

Uji toksisitas subkronis ekstrak etanolik biji Srikaya (*Annona squamosa L.*) sebagai repelan

*Test of subchronic toxicity of e^thanolic extract of *Annona squamosa* seed as repellent*

Sri Nabawiyati Nurul Makiyah¹, Sri Tasminatun²

¹Bagian Histologi FK UMY, ²Bagian Farmakologi FK UMY

Abstract

Active compound in *A. squamosa* seed such as carvon and limonene has a toxic effect on skin cell and can be absorbed into blood flow, so has a systemic effect on liver, lung and kidney. The aim of this research is to study the toxic effect of ethanolic extract of *A. squamosa* seed as repellent subchronically.

Thirty rats (*Rattus norvegicus*) Wistar strain, male and female, 3 month old used as subject. It is divided into 5 groups, negative control groups, positive control group with CMC, and three group of treatment group used ethanolic extract of *A. squamosa* seed dosage I (25%), II (50%) dan III (100%). The back hair of the rats were showed with its diameter 1,5cm of it and given a treatment topically for each groups every day for thirty days and observed its condition if any change happens every days. On day 31, all of the rats decapitated, a skin located of treatment is taken and so its liver, lung and kidney to make a histopathological preparation with H&E.

The result of this research showed that subchronic ethanolic extract of *A. squamosa* seed 25%, 50% and 100% topically caused irritation on skin, but not caused of change in histological features of liver, lung and kidney. Subchronic ethanolic extract of *A. squamosa* seed 100% significantly caused irritation and increased of polimorphonuclear cell.

Key words : *Annona squamosa*, carvon, limonen, subchronic toxicity test, topical

Abstrak

Senyawa aktif dalam biji antara lain carvon dan limonene mempunyai efek toksik pada sel-sel kulit dan dapat terabsorpsi masuk ke dalam aliran darah, sehingga memberikan efek sistemik pada organ hepar, pulmo dan ginjal. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek toksik ekstrak etanolik biji *A. squamosa* sebagai repelan yang digunakan secara subkronis.

Subyek penelitian adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan dan betina, umur 3 bulan, 30 ekor. Subyek dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol CMC, kelompok ekstrak etanolik biji *A. squamosa* konsentrasi I (25%), II (50%) dan III (100%). Punggung tikus dicukur dengan diameter 1,5 cm, diberi perlakuan pada hari ke-1-30 sesuai kelompoknya. Ekstrak dioleskan setiap hari di tempat yang dicukur. Kondisi umum tikus diamati dan dicatat perubahan yang terjadi setiap hari. Pada hari ke-31, semua tikus dikorbankan, kulit tempat perlakuan, hepar, paru dan ginjal diambil dan dibuat preparat histologi dengan pengecatan H&E.

Hasil penelitian menunjukkan pemberian subkronis ekstrak etanolik biji srikaya (*Annona squamosa*) 25%, 50%, 100% secara topikal menyebabkan iritasi pada kulit, tetapi tidak menyebabkan perubahan histologis organ hepar, paru dan ginjal, ekstrak etanolik *A. squamosa* 100% topikal subkronis secara signifikan dapat menyebabkan iritasi dan meningkatnya jumlah polimorfonuklear sel.

Kata kunci : *Annona squamosa*, carvon, limonen, uji toksisitas subkronis, topikal,

Pendahuluan

Tanaman srikaya (*Annona squamosa*) mempunyai aktivitas insektisida dengan cara sebagai larvasida, *Growth regulator* dan *Chemosterilant*¹. Habitat tanaman ini di daerah tropis terutama di Amerika, India Barat, dan tersebar luas di seluruh wilayah tropis di dunia. Daging buah srikaya yang berwarna putih dapat dimakan segar karena rasanya manis, daunnya yang berwarna biru keabu-abuan bisa digunakan sebagai insektisida, bijinya yang dihaluskan bisa digunakan sebagai insektisida dan obat kutu kepala². Penelitian Sundari dan Kesetyaningsih pada tahun 2004 menunjukkan bahwa ekstrak etanolik biji *A. squamosa* memiliki daya repelan (menolak nyamuk) terhadap nyamuk *Aedes Aegypti* sampai konsentrasi 25%³. Repelan pada manusia digunakan dengan cara mengoleskan pada kulit anggota badan yang terbuka seperti tangan dan kaki.

