

UJI TOKSISITAS AKUT FERMENTASI BUAH BERENUK (*Crescentia cujete* L) TERHADAP JUMLAH LIMFOSIT DAN MONOSIT PADA TIKUS *Sprague Dawley*

Melania Adtrivonia Gias

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Wijaya Kusuma Surabaya

email: giasmelni@gmail.com

Abstract

This study aims to know the acute toxicity effect of fermented berenuk fruit on the number of lymphocytes and monocytes in Sprague Dawley rats. This type of research is a laboratory experiment with the number of experimental animal samples used were 20 Sprague Dawley rats, which were divided into 4 treatments and 5 repetitions, namely P1 (Control), P2 (50 mg/kg BW fermented berenuk fruit), P3 (500 mg/kg BW fermented berenuk fruit), and P4 (5000 mg/kg BW fermented berenuk fruit). Fermented berenuk fruit was given orally in several different doses. This study was conducted for 22 days, including 7 days of adaptation, 14 days of treatment and on the 15th day, blood samples were taken through the ophthalmica vein and then lymphocytes and monocytes were counted using a haematology analyzer. The data obtained were tested with Anova. The results of the analysis showed no significant difference ($p > 0.05$) indicating no effect of berenuk fruit fermentation on the number of lymphocytes and monocytes of Sprague Dawley rats in all treatment groups. The hypothesis was accepted that there was no acute toxicity of fermented berenuk fruit in affecting the number of lymphocytes and monocytes of Sprague Dawley rats. This study provides new insights into the potential of berenuk fruit and further research needs to be done to better understand its effects on blood rheology.

Keywords: *Fermentation of Berenuk Fruit (*Crescentia Cujete* L), acute toxicity test, lymphocytes, monocytes, Sprague Dawley rats.*

PENDAHULUAN

Indonesia memiliki beragam tumbuhan yang biasa digunakan dalam pengobatan penyakit dan menjaga imunitas tubuh. Tumbuhan sering dimanfaatkan dalam pengobatan tradisional baik dalam bentuk obat herbal terstandar dan jamu. Penggunaan obat tradisional sudah meluas di masyarakat, namun keamanan dan efektivitas dari obat tradisional belum diketahui secara jelas (Yusuf, *et al.*, 2018). Pengetahuan tentang khasiat dan keamanan tumbuhan obat hanya berdasarkan pengalaman dan belum teruji secara laboratorium. Masih banyak tumbuhan yang belum diketahui kadar toksisitasnya, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut. Salah satu tumbuhan yang berpotensi dikembangkan dalam dunia pengobatan adalah buah berenuk (*Crescentia cujete* L).

Buah berenuk (*Crescentia cujete* L) merupakan tanaman yang memiliki banyak manfaat dalam pengobatan. Daging buah berenuk dapat digunakan untuk mengobati kanker, diabetes, asma, asam lambung, dan batuk (Atmodjo, 2019). Buah berenuk mengandung metabolit sekunder, seperti senyawa polifenol, saponin, alkaloid, kolin, flavonoid, dan tanin (Rinawati, 2011). Salah satu pemanfaatan buah berenuk dapat dilakukan dengan berbagai prosedur seperti ekstraksi, perkolasi, dan fermentasi. Fermentasi dapat menguraikan serta mengawetkan zat metabolit yang terkandung dalam suatu makanan dan mensintesis nilai gizi makanan tersebut. Fermentasi buah berenuk belum diketahui keamanannya sehingga perlu dilakukan uji toksisitas akut.

