

Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Anggur Merah (*Vitis vinifera* Linn) Menggunakan Metode Thomson Dan Weil Pada Tikus Putih Wistar (*Rattus norvegicus*)

Gelda Myrna Parwanty¹⁾, Nur Azizah^{2*)}, Azmi Darotulmutmainah³⁾
^{1,2,3} Farmasi STIKes Muhammadiyah Kuningan
*Email: nurazizah@stikes-muhammadiyahku.ac.id

Abstract

Grapes (Vitis vinifera Linn) are rich in polyphenol and anthocyanin component. therefore they help reduce cholesterol levels by altering how lipids are digested and preventing the oxidation of LDL (Low Density Lipoprotein). This study aims to determine the LD₅₀ value of Vitis vinifera Ethanol Extract (VVEE). The acute toxicity test method in this study used conventional methods. A total of 25 Wistar rats were randomly divided into 5 groups, with a total of 5 rats in each group. Group I was given distilled water. Group II was given VVEE at a dose of 500 mg/kg BW/day. Group III was given VVEE at a dose of 1000 mg/kgBW/day. Group IV was given VVEE at a dose of 1500 mg/kgBW/day. Group V was given VVEE at a dose of 2000 mg/kgBW/day. Toxic symptoms and changes in body weight were observed for 14 days. The LD₅₀ value was calculated using the Thomson and Weil method. The results showed that rats given 500 mg/kg BW of VVEE showed toxic symptoms, including skin rashes on the nose for 3 days. Rats given 1500 and 2000 mg/kg BW showed toxic symptoms including weakness, excessive sleep, lethargy, changes in body weight, and death. A dose of 2000 mg/kgBW caused death in all rats in the group (100%). The obtained LD₅₀ value was 9.32 mg/kgBW. The ethanol extract of Vitis vinifera was toxic to Wistar rats.

Keywords: Acute toxicity, phytochemical screening, red grapefruit (*Vitis vinifera* L.), Wistar rats.

Abstrak

Buah anggur (*Vitis vinifera* Linn) mengandung polifenol dan antosianin yang cukup tinggi. Salah satu manfaat dari buah anggur yaitu sebagai antikolesterol dengan memodulasi metabolisme lipid dan menghambat oksidasi LDL (*Low Density Lipoprotein*). Penelitian ini bertujuan untuk menetapkan nilai LD₅₀ dari Ekstrak Etanol Anggur Merah (EEAM). Metode uji toksisitas akut pada penelitian ini menggunakan metode konvensional. Sebanyak 25 ekor tikus Wistar dibagi secara acak menjadi 5 kelompok, dengan jumlah masing-masing kelompok 5 ekor. Kelompok I diberikan aquades, kelompok II diberi EEAM dosis 500 mg/200gBB/hari, kelompok III diberi EEAM dosis 1000 mg/200gBB/hari, kelompok IV diberi EEAM dosis 1500 mg/200gBB/hari, kelompok V diberi EEAM dosis 2000 mg/200gBB/hari. Gejala toksik dan perubahan berat badan diamati selama 14 hari. Nilai LD₅₀ dihitung menggunakan metode Thomson dan Weil. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tikus yang diberi EEAM dosis 500 mg/kgBB menunjukkan gejala toksik yaitu ruam kulit pada hidung selama 3 hari, sedangkan pada dosis 1500 dan 2000 mg/kgBB tikus menunjukkan gejala toksik seperti kelemahan, tidur berlebihan, koma, perubahan berat badan dan kematian. Dosis 2000 mg/kgBB menyebabkan kematian pada semua tikus dalam kelompok tersebut (100%). Nilai LD₅₀ yang diperoleh adalah 9,32 mg/kgBB, ekstrak anggur merah memiliki efek toksik pada tikus Wistar.

Kata Kunci: Anggur merah (*Vitis vinifera* L.), skrining fitokimia, tikus putih Wistar, toksisitas akut.

1. PENDAHULUAN

Obat tradisional terdiri atas bahan – bahan yang diperoleh dari tumbuh – tumbuhan, bahan hewani, mineral, sari yang dicampur, dan diracik untuk dikonsumsi serta dipercaya secara turun temurun oleh masyarakat dapat mengobati penyakit (Reiza dan Meiyanti, 2021).

Salah satu tanaman obat tradisional di Indonesia yang dapat menanggulangi masalah kesehatan adalah buah anggur merah (*Vitis vinifera* L.) (Sari dan Lusia, 2006). Buah anggur merah merupakan sumber antioksidan dengan kandungan polifenol dan antosianin yang cukup tinggi (Tarmizi, 2010). Manfaat pemberian ekstrak anggur merah bagi kesehatan salah satunya dapat menurunkan kadar kolestrol (Riayani, 2011). Penelitian yang dilakukan oleh Orbayinah dan Kurnia (2011) menunjukkan bahwa ekstrak anggur merah mempunyai efek terhadap penurunan kadar trigliserida darah. Pemberian dosis ekstrak *Vitis vinifera* yang paling efektif menurunkan kadar trigliserida adalah 500mg/200gram BB/hari.

Buah anggur merah merupakan tanaman herbal yang potensial, sehingga perlu dilakukan pengujian lebih lanjut mengenai kadar toksisitasnya. Uji toksisitas akut merupakan salah satu uji praklinik yang sangat penting. karena bertujuan untuk mendeteksi toksisitas intrinsik suatu zat, menentukan organ sasaran, kepekaan spesies, memperoleh informasi bahaya setelah pemaparan suatu zat secara akut, memperoleh informasi awal yang dapat digunakan untuk menetapkan tingkat dosis, merancang uji toksisitas selanjutnya dapat memperoleh nilai LD₅₀ suatu bahan atau sediaan, serta penentuan penggolongan dan pelabelan keamanan suatu bahan zat yang di uji (BPOM RI, 2014).

