

KOMUNIKASI RINGKAS

TOKSISITAS AKUT KONDROITIN SULFAT HASIL EKSTRAKSI DARI TULANG RAWAN IKAN HIU

Lestari, R.¹⁾, Wanda, M.Z.²⁾, dan Thamrin Wikanta³⁾

ABSTRAK

Telah dilakukan pengujian toksisitas akut melalui penentuan LD-50 dari kondroitin sulfat hasil ekstraksi tulang rawan ikan hiu. Hasil pengujian menunjukkan bahwa nilai LD-50 pada mencit secara intraperitoneal sebesar 60,8 mg/20 g bobot badan dan setelah diekstrapolasi pada mencit secara oral diperoleh nilai LD-50 sebesar 21,3 g/kg bobot badan. Berdasarkan tabel tentang penggolongan sifat racun, senyawa ini termasuk ke dalam kelompok "Praktis Tak Beracun".

ABSTRACT: *Acute toxicity of chondroitin sulfate extracted from shark cartilage. By: Lestari, R., Wanda, M. Z., and Thamrin Wikanta.*

Acute toxicity of chondroitin sulfate extracted from shark cartilage by determining the LD-50 value had been carried out. The result showed that the LD-50 value for mice ingested intraperitoneally was 60.8 mg/20 g body weight, and after extrapolating to mice ingested orally the value of LD-50 was 21.3 g/kg body weight. Based on the table of the classification of toxicity, this substance can be grouped as "Practically Non Toxic".

KEYWORDS: *acute toxicity, chondroitin sulfate, shark cartilage.*

PENDAHULUAN

Ikan hiu termasuk hewan akuatik yang unik karena mampu bertahan hidup dalam kondisi perairan yang paling buruk sekalipun, misalnya di perairan yang tercemar berat oleh bahan kimia karsinogenik. Diduga kemampuan tersebut didukung oleh sistem kekebalan tubuh yang luar biasa dalam menangkal serangan bakteri, virus, dan senyawa kimia yang toksik (Lane & Comac, 1993; Suparno, 1996). Selain itu, setiap bagian tubuh ikan hiu dapat dimanfaatkan untuk berbagai keperluan, seperti pangan, obat-obatan, kosmetik, dan industri lainnya (Wibowo & Susanto, 1995). Salah satu bagian tubuh ikan hiu yang akhir-akhir ini mendapat perhatian dari para ilmuwan adalah tulang rawannya.

Tulang rawan ikan hiu mengandung mineral, protein, lemak, dan karbohidrat. Manfaat tulang rawan ikan hiu dalam bidang kesehatan telah banyak diungkapkan oleh para ahli, antara lain untuk pengobatan alternatif penyakit kanker karena mengandung senyawa protein aktif yang disebut *cartilage derived inhibitor (CDI)* (Langer *et al.*, 1976; Lee & Langer, 1983; Asmino, 1996; Lane & Comac, 1993). Senyawa lain yang termasuk penting adalah karbohidrat yang terdapat dalam bentuk makromolekul. Karbohidrat

ini termasuk kategori mukopolisakarida atau glikosaminoglikan. Glikosaminoglikan pada tulang rawan ikan hiu yang dominan adalah kondroitin sulfat (Sugahara *et al.*, 1992; de Waard *et al.*, 1992). Kondroitin sulfat telah dikenal dalam bidang farmasi digunakan untuk penyembuhan inflamasi dan luka, katarak, pengerasan dan pembengkakan pembuluh darah, menjaga kelenturan organ tubuh dan tegangan permukaan kulit, menahan cairan tubuh dan mengatasi penyakit degeneratif persendian perifer, khususnya jenis reumatik (Lane & Comac, 1993; Mutschler, 1991; Suparno, 1996).

