

**TOKSISITAS GALAKTOMANAN FOSFAT
BIJI LAMTORO
(*Leucaena leucocephala*)**

Nilsya Febrika Zebua



pena persada
PENERBIT CV. PENA PERSADA

**TOKSISITAS GALAKTOMANAN FOSFAT
BIJI LAMTORO
(*Leucaena leucocephala*)**

Penulis:

Nilsya Febrika Zebua

Editor:

Mutolib

ISBN: 978-623-455-415-1

Design Cover:

Retnani Nur Brilliant

Layout:

Hasnah Aulia

Penerbit CV. Pena Persada

Redaksi:

Jl. Gerilya No. 292 Purwokerto Selatan, Kab. Banyumas

Jawa Tengah

Email : penerbit.penapersada@gmail.com

Website : penapersada.com Phone : (0281) 7771388

Anggota IKAPI: 178/JTE/2019

All right reserved

Cetakan pertama: 2022

Hak Cipta dilindungi oleh undang-undang. Dilarang memperbanyak karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin penerbit

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat dan rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan buku ini. Penulisan buku merupakan buah karya dari pemikiran penulis yang diberi judul "**TOKSISITAS GALAKTOMANAN FOSFAT BIJI LAMTORO (*Leucaena leucocephala*)**". Saya menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan karya ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan banyak terima kasih pada semua pihak yang telah membantu penyusunan buku ini.

Hasil ekstraksi galaktomanan biji lamtoro (*Leucaena leucocephala* [Lam.] De Wit.) dianalisis dengan spektrofotometer infra merah, massa molekul dan spektrum $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$. Modifikasi struktur galaktomanan dengan agen pengikat silang trinitrium trimetafosfat dengan perbandingan 1:0, 2:1 dan 1:1 kemudian dilakukan uji toksisitas akut dan subkronik. Toksisitas akut dan subkronik gum fosfat 1:1 dilakukan pada mencit dengan menilai perubahan berat badan, berat organ, kematian, AST dan ALT, serta histologi ginjal dan hati. Toksisitas akut pemberian satu kali dengan dosis 1000, 2000, 5000 mg/kg bb selama 14 hari, sedangkan toksisitas subkronik pemberian setiap hari dengan dosis 250, 500 dan 1000 mg/kg bb selama 28 hari.

Galaktomanan biji lamtoro menunjukkan bilangan gelombang spektrum infra merah pada 1000–1250 cm^{-1} . Berat molekul galaktomanan biji lamtoro 1387 dengan base peak 359. Galaktomanan biji lamtoro memberikan dua signal singlet yang berdekatan pada δ 60 dan 100 ppm $^{13}\text{C-NMR}$ serta dua signal singlet δ 6-7 ppm $^1\text{H-NMR}$.

Toksisitas akut dan subkronik pada mencit galaktomanan fosfat biji lamtoro tidak memberikan perbedaan yang signifikan pada berat organ, makroskopis organ, jumlah kematian hewan uji, nilai AST dan ALT dengan uji SPSS 16.0 menggunakan one way Tukey multiple comparisons dengan $p < 0,05$, sedangkan pada berat badan berbeda signifikan ($p > 0,05$) namun perubahan berat badan $< 10\%$. Analisis histologi toksisitas akut organ hati pada dosis 5000

mg/kg bb mengalami karioeksis sel hepatosit, dilatasi vena centralis dan sinusoid, sedangkan pada organ ginjal mengalami hipertropi pada glomerulus, penyempitan kapsul bowman, dan dilatasi pada tubulus proksimal dan tubulus distal pada dosis 5000 mg/kg bb. Analisis histologi toksisitas subkronik organ hati pada dosis 1000 mg/kg bb mengalami karioeksis pada sel hepatosit dan dilatasi pada vena centralis dan sinusoid, sedangkan pada organ ginjal hanya mengalami penyempitan kapsul bowman pada dosis 1000 mg/kg bb.

Penulis tentu menyadari jika buku ini isinya masih belum cukup sempurna. Penulis mengharapkan kritik maupun saran guna penyempurnaan buku ini. Semoga Tuhan YME membalas jasa semua pihak yang telah membantu penyelesaian buku ini, dengan harapan bermanfaat untuk pengembangan ilmu pengetahuan dalam rangka mencerdaskan kehidupan bangsa.

Penulis

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	v
DAFTAR SINGKATAN	vi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
BAB II POLIMER FARMASI DARI POLISAKARIDA	5
A. Guar gum	5
B. Xanthan gum.....	7
C. Natrium Alginat	9
D. Pektin	10
E. Karagenan	12
BAB III STRUKTUR GALAKTOMANAN.....	14
A. Struktur Umum Galaktomanan	14
B. Rasio Galaktosa dan Manosa	15
C. Sifat Fisikokimia Galaktomanan	17
D. Pemanfaatan Galaktomanan.....	17
E. Ekstraksi Galaktomanan	21
BAB IV MODIFIKASI GALAKTOMANAN	22
BIJI LAMTORO	22
BAB IV ELUSIDASI STRUKTUR.....	26
GALAKTOMANAN FOSFAT	26
BIJI LAMTORO	26
A. Spektrofotometri Infra Merah	26
B. Spektroskopi Massa	32
C. Spektroskopi Resonansi Magnetik Inti.....	34
BAB V TOKSISITAS.....	40
GALAKTOMANAN FOSFAT	40
BIJI LAMTORO	40
DAFTAR PUSTAKA.....	70

DAFTAR SINGKATAN

ALT	: <i>Alanine Aminotrasferase</i>
AST	: <i>Aspartat Aminotransferase</i>
BM	: Berat Molekul
FT IR	: <i>Fourier Transform Infra Red</i>
GBL	: Galaktomanan Biji Lamtoro
GF	: Galaktomanan Fosfat
GFL	: Galaktomanan Fosfat Lamtoro
GM	: Galaktosa-Manosa
LC-MS	: <i>Liquid Chromatography – Mass Spectroscopy</i>
MS	: <i>Mass Spectroscopy</i>
NMR	: <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
RMI	: Resonansi Magnetik Inti
SGOT	: <i>Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase</i>
SGPT	: <i>Serum Glutamic Pyruvic Transminase</i>
TNTMP	: <i>Trinatrium Trimetafosfat</i>

BAB I PENDAHULUAN

Kemandirian bahan baku obat perlu diupayakan dalam rangka mendukung pembangunan kesehatan nasional. Kegiatan pengembangan bahan baku obat merupakan kegiatan prioritas yang tercantum dalam Rencana Pembangunan Jangka Menengah Nasional (RPJMN) Pembangunan Kesehatan 2010-2014 dan akan difokuskan pada upaya untuk mewujudkan kemandirian industri farmasi dalam memproduksi bahan baku obat baik bahan aktif maupun bahan pembantu (eksipien) dengan semaksimal mungkin menggunakan bahan baku lokal (Permenkes, 2013).

Polimer alam memiliki beberapa keunggulan antara lain kelarutannya dalam air yang baik, kemampuan mengembang yang tinggi, tidak menghasilkan racun, memiliki biokompatibilitas yang tinggi dan dapat diuraikan oleh tubuh. Polimer alam yang berasal dari karbohidrat (polisakarida) memiliki potensi sebagai bahan baku pembuatan antara lain seperti alginat, karagenan, tragakan, pektin, xanthan gum, gellan gum, dan guar gum (Lieberman, et al., 1990).

Galaktomanan mempunyai struktur dasar yang terdiri dari rantai utama β -(1-4)-D-manopiranososa yang disubstitusi oleh satu unit α -D-galaktopiranososa pada O-6, meskipun ada beberapa deviasi dari struktur dasar ini. Galaktomanan merupakan hidrokoloid yang larut dalam air menjadi cairan kental dan stabil dalam bentuk cairan. Perbandingan manosa dan galaktosa berbeda antara galaktomanan yang satu dengan lainnya dan variasi distribusi galaktosa pada rantai utama menyebabkan variasi kelarutan, sifat alir dan sifat-sifat yang lainnya berbeda (Srivastava and Kappoor, 2005; Vieira et al., 2007; Tarigan, 2012). Perbedaan perbandingan manosa dan galaktosa tergantung dari sumbernya, misalnya rasio manosa dan galaktosa dari fenugreek gum 1:1, guar gum 2:1, tara gum 3:1 dan locust bean gum 4:1 (Prajapati, et al, 2013).

Sumber galaktomanan terbanyak berasal dari family Leguminoceae seperti biji lamtoro (*Leucaena leucocephala* [Lam] De Wit.), tumbuhan ini mudah diperoleh dan belum termanfaatkan dengan baik. Galaktomanan umumnya terdapat pada bagian endosperma biji-bijian yang termasuk keluarga Leguminoceae (Polong-polongan), seperti *Cyamomopsis tetraganolobus* (Guar gum), *Acacia arabica* (Acacia gum), *Caesalpinia spinosa* (Tara gum), *Tamarindus indica* (Tamarind gum), *Ceratonia siliqua* (Locust bean gum). Jeevanandham, et al. (2010), telah melakukan ekstraksi galaktomanan dari biji *Leucaena leucocephala* dan kemudian dilakukan ikat silang dengan epichlorohydrin menjadi bentuk tablet pelepasan terkontrol. Verma dan Razdan (2007) telah melakukan uji disintegrant dari tablet ibuprofen sebagai obat yang kurang larut dalam air yang diformulasi dengan biji *Leucaena leucocephala*.

Adapun klasifikasi tumbuhan lamtoro adalah sebagai berikut:

- Kerajaan : Plantae
- Divisi : Spermatophyta
- Kelas : Dicotyledoneae
- Ordo : Fabales
- Famili : Leguminoceae
- Genus : *Leucaena*
- Spesies : *Leucaena leucocephala* Lam. (Suprayitno, et al., 1995)

Lamtoro atau sering juga disebut petai cina merupakan tumbuhan famili Leguminoceae. Lamtoro merupakan perdu ataupun pohon kecil dengan tinggi 2-10 m, memiliki batang pohon keras dan berukuran tidak besar serta batang bulat silindris dan bagian ujung berambut rapat. Daun majemuk terurai dalam tangkai, menyirip genap ganda dua sempurna, anak daun kecil-kecil terdiri dari 5-20 pasang, bentuknya lanset, ujung runcing, tepi rata, panjang 6-21 mm dan lebar 2-5 mm. Bunga majemuk terangkai dalam karangan berbentuk bongkol yang bertangkai panjang dan berwarna putih kekuningan atau sering disebut cengkaruk. Buahnya mirip buah petai (*Parkia speciosa*) tetapi ukurannya jauh lebih kecil dan berpenampang lebih tipis, termasuk buah polong

yang berisi biji – biji kecil dengan jumlah cukup banyak, pipih, dan tipis bertangkai pendek, panjang 10-18 cm, lebar 2 cm dan diantara biji ada sekat. Biji terdiri dari 15-30 butir, letak melintang, bentuk bulat telur sungsang, panjang 8 mm, lebar 5 mm, berwarna coklat kehijauan atau coklat tua dan licin mengkilap (Dalimarta, 2000).

Nama umum tumbuhan adalah petai cina. Tumbuhan ini dikenal masyarakat Indonesia dengan nama daerah yaitu: pete cina, pete selong (Sumatera), pete selong (Sunda), lamtoro, peutey, selantara, pelending, kamalandingan, (Jawa), kalandingan (Madura). Sinonim *Leucaena glauca* L. adalah *Leucaena leucocephala* (Lmk) De Wit. Nama asing petai cina Yin he huan (C), wild tamarind (L) dan nama simplisia petai cina adalah semen *Leucaenae glaucae* (biji lamtoro) (Yuniarti, 2008).

Modifikasi polisakarida yang telah dilakukan diantaranya ikat silang dengan karboksimetil, borat, glutraldehid, poliakrilamid, polivinil alkohol, epichlorohydrin dan fosfat untuk mendapatkan galaktomanan yang kokoh dan dapat dimanfaatkan dalam bentuk sediaan oral terkontrol seperti tablet *sustain release*, microspheres, hidrogel dan *colon spesific drug delivery*. Goyal, et al., (2007) melakukan penambahan gugus karboksimetil pada tamarind, cassia tora dan guar gum. Kabir, et al., (2000), telah melakukan ikat silang guar gum dengan trinitrium trimetfosfat dalam larutan natrium hidroksida menjadi bentuk sediaan kolon. Trinitrium trimetfosfat (TNTMP) merupakan senyawa pengikat silang yang tidak bersifat racun, sehingga sering digunakan dalam industri makanan namun belum ada penelitian tentang toksisitas senyawa yang diikat silang fosfat.

Prinsip metode sintesis ikat silang fosfat yaitu mengikat 1 (satu) gugus fosfat dengan 2 (dua) molekul gum, yaitu dengan mengganti gugus -OH pada gum. Ikat silang dilakukan untuk mengoptimalkan penggunaan polisakarida. Ikat silang pada suatu polimer dapat mempengaruhi derajat mengembang (*swelling*). Suatu polimer ikat silang akan mengembang pada saat molekul-molekul pelarut menembus jaringannya (Stevens, 2007). Ikat silang gum dengan fosfat akan menghasilkan bentuk matriks (film) yang

dapat mengembang baik pada cairan lambung maupun pada cairan usus (Kabir et al., 1998).

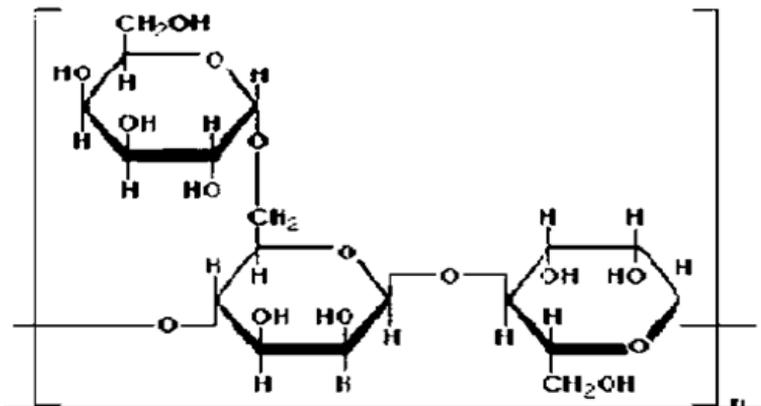
Penggunaan galaktomanan biji lamtoro telah banyak diteliti, namun modifikasi struktur dengan menggunakan agen pengikat silang TNTMP belum ada dilaporkan. Uji toksisitas perlu dilakukan pada galaktomanan biji lamtoro yang dimodifikasi dengan fosfat sehingga menjadi sumber pengetahuan pada berbagai pihak jika menggunakan bahan tambahan farmasi ini. Oleh karena itu, buku ini akan membahas hasil uji toksisitas akut dan toksisitas subkronik dari galaktomanan fosfat biji lamtoro (*Leucaena leucocephala* [Lam.] De Wit.)

BAB II POLIMER FARMASI DARI POLISAKARIDA

Polimer alam yang umumnya digunakan pada industri farmasi yang berasal dari karbohidrat (polisakarida) memiliki potensi sebagai bahan baku pembuatan antara lain seperti alginat, karagenan, tragakan, pektin, xanthan gum, gellan gum, dan guar gum (Lieberman, et al., 1990).

A. Guar gum

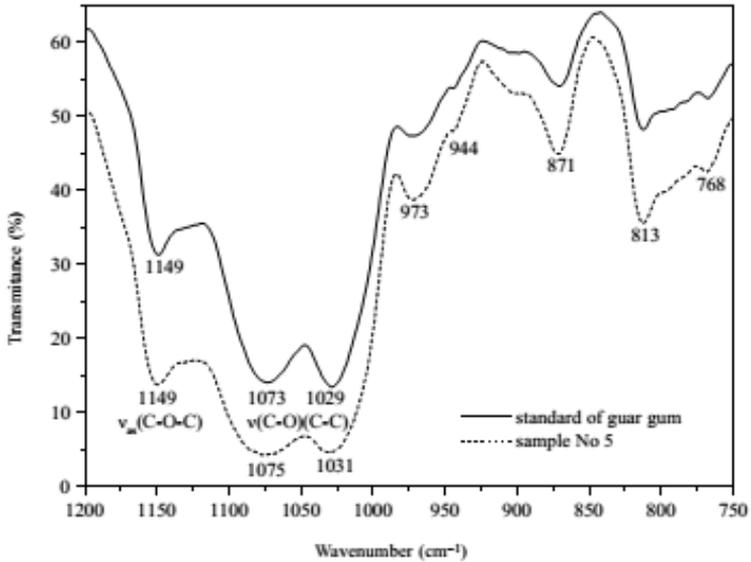
Guar gum tersusun atas gabungan galaktosa dan manosa yang digabungkan melalui hubungan glukosida, yang dapat digambarkan secara kimiawi sebagai galaktomanan. Galaktosol, jaguar gum, guar galaktomannanum, galaktomannan polisakarida merupakan nama lain dari guar gum. Struktur Guar gum seperti yang terlihat pada **Gambar 2.1**.



Gambar 2.1. Struktur Kimia Guar Gum (Rowe,2006)

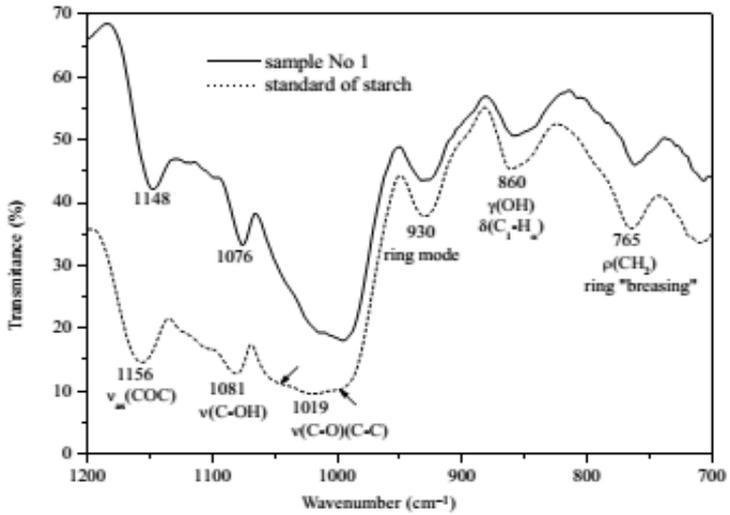
Guar gum tidak berbau atau hampir tidak berbau, berbentuk serbuk putih dengan rasa hambar dan memiliki fungsi sebagai pensuspensi dan disintegrant pada formulasi tablet dan dapat meningkatkan viskositas. Guar gum juga berpotensi sebagai pembawa matriks hidrofilik untuk obat oral

pelepasan terkendali dengan bermacam -macam kelarutan(Rowe, 2006). Adapun spektrum infra merah dari guar gum seperti yang terlihat pada **Gambar 2.2**.



Gambar 2.2. Spektrum Infra Merah Guar Gum (Copikova, et al., 2001)

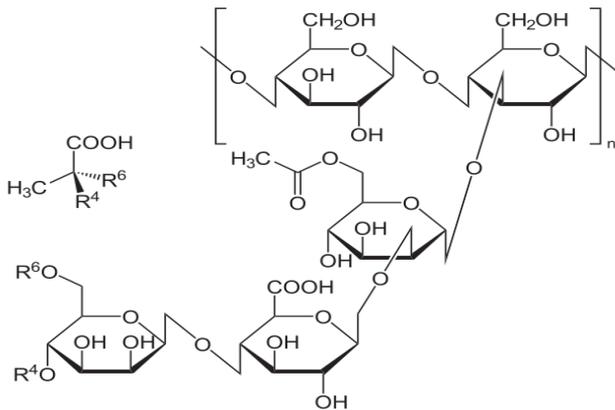
Guar gum stabil pada pH 4,0-10,5, praktis tidak larut dalam pelarut organik. Jika ditambahkan air panas ataupun dingin langsung mengembang seketika hingga mencapai kekentalan yang tinggi. Penyimpanan serbuk guar gum sebaiknya pada wadah yang tertutup dengan baik pada tempat yang dingin dan kering. Viskositas guar gum tergantung pada temperatur, waktu, konsentrasi, pH, dan ukuran partikel(Rowe, 2006). Spektrum gum berbeda dengan pati, hal ini dapat dilihat pada spektrum infra merah pati **Gambar 2.3**.



Gambar 2.3. Spektrum Infra Merah Pati (Copikova, et al., 2001)

B. Xanthan gum

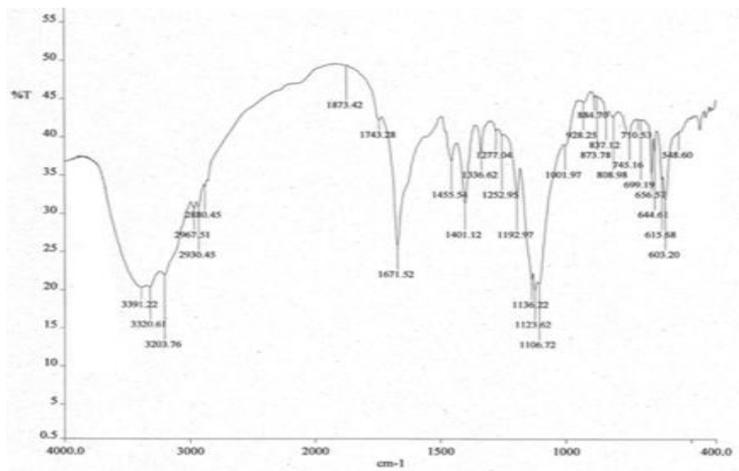
Xhantan gum memiliki β -(1 \rightarrow 4)-d-glukosa rantai utama dimana setiap unit glukosa kedua melekat trisakarida yang terdiri dari manosa, asam glukoronik, dan manosa. Karboksilat bermuatan negatif dari asam glukoronik memungkinkan untuk bentuk cairan sangat kental pada pH yang sesuai (Rowe,2006). Struktur xanthan gum seperti yang terlihat pada **Gambar 2.4**.