Uji toksisitas menggunakan hewan uji sebagai model berguna untuk melihat adanya reaksi biokimia, fisiologik dan patologik pada manusia terhadap suatu sediaan uji. Hasil uji toksisitas tidak dapat digunakan secara mutlak untuk membuktikan keamanan suatu bahan/sediaan pada manusia, namun dapat

memberikan petunjuk adanya toksisitas relatif dan membantu identifikasi efek toksik bila terjadi pemaparan pada manusia (BPOM RI, 2014).

Sebuah penelitian uji toksisitas akut pernah dilakukan terhadap ekstrak etanol anggur merah untuk mengetahui nilai LC₅₀ dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test*. Hasil yang diperoleh menyatakan bahwa ekstrak buah anggur merah memiliki potensi toksisitas akut dengan dosis 648.004 µg/ml (Dita, 2010). Penelitian mengenai uji toksisitas akut ekstrak etanol buah anggur merah dengan menggunakan hewan uji tikus belum pernah dilakukan. Penggunaan tikus sebagai hewan uji dapat menghasilkan hasil yang lebih akurat karena tikus memiliki gen homolog yang hampir sama dengan manusia serta karakter anatomi dan fisiologi telah diketahui secara baik (Hubrecht dan Kirkwood, 2009). Oleh sebab itu perlu dilakukan pengujian lebih lanjut pada hewan uji tikus untuk melihat ada tidaknya efek toksik yang terjadi untuk menjamin keamanan penggunaannya.

2. METODE

Alat

Alat – alat yang digunakan dalam penelitian yaitu batang pengaduk (Herma), gelas ukur (*pyrex*®), gelas kimia (*pyrex*®), kandang mencit, oven (Mommert), pipet tetes, rotary evaporator (heidolph®), Maserator, timbangan analitik (*kern*®), blender (Miyako), penangas air (Mommert), kompor gas (Rinnai), tabung reaksi (*pyrex*®), rak tabung, cawan uap, pipet ukur, kertas saring, sonde oral, spuit.

Bahan

Bahan – bahan yang digunakan dalam penelitian adalah aquades (WaterOne), etanol 96% (Merck), tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar yang diperoleh dari UHP LPPT UGM, buah anggur merah (*Vitis vinifera*) yang diambil dari perkebunan anggur Dineu Garden Kota Bandung- Jawa Barat, asam klorida 2N (HCl pekat), serbuk magnesium (Alain), FeCl₃ 1% (Alain), asam asetat anhidrat, H₂SO₄, amil alkohol, Na CMC

1%, pereaksi Mayer (Aloin), Wager, Dragendorf (Aloin).

Pembuatan Simplisia Buah Anggur Merah

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi STIKes Muhammadiyah Kuningan dengan nomor determinasi: 005/KET/Lab.BF/V/2022. Sampel yang digunakan sebanyak 9 kg dilakuka sortasi basah untuk memisahkan kotoran yang masih menempel pada tumbuhan, kemudian di cuci bersih menggunakan air mengalir, ditiriskan, dipotong kecil - kecil dan dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 70°C selama 14 hari. Setelah itu dilakukan sortasi kering untuk memisahkan benda-benda asing seperti bagian-bagian tanaman yang tidak diinginkan dan kotoran yang masih menempel pada simplisia. Sampel yang telah kering ditimbang lalu di hitung susut pengeringannya dan kemudian dihaluskan menggunakan blender.

Pembuatan Ekstrak Etanol Buah Anggur Merah

Serbuk anggur dimaserasi menggunakan etanol 96% dengan perbandingan 1:7, sebanyak 1kg serbuk simplisia di ekstraksi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 7L selama 3-4 hari dengan pengadukan berulang setiap 3 jam sekali, rendaman di saring dengan corong gelas yang telah dilapisi kertas saring dan didapatkan ekstrak anggur 1. Residu diremaserasi ulang dengan perbandingan 1:4, sebanyak 1kg serbuk simplisia di ekstraksi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 4L selama 3-4 hari dengan pengadukan berulang setiap 3 jam sekali, rendaman disaring dengan corong gelas yang dilapisi dengan kertas saring dan didapatkan ekstrak anggur 2. Ekstrak anggur 1 dicampurkan dengan ekstrak anggur 2, ekstrak anggur cair diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental.

Kemudian dihitung rendemen ekstrak yang diperoleh. selanjutnya dilakukan uji karakteristik ekstrak yaitu parameter spesifik yang terdiri dari uji organoleptis ekstrak dan parameter non-spesifik terdiri

dari kadar air, kadar abu, kadar abu tidak larut asam, kadar abu larut air, kadar sari larut air dan kadar sari larut etanol. Kemudian dilakukan skrining fitokimia yang dilakukan terhadap senyawa flavonoid, alkaloid, tannin, fenol, saponin dan steroid/triterpenoid.

Uji Toksisitas Akut

Penyiapan Hewan Uji

Penelitian ini telah mendapatkan keterangan kelayakan etik (*ethical clearance*) Nomor 016/ec.02/kep-kbth/IV/2022 dari komisi etik penelitian STIKes BTH Tasikmalaya. Hewan uji yang digunakan yaitu tikus Wistar putih jantan (*Rattus norwegicus*) sebanyak 25 ekor dengan bobot badan 200 - 300 gram. Tikus dibagi menjadi 5 kelompok, tiap kelompok terdiri dari 5 ekor tikus jantan yang ditentukan secara acak. Kelompok I sebagai kontrol negatif sedangkan kelompok II – V sebagai kelompok perlakuan. Sebelumnya tikus diaklimatisasi selama 1 minggu yang bertujuan untuk mengondisikan hewan dengan suasana laboratorium dan untuk menghilangkan stress akibat transportasi.