Uji toksisitas akut bertujuan untuk menganalisis adanya toksisitas suatu zat, mengidentifikasi organ target dan kepekaannya, memperoleh data bahaya suatu senyawa secara

akut dan mengumpulkan informasi awal yang dapat digunakan untuk menentukan tingkat dosis yang diperlukan untuk uji toksisitas selanjutnya (Soeksmanto, *et al.*, 2010). Uji toksisitas diperlukan sebagai jaminan keamanan bagi masyarakat dari efek toksik yang dapat merusak organ tubuh. Salah satu sistem kekebalan tubuh terdapat pada darah, khususnya sel mononuklear. Sel mononuklear terdiri atas limfosit dan monosit. Limfosit memiliki nukleus besar yang hampir memenuhi sitoplasma. Monosit memiliki sitoplasma tidak bergranula dan mempunyai nukleus menyerupai ginjal. Sinergisme sel-sel tersebut menyebabkan tubuh memiliki sistem imun yang baik terhadap infeksi yang disebabkan oleh virus, bakteri dan parasit (Ganong, 2010).

Gangguan fisiologis khususnya akibat toksisitas pada tubuh mengakibatkan gambaran darah mengalami perubahan. Peningkatan jumlah limfosit dan monosit sering terjadi pada beberapa toksisitas (Dewi, *et al.*, 2019). Beberapa senyawa aktif yang terkandung dalam buah berenuk dikhawatirkan memungkinkan efek toksik bagi penggunaannya. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui efek toksisitas akut dari pemberian fermentasi buah berenuk terhadap jumlah monosit dan limfosit pada tikus *Sprague Dawley*.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Wijaya Kusuma Surabaya pada bulan Februari 2024.

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang hewan coba, tempat pakan dan minum, timbangan, object glass, mikrohematokrit, sonde oral, pipet thoma leukosit (skala 0,5-11), haemocytometer, aspirator, cover glass, cell counter, rak pewarnaan, mikroskop dan tabung EDTA.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain fermentasi buah berenuk, sampel darah tikus *Sprague Dawley*, pakan hewan coba, air mineral, methanol (Supelco, Indonesia), reagen turk (Indo Reagent), reagen giemsa (Onemed, Indonesia), oil emersi (Indo Reagent, Indonesia), ketamin (Ket-A-100®, Indonesia), masker, tissue, dan gloves.

Metode Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorik, tikus *Sprague Dawley* dipilih secara random lalu dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan dan 5 ulangan dengan dosis uji setiap kelompok yang berbeda-beda. Perhitungan ulangan menggunakan rumus Federer yaitu $(n-1)k \geq 16$. Keterangan, n adalah jumlah ulangan dan k adalah jumlah kelompok. Hasil perhitungan rumus Federer adalah sebagai berikut ; $(n-1) k \geq 16 = 4(n - 1) \geq 16 = 4n - 4 \geq 16 = 4n \geq 16 + 4 = 4n \geq 20 = n \geq 20 : 4 = n \geq 5$ (ulangan). Parameter pada penelitian ini meliputi jumlah monosit dan limfosit pada sampel darah tikus *Sprague Dawley* pasca perlakuan. Penelitian ini menggunakan 3 variabel yaitu :

1. Variabel kendali yaitu fermentasi buah berenuk dan dosis pemberian simplisia yaitu 50, 500 dan 5.000 mg/kg BB.
2. Variabel terikat yaitu jumlah limfosit dan monosit tikus *Sprague Dawley*.
3. Variabel bebas yaitu tikus *Sprague Dawley* jantan berumur 6 bulan berat 250 gram.

Prosedur Penelitian

Pengambilan sampel dalam penelitian ini pada akhir periode riset (*Post Test*). Masing-masing tikus *putih Sprague Dawley* diambil dan dipilih secara acak kemudian dilakukan anestesi menggunakan ketamin 50 mg/kg BB. Pengambilan darah menggunakan mikrohematokrit melalui vena *ophthalmica*. Darah disimpan dalam tabung Vaculab EDTA K3. Tabung disimpan dalam termos pendingin dengan suhu 4°C agar tidak lisis.