Repelan akan digunakan secara berulang-ulang dalam waktu yang lama hingga berbulan-bulan sehingga keamanannya harus terjamin⁴. Senyawa aktif utama dalam *A. squamosa* adalah squamosin dan asiminin yang termasuk golongan asetoginin. Selain itu, bijinya mengandung aporphine alkaloid (anonaine, roemerine, norcorydine, corydine, norisocorydine and glaucine), Carvone, linalool, limonene, a - dan b -pinene⁵.

Untuk keperluan penapisan spektrum efek toksis suatu senyawa diperlukan serangkaian uji toksikologi. Secara umum uji toksikologi dibedakan menjadi dua golongan yaitu uji toksikologi tak khas dan uji toksikologi khas. Uji toksikologi tak khas dirancang untuk mengetahui keseluruhan atau spektrum efek toksik suatu senyawa pada aneka

ragam jenis hewan uji, termasuk uji ini adalah uji toksisitas akut, sub kronis dan kronis. Beda ketiga uji tersebut adalah pada sifat dan lama pemberian atau pemejanan senyawa uji, serta sasaran dan luaran ujinya⁶.

Toksitas suatu substansi beracun pada organisme hidup dipengaruhi oleh banyak faktor baik yang berasal dari organisme yang terkena maupun dari racun itu sendiri. Interaksi bahan toksik dengan tubuh dapat menimbulkan efek yang diharapkan dan menguntungkan (*efek terapeutik*), atau dapat pula merugikan sebagai efek samping, reaksi hipersensitif, reaksi alergi atau efek toksik. Efek toksik dapat muncul sebagai gangguan faali, biokimia atau perubahan struktur sel, jaringan atau organ tubuh⁷.

Uji ketoksikan subkronis adalah uji toksikologi sesuatu senyawa yang diberikan dengan dosis berulang pada hewan uji tertentu, selama kurang dari 3 bulan. Pada dasarnya uji ketoksikan subkronis meliputi efek toksik (wujud dan sifat) sesuatu obat yang mungkin timbul selama lebih kurang 10 % masa hidup hewan uji, yang pada akhirnya dapat disetarakan dengan kejadian yang mungkin timbul ketika obat tersebut digunakan pada manusia. Hal ini perlu dikerjakan mengingat pemakaian obat seringkali memerlukan waktu relatif panjang, bahkan mungkin sepanjang masa hidup si pemakai. Selain itu dengan uji ketoksikan subkronis memungkinkan terliputnya wujud dan sifat efek toksik yang munculnya lambat dan tak dapat terliput pada uji ketoksikan akut⁸.

Beberapa senyawa aktif dalam biji *A. squamosa* antar lain carvon dan limonene mempunyai efek toksik pada sel-sel kulit atau dapat terabsorpsi masuk ke

dalam aliran darah, sehingga dapat memberikan efek sistemik pada organ hepar, pulmo dan ginjal.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek toksik ekstrak etanolik biji *A. squamosa* sebagai repelan yang digunakan secara subkronis.

Bahan dan Cara

Subyek uji dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan dan betina berumur 3 bulan sebanyak tigapuluh ekor. Sedangkan bahan ujinya adalah ekstrak etanolik biji *A. squamosa* konsentrasi 25%, 50% dan 100%.

Subyek uji dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif tanpa perlakuan, kelompok kontrol CMC, kelompok ekstrak konsentrasi I (25%), II (50%) dan III (100 %).