Perlakuan Pada Hewan Uji

Tikus dipuaskan terlebih dahulu selama 14-18 jam, air minum boleh diberikan. Setelah dipuaskan, hewan ditimbang dan diberikan sediaan uji. Sediaan uji dilakukan dengan pemberian dosis tunggal menggunakan sonde. Kelompok I kontrol negatif diberi aquades, kelompok perlakuan II diberi EEAM 500mg/200gBB, kelompok perlakuan III diberi EEAM 1000mg/200gBB, kelompok perlakuan IV diberi EEAM 1500mg/200gBB dan kelompok perlakuan V diberi EEAM 2000mg/200gBB. Setelah perlakuan, pakan boleh diberikan kembali setelah 3-4 jam.

Pengamatan Hewan Uji

Pengamatan dilakukan selama 24 jam pertama sejak diberikan perlakuan, dan dilanjutkan 7-14 hari. Perhatian khusus diberikan akan adanya tremor, kejang, salivasi, diare, alergi, lemah, tidur dan koma. Pengamatan meliputi waktu timbul

dan hilangnya gejala toksis, berat badan sebelum dan sesudah perlakuan serta saat terjadinya kematian. Hewan uji yang sekarat dikategorikan dalam perhitungan sebagai hewan yang mati. Hewan ditimbang sedikitnya 2 kali dalam 1 minggu.

Analisis Data

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini adalah data primer dari hasil pengamatan hewan coba, baik kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan. Data yang diperoleh berupa data kuantitatif dan kualitatif. Data kuantitatif yang akan diperoleh yaitu jumlah hewan coba yang mati, sedangkan data kualitatif yang akan diperoleh berupa gejala efek toksik.

Data perubahan berat badan pada hewan uji dianalisis secara statistic dengan uji *one way* ANOVA selanjutnya data diolah dengan menggunakan bantuan program SPSS 26 *for windows*. Data LD₅₀ diambil dari jumlah tikus yang mati dan yang masih hidup pada setiap kelompok. Selanjutnya dihitung nilai LD₅₀ menggunakan metode *Thomson* dan *Weil*.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Hasil Penelitian

Hasil Pengerinan Simplisia Buah

Anggur Merah

Buah anggur merah (*Vitis vinifera* Linn) yang digunakan sebanyak 9 kg menghasilkan simplisia sebanyak 1.192 g, yang sebelumnya telah melalui proses pengeringan. Susut pengeringan yang didapat dari pengeringan simplisia buah anggur merah sebesar 1,15%. Penghalusan simplisia menghasilkan 1.090g serbuk simplisia.

Hasil Ekstraksi Buah Anggur Merah

Hasil ekstrak kental yang didapatkan dari 1.090 g simplisia buah anggur merah dan 11 L alkohol 96% sebagai pelarut, sebanyak 862 g ekstrak kental. Sehingga, rendemen ekstrak buah anggur merah yang di hasilkan sebesar 79%.

Hasil Karakterisasi Ekstrak

Hasil pemeriksaan karakterisasi ekstrak buah anggur merah yang meliputi karakterisasi spesifik dapat di lihat pada Tabel 3.1 dan non spesifik dapat di lihat pada Tabel 3.2.

Tabel 3.1 Hasil Uji Organoleptik

Parameter Organoleptik	Ekstrak Buah Anggur Merah
Bentuk	Kental
Warna	Coklatr kehitaman
Bau	Berbau khas
Rasa	Manis sedikit pahit

Tabel 3.2 Standarisasi Ekstrak

Parameter Uji	Kadar(%)
Kadar Air	9,51
Kadar Abu	1,10
Kadar Abu Tidak Larut Asam	0
Kadar Abu Larut Air	100
Kadar Sari Larut Air	48,51
Kadar Sari Larut Etanol	36,62

Hasil Uji Skrining Fitokimia

Hasil uji skrining fitokimia ekstrak buah anggur merah dapat di lihat pada table 3.3.

Tabel 3.3 Hasil Uji Skrining Fitokimia

Metabolit Sekunder	Hasil Uji
Fenol	+
Tannin	+
Flavonoid	+
Alkaloid	+
Saponin	+
Triterpenoid	+
Steroid	-

Keterangan : (+) mengandung senyawa metabolit
(-) tidak mengandung senyawa metabolit

Hasil Pengamatan Hewan Uji

Tikus kontrol negatif dan perlakuan dengan EEAM diamati perubahan tingkah laku, perubahan berat badan yang di sebabkan oleh efek toksik. Hasil engamatan gejala toksik pada tikus dapat dilihat pada Tabel 3.4.