Pembuatan fermentasi buah berenuk yaitu buah dicuci dengan air mengalir lalu dikupas. Daging buah dipotong kecil – kecil dan dihaluskan kemudian difermentasi dengan komposisi sebagai berikut : air : buah : gula : pektinase (Pectinex® Ultra AFP, Novozymes, London, UK) dengan perbandingan berat 1.000 : 400 : 40 : 40. Campuran disimpan dalam botol pada suhu 25°C selama 30 hari. Kain kasa digunakan sebagai penutup mulut botol. Campuran tersebut diaduk secara manual setiap 24 jam.

Penelitian ini menggunakan 20 ekor tikus *Sprague Dawley* jantan yang berumur 6 bulan dengan berat ± 300 gram yang dibagi ke dalam 4 kelompok perlakuan. Setiap kelompok terdiri dari 5 ekor tikus. Tikus dipilih secara acak dimana didalam satu kandang terdapat 5 ekor

tikus. Tikus ditempatkan di dalam kandang akrilik yang berukuran 30 x 20 x 30 dengan alas sekam kayu setebal 5 cm dan diadaptasi selama 7 hari dan diberi makan berupa pelet Rat Bio (RB1) sebanyak 20-30 gram didalam satu wadah yang diletakkan dalam kandang setiap 2 kali sehari, pada pagi dan sore hari, serta air mineral secara ad libitum yang disediakan melalui dot navo yang diikat disamping kandang.

Penentuan dosis merujuk pada BPOM RI (2022) yaitu semakin kecil nilai LD50 maka semakin toksik senyawa tersebut. Sebaliknya semakin besar nilai LD50 maka semakin rendah toksisitasnya. Pada penelitian ini dosis yang digunakan sebesar 50 mg/kg BB, 500 mg/kg BB dan 5000 mg/kg BB.

Tikus *Sprague Dawley* yang digunakan dalam penelitian ini harus dipuaskan selama 12 jam sebelum diberikan perlakuan. Sediaan uji diberikan dalam dosis tunggal dengan menggunakan sonde oral. Sonde oral dimasukkan kedalam mulut, kemudian diluncurkan pada langit-langit ke arah belakang sampai ke esofagus kemudian masuk ke lambung. Volume maksimal pemberian sediaan uji secara oral kepada tikus ialah 2 ml. Sediaan uji diberikan selama 14 hari pada 3 kelompok dan 1 kelompok kontrol yang tidak diberikan. Sampel darah diambil pada hari ke-15. Tikus yang sudah diambil darah akan di euthanasia menggunakan ketamin LD50 dengan dosis 100 mg/kg BB.

Sampel darah yang diambil pada hari ke-15 dimasukkan ke dalam tabung EDTA. Sampel darah diambil menggunakan pipet Thoma leukosit yang telah dilengkapi dengan aspirator sampai skala 0,5. Tambahkan reagen turk sampai skala 11 lalu bersihkan pipetnya dengan tissue, kemudian lepaskan aspirator lalu dihomogenkan dengan cara diputar seperti angka 8 sebanyak 80 kali. Sampel diteteskan pada haemocytometer atau cekungan diantara kamar hitung dan ditutup dengan cover glass. Amati pada mikroskop dengan perbesaran 100x. Terdapat 9 kotak besar pada kamar hitung. Perhitungan leukosit dilakukan pada 4 kotak besar dimasing-masing ujung. Total jumlah leukosit di 4 kotak dikalikan 50 (Yunani, *et al.*, 2021). Presentase leukosit dilakukan untuk mendapatkan hasil absolut.

Sampel darah yang diambil pada hari ke-15 dimasukkan ke dalam tabung EDTA. Sampel darah diteteskan pada objek glass dan dibuat preparat apus. Preparat apus kemudian difiksasi dengan metanol 70 % selama 3 menit. Preparat kemudian diwarnai dengan pewarnaan Giemsa selama 20 detik. Preparat dicuci dengan air mengalir dan dibiarkan mengering. Preparat diperiksa dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000x dengan ditetesi oil emersi. Jumlah limfosit, monosit dan leukosit yang lain dihitung dengan cell counter sampai 100 sel. Hasil dilaporkan dengan satuan %. Tentukan presentase monosit dan limfositnya untuk mendapatkan hasil relatif. Hasil absolut dihitung dengan cara mengalikan hasil relatif dengan jumlah leukosit. Satuan yang digunakan adalah sel/mm³.