Punggung tikus yang sebelumnya telah dicukur.dengan diameter 1,5 cm, diberi perlakuan pada hari pertama hingga hari ke-30 sesuai dengan kelompoknya masing-masing. Ekstrak dioleskan setiap hari di

tempat yang dicukur. Kondisi umum tikus diamati setiap hari dan dicatat perubahan yang terjadi. Apabila ada tikus yang mati, harus segera dilakukan pembedahan dan organ hepar, paru dan ginjal serta kulit tempat perlakuan diambil untuk pengamatan histopatologi. Pada hari ke-31, semua tikus dikorbankan, kulit tempat perlakuan diambil dan dibuat preparat histologi dengan pengecatan H&E. Organ hepar, paru dan ginjal juga diambil untuk pengamatan histopatologi.

Evaluasi : kondisi kesehatan tikus selama percobaan, histopatologi hepar, paru dan ginjal, histopatologi kulit mencit dianalisis adanya hiperemi, sel radang (sel leukosit PMN, monosit, limfosit) secara semikuantitatif.

Preparat histologi kulit, hepar, paru dan ginjal diamati dengan mikroskop Olympus® dengan perbesaran 100x dan 400x dan dianalisis perubahan-perubahan yang terjadi pada tingkat seluler. Preparat kulit diamati adanya perdarahan untuk melihat derajat iritasi dan jumlah sel PMN.

Penilaian diberikan sebagai berikut :

Area perdarahan per lapang pandang	Skor
Tidak ada perdarahan	0
Perdarahan < 25 %	1
Perdarahan 26 % - 50%	2
Perdarahan 51-75 %	3
Perdarahan 75 %- 100%	4

Jumlah PMN	Skor
0	0
1-5	1
6-10	2
11-15	3
16-20	4
Terbentuk nodulus limfatikus	5

Derajat iritasi dan PMN dianalisis dengan uji statistik Non Parametrik Kruskal

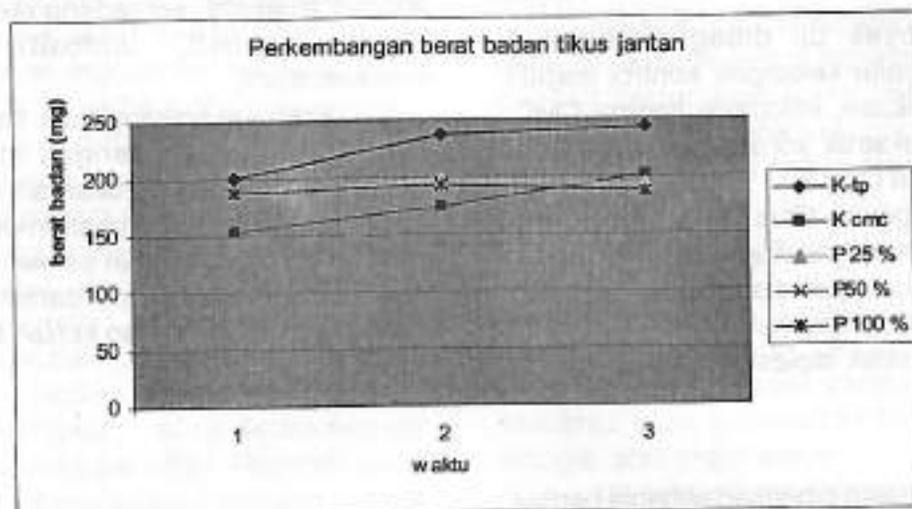
Wallis dengan taraf kepercayaan 95% dilanjutkan dengan Man Whitney Test.

Hasil Penelitian

Penelitian dilakukan pada hewan uji tikus (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan dan betina. Ekstrak diberikan secara topikal selama 30 hari pada kulit tikus yang bulunya sudah dicukur. Kecepatan waktu antara lama pemberian pada hewan uji dan kesetaraan waktu pada manusia adalah 30 hari pada hewan uji tikus setara dengan 34 bulan pada manusia⁴.