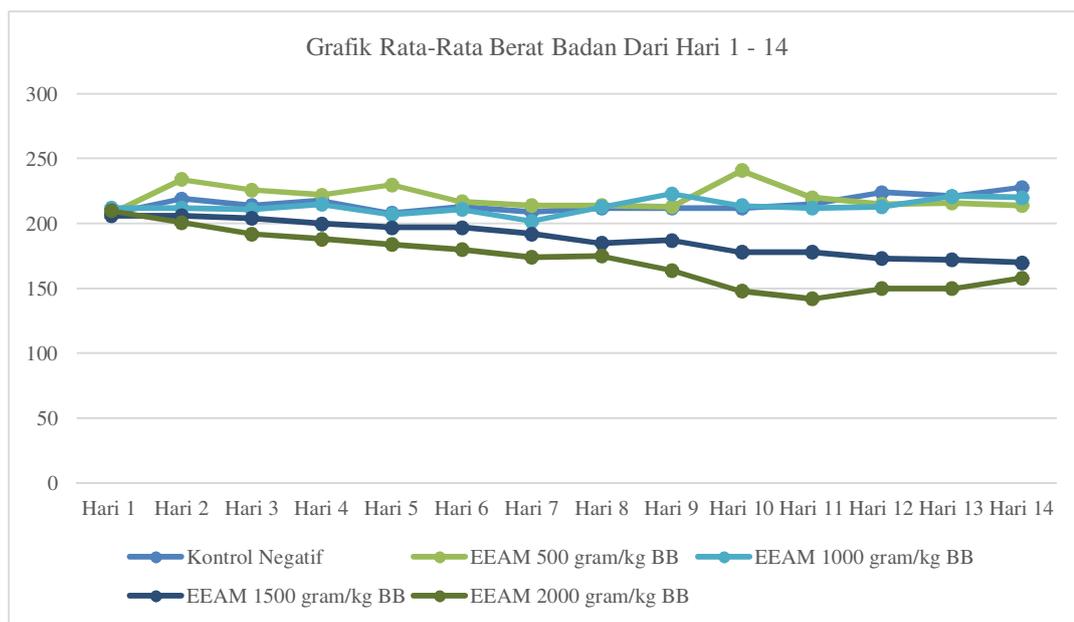
Tabel 3.4 Pengamatan Tanda-tanda Toksisitas

Gejala	Kontrol Negatif					EEAM 500mg/kgBB					EEAM 1000mgkg/BB					EEAM 1500mg/kgBB					EEAM 2000mg/kgBB				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Kejang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salivasi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tremor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diare	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alergi	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lemah	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Tidur	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Koma	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Sesak Nafas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Perut Membesar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan : (+) = terjadi
 (-) = tidak terjadi

Bobot badan hewan uji yang diamati adalah bobot sebelum perlakuan dan sesudah perlakuan. Data perubahan berat badan hewal uji dianalisis secara statistik

dengan uji *one way* anova. Hasil perubahan berat badan tikus dapat dilihat pada data berat badan tikus yang tercantum pada Gambar 3.1.

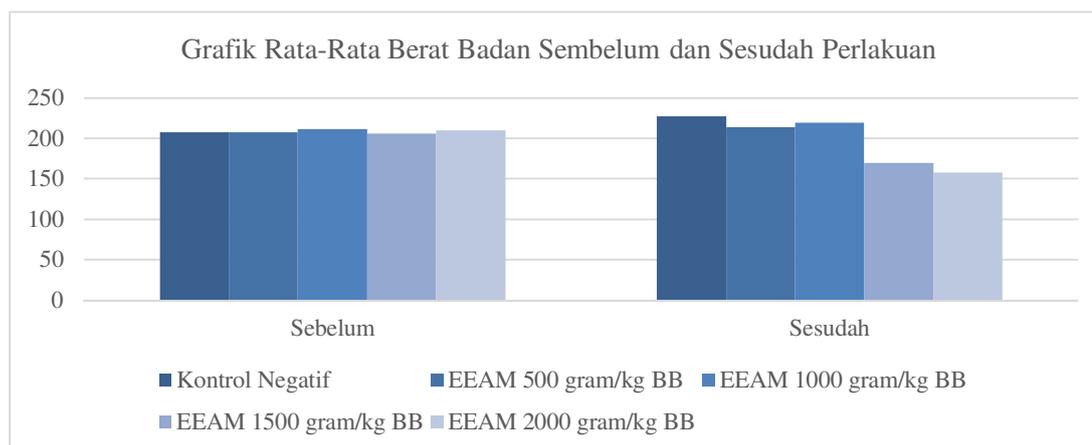


Gambar 3.1 Grafik Perubahan Rata-rata Berat Badan Tikus Dari Hari 1- 14

Tabel 3.5 Uji One Way ANOVA Rata-rata Perubahan Berat Badan Tikus

Kelompok	Rata - rata					P-value
	Kontrol Negatif	EEAM 500 g/kgBB	EEAM 1000 g/kgBB	EEAM 1500 g/kgBB	EEAM 2000 g/kgBB	
Sebelum	208	208	212	206	210	0,934
Sesudah	228	214	220	170	158	0,000

Keterangan : p<0,05 terdapat perbedaan signifikan
p>0,05 tidak terdapat perbedaan signifikan

**Gambar 3.1 Grafik Pengamatan Rata-rata Berat Badan Tikus Sebelum dan Sesudah Perlakuan**

Parameter yang diamati adalah kematian tikus selama 14 hari dari hari pertama sampai hari terakhir. Hasil data

pengamatan kematian hewan uji dapat dilihat pada Tabel 3.6.

Tabel 3.6 Data Kematian Tikus

Kelompok	Jumlah tikus	Dosis (mg/kgBB)	Jumlah kematian
Kontrol Negatif	5	0	0
I	5	500	0
II	5	1000	0
III	5	1500	3
IV	5	2000	5

3.2. Pembahasan

Pembuatan simplisia buah anggur merah dilakukan dengan cara sortasi basah untuk memisahkan kotoran yang masih menempel pada tumbuhan, kemudian dilakukan pengeringan menggunakan oven dengan suhu 70°C selama 14 hari. Dimana 9 kg buah anggur merah menghasilkan 1.192 g simplisia kering. Pemilihan oven sebagai metode pengeringan dipilih karena pada pengeringan oven suhu pemanasan dalam oven lebih merata, suhu yang digunakan dapat dimonitori dan sirkulasi udara lebih sempurna sehingga mengoptimalkan

proses pengeringan, serta pengeringan dapat diselesaikan dalam waktu yang singkat (Depkes RI, 2008). Setelah itu dilakukan sortasi kering untuk memisahkan benda-benda asing seperti bagian-bagian tanaman yang tidak diinginkan dan kotoran yang masih menempel pada simplisia. Sampel yang telah di sortasi dan kering dihaluskan menggunakan blender, serbuk simplisia yang dihasilkan dari proses penghalusan sebanyak 1.090 g.

