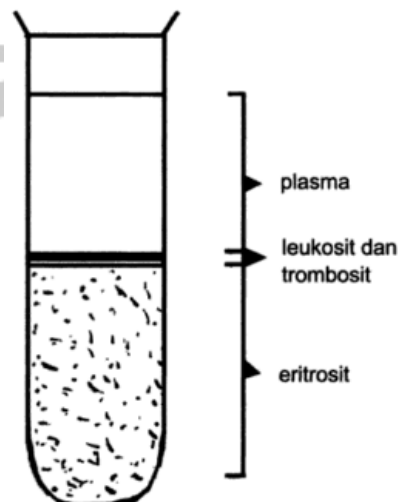


II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Darah

Darah merupakan komponen penting dalam penilaian kondisi fisiologis tubuh (Mitruka dan Rawnsley, 1981). Darah terdiri dari plasma dan sel darah. Sel darah meliputi eritrosit, leukosit, dan trombosit. Komponen

darah tersebut dapat diamati setelah dilakukan sentrifugasi sehingga membentuk beberapa lapisan (Gambar 1). Plasma darah merupakan cairan penyusun darah yang mengandung sejumlah protein yang berperan sangat penting untuk menghasilkan osmotik plasma (Isnaeni, 2006). Darah berfungsi untuk mengedarkan substansi yang masuk ke dalam tubuh maupun yang dihasilkan tubuh dari proses-proses metabolisme (Ihedioha dkk., 2012), sebagai pertahanan terhadap antigen, dan mengatur stabilitas suhu tubuh (Sumardjo, 2008).



Gambar 1. Sampel darah setelah disentrifugasi (Sumber: Isnaeni, 2006).
Keterangan: Volume darah yang ditempati eritrosit disebut hematokrit.

Terdeteksinya hingga tingkat keparahan dari suatu penyakit dapat diketahui dari pemeriksaan darah (hematologis) (Bastiawan dkk., 2001). Profil darah merupakan gambaran kondisi fisiologis tubuh yang berkaitan dengan kesehatan, sehingga kondisi profil darah yang baik akan mendukung proses fisiologis tubuh yang lebih baik. Kondisi profil darah yang baik dapat ditandai dengan komponen darah yang berada dalam kisaran normal (Ali dkk., 2013).

Terdapat dua komponen dalam profil darah yaitu profil hematologi dan profil kimia darah. Hematologi lengkap (*complete blood count*) merupakan dasar untuk pengujian praklinis dan klinis serta menjadi persyaratan dasar dalam penilaian praklinis obat-obatan dan toksisitas (Harrison dkk., 1978). Profil hematologi meliputi profil eritrosit (jumlah eritrosit, kadar hemoglobin, dan persentase hematokrit), profil leukosit (jumlah total leukosit, jumlah neutrofil, jumlah limfosit, dan *mixed* (gabungan jumlah monosit, eosinofil, dan basofil), dan profil trombosit (jumlah trombosit) (Fitria dan Sarto, 2014). Profil hematologi normal tikus putih (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) galur Wistar sebagai acuan kontrol disajikan pada Tabel 1 dan 2.

Tabel 1. Profil hematologi normal dan berat badan tikus Wistar jantan umur 4, 6, dan 8 minggu.

Variabel	Umur (minggu)		
	4	6	8
Eritrosit ($\times 10^6 / \mu\text{L}$)	4,87 \pm 0,81	6,22 \pm 1,93	5,50 \pm 0,32
Hemoglobin (g/dL)	10,09 \pm 0,34	14,67 \pm 3,52	10,63 \pm 0,26
Hematokrit (%)	43,89 \pm 1,42	48,42 \pm 5,57	52,17 \pm 5,14
Leukosit ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	8,05 \pm 2,27	7,16 \pm 2,51	8,08 \pm 1,08
Neutrofil ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	2,93 \pm 0,14	2,43 \pm 0,23	2,24 \pm 0,08
Limfosit ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	5,03 \pm 0,14	4,60 \pm 0,14	5,56 \pm 0,05
Mixed ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	5,03 \pm 0,14	4,60 \pm 0,14	5,56 \pm 0,05
Trombosit ($\times 10^5 / \mu\text{L}$)	2,28 \pm 0,49	2,01 \pm 0,38	1,47 \pm 0,41
Berat badan (g)	62,36 \pm 3,82	163,50 \pm 13,09	196,78 \pm 21,63

Sumber: Fitria dan Sarto, 2014.

Tabel 2. Profil hematologi normal dan berat badan tikus Wistar betina umur 4, 6, dan 8 minggu.

Variabel	Umur (minggu)		
	4	6	8
Eritrosit ($\times 10^6 / \mu\text{L}$)	5,16 \pm 0,80	6,67 \pm 0,18	6,92 \pm 0,38
Hemoglobin (g/dL)	11,12 \pm 1,75	12,52 \pm 0,95	13,44 \pm 0,55
Hematokrit (%)	31,80 \pm 4,59	36,84 \pm 2,29	38,06 \pm 1,61
Leukosit ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	6,58 \pm 1,16	4,90 \pm 0,76	5,36 \pm 1,21
Neutrofil ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	1,34 \pm 0,46	1,06 \pm 0,26	1,18 \pm 0,28
Limfosit ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	5,24 \pm 1,36	3,84 \pm 0,74	4,12 \pm 1,24
Mixed ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,06 \pm 0,13
Trombosit ($\times 10^5 / \mu\text{L}$)	7,11 \pm 2,20	6,79 \pm 3,20	8,39 \pm 1,18
Berat badan (g)	59,90 \pm 2,30	132,28 \pm 5,86	151,60 \pm 8,54

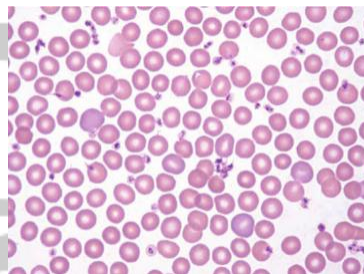
Sumber: Fitria dan Sarto, 2014.