Untuk membuka peluang pemanfaatan kondroitin sulfat yang terdapat dalam tulang rawan ikan hiu, telah dikembangkan suatu teknik ekstraksi yang cukup sederhana oleh Suparno *et al.* (1998a; 1998b) dengan menggunakan metode enzimatik dalam suasana basa alkoholik. Perlu dilakukan uji toksisitas kondroitin sulfat hasil ekstraksi dari tulang rawan ikan hiu, sebelum digunakan terhadap manusia (Ballantyne *et al.*, 1995). Uji toksisitas dilakukan melalui penentuan LD-50 (Gan, 1987) menggunakan hewan tingkat rendah dengan memperhatikan berbagai faktor yang dapat mempengaruhinya, seperti spesies hewan, jenis kelamin, umur, makanan, kondisi kesehatan hewan, dan kondisi lingkungan (Morrison

¹⁾ Fakultas Farmasi Universitas Pancasila
²⁾ Peneliti pada Balai Penelitian Perikanan Laut

et al., 1968; Rhodes et al., 1995) serta cara pemberian intravena (iv), intraperitoneal (ip), subkutan (sk) atau oral (or) (Turner, 1965). Pada penelitian ini pengujian dilakukan menggunakan mencit jantan secara intraperitoneal (ip), yang kemudian hasilnya diekstrapolasi terhadap tikus secara oral.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Sediaan uji yang akan diteliti adalah senyawa kondroitin sulfat hasil isolasi dari tulang rawan ikan hiu (*Carcharhinus limbatus*) dengan metode yang dikembangkan oleh Instalasi Penelitian Perikanan Laut Slipi, Jakarta (Suparno et al., 1998a).

Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah mencit putih galur DDY dengan jenis kelamin jantan, umur 2-3 bulan, bobot badan 20-25 gram, diperoleh dari Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Bogor. Hewan yang digunakan dalam kondisi sehat, dengan ciri-ciri: gerakan lincah, bulu tak berdiri, warna bulu mengkilap, serta makan dan minum normal (tidak bersisa banyak). Pemilihan hewan dengan jenis kelamin jantan adalah untuk menghindari kemungkinan terjadinya penyimpangan karena faktor hormonal.

Metode Penelitian

Sebelum tikus digunakan, terlebih dahulu diadaptasikan dengan kondisi lingkungannya yang baru, di dalam kandang dengan suhu dan penerangan kamar, selama tujuh hari. Sebelum dan selama penelitian berlangsung, tikus diberi makan dengan makanan standar sebanyak 20 gram/hari/ekor dan minum air suling. Makanan standar didapatkan dari Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Bogor.

Metode yang digunakan untuk penetapan nilai LD-50 kondroitin sulfat adalah metode Weil (1952). Uji ini meliputi dua tahap, yaitu:

Tahap 1

Disiapkan sebanyak 3-4 kelompok hewan uji, masing-masing terdiri atas lima ekor mencit jantan. Tiap kelompok diberi larutan kondroitin sulfat secara intraperitoneal (ip) dengan dosis yang merupakan kelipatan dari dosis kelompok lain. Jumlah kematian dihitung setelah 24 jam sejak pemberian. Bila setelah 24 jam tidak ada seekor mencit pun yang mati maka dosis peninjagan diperbesar dari konsentrasi sediaan uji yang paling besar.

Tahap 2

Apabila pada dosis peninjagan, pada salah satu kelompok ada mencit yang mati minimal dua ekor, maka percobaan dilanjutkan dengan memperbesar jumlah kelompok menjadi lima dan masing-masing kelompok terdiri atas lima ekor mencit. Dosis yang diberikan pada kelompok hewan uji pada penetapan nilai LD50 tahap 2 adalah berdasarkan hasil pengamatan jumlah mencit yang mati pada percobaan tahap 1. Dosis terendah untuk tahap 2 mendekati atau sama dengan dosis yang menimbulkan kematian minimal dua ekor pada percobaan tahap 1, sedangkan dosis tertinggi mendekati atau sama dengan dosis yang menimbulkan kematian lebih dari dua ekor pada percobaan tahap 1. Perhitungan dosis untuk tiap kelompok (Da) pada tahap ini menggunakan rumus:

$$Da = Dr \times R^{a-1} \dots\dots\dots (1)$$

dengan:
 Da = dosis kelompok a
 a = nomor kelompok, 1 sampai 5
 Dr = dosis terendah yang digunakan
 d = log R = log kelipatan dosis/jumlah kelompok - 1.

