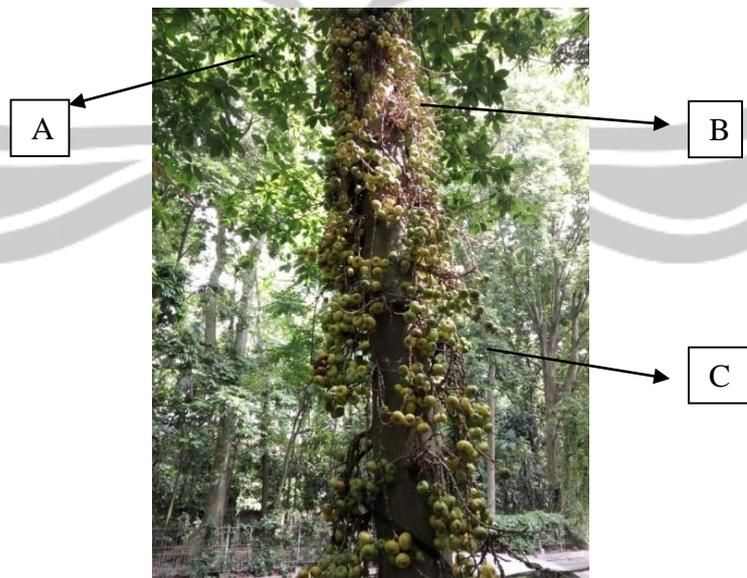


II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Buah Luwingan (*Ficus hispida* L.f.)

Luwingan (*Ficus hispida* L.f.), umumnya dikenal dengan ara berbulu atau ara bertangkai daun kasar merupakan tumbuhan dari suku Moraceae dengan tinggi pohon mencapai sekitar 15 meter dan diameter pohon dapat mencapai 40 cm. Tumbuhan ini merupakan tumbuhan tropis, biasanya dapat ditemukan dan tumbuh secara liar di lahan terbuka, tepi rawa, tepi sungai, hutan sekunder pada ketinggian di bawah 1000 mdpl (Lee dkk., 2013). Luwingan terdistribusi di beberapa negara tropis yaitu India (Gobla), Indonesia (Luwingan), Thailand (Ma Dau Plong), Bengali (Dummor), Tamil (Peyatti), Papua Nugini, Australia-Queensland, Sri Lanka, Myanmar, dan China Selatan (Lansky dan Paavilainen, 2011).



Gambar 1. Pohon luwingan (*Ficus hispida* L.f.) di kebun Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada (Sumber: Dokumentasi Pribadi, 2016).

Keterangan : Pohon luwingan dengan (A) daun luwingan, (B) batang luwingan, dan (C) gerombolan buah dalam tandan atau tangkai.

Menurut Lee dkk., (2013), luwungan mempunyai klasifikasi yaitu:

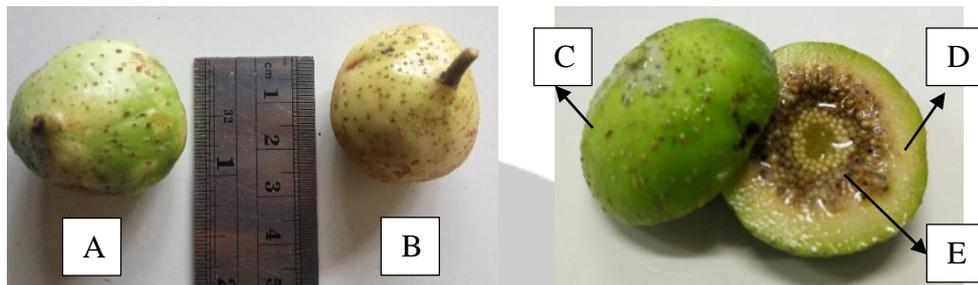
Kerajaan : Plantae
 Divisi : Magnoliophyta
 Kelas : Magnoliopsida
 Ordo : Urticales
 Famili : Moraceae
 Genus : Ficus
 Spesies : *Ficus hispida* L.f.