1. Eritrosit

Eritrosit mamalia memiliki diameter rata-rata sebesar 7,5 μm . Eritrosit merupakan sel cakram tak berinti berbentuk bikonkaf dengan pinggirannya sirkuler yang tebalnya sekitar 1,5 μm dan pusatnya tipis. Cakram tersebut memiliki permukaan yang relatif luas untuk pertukaran oksigen melintasi membran sel (Frandsen, 1993). Salah satu penyebab naiknya jumlah eritrosit adalah meningkatnya suhu tubuh, dikarenakan dengan suhu tubuh yang meningkat akan menyebabkan aktivitas penyerapan oksigen

meningkat (Bozorgnia dkk., 2011). Eritrosit rentan terhadap terjadinya peroksidasi lipid karena struktur membran eritrosit yang kaya asam lemak tak jenuh sehingga membran tidak stabil dan sel lisis (Adenkola dkk., 2010).

Eritrosit (Gambar 2) berfungsi dalam penyediaan oksigen untuk kebutuhan energi dalam rangka metabolisme karena adanya hemoglobin (Smith dkk., 1994). Hemoglobin merupakan protein majemuk, terdiri atas protein sederhana (globin) dan heme. Hemoglobin berfungsi untuk mengangkut oksigen dari kedua paru-paru ke jaringan tubuh dan mengangkut karbondioksida dari jaringan tubuh ke kedua paru-paru (Sumardjo, 2008). Hemoglobin dipengaruhi oleh umur hewan, spesies, lingkungan, pakan, ada tidaknya kerusakan eritrosit dan penanganan darah saat pemeriksaan (Wardhana dkk, 2001).



Gambar 2. Eritrosit tikus (Sumber: Greer dkk., 2014)

Keterangan: eritrosit dengan pewarnaan Wright perbesaran 1000x, terjadi polikromasia dan anisitosis ringan

Eritrosit berasal dari *hemositoblast*, proses pembentukannya dinamakan *eritropoiesis* (Guyton dan Hall, 2006) dan diatur melalui mekanisme umpan balik yang dipengaruhi jumlah oksigen dalam darah. Kecepatan eritropoiesis akan meningkat dengan menurunnya jumlah eritrosit. Pada kondisi jumlah O_2 menurun, hati akan banyak melepas globulin dan ginjal akan memproduksi lebih banyak faktor eritropoietik

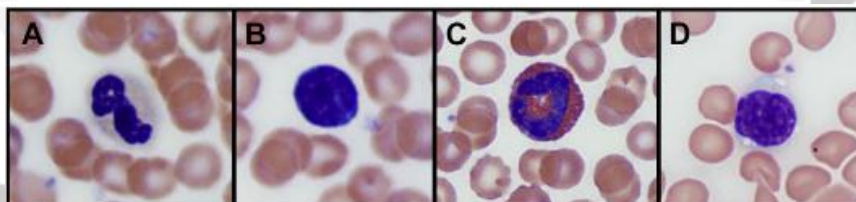
yang akan saling berinteraksi membentuk eritropoietin. Eritropoietin yang terbentuk akan merangsang terjadinya proses eritropoiesis sehingga jumlah eritrosit meningkat. Namun apabila jumlah O_2 meningkat maka produksi globulin dan faktor eritropoietik akan menurun (Notopoero, 2007).

Penurunan jumlah eritrosit dapat terjadi apabila prekursor seperti zat besi dan asam amino yang membantu dalam pembentukan eritrosit kurang. Kurangnya prekursor tersebut dikarenakan adanya gangguan penyerapan gizi yang berkurang sehingga dapat memengaruhi organ yang berperan dalam produksi sel darah (Wardhana dkk., 2001). Gagalnya pembentukan eritrosit akan mengakibatkan bentuk eritrosit tidak teratur, memiliki membran sangat tipis, besar, bentuknya oval yang berbeda dengan bentuk normal sehingga dapat memengaruhi pengangkutan oksigen ke jaringan tubuh (Guyton dan Hall, 2006).

2. Leukosit

Leukosit merupakan sel darah yang memiliki inti. Leukosit memiliki ukuran sel yang lebih besar, tetapi jumlah yang lebih sedikit dibandingkan dengan eritrosit (Bacha dan Bacha, 2000). Leukosit berfungsi sebagai sistem pertahanan tubuh terhadap agen infeksi yang cepat dan kuat (Cahyaningsih dkk., 2007). Sistem pertahanan tersebut dilakukan dengan cara menghancurkan antigen melalui fagositosis atau pembentukan antibodi. Leukosit sebagian dibentuk di sumsum tulang dan sebagian di organ limfoid seperti kelenjar limfe, timus, dan tonsil, kemudian akan diangkut menuju bagian yang mengalami peradangan (Guyton dan Hall, 2006).

Leukosit dibagi menjadi dua kelompok yaitu granulosit yang terdiri dari neutrofil, eosinofil, basofil dan kelompok agranulosit terdiri dari monosit dan limfosit (Cahyaningsih dkk., 2007). Granulosit seperti monosit, eosinofil, dan basofil jumlahnya sangat sedikit dalam kondisi normal, tetapi apabila terdapat antigen maka jumlahnya akan meningkat (Fitria dan Sarto, 2014). Monosit berukuran lebih besar daripada limfosit dengan memiliki inti sel berbentuk bulat atau panjang seperti ginjal. Monosit dibentuk di dalam sumsum tulang (Handayani dan Haribowo, 2008), kemudian memasuki aliran darah, beredar sekitar 8 jam dan kemudian memasuki jaringan ikat, tempat sel ini mengalami pematangan menjadi makrofag yang berfungsi sebagai fagosit (Junqueira, 2007). Neutrofil, limfosit, eosinofil dan monosit ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Struktur leukosit tikus (Sumber: Campbell, 2015).
Keterangan: Neutrofil (A), limfosit (B), eosinofil (C), monosit (D) dengan pewarnaan Giemsa-Wright perbesaran 1000x.

3. Neutrofil

Neutrofil berperan dalam respon imun bawaan (Fitria dan Sarto, 2014). Neutrofil memiliki masa hidup singkat yaitu sekitar 10 jam dalam sirkulasi. Granula pada neutrofil tidak berwarna, mempunyai inti sel yang terangkai (kadang terpisah), dan banyak terdapat granula pada protoplasmanya (Handayani dan Haribowo, 2008). Adanya peningkatan neutrofil dapat terjadi karena terjadinya stress akut (Burhanudin, 2015). Adanya sel yang dirusak

mikroba akan mengeluarkan sinyal kimiawi untuk memanggil neutrofil dari darah datang, memasuki jaringan yang terinfeksi dan menelan serta merusak mikrobia dalam sel tersebut. Ketika terdapat antigen maka neutrofil merupakan fagosit yang pertama datang, diikuti monosit yang berkembang menjadi makrofag besar dan aktif. Makrofag akan memfagositosis antigen dan produknya serta membersihkan sel-sel jaringan yang rusak dan sisa neutrofil yang dirusak dalam proses fagositosis tersebut (Campbell dkk., 2004).