Jumlah kematian mencit pada tiap kelompok dihitung setelah 24 jam sejak pemberian, dan hasilnya dicocokkan dengan tabel Weil (1952). Dengan menggunakan perhitungan maka dapat diperoleh nilai LD-50.

Penentuan nilai LD-50

Setelah 24 jam sejak pemberian bahan, jumlah kematian mencit pada tiap kelompok dicocokkan dengan tabel biometrik Weil (1952), selanjutnya nilai LD-50 dihitung dengan rumus:

$$\log m = \log D + d(f + 1) \dots\dots\dots (2)$$

dengan:
 m = nilai LD-50
 D = dosis terendah yang digunakan
 d = log R = log kelipatan dosis/jumlah kelompok - 1
 f = suatu faktor dari tabel

Selang LD-50 dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Selang LD-50} = \text{antilog} (\log M + 2 \text{ slog } m) \dots\dots(3)$$

dengan:
 slog m = d x sf
 d = log R
 = log kelipatan dosis/jumlah kelompok - 1
 sf = suatu faktor dari tabel

HASIL DAN BAHASAN

Hasil dari tiap tahap pada penentuan nilai LD50 adalah sebagai berikut:

Tahap 1

Setelah 24 jam sejak pemberian larutan kondroitin sulfat, ternyata pada kelompok III dan IV ada mencit yang mati masing-masing lima ekor seperti terlihat pada Tabel 1. Maka uji coba dilanjutkan ke tahap 2.

mg/10 g BB dan dosis di bawahnya yang mendekati dosis tersebut adalah 25,0 mg/10 g BB, yang digunakan sebagai dosis terendah pada tahap 2. Dosis setiap kelompok pada tahap 2 dihitung sesuai dengan rumus (1).

Hasil uji coba tahap 2 dapat dilihat pada Tabel 2.

Pada tahap 2, nilai LD50 sudah dapat dihitung menggunakan tabel dan rumus Weil (1952) berdasarkan rumus (2). Untuk jumlah mencit lima ekor dalam

Tabel 1. Jumlah kematian mencit 24 jam setelah pemberian pada tahap 1.
 Table 1. Total mice death, 24 hours after treatment in the first step.

Kelompok <i>Group</i>	Dosis kondroitin sulfat <i>Dose of chondroitin sulfate</i>	Kadar larutan kondroitin sulfat <i>Concentration of chondroitin sulfate</i>	Jumlah kematian setelah 24 jam <i>Total mice death, 24 hours after treatment</i>
	mg/10 g BB (BW)	(%)	
I	12.5	5	0
II	25.0	10	0
III	50.0	20	5
IV	100.0	20	5

BB = bobot badan; BW = body weight

Tahap 2

Pada tahap 1, kelompok II dengan dosis 25,0 mg/10 g BB tidak ada mencit yang mati, dan pada kelompok III dengan dosis 50,0 mg/10 g BB ada lima ekor mencit yang mati. Dosis kelompok III adalah dua kali dosis kelompok II. Dosis terendah yang menimbulkan tingkat kematian minimal pada tahap 1 adalah 50

tiap kelompok (n = 5) dan untuk empat atau lebih tingkatan dosis yang diberikan (k = 3), dengan variasi kematian 1, 2, 4, 5, maka dari tabel didapatkan harga $f = 0,12500$ dan $sf = 0,45178$, sehingga:

$$\begin{aligned} \log m &= \log 25 + 0,07526 (0,12500 + 1) \\ &= 1,39794 + 0,08467 \\ &= 1,48261 \end{aligned}$$

Tabel 2. Jumlah kematian mencit 24 jam setelah pemberian pada tahap 2.
 Table 2. Total mice death, 24 hours after treatment in the second step.

