

UJI TOKSISITAS DAN UJI TERATOGENIK INFUS BIJI PINANG (*ARECA CATECHU L.*) FASE IMPLANTASI PADA TIKUS GALUR WISTAR

D. Mutiatikum*, Lucie Widowati*, Ani Isnawati*

ABSTRACT

TOXICITY AND TERATOGENIC TEST TO PINANG SEED INFUSION (*ARECA CATECHU L.*) IMPLANTATION PHASE ON WISTAR RAT

One of the empirical effects of pinang seed or jambe (Areca catechu L.) is the shedding of menstrual period (emenogoga) and some bibliography said that pinang seed contain abortive compound, which is also potentially teratogenic. The objectives of this study are to learn about the effects of pinang seed infus to pregnant mouse by observing the number of fetus, the amount of resorption, the number of abortion and physical defects on the fetus born. The infusion was given orally on the 3rd and 5th day of pregnancy to observe the prenatal death. The results show that dosage of 211, 422 and 844 mg/ kg of body weight that was administered orally to pregnant mouse of implantation phase influence the degree of abortion statistically significant (50%) and there is no teratogenic effect.

PENDAHULUAN

Biji pinang atau jambe (*Areca catechu L.*) termasuk tanaman obat yang khasiatnya secara empiris adalah sebagai anti diare, anti cacing, anti disentri, untuk memperkuat gigi dan sebagai peluruh haid (*emenogoga*). Kandungan biji pinang ini adalah alkaloid (arekolin, arrekoidin, gurasin, guvalin), tanin dan gula^{1,2}). Menurut kepustakaan, biji pinang mengandung senyawa yang bersifat *abortivum*, sedangkan bahan-bahan yang bersifat *abortivum* berpotensi sebagai teratogen dan ini dapat menyebabkan kelainan atau cacat pada bayi yang dikandung³).

Uji teratogenik adalah uji yang dirancang untuk mengevaluasi efek khusus suatu senyawa pada janin selama masa kritis kehamilan seperti fase implantasi, fase organogenesis dan fase fetus.

Pemaparan fetus terhadap obat terjadi karena obat melewati sawar plasenta⁴).

Penyalahgunaan obat tradisional untuk tujuan aborsi semakin meningkat, sejalan dengan kehamilan yang tidak dikehendaki. Biji pinang sering ditemukan pada komponen jamu peluntur/pelancar haid, obat tradisional pelancar haid banyak digunakan justru untuk menggugurkan kandungan. Berdasarkan hal tersebut di atas dilakukan penelitian ini dengan tujuan untuk mendapatkan informasi mengenai efek samping akibat penggunaan infus biji pinang.

BAHAN DAN CARA

Bahan

Bahan yang digunakan adalah biji pinang (*Areca catechu L.*) diperoleh dari tanaman pinang yang berasal dari daerah

* Puslitbang Farmasi, Badan Litbangkes, Depkes RI.

Garut (Jawa Barat) dalam keadaan basah. Determinasi tumbuhan dilakukan di Herbarium Bandungense, Jurusan Biologi, FMIPA ITB. Setelah dibersihkan, dipotong kecil-kecil dan dikeringkan di bawah sinar matahari, kemudian dibuat serbuk dengan menggunakan alat penggiling dan disaring dengan ayakan Mesh 80.

Hewan percobaan yang digunakan adalah tikus dewasa jantan dan betina galur wistar, berumur kurang lebih antara 10--12 minggu dengan bobot badan 150 - 200 g dan mencit dewasa galur Webster dengan bobot badan 20 - 25 g yang diperoleh dari Laboratorium Perhewan Jurusan Farmasi, FMIPA, ITB.

Tempat pelaksanaan penelitian adalah Laboratorium Perhewan Jurusan Farmasi, FMIPA, ITB.