4. Limfosit

Limfosit berperan dalam respon imun adaptif (Fitria dan Sarto, 2014). Terdapat dua jenis utama limfosit yaitu limfosit T (sel T) dan limfosit B (sel B) yang bersirkulasi dalam darah dan limfa. Kedua jenis limfosit tersebut melakukan respons pertahanan terhadap antigen yang berbeda tetapi saling melengkapi. Sel B akan mensekresi protein yaitu antibodi ketika terdapat antigen. Sel B dan sel T dapat mengenali antigen secara spesifik karena adanya reseptor antigen yang terikat pada membran plasma (Campbell dkk., 2004). Sel T umumnya bermigrasi ke kelenjar limfa perifer. Limfosit T dalam organ limfoid sekunder akan berkembang menjadi sel T *helper* (Th) atau T *cytotoxic* (Tc). Sel Th akan berinteraksi dengan antigen yang disajikan oleh APC (*Antigen Presenting Cell*) (Fung-Leung dkk., 1991).

5. Trombosit

Trombosit merupakan komponen sel darah yang tidak memiliki nukleus (Gibson, 2003). Trombosit dihasilkan oleh megakariosit dalam sumsum tulang, memiliki bentuk cakram bikonveks apabila dalam keadaan

tidak aktif. Trombosit pada manusia berdiameter 2-4 μm dan memiliki volume 7-8 fL. Trombosit memiliki selubung eksternal yang banyak mengandung glikoprotein yang berfungsi sebagai reseptor. Ketika trombosit berada dalam keadaan tidak aktif maka tidak teragregasi. Hal ini dikarenakan glikoprotein pada selubung eksternal trombosit mengandung molekul *sialic acid* sehingga selubung eksternal tersebut memiliki muatan negatif yang menyebabkan adanya reaksi tolak-menolak (Setiabudy, 2007; Abrams, 2009 dalam Putra, 2012).

Trombosit berfungsi dalam hemostasis (Gibson, 2003) yang berhubungan dengan koagulasi darah sebagai fungsi utama trombosit (Fitria dan Sarto, 2014). Fungsi koagulasi tersebut bermula dari melekatnya trombosit ke kolagen yang terpapar dalam dinding pembuluh darah yang rusak. Trombosit selanjutnya melepas ADP (Adenosin Diphosphate) sehingga sejumlah besar trombosit bersatu, kemudian melepaskan lipida yang diperlukan untuk pembentukan bekuan (Waterbury, 2001).

B. Luwigan (*Ficus hispida* L.f)

Luwigan tergolong dalam suku Moraceae yang mampu tumbuh hingga mencapai 15 m. Batang berwarna abu-abu dan bergetah, serta memiliki akar rambut. Tanaman ini tersebar di beberapa negara tropis seperti India, Sri Lanka, Myanmar, China bagian selatan, Papua Nugini, Australia, dan Indonesia (Lee dkk., 2013). Pohon luwigan (Gambar 4) dapat ditemukan sepanjang tahun dan tumbuh liar atau dibudidayakan untuk mendapatkan buahnya (Mandal dan Kumar, 2002).

Menurut Lee dkk. (2013), klasifikasi tanaman luwingan sebagai berikut:

Kerajaan	:	Plantae
Divisi	:	Magnoliophyta
Kelas	:	Magnoliopsida
Bangsa	:	Urticales
Suku	:	Moraceae
Marga	:	Ficus
Jenis	:	<i>Ficus hispida</i>

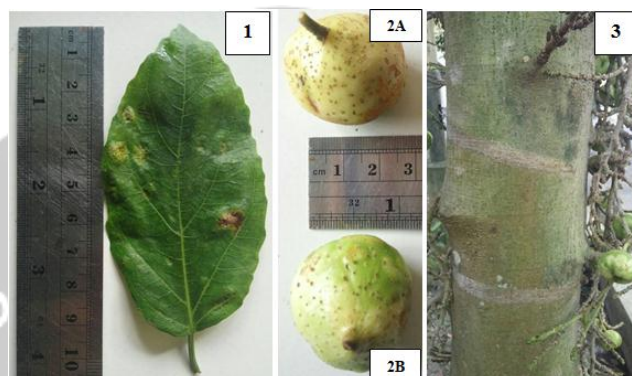


Gambar 4. Pohon luwingan yang tumbuh di sekitar kebun biologi Universitas Gadjah Mada (B) (Sumber: Dokumentasi pribadi, 2016)

Keterangan: Luwingan dapat tumbuh hingga 15 m, memiliki batang cokelat, bergetah dan buah muncul dari tangkai yang tumbuh dari mata tunas batang.

Luwingan memiliki daun (Gambar 5) yang berujung runcing membentuk seperti jantung, dan diselubungi oleh bulu kasar berwarna cokelat atau putih. Kulit batang luwingan berwarna cokelat (Lee dkk., 2013). Ekstrak daun luwingan di India dapat digunakan sebagai antidiare (daun) (Mandal dan Kumar, 2002), dan hepatoprotektif (daun) (Mandal dkk., 2000). Buah luwingan dilapisi oleh selapis epidermis dan dilapisi kembali oleh kutikula tebal dengan sedikit trikoma (Mandal dan Kumar, 2002). Buah luwingan mulai muncul dari pohon luwingan yang berusia 3 tahun. Buah dapat muncul

dalam satu tandan sebanyak 10-20 buah. Buah luwingan merupakan buah yang tumbuh sepanjang tahun (Corlett, 2006; Kuaraksa dkk., 2012).