Gambar 2.4. Struktur Kimia Xhantan Gum (Rowe,2006)

Xhantan gum terbuat dari bakteri *Xanthomonas campestris*. Hasil fermentasi yang didapat lalu dipisahkan dengan alkohol lalu dimurnikan dan dikeringkan hingga didapat serbuk xhantan gum. Nama lain dari xhantan gum adalah Corn sugar gum, xhantani gummi, xantural. Meskipun sangat mudah mengembang, itu akan memperlambat pelepasan obat. Fungsi dari xhantan gum sendiri adalah sebagai pensuspensi, penstabil, pengental, dan pengemulsi serta sebagai peningkatviskositas(Rowe, 2006).

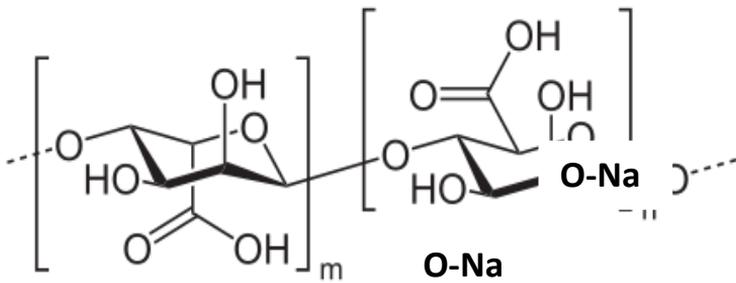
Bentuk dari xhantan gum berupa serbuk halus berwarna krem dan tidak berbau, praktis tidak larut dalam etanol dan eter tetapi larut pada air panas atau dingin. Salah satu sifat unik dari xhantan gum ialah dapat memberikan kekentalan yang sangat tinggi pada konsentrasi rendah (Rowe,2006). Adapun spektrum infra merah dari xanthan gum seperti yang terlihat pada **Gambar 2.5**.



Gambar 2.5. Spektrum Infra Merah Xanthan Gum (Mudoi, et al., 2013)

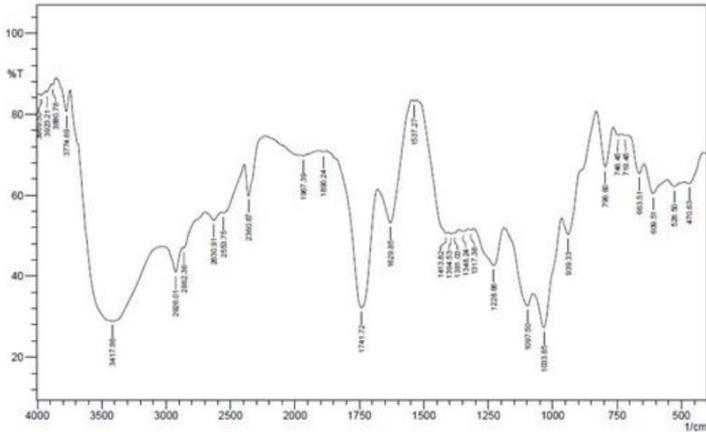
C. Natrium Alginat

Asam alginat diekstrak dari rumput laut coklat dan dinetralkan dengan sodium bikarbonat hingga menjadi natrium alginat. Natrium alginat memiliki nama lain natrii alginas dan sodium polymannuronat. Natrium alginat tidak berbau dan tidak berasa, berbentuk serbuk dengan warna putih sampai coklat kekuningan. Fungsi dari natrium alginat adalah sebagai agen penstabil, pensuspensi, sebagai disintegran tablet dan kapsul, sebagai pengikat dalam formulasi tablet dan sebagai peningkat viskositas (Rowe, 2006). Struktur Na-alginat dapat dilihat pada **Gambar 2.6**.



Gambar 2.6. Struktur Kimia Natrium Alginat (Rowe,2006)

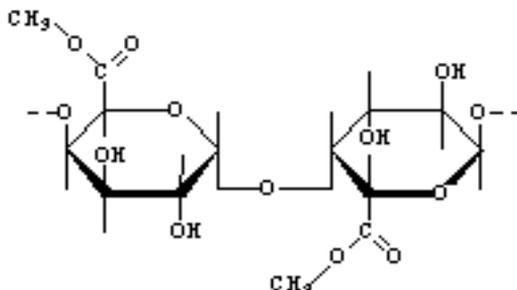
Kelarutan dalam air membentuk koloid kental dan tidak larut dalam medium dengan pH kurang dari 3, etanol, dan pelarut organik lainnya. Larutan natrium alginat stabil pada pH 4-10. Penggunaan natrium alginat sebagai pengisi, pengikat, dan penghancur, serta memiliki sifat sebagai pengental, pensuspensi dan pembentuk gel(Rowe,2006). Adapun spektrum infra merah dari natrium alginat seperti yang terlihat pada **Gambar 2.7**.



Gambar 2.7. Spektrum Infra Merah dari Alginat (Subramanian, et al., 2015)

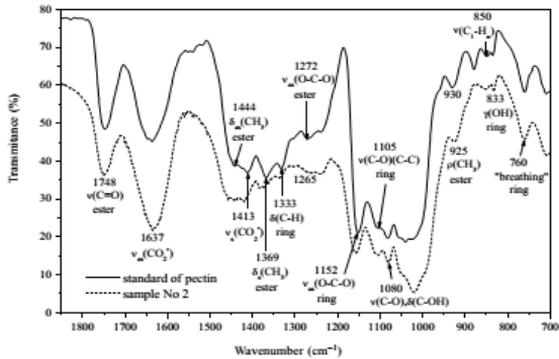
D. Pektin

Pektin merupakan polimer dari asam D-galakturonat yang dihubungkan oleh ikatan α -1,4 glikosidik. Sebagian gugus karboksil pada polimer pektin mengalami esterifikasi dengan metil (metilasi) menjadi gugus metoksil. Senyawa ini disebut sebagai asam pektinat atau pektin. Pektin didapat dari selulosa tanaman, nama lain dari pektin adalah Citrus pektin, methopektin, metil pektin, mexpektin, pektina, asam pektinik. Pektin berbentuk serbuk kasar yang berwarna kuning kecoklatan yang tidak memiliki rasa dan bau, dan dapat larut dalam air, tidak larut dalam etanol 95% dan pelarut organik lainnya. Struktur kimia pektin dapat dilihat pada **Gambar 2.8**.



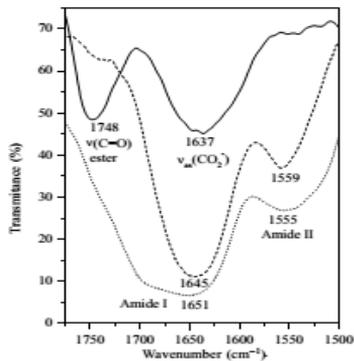
Gambar 2.8. Struktur Kimia Pektin (Rowe, 2006)

Penggunaan pektin dapat sebagai adsorban, pengemulsi, pengental, penstabil dan agen pembentukan gel. Butiran gel pektin menunjukkan efektivitas sebagai perantara untuk pelepasan terkontrol untuk obat dengan jalur gastrointestinal. Pektin dapat digunakan juga sebagai matriks dengan penyalut polimer yang sensitif dengan pH, dimana memperlambat pelepasan obat(Rowe,2006). Adapun spectrum infra merah dari pektin dapat dilihat pada **Gambar 2.9**.



Gambar 2.9.Spektrum Infra Merah Pektin (Copikova, et al., 2001)

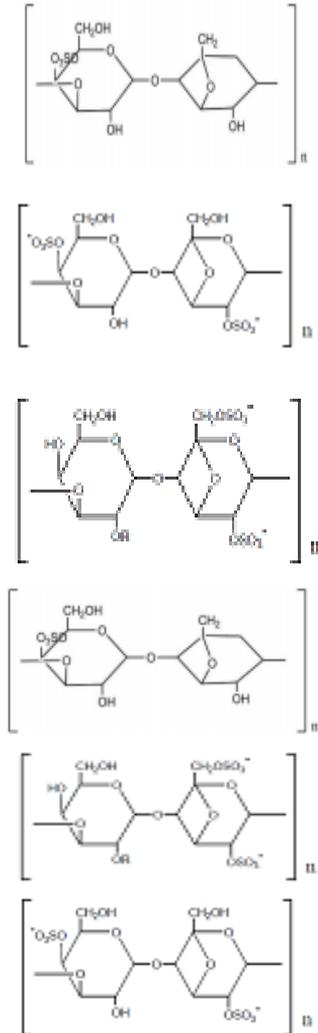
Adapun perbedaan spektrum infra merah pektin dan gelatin seperti yang terlihat pada **Gambar 2.10**.



Gambar 2.10. Spektrum Infra Merah Pektin dan Gelatin (Copikova, et al., 2001)

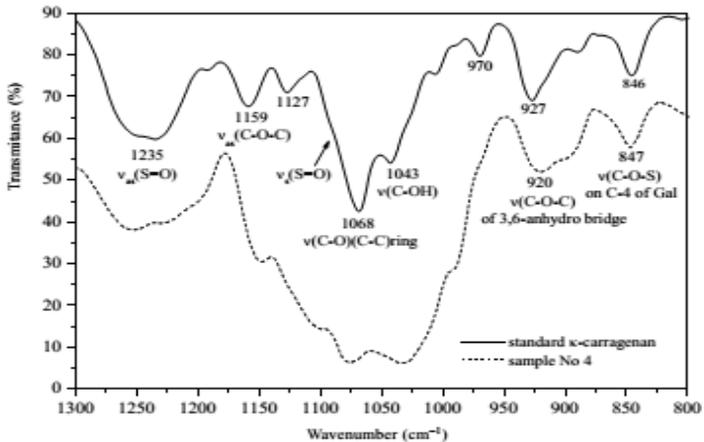
E. Karagenan

Karagenan menurut FAO (1986), adalah istilah umum untuk senyawa hidrokoloid yang diperoleh melalui proses ekstraksi rumput laut merah dengan menggunakan air. Adapun struktur karagenan seperti yang terlihat pada **Gambar 2.11**.



Gambar 2.11. Struktur (a) Kappa Karagenan, (b) Iota Karagenan, (c) Lambda Karagenan (Winarno, 1990)

Karagenan sebagai senyawa hidrokoloid terdiri dari amonium, kalsium, magnesium, potasium dan sodium sulfat ester galaktosa dan kopolimer 3,6 anhidrogalaktosa. Heksosa ini dihubungkan dengan ikatan glikosidik α -1,3-galaktosa dan β -1,4-3,6 anhidrogalaktosa secara bergantian pada polimer. Struktur dasar karaginan terdiri dari tiga tipe karaginan yaitu kappa, iota dan lambda karaginan. Kappa karagenan tersusun dari α (1,3) D-galaktosa 4-sulfat dan β (1,4) 3,6 anhidro-D-galaktosa. Iota karagenan ditandai dengan adanya 4-sulfat ester pada setiap residu D-glukosa dan gugusan 2-sulfat ester pada setiap gugusan 3,6 anhidro-Dgalaktosa. Lambda karagenan berbeda dengan kappa dan iota karagenan, karena memiliki sebuah residu disulfat α (1,4) D-galaktosa (Winarno, 1990). Karagenan sangat penting perannya sebagai stabilisator (pengatur keseimbangan), thickener (bahan pengental), pembentuk gel, pengemulsi, dan lain-lain. Sifat ini banyak dimanfaatkan dalam industri makanan, obat-obatan, kosmetik, tekstil, cat, dan pasta gigi. Adapun spektrum infra merah dari karagenan adalah seperti yang terlihat pada **Gambar 2.12**.



Gambar 2.12. Spektrum Infra Merah Karagenan (Copikova, et al., 2001)

BAB III

STRUKTUR GALAKTOMANAN

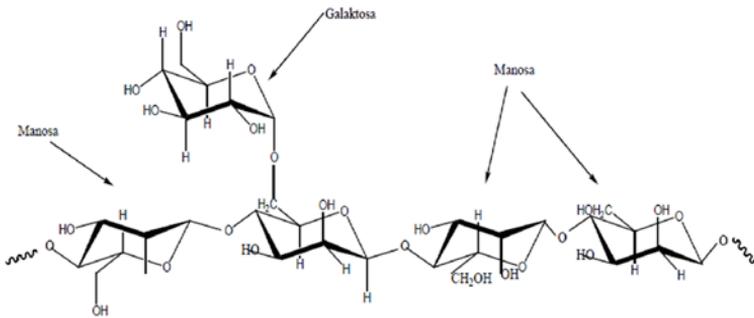
Galaktomanan merupakan salah satu bagian dari polisakarida, yang secara umum dihasilkan dari tanaman jenis Leguminoceae. Butiran benih, yang menghasilkan galaktomanan pada umumnya tumbuh dari tanaman legume di daerah yang semi kering di dunia. Biosintesis galaktomanan adalah proses fotosintesis yang terjadi pada tanaman legum (Srivastava dan Kapoor, 2005).

Galaktomanan memiliki beberapa fungsi bagi tumbuhan yang mengandungnya antara lain sebagai cadangan makanan bagi tumbuhan, mencegah kekurangan air bagi tumbuhan selama periode kelangkaan air dan juga mengontrol dan memanipulasi penyerapan air oleh kecambah dari jenis kacang-kacangan yang berbeda dan menciptakan kondisi yang menguntungkan bagi pertumbuhan tanaman tersebut. Hal ini dapat terjadi karena galaktomanan memiliki struktur penahan air yang unik. Selain itu, galaktomanan merupakan polisakarida yang digunakan sebagai aditif pada makanan dan juga sebagai hidrokoloid pada industri (Mathur, 2012).

A. Struktur Umum Galaktomanan

Struktur dasar yang membangun galaktomanan adalah galaktosa dan manosa. Polisakarida galaktomanan memiliki struktur umum yang linear, yang mana unit polimer (1,4)- β -D-mannopiranos, terikat pada (1,6)- α -D-galaktopiranos (Mathur, 2012). Manosa ini jarang terdapat bebas di alam. Umumnya berikatan dengan glukosa dalam bentuk laktosa, yaitu gula yang terdapat dalam susu. Galaktosa mempunyai rasa kurang manis jika dibandingkan dengan glukosa dan kurang larut dalam air. Seperti halnya glukosa, galaktosa juga merupakan gula pereduksi. Glukosa dan galaktosa bereaksi positif terhadap larutan fehling, yaitu dengan menghasilkan endapan merah bata dari Cu_2O . Sementara manosa adalah salah

satu jenis monosakarida yang merupakan gula aldehida hasil dari oksidasi manitol. Manosa jarang terdapat dalam makanan sehingga dianggap kurang penting dalam ilmu gizi. Polimer galaktomanan yang tersusun dengan monomer galaktosa dan manosa dapat dilihat pada **Gambar 3.1**.



Gambar 3.1. Polimer Galaktomanan (Sigres dan Sutrisno, 2013)

B. Rasio Galaktosa dan Manosa

Galaktomanan dari tumbuhan yang berbeda akan menghasilkan berat molekul, rasio penyusun polisakarida (M:G), dan fungsi yang berbeda juga (Mathur, 2012). Galaktomanan dari masing-masing tanaman berbeda-beda pada rasio manosa dan galaktosa, distribusi galaktosa pada rantai manosa dan berat molekulnya. Rasio rantai manosa dan galaktosa pada umumnya berkisar pada 1,1-5,0.

Galaktomanan dengan rasio galaktosa yang besar umumnya mudah larut dalam air dan kecenderungannya untuk membentuk gel sangat rendah dibandingkan galaktomanan dengan rasio galaktosa yang rendah. Kelarutan yang sangat tinggi tersebut disebabkan oleh banyaknya rantai cabang sehingga rantai manosa menjadi sukar untuk berinteraksi secara intermolekuler (Srivastava dan Kapoor, 2005). Galaktomanan juga bersifat pengental dan penstabil emulsi yang baik serta dapat mengurangi resiko masuknya racun jikadigunakan

sebagai bahan farmasi dan industri makanan (Stephen et al., 2006).

Galaktomanan yang diperoleh dari masing-masing tanaman yang berbeda memiliki kadar yang berbeda, misalnya galaktomanan yang diperoleh dari ampas kelapa sebesar 20% (Zultiniar dan Casoni, 2009), pada kolang-kaling 4,58% (Tarigan, 2012), sedangkan pada Fenugreek kadar galaktomanan yang diperoleh berkisar 25-30% (Mathur dan Mathur, 2005).

Beberapa variasi dalam hal berat molekul galaktomanan telah dilaporkan. Hal ini terjadi disebabkan galaktomanan yang diperoleh dari berbagai sumber yang berbeda memiliki perbandingan jumlah manosa dan galaktosa yang berbeda. Biji aren mempunyai perbandingan manosa : galaktosa = 2,26 : 1 (Kooiman, 1971), sedangkan pada bungkil inti sawit perbandingan manosa : galaktosa = 3 : 1 (Tafsin, 2007). Galaktomanan juga ditemukan dengan perbandingan manosa : galaktosa = 1,1 : 1 dengan massa molekul 79.000 yang diisolasi dari biji *Gleditsia delavayi* (Kooiman, 1971). Perbedaan rasio manosa dan galaktosa pada beberapa tumbuhan dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1. Rasio Manosa Dan Galaktosa Beberapa Tumbuhan (Mathur, 2012)

Galaktomanan	Sumber Tanaman	Rasio M:G
Guar Gum	Guar plant	2 : 1
Fenugreek Gum	Fenugreek plant	1 : 1
Locust bean gum	Carob tree	4 : 1
Tara Gum	Tara shrub	3 : 1
Cassia Tora Gum	Cassia tora	5 : 1
Daincha Gum	Sesbania bisipinosa	2 : 1

Galaktomanan yang telah dimurnikan yang diperoleh dari biji *Astragalus lehmannianus* mengandung 55% D-manosa dan 45% D-galaktosa (Kooiman, 1971). Selain perbedaan dalam hal persen galaktomanan dan perbedaan perbandingan manosa dan galaktosa dalam galaktomanan juga terdapat perbedaan dalam hal distribusi galaktosa pada rantai manosa juga perbedaan dalam berat molekulnya (Kok et al., 1999).

C. Sifat Fisikokimia Galaktomanan

Sifat fisikokimia galaktomanan dapat dikarakterisasi dengan menggunakan beberapa peralatan dan teknik yang berbeda. Parameter-parameter yang penting dalam karakterisasi galaktomanan adalah perbandingan manosa dan galaktosa, rata-rata berat molekul, bentuk struktur dan viskositasnya. Rasio manosa dan galaktosa dapat ditentukan dengan menggunakan banyak cara setelah terlebih dahulu dihidrolisis dengan menggunakan asam. Berat molekulnya dapat ditentukan dengan menggunakan liquid chromatography sedangkan distribusi galaktosa pada rantai manannya dapat dikarakterisasi dengan menggunakan NMR atau dengan menggunakan metode enzimatik dengan enzim β -D-mannanase yang akan mendegradasi galaktomanan secara spesifik (Cerqueira et al., 2009).

Tingkat kekentalan galaktomanan bila dilarutkan dalam air sangat tergantung pada ukuran molekulnya dan bila ditambahkan polisakarida lainnya seperti xantan maka akan terbentuk gel. Kelebihan utama dari galaktomanan ini bila dibandingkan dengan polisakarida lainnya adalah kemampuannya untuk membentuk larutan yang sangat kental dalam konsentrasi yang rendah dan hanya sedikit dipengaruhi oleh pH, kekuatan ionik dan pemanasan. Viskositas galaktomanan sangat konstan sekali pada kisaran pH 1 - 10,5 yang kemungkinan disebabkan oleh karakter molekulnya yang bersifat netral. Namun galaktomanan akan mengalami degradasi pada kondisi yang sangat asam atau basa pada suhu tinggi (Morris et al., 1977).

D. Pemanfaatan Galaktomanan

Penggunaan galaktomanan dalam bidang farmasi dari sumber komersial dan nonkomersial, telah dipelajari secara ekstensif selama dekade terakhir (Silveira, 2011). Galaktomanan menunjukkan potensi dalam tren global terhadap penggunaan produk yang lebih nabati untuk motif ekologi dan produksi serta

aplikasinya yang tidak menyebabkan pencemaran sehingga tidak mengganggu ekosistem. Ada berbagai bentuk aplikasi dalam farmasi, yaitu:

1. Formulasi Tablet

Galaktomanan dapat diaplikasikan sebagai bahan pengikat dalam tablet karena memiliki sifat merekat yang baik dibandingkan dengan banyak senyawa sintesis. Galaktomanan dapat meningkatkan kekompakan massa serbuk dan membentuknya menjadi granul. Galaktomanan dapat pula digunakan sebagai bahan tambahan pengikat waktu hancur pada tablet karena memiliki kemampuan mengembang dan menyerap air yang baik sehingga akan menyebabkan peningkatan laju disolusi (Rishabh, et al., 2011).