Cara

1. Pemeriksaan Pendahuluan meliputi :
 - Determinasi tanaman oleh Herbarium Bandungense, Jurusan Biologi FMIPA ITB.
 - Penetapan kadar abu menurut FI IV
 - Penetapan kadar air menurut FI IV
 - Pembuatan infus biji pinang 10% menurut FI IV
2. Uji Toksisitas Akut menurut cara Weil CS.⁵⁾.
Tahap peninjauan
Pada tahap ini 5 kelompok mencit masing-masing 5 ekor tiap kelompok diberi dosis antara 10 - 100 mg/10 g bb secara oral, menggunakan satu faktor tertentu. Observasi dilakukan selama 24 jam, bila dalam 24 jam ada yang mati 0% dan 100%, maka percobaan tahap kedua dilakukan dengan menggunakan dosis tersebut. Apabila tak ada

yang mati maka dilakukan dengan mempergunakan dosis di atas 100 mg/10 g bb.

Tahap penentuan LD₅₀

Pada tahap ini 5 kelompok mencit masing-masing 10 ekor diberi dosis berdasarkan peninjauan, tiap kelompok digunakan satu faktor tertentu. Observasi juga dalam 24 jam dilihat adanya kematian, apabila angka kematian cocok dengan yang tertera dalam tabel, maka harga LD₅₀ dapat dihitung, tetapi jika belum cocok maka percobaan diulang lagi hingga ditemukan angka kematian yang cocok dengan tabel yang tersedia. Data hasil pengamatan dihitung menggunakan metode perhitungan menurut Reed Muench.

3. Uji Teratogenik

1. Penentuan tahap siklus estrus pada tikus betina dewasa
2. Menentukan hari pertama kehamilan
3. Penentuan dosis infus biji pinang yang dipakai oleh hewan percobaan adalah hasil konversi dari dosis manusia. Dosis terkecil ditentukan 1/56 dari dosis pemakaian pada manusia, sedangkan fluorourasil digunakan sebagai pembanding positif karena mempunyai efek teratogenik.

4. Kelompok Dosis

Sejumlah 50 ekor tikus betina hamil dibagi menjadi 5 kelompok masing-masing 10 ekor tikus hamil. Infus diberikan peroral pada induk tikus hamil sebagai berikut:

Kelompok I mendapat infus biji pinang 211 mg/kg bb

Kelompok II mendapat infus biji pinang 422 mg/kg bb

Kelompok III mendapat infus biji pinang 844 mg/kg bb

Kelompok IV (pembanding) mendapat fluorourasil 25 mg/kg bb
Kelompok V (kontrol) mendapat aquades

4. Pembedahan dan Pengamatan
Setelah tikus betina dewasa terbukti kawin pada hari ke nol, dibedah pada hari ke 19 kehamilan untuk diamati. Fetus-fetus harus dipindahkan secara berurutan, dimulai dari pangkal uterus kanan sampai ovarium, kemudian kiri. Tiap fetus harus dikeringkan sebelum ditimbang dicatat pada kertas dokumentasi.
5. Fiksasi Fetus dalam Alkohol 90% untuk Pembuatan Kerangka meliputi:
 - Penjernihan
 - Pemutihan
 - Pewarnaan
 - Pembersihan akhir
 - Penilaian kerangka
 - Penyimpanan kerangka
6. Penilaian Jaringan Lunak Fetus Tikus.
Setelah fetus difiksasi dalam larutan Bouin selama 1-2 minggu, fetus dari satu induk dipindahkan kedalam gelas piala berisi air. Satu fetus diangkat, dikeringkan dengan kertas tisu, disayat dengan pola tertentu kemudian diamati. Organ bagian dalam dikeluarkan secara hati-hati yaitu jantung, hati, ginjal, dan paru. Keadaan ureter, kelenjar kelamin dan kandung kemih diperiksa. Semua penyimpanan dari keadaan normal dicatat dan sayatan disimpan.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