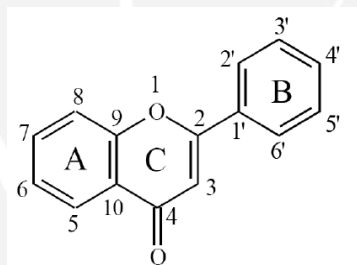
Gambar 5. Daun Luwingan (1), buah luwingan matang (2A); buah luwingan muda (2B), batang luwingan (3) (Sumber: Dokumentasi Pribadi, 2017)

Keterangan: Daun berbentuk seperti jantung berujung runcing (1), buah luwingan matang berwarna kuning, lebih mudah dilepas dari tangkainya (2A), sedangkan buah muda berwarna hijau, lebih sulit dilepas dari tangkainya (2B), batang tumbuhan luwingan berwarna coklat (3).

Buah luwingan (Gambar 5) kaya akan kalsium, fosfor, dan zat besi dengan tekstur daging lembut dan berbiji kecil (Corlett, 2006; Kuaraksa dkk., 2012). Buah luwingan diketahui mengandung fitokimia seperti alkaloid, karbohidrat, protein dan asam amino, sterol, fenol, flavonoid, glikosida, saponin, dan terpena (Ali dan Chaudhary, 2011). Jus buah luwingan yang dicampur dengan madu berguna sebagai antihemoragik (anti pendarahan) (Sergio dan Peraza, 2002). Penelitian Suranto (2016) mengungkapkan kadar flavonoid yang terkandung di dalam buah luwingan muda sebesar 0,211 mg/50mg, sedangkan yang terkandung di dalam buah luwingan matang sebesar 0,317 mg/50mg. Sementara itu, kandungan saponin buah muda sebesar 2,325 mg/50mg, sedangkan dalam buah matang sebesar 1,385 mg/50mg.

C. Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang termasuk senyawa fenol alam. Flavonoid terdapat pada semua bagian tumbuhan termasuk daun, akar, kayu, kulit tepung sari, nektar, bunga, buah, dan biji (Mabry dkk., 1970). Kerangka flavonoid (Gambar 6) terdiri atas satu cincin aromatik A, satu cincin aromatik B, dan cincin tengah berupa heterosiklik yang mengandung oksigen (Cook dan Samman, 1996).



Gambar 6. Struktur umum flavonoid (Sumber: Sudirman, 2014)

Keterangan: Flavonoid terdiri atas satu cincin aromatik (A), satu cincin aromatik (B), dan cincin tengah berupa heterosiklik yang mengandung oksigen.

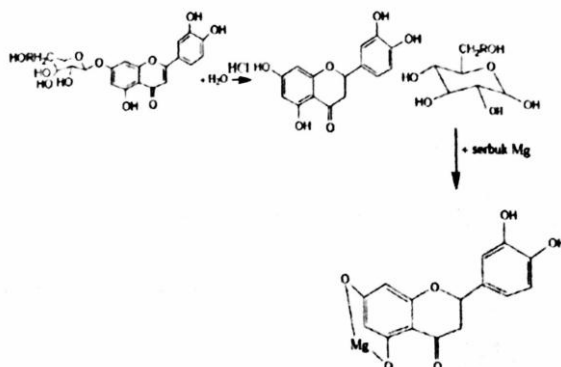
Jenis utama flavonoid adalah antosianidin, flavonol, flavone, flavonol, flavonone, dan isoflavon. Flavonol dan flavone merupakan senyawa pigmen tumbuhan kuning (Robinson, 1995). Flavonol dan flavone biasanya dalam bentuk O-glikosida (Hertog dkk., 1992). Flavonoid berperan sebagai antioksidan dengan cara penangkapan radikal bebas melalui donor atom hidrogen dari gugus hidroksil flavonoid (Miller, 1996).

Flavonoid memiliki manfaat sebagai antioksidan, antibakteri, antivirus, antiradang, antialergi, dan antikanker (Mabry dkk., 1970), serta pencegahan penyakit degeneratif seperti kanker dan kardiovaskular (Miller, 1996). Umur dan tingkat kematangan buah berpengaruh terhadap kadar flavonoid yang

terkandung dalam buah. Pada jenis buah putih, kandungan flavonoid buah muda akan lebih tinggi dibandingkan buah matang. Berbeda dengan buah berwarna merah yang kandungan antosianin dan flavonols akan meningkat selama tahap akhir pematangan buah (Marinova dkk., 2005). Oleh karena itu, pengujian buah luwangan menggunakan buah muda dan matang. Analisis fitokimia menjadi rangkaian penting dalam pengujian keamanan buah. Hal ini dikarenakan kandungan fitokimia dalam buah harus diketahui ketika akan diujikan ke makhluk hidup (Harbone, 1987). Oleh karena itu, dilakukan pengujian kualitatif dan kuantitatif terhadap buah luwangan muda dan matang.

1. Uji Kualitatif

Pengujian kualitatif flavonoid dapat dilakukan menggunakan 3 uji yaitu uji Wilstater dengan pereaksi Mg-HCl, uji Bate Smith-Metcalf dengan pereaksi H₂SO₄ pekat, dan uji dengan pereaksi larutan NaOH. Pengujian tersebut dilakukan karena memiliki prosedur yang sederhana dan praktis serta cukup akurat untuk pengujian sampel cair (Mabry dkk., 1970). Pada uji Wilstater, penambahan Mg-HCl dalam sampel akan membentuk gelembung-gelembung yang merupakan gas H₂. Mg-HCl berfungsi untuk mereduksi benzopiron yang terdapat pada struktur flavonoid sehingga terjadi adanya perubahan warna menjadi merah atau jingga yang menunjukkan terbentuknya garam flavilium (Gambar 7) (Tiwari dkk., 2011).



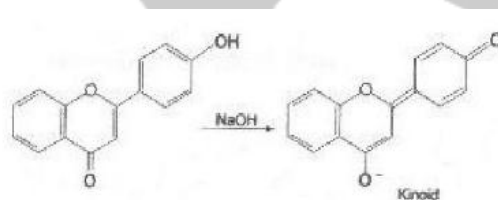
Gambar 7. Reaksi Uji Wilstater terhadap senyawa flavonoid (Sumber: Marlina dkk., 2005)

Keterangan: HCl pekat akan menghidrolisis flavonoid menjadi aglikonnya (O-glikosil) akibat penggantian H^+ oleh HCl pekat. Serbuk Mg mereduksi inti benzopiron dalam O-glikosil menghasilkan senyawa kompleks flavillium yang berwarna merah atau jingga.

