

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Rasa nyeri merupakan perasaan yang tidak menyenangkan dan merupakan pengalaman emosional yang ditandai dengan potensi kerusakan jaringan, nyeri merupakan salah satu aspek penting dalam bidang medis dan menjadi penyebab tersering yang mendorong seseorang untuk mencari pengobatan” (Hartwig,2012). Pengobatan yang umum digunakan untuk mengatasi nyeri adalah obat analgetik. Analgetik adalah senyawa yang dapat menekan fungsi susunan saraf pusat secara selektif, digunakan untuk mengurangi rasa sakit tanpa mempengaruhi kesadaran. Analgesik termasuk dalam golongan *non steroid anti-inflammatory drugs* (NSAIDs) yang bekerja dengan cara menghambat enzim *cyclooxygenase* (COX), sehingga konversi asam arakidonat menjadi *prostaglandin E2* (PGE2) terhambat. Namun penggunaan analgesik juga memiliki beberapa keterbatasan contohnya pada penggunaan NSAID yang dapat mengiritasi saluran cerna, berefek samping pada ginjal dan hati, gangguan fungsi trombosit serta penggunaan opioid yang dapat mengakibatkan ketergantungan (Wirasuta,2007).

Pengobatan herbal masih digunakan sebagai pengobatan utama di negara berkembang karena obat herbal lebih dapat diterima, lebih terjangkau, dan memiliki efek samping yang ringan. Indonesia terkenal sebagai Negara yang kaya akan tumbuhan obat, salah satunya adalah gandasuli (*Hedycium coronarium* J. Koenig) yang merupakan tumbuhan asli Indonesia yang dikenal dengan nama gandasuli dari famili Zingiberaceae. Kandungan senyawa aktif dalam gandasuli telah terbukti memiliki efek antioksidan, anti inflamasi (Pachurekar,2017).

Agar obat tradisional dengan bahan baku ekstrak etanol rimpang gandasuli ini dapat menjadi obat herbal terstandar, maka perlu juga dilakukan uji praklinik berupa uji keamanan yang mencakup uji toksisitas akut dari ekstrak. Uji toksisitas akut merupakan bagian dari uji praklinik yang

dirancang untuk mengukur efek toksik suatu senyawa. Toksisitas akut mengacu pada efek toksik yang terjadi setelah pemberian oral dosis tunggal dalam selang waktu 24 jam. Dosis letal atau LD₅₀ merupakan tolak ukur statistik setelah pemberian dosis tunggal yang sering dipergunakan untuk menyatakan tingkatan dosis toksik sebagai data kuantitatif. Sedangkan gejala klinis, gejala fisiologis dan mekanisme toksik sebagai data kualitatifnya (Jenova, 2009).

Dalam penentuan nilai LD₅₀ metode yang dapat digunakan salah satunya adalah metode Thompson-Weil dimana metode ini menggunakan daftar perhitungan LD₅₀ yang terdapat pada table biometrik Thomson-weil. Metode ini dipilih dikarenakan mempunyai tingkat kepercayaan yang cukup tinggi, hasil yang akurat, dan tidak memerlukan hewan coba yang cukup banyak. Oleh karena itu penulis tertarik untuk membuat ekstrak etanol terstandar dari simplisia ini lengkap dengan pengujian spesifik dan non spesifik simplisia dan diharapkan data tersebut dapat menjadi acuan bagi peneliti yang ingin menjadikan tumbuhan ini menjadi obat herbal terstandar. setelah proses standarisasi ekstrak dan simplisia, penelitian dilanjutkan untuk melihat aktivitas analgetik dari ekstrak etanol simplisia gandasuli yang diujikan terhadap mencit putih jantan (*Mus musculus.*) dengan menggunakan metoda Hot Plate dan dilanjutkan dengan pengujian toksisitas akut dari tumbuhan rimpang Gandasuli dengan penentuan nilai LD 50 (*Lethal dose*), tentunya semua data dari persiapan simplisia sampai dengan standarisasi pembuatan ekstrak dibutuhkan agar didapatkannya hasil yang optimal dalam pengujian aktivitas dan toksisitas akut, bahkan prosedur kerja dari pembuatan ekstrak dapat menjadi acuan bagi peneliti jika mendapatkan hasil yang optimal, selain itu penelitian ini agar simplisia dapat sebagai pengganti obat sintesis di masyarakat dan dapat menjadi alternatif pengobatan secara herbal.

Penelitian dilakukan dengan beberapa tahapan. Tahap yang pertama yaitu dengan menyiapkan simplisia di ekstraksi dengan metoda maserasi, dilanjutkan dengan standarisasi ekstrak simplisia dan ekstrak yang telah terstandarisasi tersebut dilakukan pengujian aktivitas analgesik dan

toksitasnya terhadap hewan uji. Data hasil pengamatan dianalisis dengan uji Anova. Luaran dari penelitian ini adalah dihasilkan sebuah tesis dan sebuah artikel yang dimuat pada jurnal nasional terakreditasi.

B. Rumusan Masalah

- 1 Apakah pemberian ekstrak etanol rimpang gandasuli (*Hedygium coronarium* J. Koenig) terstandarisasi memiliki efek analgetik terhadap mencit putih jantan (*Mus musculus*) ?
- 2 Apakah ekstrak etanol rimpang gandasuli (*Hedygium coronarium* J. Koenig) terstandarisasi memiliki efek toksik terhadap hewan uji berdasarkan dari nilai LD₅₀ ?
- 3 Bagaimana pengaruh dosis pemberian ekstrak etanol rimpang gandasuli (*Hedygium coronarium* J. Koenig) terhadap efek analgetik pada mencit putih jantan (*Mus musculus*) ?
- 4 Berapakah nilai LD₅₀ ekstrak etanol rimpang gandasuli (*Hedygium coronarium* J. Koenig) pada mencit putih jantan (*Mus musculus*).?

C. Hipotesa

- 1 Adanya efek analgetik setelah pemberian ekstrak etanol rimpang gandasuli (*Hedygium coronarium* J. Koenig) yang terstandarisasi terhadap mencit putih jantan (*Mus musculus*) (H1).
- 2 Berdasarkan nilai LD₅₀, ekstrak etanol rimpang gandasuli (*Hedygium coronarium* J. Koenig) memiliki tingkat toksisitas yang relatif aman.

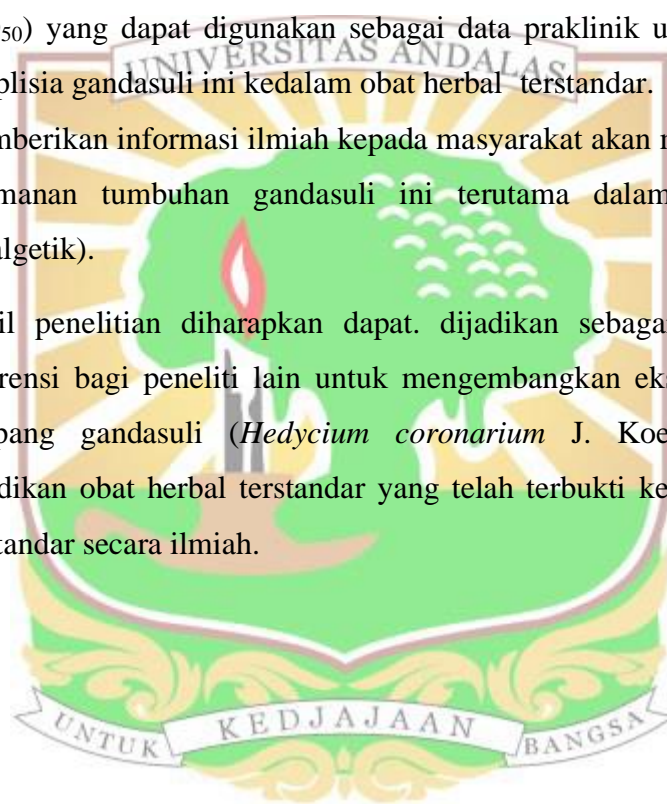
D. Tujuan Penelitian

- 1 Membuktikan adanya efek analgetik dari ekstrak etanol rimpang gandasuli (*Hedygium coronarium* J. Koenig) yang terstandarisasi terhadap mencit putih jantan (*Mus musculus* L).
- 2 Melihat tingkat keamanan toksisitas dari ekstrak etanol rimpang gandasuli (*Hedygium coronarium* J. Koenig) berdasarkan nilai LD₅₀.
3. Untuk mengetahui adanya pengaruh dosis ekstrak etanol rimpang gandasuli (*Hedygium coronarium* J. Koenig) terstandarisasi terhadap efek analgetik yang ditimbulkan pada mencit putih jantan (*Mus musculus* L)

4 Memenuhi parameter standarisasi, efikasi dan keamanan ekstrak etanol rimpang gandasuli (*Hedycium coronarium* J. Koenig) agar dapat diangkat menjadi obat herbal terstandar.

E. Manfaat Penelitian

1. Menyediakan data untuk pengembangan lebih lanjut ekstrak etanol rimpang gandasuli (*Hedycium coronarium* J. Koenig) dan dapat menambah referensi perpustakaan Universitas Andalas sebagai wahana ilmu pengetahuan dan teknologi.
2. Untuk mengukur tingkat keamanan ekstrak berdasarkan efek toksisitas akut (LD_{50}) yang dapat digunakan sebagai data praklinik untuk pengembangan simplisia gandasuli ini kedalam obat herbal terstandar.
3. Memberikan informasi ilmiah kepada masyarakat akan mamfaat, khasiat dan keamanan tumbuhan gandasuli ini terutama dalam pengobatan nyeri (analgetik).
4. Hasil penelitian diharapkan dapat. dijadikan sebagai bahan acuan dan referensi bagi peneliti lain untuk mengembangkan ekstrak terstandar dari rimpang gandasuli (*Hedycium coronarium* J. Koenig) untuk dapat dijadikan obat herbal terstandar yang telah terbukti keamanan, efikasi dan terstandar secara ilmiah.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Botani Tumbuhan Gandasuli (*Hedycium coronarium* J. Koenig)

1. Klasifikasi Tumbuhan Gandasuli.

Dalam sistem taksonomi, gandasuli diklasifikasikan sebagai berikut (Wongsuwan P,2011) :

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Magnoliophyta
Kelas	: Liliopsida
Ordo	: Zingiberales
Famili	: Zingiberaceae
Genus	: Hedychium
Species	: <i>Hedychium coronarium</i> , J. Koenig

2. Nama Daerah .

Di Indonesia gandasuli terdapat beberapa nama tergantung daerah tempat tumbuhan ini tumbuh, diantaranya

- a. Jawa: kembang laras (Jawa), gondasuli, gandasoli (Sunda)
- b. Nusa tenggara: mandasul (Bali), manasuli.
- c. Maluku: dagasuli, dagahuli (Halmahera Utara)
- d. Sumatera: gondasuli (Melayu), gandasuli, dugahuli (Batak), Rimpang talerang (Minang).

3. Anatomi Dan Morfologi

Tumbuhan gandasuli merupakan salah satu jenis tumbuhan dari keluarga suku jahe-jahean (Zingiberaceae). Jenis ini berupa tumbuhan herba menahun, dengan rhizoma, membentuk rumpun. Rhizoma cenderung pendek dan dari sana muncul teruk berdaun mencapai tinggi hingga 3 m. Daun tersusun selang-seling dengan bentuk helaian lanset,

berukuran hingga 60×11 cm, berwarna hijau dan pucat di permukaan bawahnya. Bunga tersusun dalam rangkaian perbungaan yang muncul dari ujung teruk berdaun dengan ukuran total hingga 20×11 cm dengan daun pelindung yang bertumpukan rapat, saling beririsan, berbentuk bundar telur, berukuran $40\text{--}60 \times 20\text{--}30$ cm dan biasanya bertekstur tebal, masing-masing daun pelindung dengan 2 hingga 6 bunga. Bunga hampir warna putih dan beraroma yang harum, kelopak menyatu dan terbelah di satu sisi, mahkota dengan tabung hingga sepanjang 7 cm, benang sari steril 3–5 cm panjangnya, bibir bunga biasanya terbelah di ujungnya, 3.5×5 cm dengan warna kekuningan di bagian tengah. Benang sari fertil tunggal dengan kepala sepanjang 12 mm. Tumbuhan gandasuli berkembang biak dengan rimpang. Habitat tumbuhan gandasuli berada pada dataran rendah hingga ketinggian 2500 mdpl dengan sinar matahari yang cukup dan curah yang sedang (Silalahi, 2018).

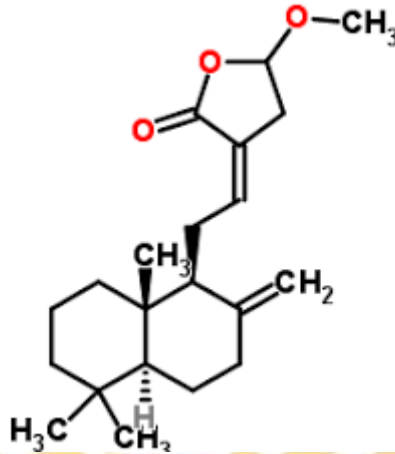


Gambar 1. Tumbuhan gandasuli (*Hedycium coronarium*, J. Koenig)

4. Kandungan Kimia Dan Kegunaan Tumbuhan Gandasuli

Senyawa-senyawa metabolit sekunder yang diketahui dari jenis ini antara lain etil heksadekanoat, tetradekanol, benzil alkohol, α -farnesene, linalool, borneol, γ -cadinene, camphene, carvacrol, β -caryphyllene, β -cedrene, 1,8-cineole, ar-curcumene, p-cymene, dehidroaromadendran, 10-epi- γ -eudesmol, β -eudesmol, germacrene D, limonene, (E)-nerolidol, α -pinene, β -pinene, sabinene, β -selinene, terpin-4-ol, alfa terpineol, hedychiols A, hedychiols B 8,9-diasetat, β -sitosterol, stigmasterol, daucosterol, isocoronarin D, benzoil eugenol, coronarin (A-D), coronarin D

metil eter, coronarin H, kriptomeridiol, docosyl-(E))-ferulate, eicosil, etoksikoronarin D, hedyokenon, hedychilactones (A-C), hedyforrestin C, pacovatin A, dan α -thujene (Silalahi,2018).



Gambar 2. Struktur kimia (coronarin D metil eter) pada tumbuhan gandasuli

B. Tinjauan Tentang Simplisia

Simplisia adalah bahan alamiah yang digunakan sebagai obat, belum mengalami pengolahan apapun, umumnya dalam keadaan kering, langsung digunakan sebagai obat dalam atau banyak digunakan sebagai obat dalam sediaan galenik tertentu atau digunakan sebagai bahan dasar untuk memperoleh bahan baku obat. Sedangkan sediaan galenik berupa ekstrak total mengandung 2 atau lebih senyawa kimia yang mempunyai aktifitas farmakologi dan diperoleh sebagai produk ekstraksi bahan alam serta langsung digunakan sebagai obat atau digunakan setelah dibuat bentuk formulasi sediaan obat tertentu yang sesuai (Depkes RI,1995).