Kelompok <i>Group</i>	Dosis kondroitin sulfat <i>Dose of chondroitin sulfate</i>	Kadar larutan kondroitin sulfat <i>Concentration of chondroitin sulfate</i>	Jumlah kematian setelah 24 jam <i>Total mice death, 24 hours after treatment</i>
	mg/10 g BB (BW)	(%)	
I	25	10	0
II	29.73	11.89	1
III	35.36	14.14	2
IV	42.04	16.82	4
V	50	20	5

BB = bobot badan; BW = body weight

$$m = \text{antilog } 1,48261 = 30,3816 \text{ mg}/10 \text{ g BB}$$

Nilai LD-50 pada mencit secara intraperitoneal adalah:

$$= 30,3816 \text{ mg}/10 \text{ g BB}$$

$$= 60,76 \text{ mg}/20 \text{ g BB}$$

Selang LD-50 dihitung menggunakan rumus (3) dengan:

$$\begin{aligned} \text{slog } m &= d \times \text{sf} \\ &= 0,07526 \times 0,45178 \\ &= 0,034 \end{aligned}$$

maka dapat diperoleh:

$$\begin{aligned} \text{Selang LD-50 terendah} & \\ &= \text{antilog} (\log m - 2 \times \text{slog } m) \\ &= \text{antilog} (1,48261 - 2 \times 0,034) \\ &= \text{antilog} (1,48261 - 0,068) \\ &= \text{antilog } 1,41461 \\ &= 25,9783 \text{ mg}/10 \text{ g BB} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Selang LD-50 tertinggi} & \\ &= \text{antilog} (\log m + 2 \times \text{slog } m) \\ &= \text{antilog} (1,48261 + 2 \times 0,034) \\ &= \text{antilog} (1,48261 + 0,068) \\ &= \text{antilog } 1,55061 \\ &= 35,5312 \text{ mg}/10 \text{ g BB} \end{aligned}$$

Ekstrapolasi nilai LD-50 dari mencit ke tikus:

Nilai LD-50 pada mencit secara intraperitoneal adalah:

$$\begin{aligned} &= 30,3816 \text{ mg}/10 \text{ g BB} \\ &= 60,76 \text{ mg}/20 \text{ g BB} \end{aligned}$$

Ekstrapolasi ke tikus secara intraperitoneal adalah:

$$\begin{aligned} &= (60,76 \times 7) \text{ mg}/200 \text{ g BB} \\ &= 425,32 \text{ mg}/200 \text{ g BB} \end{aligned}$$

Nilai LD-50 pada tikus secara oral adalah:

$$\begin{aligned} &= (425,32 \times 10) \text{ mg}/200 \text{ g BB} \\ &= 4253,2 \text{ mg}/200 \text{ g BB} \\ &= 21266 \text{ mg}/\text{kg BB} \\ &= 21,27 \text{ g}/\text{kg BB} \end{aligned}$$

Penggunaan metode Weil (1952) dianggap sederhana dan paling mudah pengerjaannya, sedangkan penggunaan mencit umur 2-3 bulan dianggap sudah dewasa dan organ tubuhnya telah berfungsi sempurna. Untuk menghindari terjadinya penyimpangan karena faktor hormonal maka dipilih mencit dengan jenis kelamin jantan.

Hasil penentuan LD50 senyawa kondroitin sulfat diperoleh nilai LD50 secara intraperitoneal pada

mencit sebesar 60,76 mg/20 g bobot badan. Hasil ekstrapolasi pada tikus dengan cara mengalikannya dengan suatu faktor perbandingan yang telah disusun Paget & Barnes (1964) seperti terlihat pada Lampiran 2. diperoleh nilai LD-50 secara oral pada tikus sebesar 21,27 g/kg bobot badan. Berdasarkan Lampiran 3 yang telah disusun oleh Gleason (1969), maka kondroitin sulfat yang diteliti, termasuk ke dalam golongan senyawa "Praktis Tak Beracun" ($>15 \text{ g}/\text{kg BB}$, *Practically Non Toxic*), berarti pemakaian kondroitin sulfat untuk obat cukup aman.