Data yang diperoleh dari hasil penelitian adalah data monosit dan limfosit secara relatif dan absolut. Data dianalisis menggunakan uji ANOVA dan dilanjutkan uji Duncan. Taraf signifikan yang digunakan adalah 95 %.

HASIL

Hasil pengujian toksisitas akut fermentasi buah berenuk dengan beberapa dosis perlakuan terhadap jumlah limfosit dan monosit tikus *Sprague Dawley* memperlihatkan rerata limfosit dan monosit yang bervariasi. Hasil tersebut selanjutnya di uji dengan uji Anova dan didapatkan bahwa tidak terdapat pengaruh pemberian fermentasi buah berenuk terhadap jumlah limfosit dan monosit tikus *Sprague Dawley* ($p > 0,05$). Tidak adanya perbedaan yang signifikan ditunjukkan oleh nilai signifikansi limfosit dan monosit berturut-turut 0,89 dan 0,43. (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil uji Anova uji toksisitas akut fermentasi buah berenuk terhadap limfosit dan monosit pada tikus *Sprague dawley*

Paramete r	Kelompok				P
	P1	P2	P3	P4	
Limfosit	4.45 ± 0.48	4.60 ± 0.50	4.43 ± 0.26	4.58 ± 0.45	0.89
Monosit	0.64 ± 0.20	0.52 ± 0.26	0.48 ± 0.22	0.40 ± 0.24	0,43

PEMBAHASAN

Hasil pengujian toksisitas akut menunjukkan tidak adanya pengaruh pemberian fermentasi buah berenuk terhadap jumlah limfosit dan monosit tikus *Sprague Dawley* pada semua kelompok perlakuan. Pengujian toksisitas akut dilakukan untuk mendeteksi efek toksik yang muncul dalam waktu singkat setelah pemberian fermentasi buah berenuk secara oral dalam beberapa tingkatan dosis. Hasil penelitian diatas menunjukkan bahwa pemberian fermentasi buah berenuk dalam beberapa tingkatan dosis tidak berpengaruh pada reologi darah. Hasil uji toksisitas dapat memberikan petunjuk adanya toksisitas relatif dan membantu identifikasi efek toksik bila terjadi paparan pada manusia (BPOM, 2022).

Buah berenuk memiliki beberapa pengaruh positif terhadap darah, seperti kandungan zat besi dalam buah berenuk dapat membantu dalam pembentukan hemoglobin sehingga meningkatkan jumlah eritrosit dan mencegah terjadinya anemia (Kusudaryati & Prananingrum, 2018). Buah berenuk mengandung senyawa seperti flavonoid yang dapat membantu melindungi eritrosit dari kerusakan akibat radikal bebas (Auliana, 2016). Buah berenuk juga mengandung senyawa kolin yang diperlukan untuk sintesis neurotransmitter dalam sel saraf (Wilujeng, *et al.*, 2023). Nutrisi seperti vitamin C dan flavonoid pada buah berenuk dapat membantu leukosit dalam meningkatkan fungsi kekebalan tubuh dan mendukung aktivitas dalam melawan infeksi (Ahmed, 2021). Kandungan folat dan vitamin B12 pada buah berenuk dibutuhkan untuk pembentukan dan pematangan berbagai jenis leukosit termasuk limfosit dan monosit (Meliala, 2020). Proses fermentasi buah berenuk juga tidak banyak merubah komponen nutrisi yang terkandung di dalam buah berenuk (Wilujeng, *et al.*, 2023).