2. Emulgator dan Suspending agents

Galaktomanan dapat diaplikasikan sebagai emulgator dan suspending agents. Galaktomanan dapat menstabilkan emulsi karena kemampuannya membentuk lapisan antar muka, dapat mengurangi tegangan permukaan dan memiliki kemampuan menarik yang tinggi sehingga mencegah terjadinya pemisahan dua fase dalam emulsi. Galaktomanan dapat meningkatkan kekuatan tarik dari partikel suspensi melalui ikatan hidrogen dan interaksi molekul. Galaktomanan meningkatkan kemampuan dispersi koloid dan viskositas sehingga partikel padat tetap menyatu dalam waktu yang lama dan dosis yang diinginkan tercapai (Rishabh et al., 2011).

3. Matriks sediaan lepas lambat

Dewasa ini penggunaan sediaan lepas lambat telah diterima secara luas di masyarakat karena penggunaannya yang lebih sederhana dan secara tepat menghasilkan efek terapeutik yang diinginkan dibandingkan sediaan konvensional. Salah satu metode pembuatan sediaan lepas lambat adalah menggunakan sistem matriks. Berbagai gum alam telah digunakan sebagai polimer matriks sediaan lepas lambat. Pada sistem matriks, terdiri dari satu matriks, dan obat yang akan digunakan untuk tujuan *sustained released*

didispersikan atau dicampurkan dengan matriks tersebut. Terdapat dua tipe dari sistem matriks yaitu sistem matrik hidrofilik dan sistem matriks yang tidak terlarut atau matriks inert. Galaktomanan merupakan polimer matriks yang bersifat hidrofilik. Polimer ini ketika bersentuhan dengan air dapat terhidrasi dan membentuk gel. Pelepasan obat dari gel ini biasanya secara difusi (Bravo, et al.,2004; 1999; Khan, et al.,1998).

4. Agen penyalut.

Galaktomanan merupakan agen penyalut yang baik karena dapat mengontrol pelepasan obat dan mencegah terjadinya degradasi di dalam lambung. Gum dari jenis polisakarida telah dilaporkan dapat menjadi polimer film yang baik untuk penyalut sediaan lepas lambat parasetamol bila digunakan pada konsentrasi 2% (Mitul, et al., 2012).

5. Gelling agent

Pemanfaatan galaktomanan sebagai dasar untuk pembuatan gel farmasi adalah sebuah konsep baru. Galaktomanan dapat membentuk gel dengan atau tanpa kombinasi dengan agen lain. Pembentukan gel adalah hasil dari ikatan intra molekul untuk menghasilkan jaringan tiga dimensi, dimana molekul-molekul air akan terperangkap. Reaksi tersebut dipengaruhi oleh sifat fisik (perubahan pH, suhu) atau sifat kimia (penambahan reagen yang sesuai). Galaktomanan berinteraksi secara sinergis dengan xanthan gum atau karagenan untuk membentuk gel elastis. Gum dari berbagai tanaman telah digunakan sebagai agen pembentuk gel karena bersifat non-toksitas, biaya rendah, mudah didapat, dan tidak menyebabkan pencemaran lingkungan (Kumar, et al., 2009).

6. Agen Pembuatan Mukoadesif

Mukoadesif adalah sistem yang menyebabkan tablet dapat terikat pada permukaan sel epitel lambung atau mucin dan memperpanjang waktu tinggal dilambung dengan peningkatan durasi kontak antara sediaan dan membran biologis. Perlekatan sistem penghantaran pada dinding

lambung meningkatkan waktu tinggal terutama ditempat aksi Galaktomanan dapat digunakan sebagai agen pembuatan mukoadhesiv karena merupakan makromolekul yang bersifat hidrofilik. Agen mukoadhesif dalam bentuk molekul melakukan kontak dengan musin mukosa dan kemudian terjadinya adhesi dengan mukosa dan akhirnya terjadi pelepasan obat melalui membran mukosa secara terus menerus (Chawla et al., 2003; Bravo et al., 2004).

Pada industri makanan, galaktomanan biasa dipakai sebagai penggumpal. Pada industri es krim galaktomanan digunakan untuk membuat es agar tidak cepat mencair. Selain itu galaktomanan juga digunakan oleh industri pembuatan keju, buah kalengan, dan bumbu salad. Di Finlandia galaktomanan direkomendasikan sebagai salah satu obat untuk mengatasi hiperlipidemia (kadar lemak darah tinggi). Seperti dikutip Duodecim Medical Publication, Finlandia, galaktomanan efektif menangkap lemak dan mengubahnya menjadi gumpalan-gumpalan dan dibuang bersama feses. Galaktomanan juga ampuh menurunkan serum total kolesterol dan Low Density Lipoprotein (LDL) kolesterol 10-15%. Sedangkan kadar High Density Lipoprotein (HDL) dan trigliserida tidak berubah. Di dalam tubuh, galaktomanan menghidrolisis enzim amilase untuk memperlambat penyerapan gula (Zultiniar and Casoni, 2009).

Hasil penelitian membuktikan bahwa galaktomanan dapat mengurangi 54% kadar gula pada urine penderita diabetes. Selain itu, ia juga menurunkan respon insulin terhadap makanan dan memperlambat penyerapan karbohidrat, sehingga kadar glukosa darah tetap normal. Oleh sebab itu, galaktomanan juga berkhasiat bagi penderita diabetes. Senyawa galaktomanan dalam ilmu gizi merupakan serat makanan (dietary fiber) yang mampu menurunkan kadar glukosa dan kolesterol darah (Lepur, 2012).

E. Ekstraksi Galaktomanan

Ekstraksi galaktomanan umumnya dilakukan langsung pada bahan segar yang diblender seperti pada isolasi galaktomanan kolang kaling. Namun beberapa penelitian juga dengan cara sampel dikeringkan dan diserbukkan seperti pada ekstraksi Durio seed gum kemudian dilanjutkan dengan penambahan air dengan perbandingan 1:2 – 1:30. Pengaturan pH juga dilakukan pada proses awal isolasi, ada yang menggunakan pH netral seperti isolasi galaktomanan dari kolang kaling, namun ada pula dengan pH basa seperti pada isolasi galaktomanan dari ampas kelapa. Beberapa penelitian melakukan pemanasan dalam proses preparasi sampel, namun banyak pula penelitian yang dilakukan tanpa pemanasan (Tarigan, 2012; Mirhoseini dan Amid, 2011; Purawisastra, 2010, Tamaki, et al., 2010).

Setelah proses preparasi sampel kemudian dilanjutkan dengan proses sentrifugasi dengan kecepatan >8500 rpm karena jika dibawah kecepatan tersebut tidak diperoleh galaktomanan. Setelah proses sentrifugasi selesai kemudian dilanjutkan dengan penambahan etanol dengan perbandingan sampel dengan etanol sebanyak 1:2 karena dengan perbandingan etanol yang lebih dari 1:2 ternyata tidak memberikan hasil yang signifikan. Setelah proses penambahan etanol maka akan terbentuk agregat dimana awalnya galaktomanan yang larut di dalam air kemudian akan terhidrasi dengan penambahan etanol. Selanjutnya dilakukan pemurnian dengan pencucian dengan etanol p.a berulang. Sebagian penelitian melakukan pemurnian dengan penambahan larutan fehling (Tarigan, 2012). Tamaki, et al., (2010), melakukan ekstraksi galaktomanan dari *Delonix regia*, suatu tumbuhan dari famili fabaceae dengan memodifikasi prosedur sentrifugasi menjadi autoklaf dan diterangkan dalam penelitian tersebut menghasilkan galaktomanan yang lebih banyak

BAB IV

MODIFIKASI GALAKTOMANAN

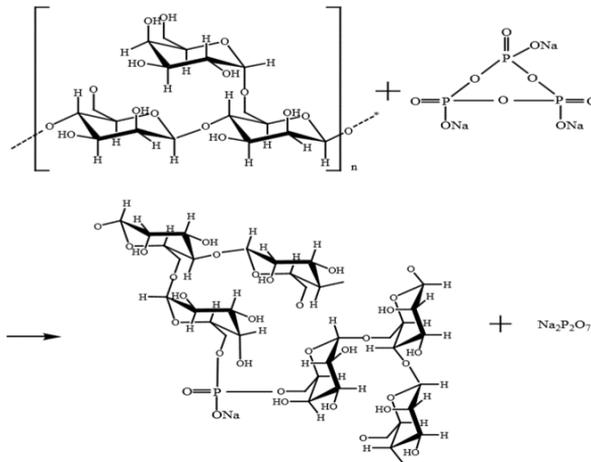
BIJI LAMTORO

Modifikasi galaktomanan dalam bentuk sintesis ikat silang menunjukkan peningkatan sifat fisika seperti kelarutannya didalam air, viskositas dan kemurniannya dibanding dengan yang aslinya (Kok et al., 1999). Sintesis adalah pengubahan bentuk suatu senyawa kimia dari starting material menjadi molekul target untuk mendapatkan produk yang lebih baik.

Galaktomanan ikat silang saat ini semakin dikembangkan sebagai bahan yang digunakan untuk membawa obat ke bagian usus yang bermasalah. Kemampuan mengembang dari suatu galaktomanan di dalam cairan gastrointestinal menurun dari 100-200 kali menjadi 10-35 kali tergantung jumlah bahan pengikat silang yang digunakan. Galaktomanan akan kehilangan sifat non-ioniknya disebabkan oleh proses ikat silang dan menjadi bermuatan negatif (Rana et al., 2011).

Prinsip dengan menggunakan metode ikat silang hampir sama dengan metode asetilasi yaitu sama-sama mengganti gugus -OH dengan gugus fungsi yang lain. Pada metode ikat silang, gugus -OH diganti dengan gugus eter, gugus ester, borat atau gugus fosfat sehingga struktur senyawa diikat silang menjadi lebih panjang. Pemanfaatan galaktomanan sebagai matriks dapat dibuat dengan mencangkokkan senyawa yang mengandung gugus hidrofilik, salah satunya seperti asam akrilat (AA) yang memiliki gugus karboksil (-COOH) ikatan rangkap. Asam akrilat (AA) mudah mengalami reaksi ikat silang, sehingga asam akrilat (AA) mengalami homopolimerisasi menghasilkan poli (asam akrilat) galaktomanan. Beberapa jenis zat pengikat silang yang dapat dipakai adalah mononatrium fosfat, borat, natrium trimetafosfat, natrium tripolifosfat, epichlorohydrin, formaldehid, asam akrilat (AA), karboksimetil (Rana, et al., 2011; Jie, et al., 2006).

Salah satu pengikat silang dari senyawa fosfat adalah trinitrium trimetafosfat yang digunakan untuk mereduksi sifat mengembang guar gum. Pada pH basa, senyawa kompleks ester di-polimer fosfat dibentuk dari galaktomanan dan trinitrium trimetafosfat yang mengalami reaksi ikat silang (Gowda et al., 2012). Selain trinitrium trimetafosfat, agen fosfat yang lainnya adalah dinatrium hidrogen posfat (Na_2HPO_4) dapat memberikan derajat substitusi ikat silang yang tinggi pada pati sagu (Romengga, et al., 2011). Reaksi antara galaktomanan dengan trinitrium trimetafosfat dapat dilihat pada Gambar 2.19.



Gambar 3.2. Reaksi Galaktomanan dengan Trinitrium Trimetafosfat (Rana et al., 2011)

Trinitrium trimetafosfat (TNTMP) merupakan suatu pengikat silang yang tidak bersifat racun. Pada pH basa, senyawa fosfat dibentuk dari guar gum dan trinitrium trimetafosfat yang mengalami reaksi ikat silang. Menurut Gowda, et al., (2012), sifat mengembang pada polimer yang terikat silang menurun secara jelas (29-35 kali lipat).

Senyawa fosfat selain trinitrium trimetafosfat adalah dinatrium hidrogen fosfat (Na_2HPO_4) atau disebut juga dengan disodium orthophosphate yaitu senyawa berbentuk kristal

transparan, larut dalam air; digunakan sebagai bahan tambahan pengolahan pangan untuk mengendalikan pH dalam kisaran 4-9. Batas maksimum penggunaan senyawa fosfat sebagai fosfor (P) adalah 70 mg/kg berat badan (BPOM, 2013).

Fosfat telah banyak digunakan sebagai agen cross-link karena dipercaya aman bagi kesehatan. Kadar fosfat yang diperbolehkan di dalam air maksimal 2 ppm, karena kandungan fosfat di atas 2 ppm akan menyebabkan peningkatan pertumbuhan tanaman air seperti eceng gondok, akibatnya peningkatan pertumbuhan eceng gondok maka jumlah oksigen terlarut di dalam air menurun dan dapat menyebabkan kematian ikan yang hidup di dalamnya (Stefhany, et al, 2013; Padmaningrum, et al., 2013)

Bentuk senyawa fosfor yang paling dikenal dan aktif dalam tubuh manusia adalah fosfat atau fosfat. Fosfor sebagai unsur kimia dengan lambang P ini bersifat sangat reaktif sehingga jarang ditemukan fosfor dalam bentuk tunggal. Termasuk dalam tubuh, unsur fosfor biasa terikat dengan kimia lain dengan membentuk berbagai senyawa atau molekul yang kemudian aktif dalam tugasnya masing-masing. Fosfor dalam bentuk tunggalnya berwarna putih kekuning-kuningan dan terbakar ketika berada di udara terbuka. Fosfor dalam bentuk ini sangat beracun dan penggunaannya harus selalu dalam pengawasan ahli medis (Stefhany, et al, 2013).

Fosfor secara alami terdapat di dalam tumbuhan seperti kacang panjang sebesar 18 mg per 100 g (18%). Fosfor diketahui dapat menjadi komponen penyusun tulang-gigi dan membran sel dalam bentuk fosfolipida. Peringkat kedua mineral terbanyak di tubuh manusia adalah fosfor, di bawah kalsium. Kedua mineral utama ini bekerja erat dalam membentuk dan memelihara kekuatan tulang dan gigi manusia. Sebesar 85% fosfor terpusat pada jaringan tulang dan gigi, sisanya menyebar ke seluruh tubuh dalam jaringan lunak dan sel-sel tubuh manusia (Stefhany, et al., 2013; Padmaningrum, et al., 2013).

Fosfor yang terkandung dalam jenis daging-dagingan hewani lebih mudah diserap oleh tubuh manusia dibandingkan

fosfor yang secara alami terkandung dalam tanam-tanaman pangan dimana fosfor yang dapat diserap hanya sebesar 50% maksimal. Meski demikian, beberapa penelitian menyebutkan bahwa fosfor berasal dari tumbuh-tumbuhan tetap lebih baik daripada yang berasal dari hewan. Berikut ini beberapa sumber fosfor yaitu kuaci, biji bunga matahari, biji wijen, keju, ikan salmon, mackerel, tuna, ikan bandeng, kerang, udang, kepiting, kacang-kacangan, daging, susu, yoghurt dan olahan susu lainnya, tahu, tempe, olahan kacang kedelai lainnya, dan cereal (Stefhany, et al., 2013; Padmaningrum, et al., 2013).

Fosfor banyak berfungsi dalam sistem filterasi racun pada ginjal dan memegang peranan penting dalam proses menyimpan atau mendayagunakan energi tubuh. Fosfor juga mengurangi rasa sakit dan kelelahan otot setelah bekerja berat. Selain itu, fosforus juga dibutuhkan dalam proses pertumbuhan, perawatan serta perbaikan seluruh jaringan lunak dan sel-sel tubuh, penyusunan rantai DNA dan RNA. Fosfor juga berperan sebagai penyeimbang dan membantu penyerapan berbagai vitamin dan mineral, seperti vitamin D, yodium, magnesium serta seng (Stefhany, et al., 2013; Padmaningrum, et al., 2013).

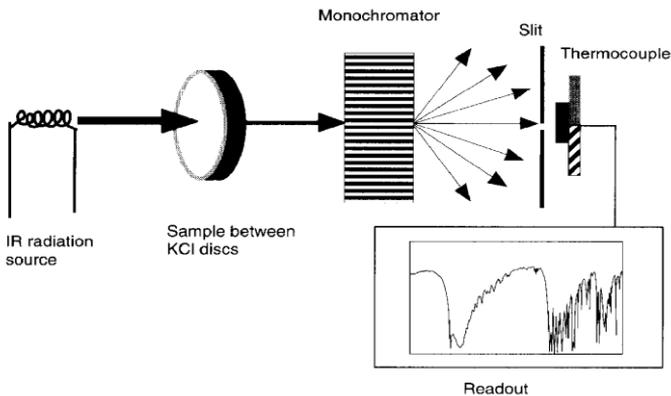
Komponen utama dari jaringan tulang adalah hydroxyapatite yang merupakan salah satu turunan kalsium fosfat. Enamel gigi juga tersusun dari hydroxyapatite. Keduanya terbentuk dari ikatan antara kalsium dengan fosfat. Tanpa keduanya, manusia tidak akan memiliki tulang atau gigi yang sehat dan kuat. Fosfat bahkan bisa disebut komponen utama bagi makhluk hidup karena fosforus menjadi kerangka bagi susunan DNA/RNA dimana fosforus bertugas menyusun rangka terstruktur yang dibutuhkan bagi DNA maupun RNA. Sel-sel hidup secara aktif melakukan perpindahan energi melalui trifosfat adenosina (ATP). Fosfolipid atau lemak fosfat menjadi komponen struktural bagi pembentukan membran-membran sel tubuh dan garam kalsium fosfat bertugas menjadikan tulang-tulang menjadi kaku dan tegak (Stefhany, et al., 2013; Padmaningrum, et al., 2013).

BAB IV

ELUSIDASI STRUKTUR GALAKTOMANAN FOSFAT BIJI LAMTORO

A. Spektrofotometri Infra Merah

Instrumen spektroskopi sinar infra merah terdiri dari beberapa komponen penting dari instrumen spektroskopi sinar infra merah yaitu sumber cahaya dan monokromator. Sumber cahaya spektrofotometer infra merah adalah sinar infra merah yang digunakan pada penentuan struktur adalah sinar infra merah dengan bilangan gelombang antara 200-4000 cm^{-1} . Monokromator digunakan untuk memilih satu bilangan gelombang tertentu secara berurutan untuk melakukan pemantauan intensitas cahaya setelah sinar radiasi melewati sampel. Pada spektroskopi sinar infra merah yang menggunakan interferometer sebagai bagian pengganti monokromator, maka analisis akan lebih cepat dibandingkan tanpa interferometer (Watson, 2000). Diagram sederhana spektrofotometer infra merah dapat dilihat pada **Gambar 4.1**.



Gambar 4.1. Diagram Sederhana Instrumen Spektroskopi Sinar Inframerah (Watson, 2000)

Molekul senyawa oleh spektroskopi sinar infra merah akan diradiasi pada rentang bilangan gelombang keseluruhan ($200\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$). Molekul hanya dapat menyerap frekuensi energi yang sesuai dengan gugus fungsi yang dimilikinya saja dan memberikan frekuensi getaran yang sesuai. Oleh karena itu metode spektroskopi sinar infra merah sesuai untuk digunakan dalam penentuan gugus fungsi suatu molekul (Lee dan Webb, 2003).

Frekuensi tertentu dari suatu getaran akan ditentukan berdasarkan ikatan antara atom-atom sehingga pada suatu senyawa organik akan menentukan gugus fungsional yang terdapat pada molekul tersebut. Frekuensi getaran juga bervariasi tergantung pada gugus fungsi tetangga, ikatan hidrogen dan efek sterik; hal inilah yang menyebabkan frekuensi getaran dari suatu gugus fungsi dapat mengalami pergeseran (Lee dan Webb, 2003).

Spektrum inframerah suatu molekul adalah hasil transisi antara tingkat energi getaran yang berlainan. Pancaran infra merah yang kerapatannya kurang dari 100 cm^{-1} diserap oleh sebuah molekul organik dan diubah menjadi putaran energi molekul. Penyerapan ini tercantum, namun spektrum getaran terlihat bukan sebagai garis-garis melainkan berupa pita-pita. Hal ini disebabkan perubahan energi getaran tunggal selalu disertai sejumlah perubahan energi putaran (Supratman, 2010).

Dalam molekul sederhana beratom dua atau beratom tiga tidak sukar untuk menentukan jumlah dan jenis vibrasinya dan menghubungkan vibrasi-vibrasi tersebut dengan energi serapan, tetapi untuk molekul-molekul beratom banyak, analisis jumlah dan jenis vibrasi itu menjadi sukar sekali atau tidak mungkin sama sekali, karena bukan saja disebabkan besarnya jumlah pusat-pusat vibrasi, melainkan karena juga harus diperhitungkan terjadinya interaksi beberapa pusat vibrasi (Supratman, 2010). Vibrasi molekul dapat dibagi dalam dua golongan, yaitu vibrasi regang dan vibrasi lentur.

Vibrasi regang (*stretching*) mengalami perubahan jarak antara dua atom di dalam suatu molekul secara terus menerus. Vibrasi regang ini ada dua macam yaitu vibrasi regang simetris dan tak simetri. Regangan Simetri, atom bergerak bersamaan dan searah dalam satu bidang datar. Regangan Asimetri, atom bergerak bersamaan dan tidak searah tetapi masih dalam satu bidang datar. Atom bergerak terus sepanjang ikatan yang menghubungkannya sehingga terjadi perubahan jarak antara keduanya dimana sudut ikatan tidak berubah (Supratman, 2010).