KESIMPULAN DAN SARAN

1. Hasil uji toksisitas akut diperoleh nilai LD-50 kondroitin sulfat pada mencit secara intraperitoneal (ip) sebesar 60,76 mg/20 g bobot badan, dan setelah diekstrapolasi pada tikus secara oral (or) diperoleh nilai LD50 sebesar 21,27 g/kg bobot badan, sehingga kondroitin sulfat hasil penelitian tersebut digolongkan sebagai bahan yang "Praktis Tak Beracun" (*Practically Non Toxic*).
2. Untuk penggunaan lebih luas, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai toksisitas subkronik dari kondroitin sulfat karena senyawa ini merupakan senyawa baru yang belum banyak digunakan oleh masyarakat.
3. Kecenderungan penangkapan ikan hiu akan dibatasi, maka perlu digali/diupayakan untuk mendapatkan senyawa kondroitin sulfat dari sumber lain, serta kemungkinan pengembangan budi daya ikan hiu di suatu perairan di wilayah Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Asmino. 1996. Tulang rawan ikan hiu sebagai pengobatan alternatif untuk tumor yang padat (solid) dan penyakit angiogenik. *Majalah Kedokteran Indonesia*. 46(9): 519-523.
- Ballantyne, B., Marrs, T.C., and Turner, P. 1995. Fundamentals of toxicology. In: Ballantyne, B., Marrs, T.C., and Turner, P. (Eds.). *General and Applied Toxicology*. Abridged Edition. The Macmillan Press Ltd., Basingstoke. 3-38.
- de Waard, P., Vliegthart, J.F.G., Harada, T., and Sugahara, K. 1992. Structural studies on sulfated oligosaccharides derived from the carbohydrate-protein linkage region of chondroitin 6-sulfate proteoglycans of shark cartilage. II. Seven compounds containing 2 or 3 sulfate residues. *J. Biol. Chem.* 267: 6036-6043.
- Gan, S. 1987. *Farmakologi dan Terapi*. Ed III. Bag. Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta. 187.
- Gleason, M.N. 1969. *Clinical Toxicology of Commercial Product*. Baltimore William and Wilkins. 3-4.

- Lane, I.W. and Comac, L. 1993. *Shark Don't Get Cancer: How Shark Cartilage Could Save Your Life*. Avery Publishing Group Inc., New York, 192 pp.
- Langer, R., Brem, H., Falterman, K., Klein, M., and Folkman, J. 1976. Isolation of cartilage factor that inhibits tumor neovascularization. *Science*, 193: 70-72.
- Lee, A. and Langer, R. 1983. Shark cartilage contains inhibitor of tumor angiogenesis. *International J. Cancer*. 221: 1185-1186.
- Morrison, J.K., Quinton, R.M., and Reinert, H. 1968. The purpose and value of LD50 determinations. In: Boyland, E., R. Goulding (Eds.). *Modern Trends in Toxicology*. Butterworth, London. 1-13.
- Mutschler, E. 1991. *Dinamika Obat*. Edisi 5. Diterjemahkan oleh: M. B. Widiyanto dan A. S. Ranti. Penerbit ITB, Bandung. 209-217.
- Paget, G.E. and Barnes, J.M. 1964. Evaluation of drug activities. In: Laurence, D.R. and Bacharach, A.I. (Eds.). *Pharmacometrics*. Vol I. Academic Press. London. 160-162.
- Rhodes, C., Thomas, M., and Athis, J. 1995. Principles of testing for acute toxic effects. In: Ballantyne, B., Marrs, T.C., and Turner, P. (Eds.). *General and Applied Toxicology. Abridged Edition*. The Macmillan Press Ltd., Basingstoke. 39-77.
- Sugahara, K., Oki, Y., Harada, T., de Waard, P., and Vliegthart, J.F.G. 1992. Structural studies on sulfated oligosaccharides derived from the carbohydrate-protein linkage region of chondroitin 6-sulfate proteoglycans of shark cartilage. I. Six compounds containing o- or 1-sulfate and/or phosphate residue. *J. Biol. Chem.* 267: 6027-6035.
- Suparno. 1996. Ikan hiu: hewan primitif yang memberikan sumbangan luar biasa bagi kesehatan manusia. *Warta Penelitian Perikanan Indonesia*, II (4): 2-7. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perikanan, Jakarta.
- Suparno, Saleh, M., and Murdinah. 1998a. Extraction and isolation of chondroitin from various tissues of elasmobranchs. *Paper presented in APFIC Symposium on Fish Utilization*. Beijing, 24-26 September 1998.
- Suparno, Murdinah, dan Saleh, M. 1998b. Kandungan khondroitin pada beberapa bagian tubuh ikan hiu (*Carcharhinus limbatus*) yang berbeda ukuran. *Seminar Bioteknologi Kelautan Indonesia I '98*. Jakarta. 14-15 Oktober 1998.
- Turner, R.A. 1965. *Screening Methods in Pharmacology*. Acad. Press. New York. 302-303.
- Weil, C.S. 1952. Tables for convenient of median effective dose (LD50 or ED50) and instruction in their use. *Biometrics* (8): 247-253.
- Wibowo, S. dan Susanto, H. 1995. *Sumber Daya dan Pemanfaatan Hiu*. Penebar Swadaya, Jakarta. 156 pp.