Pohon luwungan (Gambar 2A) memiliki batang berwarna coklat hingga abu – abu dan bergetah, bercabang banyak. Ranting daun luwungan memiliki bulu kasar dengan tipe percabangan *opposite*. Daun luwungan (Gambar 2B) memiliki helai seperti kertas (tipis), berujung runcing, berpangkal rata, tepi daun bergerigi dengan permukaan atas dan bawah yang memiliki bulu kasar berwarna coklat sampai putih serta ujung daun luwungan terdapat sepasang kelenjar lilin. Pohon luwungan akan menghasilkan buah ketika telah mencapai usia 3 tahun dengan buah bergerombol sebanyak 10-20 buah per tandan yang akan berbuah sepanjang tahun (Lee dkk., 2013).



Gambar 2. Batang pohon luwungan (A) dan daun luwungan (B) (Dokumentasi pribadi, 2017)

Keterangan : (A) Batang pohon berwarna coklat dan bergetah yang ditunjukkan dengan warna hitam pada batang serta bercabang banyak, dan (B) daun luwungan berwarna hijau, berujung runcing dengan pangkal rata dan memiliki panjang sekitar ± 10 cm.



Gambar 3. Buah luwungan (*Ficus hispida* L.f.) (Sumber: Dokumentasi pribadi, 2016)

Keterangan : (A) Buah luwungan muda berwarna hijau berstektur keras dan (B) buah luwungan matang berwarna kuning berstektur lunak, (C) lapisan kulit buah atau lapisan epidermis dengan kutikula, (D) daging buah luwungan, dan (E) bunga buah yang akan menjadi bakal biji buah.

Tumbuhan ini tergolong dalam tumbuhan berumah dua karena syconia betina mengandung bunga betina yang akan menjadi bakal biji buah sementara syconia jantan mengandung polen (Lee dkk., 2013). Buah luwungan (Gambar 3) dilapisi oleh lapisan epidermis dan kutikula tebal dengan sedikit trikoma (Mandal dan Kumar, 2002). Buah luwungan berbentuk bulat dengan diameter sekitar 40 mm dan biji buahnya kecil berbentuk pipih oval. Buah luwungan muda atau mentah berwarna hijau (Gambar 3A) dengan tekstur buah keras sedangkan buah luwungan yang matang (Gambar 3B) berwarna kuning kecoklatan dengan tesktur buah lunak (Corlett, 2006 ; Kuaraksa dkk., 2012).

Di berbagai negara, luwungan merupakan tumbuhan yang memiliki banyak kegunaan dan telah banyak dimanfaatkan sebagai bahan pangan maupun obat tradisional (Lee dkk., 2013). Di India, luwungan karena sifat farmakologisnya, digunakan sebagai antidiare dan hepatoprotektif (Ali dan Chaudhary, 2011). Di India, dekok kulit kayu luwungan digunakan untuk mengobati penyakit batuk serta ekstrak air panas kulit kayu kering luwungan

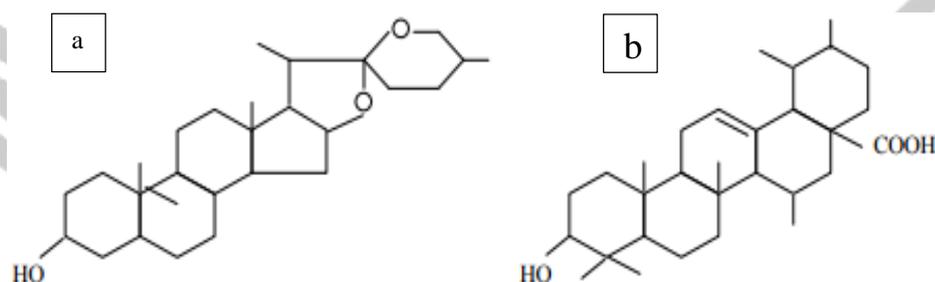
digunakan untuk mengobati anemia, penyakit kuning, dan kusta. Di Malaysia, ekstrak air panas daun luwungan diminum untuk membantu proses kelahiran. Di Bangladesh, akar kering luwungan yang diminum bersama dengan air beras dapat mengurangi rasa sakit ketika menstruasi (Lansky dan Paavilainen, 2011). Di Indonesia, khususnya di Yogyakarta, luwungan dapat ditemukan di proyek Taman Kehati, Tepus, Kabupaten Gunung Kidul sebagai keanekaragaman tumbuhan lokal di DIY (Kehati, 2009 dalam Fitria dkk., 2015).