Vibrasi lentur (*bending*) terjadi perubahan sudut antara dua ikatan kimia. Ada empat macam vibrasi lentur yaitu vibrasi lentur dalam bidang yang dapat berupa vibrasi *scissoring* atau vibrasi *rocking* dan vibrasi keluar bidang yang dapat berupa *wagging* atau berupa *twisting*. Jika sistem tiga atom merupakan bagian dari sebuah molekul yang lebih besar, maka dapat menimbulkan vibrasi bengkokan atau vibrasi deformasi yang mempengaruhi molekul secara keseluruhan. Vibrasi bengkokan ini terbagi menjadi empat jenis, yaitu:

- a. Vibrasi Goyangan (*Rocking*), unit struktur bergerak mengayun asimetri tetapi masih dalam bidang datar.
- b. Vibrasi Guntingan (*Scissoring*), unit struktur bergerak mengayun simetri dan masih dalam bidang datar.
- c. Vibrasi Kibasan (*Wagging*), unit struktur bergerak mengibas keluar dari bidang datar.
- d. Vibrasi Pelintiran (*Twisting*), unit struktur berputar mengelilingi ikatan yang menghubungkan dengan molekul induk dan berada di dalam bidang datar.

Pancaran infra merah pada umumnya mengacu pada bagian spektrum elektromagnetik yang terletak di antara daerah tampak dan daerah gelombang mikro. Sebagian besar kegunaannya terbatas di daerah antara 4000 cm^{-1} dan 666 cm^{-1} ($2,5 - 15,0\ \mu\text{m}$). Akhir-akhir ini muncul perhatian pada daerah infra merah dekat, $14.290-4000\text{ cm}^{-1}$ ($0,7-2,5\ \mu\text{m}$) dan

daerah infra merah jauh, $700\text{-}200\text{ cm}^{-1}$ ($14,3\text{-}5,0\text{ }\mu\text{m}$). Salah satu hasil kemajuan instrumentasi IR adalah pemrosesan data seperti *Fourier Transform Infra Red* (FTIR). Dalam teknik ini padatan diuji dengan cara merefleksikan sinar infra merah yang melalui tempat kristal sehingga terjadi kontak dengan permukaan cuplikan. Degradasi atau induksi oleh oksidasi, panas, maupun cahaya, dapat diikuti dengan cepat melalui infra merah. Sensitivitas FT-IR adalah 80-200 kali lebih tinggi dari instrumentasi dispersi standar karena resolusinya lebih tinggi (Supratman, 2010).

Sinar infra merah bila dilewatkan melalui cuplikan senyawa organik maka sejumlah frekuensi akan diserap sedangkan frekuensi yang lain diteruskan tanpa diserap. Daerah infra merah terletak antara spektrum elektromagnetik cahaya tampak dan spektrum radio, yakni antara $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$. Spektrofotometri infra merah memungkinkan identifikasi gugus fungsional karena gugus fungsi tersebut menunjukkan serapan yang spesifik pada daerah infra merah. Spektrum infra merah khas untuk senyawa tertentu, sehingga metoda ini tepat untuk menentukan struktur senyawa yang belum dikenal yaitu dengan cara membandingkannya terhadap senyawa yang sudah diketahui. Sangat jarang dua senyawa organik memiliki spektrum infra merah yang identik baik dalam posisi maupun intensitas puncak-puncaknya (Supratman, 2010).

Menurut Supratman (2010), cara menganalisis spektrum infra merah dari senyawa yang tidak diketahui adalah pertama harus ditentukan ada atau tidaknya beberapa gugus fungsional utama, seperti C=O, O-H, N-H, C-O, C=C, C≡N, C≡C, dan NO₂. Para ahli kimia telah mempelajari ribuan spektra inframerah dan menentukan panjang gelombang absorpsi masing-masing gugus fungsi. Peta korelasi memaparkan ringkasan informasi ini.

Alkohol dan Amina

OH atau NH: 3000-3700 cm^{-1}

C-O atau C-N: 900-1300 cm^{-1}

Karbon-karbon dan Karbon-hidrogen

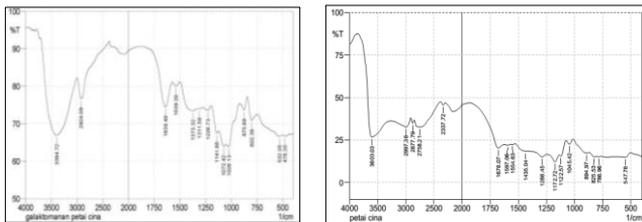
C - H sp^3 (alkana atau gugus alkil): 2800-3000 cm^{-1}

C - H sp^2 (= CH-): 3000-3300 cm^{-1}

C - H sp (-CH): $\sim 3300 \text{ cm}^{-1}$

(Fessenden dan Fessenden, 1986).

Galaktomanan biji lamtoro diekstraksi dengan metode sentrifuge (Tarigan, 2012) dan metode pemanasan tanpa sentrifuge (Tamaki, et al., 2010). Pengujian gugus fungsi dari gum dapat diperiksa dengan spektrofotometri Infra merah pada bilangan gelombang 4000–2000 cm^{-1} , selain itu untuk memastikan bahwa senyawa yang telah diekstraksi ini merupakan senyawa gum maka spektrum pada daerah sidik jari yaitu pada bilangan gelombang 2000–500 cm^{-1} . Spektrum infra merah galaktomanan biji lamtoro yang diekstraksi dengan metode pemanasan dan sentrifuge dapat dilihat pada **Gambar 4.2**.



Gambar 4.2. Spektrum Infra Merah Galaktomanan Biji Lamtoro : Metode Pemanasan (kiri) dan Metode Sentrifuge (kanan)

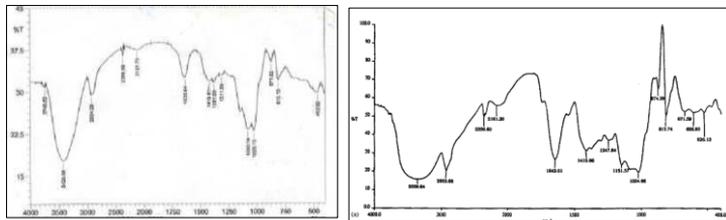
Galaktomanan biji lamtoro (GBL) yang dianalisis dengan spektroskopi FT-IR pada **Gambar 4.2** secara umum memberikan pita serapan vibrasi *stretching* O-H pada bilangan gelombang 3700-3000 cm^{-1} , metode pemanasan

pada 3394,72 cm^{-1} dan metode sentrifuge pada 3603,03 cm^{-1} . Vibrasi *stretching* C-H memberikan pita serapan pada 3000-2800 cm^{-1} , metode pemanasan pada 2924,09 cm^{-1} dan metode sentrifuge pada 2997,38 cm^{-1} . Daerah sidik jari pada bilangan 2000-500 cm^{-1} memberikan pita serapan yang mirip antara hasil ekstraksi gum biji lamtoro metode sentrifuge dan metode pemanasan yaitu terlihatnya vibrasi bending C=O, C-H, dan C-O pada hasil analisis kedua metode ekstraksi tersebut. Hasil analisis gugus fungsi galaktomanan biji lamtoro dapat dilihat pada **Tabel 4.1**.

Tabel 4.1. Hasil Analisis Gugus Fungsi Gum Biji Lamtoro

Gugus Fungsi	Bilangan Gelombang (cm^{-1})	
	Metode Pemanasan	Metode Sentrifuge
vibrasi <i>stretching</i> -OH	3394,72	3603,03
vibrasi <i>stretching</i> C-H	2924,09	2997,38
Vibrasi <i>bending</i> C=O	1639,40	1678,07
vibrasi <i>bending</i> C-H	1373,32	1288,45
vibrasi <i>bending</i> C-O	1026,13	1045,42

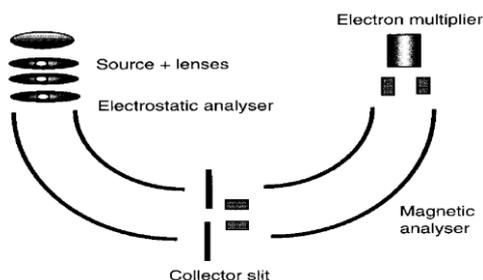
Gambar 4.2 merupakan spektrum infra merah dari gum biji lamtoro dimana bentuk pita serapan daerah sidik jari pada bilangan gelombang 2000-500 cm^{-1} sangat mirip dengan hasil analisis spektrum infra merah dari gum biji aren dan guar gum pada **Gambar 4.3**.



Gambar 4.3. Spektrum Infra Merah: Biji Aren (kiri) dan Guar Gum (kanan) (Tarigan, 2012)

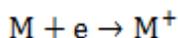
B. Spektroskopi Massa

Instrumen spektroskopi massa terdiri dari beberapa komponen penting dapat dilihat pada **Gambar 4.2**.



Gambar 4.4. Diagram Sederhana Instrumen Spektroskopi Massa (Watson, 2000)

Instrumen spektroskopi massa terdiri dari sumber ion dan pemisah ion. Sampel yang masuk ke dalam instrumen diawali dengan pemanasan hingga terjadi proses penguapan dan dibantu dengan vakum didalam sumber ion. Pada fase uap, analit akan dibombardir dengan elektron yang berasal dari filamen tungsten atau rhenium. Proses ionisasi akan mengikuti reaksi berikut ini:

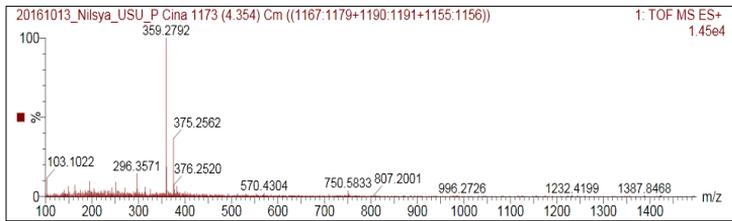


Karena elektron yang diberikan memiliki energi yang sangat tinggi, maka selanjutnya akan terjadi proses fragmentasi. Ion fragmen yang telah terfragmentasi akan dipisahkan oleh sektor magnetik yang menungknkan ion yang keluar dari celah kolektor akan menuju ke detektor dengan dipisah-pisahkan berdasarkan berat molekulnya walaupun memiliki rentang bobot molekul yang sangat besar.

Informasi yang paling penting yang diperoleh dari data spektroskopi massa adalah rumus molekul dan berat molekul suatu senyawa. Rumus molekul suatu senyawa dapat diperoleh dari fragmen ion hasil fragmentasi senyawa yang dianalisis. Fragmen ion harus memiliki massa yang

akurat untuk dapat menafsirkan rumus molekul yang tepat. Interpretasi spektroskopi massa dilakukan dengan cara mengidentifikasi fragmen ion, menentukan elemen penyusun senyawa, menentukan *index hydrogen deficiency* (jumlah ikatan rangkap dan/atau cincin), menentukan kerangka dasar, menentukan struktur yang mungkin dari fragmen ion yang memiliki berat molekul paling besar (Furniss, et. al., 1989).

Analisis spektroskopi massa di BPPT Serpong dengan spesifikasi alat UPLC- QToF-MS/MS System (Waters), dengan column Acquity UPLC BEH C18 1.7um, 2.1x50 mm, laju alir 0.3 mL/min dan volume injeksi 5 uL, temperatur 40 dC, eluen yang digunakan air + 0,1% formic acid. Berat Molekul (BM) gum biji lamtoro 1387 dengan *base peak* 359 dapat dilihat pada **Gambar 4.5**



Gambar 4.5. Hasil Analisis LC-MS Gum Biji Lamtoro (GBL)

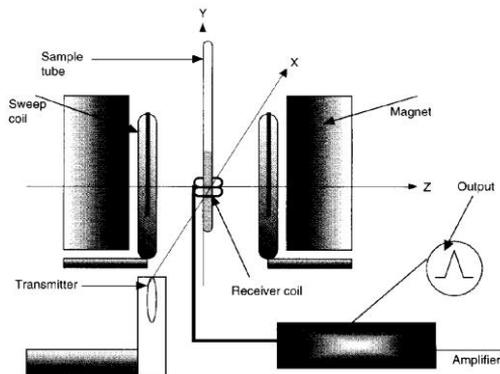
Gambar 4.5 menunjukkan *base peak* Gum Biji Lamtoro (GBL) sebesar 359 membenarkan bahwa molekul galaktomanan terdiri dari satu molekul galaktosa $C_6H_{12}O_6$ (BM 180) dan satu molekul manosa $C_6H_{12}O_6$ (BM 180) sehingga BM senyawa tersebut berjumlah 360. Spektrometri massa akan menghasilkan suatu radikal ion, suatu spesi dengan satu elektron tak berpasangan dan bermuatan +1 sehingga terbentuk ion organik m/z 359.

Spektrum massa adalah alur kelimpahan (abundance) jumlah relatif fragmen bermuatan positif berlainan versus massa per muatan (m/z) dari fragmen-fragmen tersebut. Muatan ion dari kebanyakan partikel yang dideteksi dalam

suatu spektrometer massa adalah +1; maka nilai m/z sama dengan massa molekulnya (M). Spektrum massa dipaparkan sebagai grafik batang dimana setiap puncak dalam spektrum menyatakan suatu fragmen molekul. Fragmen disusun sedemikian rupa sehingga puncak-puncak dicatat menurut kenaikan m/z dari kiri ke kanan dalam spektrum. Intensitas puncak sebanding dengan kelimpahan relatif fragmen-fragmen tergantung pada stabilitas relatifnya. Puncak tertinggi dalam suatu spektrum disebut dengan puncak dasar (*base peak*) dengan intensitas 100%. Puncak dasar terkadang disebabkan oleh ion molekul, tetapi lebih sering berasal dari suatu fragmen yang lebih kecil, sedangkan puncak yang paling kanan merupakan berat molekul (Supratman, 2010).

C. Spektroskopi Resonansi Magnetik Inti

Resonansi Magnetik Inti (RMI) atau yang lebih dikenal dengan NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*) adalah Instrumen spektroskopi sinar resonansi magnetik inti yang terdiri dari beberapa komponen penting seperti yang terlihat pada **Gambar 4.6**.



Gambar 4.6. Diagram Sederhana Dari Instrumen Spektroskopi Resonansi Magnetik Inti (Watson, 2000)

Sumber cahaya yang digunakan adalah lampu deuterium untuk daerah sinar ultra lembayung pada panjang

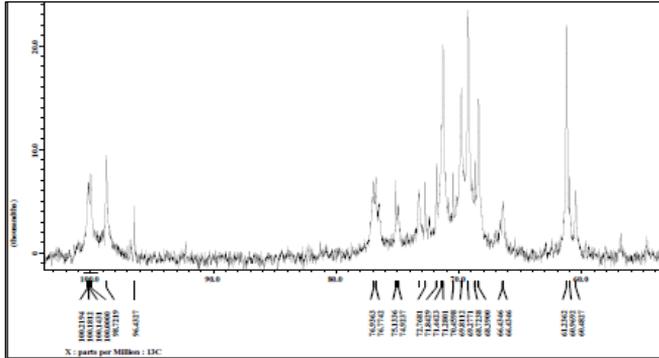
gelombang 190-350 nm dan lampu tungsten untuk daerah sinar tampak pada panjang gelombang 350-900 nm. Monokromator digunakan untuk mendispersikan cahaya menjadi panjang gelombang konstituennya yang kemudian panjang gelombang yang diinginkan akan diteruskan melalui celah. Optik digunakan pada spektroskopi sinar ultra lembayung dan sinar tampak sinar ganda. Optik dapat membagi sinar menjadi dua bagian, bagian pertama akan melalui kompartemen sampel, sedangkan bagian kedua akan melalui kompartemen blanko (Watson, 2000).

Spektroskopi resonansi magnetik inti merupakan alat yang sangat baik dan cepat untuk penentuan struktur senyawa kimia. Spektroskopi massa lebih cepat dari spektroskopi resonansi magnetik inti, tetapi hanya diperoleh rumus molekul dan berat molekul suatu senyawa kimia dan pola pemecahan suatu senyawa kimia, sangat jarang untuk memberikan informasi yang cukup untuk penentuan struktur senyawa kimia secara lengkap. Spektroskopi resonansi magnetik inti secara nyata dapat digunakan untuk penentuan struktur senyawa kimia yang baru. Kemampuan spektroskopi resonansi magnetik inti dalam menganalisis senyawa dalam konsentrasi dan jumlah yang rendah (dari hasil sintesis, maupun degradasi) mewakili kegunaan yang sangat bermanfaat dari spektroskopi resonansi magnetik inti pada pengembangan obat (Lee dan Webb, 2003).

Penentuan struktur suatu senyawa biasanya memerlukan data ^{13}C dari spektroskopi resonansi magnetik inti disamping data ^1H dari spektroskopi resonansi magnetik inti. Pada saat analisis data penentuan struktur senyawa hasil metabolit ataupun degradasi mungkin data ^1H sudah sangat mencukupi untuk menghubungkan senyawa yang hendak dianalisis terhadap senyawa penuntun. Tetapi untuk beberapa hal, data ^{13}C diperlukan untuk pemastian lebih lanjut (Lee dan Webb, 2003).

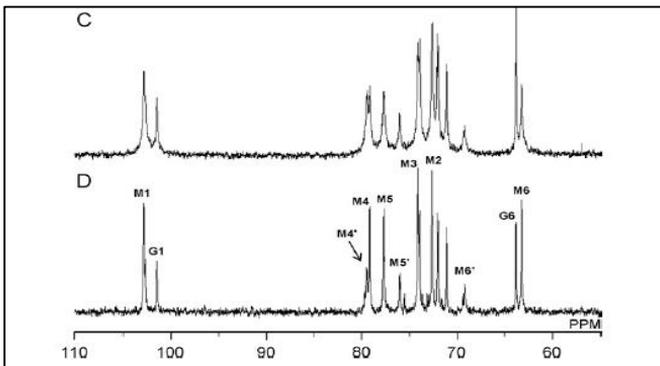
Spektrum ^{13}C -NMR dari gum biji lamtoro (500 MHz dalam CDCl_3) memberikan dua signal singlet yang

berdekatan (δ 60 dan 100 ppm) yang merupakan signal karbon dari senyawa galaktosa dan manosa seperti yang terlihat pada **Gambar 4.7** Signal singlet (δ 60 ppm) berasal dari atom karbon metoksi dan signal singlet (δ 100 ppm) berasal dari atom karbon teroksigenasi.



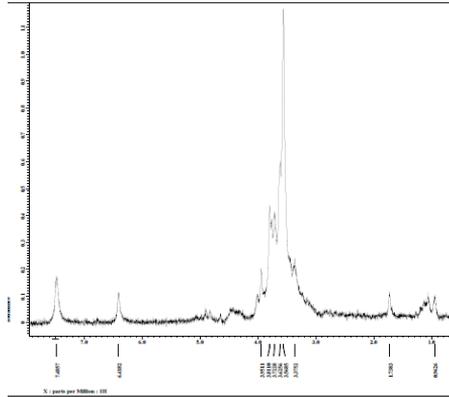
Gambar 4.7. Spektrum ^{13}C -NMR Gum Biji Lamtoro (GBL)

Hal ini sesuai dengan hasil kajian Muschin dan Yoshida (2012), yaitu spektrum ^{13}C -NMR dari fenugreek gum dan tara gum memiliki dua signal (δ 60 dan 100 ppm) seperti yang terlihat pada **Gambar 4.8**.



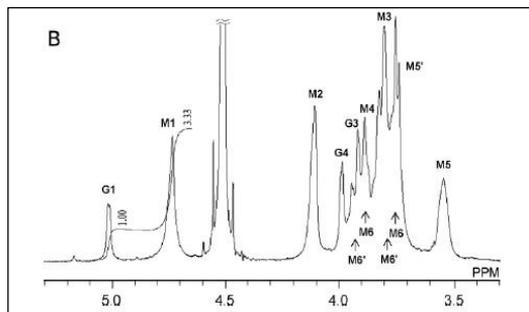
Gambar 4.8. Spektrum ^{13}C -NMR Fenugreek Gum dan Tara Gum (Muschin dan Yoshida, 2012)

Spektrum $^1\text{H-NMR}$ dari Gum Biji Lamtoro (500 MHz dalam D_2O) memberikan dua signal singlet yang berdekatan signal pada δ 3-4 ppm dan δ 6-7 ppm berasal dari proton metoksi dari galaktosa dan manosa. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ dari Gum Biji Lamtoro (GBL) dapat dilihat pada **Gambar 4.9**.



Gambar 4.9. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ Gum Biji Lamtoro (GBL)

Hasil kajian Muschin dan Yoshida (2012) seperti yang terlihat pada **Gambar 4.10**, analisis $^1\text{H-NMR}$ pada tara gum memberikan signal singlet (δ 4-5 ppm) yang merupakan proton metoksi dari galaktosa dan manosa.