Dalam buku "Materia Medika Indonesia" ditetapkan definisi bahwa simplisia adalah bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga dan kecuali dikatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan (Depkes RI, 2000).

C. Klasifikasi Simplisia (Depkes RI.1995)

Simplisia dibagi menjadi 3 golongan yaitu: simplisia nabati, simplisia hewani, dan simplisia pelikan (mineral).

1. Simplisia Nabati

Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tumbuhan utuh, bagian tumbuhan/eksudat tumbuhan. Yang dimaksud dengan eksudat tumbuhan adalah isi sel yang secara spontan keluar dari tumbuhan atau yang dengan cara tertentu dikeluarkan dari selnya, atau zat-zat nabati lainnya yang dengan cara tertentu dipisahkan dari tumbuhannya.

2. Simplisia Hewani

Simplisia hewani adalah simplisia yang berupa hewan utuh, bagian hewan atau zat-zat berguna yang dihasilkan oleh hewan dan belum berupa zat kimiamurni.

3. Simplisia Mineral

Simplisia pelikan atau mineral adalah simplisia yang berupa bahan pelikan atau mineral yang belum diolah dengan cara sederhana dan belum berupa zat kimia murni.

D. Tahap Pembuatan

Pembuatan simplisia dilakukan tahapan seperti berikut : pengumpulan bahan baku, sortasi basah, pencucian, perajangan, pengeringan, penyimpanan dan pemeriksaan mutu (Sirait. 1985)

1. Pengumpulan Bahan Baku

Kadar senyawa aktif dalam suatu simplisia berbeda-beda antara lain tergantung pada:

- a. Bagian tumbuhan yang digunakan
- b. Umur tumbuhan atau bagian tumbuhan pada saat panen
- c. Waktu panen
- d. Lingkungan tempat tumbuh

Waktu panen sangat erat hubungannya dengan pembentukan senyawa aktif didalam bagian tumbuhan yang akan dipanen. Waktu panen yang tepat pada saat bagian tumbuhan tersebut mengandung

senyawa aktif dalam jumlah terbesar. Senyawa aktif terbentuk secara maksimal didalam bagian tumbuhan atau pada umur tertentu.

2. Sortasi Basah

Sortasi basah dilakukan untuk menghilangkan kotoran-kotoran atau bahan-bahan asing lainnya dari bahan simplisia. Misalnya pada simplisia yang dibuat dari akar suatu tumbuhan obat, bahan-bahan asing seperti tanah, serta pengotoran lainnya harus dibuang. Tanah mengandung bermacam-macam mikroba dalam jumlah yang tinggi, oleh karena itu pembersihan simplisia dari tanah yang terikut dapat mengurangi jumlah mikroba awal.

3. Pencucian

Pencucian dilakukan untuk menghilangkan tanah dari pengotoran lainnya yang melekat pada simplisia. Pencucian dilakukan dengan air bersih, misalnya air dari mata air, air sumur atau air PAM. Bahan simplisia yang mengandung zat yang mudah larut di dalam air yang mengalir, pencucian agar dilakukan dalam waktu sesingkat mungkin. Cara sortasi dan pencucian sangat mempengaruhi jenis dan jumlah awal mikroba dalam simplisia.

4. Perajangan

Beberapa jenis bahan simplisia perlu mengalami prases perajangan. Perajangan bahan simplisia dilakukan untuk mempermudah proses pengeringan, pengepakan dan penggilingan. Tumbuhan yang baru diambil, jangan langsung dirajang tetapi di jemur dalam keadaan utuh selama 1 hari. Perajangan dapat dilakukan dengan pisau, dengan alat mesin perajang khusus sehingga diperoleh irisan tipis atau potongan dengan ukuran yang dikehendaki. Semakin tipis bahan yang akan dikeringkan, semakin cepat penguapan air, sehingga mempercepat waktu pengeringan. Akan tetapi irisan yang terlalu tipis juga dapat menyebabkan berkurangnya atau hilangnya zat berkhasiat yang mudah menguap, sehingga mempengaruhi komposisi, bau dan rasa yang diinginkan.

5. Pengeringan

Tujuan pengeringan ialah untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak, sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama. Dengan mengurangi kadar air dan menghentikan reaksi enzimatik akan dicegah penurunan mutu atau kerusakan simplisia. Pengeringan simplisia dilakukan dengan menggunakan suatu alat pengering. Hal-hal yang perlu diperhatikan selama proses pengeringan adalah suhu pengeringan, kelembaban udara, aliran udara, waktu pengeringan dan luas permukaan bahan.

6. Sortasi Kering

Sortasi setelah pengeringan sebenarnya merupakan tahap akhir pembuatan simplisia. Tujuan sortasi untuk memisahkan benda-benda asing seperti bagian-bagian tumbuhan yang tidak diinginkan dan pengotoran- pengotor lainnya yang masih ada dan tertinggal pada simplisia kering. Proses ini dilakukan sebelum simplisia dibungkus untuk kemudian disimpan. Seperti halnya pada sortasi awal, sortasi disini dapat dilakukan dengan atau secara mekanik.

7. Pengepakan Dan Penyimpanan

Simplisia dapat rusak, mundur atau berubah mutunya karena berbagai faktor luar dan dalam, antara lain : cahaya, oksigen udara, reaksi kimia intern, dehidrasi, penyerapan air, pengotoran, serangga, dan kapang. Selama penyimpanan ada kemungkinan terjadi kerusakan pada simplisia. Kerusakan tersebut dapat mengakibatkan kemunduran mutu, sehingga simplisia bersangkutan tidak lagi memenuhi syarat yang diperlukan atau yang ditentukan. Oleh karena itu pada penyimpanan simplisia perlu diperhatikan beberapa hal yang dapat mengakibatkan kerusakan simplisia, yaitu cara pengepakan, pembungkusan dan pewadahan, persyaratan gudang simplisia, cara sortasi dan pemeriksaan mutu, serta cara pengawetannya. Penyebab kerusakan pada simplisia yang utama adalah air dan kelembaban.

8. Pemeriksaan Mutu

Pemeriksaan mutu simplisia dilakukan pada waktu penerimaan atau pembeliannya dari pengumpul atau pedagang simplisia. Simplisia yang diterima harus berupa simplisia murni dan memenuhi persyaratan umum untuk simplisi seperti yang disebutkan dalam buku Farmakope Indonesia, ekstra Farmakope Indonesia ataupun Materia Medika Indonesia edisi terakhir. Apabila untuk simplisia yang bersangkutan terdapat paparannya dalam salah satu atau ketiga buku tersebut, maka simplisia tadi harus memenuhi persyaratan yang disebutkan pada paparannya. Suatu simplisia dapat dinyatakan bermutu Farmakope Indonesia, ekstra Farmakope Indonesia ataupun Materia Medika Indonesia, apabila simplisia bersangkutan memenuhi persyaratan yang disebutkan dalam buku-buku yang bersangkutan. Pada pemeriksaan mutu simplisia pemeriksaan dilakukan dengan cara organoleptik, makroskopik dan atau cara kimia. Beberapa jenis simplisia tertentu ada yang perlu diperiksa dengan uji mutu secara biologi.

E. Tinjauan Tentang Standardisasi

Standardisasi simplisia mempunyai pengertian bahwa simplisia yang akan digunakan sebagai bahan baku obat harus memenuhi persyaratan yang tercantum dalam monografi terbitan resmi pemerintah sebagai pihak pembina dan pengawasan yang meliputi makroskopis, mikroskopis (iris dan serbuk) serta kimia (Depkes RI, 2000).

F. Parameter Standarisasi Simplisia

1. Parameter Non Spesifik

Parameter non spesifik merupakan tolok ukur baku yang dapat berlaku untuk semua jenis simplisia, tidak khusus untuk jenis simplisia dari tumbuhan tertentu ataupun jenis proses yang telah dilalui. Ada beberapa parameter nonspesifik yang ditetapkan untuk simplisia dalam penelitian ini antara lain penetapan kadar abu, penetapan kadar abu yang tidak larut dalam asam, penetapan kadar abu yang larut dalam air,

penetapan kadar air dan penetapan susut pengeringan (Depkes RI, 2000).

a. Parameter Kadar Abu

- 1). Pengertian dan prinsip : Bahan dipanaskan pada temperatur dimana senyawa organik dan turunannya terdestruksi dan menguap. Sehingga tinggal unsur mineral dan anorganik.
- 2). Tujuan : Memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal yang berasal dari proses awal sampai terbentuknya simplisia.
- 3). Nilai : Maksimal atau rentang yang diperbolehkan. Terkait dengan kemurnian dan kontaminasi.

b. Parameter Kadar Sari Larut Dalam Pelarut Tertentu (Etanol Dan Air)

- 1) Pengertian dan prinsip : Melarutkan simplisia dengan pelarut (alkohol atau air) untuk ditentukan jumlah solut yang identik dengan jumlah senyawa kandungan secara gravimetri. Dalam hal tertentu dapat diukur senyawa terlarut dalam pelarut lain misalnya heksana, diklorometan, metanol.
- 2). Tujuan : Memberikan gambaran awal jumlah senyawa kandungan.
- 3). Nilai : Nilai minimal atau rentang yang telah ditetapkan terlebih dahulu.

c. Parameter Susut Pengeringan

- 1). Pengertian dan prinsip : Pengukuran sisa zat setelah pengeringan pada temperatur 105°C selama 30 menit atau sampai berat konstan, yang dinyatakan sebagai nilai proses. Dalam hal khusus (jika bahan tidak mengandung minyak menguap/atsiri dan sisa

pelarut organik menguap) identik dengan kadar air, yaitu kandungan air karena berada di atmosfer/lingkungan udara terbuka.

2). Tujuan : Memberikan batasan maksimal (rentang) tentang besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan.

3). Nilai : Minimal atau rentang yang diperbolehkan. Terkait dengan kemurnian dan kontaminasi.

d. Parameter Kadar Air

1). Pengertian dan prinsip: Pengukuran kandungan air yang berada didalam bahan, dilakukan dengan cara tepat diantara titrasi, destilasi atau gravimetri.

2). Tujuan : Memberikan batasan minimal atau rentang tentang besarnya kandungan air didalam bahan.

3). Nilai : Maksimal atau rentang yang diperbolehkan. Terkait dengan kemurnian dan kontaminasi.

e. Parameter Kadar Total Golongan Kandungan Kimia

1). Pengertian dan prinsip: Dengan penerapan metode spektrofotometri, titrimetri, volumetri, gravimetri, atau lainnya, dapat ditetapkan kadar golongan kandungan kimia. Metode harus sudah teruji validitasnya, terutama selektivitas dan batas linearitas.

2). Tujuan : Memberikan informasi kadar golongan kandungan kimia sebagai parameter mutu simplisia dalam kaitannya dengan efek farmakologis.

3). Nilai : Minimal atau rentang yang telah ditetapkan

f. Parameter Cemar Logam Berat

- 1). Pengertian dan prinsip : Menentukan kandungan logam berat spektroskopi serapan atom atau lainnya yang lebih valid.
- 2). Tujuan : Memberikan jaminan bahwa ekstrak tidak mengandung logam berat tertentu (Hg,As,Cd,Pb, dll) melebihi nilai yang ditetapkan karena berbahaya (toksik) bagi kesehatan.
- 3). Nilai : Maksimal atau rentang yang diperbolehkan.

g. Parameter Sisa Pestisida

- 1). Pengertian dan prinsip : Menentukan kandungan sisa pestisida yang mungkin saja pernah ditambahkan atau mengkontaminasi pada bahan simplisia.
- 2). Tujuan : Memberikan jaminan bahwa ekstrak tidak mengandung pestisida melebihi nilai yang ditetapkan karena berbahaya (toxic) bagi kesehatan.
- 3). Nilai : Maksimal atau rentang yang diperbolehkan.
Terkait dengan kontaminasi sisa pertanian.

h. Uji ALT (Angka Lempeng Total) (Nataya, 2015)

Menurut WHO pada tahun 2011, Angka Lempeng Total (ALT) disebut juga angka lempeng heterotropik (*Heterotropic Plate Count/HPC*) merupakan indikator keberadaan mikroba heterotropik termasuk bakteri dan kapang yang sensitif terhadap proses desinfektan seperti bakteri coliform, mikroba resisten desinfektan seperti pembentuk spora dan mikroba yang dapat berkembang cepat pada air olahan tanpa residu desinfektan. Meski telah mengalami proses desinfeksi yang berbeda, umum bagi mikroba tumbuh selama

perlakuan (treatment) dan distribusi dengan konsentrasi berkisar 10^4 - 10^5 sel/ml. Nilai ALT bervariasi tergantung berbagai faktor diantaranya kualitas sumber air, jenis perlakuan, konsentrasi residu desinfektan, lokasi sampling, suhu air mentah, waktu pengujian, metode uji meliputi suhu dan waktu inkubasi (Martoyo,dkk, 2014).

Metode kuantitatif digunakan untuk mengetahui jumlah mikroba yang ada pada suatu sampel, umumnya dikenal dengan ALT. Uji Angka Lempeng Total yang lebih tepatnya ALT aerob mesofil atau anaerob mesofil menggunakan media padat dengan hasil akhir berupa koloni yang dapat diamati secara visual berupa angka dalam koloni CFU (*Colony Forming Unit*) per ml/g atau koloni/100ml. Prinsip pengujian ALT menurut Metode Analisis Mikrobiologi (MA PPOMN nomor 96/mik/00) yaitu pertumbuhan koloni bakteri aerob mesofil setelah cuplikan diinokulasikan pada media lempeng agar dengan metode pour plate dan diinkubasi pada suhu yang sesuai. Pada pengujian ALT menggunakan media PCA (*Plate Count Agar*) sebagai media padatnya. (BPOM RI, 2008).