1. Uji Pendahuluan

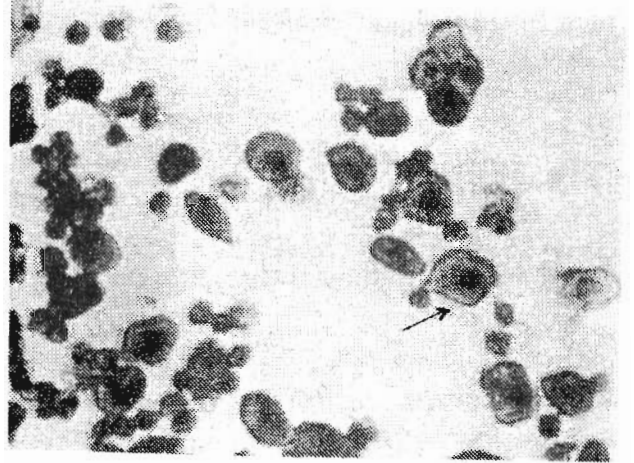
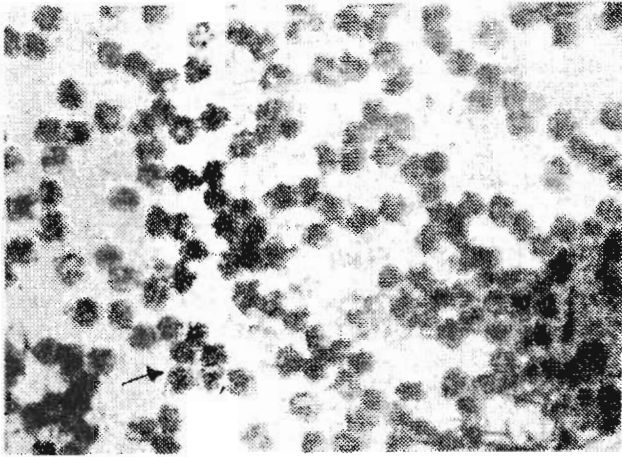
Determinasi tumbuhan oleh Herbarium Bandungense, Jurusan Biologi FMIPA Institut Teknologi Bandung. Hasil determinasi menunjukkan bahwa tanaman uji adalah *Areca catechu* L. Hasil pemeriksaan kadar air dari biji pinang adalah 8,4% dan kadar abu 2,1% masih memenuhi syarat yang ditetapkan Materia Medika Indonesia⁶.

2. Uji Toksisitas Akut

Data hasil pengamatan dan perhitungan dengan menggunakan metode Reed Muench dapat dilihat pada Tabel di bawah ini. Menurut Materia Medika China LD₅₀ biji pinang pada mencit adalah 120 ± 24 mg/ kg bb pemberian secara oral, sedangkan hasil penelitian adalah 141,9 mg/ kg bb dengan cara pemberian yang sama. Setelah dikonversi terhadap manusia (mg/ kg bb manusia), maka dapat dikategorikan sangat toksik (*very toxic*).

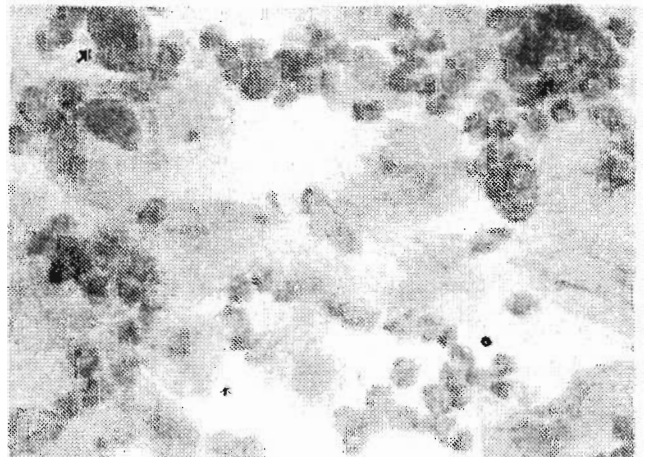
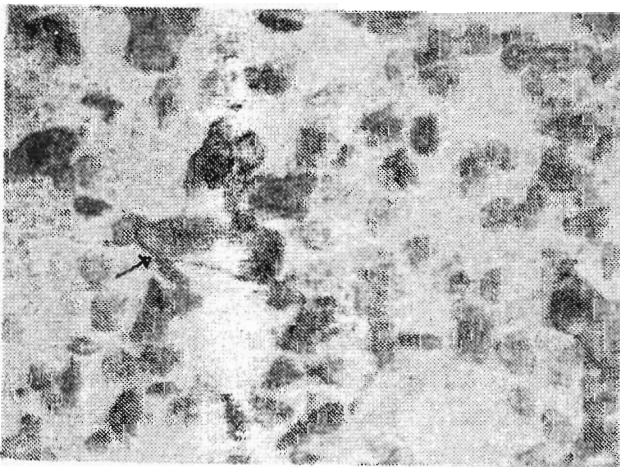
3. Uji Teratogenik