B. Komponen Fitokimia Buah Luwungan

Uji fitokimia adalah pemeriksaan kandungan kimia untuk mengetahui senyawa kimia atau senyawa bahan alami yang terkandung dalam suatu tumbuhan (akar, batang, bunga, buah, dan biji), baik secara kualitatif ataupun kuantitatif. Pada umumnya, pemeriksaan fitokimia lebih diarahkan pada senyawa metabolit sekunder (Murni, 2012). Uji fitokimia buah luwungan diketahui mengandung berbagai senyawa bioaktif yaitu alkaloid, karbohidrat, protein dan asam amino, sterol, fenol, flavonoid, glikosida, saponin, dan terpena (Ali dan Chaudhary, 2011). Buah tin (*Ficus carica*) memiliki kesamaan genus dan beberapa kandungan senyawa aktif dengan buah luwungan antara lain saponin dan flavonoid (Lansky dan Paavilainen, 2011) sehingga menimbulkan dugaan adanya kesamaan potensi dan manfaat yang sama. Oleh sebab itu, pengujian fitokimia terhadap senyawa saponin dan flavonoid merupakan hal yang penting untuk dilakukan. Hal ini disampaikan oleh Wurdianing dkk. (2014), bahan dengan kandungan senyawa flavonoid dan saponin dapat bersifat sebagai antioksidan yang berperan terhadap mekanisme perbaikan profil lipid.

1) Saponin

Saponin (Gambar 4) adalah glikosida alami yang mempunyai sifat aktif permukaan yang bersifat amfifilik dengan struktur molekulnya terdiri dari aglikon steroid atau triterpen yang disebut dengan sapogenin dan glikon yang mengandung satu atau lebih rantai gula (Bogoriani, 2015). Sifat amfifilik karena sapogenin bersifat lipofilik yang dapat membentuk ikatan dengan lipid (non polar) sedangkan bagian rantai gula bersifat hidrofilik yang dapat berikatan dengan air (polar) (Naoumkina dkk., 2010 dalam Bogoriani, 2015). Saponin mampu membentuk larutan koloidal dalam air dan membentuk busa yang mantap jika dikocok dan tidak hilang dengan penambahan asam kuat, misalnya HCl (Harborne, 1998). Kemampuan pembentukan busa pada saponin disebabkan oleh kombinasi sifat lipofilik dari sapogenin dan sifat hidrofilik dari bagian rantai gula (Naoumkina dkk., 2010 dalam Bogoriani, 2015).



Gambar 4. Tipe aglikon pada senyawa saponin (Sumber: Farnsworth, 1966)
Keterangan : Berdasarkan struktur aglikonnya, saponin dibedakan menjadi (a) tipe steroida dan (b) tipe triterpenoda, keduanya memiliki hubungan glikosidik pada atom C-3.

Saponin berperan menghambat penyerapan kolesterol di usus dengan membentuk senyawa kompleks yang besar dan tidak larut sehingga kolesterol akan dikeluarkan dari tubuh bersama dengan feses yang

merupakan lintasan utama untuk mengeluarkan kolesterol. Hal ini mencegah kenaikan kadar kolesterol dalam darah dan hati yang merupakan tempat metabolisme kolesterol. Aktivitas penghambatan penyerapan kolesterol dihitung dengan mengukur kadar sterol dalam feses (Wilcox dan Galloway, 1961; Malinow dkk., 1977).