Pada pengujian Bate Smith-Metcalf, pereaksi H_2SO_4 pekat akan membentuk perubahan warna menjadi orange sebagai reaksi positif karena terbentuknya garam flavilium (Achmad, 1986 dalam Marlina dkk., 2005).

Pada uji flavonoid dengan pereaksi NaOH akan terjadi perubahan warna dibandingkan dengan kontrol sebagai reaksi positif adanya flavonoid.

Penambahan NaOH akan bereaksi dengan flavonoid yang membentuk senyawa kinoid (Gambar 8) (Mulyani dan Laksana, 2011).



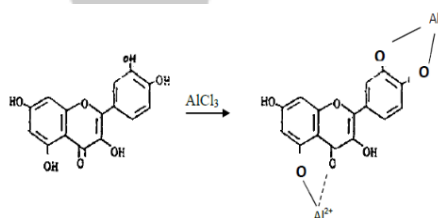
Gambar 8. Reaksi Flavonoid dengan NaOH (Sumber: Robinson, 1995)
Keterangan: Flavonoid bereaksi dengan NaOH menghasilkan senyawa kinoid.

2. Uji Kuantitatif

Penentuan kadar flavonoid dalam sampel herbal dapat ditentukan menggunakan berbagai metode. Metode spektrofotometri dengan prinsip

kolorimetri merupakan metode yang diakui oleh Departemen Kesehatan RI (Carbonaro dkk., 2005 dalam Neldawati dkk., 2013). Metode tersebut menggunakan AlCl_3 sebagai pereaksinya. Pengujian tersebut mengukur nilai absorbansi menggunakan panjang gelombang 510 nm. Uji kuantitatif dengan metode tersebut merupakan metode kuantifikasi flavonoid klasik yang paling banyak digunakan (Bruneton, 1999). Prinsip pengukuran kadar flavonoid menggunakan metode aluminium klorida yaitu terjadinya pembentukan kompleks antara aluminium klorida dengan gugus keto pada atom C-4 dan gugus hidroksi pada atom C-3 atau C-5 yang bertetangga dari golongan flavon dan flavonol (Azizah dkk., 2014).

Flavonoid mengandung sistem aromatis yang terkonjugasi dan dapat menunjukkan pita serapan kuat pada daerah UV-Vis (Harbone, 1987). Flavonoid bersama dengan AlCl_3 akan bereaksi membentuk kompleks tahan asam antara gugus hidroksi dan keton yang bertetangga, dan membentuk kompleks tahan asam dengan gugus ortohidroksi pada flavonoid (Mursyidi, 1990). Reaksi yang terjadi antara flavonoid dan AlCl_3 dapat terjadi apabila dalam flavonoid terdapat gugus O-hidroksi bebas (Mulyani dan Laksana, 2011).



Gambar 9. Reaksi Kuersetin dengan Aluminium Klorida (Sumber: Azizah dkk., 2014).

Keterangan: Penambahan AlCl_3 dalam kuersetin akan berikatan dengan gugus keto dan gugus hidroksi.

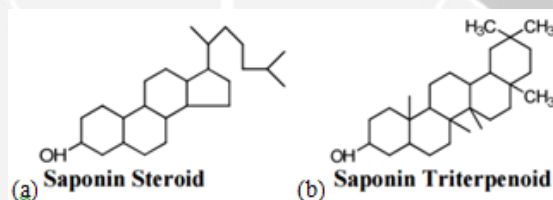
Penetapan kadar flavonoid dengan metode spektrofotometri UV-Vis menggunakan kuersetin sebagai standar. Kuersetin digunakan sebagai standar karena kuersetin merupakan flavonoid golongan flavonol yang memiliki gugus keto pada atom C-4 dan juga gugus hidroksil pada atom C-3 dan C-5 yang bertetangga. Reaksi kuersetin dengan $AlCl_3$ ditunjukkan pada Gambar 9 (Azizah dkk., 2014).

Kuersetin mampu mencegah proses oksidasi dari *Low Density Lipoprotein* (LDL). Kemampuan ini dikarenakan kuersetin dapat menangkap radikal bebas dan mengkelat logam transisi. Kuersetin akan mendonorkan protonnya ketika bereaksi dengan radikal bebas dan menjadi senyawa radikal. Namun, elektron tidak berpasangan yang dihasilkan di delokalisasi oleh resonansi. Hal ini membuat senyawa kuersetin radikal memiliki energi yang sangat rendah untuk menjadi radikal yang efektif (Waji dkk., 2009 dalam Neldawati 2013).

D. Saponin

Saponin merupakan jenis glikosida yang terdiri atas gula sebagai bagian glikon yang terikat pada sapogenin yang merupakan bagian aglikonnya (Harborne, 1987). Saponin memiliki beberapa sifat antara lain berasa pahit, dan berbusa dalam air sehingga mempunyai sifat detergen yang baik. Saponin dapat beracun bagi binatang berdarah dingin, tetapi tidak beracun bagi binatang berdarah panas, bersifat antieksudatif dan bersifat antiinflamasi (Robinson, 1995).

Saponin dalam konsentrasi rendah sering menyebabkan hemolisis sel darah merah pada tikus. Saponin dapat bereaksi netral (larut dalam air), beberapa ada yang bereaksi asam (sukar larut dalam air) dan sebagian kecil ada yang bereaksi dengan basa (Harborne, 1987; Sirait, 2007). Saponin dalam tanaman banyak ditemukan pada bagian akar, umbi, kulit pohon, biji dan buah. Saponin yang terdapat pada tumbuhan mayoritas adalah jenis triterpena (Wina dkk., 2005). Struktur saponin ditunjukkan pada Gambar 10



Gambar 10. Struktur Saponin Steroid (a) dan Saponin Triterpenoid (b) (Sumber: Jaya, 2010).

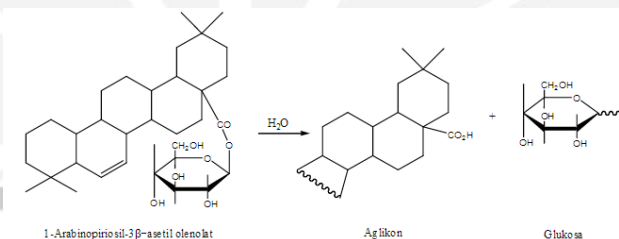
Keterangan: Saponin steroid merupakan saponin yang memiliki aglikon berupa steroid terdiri dari atom C 27 yang menempel pada unit karbohidrat (a); saponin triterpenoid merupakan saponin yang memiliki aglikon berupa triterpenoid terdiri dari atom C 30 yang menempel pada unit karbohidrat (b).