Hasil susut pengeringan yang didapat menunjukkan banyaknya senyawa yang hilang pada proses pengeringan.

Umumnya adalah senyawa senyawa yang mudah menguap (Depkes RI, 2000). Semakin tinggi dan lama pengeringan akan memengaruhi hilangnya kadar air dan kandungan yang terdapat dalam simplisia (Saputri *et al.*, 2022). Nilai susut pengeringan yang didapat dalam penelitian ini sebesar 1,15%, berdasarkan Farmakope Herba Indonesia Nilai susut pengeringan tidak melebihi 10%. Hasil yang didapat dinyatakan baik karena memenuhi persyaratan yaitu tidak lebih dari 10%.

Ekstraksi buah anggur merah diekstrak menggunakan metode maserasi, maserasi digunakan karena termasuk salah satu metode yang paling mudah pada pembuatan ekstrak karena tidak memerlukan alat yang rumit serta terjangkau (Depkes RI, 2000). Penggunaan etanol 96% sebagai pelarut dipilih karena etanol merupakan pelarut dapat mengekstraksi senyawa polar maupun non polar dengan baik. Etanol juga dapat menyaring senyawa kimia lebih banyak dibandingkan senyawa lain (Lumempouw *et al.*, 2012; Riwanti *et al.*, 2020). Hasil ekstrak kental yang didapatkan dari 1.090 g simplisia buah anggur merah dan 11L alkohol 96% sebagai pelarut, sebanyak 862 g ekstrak kental.

Rendemen ekstrak buah anggur merah yang di hasilkan sebesar 79%. Semakin tinggi nilai rendemen yang dihasilkan, maka ekstrak yang dihasilkan akan semakin banyak, rendemen dikatakan baik jika nilainya >10% (Armando, 2009). Oleh karena itu hasil rendemen ekstrak yang didapat dinyatakan baik karena hasil rendemen >10%.

Karakterisasi ekstrak dilakukan dengan menentukan karakterisasi spesifik melalui uji organoleptik ekstrak buah anggur merah. Uji organoleptik terhadap ekstrak bertujuan untuk pengenalan awal menggunakan pancaindra yang dilakukan dengan cara mencium bau dari ekstrak, mengetahui rasa ekstrak, melihat warna ekstrak dan melihat bentuk ekstrak (Depkes RI, 2000). Ekstrak kental menunjukkan hasil bertekstur kental,

berwarna coklat kehitaman, berbau khas dan rasa manis sedikit pahit.

Karakterisasi non spesifik dapat ditentukan melalui penetapan kadar air, kadar abu, kadar abu tidak larut asam, kadar abu larut air, kadar sari larut air dan kadar sari larut etanol pada ekstrak buah anggur merah. Penetapan kadar air ekstrak bertujuan untuk memberikan rentang tentang besarnya kandungan air yang terdapat dalam ekstrak. Hasil penetapan kadar air dalam ekstrak buah anggur merah memiliki kadar air sebesar 9,51%, suatu ekstrak dikatakan telah memenuhi syarat standar apabila memiliki kadar air <10%. Tingginya kadar air yang terkandung dalam suatu ekstrak dapat menyebabkan pertumbuhan mikroorganisme (Farmakope Herbal, 2008; Supriningrum *et al.*, 2017). Hasil kadar air yang didapat dinyatakan sesuai dengan syarat standar karena hasil kadar air kurang dari 10%. Tingginya kadar air pada suatu ekstrak dapat disebabkan oleh proses pengeringan yang kurang optimal (Prasetyo dan Inorihah, 2013) serta absorpsi air kedalam ekstrak saat proses penyimpanan akibat lingkungan yang lembab (Saifudin *et al.*, 2011).

Hasil penetapan kadar abu dalam ekstrak buah anggur merah memiliki kadar sebesar 1,10%, hasil pengujian ini sesuai dengan persyaratan Farmakope Herbal Indonesia yakni kadar abu total tidak lebih dari 16,6%. Penetapan kadar abu dilakukan untuk memberikan gambaran kandungan mineral yang berasal dari proses awal sampai terbentuknya ekstrak (Depkes RI, 2000). Semakin tinggi kadar abu yang diperoleh maka kandungan mineral dalam bahan juga semakin tinggi (Rakhmawati *et al.*, 2014).

Penetapan kadar abu tidak larut asam dilakukan untuk mengevaluasi ekstrak terhadap kontaminasi mineral eksternal yang berasal dari luar seperti tanah dan pasir (Saifudin *et al.*, 2011). Tingginya kadar abu tidak larut dalam asam menunjukkan adanya kandungan silika yang berasal dari tanah atau pasir dan unsur logam perak seperti timbal dan merkuri (Guntarti *et al.*, 2015). Hasil

penetapan kadar abu tidak larut asam dalam ekstrak etanol buah anggur merah memiliki kadar 0%, hasil yang didapat dinyatakan baik karena memenuhi persyaratan kadar abu tidak larut asam yaitu tidak lebih dari 1% (Depkes RI, 2000).

Hasil penetapan kadar abu larut air dalam ekstrak etanol buah anggur merah memiliki kadar sebesar 100%. Kadar abu larut air menunjukkan jumlah garam mineral organik yang terkandung dalam ekstrak. Berdasarkan kriteria Standar Nasional Indonesia kadar abu larut air dalam ekstrak minimal 45%, hasil yang di dapat dinyatakan baik karena memenuhi persyaratan yaitu lebih dari 45%.