Lampiran 1. Rumus perhitungan dosis untuk tiap kelompok (Da) pada tahap 2.
Appendix 1. Dose calculation for each group (Da) in the second step.

$$Da = Dr \times R^{a-1}$$

karena:

$$d = \frac{\log \text{kelipatan dosis}}{\text{jumlah kelompok} - 1} = \frac{\log 2}{5-1} = \frac{0,3010}{4} = 0,07526$$

$$R = \text{antilog } d = \text{antilog } 0,07526 = 1,1892$$

maka:

$$\begin{aligned} \text{Dosis kelompok 1 : } D1 &= Dr \times R^{1-1} \\ &D1 = 25 \text{ mg/10 g BB} \times 1,1892^{1-1} \\ &D1 = 25 \text{ mg/10 g BB} \\ \text{Dosis kelompok 2 : } D2 &= Dr \times R^{2-1} \\ &D2 = 25 \text{ mg/10 g BB} \times 1,1892^{2-1} \\ &D2 = 29,73 \text{ mg/10 g BB} \\ \text{Dosis kelompok 3 : } D3 &= Dr \times R^{3-1} \\ &D3 = 25 \text{ mg/10 g BB} \times 1,1892^{3-1} \\ &D3 = 35,36 \text{ mg/10 g BB} \\ \text{Dosis kelompok 4 : } D4 &= Dr \times R^{4-1} \\ &D4 = 25 \text{ mg/10 g BB} \times 1,1892^{4-1} \\ &D4 = 42,04 \text{ mg/10 g BB} \\ \text{Dosis kelompok 5 : } D5 &= Dr \times R^{5-1} \\ &D5 = 25 \text{ mg/10 g BB} \times 1,1892^{5-1} \\ &D5 = 50 \text{ mg/10 g BB} \end{aligned}$$

Lampiran 2. Faktor konversi LD-50 menurut Paget and Barnes (1964).

Appendix 2. The conversion factor of LD-50 value based on Paget and Barnes (1969).

	20 g Mouse	200 g Rat	400 g Guinea pig	1.5 kg Rabbit	2.0 kg Cat	4.0 kg Monkey	12.0 kg Dog	70.0 kg Man
20 g Mouse	1,0	7,0	12,25	27,8	29,7	64,1	124,2	387,9
200 g Rat	0,14	1,0	1,74	3,9	4,2	9,2	17,8	56
400 g Guinea pig	0,08	0,57	1,0	2,25	2,4	5,2	10,2	31,5
1.5 kg Rabbit	0,04	0,25	0,44	1,0	1,08	2,4	4,5	14,2
2.0 kg Cat	0,03	0,23	0,41	0,92	1,0	2,2	4,2	13
4.0 kg Monkey	0,016	0,11	0,19	0,42	0,45	1,0	1,9	6,1
12.0 kg Dog	0,008	0,06	0,1	0,22	0,24	0,52	1,0	3,1
70.0 kg Man	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,076	0,16	0,32	1,0

Lampiran 3. Penggolongan toksisitas zat kimia menurut Gleason (1969).

Appendix 3. The clasification of chemical toxicity based on Gleason (1969).

No.	LD-50	Tingkatan toksisitas Toxicity level
1	> 15 g/kg	<i>Practically Non Toxic (PNT)</i>
2	5 g - 15 g/kg	<i>Slightly Toxic (ST)</i>
3	500 mg - 5 g/kg	<i>Moderately Toxic (MT)</i>
4	50 mg - 500 mg/kg	<i>Very Toxic (VT)</i>