Gambar 4.10. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ Tara Gum (Muschin dan Yoshida, 2012)

D. Derajat Ikat Silang Fosfat

Menurut Polnaya, et al. (2013), derajat ikat silang (degree of substitution= DS) fosfat dari monostarch dan distarch phosphate dihitung dengan rumus:

$$DS\ 1\ (\text{monostarch phosphate}) = 162P / (3100 - 103P)$$

$$DS\ 2\ (\text{distarch phosphate}) = 162P / (3100 - 102P)$$

dimana massa atom P yaitu 31, sedangkan angka 162 adalah berat molekul dari anhydroglucose, angka 3100 massa atom fosfor dikalikan 100, angka 103 adalah massa molar fosfat dari mono-galaktomanan phosphate (1 atom P, 3 atom O, 1 atom Na, dan 1 atom H), dan 102 adalah massa molar fosfat dari di-galaktomanan phosphate (1 atom P, 3 atom O, dan 1 atom Na). Dalam hal ini sampel galaktomanan dan pati (starch) dianggap sama karena monomer glukosa dan galaktosa mempunyai berat molekul yang sama. Hasil analisis derajat ikat silang fosfat dapat dilihat pada **Tabel 4.2**.

Tabel 4.2. Hasil Analisis Derajat Ikat Silang Fosfor pada GFL

Sampel	Kadar Posfor (mg/100 g)	Derajat Ikat Silang 1 Posfat (DS 1)	Derajat Ikat Silang 2 Posfat (DS 2)
GFL 1:1	14,1446	1,3946	1,3826
GFL 2:1	10,2267	0,8094	0,8055

Pada **Tabel 4.2** terlihat bahwa data kadar fosfor yang dianalisis mendekati data sebenarnya yaitu sebesar 15% untuk perbandingan galaktomanan dan TNTMP 1:1 dan sebesar 10% untuk TNTMP sebesar 2:1. TNTMP mempunyai massa molar sebesar 306 dengan (3 atom Na, 9 atom O, dan 3 atom P), massa atom P adalah 31 sehingga 30% dari massa molar TNTMP adalah massa molar P. Hal ini dapat disimpulkan bahwa dalam 500 mg TNTMP terdapat 150 mg massamolar P, dan dalam 1000 mg TNTMP terdapat 300 mg massamolar P. Hal ini berarti pada galaktomanan:TNTMP perbandingan 1:1 (g/g) terdapat 300 mg massa P dalam 2000 mg galaktomanan fosfat sehingga kadar P adalah sebesar 15%, begitu pula pada perbandingan galaktomanan:TNTMP

sebesar 2:1 (g/g) terdapat 150 mg massa P dalam 1000 mg galaktomanan fosfat sehingga kadar P adalah sebesar 10%.

Jika kita menghitung rumus derajat ikat silang (Polnaya, et al., 2013) maka maksimal kadar P yang dapat dihitung dengan rumus tersebut adalah 30%, jika nilai P > 30% maka perhitungan akan error (gagal). Hal ini sesuai dengan nilai massa molar P adalah 93 yaitu 30% dari massa molar TNTMP sebesar 306. Berdasarkan data pada **Tabel 4.2** dapat disimpulkan bahwa semakin besar rasio TNTMP yang ditambahkan pada proses ikat silang fosfat akan semakin meningkatkan nilai derajat ikat silang DS1 dan DS2 namun menurut rumus DS tersebut maksimal rasio galaktomanan:TNTMP sebesar 2:1.

BAB V

TOKSISITAS

GALAKTOMANAN FOSFAT

BIJI LAMTORO

Toksistas adalah kemampuan suatu zat kimia dalam menimbulkan kerusakan pada organisme baik saat digunakan atau saat berada dalam lingkungan. Uji toksistas adalah suatu uji untuk mendeteksi efek toksik suatu zat pada sistem biologi dan untuk memperoleh data dosis-respon yang khas dari sediaan uji. Data yang diperoleh dapat digunakan untuk memberi informasi mengenai derajat bahaya sediaan uji tersebut bila terjadi pemaparan pada manusia, sehingga dapat ditentukan dosis penggunaannya demi keamanan manusia (Priyanto, 2009).

Uji toksistas menggunakan hewan uji sebagai model berguna untuk melihat adanya reaksi biokimia, fisiologik dan patologik pada manusia terhadap suatu sediaan uji. Hasil uji toksistas tidak dapat digunakan secara mutlak untuk membuktikan keamanan suatu bahan/sediaan pada manusia, namun dapat memberikan petunjuk adanya toksistas relatif dan membantu identifikasi efek toksik bila terjadi pemaparan pada manusia (Ditjen POM, 2014).

Obat sebelum dipasarkan atau digunakan harus menjalani serangkaian uji untuk memastikan efektivitas dan keamanannya. Umumnya uji toksistas terdiri atas dua jenis, yaitu toksistas umum (akut, subkronik dan kronik) dan toksistas khusus (teratogenik, mutagenik dan karsinogenik) (Priyanto, 2009; Lu, 1994).

Penelitian toksistas konvensional pada hewan coba sering mengungkapkan serangkaian efek akibat pajanan toksikan dalam berbagai dosis untuk berbagai masa pajanan. Penelitian toksikologi biasanya dibagi menjadi tiga kategori yaitu uji toksistas akut, subkronik dan kronik.

Uji toksisitas akut dilakukan dengan memberikan bahan kimia yang sedang diuji sebanyak satu kali atau beberapa kali dalam jangka waktu 24 jam. Uji toksisitas jangka pendek (dikenal dengan subkronik) dilakukan dengan memberikan bahan tersebut berulang-ulang, biasanya setiap hari atau lima kali seminggu, selama jangka waktu kurang lebih 10% dari masa hidup hewan, yaitu tiga bulan untuk tikus dan satu atau dua tahun untuk anjing. Uji toksisitas jangka panjang dilakukan dengan memberikan bahan kimia berulang-ulang selama masa hidup hewan coba atau sekurang-kurangnya sebagian besar dari masa hidupnya, misalnya 18 bulan untuk mencit, 24 bulan untuk tikus, dan 7-10 tahun untuk anjing dan monyet (Lu, 1994).

A. Toksisitas Akut

Uji toksisitas akut adalah suatu pengujian untuk mendeteksi efek toksik yang muncul dalam waktu singkat setelah pemberian sediaan uji yang diberikan secara oral dalam dosis tunggal, atau dosis berulang yang diberikan dalam waktu 24 jam (BPOM RI, 2011). Prinsip uji toksisitas akut oral yaitu, sediaan uji dalam beberapa tingkat dosis yang diberikan pada beberapa kelompok hewan uji kemudian dilakukan pengamatan terhadap adanya efek toksik dan kematian sebagai parameter akhir. Hewan yang mati selama percobaan dan yang hidup sampai akhir percobaan diotopsi untuk dievaluasi adanya gejala-gejala toksisitas (BPOM RI, 2011).

Tujuan toksisitas akut adalah untuk mendeteksi toksisitas dari suatu zat, untuk memperoleh informasi awal yang dapat digunakan untuk merancang uji toksisitas selanjutnya serta untuk menentukan LD50 (potensi ketoksikan) akut dari suatu senyawa. Penelitian uji toksisitas akut sebagian besar dirancang untuk menentukan dosis lethal (LD50). Penelitian uji toksisitas akut sebagian besar dirancang untuk menentukan dosis letal median (LD50) toksikan (Priyanto, 2009).a

LD50 didefinisikan sebagai “dosis tunggal suatu bahan yang secara statistik diharapkan akan membunuh 50% hewan coba”. Pengujian ini juga dapat menunjukkan organ sasaran yang mungkin dirusak dan efek toksik spesifiknya, serta memberikan petunjuk tentang dosis yang sebaiknya digunakan dalam pengujian yang lebih lama (Lu, 1994).

Nilai LD50 sangat berguna untuk klasifikasi lazim zat kimia sesuai dengan toksisitas relatifnya dan Evaluasi dampak keracunan yang tidak disengaja; perencanaan penelitian toksisitas subkronik dan kronik pada hewan, memberikan informasi tentang mekanisme toksisitas, pengaruh umur, seks, faktor penjamu dan faktor lingkungan lainnya dan variasi respons antarspesies dan antarstrain hewan; memberikan informasi tentang reaktivitas suatu populasi hewan (Lu, 1994). Kategori toksisitas akut sesuai LD50 dapat dilihat pada **Tabel 5.1**.

Tabel 5.1. Kategori Toksisitas sesuai LD50

Kategori	LD50
Super toksik	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

Pengamatan terhadap pengujian efek toksik dilakukan pada setiap kelompok, efek toksik yang terjadi diamati dibandingkan dengan kontrol. Waktu pengamatan adalah tiap 30 menit, 60 menit, 90 menit, 120 menit, 150 menit, 180 menit, 210 menit, 240 menit. Total waktu pengamatan adalah 4 jam secara periodik dan dilanjutkan selama 24 jam pertama (OECD, 2011). Pada kelompok perlakuan dilakukan pengamatan terhadap ada tidaknya gejala toksik dan pengujian yang meliputi uji panggung, uji katalepsi dan uji menggelayung.

Berdasarkan hasil pengujian terlihat bahwa pemberian sediaan pada pengamatan intensif selama 4 jam pertama tidak ditemukan gejala toksik pada kelompok kontrol (akuades 1% bb) maupun kelompok perlakuan GFL 1:1 dengan dosis 1000 mg/kg bb, 2000 mg/kg bb, 5000 mg/kg bb. Galaktomanan biji lamtoro yang telah diikatsilang dengan trinitrium trimetafosfat (TNTMP) dengan perbandingan GFL 1:1 dipilih dari formula cangkang kapsul yang lain karena pada formula ini yang paling banyak mengandung TNTMP.

Pemberian sediaan tidak menimbulkan gejala toksik pada kelompok kontrol (akuades 1% bb) maupun kelompok perlakuan untuk dosis 1000 mg/kg bb, 2000 mg/kg bb, 5000 mg/kg bb. Gejala abnormal mencit pada uji panggung tidak ditemukan, seperti perilaku berputar-putar, menggosok hidung, dan menggeliat. Kaki depan mencit masih mudah mencapai permukaan meja yang ditaruh pada pensil yang digerakkan dari atas ke bawah pada uji katalepsi. Mencit masih kuat menggelayang ketika diletakkan diatas kawat pada uji menggelayang (Sutjiatmo, et al., 2015).

a. Pengamatan Berat Badan

Berdasarkan **Tabel 5.2** terlihat bahwa terdapat perubahan berat badan mencit perminggu antara kontrol (akuades 1% bb) dan gum biji lamtoro yang telah diikatsilang dengan trinitrium trimetafosfat dengan perbandingan GFL 1:1. Hal ini menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan GFL 1:1 dosis 1000 mg/kg bb, namun terdapat perbedaan yang signifikan terhadap GFL 1:1 dosis 2000 dan 5000 mg/kg bb namun kenaikan berat badan tidak mencapai 10%. Menurut OECD (2008), dikatakan toksik apabila terjadi perubahan berat badan sampai 10%.

Tabel 5.2. Persentase Perubahan Berat Badan Perminggu

Perlakuan Uji Toksisitas Akut	Rata-rata berat badan (g) \pm SD			Δ per BB	
	Minggu ke-0	Minggu ke-1	Minggu ke-2	Minggu ke-1	Minggu ke-2
Kontrol (Akuades 1% bb)	27,35 \pm	27,78 \pm	28,24 \pm	+1,58	+1,65%
	1,26	1,24	1,20		
Gum Fosfat biji Lamtoro (GFL) 1:1					
1000 mg/kg bb	25,83 \pm	26,27 \pm	26,74 \pm	+1,71%	+1,80%
	1,20	1,18	1,17		
2000 mg/kg bb	23,88 \pm	24,30 \pm	24,76 \pm	+1,79%	+1,90%
	1,12	1,05	0,95		
5000 mg/kg bb	23,87 \pm	24,31 \pm	24,79 \pm	+1,84%	+1,94%
	1,49	1,51	1,53		

Keterangan :

(-) = Terjadi penurunan berat badan

(+) = Terjadi kenaikan berat badan

(SD) = Standar deviasi

Analisis SPSS berat badan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan GFL 1:1 dilakukan untuk melihat signifikansi perbedaan yang dapat dilihat pada **Tabel 5.3**. Analisis data statistik perubahan berat badan setelah pemberian dosis GFL 1000, 2000 dan 5000 mg/kgbb menggunakan SPSS 16.0 dengan tingkat kepercayaan 95%. Uji normalitas menunjukkan nilai signifikansi dengan $\alpha > 0,05$ hal ini menunjukkan bahwa sebaran data normal. Uji homogenitas juga menunjukkan nilai signifikansi $\alpha > 0,05$ sehingga selanjutnya dapat menggunakan uji *one way analysis of variance* (ANOVA), dilanjutkan dengan uji *post hoc Multiple Comparisons Tukey HSD*.

Tabel 5.3. Hasil Analisis SPSS Perubahan Berat Badan Pemberian Dosis GFL

Tukey HSD

Konsentrasi GFL	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
5000-X0	6	23.8733		
2000-X0	6	23.8767		
2000-X1	6	24.3000	24.3000	
5000-X1	6	24.3133	24.3133	
2000-X2	6	24.7567	24.7567	
5000-X2	6	24.7850	24.7850	
1000-X0	6	25.8250	25.8250	25.8250
1000-X1	6	26.2650	26.2650	26.2650
1000-X2	6		26.7367	26.7367
Kontrol-X0	6			27.3517
Kontrol-X1	6			27.7833
Kontrol-X2	6			28.2400
Sig.		.065	.055	.060

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

b. Pengamatan kematian

Hasil pengamatan kematian hewan selama waktu pemberian sediaan uji dimana tidak ada satu mencit pun yang mati setelah pemberian sediaan uji. Menurut (OECD, 2001), jika pada dosis 5000 mg/kg bb tidak ada kematian nilai LD₅₀nya lebih besar dari 5000 sehingga termasuk kedalam kriteria praktis tidak toksik.

c. Pengamatan berat organ relatif

Organ hati dan ginjal pada mencit yang masih hidup sampai akhir periode pengamatan diotopsi dan

ditimbang beratnya. Hasil berat organ hati dan ginjal yang didata pada akhir perlakuan ditunjukkan pada **Tabel 5.4**.

Tabel 5.4. Rata-rata Berat Organ Mencit pada Uji Toksisitas Akut

Kelompok	Dosis Uji Toksisitas Akut	Rata-rata berat organ (g)	
		Hati	Ginjal
Kontrol	Akuades 1% bb	1,71	0,17
GFL 1:1	1000 mg/kgbb	1,83	0,18
	2000 mg/kgbb	1,63	0,17
	5000 mg/kgbb	1,68	0,16

Analisis data statistik perbedaan berat organ hati dan ginjal setelah pemberian dosis GFL 1000, 2000 dan 5000 mg/kgbb menggunakan SPSS 16.0 dengan tingkat kepercayaan 95%. Uji normalitas menunjukkan nilai signifikansi dengan $\alpha > 0,05$ hal ini menunjukkan bahwa sebaran data normal. Uji homogenitas juga menunjukkan nilai signifikansi $\alpha > 0,05$ sehingga selanjutnya dapat menggunakan uji *one way analysis of variance* (ANOVA), dilanjutkan dengan uji *post hoc Multiple Comparisons Tukey HSD*.

Analisis SPSS berat hati dan ginjal setelah pemberian dosis GFL 1:1 dapat dilihat pada **Tabel 5.4** dan **Tabel 5.5**. Hasil analisis menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$) antara kelompok kontrol (akuades 1% bb) dan kelompok perlakuan GFL 1:1 dosis 1000 mg/kg bb, 2000 mg/kg bb dan 5000 mg/kg bb. Hal ini dapat disimpulkan bahwa tidak ada pengaruh sediaan yang diberikan terhadap berat organ hati dan ginjal dan mencit.

Tabel 5.5. Hasil Analisis SPSS Berat Hati dan Ginjal Pemberian Dosis GFL

Tukey HSD

Parameter	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Ginjal-2000	6	.1583	
Ginjal-5000	6	.1633	
Ginjal-Kontrol	6	.1667	
Ginjal-1000	6	.1817	
Hati-5000	6		1.5583
Hati-2000	6		1.6267
Hati-Kontrol	6		1.7100
Hati-1000	6		1.8283
Sig.		1.000	.432

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

d. Pengamatan makroskopis hati dan ginjal mencit

Pengamatan secara makroskopis organ merupakan salah satu indikator yang berguna bagi toksisitas untuk mengetahui adanya gejala kerusakan pada organ sasaran.

Pengamatan makroskopis organ hati dan ginjal mencit setelah pemberian galaktomanan biji lamtoro yang telah diikatsilang dengan TNTMP dengan perbandingan GFL 1:1 dapat dilihat pada **Tabel 5.6**

Tabel 5.6. Pengamatan Makroskopis Organ Hati dan Ginjal

Dosis	Organ	Pengamatan Uji Toksisitas Akut		
		Warna	Konsistensi	Permukaan
Kontrol (Akuades 1% bb)	Hati	Merah Kecoklatan	Kenyal	Licin
	Ginjal	Merah Kecoklatan	Kenyal	Licin
Gum Fosfat biji Lamtoro (GFL) 1:1				

1000 mg/Kg bb	Hati	Merah Kecoklatan	Kenyal	Licin
	Ginjal	Merah Kecoklatan	Kenyal	Licin
2000 mg/Kg bb	Hati	Merah Kecoklatan	Kenyal	Licin
	Ginjal	Merah Kecoklatan	Kenyal	Licin
5000 mg/Kg bb	Hati	Merah Kecoklatan	Kenyal	Licin
	Ginjal	Merah Kecoklatan	Kenyal	Licin

Berdasarkan **Tabel 5.6** terlihat bahwa tidak ada perubahan morfologi organ hati dan ginjal secara makroskopis pada kelompok kontrol (akuades 1% bb) dan kelompok perlakuan GFL 1:1 dosis 1000, 2000 dan 5000 mg/kg bb yaitu organ hati dan ginjal tetap berwarna merah kecoklatan, permukaannya licin, dan konsistensinya kenyal, Organ hati dan ginjal yang tidak normal mengalami perubahan morfologi secara makroskopis yaitu perubahan warna menjadi pucat disertai struktur permukaan yang bernodul-nodul (Anggraini, 2008).

e. AST dan ALT pada Uji Toksisitas Akut

Analisis AST dan ALT setelah pemberian gum biji lamtoro yang telah diikatsilang dengan TNTMP dengan perbandingan GFL 1:1 dapat dilihat pada **Tabel 5.7**. Analisis data statistik nilai AST dan ALT setelah pemberian dosis GFL 1000, 2000 dan 5000 mg/kgbb menggunakan SPSS 16.0 dengan tingkat kepercayaan 95%. Uji normalitas menunjukkan nilai signifikansi dengan $\alpha > 0,05$ hal ini menunjukkan bahwa sebaran data normal. Uji homogenitas juga menunjukkan nilai signifikansi $\alpha > 0,05$ sehingga selanjutnya dapat menggunakan uji *one way analysis of variance (ANOVA)*, dilanjutkan dengan uji *post hoc Multiple Comparisons Tukey HSD*.