Penetapan kadar sari larut dalam pelarut air dan etanol bertujuan sebagai perkiraan banyaknya kandungan senyawa-senyawa aktif yang bersifat polar (larut dalam air) atau bersifat polar-non polar (larut dalam etanol) (Saifudin *et al.*, 2011). Pada ekstrak etanol buah anggur merah kadar senyawa yang larut dalam pelarut air dan etanol masing-masing sebesar 48,51% dan 36,62% dari hasil yang diperoleh bahwa senyawa dari buah anggur merah lebih banyak larut dalam air dibanding etanol. Hal ini menunjukkan senyawa polar yang terkandung dalam buah anggur merah lebih banyak dibandingkan dengan senyawa non polar.

Berdasarkan penelitian Merli (2021), ekstrak buah anggur merah mengandung senyawa alkaloid, tanin, saponin, flavonoid, fenol dan steroid. Hal ini sejalan dengan hasil skrining fitokimia yang dilakukan pada penelitian ini, senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak buah anggur merah pada penelitian ini adalah senyawa alkaloid, flavonoid, fenol, tanin, saponin dan triterpenoid seperti yang tercantum pada Tabel 3.3.

Buah anggur merah pada penelitian ini dapat dimanfaatkan sebagai agen antikolestrol. Menurut *The George Mateljan Foundation*, buah anggur merah dapat memberikan beberapa manfaat kesehatan, selain antioksidan yang kuat,

juga modulasi metabolisme lipid dan menghambat oksidasi LDL (*low-density lipoprotein*) (Hassan *et al.*, 2010). Kandungan zat yang terdapat dalam anggur merah sudah diproduksi secara massal di berbagai negara sebagai obat fitofarmaka dan dipakai untuk pengobatan berbagai macam penyakit, salah satunya sebagai antikolestrol (Xia *et al.*, 2007). Anggur merah berpengaruh terhadap penurunan kadar trigliserida darah (Orbayinah dan Kurnia, 2011).

Penentuan dosis awal 500 mg/kgBB sebagai dosis terapi obat di pilih berdasarkan penelitian Orbayinah dan Kurnia (2011), yang menunjukkan bahwa ekstrak anggur merah memiliki efek antikolesterol, dosis selanjutnya ditentukan dengan mengkalikan dosis terapi sehingga diperoleh dosis yang maksimal yang dapat menyebabkan kematian pada hewan coba dengan batas maksimal pemberian 5000 mg/kgBB (Priyanto, 2010). Pada penelitian ini dosis dikalikan 2 dari dosis terapi.

Uji toksisitas akut dilakukan terhadap 25 ekor tikus putih Wistar (*Rattus norvegicus*) yang dibagi menjadi 5 kelompok setiap kelompok berisi 5 ekor tikus. Sebelum digunakan untuk penelitian, tikus diaklimatisasi terlebih dahulu selama 7 hari, yang bertujuan untuk mengondisikan hewan dengan suasana laboratorium dan untuk menghilangkan stress akibat transportasi (BPOM, 2014). Selama proses aklimatisasi tikus diberi makan dan minum setiap harinya, berat badan tikus di monitori setiap 3 hari sekali agar berat badan tikus tidak melebihi kriteria inklusi yang sudah di tetapkan. Kemudian setelah proses aklimatisasi selesai selanjutnya dilakukan perlakuan, tikus dipuasakan terlebih dahulu selama 14-18 jam, air minum tetap diberikan. Tikus dipuasakan bertujuan agar tidak ada nutrisi atau zat lain yang dapat mengganggu hasil dari penelitian, selanjutnya tikus di timbang untuk mengetahui berat badan sebelum diberikan perlakuan (BPOM, 2014). Pada kelompok I kontrol negatif diberikan aquades, kelompok perlakuan II, III, IV,

V diberikan EEAM 500 mg/kgBB pada kelompok II, EEAM 1000 mg/kgBB pada kelompok III, EEAM 1500 mg/kgBB pada kelompok IV dan EEAM 2000 mg/kgBB pada kelompok V.

Pengamatan dilakukan setelah sediaan diberikan pada setiap tikus di masing-masing kelompok untuk mengetahui perubahan yang terjadi setelah diberikan perlakuan dengan sebelum diberikan perlakuan, pengamatan berupa gejala toksik, perbuahan berat badan dan kematian. Pengamatan dilakukan selama 14 hari, tanda toksisitas yang diamati meliputi adanya tremor, kejang, salivasi, diare, alergi, lemah, tidur dan koma. Berdasarkan Tabel 3.4 gejala toksisitas ditunjukkan oleh tikus pada kelompok perlakuan II, IV dan V. Pada kelompok perlakuan II tikus 1 dan 2 menunjukkan gejala alergi ruam kemerahan dibagian mulut dan hidung, pada kelompok IV tikus 2, 3 dan 5 menunjukkan gejala lemah, tidur dan koma, gejala lain ditunjukkan pada tikus 2 yaitu perut tikus yg membesar. Pada kelompok V semua tikus menunjukkan gejala lemah, tidur dan koma, gejala lain yang ditunjukkan berupa kesulitan bernafas. Senyawa aktif yang terdapat dalam tanaman hampir selalu toksik apabila diberikan dalam dosis tinggi. Semua keracunan terjadi akibat reaksi antara zat beracun dengan reseptor dalam tubuh (Marlinda *et al.*, 2012). Metabolit sekunder yang diduga dapat menyebabkan kerusakan sel organ adalah saponin dan alkaloid dikarenakan waktu ekskresi pada metabolisme yang memerlukan waktu lama, sehingga kontak pada sel hati menjadi lebih lama dan dapat merusak sel hati (Nurqobiah *et al.*, 2014). Saponin diduga memiliki mekanisme merusak dengan cara meningkatkan permeabilitas lipid bilayer sel darah merah yang menyebabkan hemolisis, hemolisis akibat saponin dapat menyebabkan kerusakan pada ginjal (Ayuningtyas *et al.*, 2015). Flavonoid yang terkandung dalam buah anggur merah diperkirakan menjadi penyebab gangguan system saraf yang menyebabkan tikus mengalami kegagalan dalam mengendalikan otot-otot sehingga

menjadi lemah dan lumpuh (Mustapa *et al.*, 2018).