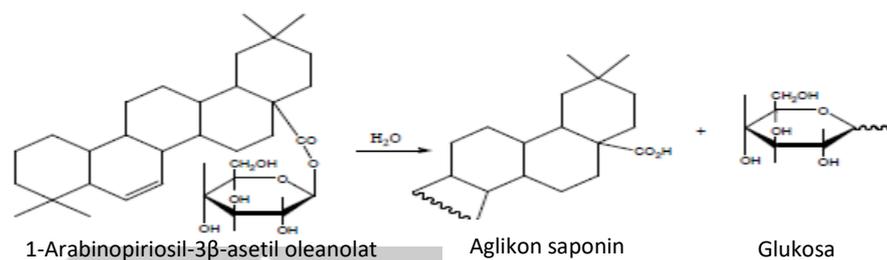
Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Lee dkk. (2005), saponin akan berikatan dengan asam empedu (hasil sintesis kolesterol dalam hati, disimpan dalam kantung empedu, dan dilepaskan dalam usus) membentuk misel sehingga kemampuan asam empedu untuk membentuk misel dengan lipid akan berkurang dan meningkatkan ekskresi asam empedu di dalam feses. Hal ini menyebabkan konversi kolesterol menjadi asam empedu meningkat untuk mempertahankan depot asam empedu sehingga reseptor LDL dari hati juga akan meningkat. Adanya peningkatan reseptor LDL mengakibatkan terjadinya peningkatan pengangkutan LDL dan penurunan kadar kolesterol dalam darah (Wurdianing dkk., 2014).

Menurut penelitian Sato dkk., (2011), saponin juga mampu menurunkan kadar trigliserida dengan menghambat aktivitas lipase pankreas yang berfungsi untuk menghidrolisis asam lemak posisi 1 dan 3 gugus gliserol pada triasilgliserol menjadi asam lemak bebas dan 2-monoasilgliserol. Senyawa hasil hidrolisis tersebut oleh reaksi enzimatik akan membentuk triasilgliserol di dalam sel epitel usus. Adanya penghambatan aktivitas lipase pankreas berdampak terhadap menurunnya kadar triasilgliserol atau trigliserida di usus (Wurdianing dkk., 2014).

Kadar saponin dalam buah luwungan akan menurun seiring dengan tingkat kemasakan buah (Puspitasari, 2016). Buah muda akan memiliki kandungan saponin yang lebih tinggi dibandingkan dengan buah matang. Buah muda biasanya memiliki rasa yang lebih pahit atau ketir daripada buah matang karena adanya saponin yang berfungsi untuk melindungi diri dari serangga (Krueger dan Potter, 1994). Penelitian Puspitasari (2016), menunjukkan bahwa kandungan saponin dalam buah luwungan muda lebih tinggi yaitu sebesar 2,325 mg/50 mg dibandingkan buah luwungan matang sebesar 1,385 mg/50 mg. Faktor yang memengaruhi kadar saponin dalam tumbuhan adalah umur fisiologis dan lingkungan tempat tumbuh (Puspitasari, 2016). Uji fitokimia senyawa saponin pada buah luwungan secara kualitatif dan kuantitatif dapat dilakukan seperti berikut:

a) Uji kualitatif

Uji senyawa saponin secara kualitatif dalam sampel dapat dilakukan dengan metode Forth, yaitu hidrolisis saponin dalam air. Hasil positif uji ini ditandai dengan timbulnya busa/buih stabil selama 30 detik apabila ditambahkan akuades dan penggojogan selama 30 detik (Marliana dkk., 2005; Robinson, 1995). Timbulnya busa menunjukkan adanya glikosida yang mempunyai kemampuan membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya (Marliana dkk, 2005). Reaksi yang terjadi pada uji ini dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Reaksi uji Forth senyawa saponin (Sumber: Marlina dkk., 2005).