Tabel 5.7. Data Hasil Analisis AST dan ALT pada Uji Toksisitas Akut

Kelompok	Dosis Uji Toksisitas Akut	Rata-rata nilai (U/l)	
		AST	ALT
Kontrol	Akuades 1% bb	138,03	77,55
GFL 1:1	1000 mg/kgbb	141,48	80,72
	2000 mg/kgbb	155,80	85,95
	5000 mg/kgbb	165,68	89,50

Uji signifikansi perbedaan hasil AST dan ALT dari pemberian GFL 1:1 dengan dosis 1000, 2000, dan 5000 mg/kg bb terhadap kelompok kontrol (akuades 1% bb). Hasil analisis SPSS terhadap nilai AST dan ALT mencit dapat dilihat pada **Tabel 5.8.**

Tabel 5.8. Hasil Analisis SPSS AST dan ALT Pemberian Dosis GFL

Tukey HSD

Parameter	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
ALT-Kontrol	6	77.5500	
ALT-1000	6	80.7167	
ALT-2000	6	85.9500	
ALT-5000	6	89.5000	
AST-Kontrol	6		138.0333
AST-1000	6		141.4833
AST-2000	6		155.8000
AST-5000	6		165.6833
Sig.		.991	.555

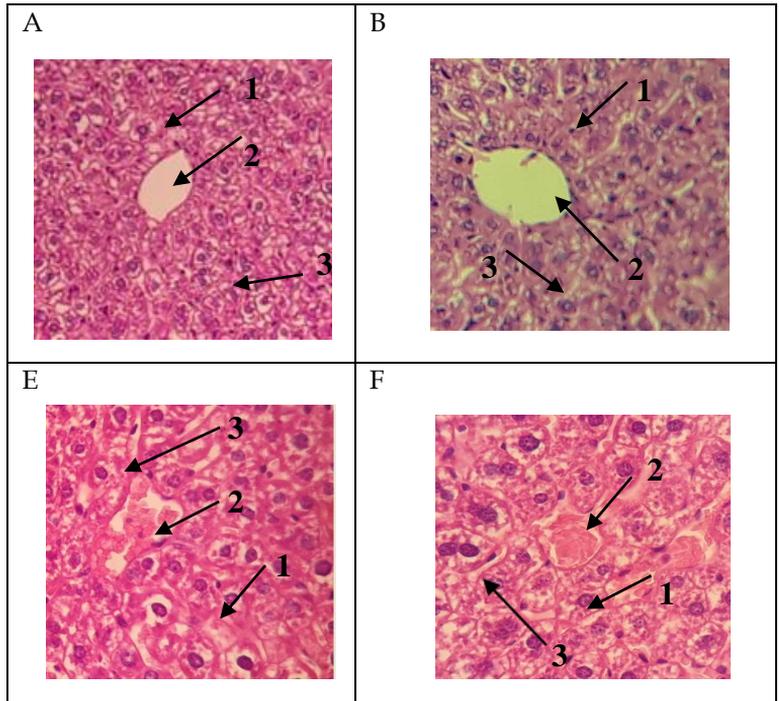
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Tabel 5.8 menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$) antara kelompok kontrol (akuades 1% bb) dan kelompok perlakuan GFL 1:1 dosis 1000 mg/kg bb, 2000 mg/kg bb dan 5000 mg/kg bb terhadap nilai AST dan ALT. Hal ini dapat disimpulkan bahwa tidak ada pengaruh sediaan yang diberikan terhadap AST dan ALT mencit. Kerusakan sel hati atau jaringan hati diukur dengan nilai enzim SGPT (*Serum Glutamic Pyruvic Transaminase*)/ALT (*Alanine Aminotransferase*) dan SGOT (*Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase*)/AST (*Aspartat Aminotransaminase*). Ketika sel hati mengalami kerusakan, enzim hati tersebut berada dalam darah, sehingga dapat diukur peningkatan aktivitasnya. Hal ini disebabkan karena kerusakan pada struktur dan fungsi membran sel hati. Apabila kerusakan yang timbul oleh radang hati hanya kecil, aktivitas ALT lebih dini dan lebih cepat meningkat dari kadar AST (Widmann, 1995),

f. Gambaran Histopatologi Organ Mencit pada Uji Toksisitas Akut

Kajian ini dilakukan untuk melihat gambaran histopatologi hati dan ginjal mencit. Hati merupakan organ terbesar yang terdapat didalam tubuh, hati tersusun dari sel-sel yang disebut hepatosit. Hepatosit merupakan sel epitel yang berkelompok membentuk lempeng-lempeng yang saling berhubungan. Hepatosit tersusun membentuk lobulus hati dengan vena sentral sebagai pusat. Celah diantara lempeng-lempeng yang dibentuk hepatosit mengandung komponen mikrovaskular yaitu sinusoid hati (Junquiera et al., 2007). Zat makanan, sebagian besar obat-obatan serta toksikan yang masuk melalui saluran cerna setelah diserap oleh epitel usus akan dibawa oleh vena porta ke hati. Oleh sebab itu, hati menjadi organ yang sangat potensial menderita keracunan lebih dahulu sebelum organ lain

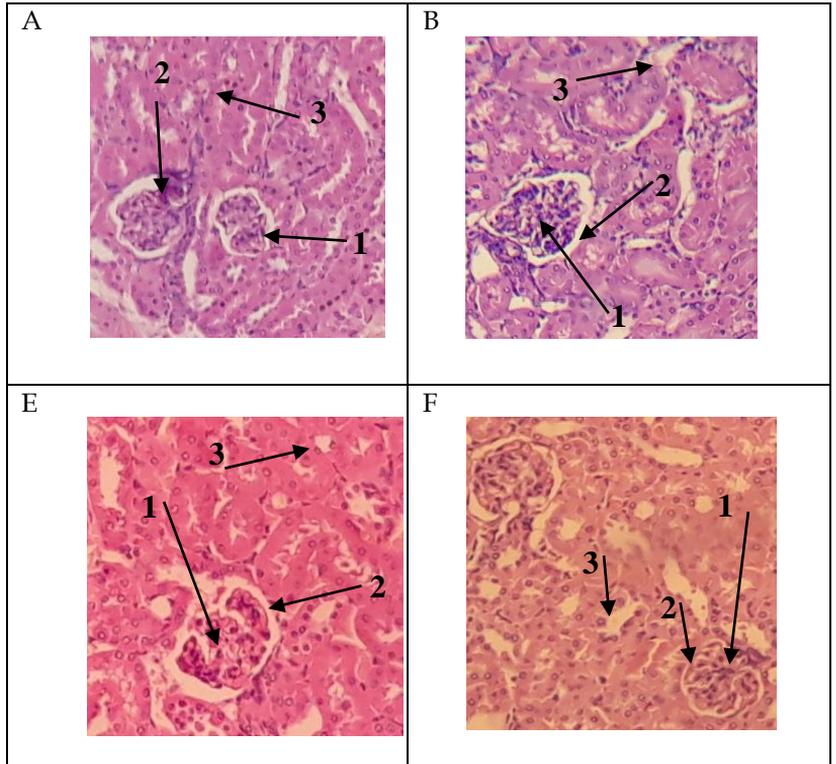
(Santoso dan Nurlaili, 2006). Analisis histopatologi pada organ hati dan ginjal mencit dianalisis di Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran USU dengan menggunakan pewarna hematoxilin dan eosin.



Gambar 5.1. Histopatologi Toksisitas Akut Hati Mencit pada Pemberian (A) Akuades 1% bb (kontrol), (B) GFL 1000 mg/kg bb, (C) GFL 2000 mg/kg bb, (D) GFL 5000 mg/kg bb. Keterangan : 1. Sel hepatosit, 2. Vena Sentralis, 3. Sinusoid.

Ginjal berfungsi menyaring zat sisa dari darah, zat sisa dikeluarkan sebagai urin. Ginjal mempunyai bagian fungsional yang disebut nefron yang terdiri dari glomerulus, tubulus proksimal, lengkung henle dan tubulus distal serta kandung kemih (Priyanto, 2009). Suhita,

et al. (2013), menyatakan bahwa salah satu tanda kerusakan ginjal adalah terjadi pembengkakan glomerulus, proliferasi kapsula Bowman yang mengakibatkan penyempitan ruang Bowman.



Gambar 5.2. Histopatologi Toksisitas Akut Ginjal Mencit pada Pemberian (A) Akuades 1% bb (kontrol), (B) GFL 1000 mg/kg bb, (C) GFL 2000 mg/kg bb, (D) GFL 5000 mg/kg bb. Keterangan : 1. Glomerulus, 2. Kapsul Bowman, 3. Tubulus.

Tabel 5.9 Analisis Histopatologi Organ Hati Mencit

Kelompok	Dosis	Hepatosit	Vena centralis	Sinusoid
Kontrol	Akuades 1% bb	Normal	Normal	Normal
GFL 1:1	1000 mg/kgbb	Normal	Normal	Normal
	2000 mg/kgbb	Normal	Kongesti	Dilatasi
	5000 mg/kgbb	Karioeksis	Kongesti	Dilatasi

Tabel 5.10. Analisis Histopatologi Organ Ginjal Mencit

Kelompok	Dosis	Glomerulus	Kapsul Bowman	Tubulus
Kontrol	Akuades 1% bb	Normal	Normal	Normal
GFL 1:1	1000 mg/kgbb	Normal	Normal	Normal
	2000 mg/kgbb	Normal	Normal	Normal
	5000 mg/kgbb	Hipertropi	Menyempit	Dilatasi

Berdasarkan **Tabel 5.9** dan **Gambar 5.1 (B)** terlihat gambar histologi organ hati kelompok GFL 1000 mg/kg bb masih dalam keadaan normal. Kelompok perlakuan GFL 2000 mg/kg bb pada **Gambar 5.1 (C)** terlihat bahwa hati mulai mengalami perubahan yang ditandai dengan kongesti vena centralis dan dilatasi sinusoid. Kelompok perlakuan GFL 5000 mg/kg bb pada **Gambar 5.1 (D)** terlihat bahwa 10% sel hepatosit mengalami karioeksis, dilatasi sinusoid, dan terjadi kongesti (pendarahan) pada vena centralis.

Menurut Setiawan (2013), sel hepatosit yang mengalami nekrosis meliputi inti sel piknotik (pengerutan inti sel), karioeksis (inti sel pecah) dan kariolisis (inti sel menghilang). Vena centralis akan mengalami melebar jika terjadi kerusakan karena sel-sel endotel akan lisis.

Konsentrasi suatu senyawa yang tinggi dalam darah akan terjadi penyaluran darah dengan perfusi kuat disalurkan pada sinusoid, sehingga sinusoid melebar.

Salah satu organ yang sering menderita karena adanya zat-zat toksik adalah hati, bahan kimia kebanyakan mengalami metabolisme dalam hati dan oleh karenanya maka banyak bahan kimia yang berpotensi merusak sel-sel hati. Bahan kimia yang dapat mempengaruhi hati disebut hipotoksik. Hati merupakan kelenjar metabolik dalam tubuh yang paling besar. organ ini memiliki berat rata-rata 1500 gram atau 2,5% berat badan pada orang dewasa. Bagian atas hati berbentuk cembung dan terletak di bagian kanan bawah diafragma dan sebagian disebelah kiri bawah. Bagian bawah hati berbentuk cembung dan melindungi pankreas, ginjal kanan, lambung, dan usus. Warnanya dalam keadaan segar merah kecoklatan, warna tersebut terutama disebabkan oleh adanya darah yang amat banyak (Lee, dkk., 1997).

Hati terdiri dari dua lobus utama, yakni lobus kanan dan kiri yang masing-masing terdiri dari dua segmen. Lobus kanan dibagi menjadi segmen anterior dan posterior. Lobus kiri dibagi menjadi segmen medial dan lateral. Segmen median terbagi menjadi dua bagian, satu lobus quadratus dan caudatus. Hati tersusun oleh beberapa tipe sel, yaitu sel hepatosit, duktus biliaris, vaskular, dan sinusoid (Junquiera dan Corneiro, 2007).

Sel hepatosit merupakan 70% dari di hati dan 90% dari berat hati total. Hepatosit lobulus memiliki sebuah vena sentral (vena terminalis) dan traktus portal yang terletak di perifer. Sel-sel duktus biliaris membentuk duktus dalam traktus portal lobulus hepar. Duktus dari lobulus-lobulus yang berdekatan menyatu berjalan menuju hilus hepar, dengan ukuran dan garis tengahnya secara bertahap membesar. Sel vaskular ini menerima darah melalui arteri hepatis dan vena porta. Arteri hepatis dan vena porta masuk ke hepar di porta hepatis lalu bercabang menjadi pembuluh yang lebih halus berjalan sejajar sampai mencapai

vena sentralis. Sinusoid adalah saluran darah yang melebar dan berliku-liku, sinusoid hepar dipisahkan dari hepatosit di bawahnya oleh spatium perisinusoideum (disse) sub endotelial. Akibatnya, zat makanan yang mengalir di dalam sinusoid memiliki akses langsung melalui dinding endotelial yang tidak utuh dengan hepatosit. Struktur dan jalur sinusoid yang berliku di hepar memungkinkan pertukaran zat yang efisien antara hepatosit dan darah. Selain endotel, sinusoid hepar juga mengandung makrofag, yang disebut sel kuppffer (*macrophagocytus stellatus*), terletak di sepanjang sinusoid. Kandung empedu adalah organ kecil berongga yang melekat pada permukaan bawah hepar. Empedu diproduksi oleh hepatosit dan mengalir melalui kanalikuli dan disimpan di dalam kandung empedu (Junquiera dan Corneiro, 2007).

Kerusakan pada hati dapat terjadi oleh beberapa faktor yaitu onset pemaparan yang terlalu lama, durasi pemaparan, dosis dan sel inang yang rentan. Kerusakan yang terjadi pada sel hati dapat bersifat sementara (*reversible*) dan tetap (*irreversible*). Sel akan mengalami perubahan untuk beradaptasi mempertahankan hidupnya, perubahan ini biasa disebut degenerasi. Degenerasi sel dapat berupa degenerasi hidropik dan degenerasi lemak. Degenerasi terjadi karena adanya gangguan biokimiawi yang disebabkan oleh iskemia, anemia, metabolisme abnormal dan zat kimia yang bersifat toksik (Price dan Wilson, 2006).

Degenerasi hidropik merupakan peristiwa meningkatnya kadar air di intraseluler yang menyebabkan sitoplasma dan organel-organel membengkak dan membentuk vakuola-vakuola. Rusaknya permeabilitas membran sel menyebabkan Lobulus hepatic. Degenerasi hidropik merupakan respon awal sel terhadap bahan-bahan yang bersifat toksik, serta merupakan proses awal dari kematian sel (Cheville, 1999).

Kerusakan sel secara terus-menerus akan mencapai suatu titik sehingga terjadi kematian sel. Paparan zat

toksik pada sel apabila cukup hebat atau berlangsung cukup lama, maka sel tidak dapat lagi mengkompensasi dan tidak dapat melanjutkan metabolisme. Inti sel yang mati dapat terlihat lebih kecil dan menjadi lebih padat (piknosis), hancur bersegmen-segmen (karioreksis) dan kemudian inti sel menghilang (kariolisis) (Underwood, 1994; Lu, 1995; Priyanto, 2009).

Pengamatan fungsi hati adalah dengan mengamati aktivitas enzim ALT dan AST. Tes fungsi hati yang umum untuk mengetahui adanya gangguan dalam organ hati adalah dengan mengukur serum aminotransferase yaitu ALT (*Alanine Aminotransferase*) atau SGPT (*Serum Glutamic Pyruvic Transaminase*) ALT merupakan enzim aminotransferase yang dibuat dalam sel hati (hepatosit), jadi lebih spesifik untuk penyakit hati dibandingkan dengan enzim lain. ALT sering dijumpai dalam hati, sedangkan AST terdapat lebih banyak di jantung, otot rangka, otak dan ginjal dibandingkan di hati (Sacher dan Richard, 2004).

Kadar ALT dalam serum meningkat terutama pada kerusakan dalam hati dibandingkan dengan AST. Hepatosit apabila mengalami cedera enzim yang secara normal tersebut berada di dalam sel yaitu sitoplasma akan masuk ke dalam aliran darah. Kerusakan pada sel hati yang sedang berlangsung dapat diketahui dengan mengukur parameter fungsi hati berupa zat dalam peredaran darah yang dibentuk oleh sel hati yang rusak atau mengalami nekrosis. Pemeriksaan enzim seringkali menjadi satu-satunya petunjuk adanya penyakit hati yang dini atau setempat ALT darah mencit normal adalah 17-77 IU/L (Widman, 1995; Murtini, et al., 2010).

AST (*Aspartat Aminotransferase*) atau juga dinamakan SGOT (*Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase*) merupakan enzim yang dijumpai dalam otot jantung dan hati, sementara dalam konsentrasi sedang dijumpai pada otot rangka, ginjal dan pankreas.

Konsentrasi rendah dijumpai dalam darah, kecuali jika terjadi cedera seluler, kemudian dalam jumlah banyak dilepaskan ke dalam sirkulasi. Pada penyakit hati, kadarnya akan meningkat 10 kali lebih dan akan tetap demikian dalam waktu yang lama. Saat terjadi kerusakan hati akut, jumlah enzim transaminase alanin (ALT) dan transaminase aspartat (AST) meningkat dalam darah. Penderita nekrosis hati (kematian sel) seperti yang diderita oleh pecandu alkohol dan penderita infeksi virus hepatitis juga menunjukkan kenaikan konsentrasi AST dalam darah. Hal ini dikarenakan AST yang berada di dalam mitokondria dilepaskan sel yang mati ke peredaran darah dalam jumlah yang banyak sehingga bisa dijadikan parameter untuk mendeteksi kerusakan sel hati (Wibowo, et al., 2005).

AST dapat diukur di laboratorium menggunakan metode fotometrik ataupun kolorimetrik. Kerusakan pada sel hati yang sedang berlangsung dapat diketahui dengan mengukur parameter fungsi hati salah satunya zat dalam peredaran darah yang dibentuk oleh sel hati yang rusak atau mengalami nekrosis yaitu enzim AST dan lain lain. Karena itu peningkatan kadar enzim ini pada serum dapat dijadikan indikasi terjadinya kerusakan jaringan yang akut. Ketika terjadi kerusakan pada hati, maka sel-sel hepatositnya lebih permeabel sehingga enzim bocor ke dalam pembuluh darah menyebabkan kadarnya meningkat pada serum. AST darah mencit normal adalah 54-298 IU/L (Murtini, et al., 2010).

Berdasarkan **Tabel 5.10** dan **Gambar 5.2 (B)** dan **Gambar 5.2 (C)** terlihat gambar histologi organ ginjal kelompok GFL 1000 dan 2000 mg/kg bb masih dalam keadaan normal. Kelompok perlakuan GFL 5000 mg/kg bb pada **Gambar 5.2 (D)** terlihat hipertropi glomerulus, penyempitan kapsul bowman, dan terjadi dilatasi tubulus.

B. Toksisitas subkronik

Uji toksisitas subkronik dilakukan dengan memberikan bahan berulang-ulang, biasanya setiap hari atau lima hari seminggu, selama jangka waktu 10% dari masa hidup hewan. Uji toksisitas subkronis meneliti toksisitas yang disebabkan oleh dosis berulang dalam jangka waktu tertentu (Hodgson dan Levi, 2000).

Tujuan utama uji subkronik adalah untuk mencapai NOAEL (no-observed-adverse effect level) dan untuk mengidentifikasi lebih lanjut ciri organ tertentu atau organ yang terpapar senyawa uji setelah pemberian secara berulang. Studi subkronik dapat dilakukan pada dua spesies (biasanya tikus dan anjing untuk FDA; dan mencit untuk EPA) dengan rute pemberian yang lazim yaitu oral. Setidaknya ada tiga dosis yang diberikan (dosis tinggi yang menghasilkan toksisitas tetapi tidak menyebabkan lebih dari 10% korban jiwa, dosis rendah yang tidak menghasilkan efek beracun jelas, dan dosis intermediate) dengan 10 sampai 20 tikus dan 4 sampai 6 anjing dari masing-masing jenis kelamin per dosis (Casarett, 2008).

Prinsip dari uji toksisitas subkronik oral adalah sediaan uji dalam beberapa tingkat dosis diberikan setiap hari pada beberapa kelompok hewan uji dengan satu dosis per kelompok selama 28 atau 90 hari, bila diperlukan ditambahkan kelompok satelit untuk melihat adanya efek tertunda atau efek yang bersifat reversibel. Selama waktu pemberian sediaan uji, hewan harus diamati setiap hari untuk menentukan adanya toksisitas. Hewan yang mati selama periode pemberian sediaan uji, bila belum melewati periode rigor mortis (kaku) segera diotopsi, dan organ serta jaringan diamati secara makropatologi dan histopatologi. Pada akhir periode pemberian sediaan uji, semua hewan yang masih hidup diotopsi selanjutnya dilakukan pengamatan secara makropatologi pada setiap organ dan jaringan, pemeriksaan hematologi, biokimia klinis dan histopatologi (Ditjen, POM., 2014).

a. Pengamatan Berat Badan

Berat badan merupakan salah satu parameter yang perlu diamati pada uji toksisitas subkronik. Menurut BPOM (2014), pengamatan berat badan dilakukan setiap minggu selama 28 hari sampai 90 hari. Persentase perubahan berat badan perminggu mencit setelah diberikan sediaan GFL 1:1 dengan dosis 250, 500, dan 1000 mg/kg bb setiap hari selama 28 hari dapat dilihat pada **Tabel 5.11**

Berdasarkan **Tabel 5.11** terlihat bahwa terdapat perubahan berat badan mencit perminggu antara kontrol (akuades 1% bb) dan gum biji lamtoro yang telah diikatsilang dengan trinitrium trimetaphosfat dengan perbandingan GFL 1:1 pada uji toksisitas subkronik (28 hari). Hal ini menunjukkan bahwa sediaan berpengaruh terhadap berat badan mencit namun tidak mencapai 10%. Menurut OECD, 2008 dikatakan toksik apabila terjadi perubahan berat badan sampai 10%.