Limfosit dan monosit adalah sel darah putih yang paling sensitif terhadap toksin. Jumlah limfosit dan monosit dapat menjadi indikator awal adanya toksisitas (Agustina, *et al.*, 2020). Hal ini disebabkan karena limfosit dan monosit merupakan dua jenis sel darah putih yang berperan dalam sistem kekebalan tubuh. Monosit berperan dalam fagositosis, yaitu proses menelan dan menghancurkan partikel asing, seperti bakteri dan virus. Limfosit berperan dalam

produksi antibodi, yaitu protein yang dapat melawan infeksi (Wang, *et al.*, 2021).

Apabila terjadi perubahan jumlah limfosit karena adanya efek toksik maka dapat menyebabkan kematian ataupun kerusakan limfosit yang menghambat kerja limfosit (Prakoewa, 2020). Hal ini menyebabkan sistem kekebalan tubuh menurun atau lemah. Toksisitas dapat merusak sumsum tulang dan kelenjar timus, tempat di mana sel-sel darah, termasuk limfosit, diproduksi. Jika sumsum tulang atau kelenjar timus rusak, produksi limfosit dapat terganggu, menyebabkan penurunan jumlah limfosit dalam sirkulasi darah. Toksisitas juga dapat memicu proses apoptosis yang mengganggu fungsi limfosit. Jika limfosit mengalami apoptosis dalam jumlah yang signifikan, hal ini dapat menyebabkan penurunan jumlah limfosit dalam darah (Bijanti, *et al.*, 2010).

Dampak toksisitas terhadap monosit ditandai dengan peningkatan jumlah monosit. Hal ini disebabkan karena banyaknya jumlah sel nekrotik, sehingga jumlah debris jaringan meningkat (Salasia dan Hariono, 2010). Hal ini mengaktifkan monosit yang akan berdiferensiasi menjadi makrofag. Makrofag adalah sel-sel besar yang berperan dalam fagositosis yaitu proses menelan dan mencerna debris jaringan, sel-sel mati, dan mikroorganisme (Sa'adah, 2018). Proses ini membantu membersihkan tubuh dari agen toksisitas yang masuk ke dalam tubuh (Apriyanto dan Rasak, 2024). Apabila terjadi perubahan jumlah monosit karena adanya efek toksik maka dapat menyebabkan kerusakan jaringan atau peradangan serta penurunan fungsi (Astuti dan Nurainy, 2011). Hal ini berakibat pada penurunan fungsi fagositosis makrofag untuk menetralkan agen toksik. Oleh karena itu, pemeriksaan limfosit dan monosit dapat menjadi salah satu bagian dari penelitian uji toksisitas untuk menilai efek toksik suatu zat terhadap sistem kekebalan tubuh. Penelitian ini juga menjelaskan bahwa fermentasi buah berenuk tidak mempengaruhi jumlah

limfosit dan monosit pada tikus *Sprague Dawley* pada fase akut.

KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini adalah :

- a. Tidak terdapat toksisitas akut fermentasi buah berenuk dalam mempengaruhi jumlah limfosit tikus *Sprague Dawley*.
- b. Tidak terdapat toksisitas akut fermentasi buah berenuk dalam mempengaruhi jumlah monosit tikus *Sprague Dawley*.