Keterangan: Senyawa saponin berupa 1-Arabinopiriosil-3β-asetil oleanolat dengan penambahan air akan terhidrolisis menjadi glukosa dan aglikon saponin berupa saponin yang menimbulkan buih.

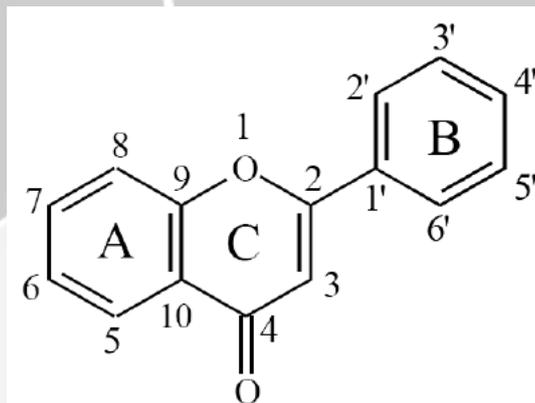
b) Uji kuantitatif

Penentuan total saponin dalam sampel dapat dilakukan dengan metode anisaldehida menggunakan reagen anisaldehida dan asam sulfat (Vador dkk., 2012). Anisaldehida merupakan gugus aromatik yang bila direaksikan dengan saponin dan sulfat akan menghasilkan warna biru kehitaman (Jork dkk., 1990 dalam Octaviani, 2016). Penggunaan metode ini dilakukan melalui pengukuran kadar absorbansi pada spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang yaitu 435 nm (Vador dkk., 2012). Kalibrasi kurva dilakukan terhadap akuades, ekstrak saponin senyawa organik, dan saponin komersial berupa Quilaja Bark (Ing-Luen dkk., 2009).

2) Flavonoid

Flavonoid (Gambar 6) termasuk dalam senyawa polifenol dan sering ditemukan pada berbagai tumbuhan dalam bentuk glikosida atau gugusan gula bersenyawa pada satu atau lebih grup hidroksil fenolik. Flavonoid merupakan turunan senyawa fenol, warnanya berubah bila

ditambah basa dan amonia, larut dalam air dan dapat diekstrak dengan etanol 70 % (Khotma, 2014). Flavonoid mempunyai aktivitas biologis dan farmakologis, antara lain sebagai antibakteri, antiinflamasi, inhibisi enzim, aktivitas alergi, aktivitas antitumor sitotoksik (Sudirman, 2014).



Gambar 6. Kerangka golongan flavonoid (Kuersetin) (Sumber: Sudirman, 2014).

Keterangan: Struktur kimia dengan rangka dasar 15 atom karbon yang tersusun dalam konfigurasi C₆-C₃-C₆ yang terdiri dari dua cincin benzen (C₆) yang terikat pada rantai propana (C₃).

Senyawa metabolit flavonoid terbukti dapat menghambat sekresi Apolipoprotein B (ApoB) dan membantu meningkatkan ekspresi reseptor LDL (*Low Density Lipoprotein*) (LDLr) (Casaschi dkk., 2002). ApoB merupakan komponen penting dari banyak lipoprotein yaitu kilomikron, VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*), IDL (*Intermediate Density Lipoprotein*), LDL yang dikenal sebagai kolesterol “jahat” karena menyebabkan aterosklerosis dan penyakit jantung. Meningkatnya sekresi ApoB berhubungan dengan berkurangnya fungsi reseptor LDL (LDLr) dan sebaliknya (Verd dkk., 1999). LDLr berbanding terbalik dengan LDL kolesterol, semakin banyak jumlah LDLr maka jumlah LDL kolesterol