Saponin memiliki manfaat bagi kesehatan manusia seperti mencegah dan mengobati penyakit jantung koroner (akibat hipokolesterolemia) dan mencegah kanker kolon (Cheeke, 2001). Saponin dapat digunakan sebagai immunomodulator, antitumor, antiinflamasi, antivirus, antijamur, hipoglikemik, efek hipokolesterol (Tamamura dkk., 2012), meningkatkan aktivitas dari Limfosit T sitotoksik, dan menginduksi respon antibodi yang dapat melindungi tubuh dari antigen (Francis dkk., 2002)

1. Uji Kualitatif

Deteksi senyawa saponin secara kualitatif dapat dilakukan dengan uji *foam* dan uji Forth. Uji Forth ditunjukkan dengan terbentuknya busa

setelah dilakukan pengocokan secara vertikal selama 1 menit sebagai hasil positif (Tiwari dkk., 2011). Saponin bersifat menyerupai sabun sehingga apabila dikocok kuat akan menimbulkan busa karena adanya kombinasi sapogenin bersifat hidrofobik yang larut dalam lemak dan rantai gula yang bersifat hidrofilik (larut dalam air) (Naoumkina dkk., 2010). Saponin yang direaksikan dengan air akan membuat gugus hidrofil berikatan dengan air dan gugus hidrofob akan mengarah ke udara. Hal tersebut dikarenakan adanya gaya adhesif yang dapat terjadi dengan air lebih kecil dibandingkan dengan gaya kohesif antara molekul-molekul air (Martin dkk., 1993). Reaksi air dengan saponin dalam uji Forth ditunjukkan dalam Gambar 11.



Gambar 11. Reaksi Uji Forth (Sumber: Setyowati dkk., 2014)
Keterangan: Saponin terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lain apabila direaksikan dengan air.

2. Uji Kuantitatif

Deteksi total senyawa saponin secara kuantitatif dapat dilakukan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis dengan standar Quilaja Bark. Panjang gelombang yang digunakan yaitu 430 nm. Metode tersebut menggunakan pereaksi dari anisaldehyde-asam sulfat (Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu, 2016). Anisaldehyde (4-Methoxybenzaldehyde, C₈H₈O₂) yaitu senyawa yang dilarutkan dalam larutan asam sulfat, dapat tidak memiliki warna (*colourless*) sampai berwarna kuning. Anisaldehyde memiliki kelarutan yang baik dalam air

dan juga dapat bercampur dengan etanol (World Health Organization, 2006).

Anisaldehyde-asam sulfat termasuk reagen umum yang dapat digunakan untuk senyawa-senyawa fitokimia seperti antioksidan, steroid, prostaglandin, karbohidrat, fenol, glikosida, saponin, terpenoid, antibiotik, mikotoksin (Fried dan Sherma, 1999), flavonoid, dan saponin (D'Amelio, 1999). Reaksi saponin dengan anisaldehyd-asam sulfat menyebabkan penambahan panjang gugus kromofor sehingga terjadi peningkatan intensitas warna dan dapat dilihat pada sinar tampak (Octaviani, 2009). Saponin bersama dengan anisaldehyde-asam sulfat pada cahaya tampak akan menghasilkan warna biru hingga biru violet (Hostettmann dan Marston, 1995).

E. Uji Toksisitas

Suatu produk herbal dan bahan alam penting untuk dilakukan evaluasi terhadap toksisitas dan keamanannya. Hal tersebut diperkuat dengan langkah WHO yang menempatkan keamanan obat tradisional menjadi salah satu langkah penting di dalam strategi pengembangan obat tradisional periode 2014-2023 (World Health Organisation, 2013). Uji toksisitas merupakan pengujian yang dilakukan untuk mendeteksi efek toksik suatu zat terhadap sistem biologi sehingga diperoleh informasi mengenai derajat bahaya sediaan uji (Badan Pengawas Obat dan Makanan, 2014). Pengujian toksisitas terdiri dari beberapa uji antara lain uji toksisitas akut, uji toksisitas sub akut/sub kronis, uji toksisitas kronis, dan uji toksisitas spesifik (meliputi toksisitas pada

janin, mutagenesis, toksisitas topikal, dan toksisitas pada darah) (Menteri Kesehatan Republik Indonesia, 1992).

Uji toksisitas subkronis merupakan uji toksisitas yang dilakukan dengan memberikan suatu zat secara berulang-ulang. Pemberian suatu zat tersebut umumnya setiap hari atau lima kali seminggu selama jangka waktu kurang lebih 10% masa hidup hewan yaitu 3 bulan untuk tikus dan 1 atau 2 tahun untuk anjing (Harmita dan Radji, 2008). Uji toksisitas subkronis pada umumnya dirancang untuk mengevaluasi keseluruhan efek suatu senyawa pada hewan uji dan menggolongkannya apabila senyawa itu diberikan secara berulang sekali sehari selama masa waktu 3 bulan (90 hari) dan juga untuk memaparkan suatu bentuk efek toksik (Patanggu, 2010; Hendrarti dkk., 2012).

Pengujian toksisitas oral subkronis dilakukan setelah adanya informasi toksisitas dari uji toksisitas akut (28 hari). Uji toksisitas oral berdasar OECD 408 (*limit test*) ini memperhatikan *animal ethics* dan *animal welfare* antara lain dengan menempatkan hewan uji di *animal room* bersuhu 22°C, pencahayaan 12 jam terang dan 12 jam gelap, dan diberi pakan serta minum. Pengujian ini dapat menggunakan satu tingkat dosis dengan prosedur yang dideskripsikan OECD 408 dan apabila pengujian tersebut tidak menghasilkan toksisitas maka pengujian dengan tiga level dosis (*main test*) tidak diperlukan (Organisation for Economic Co-operation and Development, 1998).