Penentuan Siklus estrus pada Tikus Betina Dewasa.
Pada tikus, siklus estrus terjadi antara empat sampai lima hari. Dalam satu siklus pada tikus terjadi empat fase yaitu fase estrus, kemudian metestrus, diestrus dan proestrus. Hasil pengamatan dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



Gambar 1 : Apusan vagina fase diestrus
(→ = banyak leukosit)

Gambar 2 : Apusan vagina fase proestrus
(→ = sel berinti)



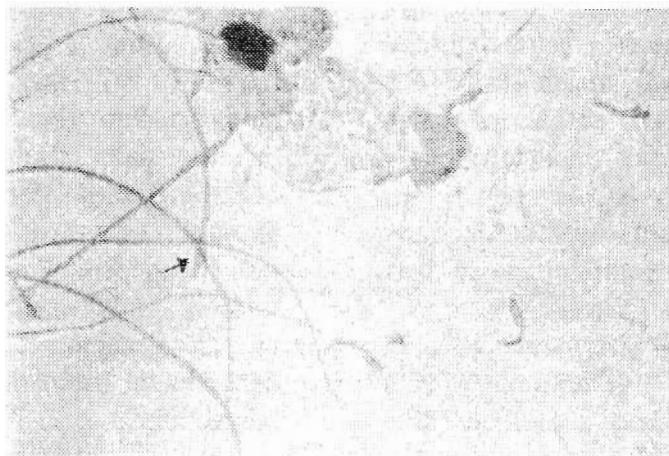
Gambar 3 : Apusan vagina fase estrus
(→ = banyak sel bertanduk)

Gambar 4 : Apusan vagina fase metestrus
• = sel leukosit +++
* = sel bertanduk ++
→ = sel berinti +

Menentukan Hari Pertama Kehamilan.

Tikus betina dewasa yang sedang mengalami proestrus dipisahkan kemudian dikawinkan dengan tikus jantan

dengan perbandingan 3 : 1, kemudian esok harinya diambil apusan vaginanya, adanya sperma dapat dinyatakan sebagai hari ke nol kehamilan. Hasil pengamatan dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



Gambar 5 : Apusana vagina, sperma tikus

Melihat Efek Teratogenik.

Sediaan infus diberikan pada fase implantasi yaitu pada hari ke 3 - ke 5 kehamilan, pada hari ke 19 dikorbankan dan diambil fetusnya. Pengamatan terhadap jumlah *corpus luteum*, resorpsi, bobot badan, ukuran panjang fetus dan yang

mengalami keguguran. Sepertiga dari jumlah fetus dimasukkan dalam alkohol 90% untuk pembuatan rangka, sisanya diawetkan dalam larutan Bouin untuk pengamatan penampilan fisik dan pengamatan jaringan lunak. Hasil pengamatan dapat dilihat pada Tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1 : Hasil Pengamatan Keguguran.

Perlakuan	Jumlah Tikus Hamil	Jumlah Tikus Keguguran	Jumlah
I	10	50%	50%
II	10	50%	50%
III	10	50%	50%
Pembanding	10	50%	50%
Kontrol	10	20%	80%

Keterangan: I = Infus buah pinang dengan dosis 211 mg/kg bb
 II = Infus buah pinang dengan dosis 422 mg/kg bb
 III = Infus buah pinang dengan dosis 844 mg/kg bb
 Pembanding = fluorourasil
 Kontrol = aquades
 Infus buah pinang diberikan pada hari ke 3 - 5 kehamilan dan dibedah pada hari ke 19 kehamilan.