Cara menyatakan hasil untuk nilai Angka Lempeng Total sesuai dengan ketentuan dari MA PPOMN No.95/MIK/00 adalah sebagai berikut :

1. Cawan petri yang dipilih adalah cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25-250 setiap cawan. Semua koloni dalam cawan petri dihitung. Jumlah koloni dihitung rata-rata dan dikalikan dengan faktor pengenceran. Hasilnya dinyatakan sebagai jumlah bakteri per mililiter atau gram.
2. Jika salah satu dari dua cawan petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 atau lebih besar dari 250, jumlah koloni dihitung, dirata-rata, dan dikalikan dengan faktor pengenceran. Hasilnya dinyatakan sebagai jumlah bakteri per mililiter atau gram.
3. Jumlahnya berturut-turut terletak antara 25-250 koloni, jumlah koloni dari masing-masing pengenceran dihitung seperti yang

- disebut pada butir a dan butir b diatas, dan dihitung rata-rata jumlah koloni dari kedua pengenceran tersebut. Jika jumlah yang tertinggi lebih besar dari dua kali jumlah yang terkecil, nyatakan jumlah yang lebih kecil sebagai jumlah bakteri per mililiter atau gram.
4. Jika rata-rata jumlah koloni masing-masing cawan petri tidak terletak antara 25-250 koloni, hitung jumlah koloni seperti pada butir a dan butir b diatas, dan nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan per mililiter atau gram.
 5. Jika jumlah koloni dari semua pengenceran lebih dari 250 koloni, maka setiap dua cawan petri dengan pengenceran tertinggi dibagi ke dalam 2, 4, atau 8 sektor. Jumlah koloni dihitung dalam satu bagian atau lebih. Untuk mendapatkan jumlah koloni dalam satu cawan petri, dihitung rata-rata jumlah koloni dan dikalikan dengan faktor pembagi dan pengenceran. Hasil dinyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan per mililiter atau gram.
 6. Jika dalam 1/8 bagian cawan petri terdapat lebih dari 200 koloni, maka jumlah koloni yang didapat = 8×200 (1600), dikalikan dengan faktor pengenceran dan hasilnya dinyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan per mililiter atau gram lebih besar dari jumlah yang didapat (lebih besar dari $1600 \times$ faktor pengenceran).
 7. Jika tidak ada koloni yang tumbuh dalam cawan petri, dinyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari satu dikalikan dengan pengenceran yang terendah (<10).
 8. Menghitung koloni perambat (Spreader)

Ada 3 macam koloni perambatan pada koloni, yaitu :

 - a. Merupakan rantai yang tidak terpisah-pisah
 - b. Perambatan yang terjadi diantara dasar cawan petri dan perbenihan
 - c. Perambatan yang terjadi pada pinggir atau permukaan perbenihan Apabila terjadi hanya 1 (satu) perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap 1 (satu). Tetapi bila 1 atau lebih

rantai terbentuk dan yang berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka setiap sumber dihitung sebagai 1 (satu) koloni. Bila (2) dan (3) terjadi maka sebaiknya pemeriksaan diulangi karena koloni dalam keadaan semacam ini agak sukar dihitung.

9. Menghitung dan membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka yang pertama dan kedua (dimulai dari kiri), sedangkan angka ketiga diganti dengan 0, apabila kurang dari 5 dan apabila 5 atau lebih dijadikan 1 yang ditambah pada angka yang kedua.

Cara menganalisis hasil pengujian sesuai dengan (PPOMN,2006), yaitu Cawan petri yang menunjukkan jumlah koloni antara 10-150 dari satu pengenceran dipilih dan dihitung jumlah koloni dari kedua cawan lalu dikalikan dengan faktor pengencerannya. Bila pada cawan petri dari dua tingkat pengenceran yang berurutan menunjukkan jumlah antara 10-150, maka dihitung jumlah koloni dan dikalikan faktor pengenceran, kemudian diambil angka rata-rata. Hasil dikalikan sebagai Angka Kapang/Khamir dalam tiap gram atau mL sampel. Untuk beberapa kemungkinan lain yang berbeda dari pernyataan diatas, maka diikuti petunjuk sebagai berikut:

i. Uji Kapang/Khamir (Meylisa, 2016)

Salah satu media agar yang dapat digunakan pada pengujian angka kapang / khamir adalah SCA (*Simmons Citrate Agar*) atau PDA (*Potato Dextrose Agar*) yang mengandung ekstrak *potato*, *glucose*, agar. Glukosa dan kentang merupakan sumber energi untuk memproduksi konidia dari kapang/khamir. Agar merupakan polisakarida asam yang diekstraksi dari ganggang merah tertentu. Sel-sel yang terletak diatas atau pembedihan padat tidak dapat bergerak. Karena itu, jika beberapa sel diletakkan dalam atau pada pembedihan, maka tiap sel akan tumbuh dan membentuk sebuah koloni yang terpisah. Media PDA direkomendasikan untuk menumbuhkan dan

menghitung kapang dan khamir dalam *butter* dan produk makanan lainnya. Menurut (Radji,2010) kapang dan khamir dapat tumbuh pada rentang pH pertumbuhan bakteri (6,5 hingga 7,5), namun pertumbuhan optimumnya pada pH 5-6, sehingga media yang digunakan cocok untuk pertumbuhan kapang dan khamir. Penanaman koloni kapang/khamir pada media menggunakan metode tabur (*pour plate*). Media steril cair dituang pada cawan petri yang sudah berisi suspensi sampel kemudian didinginkan hingga mengeras. Selanjutnya petri yang berisi agar tersebut diinkubasi selama 5 hari pada suhu 25⁰C. Suhu inkubasi kapang/khamir adalah 25⁰C karena Kapang/Khamir bersifat mesofilik yang dapat tumbuh pada suhu 25-30⁰C. Inkubasi terbalik dilakukan agar uap air yang terbentuk selama inkubasi tidak menetes ke media dan mempengaruhi pertumbuhan mikroba.

Pertumbuhan kapang mudah dilihat karena penampakkannya yang berserabut seperti kapas. Pertumbuhannya mula-mula akan berwarna putih, tetapi jika spora telah timbul akan terbentuk berbagai warna tergantung jenis kapang. Sedangkan khamir berbentuk bulat, bulat telur atau seperti silinder. Koloni yang dihitung yaitu koloni khamir yang berbentuk bulat, berwarna putih dan terpisah serta koloni kapang yang memiliki serabut putih seperti kapas tanpa membedakan tiap warna koloni serta tunggal. Jika terdapat koloni yang bertumpuk maka dianggap sebagai 1 koloni (Radji, 2010).

Cara menganalisis hasil pengujian sesuai dengan (PPOMN, 2006), yaitu : Cawan petri yang menunjukkan jumlah koloni antara 10-150 dari satu pengenceran dipilih dan dihitung jumlah koloni dari kedua cawan lalu dikalikan dengan faktor pengencerannya. Bila pada cawan petri dari dua tingkat pengenceran yang berurutan menunjukkan jumlah antara 10- 150, maka dihitung jumlah koloni dan dikalikan faktor pengenceran, kemudian diambil angka rata-rata. Hasil dikalikan sebagai Angka Kapang/Khamir dalam tiap gram atau mL sampel.

Untuk beberapa kemungkinan lain yang berbeda dari pernyataan diatas, maka diikuti petunjuk sebagai berikut:

1. Bila hanya salah satu diantara kedua cawan petri dari pengenceran yang sama menunjukkan jumlah antara 10-150 koloni, dihitung jumlah koloni dari kedua cawan dan dikalikan dengan faktor pengenceran.
2. Bila pada ~~tingkat~~ pengenceran yang lebih tinggi didapat jumlah koloni lebih besar dari dua kali jumlah koloni pada pengenceran dibawahnya, maka dipilih tingkat pengenceran terendah (Misal: pada pengenceran 10^{-2} diperoleh 60 koloni dan pada pengenceran 10^{-3} diperoleh 30 koloni, maka dipilih jumlah koloni pada pengenceran 10^{-2} yaitu 60 koloni). Bila pada pengenceran yang lebih tinggi didapat jumlah koloni kurang dari dua kali jumlah koloni pengenceran dibawahnya, maka diambil angka rata-rata dari jumlah koloni dari kedua pengenceran tersebut. Hasil dinyatakan sebagai Angka Kapang dan Khamir dalam tiap gram sampel (Misal pada pengenceran 10^{-2} diperoleh 60 koloni dan pada pengenceran 10^{-3} diperoleh 10 koloni, maka Angka Kapang/Khamir adalah: $x = \frac{6+10}{2} \times 10^3 = 8 \times 10^3$
3. Bila dari seluruh cawan petri tidak ada satupun yang menunjukkan jumlah antara 10-150 koloni, maka dicatat angka sebenarnya dari tingkat pengenceran terendah dan dihitung sebagai Angka Kapang/Khamir Perkiraan.
4. Bila tidak ada pertumbuhan pada semua cawan dan bukan disebabkan karena faktor inhibitor, maka Angka Kapang/Khamir dilaporkan sebagai kurang dari satu dikalikan faktor pengenceran terendah ($<1 \times$ faktor pengenceran terendah).

2. Parameter Spesifik

Parameter spesifik merupakan tolok ukur khusus yang dapat dikaitkan dengan jenis tumbuhan yang digunakan dalam proses standardisasi. Parameter spesifik yang akan ditetapkan pada penelitian ini adalah identitas simplisia, uji organoleptis (pemerian), uji mikroskopik, penetapan kadar sari yang larut dalam air, penetapan kadar sari yang larut dalam etanol, penetapan kandungan minyak atsiri, dan penetapan kadar bahan aktif simplisia (Depkes RI,2000).

a. Identitas Simplisia

Parameter identitas simplisia meliputi nama latin tumbuhan (sistematika botani), bagian tumbuhan yang digunakan, dan nama daerah tumbuhan. Penentuan parameter ini dilakukan untuk memberikan identitas objektif dari nama dan spesifik dari senyawa identitas, yaitu senyawa tertentu yang menjadi petunjuk spesifik dengan metode tertentu (Depkes Ri, 2000).

b. Uji Organoleptis

Parameter organoleptis simplisia meliputi pendeskripsian bentuk, warna, bau dan rasa menggunakan panca indra. Penentuan parameter ini dilakukan untuk memberikan pengenalan awal yang sederhana dan se objektif mungkin (Depkes RI,2000).

c. Uji Mikroskopik Dan Uji Makroskopik

Dilakukan penelitian morfologi dengan mengamati daun segar yang dilakukan dengan menggunakan kaca pembesar atau tanpa menggunakan alat. Cara ini digunakan untuk mencari kekhususan morfologi, ukuran dan warna simplisia yang diuji(Depkes RI,2000).

d. Senyawa Terlarut Dalam Pelarut Tertentu

Parameter senyawa terlarut dalam pelarut tertentu ditentukan dengan cara melarutkan ekstrak dengan pelarut (alkohol atau air) untuk ditentukan jumlah solut yang identik dengan jumlah senyawa kandungan secara gravimetri. Dalam hal tertentu dapat diukur senyawa yang terlarut dalam pelarut lain, misalnya heksana, diklorometan, metanol. Penentuan parameter ini dilakukan untuk memberikan gambaran awal jumlah senyawa kandungan (Depkes RI, 2000).

e. Kadar Senyawa Kimia Tertentu

Dengan tersedianya kandungan kimia yang berupa senyawa identitas atau senyawa kimia ataupun kandungan kimia lainnya, maka secara kromatografi instrumental dapat dilakukan penetapan kadar kandungan kimia tersebut. Instrumen yang dapat digunakan adalah KLT-densitometer, Kromatografi Gas, *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) atau instrumen lain yang sesuai. Metode penetapan kadar harus diuji dahulu validitasnya, yakni batas deteksi, selektivitas, linieritas, ketelitian, ketepatan dan lain-lain (Depkes RI, 2000).

3. Persyaratan Parameter Spesifik Dan Non Spesifik

Parameter spesifik dan non spesifik (Depkes RI, 2014) :

- a. Kadar abu: tidak lebih dari 8%
- b. Kadar air dalam simplisia : $\leq 10\%$ bagi simplisia.
- c. Kadar abu yang tidak larut dalam asam: Tidak lebih dari 1%
- d. Kadar sari yang larut dalam etanol: Tidak kurang dari 6%
- e. Kadar sari yang larut dalam air: Tidak kurang dari 11,5 %
- f. Kadar Susut Pengeringan : tidak boleh lebih dari 12 %

Berdasarkan Monografi (WHO, 2005) :

- g. Kadar logam berat:
 - 1). Maksimum kandungan Cd = 0,3ppm
 - 2). Maksimum kandungan Pb = 10ppm
- h. Kadar cemaran pestisida: Aldrin dan Dieldrin tidak lebih dari 0,05 mg/kg
- i. Bahan tumbuhan obat dengan merebus (*decoction*):
 - 1) Bakteri aerob tidak lebih dari $10^7/g$
 - 2) Fungi tidak lebih dari $10^5/g$
 - 3) *E.coli* tidak lebih dari $10^2/g$
- j. Bahan tumbuhan obat untuk penggunaan internal:
 - 1) Bakteri aerob maksimum $10^4/g$

- 2) Khamir dan Kapang maksimum $10^3/g$ atau mL
- 3) Enterobacteriaceae dan bakteri gram negatif tidak lebih dari $10^3/g$
- 4) *Escherichia coli* maksimum $10/g$

G. Ekstraksi

1. Pengertian Ekstrak

Ekstrak merupakan sediaan kental yang diperoleh dengan cara mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani dengan menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Anonim, 1995).

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Simplisia yang akan diekstrak mengandung senyawa aktif yang dapat larut dan senyawa yang tidak dapat larut dan mempunyai struktur kimia yang berbeda-beda yang dapat mempengaruhi kelarutan dan stabilitas senyawa-senyawa tersebut terhadap suhu, udara, dan logam berat (Anonim, 2000).

Dalam mengekstraksi suatu tumbuhan sebaiknya menggunakan jaringan tumbuhan yang masih segar, namun kadang-kadang tumbuhan yang akan dianalisis tidak tersedia ditempat sehingga untuk itu jaringan tumbuhan yang akan diekstraksi dapat dikeringkan terlebih dahulu. Untuk mendapatkan ekstrak yang memenuhi standar mutu ada 2 hal yang perlu diperhatikan yakni proses pembuatan ekstrak dan metode ekstraksinya (Anonim, 2000).

2. Metode Ekstraksi

Metode ekstraksi terbagi atas 3, penggolongan metodenya sebagai berikut:

a. Ekstraksi Dengan Menggunakan Pelarut

Berdasarkan sifat ketahanan senyawa kimia yang terkandung didalam sampel terhadap suhu, ekstraksi menggunakan pelarut terbagi lagi atas 2 cara yakni cara dingin dan cara panas :

1) . Cara Dingin

Metode ini digunakan untuk senyawa yang sifatnya tidak tahan terhadap panas (termolabil). Ada 2 metode ekstraksi yang dapat dilakukan, yakni : Maserasi dimana maserasi merupakan proses pengekstrakan dengan prinsip perendaman dengan menggunakan pelarut yang sesuai dalam temperatur suhu kamar yang disertai dengan pengadukan. Pada proses maserasi ini, berlangsung proses difusi dimana akan terjadi perpindahan larutan dari konsentrasi tinggi ke konsentrasi rendah. Setelah maserasi ada metoda yang disebut Perkolasi merupakan proses pengekstrakan dengan prinsip pengaliran oleh pelarut yang umumnya dilakukan pada suhu kamar.