Prinsip dari uji toksisitas oral subkronis yaitu pemberian sediaan uji yang dilakukan setiap hari pada beberapa kelompok hewan uji dan diamati setiap hari untuk menentukan toksisitas. Hewan uji yang mati selama periode

pemberian sediaan uji, dilakukan otopsi apabila belum melewati periode *rigor mortis* (kaku), kemudian organ diamati secara makropatologi dan histopatologi. Semua hewan uji yang belum mati pada akhir periode pemberian sediaan uji dilakukan otopsi, pengamatan setiap organ dan jaringan secara makropatologi, dan pengamatan hematologi, biokimia klinis dan histopatologi (Organisation for Economic Co-operation and Development, 1998; Badan Pengawas Obat dan Makanan, 2014).

Penelitian toksisitas oral subkronis dilakukan dengan tujuan mengetahui pengaruh pemberian tanaman obat terhadap organ tubuh yang penggunaannya dalam jangka panjang (Patanggu, 2010; Hendrarti dkk., 2012), memperoleh informasi adanya efek toksik zat yang tidak terdeteksi pada uji toksisitas akut, memperoleh informasi kemungkinan adanya efek toksik setelah pemaparan sediaan uji secara berulang dalam jangka waktu tertentu; mempelajari adanya efek kumulatif dan efek reversibilitas zat tersebut (Badan Pengawas Obat dan Makanan, 2014), dan mengetahui lebih jauh karakteristik pengaruh toksik spesifik dari senyawa kimia pada organ atau jaringan (Klassen dkk., 2001).

F. Koleksi Sampel Darah

Proses koleksi sampel darah pasti diperlukan pada penelitian toksisitas dengan parameter hematologis. Sampel darah yang digunakan yaitu *whoole blood*, merupakan darah dengan komposisi yang utuh yaitu terdapat sel darah merah, sel darah putih dan platelet. Hewan uji yang akan digunakan untuk diambil sampel darah terlebih dahulu dilakukan anestesi. Anestesi dapat

dilakukan menggunakan ketamin (ketalar) (Bishop dkk., 2010). Ketamin merupakan obat yang dapat digunakan untuk analgesik dan sedatif sehingga dapat mengurangi rasa sakit (Cottingham dan Thomson, 1994). Administrasi ketamin dapat dilakukan melalui *intramuscular* (Gambar 12) apabila injeksi *intravena* tidak memungkinkan seperti keadaan darurat, volume yang besar atau keadaan obesitas (Brown dkk., 2012 dalam Marland dkk., 2013).



Gambar 12. Administrasi secara *intramuscular* (Sumber: Krinke, 2000)
Keterangan: *handling* dilakukan oleh satu orang, satu orang lain menarik bagian kaki agar otot terlihat dan tangan lain memegang *sputit* untuk injeksi.

Koleksi sampel darah dapat dilakukan melalui *sinus orbitalis* (Gambar 13) (Hoff, 2000) dikarenakan darah dapat keluar dengan cukup banyak sehingga proses koleksi dapat cepat. Koleksi darah melalui metode ini memiliki rentang waktu yaitu minimal 2 minggu apabila akan dilakukan koleksi darah dengan metode yang sama. Hal ini dikarenakan agar hewan uji dapat mengembalikan serat jaringan ikat pada lokasi perdarahan (LaRegina dan Sharp, 1998). Maksimal volume darah yang dapat diambil didasarkan pada berat badan (Tabel 3).

Tabel 3. Volume Koleksi Darah Berdasarkan Berat Badan.

Berat Badan (g)	Volume darah (ml)	1% Volume Darah* (Setiap 24 jam)	7,5% Volume Darah* (Setiap 7 Hari)	10% Volume Darah* (Setiap 2-4 Minggu)
20	1,10-1,40	11-14 μ l	90-105 μ l	110-140 μ l
25	1,37-1,75	14-18 μ l	102-131 μ l	140-180 μ l
30	1,65-2,10	17-21 μ l	12-158 μ l	170-210 μ l
35	1,93-2,45	19-25 μ l	145-184 μ l	190-250 μ l
40	2,20-2,80	22-28 μ l	165-210 μ l	220-280 μ l
125	6,88-8,75	69-88 μ l	516-656 μ l	690-880 μ l
150	8,25-10,50	82-105 μ l	619-788 μ l	820-1000 μ l
200	11,00-14,00	110-140 μ l	825-1050 μ l	1,1-1,4 ml
250	13,75-17,50	138-175 μ l	1-1,3 ml	1,4-1,8 ml
300	16,50-21,00	165-210 μ l	1,2-1,6 ml	1,7-2,1 ml
350	19,25-24,50	193-2450 μ l	1,4-1,8 ml	1,9-2,5 ml

*Maksimal volume pengambilan darah

Sumber: National Institutes of Health, 2015.



Gambar 13. Koleksi darah melalui *sinus orbitalis* (Sumber: Hoff, 2000).
Keterangan: mikrohematokrit diarahkan masuk ke bagian bawah bola mata dengan sudut 45°.

Koleksi darah melalui *sinus orbitalis* dilakukan dengan memasukkan mikrohematokrit dengan sudut 45° ke bagian bawah bola mata hewan uji yang telah dianestesi (Hoff, 2000). Mikrohematokrit diputar dan darah dialirkan masuk ke *microtube* berisi EDTA agar darah tidak menggumpal (LaRegina dan Sharp, 1998). Koleksi darah dengan metode ini memiliki kelemahan yaitu dapat menyebabkan kebutaan hewan uji apabila tusukan mikrohematokrit mengenai saraf di permukaan tengah mata, dapat menyebabkan peradangan okuler, infeksi, kehilangan cairan mata dan keratitis apabila terjadi gerakan tak

terkendali dari hewan uji ketika kapiler mikrohematokrit memasuki mata (Hoff, 2000). Oleh karena itu metode ini membutuhkan keahlian khusus dan terlatih agar tusukan mikrohematokrit tidak mengakibatkan trauma pada hewan uji (Singgih, 2005 dalam Heryani 2016).

G. Tikus Putih Galur Wistar

Suatu hasil penelitian dalam bidang kedokteran dan farmasi harus terlebih dahulu dilakukan pengujian menggunakan hewan uji sebelum diterapkan pada manusia (Wongso dan Halimah, 2013). Hewan uji merupakan hewan yang sengaja dipelihara dan dikembangbiakkan untuk digunakan sebagai hewan model/hewan uji coba. Penelitian *in vivo* menggunakan hewan uji untuk mempelajari dan mengembangkan berbagai macam bidang ilmu dalam skala penelitian atau pengamatan laboratoris. Hewan uji yang sering digunakan dalam penelitian *in vivo* yaitu tikus (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988). Tikus umumnya digunakan dalam penelitian dengan kajian imunologi, onkologi, fisiologi, patologi, toksikologi, farmakologi, dan neurosains (Johnson, 2012 dalam Fitria dan Sarto 2014).