Ekstrak etanolik biji *A. squamosa* diencerkan dengan aquades yang mengandung CMC (carboksi metil selulose)

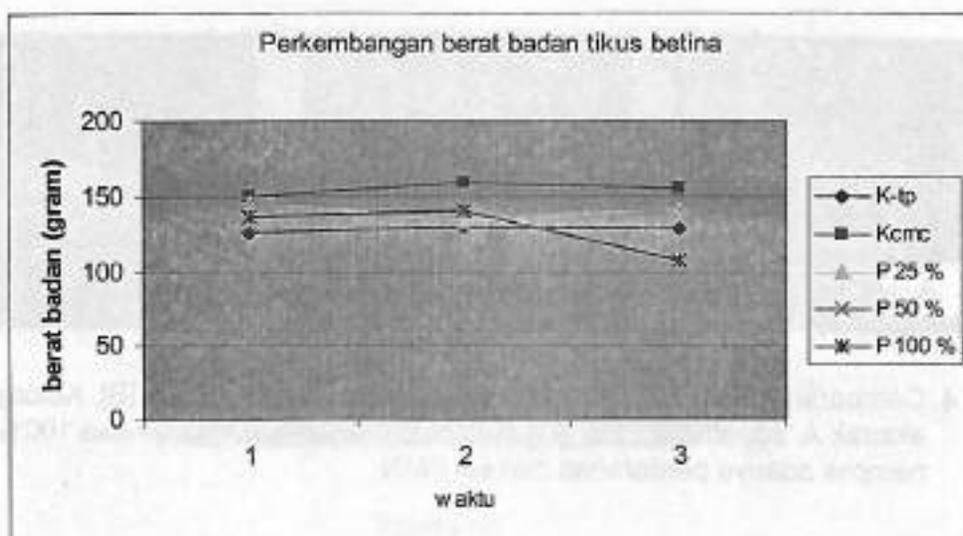
0,5 %. Ekstrak biji *A. squamosa* mengandung minyak, sehingga penambahan CMC berfungsi sebagai emulgator. Hal ini akan menjamin homogenitas larutan. Untuk mengetahui pengaruh pelarut terhadap hewan uji, maka ada satu kelompok tikus yang mendapat perlakuan diolesi dengan larutan CMC 0,5 %. Hasil penelitian menunjukkan perlakuan CMC 0,5 % secara topikal selama 30 hari tidak memberikan perubahan fisiologis tikus, baik secara makroskopis maupun mikroskopis.



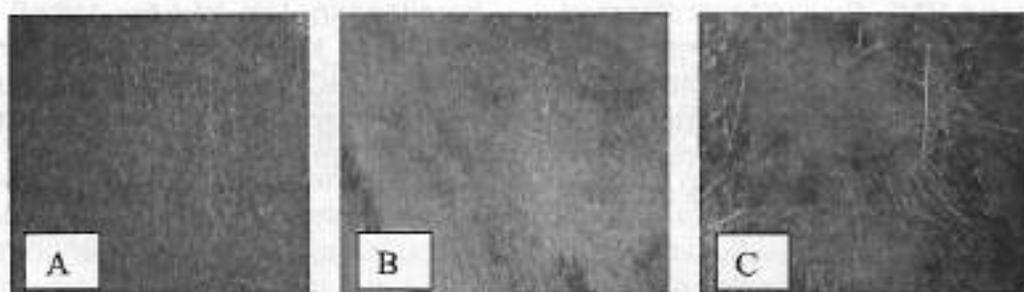
Gambar 1. Perkembangan berat badan tikus jantan (waktu 1 =awal penelitian, 2 = tengah penelitian, 3= akhir penelitian)

Perkembangan berat badan tikus dapat dilihat pada Gambar 1 pada tikus jantan dan Gambar 2 pada tikus betina. Dari hasil analisis statistik Anova yang dilanjutkan dengan uji Tukey menunjukkan bahwa perbedaan berat badan tikus jantan selama penelitian secara umum tidak berbeda bermakna, hanya pada beberapa kelompok yaitu kelompok ekstrak 50% dan 100% dibandingkan dengan kelompok tanpa

perlakuan, berat badan tikus pada tengah dan akhir penelitian berbeda bermakna. Kelompok perlakuan ekstrak 50% dan 100% mempunyai berat badan yang lebih rendah. Pada tikus betina, berat badan selama penelitian secara umum tidak berbeda bermakna, hanya pada kelompok ekstrak 100% dibandingkan dengan kelompok CMC, berat badan tikus pada akhir penelitian berbeda bermakna.