2) . Cara Panas

Metode ini digunakan untuk senyawa yang sifatnya tahan terhadap panas (termostabil). Jenis metode ekstraksi yang dapat dilakukan, yakni: Refluks , merupakan proses pengekstrakan dengan menggunakan pelarut pada temperatur titik didihnya selama waktu tertentu dengan jumlah pelarut sedikit/terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Setelah itu ada Soxhlet dimana Soxhlet adalah proses pengekstrakan dengan menggunakan pelarut yang selalu baru dengan menggunakan alat khusus sehingga terjadinya proses ekstraksi yang kontinu sehingga jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Selanjutnya Digesti yaitu ekstraksi yang sama seperti maserasi, namun dilengkapi dengan adanya pengadukan kontinu yang dilakukan pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur kamar. Dan Infus, infus merupakan proses pengekstrakan dengan menggunakan pelarut air pada temperatur penangas air (temperatur 96-98°C) selama lebih kurang 15 sampai 20 menit.

b. Destilasi Uap

Destilasi uap adalah proses pengekstrakan suatu bahan yang mengandung senyawa yang mudah menguap (minyak atsiri) dengan menggunakan uap air.

c. Cara Ekstraksi Lainnya

Ada beberapa cara tambahan yang dapat dilakukan untuk proses pengekstrakan suatu bahan sehingga sesuai dengan hasil yang ingin diperoleh, misalnya :

1). Ekstraksi Berkesinambungan

Ekstraksi yang dilakukan dengan menggunakan pelarut yang berbeda yang prosesnya tersusun berurutan beberapa kali. Tujuannya untuk meningkatkan jumlah pelarut dan cocok untuk ekstraksi dengan jumlah bahan yang banyak.

2). Super Kritis Karbon Dioksida

Ekstraksi ini menggunakan gas karbondioksida, dimana kita ketahui bahwa karbondioksida mudah menguap sehingga penggunaannya dapat memudahkan penghilangan cairan pelarut dan didapatkan langsung ekstrak.

3). Ekstraksi Ultrasonik

Ekstraksi yang menggunakan getaran ultrasonik, dimana getaran ultrasonik (> 20.000 Hz) ini mampu meningkatkan permeabilitas dinding sel sehingga mampu mempercepat proses ekstraksi.

H. Tinjauan Tentang Nyeri

Nyeri adalah suatu kondisi yang tidak nyaman dan menyiksa bagi penderitanya, namun terkadang nyeri dapat digunakan sebagai tanda adanya kerusakan jaringan. Inflamasi merupakan manifestasi dari terjadinya kerusakan jaringan, dimana nyeri merupakan salah satu gejalanya. (Rahardja,2007) dalam penelitiannya menyatakan bahwa “Nyeri sebagai perasaan sensoris dan emosional yang tidak enak serta berkaitan dengan kerusakan jaringan”. Nyeri sendiri berfungsi untuk mengingatkan bahwa ada sesuatu yang tidak beres pada tubuh kita dan dapat memudahkan diagnosis penyakit tersebut dengan melihat sifat dan tempat terjadinya nyeri tersebut. Walaupun nyeri merupakan

petunjuk yang berharga bagi tubuh, namun pasien merasakannya sebagai hal yang tidak mengenakan, menyiksa, dan berusaha untuk bebas darinya (Mutschler, 1991).

Nyeri akan muncul ketika rangsang mekanik, termal, kimia, atau listrik melampaui ambang tertentu (nilai ambang nyeri). Ketika terjadi rangsang nyeri dan melampaui nilai ambang nyeri, maka akan terjadi kerusakan jaringan dan pelepasan mediator-mediator nyeri. Mediator nyeri ini terdapat di seluruh jaringan dan organ tubuh, kecuali di susunan saraf pusat (SSP). Mediator-mediator nyeri yang juga disebut autokoid ini antara lain histamin, prostaglandin, serotonin, bradikinin, dan leukotrien. Mediator nyeri ini dapat menyebabkan terjadinya reaksi peradangan, kejang-kejang, dan demam (Dipiro *et al*, 2008).

Proses penghantaran nyeri terdiri atas 4 tahap yaitu stimulasi, transmisi, persepsi nyeri dan modulasi (Dipiro *et al*, 2008) :

1. Stimulasi

Stimulasi sensasi nyeri diawali dengan pembebasan reseptor nyeri akibat rangsangan mekanis, panas, dan kimia. Adanya rangsangan tersebut (noxious stimuli) akan menyebabkan lepasnya bradikinin, K⁺, prostaglandin, histamin, leukotrien, serotonin dan substansi P. Aktivasi reseptor menimbulkan aksi potensial yang ditransmisikan sepanjang serabut saraf aferen menuju sumsum tulang belakang (Dipiro *et al*, 2008) .

2. Transmisi

Transmisi rangsang nyeri terjadi di serabut aferen A δ dan C. Serabut saraf aferen tersebut merangsang serabut nyeri di berbagai lamina spinal cord's dorsal horn melepaskan berbagai neurotransmitter termasuk glutamat, substansi P, dan kalsitonin (Dipiro *et al*, 2008).

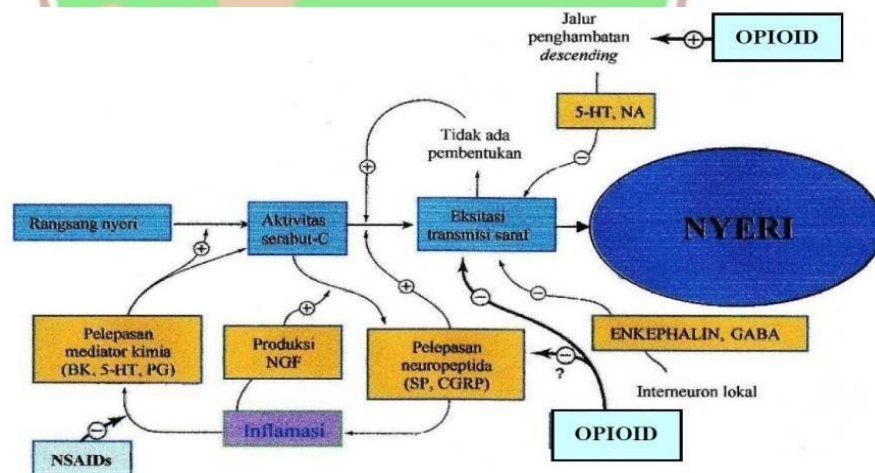
3. Persepsi

Persepsi nyeri Merupakan titik utama transmisi impuls nyeri. Otak akan mengartikan sinyal nyeri dengan batas tertentu, sedangkan fungsi kognitif dan tingkah laku akan memodifikasi nyeri sehingga tidak lebih parah. Relaksasi, pengalihan, meditasi dan berkhayal dapat mengurangi

rasa nyeri. Sebaliknya, perubahan biokimia saraf yang terjadi pada keadaan seperti depresi dan stres dapat memperparah rasa nyeri (Dipiro *et al*, 2008).

4. Modulasi

Modulasi nyeri melalui sejumlah proses yang kompleks. Telah diketahui bahwa sistem opiat endogen terdiri atas neurotransmitter-neurotransmitter (seperti enkefalin, dinorfin, dan β -endorfin dan reseptor-reseptor (seperti μ , δ , dan κ) yang ditemukan dalam sistem saraf pusat. Opioid endogen berikatan dengan reseptor opioid dan mengantarkan transmisi rangsang nyeri⁶. Faktor pertumbuhan neuron atau neuron growth factor (NGF) merupakan mediator mirip sitokin yang dihasilkan oleh jaringan di perifer terutama pada jaringan yang mengalami peradangan dan beraksi secara spesifik pada serabut saraf aferen serta meningkatkan kemosensitifitas dan kandungan senyawa peptida. Senyawa peptida dilepaskan di pusat dan di perifer sebagai mediator yang berperan penting dalam terjadinya nyeri (Rang *et al*, 2003). Proses timbulnya nyeri dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Mekanisme timbulnya nyeri

Keterangan:



= menginduksi

= menghambat

BK	=Bradikinin
5-HT	= 5-Hidroksitriptamin (serotonin)
SP	= SubstansiP
PG	=Prostaglandin
NGF	= <i>Neuron Growth Factor</i> atau Faktor Pertumbuhan
CGRP	= <i>Calcitonin gene-relatedpeptide</i>
NA	= NorAdrenalin
GABA	= <i>Gama Amino Butiric Acid</i> (asam γ - aminobutirat)

Ada tiga tipe serabut saraf yang terlibat dalam transmisi nyeri yaitu:

- Serabut A- β : berukuran besar, bermielin, cepat dalam menyalurkan impuls (30-100 m/detik), memiliki ambang nyeri yang rendah dan merespon terhadap sentuhan ringan.
- Serabut A- δ : berukuran kecil, bermielin tipis, dan memiliki kecepatan konduksi yang lebih rendah (6-30 m/detik). Serabut ini merespon terhadap tekanan, panas, zat kimia, dan memberi reaksi terhadap nyeri yang tajam, serta menimbulkan refleks penarikan diri atau gerakan cepat lainnya.
- Serabut C : berukuran kecil, tidak bermielin, dan memiliki kecepatan konduksi yang lambat (1-1,25 m/detik). Serabut ini merespon terhadap seluruh jenis rangsang bahaya dan mentransmisikan nyeri yang lambat dan tumpul.

Nyeri menurut tempat terjadinya dibagi atas nyeri somatik dan nyeri dalaman (viseral). Nyeri somatik dibagi lagi atas 2 kualitas yaitu nyeri permukaan dan nyeri dalam. Apabila rangsang bertempat dalam kulit maka rasa yang terjadi disebut nyeri permukaan. Sebaliknya nyeri yang berasal dari otot, persendian, tulang, dan jaringan ikat disebut nyeri dalam. Berdasarkan waktu terjadinya, nyeri dibedakan menjadi nyeri akut dan nyeri kronik. Nyeri akut diperantarai oleh serabut saraf A δ dengan adanya rangsang nyeri mayor (trauma fisik, infark miokard, *peptic ulcer*) dan bereaksi cepat. Nyeri persisten dapat berupa nyeri akut maupun kronis. Nyeri persisten dipengaruhi oleh sensitisasi sentral dan kerusakan jaringan perifer (Dipiro *et al*, 2008)

I. Tinjauan Mengenai Analgetik

Analgetika atau obat penghilang nyeri adalah zat-zat yang mengurangi atau menghalau rasa nyeri tanpa menghilangkan kesadaran (Tjay dan Rahardja, 2007).

Atas dasar kerja farmakologisnya, analgetika dibagi dalam dua kelompok besar, yakni :

1. Analgetika Perifer (Non-Narkotik),

Terdiri dari obat-obat yang tidak bersifat narkotik dan tidak bekerja sentral. Analgetika antiradang termasuk kelompok ini.

Secara kimiawi analgetika perifer dapat dibagi dalam beberapa kelompok, antara lain :

- a. Derivat para-aminofenol : Parasetamol.
- b. Derivat salisilat : Asetosal, Salisilamida, Benorilat.
- c. Derivat asam propionat : Ibuprofen, Naproksen, Ketoprofen,
- d. Derivat antranilat : Mefenaminat, Glafenin.
- e. Derivat pirazolon : Propifenazon, Dan Metamazol.
- f. lain-lain : Benzidamin

Parasetamol dan obat golongan anti-inflamasi non-steroid adalah analgesik pilihan pertama untuk mengatasi nyeri ringan sampai sedang. Parasetamol merupakan senyawa turunan p-aminofenol, bekerja menghambat prostaglandin secara lemah pada reseptor siklooksigenase (COX) yaitu COX-1, bersifat selektif terhadap COX-2 pada jaringan sentral dan memiliki efek perifer yang sangat kecil. Metabolit toksik parasetamol yaitu N-asetil-p- benzoquinoneimie (NAPQI) bersifat reaktif dapat berikatan dengan sel jaringan hati secara irreversible. Penggunaan parasetamol dalam dosis besar dan jangka waktu yang lama dapat menimbulkan kerusakan hati (hepatotoksik) (Burke et al, 2006).

2. Analgetika Narkotik

Khusus digunakan untuk menghalau rasa nyeri hebat, seperti kanker. Analgesik narkotik atau yang kini juga disebut opioid juga memiliki

beberapa golongan, diantaranya :

- a. morfin dan alkaloid opium
- b. meperidin dan derivat fenilpiperidin
- c. metadon dan propoksifen

Alkaloid opioid seperti morfin memiliki efek analgesik melalui aksi pada reseptor dalam sistem saraf pusat yang mana merespon terhadap peptida endogen tertentu dengan sifat farmakologi opioid-like (Katzung, 2012). Opioid yang poten seperti morfin digunakan untuk nyeri akut berat hingga nyeri kronik, termasuk nyeri pada kanker. Dengan dosis terapeutik morfin atau penggantinya yang berulang kali diberikan, secara bertahap ada efektivitas yang hilang atau disebut toleransi. Bersamaan dengan toleransi, timbul ketergantungan fisik (Katzung, 2012).

J. Tinjauan Tentang Metode Pengujian Aktivitas Analgetik

Metode-metode pengujian aktivitas analgesik bertujuan untuk menentukan secara reproduibel suatu zat uji terhadap ambang nyeri dengan mengukur respon refleksnya terhadap rangsangan syok panas, tekanan, listrik dan kimia. Induksi nyeri meliputi mekanik, elektrik dan kimia.

Percobaan dengan menggunakan hewan coba untuk menguji efek analgetik, dengan alasan hewan coba mempunyai stimulus saraf yang hampir sama dengan manusia. Metode percobaan yang dapat digunakan adalah metode stimulasi dengan panas, metode stimulasi tekanan, metode stimulasi listrik, dan metode stimulasi kimiawi atau biasa disebut *Writhing test*.

1. Metode Stimulasi Panas

Penggunaan stimulasi rangsangan panas pada metode ini diberikan secara radiasi dengan intensitas tetap. Sumber panas yang dikeluarkan secara radiasi berasal dari tegangan 6-8 volt dilengkapi dengan satu refraktor untuk memfokuskan panas lampu melalui suatu lensa menuju ujung ekor tikus yang terletak 6 inci di bawah lampu. Kelemahan metode tail flick yakni sangat melelahkan mata. Mirip dengan metode sebelumnya, penggunaan lampu dengan daya 100 watt digunakan dalam metode yang digunakan oleh Bass dan Van Der Brook. Hanya saja pada metode ini

dilakukan perekaman secara otomatis selama penyinaran pada pencatat waktu dan memudahkan pengamatan respon hewan dengan pemakaian stop watch. Selain kedua metode di atas, panas dapat pula diberikan secara konduksi dikenal dengan metode Hot Plate oleh Wolf dan Mc Donald. Hewan coba yang berupa mencit menunjukkan respon seperti menjilat kaki, mengangkat kaki, menendang kaki atau meloncat. Mencit diamati waktu untuk menimbulkan reaksi tersebut setelah diletakkan di atas hot plate yang memiliki suhu tertentu. Pada suhu 50°C hewan coba memberikan reaksi yang tak teratur, namun pada suhu 55°C waktu reaksinya 30 detik sedangkan pada suhu 60°C waktu reaksinya 20 detik. (Domer, 1971) Keuntungan dari metode stimulasi panas adalah rangsangannya alami, mudah dikontrol, tidak menyebabkan kerusakan jaringan walaupun rangsangan untuk menimbulkan rasa sakit dilakukan berkali-kali, dan dapat digunakan pada subyek yang bergerak ataupun tidak bergerak (Domer, 1971).