Tikus banyak digunakan dalam penelitian praklinik karena tikus memiliki karakteristik genetik yang mirip dengan manusia, mudah berkembang biak, murah dan mudah mendapatkannya. Tikus merupakan hewan yang melakukan aktivitasnya pada malam hari (*nocturnal*) (Sirois, 2005). Salah satu tikus yang banyak digunakan dalam penelitian sebagai hewan percobaan yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) (Malole dan Pramono, 1989). Tikus putih (*Rattus norvegicus*) atau dikenal dengan nama lain *Norway*

Rat (Sirois, 2005) yang berkembang biak di Filipina, Indonesia, Laos, Malaysia, dan Singapura (Adiyati, 2011).

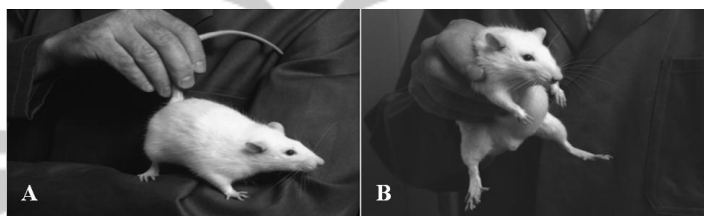
Menurut Krinke (2000), klasifikasi tikus putih (*Rattus norvegicus*) yaitu sebagai berikut:

Kerajaan	: Animalia
Divisi	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Bangsa	: Rodentia
Suku	: Muridae
Marga	: <i>Rattus</i>
Jenis	: <i>Rattus norvegicus</i>

Berat badan tikus putih dapat mencapai 35-40 g pada umur empat minggu, sedangkan setelah dewasa dapat mencapai 200-250 g yang akan bervariasi tergantung galurnya. Berat badan tikus jantan tua mencapai 500 g, tetapi tikus betina jarang yang melebihi 350 g (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988). Hal tersebut terkait adanya ekspresi hormon androgen (testosteron) pada jantan yang berfungsi dalam mengendalikan pertumbuhan, dimulai dari masa pubertas dengan target kulit, otot, tulang, dan metabolisme air dan garam sehingga massa tubuh hewan jantan lebih tinggi dibandingkan betina (Kaltelback dan Dunn, 1980 dalam Fitria dan Sarto, 2015). Kebutuhan pakan bagi seekor tikus setiap harinya kurang lebih sebanyak 10% (pakan kering) dari bobot tubuhnya atau 15% (pakan basah) dari bobot tubuhnya. Kebutuhan minum seekor tikus setiap hari kira-kira 15-30 mL air. Jumlah ini dapat berkurang jika pakan yang dikonsumsi sudah banyak mengandung air (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988). Pemberian minum secara *ad libitum* selama 12-

24 jam dapat membantu proses fisiologis dan adaptasi tikus, juga dapat meminimalisir terjadinya stress psikologis (Rowland, 2007).

Suhu badan tikus normal yang diukur melalui rektal yaitu 35,9 – 37,5 °C (LaRegina dan Sharp, 1998). Perilaku normal tikus yaitu memanjat, berjalan dan berdiri dengan lengan kaki belakangnya, meregangkan tubuhnya, menggali, menggerogoti, mencari makan, *grooming*, dan gerakan mundur untuk bersembunyi (Chave, 2007). Selain itu, tikus juga menunjukkan perilaku bermain seperti melompat, mengejar, dan bertengkar dengan tikus lain (Scharmman, 1991 dalam Chave, 2007). Perilaku tersebut diperlukan untuk kesejahteraan tikus, pengembangan sosial dan seksual yang normal (Lawlor, 2002 dalam Chave, 2007). Panksepp (1981) dalam Chave (2007) juga menambahkan fungsi dari bermain yaitu membangun hubungan sosial yang stabil. Cara penanganan (*handling*) tikus ditunjukkan dalam Gambar 14.



Gambar 14. Cara *Handling* Tikus Putih Wistar (Sumber: Koolhaas, 2010). Keterangan: cara memegang (*handling*) yang baik tikus yang baru pertama dipegang (A); dan tikus yang telah biasa dipegang (B).

Tikus Wistar (albino) (Gambar 15) dikembangkan pertama kali di Wistar Institute (Philadelphia, PA) pada tahun 1906 dengan nama katalog WISTARAT[®]. Galur ini terus dibiakkan hingga kini karena ideal sebagai hewan model untuk berbagai tujuan penelitian (Clause, 1998; Wistar Institute, 2014; River, 1998 dalam Fitria dan Sarto, 2014). Tikus Wistar memiliki ciri kepala lebar, telinga panjang, memiliki panjang ekor yang selalu kurang dari

panjang tubuhnya, dan lebih aktif (agresif) daripada jenis lain seperti tikus *Sprague dawley* (Sirois, 2005). Tikus Wistar adalah salah satu hewan coba yang paling banyak digunakan sebagai model dalam penelitian biomedik (Johnson, 2012 dalam Fitria dan Sarto, 2014) karena memiliki metabolisme yang menyerupai manusia, ideal untuk berbagai tujuan penelitian dan telah banyak digunakan dalam penelitian praklinik (Fitria dan Sarto, 2014).



Gambar 15. Tikus Putih Galur Wistar (Sumber: Janvier-Labs, 2016)
Keterangan: Tikus putih galur Wistar memiliki kepala lebar, telinga panjang,

H. Hipotesis

Pemberian *per oral* filtrat buah luwangan (*Ficus hipida* L.f) pada tikus putih (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) galur Wistar setiap hari selama 90 hari (uji toksisitas oral subkronis) aman terhadap profil hematologis yang diindikasikan melalui profil eritrosit (jumlah eritrosit total, kadar hemoglobin, presentase hematokrit), profil leukosit (jumlah leukosit total, jumlah neutrofil, dan jumlah limfosit), dan jumlah trombosit tetap berada dalam kisaran normal.