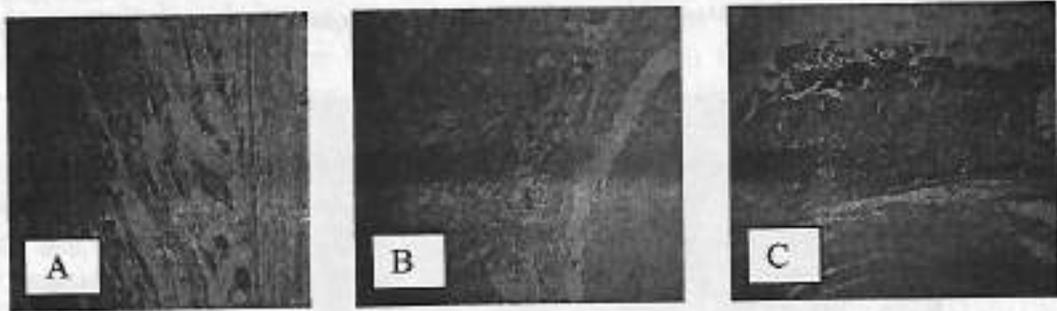
Gambar 2. Perkembangan berat badan tikus betina (waktu 1 =awal penelitian, 2 = tengah penelitian, 3= akhir penelitian)



Gambar 3. Gambaran makroskopis kulit tikus [A]. kontrol tanpa perlakuan [B]. Kelompok ekstrak *A. squamosa* 25 % [C]. Kelompok ekstrak *A. squamosa* 100 %, nampak adanya kemerahan dan iritasi.

Secara makroskopis kulit tikus yang diolesi dengan ekstrak etanolik biji *A. squamosa* dosis 25%, 50% dan 100% menunjukkan adanya tanda-tanda kemerahan dan iritasi setelah 15 hari perlakuan. Hal ini tidak terjadi pada tikus kelompok kontrol tanpa perlakuan dan

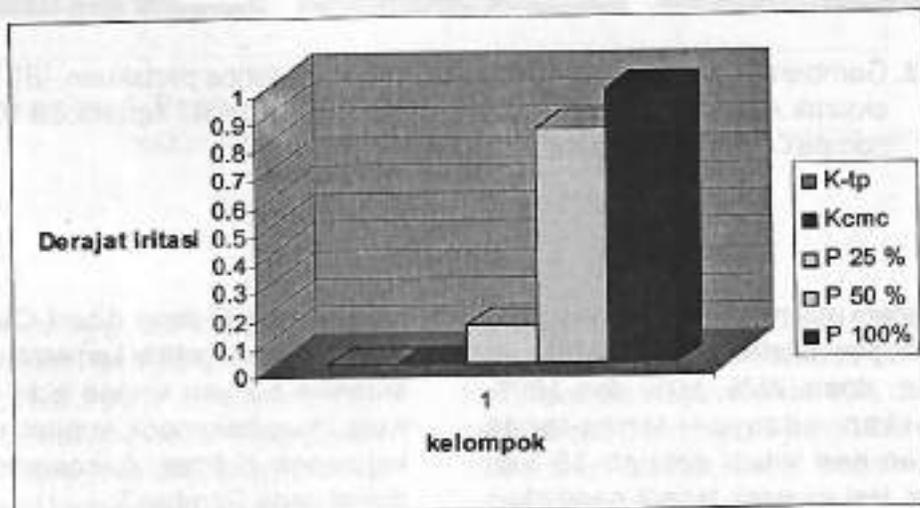
kontrol negatif yang diberi CMC. Jumlah tikus yang mengalami kemerahan dan iritasi semakin banyak hingga akhir perlakuan. Kulit tikus kelompok kontrol negatif dan kelompok ekstrak *A. squamosa* dapat dilihat pada Gambar 3.