Penimbangan berat badan tikus dilakukan sebelum dan sesudah perlakuan, diperoleh nilai rata-rata berat badan dari setiap kelompok sebelum diberikan perlakuan dan sesudah diberikan perlakuan. Berdasarkan Tabel 3.5 dan Gambar 3.1 setiap kelompok uji mengalami penurunan dan kenaikan berat badan yang berbeda. Pada kelompok I kontrol negatif dan kelompok perlakuan II dan III tikus mengalami peningkatan berat badan, sedangkan pada kelompok perlakuan IV dan V tikus mengalami penurunan berat badan. Analisa statistik data rata-rata perubahan berat badan tikus dengan uji *one way* ANOVA menunjukkan nilai $p < 0,05$ yang berarti bahwa ada perbedaan rata-rata berat badan tikus yang signifikan sebelum dan sesudah perlakuan. Perubahan berat badan secara nyata merupakan indikator yang paling mudah terlihat dan menjadi indikator awal adanya efek toksik dari sampel uji yang diberikan. Bobot badan pada studi toksisitas hewan coba yang mendapat dosis tinggi umumnya kehilangan berat badan yang disebabkan oleh penurunan nafsu makan (Sireeratawong *et al.*, 2010). Penurunan nafsu makan dapat di sebabkan oleh senyawa yang terkandung dalam buah anggur merah, seperti alkaloid, steroid dan flavonoid. Senyawa tersebut dapat bertindak sebagai *stomach poisoning* atau racun perut, oleh karena itu jika senyawa tersebut masuk kedalam perut tikus alat pencernaan tikus akan terganggu dan menyebabkan tikus tidak mau makan (Mukti *et al.*, 2012).

Berdasarkan data kematian tikus yang tercantum pada Tabel 3.6 diperoleh dari setiap kelompok dalam waktu 24 jam sampai hari ke 14. Pada kelompok I kontrol negatif, kelompok perlakuan II dosis EEAM 500 mg/kgBB dan kelompok perlakuan III dosis 1000 mg/kgBB tikus tidak mengalami kematian. Kematian pada tikus terjadi pada kelompok perlakuan IV dosis EEAM 1500 mg/kgBB sebanyak 3 tikus, tikus nomor 2 mengalami kematian pada hari 7

setelah pemberian sediaan, tikus nomor 3 dan 5 sekarat sampai hari pengamatan selesai yaitu hari ke 14 dan pada kelompok perlakuan V dosis 2000 mg/kgBB semua tikus sekarat sampai hari pengamatan selesai yaitu hari ke 14. Hewan yang mati dalam rentang < 3 hari, berarti mati karena faktor dosis langsung dan jika mati pada rentang > 4 hari umumnya mati karena kerusakan organ. Hewan uji yang sekarat dikategorikan dalam perhitungan sebagai hewan yang mati (Priyanto, 2010; BPOM, 2014).

Berdasarkan data kematian yang diperoleh, urutan kematian pada uji toksisitas akut yaitu 0,0,3,5, pada Tabel weil harga r 0,0,3,5 mempunyai nilai f (factor) sebesar 0,90000. Kemudian analisis data kematian di hitung menggunakan metode Thomson dan weil, didapat nilai LD₅₀ sebesar 9,32 mg/kgBB, hasil data yang didapat lalu di analisis berdasarkan derajat ketoksikan. Derajat ketoksikan pada ekstrak etanol buah anggur merah dengan dosis 9,32 mg/kgBB termasuk dalam kategori toksik (BPOM, 2014). Sesuai penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh (Dita, 2010) yang menyatakan bahwa ekstrak buah anggur merah memiliki potensi toksisitas akut.

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa dosis pemberian ekstrak etanol yang paling toksik adalah dosis pemberial 2000mg/kgBB karena menyebabkan kematian terbanyak pada tikus, nilai LD₅₀ yang diperoleh dari hasil pengujian uji toksisitas akut ekstrak etanol buah anggur merah (*Vitis vinifera* L.) yaitu sebesar 9,32 mg/kgBB termasuk dalam kategori "Toksik".