Tabel 5.11. Persentase Perubahan Berat Badan Perminggu

Perlakuan Toksisitas Subkronik (28 hari)	Persentase Perubahan Berat Badan Perminggu (%)				
	$X_1 - X_0$	$X_2 - X_1$	$X_3 - X_2$	$X_4 - X_3$	$X_4 - X_1$
Kontrol	(+) 1,13	(+) 1,15	(+) 1,16	(+) 1,21	(+) 4,73
Gum Fosfat Biji Lamtoro (GFL)					
250 mg/Kg bb	(+) 1,15	(+) 1,27	(+) 1,26	(+) 1,22	(+) 5,00
500 mg/Kg bb	(+) 1,21	(+) 1,37	(+) 1,39*	(+) 1,43*	(+) 5,51*
1000 mg/Kg bb	(+) 1,24*	(+) 1,35*	(+) 1,47*	(+) 1,40*	(+) 5,56*

Keterangan :

* = Perbedaan signifikan terhadap kelompok kontrol ($p < 0,05$)

(-) = Terjadi penurunan berat badan

(+) = Terjadi kenaikan berat badan

Analisis data statistik perubahan berat badan mencit setelah pemberian dosis GFL 250, 500 dan 1000 mg/kgbb selama 28 hari menggunakan SPSS 16.0 dengan tingkat kepercayaan 95%. Uji normalitas menunjukkan nilai signifikansi dengan $\alpha > 0,05$ hal ini menunjukkan bahwa sebaran data normal. Uji homogenitas juga menunjukkan nilai signifikansi $\alpha > 0,05$ sehingga selanjutnya dapat menggunakan uji *one way analysis of variance* (ANOVA), dilanjutkan dengan uji *post hoc Multiple Comparisons Tukey HSD*.

g. Pengamatan kematian

Hasil pengamatan kematian hewan pada uji toksisitas subkronik selama waktu pemberian sediaan uji (28 hari) dimana tidak ada satu mencit pun yang mati setelah pemberian sediaan uji. Menurut BPOM (2014), bila pada dosis 1000 mg/kg berat badan tidak dihasilkan efek toksik, dosis tidak perlu dinaikkan lagi, meskipun dosis yang diharapkan untuk manusia belum tercapai.

h. Pengamatan berat organ relatif

Hasil berat organ yang didata pada akhir perlakuan ditunjukkan pada **Tabel 5.12**

Tabel 5.12. Rata-rata Berat Organ pada Uji Toksisitas Subkronik (28 hari)

Kelompok	Dosis Uji Toksisitas Subkronik	Rata-rata berat organ (g)	
		Hati	Ginjal
Kontrol	Akuades 1% bb	1,69	0,18
Gum Fosfat biji Lamtoro (GFL)	250 mg/kgbb	1,85	0,20
	500 mg/kgbb	1,70	0,19
	1000 mg/kgbb	1,75	0,18

Analisis data statistik perbedaan berat organ hati dan ginjal setelah pemberian dosis GFL 250, 500 dan 1000

mg/kgbb menggunakan SPSS 16.0 dengan tingkat kepercayaan 95%. Uji normalitas menunjukkan nilai signifikansi dengan $\alpha > 0,05$ hal ini menunjukkan bahwa sebaran data normal. Hasil SPSS analisis berat organ hati dan ginjal kelompok perlakuan GFL 1:1 dengan dosis 250, 500, dan 1000 mg/kg bb dapat dilihat pada **Tabel 5.13**.

Tabel 5.13. Analisis SPSS Organ Hati dan Ginjal pada Pemberian GFL 1:1

Tukey HSD

Parameter	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Ginjal-1000	6	.1683	
Ginjal-Kontrol	6	.1817	
Ginjal-250	6	.1850	
Ginjal-500	6	.1950	
Hati-Kontrol	6		1.6867
Hati-500	6		1.6950
Hati-1000	6		1.7450
Hati-500	6		1.8517
Sig.		1.000	.860

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uji homogenitas juga menunjukkan nilai signifikansi $\alpha > 0,05$ sehingga selanjutnya dapat menggunakan uji *one way analysis of variance* (ANOVA), dilanjutkan dengan uji *post hoc Multiple Comparisons Tukey HSD* untuk melihat signifikansi perbedaan berat organ hati dan ginjal setelah pemberian sediaan. Berdasarkan hasil uji *post hoc Multiple Comparisons Tukey HSD* dosis 250, 500, 1000 mg/kg bb dan

kelompok kontrol (akuades 1%) masih berada pada kolom yang sama sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak ada pengaruh sediaan yang diberikan terhadap berat organ hati dan ginjal mencit.

i. Analisis AST dan ALT pada Uji Toksisitas Subkronik

Analisis AST dan ALT setelah pemberian gum biji lamtoro yang telah diikatsilang dengan TNTMP dengan perbandingan GFL 1:1 dapat dilihat pada **Tabel 5.14** dan analisis SPSS. Analisis data statistik perbedaan nilai AST dan ALT setelah pemberian dosis GFL 250, 500 dan 1000 mg/kgbb menggunakan SPSS 16.0 dengan tingkat kepercayaan 95%. Uji normalitas menunjukkan nilai signifikansi dengan $\alpha > 0,05$ hal ini menunjukkan bahwa sebaran data normal. Uji homogenitas juga menunjukkan nilai signifikansi $\alpha > 0,05$ sehingga selanjutnya dapat menggunakan uji *one way analysis of variance (ANOVA)*, dilanjutkan dengan uji *post hoc Multiple Comparisons Tukey HSD* untuk melihat signifikansi perbedaan nilai AST dan ALT setelah pemberian sediaan. Hasil uji *post hoc Multiple Comparisons Tukey HSD* menunjukkan tidak ada pengaruh sediaan yang diberikan terhadap nilai AST dan ALT. Hasil analisis SPSS 16,0 terhadap nilai AST dan ALT mencit dapat dilihat pada **Tabel 5.14**.

Tabel 5.14. Data Hasil Analisis AST dan ALT pada Uji Toksisitas Subkronik

Kelompok	Dosis Uji Toksisitas Subkronik	Rata-rata nilai (U/l)	
		AST	ALT
Kontrol	Akuades 1% bb	145,47	80,85
Gum Fosfat biji Lamtoro (GFL)	250 mg/kgbb	142,28	80,22
	500 mg/kgbb	156,32	87,32
	1000 mg/kgbb	163,22	91,83

Tabel 5.15. Analisis SPSS terhadap AST dan ALT pada Pemberian GFL 1:1

Tukey HSD

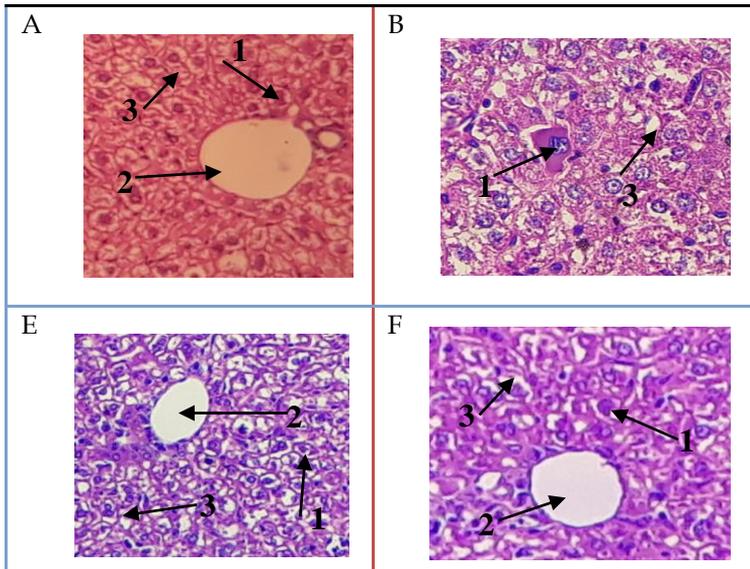
Parameter	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
ALT-250	6	80.2167	
ALT-Kontrol	6	80.8500	
ALT-500	6	87.3167	
ALT-1000	6	91.8333	
AST-250	6		142.2833
AST-Kontrol	6		145.4667
AST-500	6		156.3167
AST-1000	6		163.2167
Sig.		.985	.743

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

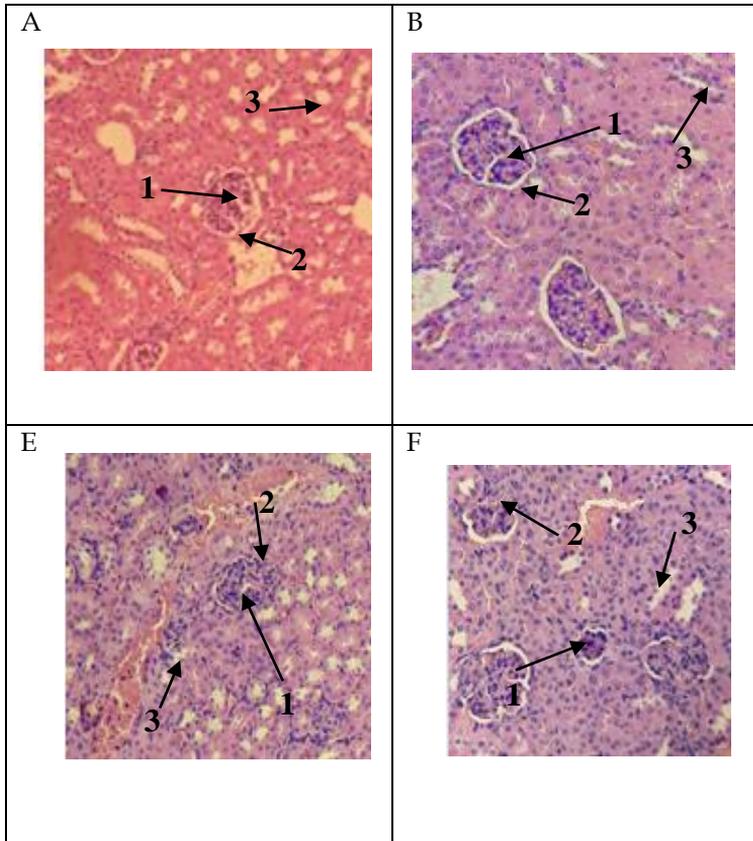
Kerusakan sel hati atau jaringan hati diukur dengan nilai enzim SGPT (*Serum Glutamic Pyruvic Transaminase*) / ALT (*Alanine Aminotransferase*) dan SGOT (*Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase*) / AST (*Aspartat Aminotransaminase*). Ketika sel hati mengalami kerusakan, enzim hati tersebut berada dalam darah, sehingga dapat diukur peningkatan aktivitasnya. Hal ini disebabkan karena kerusakan pada struktur dan fungsi membran sel hati, Apabila kerusakan yang timbul oleh radang hati hanya kecil, aktivitas ALT lebih dini dan lebih cepat meningkat dari kadar AST (Widmann, 1995).

j. Gambaran Histopatologi Organ Mencit pada Uji Toksisitas Subkronik

Analisis histopatologi organ hati dan ginjal setelah pemberian GFL 1:1 dengan dosis 250, 500, dan 1000 mg/kg bb selama 28 hari dapat dilihat pada **Gambar 5.3** dan **Gambar 5.4**



Gambar 5.3. Histopatologi Toksisitas Subkronik Hati Mencit pada Pemberian (A) Akuades 1% bb (kontrol), (B) GFL 250 mg/kg bb, (C) GFL 500 mg/kg bb, (D) GFL 1000 mg/kg bb, selama 28 hari. Keterangan : 1. Sel hepatosit, 2. Vena sentralis, 3. Sinusoid



Gambar 5.4. Histopatologi Toksisitas Subkronik Ginjal Mencit pada Pemberian (A) Akuades 1% bb (kontrol), (B) GFL 250 mg/kg bb, (C) GFL 500 mg/kg bb, (D) GFL 1000 mg/kg bb, selama 28 hari. Keterangan : 1. Glomerulus, 2. Kapsul Bowman, 3. Tubulus

Histopatologi pada organ hati dan ginjal mencit yang terpapar GFL 1:1 dengan dosis 250, 500 dan 1000 mg/kg bb dianalisis di Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran USU dengan menggunakan pewarna hematoksilin dan eosin dapat dilihat pada **Tabel 5.16** dan **Tabel 5.17**

Tabel 5.16. Analisis Histopatologi Organ Hati Mencit

Kelompok	Dosis Toksisitas Subkronik	Hepatosit	Vena centralis	Sinusoid
Kontrol	Akuades 1% bb	Normal	Normal	Normal
GFL 1:1	250 mg/kgbb	Normal	Kongesti	Dilatasi
	500 mg/kgbb	Normal	Normal	Dilatasi
	1000 mg/kgbb	Karioeksis	Dilatasi	Dilatasi

Tabel 5.17. Analisis Histopatologi Organ Ginjal Mencit

Kelompok	Dosis Toksisitas Subkronik	Glomerulus	Kapsul Bowman	Tubulus
Kontrol	Akuades 1% bb	Normal	Normal	Normal
GFL 1:1	250 mg/kgbb	Normal	Normal	Normal
	500 mg/kgbb	Normal	Menyempit	Normal
	1000 mg/kgbb	Normal	Menyempit	Normal

Berdasarkan **Tabel 5.16** dan **Gambar 5.3 (B)** terlihat gambar histologi organ hati kelompok GFL 250 mg/kg bb sudah mengalami perubahan dimana terjadi kongesti vena centralis dan dilatasi sinusoid. Kelompok perlakuan GFL 500 mg/kg bb pada **Gambar 5.3 (C)** terlihat bahwa hati mulai mengalami perubahan yang ditandai dilatasi sinusoid. Kelompok perlakuan GFL 1000 mg/kg bb pada **Gambar 5.3 (D)** terlihat bahwa sel hepatosit mengalami karioeksis, dan terjadi dilatasi sinusoid.

Menurut Setiawan (2013), sel hepatosit yang mengalami nekrosis meliputi inti sel piknotik (pengerutan inti sel), karioeksis (inti sel pecah) dan kariolisis (inti sel menghilang). Vena centralis akan mengalami melebar jika terjadi kerusakan karena sel-sel endotel akan lisis. Konsentrasi suatu senyawa yang tinggi dalam darah akan terjadi penyaluran darah dengan perfusi kuat disalurkan pada sinusoid, sehingga sinusoid melebar.

Berdasarkan **Tabel 5.17** dan **Gambar 5.4 (B)** dan **Gambar 5.4 (C)** terlihat gambar histologi organ ginjal kelompok GFL 1000 dan 2000 mg/kg bb masih dalam keadaan normal. Kelompok perlakuan GFL 5000 mg/kg bb pada **Gambar 5.4 (D)** terlihat hipertropi glomerulus, penyempitan kapsul bowman, dan terjadi dilatasi tubulus.

Ginjal terletak dibagian belakang abdomen atas, di belakang peritoneum dan di depan dua iga terakhir. Ginjal dipertahankan dalam posisi tersebut oleh bantalan lemak yang tebal. Kelenjar adrenal terletak diatas kutub masing-masing ginjal. Ginjal terlindung dengan baik dari trauma langsung di sebelah posterior dilindungi oleh kosta dan otot-otot yang meliputi kosta, sedangkan di anterior dilindungi oleh bantalan usus yang tebal, sedikit lebih rendah dari pada ginjal kiri karena besarnya lobus hepatis dekstra. Secara anatomis ginjal terbagi menjadi 2 bagian, yaitu korteks dan medula ginjal. Di dalam korteks terdapat berjuta-juta nefron sedangkan di dalam medula banyak terdapat duktuli ginjal. Nefron adalah unit fungsional terkecil dari ginjal yang terdiri atas tubulus kontortus proksimal, tubulus kontortus distal dan tubulus koligentes (Junquiera dan Corneiro, 2007).

Ginjal adalah organ utama untuk membuang produk sisa metabolisme yang tidak diperlukan lagi oleh tubuh. Produk-produk ini meliputi urea (dari sisa metabolisme asam amino), kreatin asam urat (dari asam nukleat) dan bilirubin (produk akhir dari pemecahan hemoglobin). Pada keadaan normal glomerulus tidak dapat dilalui oleh protein yang bermolekul besar, tetapi pada keadaan patologis protein tersebut dapat lolos. Sel tubulus selain berfungsi mereabsorpsi, juga menambahkan zat-zat kimiawi seperti yodium, amonia dan hippuric acid. Pada disfungsi glomerulus, bahan-bahan asing tiba di tubulus dalam kadar yang abnormal melalui ruang Bowman. Hal ini menyebabkan sel epitel

tubulus mengalami degenerasi bahkan kematian jika terlalu banyak bahan-bahan yang harus diserap kembali (Purnomo, 2009).

Tubulus proksimal memiliki fungsi utama yaitu menyerap kembali natrium, albumin, glukosa, air dan juga bermanfaat dalam penggunaan kembali bikarbonat. Epitelium tubulus proksimalis merupakan bagian yang paling sering terserang iskemia atau rusak akibat toksin, karena kerusakan yang terjadi akibat laju metabolisme yang tinggi. Nefrosis merupakan istilah morfologik untuk kelainan ginjal degeneratif terutama yang mengenai tubulus. Kelainan tubulus dapat menyebabkan albuminuria dan sedimen abnormal di urin. Secara mikroskopis kelainan dijumpai pada tubulus kontortus proksimal berupa degenerasi hidropis, degenerasi lemak, nekrosis dan kalsifikasi (Purnomo, 2009).

C. Toksisitas kronik

Uji toksisitas kronis menentukan toksisitas dari keberadaan bahan yang sebagian besar terdapat dalam kehidupan. Hal ini mirip dengan tes subkronis tetapi memerlukan waktu yang lebih lama dan melibatkan kelompok yang lebih besar dari hewan (Gupta, et al., 2012). Pada tikus, paparan kronik biasanya 6 bulan sampai 2 tahun. Untuk hewan selain tikus biasanya selama satu tahun tetapi mungkin lebih lama (Casarett, 2008).

Tujuan uji toksisitas kronik adalah menentukan sifat toksisitas zat kimia. Protokol yang biasa digunakan pada pengujian subkronik dan kronik melibatkan kelompok hewan mengandung jumlah yang sama dari kedua jenis kelamin (jantan dan betina) menerima setidaknya tiga tingkat dosis obat dan satu kelompok kontrol. Hewan-hewan ini diobservasi setiap hari terhadap tanda-tanda klinis toksisitas. Berat badan dan konsumsi makanan diukur secara berkala. Ada tiga parameter, yaitu tanda-tanda klinis, berat badan, dan

konsumsi makanan. Profil kimia hematologi dan serum lengkap diukur setidaknya pada akhir pengujian (Gupta, et al., 2012).

DAFTAR PUSTAKA

- Anggraini, D.R. (2008). Gambaran Makroskopik dan Mikroskopik Hati dan Ginjal Mencit Akibat Pemberian Plumbum Asetat. *Tesis*. Medan: Sekolah Pascasarjana Universitas Sumatera Utara. Hal. 52.
- Anief, M. (1986). *Ilmu Farmasi*. Jakarta: Ghalia Indonesia. Hal. 17,82.
- Ansel, H.C. (1989). *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*. diterjemahkan oleh Farida Ibrahim, Asmanizar, Iis Aisyah. Edisi keempat. Jakarta. UI Press. Hal:255-271.
- Astuti, R.D. dan Sugiarto, D.K.S. (2015). Penentuan Kadar Mineral Seng (Zn) dan Fosfor (P) dalam Nugget Ikan Gabus (*Channa Striata*) - Rumput Laut Merah (*Eucheuma Spinosum*) *Jurnal Sains Dan Seni ITS*. 4(2):2337-3520
- Be douet, L., Courtois, B. dan Courtois, J. (2005). Methods for obtaining neutral and acid oligosaccharides from flax pectins. *Biotechnology Letters*. 27: 33-40
- Bhatia, H., Gupta, P.K., dan Soni, P.L. (2013). Extraction, Purification And Characterization Of A Galactomannan From *Prosopis juliflora* (Sw.) Dc. Seed Polysaccharides. *International Journal of Science, Environment and Technology* 2013, 2(4):708 - 724.
- Bravo, S. A., Lamas, M. C., & Salomon, C. J. (2004). Swellable matrices for the controlled release of diclofenac sodium: Formulation and in vitro studies. *Pharmaceutical Development and Technology*. 9(1):75-83.
- Buletin INFARKES (Informasi Kefarmasian dan Alat Kesehatan), Edisi II, Maret - April 2016.

- Casarett, L.J., dan Doull, J. (2008). *Toxicology the Basic Science of Poisons*. Editor: Curtis D. Klaassen. Edisi Ketujuh. New York: McGraw-Hill Companies, Inc. Halaman 28, 31, 32.
- Cerqueira, M.A., Bourbon, A.I., Pinheiro, A.C., Martins, J.T., Souza, B.W.S., Teixeira, A.J., and Vicente, A.A.(2011).Galactomannans Use in The Development of The Edible Films/ Coatings for Food Applications.*Food Science and Technology*. 22:662-671.
- Cerqueira, M.A., Pinheiro, A.C., Souza, B.W.S., Lima, A.M.P., Ribeiro, C., Miranda, C., Teixeira, J.A., Moreira, R.A., Coimbra, M.A., Goncalves, M.P., Vicente, A.A. (2009)Extraction, Purification and Characterization of Galactomannans from Non-Traditional Sources. *Carbohydrate Polymers*. 75(3):408-414
- Chawla, G., Gupta, P., Koradadia,V., Bansal, A. K. (2003). Gastroretention: A Means to Address Regional Variability in Intestinal Drug Absorption. *Journal Pharmaceutical Technology*.10:50-60
- Cheville, N.F. (1999). *Introduction to Veterinary Pathology*. Edisi Kedua. Iowa: Iowa State University Press. Hal. 214.
- Copicova, J., Synytsya, A., Cerna, M., Kaasova, J., Novotna, M. (2001). Application of FT-IR Spectroscopy in Detection of Food Hydrocolloids in Confectionery Jellies and Food Supplements. *Czech J. Food Sci.*, 19: 51-56
- Dalimartha, S. (2000). *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia*. Bogor: Trubus Agriwidya.
- Deetae, P., Shobsngob, S., Varanyanond, W., Chinachoti, P.,Naivikul, O., Varavinit, S., Preparation, pasting properties and freeze-thaw stabilityof dual modified crosslink-

phosphorylated rice starch. *Carbohydrate Polymers*. 73 (2008) 351-358.

Ditjen POM Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995a). *Farmakope Indonesia*. Edisi IV. Departemen Kesehatan RI. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Hal:31-32.

Ditjen POM Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995b). *Materia Medika Indonesia*. Jilid ke VI. Jakarta: Ditjen POM. Hal.297-307.

Ditjen POM. (2014). Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat Dan Makanan Republik Indonesia Nomor 7 Tahun 2014 Tentang Pedoman Uji Toksisitas Nonklinis Secara *In Vivo*. Jakarta: Badan Pengawasan Obat dan Makanan RI. Hal. 3-4, 9,11-12,28-32.