2. Metode Stimulasi Tekanan

Pengujian aktivitas analgesik dilakukan dengan menggunakan tekanan yang diberikan melalui suatu alat syringe dari suatu rangkaian tertutup terdiri atas suatu minyak mineral yang dihubungkan dengan pipa-T dengan syringe lain pada ekor tikus. Biasanya tekanan akan menyebabkan tikus meronta-ronta untuk melepaskan diri atau mencicit. Disisi lain, keuntungan dari metode ini adalah rangsangannya alami, mudah digunakan tanpa adanya peralatan mekanik atau elektronik yang mahal, namun terdapat kendala bahwa kontrol dan ukuran parameter stimulus yang baik sulit didapatkan tanpa adanya peralatan mekanik dan elektronik yang canggih. selain itu, metode ini hanya digunakan pada hewan coba yang tidak bergerak (sudah dibius) karena pada hewan yang bergerak akan menyulitkan kontrol dan pengukuran. (Domer, 1971).

3. Metode Stimulasi Listrik

Kera (*Macaca mulata*) digunakan untuk melaksanakan metode ini yang mana elektrode aliran listrik akan dipasang di ganglion gaseri atau telinga. Sebenarnya, stimulasi listrik dapat dilakukan dengan beberapa cara seperti melalui jaringan listrik pada lantai, dengan elektrode yang ditempelkan pada kulit, dan elektrode yang ditanam pada ganglia sensoris atau pada tempat susunan saraf pusat. Hewan coba tadi diberikan arus tertentu dan bila merasa kesakitan maka arus diturunkan satu tingkat secara otomatis sehingga dapat diukur ambang rasa sakitnya. Setelah adanya perlakuan terhadap hewan coba, percobaan diulang kembali, jika ambang rasa sakitnya meningkat maka dapat disimpulkan bahwa senyawa pada perlakuan yang diberikan pada hewan coba memiliki efek analgesik. Kekurangan dari metode ini yaitu memerlukan perlengkapan khusus dan rumit. Metode lain yang dapat digunakan selain metode di atas adalah metode pulpa gigi namun sulit dilakukan karena membutuhkan keterampilan yang tinggi (Domer, 1971).

Adanya keuntungan metode stimulasi listrik adalah stimulan dapat dikontrol menggunakan stimulator arus listrik yang dipertahankan konstan walaupun terjadi fluktuasi daya tahan subyek, dapat digunakan dan diukur dengan mudah, dapat menghasilkan rasa sakit yang hebat tanpa merusak jaringan, dapat diulang dengan interval yang sangat pendek, onsetnya cepat, dan dapat digunakan pada segala macam spesies. (Domer, 1971)

4. Metode Stimulasi Kimia

Hewan kecil seperti mencit digunakan pada metode ini dengan diberikan ransangan nyeri. Nyeri diinduksi dengan injeksi iritan kedalam rongga peritoneal mencit. Hewan tersebut bereaksi dengan perilaku peregangan yang disebut geliatan, selanjutnya dikenal dengan metode writhing test. Uji coba ini cocok untuk mendeteksi aktivitas analgesik walaupun beberapa agen psikoaktif juga menunjukkan aktivitas. Suatu agen pengiritasi seperti asam asetat, baridikinin atau asetilkolin diinjeksikan secara intra peritoneal pada mencit lalu reaksi geliatan dari

mencit dievaluasi. Metode uji aktivitas analgesik ini lebih disukai karena memberikan hubungan bertingkat antara intensitas rangsangan nyeri dan dosis senyawa yang dibutuhkan untuk menahan rangsangan nyeri sehingga dapat diperoleh estimasi kuantitas aktivitas analgesik suatu senyawa (Dyah *et al*, 2002). Pengamatan frekuensi geliat pada kelompok hewan yang diberikan senyawa uji dibandingkan dengan frekuensi geliat pada masing-masing kelompok yang diberikan standar (obat yang sudah teruji efek analgesiknya) dan plasebo (kontrol). Adanya penurunan frekuensi geliat karena suatu senyawa yang memiliki efek analgesik menggambarkan kemampuan senyawa tersebut dalam meningkatkan ambang rasa nyeri (Dyah *et al*, 2002).

K. Toksisitas

Suatu zat kimia dikatakan toksik (beracun) diartikan sebagai zat yang berpotensi memberikan efek berbahaya terhadap mekanisme biologi tertentu pada suatu organisme. Sifat toksik suatu senyawa ditentukan oleh: dosis, konsentrasi racun pada reseptor, sifat zat tersebut, kondisi bioorganisme, dan bentuk efek yang ditimbulkan. Toksisitas merupakan istilah relatif dari suatu zat kimia, dalam kemampuannya menimbulkan efek berbahaya atau penyimpangan mekanisme biologi pada suatu organisme (Wilmana dan Gunawan, 2012).

1. Toksisitas Akut

Toksisitas akut adalah derajat efek toksik suatu senyawa yang terjadi secara singkat (24 jam) setelah pemberian dalam dosis tunggal. Jadi yang dimaksud dengan uji toksisitas akut adalah uji yang dilakukan untuk mengukur derajat efek suatu senyawa yang diberikan pada hewancoba tertentu, dan pengamatannya dilakukan pada 24 jam pertama setelah perlakuan dan dilakukan dalam satu kesempatan saja (Nurlaila, 1992).

Data kuantitatif uji toksisitas akut dapat diperoleh melalui 2 cara, namun yang paling sering digunakan adalah dengan metode LD₅₀. Tujuan dilakukannya uji toksisitas akut adalah untuk menentukan potensi

ketoksikan akut dari suatu senyawa dan untuk menentukan gejala yang timbul pada hewan coba. Data yang dikumpulkan pada uji toksisitas akut ini adalah data kuantitatif yang berupa kisaran dosis letal atau toksik, dan data kualitatif yang berupa gejala klinis.



Pengamatan pada uji toksisitas pada hewan uji dilakukan 24 jam pertama sejak diberikan perlakuan, dan 7 – 14 hari pada kasus tertentu. Ada baiknya untuk mengamati hewan coba sebelum diberi perlakuan. Hal ini bertujuan untuk mengetahui perubahan gejala yang terjadi setelah diberi perlakuan dengan membandingkan gejala atau perilaku sebelum perlakuan.



Kriteria Pengamatan meliputi pengamatan terhadap gejala – gejala klinis, perubahan berat badan, jumlah hewan yang mati pada masing – masing kelompok uji dan Histopatologi organ.

Data gejala – gejala klinis yang didapat dari fungsi vital, dapat dipakai sebagai pengevaluasi mekanisme penyebab kematian secara kualitatif. Data hasil pemeriksaan histopatologi digunakan untuk mengevaluasi spektrum efek toksik. (Nurlaila, 1992).

Kategori dan kriteria nilai toksisitas akut dinyatakan sebagai nilai LD₅₀ atau sebagai estimasi toksisitas akut, seperti yang ditunjukkan pada tabel berikut (GHS, 2009):

Tabel 1. Klasifikasi toksisitas

Kategori	Kriteria	Tingkat bahaya	
1	Oral LD ₅₀ : ≤ 5 mg/kgBB Dermal LD ₅₀ : ≤ 50 mg/kgBB; Inhalasi (gas) LC ₅₀ : ≤ 100 ppm; Inhalasi (uap) LC ₅₀ : ≤ 0,5 mg/L; Inhalasi (debu, kabut) LC ₅₀ : ≤ 0,05 mg/L	Simbol	
		Tanda	Bahaya
		Pernyataan	Oral : Fatal jika tertelan Dermal : Fatal jika terkenakulit Gas, udara, debu, kabut : Fatal jika terhirup
2	Oral LD ₅₀ : 5 < mg/kgBB ≤ 50 Dermal LD ₅₀ : 50 < mg/kgBB ≤ 200; Inhalasi (gas) LC ₅₀ : 100 < ppm ≤ 500; Inhalasi (uap) LC ₅₀ : 0,5 < mg/L ≤ 2,0;	Simbol	
		Tanda	Bahaya

	Inhalasi (debu, kabut) $LC_{50} : 0,05 < \text{mg/L} \leq 0,5$	Pernyataan	Oral : Fatal jika tertelan Dermal : Fatal jika terkena kulit Gas, udara. debu, kabut : Fatal jika terhirup
3	Oral $LD_{50} : 50 < \text{mg/kgBB} \leq 300$ Dermal $LD_{50} : 200 < \text{mg/kgBB} \leq 1000$; Inhalasi (gas) $LC_{50} : 500 < \text{ppm} \leq 2500$; Inhalasi (uap) $LC_{50} : 2,0 < \text{mg/L} \leq 10,0$;	Simbol	
		Tanda	Bahaya
	Inhalasi (debu, kabut) $LC_{50} : 0,5 < \text{mg/L} \leq 1,0$	Pernyataan	Oral : Toksik jika tertelan Dermal : Toksik jika terkena kulit Gas, udara. debu, kabut : Toksik jika terhirup
4	Oral $LD_{50} : 300 < \text{mg/kgBB} \leq 2000$ Dermal $LD_{50} : 1000 < \text{mg/kgBB} \leq 2000$; Inhalasi (gas) $LC_{50} : 2500 < \text{ppm} \leq 20000$; Inhalasi (uap) $LC_{50} : 10,0 < \text{mg/L} \leq 20,0$; Inhalasi (debu, kabut) $LC_{50} : 1,0 < \text{mg/L} \leq 5,0$	Simbol	
		Tanda	Peringatan
		Pernyataan	Oral : Bahaya jika tertelan Dermal : Bahaya jika terkena kulit Gas, udara, debu, kabut : Bahaya jika terhirup
5	Oral atau dermal $LD_{50} : 2000 < \text{mg/kgBB} \leq 5000$ Inhalasi (gas, udara dan/atau debu/kabut) LC_{50} sama dengan range LD_{50} pada oral dan dermal ($2000 < \text{mg/kgBB} \leq 5000$) Kriteria tambahan: a. Terdapat indikasi menimbulkan efek toksik yang signifikan pada manusia; b. Terdapat kematian pada kategori 4; c. Terdapat tanda-tanda klinis yang signifikan pada kategori 4; d. Indikasi dari studi lain	Simbol	Tidak ada symbol
		Tanda	Peringatan
		Pernyataan	Oral : Mungkin bahaya jika tertelan Dermal : Mungkin bahaya jika terkena kulit Gas, udara. debu, kabut Mungkin bahaya jika terhirup

2. Pengujian Toksisitas Akut

Pada dasarnya semua obat dapat bersifat toksik, tergantung besarnya dosis yang diberikan. Efek toksik biasanya tercapai bila suatu rangsangan mencapai suatu nilai tertentu sehingga timbul mekanisme biologis yang nyata. Besar rangsangan sebanding dengan besar konsentrasi agen pada receptor site. Interaksi racun dan sel tubuh dapat bersifat timbal balik (reversible) atau tak terbalikan (irreversible). Toksisitas suatu bahan dapat didefinisikan sebagai kapasitas bahan untuk menciderai suatu organisme hidup. Pengetahuan mengenai bahan kimia dikumpulkan dengan mempelajari efek pemaparan bahan kimia terhadap hewan percobaan, pemaparan bahan kimia terhadap organisme tingkat rendah seperti bakteri dan kultur sel mamalia di

laboratorium, dan pemaparan bahan kimia terhadap manusia. Obat merupakan zat kimia yang mempengaruhi proses hidup (Imono, 2001).

Pengujian toksisitas suatu senyawa dibagi menjadi dua golongan yaitu uji toksisitas umum, dan uji toksisitas khusus. Pengujian toksisitas umum meliputi berbagai pengujian yang dirancang untuk mengevaluasi keseluruhan efek umum suatu senyawa pada hewan uji. Pengujian toksisitas umum meliputi : pengujian toksisitas akut, subkronik, dan kronik. Pengujian toksisitas khusus meliputi uji potensiasi, karsinogenik, mutagenik, teratogenik, reproduksi, kulit, mata, dan tingkah laku (Loomis, 1987). Pengujian toksisitas akut dapat menghasilkan nilai LD50 dan memberikan gambaran tentang gejala-gejala ketoksikan terhadap fungsi penting seperti gerak, tingkah laku, dan pernafasan yang dapat menyebabkan kematian. Uji toksisitas sub kronik dapat memberikan efek yang berbahaya yang timbul pada penggunaan obat secara berulang dalam jangka waktu tertentu. Reaksi toksik biasanya merupakan lanjutan dari efek farmakodinamik sehingga gejala toksik merupakan efek farmakodinamik yang berlebihan. Derajat toksisitas suatu obat diketahui berdasarkan nilai suatu dosis yang disebut Lethal Dose 50 (LD50). Pengujian toksisitas bertujuan untuk mencegah kerugian terhadap kesehatan manusia dan lingkungan. Lethal Dose 50

(LD50) dapat dihubungkan dengan Efektif Dose 50 (ED50), yaitu dosis yang secara terapeutik efektif terhadap 50% dari sekelompok hewan percobaan. Hubungan tersebut dapat berupa perbandingan antara LD50 dengan ED50 dan di sebut Indeks Terapeutik (IT). Makin besar indeks terapeutik suatu obat makin aman obat tersebut. Menurut (Balls *et al*, 1991), faktor-faktor yang berpengaruh terhadap LD₅₀ sangat bervariasi antara individu satu dengan individu yang lain. Selanjutnya faktor-faktor tersebut dapat diuraikan sebagai berikut:

a. Spesies, Strain, Dan Keragaman Individu.

Perbedaan sistem detoksikasi spesies menyebabkan perbedaan nilai-nilai LD50 menyatakan, variasi strain hewan percobaan menunjukkan perbedaan yang nyata dalam pengujian toksisitas akut.

b. Perbedaan Jenis Kelamin

Perbedaan jenis kelamin mempengaruhi toksisitas akut yang disebabkan oleh pengaruh langsung dari kelenjar endokrin. Hewan jantan dan betina yang sama dari strain dan spesies yang sama biasanya bereaksi terhadap toksikan dengan cara yang sama, tetapi ada perbedaan kuantitatif yang menonjol dalam kerentanan terutama pada tikus.

c. Umur

Hewan-hewan yang lebih muda memiliki kepekaan yang lebih tinggi terhadap obat karena enzim untuk biotransformasi masih kurang dan fungsi ginjal belum sempurna. Sedangkan pada hewan tua kepekaan individu meningkat karena fungsi biotransformasi dan ekskresi sudah menurun.

d. Berat badan

Penentuan dosis dalam pengujian toksisitas akut dapat didasarkan pada berat badan. Pada spesies yang sama, berat badan yang berbeda dapat memberikan nilai LD50 yang berbeda pula. Semakin besar berat badan maka jumlah dosis yang diberikan semakin besar.

e. Cara pemberian

Letal dosis dipengaruhi juga oleh cara pemberian. Nilai terkecil diperoleh dengan cara pemberian intra vena dan berturut-turut meningkat dengan cara pemberian intraperitoneal, subkutaneus, dan peroral. Cara pemberian tertentu mungkin diperlukan oleh suatu senyawa, berdasarkan pertimbangan agar senyawa dapat mencapai suatu tingkat kadar awal yang tinggi di dalam daerah yang dilokalisasi, dan untuk menghindari terjadinya berbagai efek senyawa itu pada suatu organ. Cara yang digunakan untuk pemberian suatu senyawa dapat mengubah toksisitas senyawa itu.

f. Faktor lingkungan.