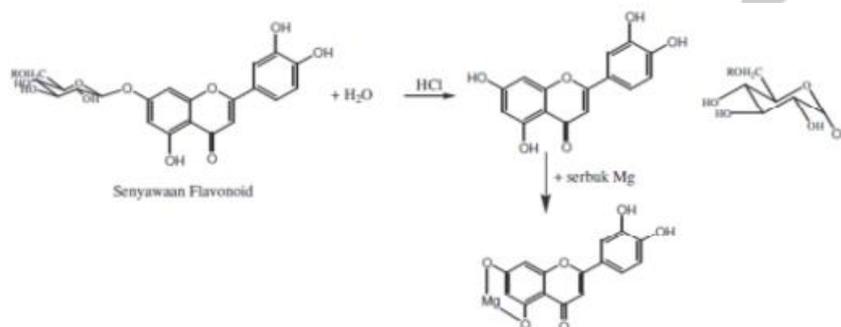
dalam darah semakin sedikit dan sebaliknya. Bertambahnya jumlah LDLr maka penyerapan LDL kolesterol dalam darah semakin meningkat sehingga kadar kolesterol dalam darah akan menurun (Musa dkk., 2007).

Selain itu, penelitian lain juga menunjukkan bahwa flavonoid akan meningkatkan aktivitas *lecithin cholesterol acyl transferase* (LCAT) yaitu enzim yang mengubah kolesterol bebas menjadi ester kolesterol dan sangat penting untuk pematangan metabolisme HDL. Ester kolesterol yang dikumpulkan oleh HDL kolesterol akan dikembalikan ke hati sehingga kolesterol dalam darah juga akan menurun (Lee dkk., 2012 dalam Wurdianing dkk., 2014). Flavonoid dapat digunakan sebagai antioksidan dengan menurunkan oksidasi LDL dan meningkatkan produksi *nitric oxide* (NO). NO merupakan vasolidator endogen yang mempunyai kemampuan sebagai anti aterosklerosis (Vita, 2005).

Pada umumnya, kandungan senyawa fenolik dalam buah akan semakin berkurang seiring dengan proses pematangan buah. Seiring dengan tingkat kematangan, pada buah dengan daging buah putih kandungan senyawa flavonoid akan semakin berkurang sedangkan pada buah dengan daging buah merah kandungan senyawa flavonoid akan semakin meningkat (Marinova dkk., 2005). Penelitian Puspitasari (2016) menunjukkan bahwa buah luwungan matang memiliki kandungan flavonoid yang lebih tinggi sebesar 0,317 mg/50 mg dibandingkan buah luwungan muda sebesar 0,211 mg/50 mg. Uji fitokimia senyawa saponin pada buah luwungan secara kualitatif dan kuantitatif dapat dilakukan seperti berikut:

a) Uji kualitatif

Uji senyawa saponin secara kualitatif dapat dilakukan dengan 3 metode uji yaitu metode Wilstater, metode Bate Smith dan Matcalfe, dan metode uji dengan NaOH 10 % (Geissman, 1962 dalam Maulana dkk., 2016). Metode Wilstater dilakukan dengan menambahkan serbuk Mg dan larutan HCl pekat pada sampel. Logam Mg dan HCl akan bereaksi dengan senyawa flavonoid membentuk gelembung – gelembung gas H_2 dan mereduksi inti benzopiron yang terdapat dalam flavonoid. Adanya flavonoid pada sampel akan menunjukkan hasil positif dengan menghasilkan warna merah atau jingga karena terbentuknya garam flavillium (Prashant dkk., 2011). Reaksi yang terjadi pada metode Wilstater adalah sebagai berikut Gambar 7:



Gambar 7. Reaksi uji metode Wilstater senyawa saponin (Sumber: Marliana dkk., 2005).