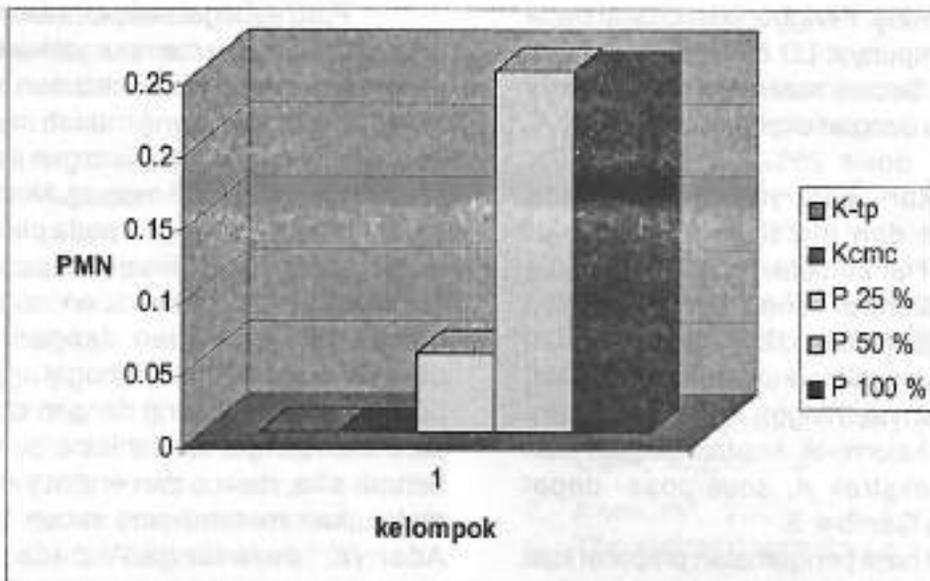
Gambar 4. Gambaran histologis kulit tikus [A]. kontrol tanpa perlakuan [B]. Kelompok ekstrak *A. squamosa* 25% [C]. Kelompok ekstrak *A. squamosa* 100%, nampak adanya perdarahan dan sel PMN

Selain dengan pengamatan makroskopis, jaringan kulit tempat perlakuan dibuat preparat histologi dengan teknik pengecatan H&E. Preparat kulit dianalisis perubahan-perubahan yang terjadi pada tingkat seluler dengan mengamati adanya perdarahan untuk melihat derajat iritasi dan jumlah sel PMN. Gambar 4 menunjukkan histologis preparat kulit. Pada preparat

kelompok ekstrak *A. squamosa* 25%, 50% dan 100% nampak adanya perdarahan dan sel PMN yang menunjukkan adanya peradangan. Hal ini tidak terjadi pada kelompok kontrol tanpa perlakuan dan kontrol CMC. Hasil pengamatan derajat iritasi dan jumlah sel PMN dapat dilihat pada Tabel 2, Gambar 5 dan Gambar 6.



Gambar 5. Hasil pengamatan derajat iritasi



Gambar 6. Hasil pengamatan sel PMN

Hasil analisis statistik Non Parametrik Kruskal Wallis dengan taraf kepercayaan 95% dilanjutkan dengan Man Whitney Test menunjukkan bahwa derajat iritasi berbeda signifikan antara kelompok ekstrak 50 % dan 100 % dengan kelompok kontrol negatif. Demikian pula jumlah sel PMN meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak. Hasil analisis statistik menunjukkan jumlah sel PMN yang berbeda secara signifikan antara kelompok ekstrak 50 % dan 100 % dengan kelompok kontrol negatif.