Beberapa faktor lingkungan yang mempengaruhi toksisitas akut antara lain perkandungan hewan, temperatur, kelembaban nisbi udara, iklim, perbedaan siang dan malam. Meskipun demikian, nilai LD50 untuk kebanyakan bahan kimia hanya sedikit dipengaruhi oleh faktor ini.

g. Kesehatan Hewan

Status hewan dapat memberikan respon yang berbeda terhadap suatu toksikan. Kesehatan hewan sangat dipengaruhi oleh kondisi hewan dan lingkungan. Malnutrisi dan infestasi parasit juga dapat mempengaruhi nilai LD50. Hewan yang tidak sehat dapat memberikan nilai LD50 yang berbeda dibandingkan dengan nilai LD50 yang didapatkan dari hewan sehat.

h. Diet.

Komposisi makanan hewan percobaan dapat mempengaruhi nilai LD50. Komposisi makanan akan mempengaruhi status kesehatan hewan percobaan. Defisiensi zat makanan tertentu dapat mempengaruhi nilai LD50 (Balls et al.1991).

3. Lethal Dose 50

Lethal Dose 50 adalah suatu besaran yang diturunkan secara statistik, guna menyatakan dosis tunggal suatu senyawa yang diperkirakan dapat mematikan atau menimbulkan efek toksik yang berarti pada 50% hewan coba setelah perlakuan. LD₅₀ merupakan tolak ukur kuantitatif yang sering digunakan untuk menyatakan kisaran dosis letal dimana dosis ini sering diartikan dosis yang dapat menyebabkan kematian hewan uji sebanyak 50%. Secara umum, semakin kecil nilai LD₅₀, maka dapat diartikan semakin toksik senyawa tersebut. Begitu pula sebaliknya, semakin besar nilai LD 50, maka semakin rendah toksisitas dari zat tersebut. Hasil yang diperoleh (dalam mg/kgBB) dapat digolongkan menurut potensi ketoksikan akut senyawa uji menjadi beberapa kelas, seperti yang terlihat pada tabel berikut (Loomis, 1987).

Tabel 2. Klasifikasi toksisitas zat berdasarkan nilai LD₅₀

Kategori	LD ₅₀
Supertoksik	5 mg/kg atau kurang
Amat sangat toksik	5-50 mg/kg
Sangat toksik	50-500 mg/kg
Toksik sedang	0,5-5 g/kg
Toksik ringan	5-15 g/kg
Praktis tidak toksik	>15 g/kg

4. Beberapa Metode Penentuan Letal Dosis

Penentuan LD50 dapat dihitung dengan menggunakan cara grafik maupun cara aljabar. Beberapa metode yang umum dipakai untuk menentukan LD50 adalah sebagai berikut:

a. Metode Trevan

Metode ini merupakan cara yang sederhana, tetapi memerlukan jumlah hewan yang besar untuk memperoleh hasil yang lebih teliti.

Mula-mula ditentukan beberapa tingkat dosis yang dilakukan pada sekelompok hewan percobaan. Pengamatan dilakukan 24 jam setelah perlakuan dan ditentukan persen kematian setiap kelompok. Antara logaritma dosis dan persen kematian dihubungkan sehingga didapatkan grafik yang berbentuk sigmoid (logaritmik). LD50 didapatkan dengan cara menarik garis dari angka 50% pada sumbu y dan diplotkan pada sumbu x. titik potong pada absis merupakan LD50 yang ditentukan.

b. Metode Perhitungan Cara Grafik (*Graphical Calculation*).

Metode ini disebut juga dengan metoda Miller dan Tainter dimana metoda ini yang paling umum dipakai dalam penghitungan efektif dosis. Namun dibutuhkan kertas khusus berkoordinat yaitu kertas probit logaritma, dengan absis dalam skala logaritma dan ordinat sebelah kiri dalam skala probit atau ordinat sebelah kanan dibuat dalam skala persen yang setara dengan skala probit (skala ini non linier) atau nilai persen dapat dilihat di dalam tabel probit. Kurva sigmoid dapat ditransformasi menjadi garis lurus dengan memplotkan respon kuantal terhadap logaritma dosis. Dalam cara perhitungan ini diperlukan tabel probit.

c. Metode Aritmatik Reed Dan Muench.

Metode ini menggunakan nilai-nilai kumulatif. Asumsi yang dipakai adalah bahwa seekor hewan yang mati oleh dosis tertentu akan mati juga oleh dosis yang lebih besar, sedangkan hewan bertahan hidup pada dosis tertentu juga akan tetap bertahan hidup pada dosis yang lebih rendah. Kematian kumulatif diperoleh dengan menambahkan secara suksesif ke bawah dan hidup kumulatif diperoleh dengan menambahkan secara suksesif ke atas. Persen hidup dari dosis-dosis yang berdekatan dengan LD50 dihitung.

d. Metode Karber.

Metode ini memakai interval rata-rata dari jumlah hewan percobaan yang mati pada tiap kelompok hewan dan perbedaan antar dosis untuk interval yang sama. Hasil dosis yang lebih besar dari dosis yang mematikan seluruh hewan dalam sekelompok dosis dan dosis yang lebih

rendah yang dapat ditolerir oleh seluruh hewan dalam suatu kelompok, tidak digunakan dalam metode ini. Jumlah perkalian diperoleh dari hasil kali beda dosis dengan rata-rata kematian pada interval yang sama. Lethal Dose 50, dosis terkecil yang menyebabkan kematian seluruh hewan dalam satu kelompok, di kurangi dengan jumlah perkalian dibagi jumlah hewan dalam tiap kelompok. Apabila dijabarkan dalam bentuk rumus adalah seperti berikut:

$$\text{LD50} = a - (b/c)$$

adapun :

a = Dosis terkecil yang menyebabkan kematian tertinggi dalam satu kelompok dosis

b = jumlah perkalian antara beda dosis dengan rata-rata kematian pada interval yang sama.

c = jumlah hewan dalam satu kelompok.

e. Metode Perhitungan Secara Grafik Litchfield Dan Wilcoxon

Metode ini merupakan salah satu metode yang sering dipakai dalam penentuan dosis efektif. Metode ini menggunakan tabel-tabel seperti tabel penghitungan ED50, tabel batas kepercayaan 95%, tabel kemiringan garis respon, tabel dari simpangan dua buah garis sejajar yang dibandingkan, dan lain-lain. Pengubahan logaritma dosis menjadi respon, dipakai tabel peluang logaritma (logarithmic probability) dan beberapa monogram. Heterogenitas data ditentukan dengan uji chi kuadrat. Untuk penghitungan LD50 dan batas kepercayaannya, metode ini sebaik metode Miller dan Tainter. Namun untuk nilai-nilai yang lain, metode ini menghasilkan pendugaan yang lebih baik, relatif lebih sederhana, dan waktu yang diperlukan relatif lebih singkat.

f. Metode Farmakope Indonesia

Menurut Farmakope Indonesia LD₅₀ dihitung dengan rumus :

$$m = a - b (\sum p_i - 0,5)$$

Keterangan :

m = log LD₅₀

a = log dosis terkecil yang masih menyebabkan jumlah kematian 100% pada hewan percobaan.

b = beda log dosis yang berurutan

p_i = jumlah hewan yang mati menerima dosis i dibagi dengan jumlah hewan seluruhnya yang menerima dosis i.

Persyaratan untuk menggunakan metoda yang tertera dalam Farmakope Indonesia (Depkes, 2014) :

- 1) Menggunakan seri dosis dengan pengenceran berkelipatan tetap.
- 2) Jumlah hewan percobaan atau jumlah biakan jaringan dalam tiap kelompok harus sama.
- 3) Dosis diatur sedemikian rupa, sehingga dosis yang digunakan memberikan efek kematian dari 0% sampai 100% dan perhitungan dibatasi oleh kelompok percobaan yang memberikan efek dari 0% sampai 100%.

g. Metode Thomson and Weil

Metode ini merupakan metode yang banyak dipergunakan karena tidak memerlukan hewan percobaan yang terlalu banyak dan mempunyai tingkat kepercayaan atau "confidence level" yang cukup tinggi. Perhitungan LD₅₀ dilaksanakan berdasarkan rumus berikut:

Menurut cara Weil nilai LD₅₀ dihitung dengan rumus : $\text{Log } m = \text{log } D + d(f + 1)$

Keterangan :

m = nilai LD₅₀

D = dosis terkecil yang digunakan

d = log dari kelipatan dosis

f = suatu nilai dalam tabel Weil, karena angka kematian tertentu

L. Efek Toksik Terhadap Organ Sasaran

1. Hati

Hati merupakan organ terbesar dalam tubuh, menempati hampir seluruh bagian atas rongga abdomen. Dalam hati terdapat 3 jenis jaringan yang penting, yaitu sel parenkim hati, susunan pembuluh darah, dan susunan saluran empedu. Ketiga jaringan ini berhubungan erat, sehingga kerusakan satu jenis jaringan dapat mengakibatkan kerusakan jaringan lain. Histologi hati terdiri atas lobules, yang berisi sel epitel khusus yang disebut hepatosit yang tersusun tidak teratur, bercabang-cabang dan selnya saling berhubungan mengelilingi vena sentralis. Pada kapiler terdapat celah garis endotel yang disebut sinusoid yang merupakan tempat perlintasan darah. Pada sinusoid terdapat sel fagositosis yang disebut sel Kuppfer yang berfungsi menghancurkan leukosit dan sel darah merah yang rusak, bakteri dan benda asing lain pada aliran pembuluh darah vena dari traktus gastrointestinalis (Wirasuta, 2007).

Pemeriksaan histopatologi meliputi perubahan berat organ dan penampilan warna hewan uji. Warna dan penampilan sering dapat menunjukkan sifat toksisitas, seperti perlemakan hati atau sirosis. Biasanya berat organ merupakan penunjuk yang sangat peka dari efek pada hati. Pemeriksaan mikroskopik dapat menggunakan mikroskop cahaya untuk mendeteksi berbagai jenis kelainan, seperti perlemakan, sirosis, nekrosis, nodul hiperplastik, dan neoplasia (Lu, 1995).

2. Ginjal

Ginjal merupakan organ yang berperan mengatur keseimbangan cairan tubuh serta mengekskresi kelebihanannya sebagai kemih. Nefron merupakan unit fungsional dan struktural dari ginjal dan ginjal terdiri dari ribuan nefron. Tiap nefron terdiri dari dua bagian, yaitu korpus renalis dimana plasma darah difiltrasi dan tubulus renalis yang mengabsorpsi dan mensekresi cairan yang lewat. Korpus renalis dibagi menjadi dua bagian yaitu glomerulus (kapiler glomerulus) dan kapsula Bowman yang

mengelilingi kapiler glomerulus. Tubulus renalis dibagi menjadi tiga bagian, yaitu tubulus proksimal, lengkung henle dan tubulus distalis (Wirasuta, 2007).

Pemeriksaan patologi makroskopik pada hewan uji ini meliputi rasio dari organ ginjal, karena berpengaruh dalam pengamatan toksisitas dari sebuah obat, caranya dilakukan dengan menimbang berat ginjal hewan uji. Bila terdapat perbedaan dengan hewan pembanding sering menunjukkan terjadinya lesi ginjal. Dan pemeriksaan mikroskopik dapat mengungkapkan tempat, luas, dan sifat morfologik lesi ginjal (Lu, 1995).

M. Tinjauan Tentang Atomic Absorption Spectroscopy (AAS)

Teknik spektroskopik adalah salah satu teknik analisis fisikokimia yang mengamati tentang interaksi atom atau molekul dengan radiasi elektromagnetik (REM). Pada prinsipnya, interaksi REM dengan molekul akan menghasilkan satu atau dua macam dari tiga macam kejadian yang mungkin terjadi yaitu hamburan (scattering), adsorpsi (adsorption), dan emisi (emission) REM oleh atom atau molekul yang diamati. Pada Atomic Absorption Spectroscopy (AAS) digunakan untuk analisis logam dalam sampel yang dianalisis dengan menggunakan obyek nyala api pembakar dimana setiap unsur akan memberikan nyala api pada gas pembakar. Pada metode ini terjadi penyerapan sumber radiasi (diluar nyala) oleh atom-atom netral dalam keadaan gas yang berada dalam nyala. Nyala api unsur logam akan mengabsorpsi sumber radiasi eksternal dan memberikan spektrum absorpsi atom yang khas (Mulya, 1995).

N. Tinjauan Mengenai ANOVA

Analysis of variance atau ANOVA merupakan salah satu uji parametrik yang berfungsi untuk membedakan nilai rata-rata lebih dari dua kelompok data dengan cara membandingkan variansinya. Prinsip uji Anova adalah melakukan analisis variabilitas data menjadi dua sumber variasi yaitu variasi di dalam kelompok (within) dan variasi antar kelompok (between). Bila variasi sama (nilai perbandingan kedua varian mendekati angka satu), berarti nilai mean yang dibandingkan tidak ada perbedaan. Sebaliknya bila variasi

antar kelompok lebih besar dari variasi didalam kelompok, nilai mean yang dibandingkan menunjukkan adanya perbedaan.

Uji Anova dapat dibagi menjadi 2 jenis berdasarkan jumlah variabel yang diamati, yaitu One Way Anova dan Two Way Anova. One Way Anova digunakan bila ada satu variabel yang ingin diamati, sedangkan Two Way Anova digunakan apabila terdapat dua variabel yang ingin diamati. Uji Anova dapat digunakan untuk menyelidiki apakah ada pengaruh perlakuan terhadap respon penelitian. (Mulya, 1995).

O. ICPE (Inductively Couple Plasma)

1. Prinsip Dan Teori

Inductively Coupled Plasma (ICP) adalah sebuah teknik analisis yang digunakan untuk deteksi dari trace metals dalam sampel lingkungan pada umumnya. Prinsip utama ICP dalam penentuan elemen adalah pengatomisasian elemen sehingga memancarkan cahaya panjang gelombang tertentu yang kemudian dapat diukur. Teknologi dengan metode ICP yang digunakan pertama kali pada awal tahun 1960 dengan tujuan meningkatkan perkembangan teknik analisis. Sejak itu ICP telah disempurnakan dan digunakan bersama.

sama dengan prosedur preparasi sampel untuk beragam matriks untuk analisis kuantitatif. Induktif Coupled Plasma (ICP) yang termasuk ke dalam Spektroskopi Atomik adalah sebuah teknik analisis yang digunakan untuk mendeteksi jejak logam dalam sampel dan untuk mendapatkan karakteristik unsur-unsur yang memancarkan gelombang tertentu. *Inductively Coupled Plasma (ICP)* merupakan instrumen yang digunakan untuk menganalisis kadar unsure unsur logam dari suatu sampel dengan menggunakan metode spektrofotometer emisi. Spektrofotometer emisi adalah metode analisis yang didasarkan pada pengukuran intensitas emisi pada panjang gelombang yang khas untuk setiap unsur. Bahan yang akan dianalisis untuk alat *ICP* ini harus berwujud larutan yang homogen. Ada sekitar 80 unsur yang dapat dianalisa dengan menggunakan alat ini. (Alcock, 1995).