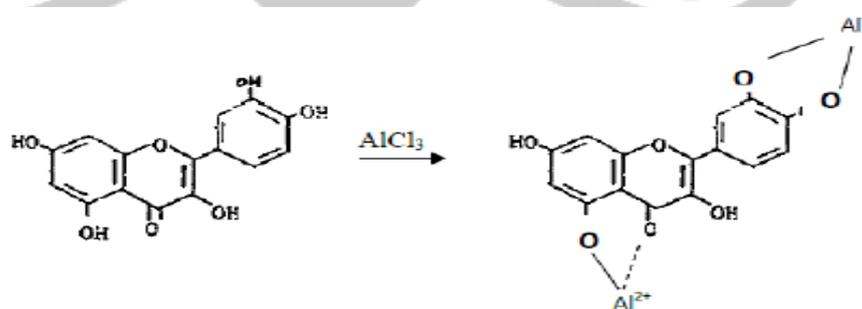
Keterangan : Flavonoid akan terhidrolisis menjadi aglikonnya yaitu O-glikosil akibat penggantian H^+ oleh larutan HCl pekat. Penambahan serbuk Mg akan mereduksi inti benzopiron dalam O-glikosil menghasilkan senyawa kompleks flavillium yang berwarna merah atau jingga.

Metode Bate Smith dan Mertcalf dilakukan dengan penambahan H_2SO_4 yang akan menunjukkan hasil positif dengan menghasilkan warna merah tua dan ungu (Marliana dkk., 2005). Penggunaan NaOH 10%

dalam identifikasi senyawa flavonoid akan menunjukkan hasil positif dengan menghasilkan warna kuning muda (Mabry dkk., 1997 dalam Maulana dkk., 2016).

b) Uji Kuantitatif

Penentuan konsentrasi flavonoid total dilakukan dengan metode kolorimetri aluminium klorida dengan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang maksimal 510 nm secara spektrofotometri berdasarkan pembentukan warna. Metode ini dapat digunakan untuk menentukan jumlah flavonoid golongan flavon dan flavonol (Cahyanta, 2016). Prinsip metode ini adalah terbentuknya kompleks antara AlCl_3 dengan gugus keto pada atom C-4 dan gugus hidroksi pada atom C-3 atau C-5 yang bertetangga dari flavon dan flavonol. Penggunaan kuersetin sebagai pembanding dalam pembuatan kurva kalibrasi karena kuersetin merupakan flavonoid golongan flavonol yang memiliki gugus keto pada C-4 gugus hidroksi pada atom C-3 atau C-5 yang bertetangga dari flavon dan flavonol (Azizah dkk., 2014). Reaksi dilihat pada Gambar 8 berikut:



Gambar 8. Reaksi aluminium klorida dengan senyawa kompleks kuersetin (Sumber: Azizah dkk., 2014).

Keterangan : Senyawa kuersetin akan bereaksi membentuk ikatan pada gugus keto dan gugus hidroksi dengan penambahan AlCl_3 yang menghasilkan warna yang dapat diukur pada panjang gelombang 510 nm.

C. Lipid

Lipid merupakan salah satu komponen penting yang dibutuhkan oleh tubuh karena berfungsi sebagai bahan dasar pembuatan hormon, sumber energi, sebagai komponen struktural membran sel serta membantu proses pencernaan. Sumber lipid dapat berasal dari makanan yang dikonsumsi dan disintesis dalam hati. Lipid yang sering ditemui dalam plasma darah adalah kolesterol, trigliserida, asam lemak, dan fosfolipid. Kolesterol merupakan komponen yang hanya di temukan dalam hewan dan merupakan kunci dari membran komponen semua sel. Kolesterol adalah alkohol steroid dengan 27 karbon atom yang terusun menjadi cincin tetrasiklik sterana dengan C-H di rantai samping. Asam lemak merupakan komponen penting manusia dalam metabolisme dan nutrisi, terdapat dalam makanan yang terdiri dari asam lemak jenuh dan asam lemak tidak jenuh. Trigliserida merupakan salah satu jenis lemak yang terdapat dalam 95% jaringan sebagai lemak cadangan dan biasanya diperoleh dari tanaman (Burtis dkk., 2008). Fosfolipid merupakan unsur utama pembentuk lipid, komponen lipid yang berikatan dengan asam fosfat, selain itu juga mengandung asam lemak dan alkohol (Mayes, 2003).