Diskusi

Pada penelitian ini berat badan tikus diukur pada awal, tengah dan akhir penelitian untuk mengetahui sejauh mana perkembangan berat badan tikus pada masing-masing kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol dan untuk mengetahui apakah perlakuan yang diberikan mempengaruhi berat badan tikus. Hasilnya ternyata menunjukkan bahwa perbedaan berat badan tikus jantan selama penelitian secara umum tidak berbeda bermakna, hanya pada kelompok ekstrak 50% dan 100% dibandingkan dengan kelompok tanpa perlakuan, berat

badan tikus pada tengah dan akhir penelitian berbeda bermakna. Kelompok perlakuan ekstrak 50% dan 100% mempunyai berat badan yang lebih rendah. Hal ini kemungkinan disebabkan karena terjadinya iritasi pada kulit tikus sehingga menimbulkan rasa sakit sehingga mempengaruhi nafsu makan tikus dan akhirnya menurunkan nafsu makan tikus, sedangkan pada tikus betina, berat badan selama penelitian tidak berbeda bermakna. Pada tikus betina, berat badan selama penelitian secara umum tidak berbeda bermakna, hanya pada kelompok ekstrak 100% dibandingkan dengan kelompok CMC, berat badan tikus pada akhir penelitian berbeda bermakna.

Senyawa yang terkandung dalam biji *A squamosa* antara lain carvon dan limonene⁵. Carvon merupakan senyawa toksik bila ditelan, dihisap atau mengenai kulit. Carvon dapat menimbulkan iritasi pada kulit. Pemakaian melalui oral pada tikus mempunyai LD50 3,7 mg/kgBB. Carvon dapat diabsorpsi melalui kulit dan penggunaan topikal pada kelinci mempunyai LD50 4 mg/kgBB⁷. Limonene termasuk iritan moderat pada binatang percobaan. Penggunaan jangka panjang pada kulit menyebabkan reaksi alergi berupa *redness*,

swelling, itching. Penggunaan topical pada kelinci mempunyai LD 50 lebih dari 5.000 mg/kgBB⁶. Secara makroskopis kulit tikus yang diolesi dengan ekstrak etanolik biji *A. squamosa* dosis 25%, 50% dan 100% menunjukkan adanya tanda-tanda kemerahan dan iritasi setelah 15 hari perlakuan. Hal ini tidak terjadi pada tikus kelompok kontrol tanpa perlakuan dan kontrol negatif yang diberi CMC. Jumlah tikus yang mengalami kemerahan dan iritasi semakin banyak hingga akhir perlakuan. Kulit tikus kelompok kontrol negatif dan kelompok ekstrak *A. squamosa* dapat dilihat pada Gambar 3.

Dari hasil pengamatan preparat kulit diamati adanya perdarahan untuk melihat derajat iritasi dan jumlah sel PMN seperti terlihat pada gambar 4 yang menunjukkan histologis preparat kulit. Pada preparat kelompok ekstrak *A. squamosa* 25%, 50% dan 100% nampak adanya perdarahan dan sel PMN yang menunjukkan adanya peradangan. Hal ini tidak terjadi pada kelompok kontrol tanpa perlakuan dan kontrol CMC. Semakin tinggi dosis ekstrak maka semakin berat derajat iritasi pada histologi preparat kulit dan dari analisis statistik menunjukkan bahwa derajat iritasi berbeda signifikan antara kelompok ekstrak 50 % dan 100 % dengan kelompok kontrol negatif. Demikian pula jumlah sel PMN meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak. Hasil analisis statistik menunjukkan jumlah sel PMN yang berbeda secara signifikan antara kelompok ekstrak 50% dan 100% dengan kelompok kontrol negatif.

Organ penting yang rawan terhadap efek toksik dan mempunyai kesempatan besar untuk cidera dan menderita antar lain hati, ginjal dan paru⁶. Absorpsi senyawa aktif dalam ekstrak yang diberikan secara topikal mungkin saja terjadi sehingga perlu dilakukan pengamatan histologis organ hepar, ginjal dan paru. Organ hepar, paru dan ginjal dibuat preparat histologi dengan teknik pengecatan H&E untuk mengetahui perubahan-perubahan yang terjadi pada tingkat seluler.