REFERENSI

- Agustiana, H., Lestari, S., dan Wibowo, E. S. 2020. *Toksitas Subletal Limbah Cair Batik hasil Biosorpsi terhadap Ikan Mas (Cyprinus carpio L.) ditinjau dari Differensial Leukosit*. Bioeksakta: Jurnal Ilmiah Biologi Unsoed, 2(2), 248-254.
- Ahmed, M. H., Hassan, A., dan Molnár, J. 2021. *The role of micronutrients to support immunity for COVID-19 prevention*. Revista Brasileira de Farmacognosia, 31(4), 361-374.
- Apriyanto, A., dan Rasak, A. 2024. *The Role Of Cluster Of Differentiation-8 (Cd8) In The Immune System*. Sinergi: Jurnal Riset Ilmiah, 1(2), 70-79.
- Astuti S, Nurainy F. 2011. *Profil Darah Tikus Akibat Pemberian Tepung Kedelai Kaya Isoflavon*. Seminar Nasional Sains & Teknologi-IV. Lembaga Penelitian Universitas Lampung.
- Atmodjo, K. 2019. *Keragaman dan pemanfaatan tumbuhan berenuk (Crescentia cujete L) di Daerah Istimewa Yogyakarta*. Biota: Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati, 116-123.
- Auliana. 2016. *Potensi Antioksidan Alami untuk Kesehatan*. Majalah Gizi Indonesia, 35(2), 122-127.
- Bijanti, R., Gandulatikyuliani, M., Wahjuni, R. S., dan Utomo, R. B. 2010. *Buku Ajar Patologi Klinik Veteriner*. Airlangga University Press.
- BPOM. 2022. *Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat Dan Makanan Republik Indonesia Nomor 1 Tahun 2022 Tentang Pedoman Uji Toksisitas Praklinik Secara In Vivo*. Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia, Jakarta.
- Dewi, K. D. U., Suartini, G. A. A. I., dan Setyawati, I. 2019. *(Cytomorphometry of peripheral blood mononuclear cell (PBMC) kintamani Bali's dog that anguish demodecosis)*. Indonesia Medicus Veterinus, 8(3), 347-355.
- Ganong WF. 2010. *Review of Medical Physiology*. New Jersey: Prentice Hall.
- Kusudaryati, D. D., dan Prananingrum, R. 2018. *Hubungan Asupan Protein Dan Status Gizi Dengan Kadar Hemoglobin Pada Remaja Putri Anemia*.
- Meliala, E. M. B. S., Nadiyah, N., Novianti, A., dan Wahyuni, Y. 2020. *Asupan folat, vitamin b12, vitamin e berhubungan dengan kadar hemoglobin (hb) ibu hamil di Puskesmas Kebon Jeruk*. Darussalam Nutrition Journal, 4(2): 112-121.
- Prakoeswa, F. R. 2020. *Peranan sel limfosit dalam imunologi: Artikel review*. Jurnal Sains dan Kesehatan, 2(4), 525-537.
- Rinawati, 2011, *Daya Antibakteri Tumbuhan Majapahit (Crescentia cujete L.) Terhadap Bakteri Vibrio alginolyticus*. Jurnal, 1–13.
- Sa'adah, S. 2018. *Sistem peredaran darah manusia*.
- Salasia, S. I. O., dan Hariono, B. 2010. *Patologi klinik veteriner: Kasus patologi klinis*. Samudra Biru.
- Soeksmanto A, Simanjuntak P, dan Subroto MA. 2010. *Uji toksisitas akut ekstrak sarang semut (Myrmecodi pendans) terhadap histologi organ hati mencit*. Jurnal Natur Indonesia, 12(2);152-155.
- Wang, J., Su, J., Yuan, Y., Jin, X., Shen, B., and Lu, G. 2021. *The role of lymphocyte-monocyte ratio on axial spondyloarthritis diagnosis and sacroiliitis staging*. BMC musculoskeletal disorders, 22(1), 86.

- Wilujeng S, Wirjaatmadja R, PrAkoso YA. 2023. *Pengaruh proses ekstraksi, fermentasi, dan penyimpanan terhadap kadar kolin yang berasal dari buah labu siam (Crescentia cujeteL).*
- Yani, A. 2011. *Fraksinasi komponen aktif antibakteri ekstrak kulit batang tanaman berenuk (Crescentia cujete L).* [Skripsi].
- Yunani, R., Era, H.M.R., dan Palestin. 2021. *Penuntun Praktikum Patologi Klinik Veteriner.* Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Wijaya Kusuma Surabaya.
- Yusuf, M. I., Wulaisfan, R., Haswika, H., dan Wahyuni, W. 2018. *Uji Toksisitas Akut dan Gambaran Histopatologi Hepar Mencit yang Diberi Ekstrak Terpurifikasi Daun Galing (Cayratia trifolia L. Domin).* Pharmauho: Jurnal Farmasi, Sains, dan Kesehatan, 4(1).