2. ICP-MS

Instrumen ICP-MS mengukur sebagian besar unsur-unsur dalam tabel periodik. Unsur-unsur yang ditampilkan dalam warna dapat dianalisis dengan ICP-MS dengan deteksi limit pada atau di bawah kisaran ppb. Elemen putih yang baik tidak diukur dengan ICP-MS (sisi kanan atas) atau tidak memiliki isotop alami. Kebanyakan analisis dilakukan pada ICP-MS instrumentasi kuantitatif, namun juga dapat berfungsi sebagai instrument semi-kuantitatif yang sangat baik.

Dengan menggunakan paket perangkat lunak semi-kuantitatif, suatu sampel dapat dianalisis untuk 80 elemen dalam tiga menit, data semi-kuantitatif yang tersedia biasanya dalam $\pm 30\%$ dari nilai kuantitatif. Untuk alasan yang sering melibatkan kesehatan manusia, mengetahui komposisi isotop sampel dapat sangat penting.

3. Prinsip kerja ICP - MS

Pada dasarnya peralatan ICP-MS merupakan gabungan dari dua peralatan yang masing-masing sudah berkembang, yakni antara alat eksitasi ICP dan MS-quadropole sebagai detektor. Penggabungan kedua alat ini menggunakan suatu skimmer yakni suatu logam tipis yang mempunyai lubang ditengahnya dengan diameter sekitar 60 μm . Alat ini ditempatkan diantara plasma dan MS. Prinsip kerja dari ICP-MS adalah sampel diintroduksi ke dalam suatu pusat tabung plasma argon, yang mengkabut, secara cepat tersolvasi dan teruapkan. Selama transit melewati inti plasma proses disosiasi dan ionisasi terjadi. Ion-ion terekstrak dari tabung pusat plasma menuju suatu pompa vakum antarfase, kemudian ditransmisikan ke dalam spektrometer massa. Didalam spektrometer dan massa ion-ion terpisahkan berdasarkan massa mereka terhadap rasio muatan.

Di dalam instrumen, cairan dikonversikan menjadi aerosol melalui proses yang dikenal sebagai nebulisasi. Sampel aerosol ini kemudian ditransportasikan ke dalam plasma dan mengalami disolvasi, vaporisasi, atomisasi, dan eksitasi atau ionisasi oleh plasma. Atom dan ion yang tereksitasi memancarkan radiasi khas mereka yang akan dikumpulkan oleh

alat yang memisahkan radiasi melalui panjang gelombangnya untuk analisis semi-kuantitatif. Radiasi ini dideteksi dan diubah menjadi sinyal elektronik yang dikonversi menjadi informasi konsentrasi untuk analisis kuantitatif.

Sampel secara normal diintroduksi sebagai larutan ke dalam plasma, tetapi introduksi langsung berupa padatan dan gas juga dimungkinkan. Introduksi sample dalam bentuk gas ke dalam plasma memiliki banyak kelebihan, efisiensi transport mendekati 100% dibandingkan dengan produksi aerosol cairan dimana dalam nebulizer lebih dari 95% sampel dibuang, meningkatkan sinyal terhadap noise dan meningkatkan limit deteksi.



BAB III

METODE PENELITIAN

A. Waktu Dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama \pm 3 bulan, dan bertempat dilaboratorium Farmakologi dan laboratorium Kimia Bahan Alam Fakultas Farmasi, dan laboratorium pertanian, Fakultas Pertanian Universitas Andalas (UNAND).

B. Alat Dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah, Rotary evaporator (IKA), ICPE 9000 (Shimadzu), Cawan Penguap (Iwaki), cawan petri (Iwaki), erlemeyer (Iwaki), Kurs Porselen (Iwaki), Autoclave (Terumo), Hot Plate (Intralab), Oven (Memmert), Forness (Memmert), stopwatch (Xiomi), jarum sonde (Terumo), timbangan mencit (OHAUS), mortir dan stamfer (Iwaki), kertas saring, sudip, gelas ukur, pipet tetes, plat tetes timbangan analitik (OHAUS), alat bedah dan erlemeyer (Pyrex).

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah rimpang gandasuli (*Hedycium coronarium* J. Koenig) segar, Plat KLT, Metanol (Bratachem), Etil Asetat (Bratachem), Aspirin (Bratachem), Quarcetin, Asam Galat, etanol 96% (Bratachem), acetosal (Bratachem), aquadest (Bratachem), SCA (Merk), PCA (Merk), asam asetat glacial (Merk), dan Na CMC (Merk). Hewan uji: mencit putih jantan (*Mus mucus*) berumur 7-9 minggu sebanyak 60 ekor dengan berat badan 20-35 gram., kloroform (CHCl₃) (Merk), FeCl₃ (Merk), norit, serbuk Mg,HCl(p) (Merk), H₂SO₄(p) (Merk), asam asetat anhidrat (Merk), kloroform amoniak (Merk), H₂SO₄ 2N (Merk), dan reagen Mayer (Merk).

C. Metoda Penelitian

1. Pengambilan Sampel

Sampel yang diambil dalam penelitian ini adalah seluruh bagian dari rimpang gandasuli segar yang diperoleh dari Daerah Sicincin, Kecamatan 2x11 Enam lingkung Kabupaten Padang Pariaman, Provinsi Sumatera Barat.

2. Identifikasi Sampel

Identifikasi sampel Rimpang gandasuli (*Hedycium coronarium J.Koenig*) secara taksonomi dilakukan di Herbarium Andalas (ANDA) Jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas.

D. Pembuatan Ekstrak Etanol Rimpang Gandasuli

1. Ekstraksi Rimpang Gandasuli

Rimpang gandasuli yang telah diambil, dibersihkan, lalu dirajang dan ditimbang sebanyak 1 kilogram. Sampel direndam (Maserasi) dalam etanol 96 % selama 6 jam pertama sambil diaduk sekali-sekali, kemudian di diamkan selama 18 jam. Pisahkan maserat dengan cara pengendapan, ulangi proses penyarian sekurang-kurangnya 2x dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama. Kumpulkan semua maserat dengan disaring menggunakan kertas saring, kemudian uapkan dengan penguap vakum (Rotary evaporator) hingga diperoleh ekstrak kental, hitung rendemen yang diperoleh yaitu persentase bobot (b/b) antara rendemen dengan ekstrak simplisia (Depkes RI, 2014).

a. Penentuan rendemen

Timbang sampel yang telah dibersihkan (A) kemudian ekstrak yang diperoleh ditimbang kembali (B). Hitung rendemen dengan rumus (Depkes RI, 2014):

$$\text{Rendemen} = \frac{B}{A} \times 100\%$$

Keterangan: A = berat sampel
B = berat ekstrak yang diperoleh

2. Pengujian Parameter Spesifik

a. Uji Mikroskopik

Dilakukan dengan menggunakan mikroskop yang derajat pembesarnya disesuaikan dengan keperluan untuk mempelajari anatomi dan histolog simplisia rimpang. Dibuat sediaan rimpang yang langsung diamati dalam media air dalam mikroskop.

b. Uji Makroskopik

Pengujian makroskopik dengan mengamati morfologi rimpang segar. Cara ini digunakan untuk mencari kekhususan morfologi, ukuran dan warna simplisia yang diuji.

c. Penetapan Kadar Sari Larut Air

Serbuk dikeringkan diudara, dimaserasi selama 24 jam 5,0 g serbuk dengan 100 ml air kloroform P, menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Disaring, diuapkan 20 ml filtrat hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, dipanaskan sisa pada suhu 10°C hingga bobot tetap. Dihitung kadar dalam persen sari yang larut dalam air, dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan diudara (Depkes RI, 2000).

$$\% \text{ Kadar Sari Larut Air} : \frac{\text{Berat Sari}}{\text{Berat Simplisia}} \times \frac{100}{20} \times 100\%$$

Keterangan :

$$\text{Berat Sari} = (\text{Cawan} + \text{Sari Setelah Di Panaskan}) - (\text{Cawan Kosong})]$$

d. Penetapan Kadar Sari Yang Larut Dalam Etanol

Serbuk dikeringkan diudara, dimaserasi selama 24 ajm 5,0 g serbuk dengan 100 ml etanol (95%), menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Disaring cepat dengan menghindarkan penguapan etanol (95%), Diuapkan 25 ml filtrat hingga kering dalam cawan dangkal berdasar

rata yang telah ditara, dipanaskan sisa pada suhu 10°C hingga bobot tetap. Dihitung kadar dalam persen sari yang larut dalam etanol (95%), dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan diudara (Depkes RI, 2000).

$$\% \text{ Kadar Sari Larut Etanol} : \frac{\text{Berat Sari}}{\text{Berat Simplisia}} \times \frac{100}{20} \times 100\%$$

Keterangan :

Berat Sari = [(Cawan + Sari Setelah Di Panaskan) – (Cawan Kosong)]

e. Pemeriksaan Organoleptis

Pada pemeriksaan organoleptis ini dilakukan untuk melihat tampilan fisik ekstrak dengan pengamatan visual yang meliputi warna, bentuk, bau dan rasa (Depkes RI, 2008).

f. Identifikasi Flavonoid

Ekstrak yang ada dalam tabung reaksi dilarutkan dengan sedikit etanol, lalu diambil sebanyak 1-2 tetes kemudian ditetaskan pada plat tetes lalu ditambahkan beberapa tetes HCl(p) dan serbuk Mg. Apabila terbentuk warna merah bata berarti positif flavonoid (Harbone, 1987) .

g. Identifikasi Terpenoid Dan Steroid

Ekstrak etanol kental ditambah 5 ml air dan 5 ml kloroform. Kemudian kedua lapisan dipisah dan dimasukkan dalam tabung reaksi. Lapisan kloroform pada fraksi di atas diambil lalu dilewatkan norit secukupnya. Selanjutnya ditetaskan pada plat tetes dan dibiarkan sampai kering. Setelah kering, ditambahkan dua tetes asam asetat anhidrat dan satu tetes asam H₂SO₄(p). Apabila terbentuk warna merah berarti positif terpenoid dan apabila terbentuk warna biru berarti positif steroid (Harbone, 1987) .

h. Identifikasi Saponin

Untuk Pengujian Saponin, dari lapisan air pada fraksi diatas diambil, lalu dikocok vertikel. Apabila terbentuk busa yang stabil selama 10 menit ini menandakan bahwa ekstrak mengandung atau

positif memiliki senyawa saponin (Harbone, 1987) .

i. Identifikasi Fenolik

Ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu dikocok dengan sedikit eter. Lapisan eter dikeringkan pada plat tetes, dan ditambahkan larutan FeCl_3 . Terbentuk warna ungu biru menandakan adanya senyawa fenol (Depkes RI, 1979)

j. Identifikasi Alkaloid

Sebanyak 500 mg ekstrak ditambahkan dengan 5 ml amoniak 25 % dan digerus dalam mortar lalu ditambahkan dengan 20 ml kloroform dan digerus kuat. Campuran disaring sehingga diperoleh lapisan air dan lapisan pelarut organik. Lapisan air ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Mayer atau Dragendroff, yang akan membentuk endapan berwarna putih atau orange jika ekstrak mengandung alkaloid (Depkes RI, 1979)

k. Penentuan Nilai Rf Dengan Menggunakan KLT

Timbang dengan teliti sampel ekstrak kental sebanyak 10 mg yang dilarutkan dalam 10 ml etanol. Setelah sampel ekstrak larut dalam etanol lalu di siapkan peralatan untuk kromatografi lapis tipis (KLT) yaitu chamber, fase diam menggunakan plat silica gel GF245 dan fase geraknya menggunakan campuran etil asetat dan metanol dengan perbandingan (6:4) ini didapatkan dari percobaan beberapa kali yang telah dilakukan uji pendahuluan dengan fase geraknya. Setelah campuran fase gerak dimasukkan kedalam chamber, dilakukan penjenjuran bejana dengan memasukkan kertas saring kedalam, setelah kertas saring dimasukkan, maka dilanjutkan dengan memotong plat KLT dengan ukuran panjang 10 x 3 cm. Plat KLT ditotolkan pembeding murni, yaitu quarcetin untuk flavonoid dan asam galat untuk fenolik, terakhir ditotolkan sampel pada fase diam. Lalu dimasukkan kedalam chamber yang telah berisi fase gerak, identifikasi dilakukan dengan membandingkan Rf sampel dan bercak hasil KLT dengan Rf dan bercak dari standar, fase diam hasil KLT di deteksi

menggunakan detektor UV pada panjang gelombang 366 nm. Cara mendapatkan nilai R_f dengan mengukur bercak pada sampel dan standar, dan memasukkan ke rumus :

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh Solut (A)}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut (B)}}$$

Keterangan : A = Jarak antara toloan dengan bercak noda

B = Jarak yang ditempuh pelarut pada fase diam

2. Pengujian Parameter Non Spesifik

a. Penentuan Kadar Air (Depkes RI, 2000)

Analisa kadar air dilakukan dengan metoda gravimetri yaitu dengan pemanasan. Analisis ini dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Sebelumnya, cawan dipanaskan dahulu dalam oven pada suhu 100-105°C selama 15 menit untuk menghilangkan kadar airnya, kemudian cawan disimpan dengan desikator ± 10 menit. Selanjutnya cawan tersebut ditimbang dan dilakukan pengulangan sampai diperoleh berat cawan yang konstan. Sampel ditimbang sebanyak 0,5 gram dan dimasukkan kedalam cawan tersebut lalu di masukkan ke oven dengan suhu 100-105°C selama ± 15 menit untuk menghilangkan kadar air. Selanjutnya sampel dimasukkan kedalam desikator ± 10 menit dan ditimbang. Sampel tersebut dipanaskan kembali dalam oven selama ± 15 menit, didinginkan dalam desikator dan ditimbang kembali. Perlakuan ini diulangi sampai didapatkan berat konstan. Kadar air dihitung dengan rumus berikut :

$$\% \text{ Kadar air} = \frac{B-C}{B-A} \times 100\%$$

Keterangan : A = Berat Konstan Cawan kosong

B = Berat krus + sampel sebelum dikeringkan

C = Berat krus + sampel setelah dikeringkan

b. Penentuan Susut Pengeringan

Bertujuan untuk menunjukkan batas maksimal (rentang) senyawa

yang hilang pada proses pengeringan. Timbang seksama 1 gram ekstrak. Tara krus yang sebelumnya telah dikeringkan selama 30 menit, masukan ekstrak kedalam krus tersebut dan timbang seksama krus beserta isinya. Masukan dalam oven, buka tutup krus dan panaskan pada suhu 100°C - 105°C selama 1 jam, dinginkan dalam desikator, kemudian timbang, lalu panaskan lagi, sampai diperoleh bobot konstan. Tentukan persentase susut pengeringan (Depkes RI, 1989).

$$\% \text{ Susut Pengeringan} : \frac{B-C}{B} \times 100\%$$

Keterangan:

A : Berat Konstan Krus Kosong

B : Berat Krus + Sampel Sebelum Dikeringkan

C : Berat Krus + Sampel Setelah Dikeringkan

c. Penentuan Kadar Abu

Bertujuan untuk memberi gambaran kandungan minimal internal dan eksternal yang berasal dari proses awal sampai terbentuknya ekstrak. Ekstrak ditimbang sebanyak 1 gram, kemudian dimasukkan kedalam krus porselen yang telah dipijar sebelumnya. Krus didinginkan dalam desikator dan dimasukkan kedalam furnes suhu 600°C selama 24 jam. Setelah dingin, ditimbang. Hitung kadar abu terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara, (Depkes RI, 1989).

$$\% \text{ Kadar Abu Total} : \frac{w_1 - w_2}{w} \times 100\%$$

Keterangan : w_2 : Berat Konstan Krus Kosong = 16,613 g

w : Berat Sampel Sebelum di Furnace (suhu 60°C)

w_1 : Berat Krus + Sampel Setelah di Furnace (suhu 60°C)

d. Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam

Dalam krus yang mengandung abu total, ditambahkan 25 ml HCL

0,1 N dan dididihkan selama 5 menit. Zat yang tidak larut disaring dengan menggunakan kertas saring krus sinterglass atau dengan ketrans saring bebas abu. Dicuci dengan air panas dan dipijarkan dalam krus selama 15 menit pada suhu tidak lebih dari 600°C. Bobot residu dikurangkan dengan bobot abu total. Dihitung bobot abu yang larut dalam mg terhadap bahan yang dikeringkan diudara (Depkes RI, 2000).

$$\% \text{ Kadar Abu Tidak Larut Asam} : \frac{w_1 - w_2}{w} \times 100\%$$

Keterangan :

w₂ : Berat Konstan Krus Kosong

w : Berat Sampel Sebelum di Furnace (suhu 600 C)

w₁ : Krus + Abu total + HCl 1N + di Furnace 15 menit (suhu 600 C)

3. Penetapan Cemaran Logam Berat (eviati dkk,2012)

a. Pembuatan Larutan Uji

Masukkan sekitar 0,5 g zat ditambahkan HNO₃ pa 5 ml, dan ditambahkan lagi 0,5 ml HClO₄ dan didiamkan selama 1 malam. Sampel dipanaskan pada suhu 100 selama 1 jam 30 menit, kemudian suhu ditingkatkan menjadi 130 selama 1 jam, suhu ditingkatkan lagi menjadi 150 selama 2 jam 30 menit (sampai uap kuning habis, bila masih ada uap kuning, waktu pemanasan ditambah lagi), setelah uap kuning habis suhu ditingkatkan menjadi 200 selama 1 jam (hingga terbentuk uap putih). Destruksi selesai dengan terbentuknya endapan putih atau sisa larutan jernih sekitar 0,5 ml. Ekstrak didinginkan kemudian diencerkan dengan air bebas ion (Aquadest) menjadi 50 ml, lalu dikocok hingga homogen dan dibiarkan semalam. Ekstrak jernih dapat langsung digunakan untuk pengukuran logam berat dengan menggunakan alat ICP (Inductively Couple plasma) ICPE 9000 Shimadzu.

4. Penetapan Cemaran Mikroba (Nataya, 2015)

a. Sterilisasi Alat, Media Dan Ruangan

Sterilisasi merupakan salah bentuk usaha untuk membebaskan alat- alat maupun bahan-bahan dari segala bentuk kehidupan terutama mikroba. Apabila alat ataupun media yang digunakan selama pengujian tidak steril, maka tidak dapat dibedakan apakah cemaran yang tumbuh berasal dari sampel atau hasil kontaminasi alat maupun media, sehingga perlu dilakukan sterilisasi untuk membebaskan alat dan media yang digunakan dari segala macam bentuk kontaminasi. Sterilisasi dilakukan menggunakan autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit. Prinsip kerja dari metode ini adalah dengan mendenaturasi atau megkoagulasikan protein yang merupakan komposisi utama dinding sel pada mikroorganismе. Uap panas bertekanan tinggi akan memecah dinding sel bakteri sehingga bakteri akan mati (Pratiwi, 2008). Pada penelitian ini, digunakan autoklaf untuk sterilisasi media, oven untuk sterilisasi peralatan atau cawan yang digunakan dan alkohol atau sterilisasi secara kimia untuk ruang dan meja peralatan yang digunakan untuk penelitian.

b. Pembuatan Media *Plate Count Agar* (PCA)

PCA ditimbang hingga diperoleh 7,05 g dan dicampurkan dengan 300 mL aquadest steril, pH diatur 7,0 dan dipanaskan hingga larutan jernih. Langkah selanjutnya adalah PCA disterilkan menggunakan autoclaf selama 15 menit pada suhu 121⁰C dengan tekanan 1 atm.

c. Pembuatan Media *Simmons Citrate Agar* (SCA)

SCA ditimbang hingga diperoleh 6,5 g dan dicampurkan dengan 100 mL aquadest steril, pH diatur 7,0 dan dipanaskan hingga larutan jernih. Langkah selanjutnya adalah SCA disterilkan menggunakan autoclaf selama 15 menit pada suhu 121⁰C dengan tekanan 1 atm.

d. Uji ALT

Sampel dibuat dengan mengambil 1 gram ekstrak yang

dilarutkan dalam 9 ml aquadest dan dibuat pengencerannya dengan 4 tingkatan (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) dengan mengambil 1 ml dari sampel dan melarutkan dalam 9 ml aquadest. Pengenceran sampel yang telah dibuat sebelumnya dipipet masing-masing 1 mL secara aseptis kedalam cawan petri steril. Media PCA (*Plate Count Agar*) sebanyak 15 mL yang telah dicairkan yang bersuhu $45 \pm 1^\circ\text{C}$ dalam waktu 15 menit dari pengenceran pertama dituangkan pada setiap cawan petri. Cawan petri digoyangkan secara perlahan agar sampel tersebar merata pada media dan biarkan hingga memadat. Uji kontrol dilakukan untuk mengetahui sterilitas media dan pengencer. Uji sterilitas media dilakukan dengan cara menuangkan media PCA dalam suatu cawan petri dan dibiarkan memadat. Seluruh cawan petri diinkubasi terbalik pada suhu 35°C selama 48 jam. Jumlah koloni yang tumbuh diamati dan dihitung. Dihitung Angka Lempeng Total dalam 1 mL contoh dengan mengalikan jumlah rata-rata koloni pada cawan dengan faktor pengenceran yang digunakan (PPOMN, 2006).

e. Uji Angka Kapang / Khamir

Penanaman koloni kapang/khamir pada media menggunakan metode tabur (*pour plate*). Media steril *Simmons Citrate Agar* (SCA) cair dituang pada cawan petri yang sudah berisi suspensi sampel kemudian didinginkan hingga mengeras. Selanjutnya petri yang berisi agar tersebut diinkubasi selama 3 hari pada suhu 25°C . Suhu inkubasi kapang/khamir adalah 25°C selama 3-5 hari dengan posisi terbalik karena Kapang/Khamir bersifat mesofilik yang dapat tumbuh pada suhu $25-35^\circ\text{C}$. Pada pengujian ini inkubasi dilakukan selama 3 hari karena koloni jamur tumbuh lebih lambat dibanding dengan koloni bakteri, sehingga dibutuhkan waktu sampai beberapa hari sampai tumbuh koloni yang dapat dilihat dipermukaan. Pertumbuhannya mula-mula akan berwarna putih, tetapi jika spora telah timbul akan terbentuk berbagai warna tergantung jenis kapang. Sedangkan khamir berbentuk bulat, bulat telur atau seperti silinder. Koloni yang dihitung yaitu koloni khamir yang berbentuk bulat, berwarna putih dan

terpisah serta koloni kapang yang memiliki serabut putih seperti kapas tanpa membedakan tiap warna koloni serta tunggal. Jika terdapat koloni yang bertumpuk maka dianggap sebagai 1 koloni (Radji, 2010).

B. Persiapan Hewan Uji

Hewan percobaan yang akan digunakan untuk uji toksisitas akut adalah mencit putih jantan (*Mus musculus* L) dengan galur Swiss Webster dewasa yang sehat sebanyak 60 ekor, 25 ekor untuk pengujian efek analgetik dan 30 ekor untuk pengujian toksisitas. Umur mencit yang digunakan berkisar antara 2-3 bulan dengan berat badan berkisar antara 20-30 gram. Sebelum perlakuan hewan coba diaklimatisasi selama 7 hari. Tujuan dari proses aklimatisasi ini adalah untuk menyesuaikan diri hewan coba terhadap lingkungan coba yang baru. Hewan yang digunakan untuk uji toksisitas adalah hewan yang belum pernah diperlakukan terhadap obat dan hewan yang dinyatakan sehat dengan kriteria tidak cacat fisik, tidak mengalami penyimpangan berat badan $\pm 10\%$, dan secara visual memperlihatkan perilaku yang normal.

Hewan percobaan dipelihara didalam kandang yang berupa kotak plastik yang tertutup dengan kawat pada bagian atasnya. Pada bagian alas kandang diberi sekam dan kotak makanan serta untuk tempat minumannya diletakkan terpisah, yakni diatas kawat penutup masing-masing kandang. Hewan uji harus dipuaskan sebelum diberikan perlakuan (mencit dipuaskan selama 3-4 jam) namun air minum boleh diberikan. Setelah dipuaskan hewan ditimbang dan diberikan sediaan uji. Sediaan uji diberikan dalam dosis tunggal dengan menggunakan sonde. Setelah diberikan perlakuan, pakan boleh diberikan kembali setelah 1-2 jam .

C. Pengujian Pada Hewan Uji

1. Perencanaan Dosis Untuk Toksisitas Akut

Dosis yang akan diberikan pada hewan percobaan untuk uji toksisitas ditentukan dengan melakukan uji pendahuluan terlebih dahulu dengan berbagai tingkatan dosis pemberian. Uji pendahuluan merupakan uji yang dilakukan untuk menentukan dosis awal yang sesuai untuk digunakan pada uji utama.

Dosis awal pada uji pendahuluan adalah dosis 1.000 mg/kg BB sampai dosis 16.000 mg/kgBB. Dosis ini dipilih berdasarkan tabel klasifikasi nilai LD₅₀ suatu zat, dimana dipilih dosis terkecil yang mungkin dapat menyebabkan kematian hewan coba sebesar 100% dan dosis terbesar yang mungkin dapat menyebabkan kematian hewan coba sebesar 0 %.

Setelah didapatkan dosisnya maka dilanjutkan dengan pengujian menggunakan 5 ekor mencit pada setiap kelompoknya. Pengujian dilakukan dengan menginduksi tikus dengan tingkatan dosis tertentu dan diamati keadaan dari tikus setelah diinduksi.

Untuk menentukan jarak antar dosis, digunakan faktor kenaikan dosis dari (Malone, 1989):

$$F = \sqrt[n-1]{DB : DK}$$

Keterangan :

- F = faktor kelipatan dosis
- n = jumlah tingkatan dosis yang diinginkan
- DB = dosis terbesar
- DK = dosis terkecil

2. Pembuatan Sediaan Uji

Volume sediaan uji yang akan diinjeksikan secara per oral ke dalam tubuh hewan percobaan sesuai dengan isi volume atau lambung mencit. Berat zat uji yang akan disuspensikan ditimbang terlebih dahulu berdasarkan konsentrasi dengan masing-masing dosis. Konsentrasi zat dihitung dengan menggunakan rumus :

$$VAO \text{ (ml)} = \frac{\text{Berat Badan (kg)} \times \text{Dosis (mg/kg BB)}}{\text{Konsentrasi (mg/ml)}}$$

Keterangan :

VAO = Volume Administrasi Oral

Selanjutnya setelah diperoleh konsentrasi, zat ditimbang lalu disuspensikan dengan Na CMC 1% dan diencerkan dengan *aquadest* hingga volume yang dibutuhkan.

3. Pengujian Efek Analgetik

Hewan percobaan sebanyak 25 ekor dipuasakan selama lebih kurang 18 jam tapi tetap diberi minum. Hewan ditimbang dan dikelompokkan menjadi 5 kelompok dan masing-masing terdiri dari 5 ekor. Ekstrak rimpang gandasuli dan asetosal disuspensikan terlebih dahulu dengan NaCMC 1% sebelum diberikan kepada hewan uji.

Pada masing-masing kelompok hewan uji diberikan secara oral yaitu Kelompok I untuk Kontrol negatif diberi NaCMC 1% dari berat badan. Kelompok II untuk Kontrol positif diberi asetosal dengan dosis 420 mg/KgBB (Lampiran 11 hal 111), Kelompok III, IV dan Kelompok V diberi ekstrak rimpang gandasuli sesuai dengan tingkatan dosis yang telah ditentukan, untuk penentuan tingkatan dosis dilakukan terlebih dahulu uji pendahuluan untuk menentukan dosis yang akan digunakan Setelah 30 menit kepada setiap kelompok ditempatkan di atas Hot Plate dengan suhu 55-70°C. Waktu yang terlewat antara penempatan hewan di piring panas dan adanya perilaku menjilati telapak kaki, gemetar, atau melompat dari permukaan dicatat sebagai respon latensi dalam hitungan detik. Kemudian diukur waktu reaksi dari perilaku pertama yang ditimbulkan dimana respon yang diamati adalah menjilati telapak kaki. Pengukuran dilakukan setiap 30 menit selama 180 menit dengan waktu cut-off untuk latensi plat panas ditetapkan pada 15 detik (Sivananda et al., 2013).

Selanjutnya dilakukan perhitungan aktivitas analgesik menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ Aktivitas Analgesik} = \frac{T-K}{C-K} \times 100$$

Keterangan:

T = waktu respon setelah diberi suspensi ekstrak etanol rimpang gandasuli

K = waktu respon kelompok kontrol negatif

C = waktu cut-off (15 detik)

4. Uji Toksisitas Akut Pada Hewan Uji

Pengujian LD₅₀ bertujuan untuk menentukan dosis ekstrak etanol rimpang Gandasuli yang mematikan. Pengujian LD₅₀ dilakukan dengan menggunakan metode Thomson and Weil karena memiliki hasil yang efisien dan tidak memerlukan jumlah hewan uji yang terlalu banyak. Mencit yang digunakan dalam pengujian LD₅₀ ini sebanyak 25 ekor yang dibagi menjadi 5 kelompok dengan mengamati jumlah hewan yang mati dalam 24 jam dan hewan yang mati dilihat kerusakan organ yang terjadi dalam waktu 24 jam diambil 2 organ yang paling penting yaitu hati dan ginjal, dan dilihat kerusakan yang ditimbulkan pada organ tersebut setelah diberikan dosis toksik, yang dibandingkan dengan keadaan organ hewan yang tidak diberikan sampel ekstrak (hewan normal).

D. Analisa Data

Data-data yang diperoleh dari hasil pengamatan diolah menggunakan metoda statistika *Analysis of Variance* (ANOVA) dua arah.