Dari semua dosis untuk perlakuan mengalami keguguran 50%, sedangkan pada kontrol hanya 20%. Pada kontrol terjadi keguguran, karena selain faktor dari luar ada faktor genetik yang dapat menyebabkan keguguran spontan. Pada fase implantasi terjadi periode gametogenesis dan blastogenesis yang masih rawan dari pengaruh luar seperti pemberian obat-obatan, apabila blastosit tidak tahan akan hancur atau keguguran, tetapi apabila hanya beberapa sel yang rusak dapat segera berdiferensiasi dan diganti dengan sel baru sehingga tidak berubah bentuk.

Pengamatan selanjutnya pada fetus yang dilahirkan, kemudian dihi-

tung jumlah *corpus luteum*, kelahiran hidup, resorpsi dari masing-masing tikus hamil yang diamati, juga bobot badan dan ukuran panjang dari masing-masing fetus yang dilahirkan. Hasil pengamatan menunjukkan ada perbedaan yang bermakna secara statistik ($p < 0,10$) pada perlakuan dengan menggunakan fluorourasil sebagai pembandingan pada rata-rata jumlah resorpsi, bobot badan dan ukuran panjang. Peningkatan dosis tidak berpengaruh terhadap peningkatan jumlah *corpus luteum*, jumlah resorpsi, bobot badan dan ukuran panjang badan fetus. Hasil pengamatan dapat dilihat pada Tabel 2 di bawah ini.

Tabel 2. Hasil Pengamatan Lebih Lanjut dari Induk Tikus Hamil Yang Tidak Mengalami Keguguran.

Perlakuan	Jumlah tikus hamil yg diamati	Jumlah rata-rata <i>Corpus luteum</i>	Kelahiran hidup		Resorpsi		Bobot badan rata-rata bayi tikus (gram)	Ukuran panjang rata-rata bayi tikus (mm)
			jumlah rata-rata	%	jumlah rata-rata	%		
I	5	9,0 ± 0,7	7,6 ± 1,1	84,4	1,4 ± 0,9	15,6	1,2 ± 0,2	22,8 ± 2,8
II	5	8,0 ± 0,7	6,6 ± 0,5	82,5	1,4 ± 0,5	17,5	1,3 ± 0,1	23,7 ± 1,3
III	5	8,0 ± 1,0	7,4 ± 0,9	92,5	0,6 ± 0,5	7,5	1,3 ± 0,2	23,4 ± 2,6
Pembandingan	5	9,4 ± 1,3	6,2 ± 1,8	66,0	3,2* ± 1,8	34,0	1,0* ± 0,2	19,7* ± 2,0
Kontrol	8	7,5 ± 1,5	6,8 ± 1,9	90,0	0,7 ± 1,1	10,0	1,4 ± 0,7	23,0 ± 3,7

Keterangan : Perhitungan secara statistik untuk *corpus luteum*, kelahiran hidup dan resorpsi dengan uji wilcoxon pada $p < 0,10$

Untuk bobot badan dan ukuran panjang badan dengan uji t test student pada $p < 0,10$

* ada beda nyata dibandingkan dengan kontrol

Pengamatan rangka pada fetus yang telah mengalami proses adalah normal yaitu mempunyai susunan dan jumlah angka yang normal seperti 7 tulang servikalis, 13 tulang torakalis, 6 tulang lumbalis dan 4 tulang sakro kaudalis. Begitu juga pengamatan jaringan lunak/organ pada fetus yang meliputi organ bagian dalam, anggota badan bagian depan

dan anggota badan bagian belakang. Pengamatan hidrosefalus, *cleft palate* dan rongga mata dibuat dengan cara irisan melintang dari kepala mulai bagian hidung berurutan ke arah belakang. Hasil pengamatan menunjukkan keadaan normal pada semua dosis perlakuan. Hasil pengamatan dapat dilihat pada Tabel 3 dan 4 di bawah ini.

Tabel 3. Hasil Pengamatan Rangka Fetus Yang Hidup Dari Induk Tikus Hamil Yang Diberi Perlakuan Pada Fase Implantasi.