Paru sebagai alat pernafasan rawan terhadap racun dan mempunyai kesempatan besar untuk menderita keracunan terutama oleh bahan-bahan yang mudah menguap⁶. Pemeriksaan mikroskopis organ paru pada preparat histologi H&E menunjukkan adanya tanda-tanda peradangan pada paru hewan uji. Namun gejala ini ditemukan pada semua kelompok hewan uji dan diperkirakan bukan akibat dari perlakuan dengan ekstrak etanolik *A. squamosa*. Sebagai organ yang berhubungan langsung dengan dunia luar, paru mempunyai mekanisme pertahanan berupa silia, mukus dan enzim yang dapat melakukan metabolisme racun tertentu⁶. Adanya peradangan pada pulmo disebabkan oleh kondisi pemeliharaan hewan uji yang kurang bersih.

Hepar merupakan organ utama metabolisme. Pemeriksaan histologis hepar menunjukkan tidak ditemukannya kelainan pada hepar, baik kelompok kontrol negatif maupun kelompok ekstrak *A. squamosa*. Demikian juga hasil pemeriksaan histologis ginjal, tidak ditemukan kelainan pada sel-sel ginjal. Senyawa aktif ekstrak *A. squamosa* yang diberikan secara topikal tidak mempengaruhi organ hepar, ginjal dan paru yang dibuktikan dengan tidak adanya perubahan seluler pada organ-organ tersebut.

Kesimpulan

1. Penggunaan subkronis ekstrak etanolik biji srikaya (*Annona squamosa*) 25 %, 50 %, 100 % secara topikal menyebabkan iritasi pada kulit.
2. Ekstrak etanolik *A. squamosa* 100 % topikal subkronis secara signifikan dapat menyebabkan iritasi dan meningkatnya jumlah PMN.
3. Ekstrak etanolik *A. squamosa* 25 %, 50 %, 100 % topikal subkronis tidak menyebabkan perubahan histologis organ hepar, paru dan ginjal.

Saran

Ekstrak etanolik *A. squamosa* tidak direkomendasikan digunakan secara topikal pada manusia.

Ucapan Terima Kasih

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada PSKK FK Universitas Muhammadiyah Yogyakarta yang telah memberikan dana penelitian. Ucapan terimakasih juga peneliti sampaikan kepada semua pihak yang telah memberikan bantuan selama penelitian.

Daftar Pustaka

1. Ganguly, N. K., Medappa, N., Srivastava, V. K. Singh, P., Kant, L., Shah, B., Muthuswamy, V., Saxena, N.C., 2003, Prospect of using herbal products in the control of mosquito vectors, *ICMR Buletin* Vol 33 (1)
2. Tiangda Ch, Gritsanapan W, Sookvanichsip N, Limchalearn A., 1999. Anti-headlice activity of preparation of *Annona squamosa* seed extract. *Joint International tropical Medicine Meeting*. Bangkok.
3. Sundari, S. dan Kesetyaningsih, TW., 2004. *Efikasi Fase Minyak Ekstrak Biji Sri kaya (Annona squamosa, L.) sebagai Repelen terhadap Nyamuk Aedes aegypti*. Laporan Penelitian, PSKI FK UMY, Yogyakarta
4. Donatus, IA., 2002, Evaluasi Data Toksikologi dalam *Evaluasi Obat*, Magister Managemen dan Kebijakan Obat UGM, Yogyakarta
5. Golob, P., Moss, C. , Dales, M., Fidge,A., Evans,J., Gudrups, I., 1999, The use of spices and medicinals as bioactive protectants for grains, *Fao Agricultural services bulletin No. 137*
6. Ngatidjan, 1991, *Metode Laboratorium dalam Toksikologi*, PAU Bioteknologi UGM, Yogyakarta
7. Anonim¹, 2005, The Physical and Theoretical Chemistry Laboratory Oxford University, *Chemical and Other Safety Information* <http://ptcl.chem.ox.ac.uk/MSDS/>. 16 Juli 2005
8. Anonim², 2005, Canadian Centre for Occupational health anf Safety, Cheminfo, Chemical Profiles Created by CCOHS, <http://www.intox.org/databank/documents/chemical/limoene/cie635.htm> 16 Juli 2005