REFERENSI

- Armando, R. 2017. Karakterisasi dan Skrining Fitokimia Daun Singkil (*Premna Corymbosa* Rott & Wild). *Ilmiah Ibnu Sina*.
- Ayuningtyas et al., 2015. Efek Nefrotoksik Pemberian Ekstrak Etanol 70% Daun Karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) Terhadap Kadat Ureum Dan Kreatinin Serum Tikus Galur Wistar. *Jurnal Cerebellum* Vol 1 (4).
- BPOM RI. 2014. *Pendoman Uji Toksisitas Nonklinik Secara In Vivo*. Jakarta.
- Departemen Kesehatan RI. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Depkes RI.
- Departemen Kesehatan RI. 2008. *Farmakope Herbal Indonesia*. Jakarta: Depkes RI.
- Dita, M. 2010. *Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Buah Anggur (Vitis vinifera) Terhadap Larva Artemia Salina Leach Dengan Metoda Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)*. Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Guntarti et al. 2015. *Penentuan Non Spesifik Ekstrak Etanol Kulit Buah Manggis (Garcinia mangostana) Pada Variasi Asal Daerah*. Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta.
- Hassan, N., Rafaat, B., Aziz, S. 2010. *Modulatory Role Of Grape Seed Extract On Erythrocyte Hemolysis And Oxidative Stress Induces By Microwave Irradiation In Rats*. *International Journal Of Integrative Biology*.
- Hubrecht, R., And Kirkwood, J. 2010. *The Ufaw Handbook Of The Care And Management Of Laboratory And Other Research Animals. Edisi Ke-8*. Universities Federation For Animal Welfare.
- Lumempouw et al., 2012. Aktivitas anti UV B ekstrak fenolik dari tongkol jagung (*Zea mays* L.). Manado : *JURNAL MIPA UNSRAT* Volume 1.
- Marlinda et al.,. 2012. Analisis Senyawa Metabolit Sekunder Dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Biji Buah Alpukat (*Persea americana* Mill). *Jurnal MIPA UNSRAT*.
- Merli, K. 2021. *Skrining Fitokimia Dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Buah Anggur (Vitis vinifera L.) Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)*. Jurusan Analisis Farmasi Dan

- Makanan Politeknik Kesehatan Kemenkes Jakarta II.
- Mukti et al., 2012. Uji Fitokimia Dan Toksisitas Ekstrak Kasar Gastropoda (*Telescopium telescopium*) Terhadap Larva *Artemia Salina*. *Journal Of Marine Research Vol 1 (2)*.
- Mustapa et al., 2018. *Uji Toksisitas Akut Yang Di Ukur Dengan Penentuan LD50 Ekstrak Etanol Bunga Cengkeh (Syzygium aromaticum L.) Terhadap Mencit (Mus musculus) Menggunakan Metode Thomson-Weil*. Fakultas Olahraga dan Kesehatan, Universitas Negeri Gorontalo.
- Nurqobliyah et al., 2014. Uji Toksisitas Fraksi Air *Impatiens balsamina* Pada Tikus Betina Galur Sprague Dawley. *Pharm Sce Vol 1 (1)*.
- Orbayinah, S., Kurnia, E. P., 2011. Pengaruh Ekstrak Buah Anggur Merah (*Vitis vinifera* L) Terhadap Kadar Trigliserida Tikus Putih (*Rattus novergicus*). *Jurnal Mutiara Medika. 11:3*.
- Prasetyo, M. S., dan Inorihah, E. 2013. *Pengelolaan Budidaya Tanaman Obat-Obatan (Bahan Simplisia)*. Badan Penelitian Fakultas UNIB, Bengkulu.
- Priyanto. 2010. *Toksikologi Ed. II*. Depok: Leskonfi Lembaga Studi Dan Konsultasi Farmakologi.
- Priyanto. 2010. *Toksikologi Ed. II*. Depok: Leskonfi Lembaga Studi Dan Konsultasi Farmakologi
- Rakhmawati et al., 2014. Formulasi dan Evaluasi Sifat Sensoris dan Fisikokimia Produk Flakes Kompositor Berbahan Dasar Tepung Tapioka, Tepung Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris* L.) dan Tepung Konjac (*Amorphophallus oncophillus*). *Jurnal Teknosains Pangan Vol 3 (1)*.
- Reiza, M. A, Meiyanti. 2021. Pemanfaatan Obat Tradisional Di Indonesia: Distribusi Dan Factor Demografis Yang Berpengaruh. *Jurnal Biomedika Dan Kesehatan Vol. 4 (3)*.
- Riayani S., 2011. *Pengaruh Ekstrak Anggur Merah (Vitis vinifera) Terhadap Kadar Kolesterol Total Darah Tikus Putih (Rattus novergicus)*. Fakultas Kedokteran Dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
- Riwanti et al., 2020. Pengaruh Perbedaan Konsentrasi Etanol Pada Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol 50, 70 dan 96% *Sargassum polycytum* dari Madura. *Journal of Pahraceutical Care Anwar Medika Vol.2 (2)*.
- Saifudin et al. 2011. *Standarisasi Bahan Obat Alam Edisi Pertama*. Graha Ilmu, Yogyakarta.
- Saputri et al., 2022. Pengaruh dan Suhu dan Waktu Pengeringan Terhadap Kadar Air dan Kadar Vitamin C pada Bubuk Cabaik Rawit (*Capsicum frutescens* L.). *SENIATI Vol 6 (3)*.
- Sari, Lusia, O. R. K. 2006. Pemanfaatan Obat Tradisional Dengan Pertimbangan Manfaat Dan Keamanannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian. Vol : 3 (1)*.
- Sireetawong et al. 2010. Toxicity Evaluation of Sappan Wood Extract in Rats. *J Med Assoc Thail. Vol: 93(7)*
- Supriningrum et al. 2017. Karakterisasi dan Skrining Fitokimia Daun Singkil (*Premna corymbosa* Rottl & Wild). *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina*.
- Tarmizi. 2010. *Buah Anggur Berpotensi Anti Kanker*. Available From : <http://kimia.unp.ac.id/?p=221>. Accessed March 8, 2022.
- Thompson, Weil CS. 1951. Tables for Convenient Calculation of Median Effective Dose (LD₅₀ or ED₅₀) and Instructions in Their Use. *Biometrics, 8:248-263*.
- Xia, M. et al., 2007. Anthocyanin Prevent Cd40-Activated Proinflammatory Signaling In Endothelial Cells By Regulating Cholesterol Distribution. *American Heart Association. 27:519*.