Environmental Protection Agency (EPA). 1978. Method 365.3: Phosphorous, All Forms (Colorimetric, Ascorbic Acid, Two Reagent). United States

Fessenden, R.J. and J.S. Fessenden. 1986. *Kimia Organik Dasar Edisi Ketiga*. Jilid 1. Terjemahan oleh A.H. Pudjaatmaka. Erlangga. Jakarta.

Furniss, B.S., Hannaford, A.J., Smith, P.W.G., dan Tatchell, A.R. (1989). *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*. Edisi Kelima. New York : John Willey and Sons Incoorporation. Hal:361-393.

Gandjar, I. G. dan Rohman, A., 2007, *Kimia Farmasi Analisis*, 323-346, Pustaka Pelajar, Yogyakarta.

Gontard, N., Guilbert, S., dan Cuq, J.L. (1993). Water and glycerol as plasticizers effect mechanical and water vapor barrier

properties of an edible wheat gluten film. *Journal Food Science*, 58(1):206-211.

Goswami, S., dan Naik, S. (2014). Natural gums and its pharmaceutical application. *Journal of Scientific and Innovative Research 2014*. 3(1):112-121.

Gowda, D.V., Khan, M.S and Vineela, S. (2012). Development and evaluation cross-linked guar gum microspheres for improved delivery of anticancer to colon. *Taylor & Francis group*. 51:1395-1404.

Goyal, P., Kumar, V., & Sharma, P. (2007). Carboxymethylation of tamarind kernelpowder. *Carbohydrate Polymers*, 69:251-255.

Gupta, D., dan Bhardwaj, S. (2012). Study of Acute, Subacute and Chronic Toxicity Test. *International Journal of Advanced Research in Pharmaceutical and Bio Sciences (IJARPB)*. 1(2): 103-129.

Hodgson, E., dan Levi, P.E. (2000). *A Textbook of Modern Toxicology*. Edisi Kedua. New York: McGraw-Hill Companies, Inc. Halaman 292, 298, 301, 302.

Jeevanandham S, Sekar, M., Dhachinamoorthi, D., Muthukumaran, M., Sriram, N., Joysaruby, J.. (2010). Sustain-Release of Various Drugs from *Leucaena leucocephala* Polysaccharide. *J Young Pharm*. 2010, 2(1): 15-20

Jie, G.M, Wang P, Meng, Z.X, Zhang, X, Zheng, T. (2006). Cross-linking of Corn Starch with Sodium Trimetaphosphate in Solid State by Microwave Irradiation. *J Appl Polym Sci*. 102(6): 5854-5860.

Junqueira, L. E., Carneiro, J., Kelley, R. (2005). *Basic Histology*. Edisi II. Boston: Mc Graw-Hill. Hal. 318-330.

- Kabir, G.I., K., Yagen B., Penhasi A. and Rubinstein A. (2000). Phosphated Crosslinked Guar for Colon-Specific Drug Delivery, 1. Preparation and Physicochemical Characterization. *Journal Controlled Release*. 63:121- 127.
- Kabir, G.I., Yagen B., Penhasi A. and Rubinstein A.(1998), Low Swelling, Crosslinked Guar and Its Potential Use as Colon-Specific Drug Carrier.*Pharmaceutical Research*. 15(7):1019-1025.
- Khan, G. M., & Jiabi, Z. (1998). Formulation and in vitro evaluation of ibuprofencarbopol 974P-NF controlled release matrix tablets III: Influence of coexcipients on release rate of the drug. *Journal of Controlled Release*, 54(2):185–190.
- Kok, M.S., Hill, S.E., and Mitchell, J.R. (1999). Viscosity of Galactomannan During High Temperature Processing, Influence of Degradation and Solubilisation. *Food Hydrocoloids*. 13: 535-542.
- Kooiman, P. (1971) Structures of The Galactomannan Seed of *Annona muricata*, *Arenga saccharifera*, *Cocos nucifera*, *Convolvulus tricolor*, and *Sophora japonica*. *Carbohyd. Res.* 20:329 – 337
- Kumar, A., Singh, K., dan Ahuja, M. (2009). Xanthan-g-poly(acrylamide): Microwave-assisted synthesis, characterization and in vitro release behavior. *Carbohydrate Polymer*.76:261–267.
- Lachman, L., Lieberman H. A., Kanig, J. L., (1994). Teori dan Praktek Farmasi Industri, diterjemahkan oleh Siti Suyatmi. Edisi III, Jakarta:UI Press. Hal: 1040, 1092-1094.

- Lee, D.C., dan Webb, M.L. (2003). *Pharmaceutical Analysis*. Oxford : Blackwell Publishing Company. Hal:105-124 dan 203-205.
- Lee, S.S.T., Butter, J.T.M., Pinaeu, T., Fernandez, S.P., dan Gonzalez, F.J. (1997). Role of CYP2E1 in the hepatotoxicity of acetaminophen. *Journal Biology Chemical*. 27(1). Hal. 12063-12067.
- Lepur, A. (2012). *Functional Properties of Galectin-3*. Hal:1-70.
- Lieberman, H. A., Lachman, L., dan Schwarzl, J.B. (1990). *Pharmaceutical Dosage Forms, Tablets, 2nd Ed., Vol. 2*, Marcel Dekker, Inc., New York, USA.
- Lu, Frank. 1994. *Toksikologi Dasar : Asas, Organ Sasaran, dan Penilaian Risiko*. Edisi Kedua. Jakarta: UI - Press.
- Mao Gui-Jie, Peng, W., Xing, Z., Tong, Z. (2006). Crosslinking of Corn Starch with Sodium Trimetaphosphate in Solid State by Microwave Irradiation. *Journal of Applied Polymer Science*. 102:5854-5860.
- Marcon, M.V., Carneiro, P.I.B., Wosiacki, G., Beleski-Carneiro, E., 2005. Pectins from Apple Pomace - Characterization by ^{13}C and ^1H NMR Spectroscopy. *Ann. Magn. Reson*. 4(3):56-63.
- Mathur, N. K.(2012). *Industrial Galactomannan Polysaccharide*. CRC Press. Boca Raton, Florida.
- Mathur, V., dan Mathur, N.K. (2005). Fenugreek and Other Lesser Known Legume Galactomannan-Polysaccharides: Scope For Developments. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 64: 475-481.
- Mikkonen, K. S., Maija, T., Peter, C., Chunlin, X., Hannu, R., Stefan, W., Bjarne, H., Kevin, B. H., and Madhav, P. Y. (2009).

Mannan As Stabilizers of Oil-In-Water Beverage Emulsions. *LWT-Food Science and Technology*. 42: 849-855

Mirhosseini, H. dan Amid, B.T.(2012a).A review Study on Chemical Composition and Molecular Structure of Newly Plant GumExudates and Seed Gums. *Food Research International* (2012). 46:387–398.

Mitul, T. P., Jitendra, K. P., & Umesh, M. U. (2012). Assessment of various pharmaceutical excipients properties of natural Moringa oleifera gum. *International Journal of Pharmacy and Life Sciences*. 3(7):1833–1847.

Moffat A.C., Osselton M.D., Widdop B. (2005), *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, 3rd edition, Pharmaceutical Press.

Morris, E. R., Rees, D. A., Young, G., Walkinshaw, M. D. & Darker, A. (1977). Order-disorder transition for a bacterial polysaccharide in solution. A role for polysaccharide conformation between Xanthomonas pathogen and its plant host. *J. Mol. Biol.*, 110:1-16.

Mudoi, P., Bharali, P., Konwar, B.K., (2013). Study on the Effect of pH, Temperature and Aeration on the Cellular Growth and Xanthan Production by Xanthomonas campestris Using Waste Residual Molasses. *J.Bioproses Biotechniq*. 3(2):1-6

Murtini, J.T., Triwibowo, R., Indriatri, N., dan Ariyani, F. (2010). Uji Toksisitas Sub Kronik *Spirulina platensis* Secara *In-Vivo*. *Jurnal Pascapaen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. 5(2). Hal. 123-134.

Muschin, S., dan Takashi, Y. (2012). Structural Analysis of Galactomanan by NMR Spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*. 87: 1893-1898.

- Nagendrappa, Mahadevaiah, Kumar, M.S.Y., Galil, M.S.A., Suresha, M.S., and Sathish, M.A. (2007). Simple Spectrophotometric Determination of Phosphate in Sugarcane Juices, Water and Detergent Samples. *E-Journal of Chemistry*. 4(4):467-473.
- Nosya, M.A (2016). *Pembuatan mikrokristal Selulosa dari Tandan Kosong Kelapa Sawit. Skripsi*. Lampung: Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam. Hal. 28.
- OECD. (2001). *Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method*. OECD Guidelines for Testing Chemicals 423(1). Pages 1-6.
- OECD. (2008). *Organization for Economic Cooperation and Development Guidelines for the Testing of Chemicals*. TG 407. Hal. 1-13.
- Padmaningrum, R.T., Aminatun, T., dan Yuliati. (2014). Pengaruh Biomasa Melati Air (*Echinodorus paleaefolius*) dan Teratai (*Nyphaea Firecrest*) terhadap Kadar Fosfat, BOD, COD, TSS, dan Derajat Keasaman Limbah Cair *Laundr. Jurnal Penelitian Saintek* 2014. 19(2):64-74.
- Passauer, L., Liebner, F. and Fischer, K. 2006. Synthesis and Properties of Novel Hydrogel from Cross-linked Starch Phosphates. *Macromolecular Symposia*. 244: 180-193.
- Patel, D.M., Patel, N.M., Pandya, N.N., Jogani, P.D., (2007). Formulation and Optimization of Carbamazepine Floating Tablets. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 69(6)
- Pawar, H.A., dan Lalitha, K.G. (2014). Isolation, Purification and Characterization of Galactomannans as an Excipient from Senna Tora Seeds. *International Journal of Biological Macromolecules*. 65:167-175.

Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor 24 Tahun 2013 Tentang Batas Maksimum Penggunaan Bahan Tambahan Pangan Penstabil.

Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 87 Tahun 2013 Tentang Peta Jalan Pengembangan Bahan Baku Obat

Polnaya, F.J., Haryadi, Marseno, D.W. dan Cahyanto, M.N. Effects of Phosphorylation and Cross-linking on the Pasting Properties and Molecular Structure of Sago Starch. *International Food Research Journal*. 20(4): 1609-1615.

Prajapati, V.P., Jani, G.K., Moradiya, N.G., Randeria, N.P., Nagar, B.J., Naikwadi, N.N., Variya, B.C. (2013). Galactomannan: A versatile biodegradable seed polysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules* (2013). 60:83-92.

Price, S.A., dan Wilson L.M. (2006). *Patofisiologi: Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit*. Edisi VI. Jakarta: ECG. Hal. 867- 875.

Priyanto. (2009). *Toksikologi Mekanisme, Terapi Antidotum, dan Penilaian Resiko*. Jakarta: Lembaga Studi dan Konsultasi Farmakologi Indonesia (LESKONFI). Hal. 1-7.

Purawisastra, S. (2010). Penggunaan Beberapa Jenis Abu Untuk Isolasi Senyawa Galaktomanan Dari Ampas Kelapa. *Jurnal Riset Teknologi Pencegahan Pencemaran Industri*. 1(4):260-264.

Purnomo, B. (2009). *Dasar-dasar Urologi*. Jakarta: Sagung Seto.

Raimon. (1993). Perbandingan Metoda Destruksi Basah dan Kering Secara Spektrofotometri Serapan Atom. *Lokakarya Nasional Jaringan Kerjasama Kimia Analitik Indonesia*. Yogyakarta.

- Rana, V., Rai, P., Tiwary, A.K., Singh, R.S., Kennedy, J.F., dan Charles, (2011), Modified gums: Approaches and Applications in Drug Delivery, *Carbohydrate Polymers*, 83(3): 1031-1047.
- Reid, J. S. G., dan Edwards, M. E. (1995) Food Polysaccharides and Their Application. Editor: Stephen, A. M., New York, M. Dekker Inc., 155- 186, 747 dalam Egorov, A. V., Mestechkin, N. M., and Shcherbukhin, V. D., 2004, Composition and Structure of Galactomannan from The Seed of *Gleditsia Ferox* Desf, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40, 3: 370-375.
- Rishabh, M., Pranati, S., & Kulkarni, G. T. (2011). Applications of mucilages in drug delivery – A review. *Advances in Biological Research*, 5(1):1-7.
- Romengga, J., Irawati, T.J., Djulaika, R., Muntamah, Zakaria, A. (2011). Sintesis Pati Sagu Ikatan Silang Fosfat Berderajat Substitusi Fosfat Tinggi dalam Suasana Asam. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. 12(2):118-124.
- Rowe, R.C. (2006). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Jilid 5. London: Pharmaceutical Press. Page 918.
- Rozana. (2013). Kesesuaian Galaktomanan Sebagai Edible Coating Untuk Buah Tropis. *Makalah Review Jurnal*. Departemen Teknik Mesin dan Biosistem, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor. Hal. 1-4.
- Sacher, R.A., dan Richard, A.M. (2004). *Tinjauan Klinis Hasil Pemeriksaan Laboratorium*. Edisi 11. Jakarta. Kedokteran EGC: Hal. 369.
- Setiawan, A., Wulandari, R., Sagi, M., Istriyati. (2013). Hapatotoksisitas Ochratoxin A Pada Fetus Mencit (*Mus musculus* L.) setelah Pendedahan selama Periode

Organogenesis. Prosiding Semirata FMIPA Universitas Lampung. 79-81

Sigres, D.P., dan Sutrisno, A., (2013), Enzim Mananase dan Aplikasi di Bidang Industri. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 3

Silveira, J. L. M. (2011). *Pharmaceutical Use of Galactomannans*. Quim, Nova, Brasil. 34(2): 292-299.

Silverstein, R.M., 1986. *Penyidikan Spektrometri Senyawa Organik*. Edisi 4. Jakarta: Erlangga. Hal. 96;170;179.

Singh, A. V. and Nath, L. K. 2011. Synthesis and Evaluation of Physicochemical Properties of Cross-linked *Phaseolus aconiticoli* Starch. *Starch*. 63: 655-660.

Srivastava, M., and Kapoor, V. P., (2005). Seed Galactomannans. *An Overview in Chemistry and Biodiversity*. 2 : 295-217.

Standar Nasional Indonesia (SNI). (2011). Cara Uji Kimia - Bagian 5: Penentuan Kadar Logam Berat Timbal (Pb) dan Kadmium (Cd) pada Produk Perikanan. *SNI 2354.5*.

Stefhany, C.A., Sutisna, M., Pharmawati, K. (2013). Tumbuhan Eceng Gondok (*Eichhornia crassipes*) pada Limbah Cair Industri Kecil Pencucian Pakaian (Laundry). *Jurnal Institut Teknologi Nasional*. 1(1):1-11.

Stephen, A.M., Phillips, G.O., and Williams, P.A. (2006). *Food Polysaccharides and Their Applications*, 2nd Edition, *Taylor & Francis Group, LLC*

Stevens. (2007). *Biointegration of Medical Implan Materials: Sains and Design*. Woodhead publishing limited. Page 242-244.

- Stojilovic, N. (2012). Why Can't We See Hydrogen in X-ray Photoelectron Spectroscopy? *Journal Chem. Educ.*89 (10):1331-1332.
- Stuart, B.(2004).*Infrared Spectroscopy : Fundamentals and Applications, Analytical Techniques in The Science.* John Wiley and Sons.Hal:84.
- Subramanian, V., Ganapathy, K dan Dakshinamoorthy, B. (2015). FT-IR, ¹H-NMR and¹³C-NMR Spectroscopy of Alginate Extracted from *Turbinaria Decurrens* (Phaeophyta). *World Journal Of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 4(12):761-771
- Sudarmadji, S. dkk. (1989). *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian.* Yogyakarta: Liberty Hal.96
- Sujatno, A., Salam, R., Bandriyana, Dimiyati, A. (2015). Studi Scanning Electron Microscopy (SEM) untuk Karakterisasi Proses Oksidasi Paduan Zirkonium. *Jurnal Forum Nuklir (JFN).* 9(2):44-50.
- Supratman, U. (2010). *Elusidasi Struktur Senyawa Organik.* Widya Padjadjaran.Bandung. Hal: 83
- Suprayitno. (1995). *Lamtoro Gung dan Manfaatnya.*C.V. Bharata, Jakarta. Hal:12
- Suptijah, P., Suseno, S.H., Kurniawati. (2012). Application of Carrageenan as Hard Capsule for Gelatin Capsule Substitute. *JPHPI 2012.* 15(3):223-231.
- Surini, S., dan Auliyya, A., (2017). Formulation Of An Anti-Wrinkle Hydrogel Face Mask Containing Ethanol Extract Of Noni Fruit (*Morinda Citrifolia* L) For Use As A Nutracosmeceutical Product. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research.* Special Issued:74-76

- Susanti, N.N., Sukmawardani, Y., Musfiroh, I. (2016). Analisis Kalium dan Kalsium pada Ikan Kembung dan Ikan Gabus. *IJPST*. 3(1):26-30.
- Sutjiatmo, A.B., Sukandar, E.Y., Candra, Vikasari, S.N. (2015). Uji Toksisitas Akut Ekstrak Air Herba Pecut Kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* (L) VAHL) Pada Mencit Swiss Webster. *Kartika-Jurnal Ilmiah Farmasi*. 3(2), 32-37
- Syamsuni, H. A., (2006). Ilmu Resep. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta. Hal 166-171
- Tafsin, M. (2007). *Kajian Polisakarida Mannan dari Bungkil Inti Sawit sebagai Pengendali Salmonella thypimurium dan Immunostimulan pada Ayam*. Disertasi. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor
- Tamaki, Y., Teruya, T., dan Tako, M. (2010). The Chemical Structure of Galactomannan Isolated from SeEDX of *Delonix regia*. *Journal Bioscience, Biotechnology, Biochemistry* 2010. 74 (5):1110-1112.
- Tarigan, J. dan Purba, J. (2015). Karakterisasi Polisakarida Galaktomanan Kolang-Kaling (*Arenga pinnata*) Terikat Silang Fosfat. *Majalah Polimer Indonesia*. 18(1):1-8.
- Tarigan, J., (2012), *Karakterisasi Edible Film yang Bersifat Antioksidan dan Antimikroba dari Galaktomanan Biji Aren (Arenga pinnata) yang Diinkorporasi dengan Minyak Atsiri Daun Kemangi (Ocimum basilicum L.)*, Disertasi. FMIPA, USU, Medan
- Tjay T.H. dan Rahardja K. (2015). Obat-Obat Penting Khasiat, Penggunaan dan Efek - Efek Sampingnya. PT Elex Media Komputindo. Jakarta. Hal. 523-531.

- Underwood, J.C.E. (1994). *Cedera Hepar Akibat Obat*. Editor: Sarjadi. Edisi Patologi Umum dan Sistemik. Edisi II. Jakarta: EGC. Hal. 483.
- Veerappa, H.M., Dan Sirigeri, J.P. (2002). Investigating Plant Galactomannans. *Biochemistry And Molecular Biology Education* 2002. 30(2):101-103.
- Verma, P.R.P., and Razdan, B. (2002). Studies on *Leucaena leucocephala* Seed Gum: Rheological Properties. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 61:437-443
- Verma, P.R.P., and Razdan, B. (2007). Studies on Disintegrant Action of *Leucaena leucocephala* Seed Gum in Ibuprofen Tablet and Its Mechanism. *Journal of Scientific and Industrial Research*.66:550-557
- Vieira, I. G. P., Mendes, F. N. V., Gallao, M. I., and de Brito, E. S. (2007). NMR Study of Galactomannans from The Seed of Mesquite Tree (*Prosopis juliflora* (Sw) DC). *Food Chemistry*. 101: 70-73.
- Wang, J., Liu, Y., Hu, P., and Huang, R. (2018). Adsorption of Phosphate from Aqueous Solution by Zr(IV)-Crosslinked Quaternized Chitosan/Bentonite Composite *Environmental Progress & Sustainable Energy*.37(1):267-275
- Watson, D.G. (2000). *Pharmaceutical Analysis. a Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemist*. Edinburgh : Churchill Livingstone. Hal:75-118 dan 145-194.
- Wibowo, W.A., Maslachah, L., dan Bijanti, R. (2005). Pengaruh Pemberian Perasan Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia*) terhadap Kadar SGOT Dan SGPT Tikus Putih (*Rattus*

norvegicus) Diet Tinggi Lemak. *Jurnal Cermin Dunia Kedokteran*. 162(2). Hal. 13-19.

Widmann, F.K. (1995). *Tinjauan Klinis atas Hasil Pemeriksaan Laboratorium*. Edisi 9. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC. Hal. 331.

Winarno, F.G. 1990. *Teknologi Pengolahan Rumput Laut*. Pustaka Sinar Harapan. Jakarta. Hal:112

Wypych, G. 2004. *Handbook of Plasticizers*. ChemTec Publishing, Toronto. Hal. 312

Yuniarti, T. (2008). *Ensiklopedia Tanaman Obat Tradisional*. Jakarta : Medpress. Hal 28

Zultiniar, G.D., dan Casoni, M.S.(2009). *Ekstraksi Galaktomanan dari Ampas Kelapa, Laboratorium Proses Pemisahan dan Pemurnian*. Program Studi Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Riau.