Perlakuan	Jumlah fetus seluruhnya	Jumlah fetus yg diamati *	Kejadian kelainan vertebra (%)			
			Servikalis	Torakalis	Lumbalis	Sakro kaudalis
I	38	13	0	0	0	tt
II	33	10	0	0	0	tt
III	37	13	0	0	0	tt
Pembanding	31	10	0	0	0	tt
Kontrol	54	17	0	0	0	tt

Keterangan : tt = tidak teramati.
 Tidak terdapat kelainan pada tulang rangka pada semua dosis
 * Pengambilan sampel fetus yang diamati berdasarkan tata cara uji teratogenik

Tabel 4. Hasil Pengamatan Jaringan Lunak/Organ Pada Fetus Dari Induk Tikus Hamil Yang Diberi Perlakuan Pada Fase Implantasi.

Perlakuan	Jumlah fetus seluruhnya	Jumlah fetus yg diamati*	% Jumlah fetus dengan kelainan organ internal secara makroskopis										
			Hidro-sefalus	Mata	Cleft palate	Jantung	Hati	Ginjal	Testis	Ovarium	Tangan	Kaki	Ekor
I	38	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II	33	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
III	37	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pembanding	31	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrol	54	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Keterangan: * Pengambilan sampel fetus yang diamati berdasarkan tata cara uji teratogenik
 Tidak terdapat kelainan pada Jaringan lunak pada semua dosis
 I = Infus buah pinang dengan dosis 211 mg/kg bb
 II = Infus buah pinang dengan dosis 422 mg/kg bb
 III = Infus buah pinang dengan dosis 844 mg/kg bb
 Pembanding = Fluoro urasil dengan dosis 25 mg/kg bb
 Kontrol = Aquades

Dari penelitian yang telah dilakukan mengenai uji toksisitas akut dan uji teratogenik dengan menggunakan hewan percobaan masih banyak kelemahannya karena untuk uji teratogenik harus dilanjutkan dengan hewan non rodent, misalnya kucing, kera. Kalau menggunakan hewan

percobaan spesifikasi dari masing-masing hewan percobaan berlainan. Dengan menggunakan metode *in vivo* diperlukan jumlah besar, selain itu efek teratogenik yang ditimbulkan mekanismenya tidak jelas. Disarankan sebaiknya dicoba metode *in vitro* untuk uji teratogenik.

KESIMPULAN

1. Uji toksisitas infus biji pinang (*Areca catechu* L.) pada mencit adalah 141,9 mg/kg bobot badan dengan cara pemberian oral.
2. Pada dosis 211, 422 dan 844 mg/kg bobot badan tidak ada efek tetatogenik terhadap fetus.
3. Hasil pengamatan pada tikus hamil yang diberi bahan uji pada fase implantasi menunjukkan bahwa pada semua dosis perlakuan menyebabkan keguguran 50% dan bermakna secara statistik ($p < 0,10$).
4. Dapat disimpulkan bahwa infus biji pinang bersifat *abortivum* dan tidak bersifat teratogenik pada dosis uji di atas.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami sampaikan kepada Puslitbang Farmasi, Badan

Litbangkes, Depkes RI dan Jurusan Farmasi, FMIPA ITB atas segala fasilitas yang diberikan selama penelitian ini, serta semua pihak yang telah membantu sehingga penelitian ini dapat berjalan lancar.

DAFTAR RUJUKAN

1. Pharmacopea of People's Republic of China (1988). The Pharmacopea. Comission of PRC The people's Medical Publ House, 1217-1219.
2. Perry, L. (1980). Medicinal Plant of East and Southeast Asia, The MITT Press, Cambridge, 357-359.
3. Nurendah dkk. (1996). Informasi Penelitian Jamu Pengatur Haid, Cermin Dunia Kedokteran. No.108, 10-16.
4. Vera, M.K. (1993). Teratogens Chemical Which Cause Birth Defects, 2nd ed, Elsevier, Amsterdam, 1-36.
5. Weil, C.S. (1952). Tables for Convinient Calculatio of Median Efective Dose and Instructions in Their Use. Biometrics 8, 249-263.
6. Ditjen POM, Departemen Kesehatan Republik Indonesia (1995). Farmakope Indonesia, ed 4, Jakarta, 1035-1036.