Lipid berikatan dengan protein secara kovalen membentuk senyawa yang larut dalam air dan beredar dalam plasma darah yaitu lipoprotein. Lipoprotein terbagi menjadi lima fraksi sesuai dengan berat jenisnya yaitu adalah kilomikron, *very low density lipoprotein* (VLDL), *intermediate density lipoprotein* (IDL), *low density lipoprotein* (LDL) dan *high density lipoprotein* (HDL) (Wiryowidagdo dan Sitanggang, 2002). Pemantauan profil lipid penting dilakukan untuk memantau risiko terjadinya penyakit akibat gangguan

metabolisme lipid. Pemeriksaan variabel profil lipid yang diamati meliputi kadar kolesterol total, kadar HDL (*High Density Lipoproteins*), LDL (*Low Density Lipoproteins*) dan kadar trigliserida dalam darah (*American Association for Clinical Chemistry*, 2015 dalam Fitria dkk., 2015). Pengamatan komponen profil lipid dapat meliputi :

1) Kolesterol Total

Kolesterol merupakan senyawa steroid yang terdapat dalam hewan dan manusia dan termasuk dalam komponen lipoprotein. Kolesterol yang terdapat dalam hewan dan manusia berasal dari sintesis kolesterol dalam tubuh dan asupan makanan (Hu dkk., 2001). Kolesterol terdapat di dalam jaringan dan lipoprotein plasma baik dalam bentuk kolesterol bebas atau gabungan dengan asam lemak rantai panjang sebagai ester kolesterol. Kolesterol disintesis dari asetil-coA di dalam hati dan akhirnya dikeluarkan dari tubuh lewat empedu sebagai garam empedu (Widyaningsih dkk., 2010).

Kolesterol yang berasal dari asupan makanan masuk ke dalam usus halus, dibawa oleh kilomikron (salah satu lipoprotein) ke dalam hati untuk dimetabolisme membentuk asam empedu dan sebagian menjadi *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL). VLDL mengalami proses penguraian lipid secara bertahap sehingga VLDL menjadi lebih diperkaya kolesterol. VLDL dimetabolisme oleh lipoprotein lipase menjadi *Low Density Lipoprotein* (LDL) melalui zat antara IDL secara endositosis. Vesikel yang mengandung IDL (*Intermediate Density Lipoprotein*) bergabung dengan lisosom dan enzim lisosom untuk menghidrolisis IDL menjadi kolesterol. Kolesterol

diubah menjadi ester kolesterol dalam badan golgi dan berdifusi ke dalam membran sel sehingga mampu meningkatkan kadar kolesterol dalam darah (Philip dkk., 2007). Kadar kolesterol darah normal pada tikus galur Wistar jantan dan betina adalah 10-54 mg/dl (Smith dan Mangkoewidjojo, 1998).

2) Kolesterol HDL (*High Density Lipoprotein*)

HDL merupakan kolesterol yang bersifat “baik” karena memiliki fungsi yaitu mengangkut kelebihan kolesterol dari jaringan perifer menuju ke hepar sehingga kadar kolesterol dalam darah menurun dan menghambat perkembangan plak atheroma, sehingga kadar HDL yang tinggi dalam darah akan mencegah terjadinya resiko aterosklerosis (Philip dkk., 2007). Molekul ini memiliki ukuran relatif kecil sehingga dapat melewati sel endotel vaskular dan masuk ke dalam intima untuk mengangkut kembali kolesterol yang terkumpul dalam makrofag. HDL juga mempunyai sifat antioksidan sehingga dapat mencegah terjadinya oksidasi LDL. Kadar HDL yang rendah di dalam darah, maka semakin besar resiko aterosklerosis dan penyakit jantung koroner (Harini dan Astirin, 2009). Kadar HDL normal pada tikus jantan dan betina adalah >35 mg/dl (Gani dkk., 2013).

3) Kolesterol LDL (*Low Density Lipoprotein*)

LDL merupakan lipoprotein yang mengangkut kolesterol dari hati menuju ke pembuluh darah sehingga disebut kolesterol yang bersifat “jahat” karena kadar LDL yang tinggi akan menyebabkan penebalan dinding pembuluh darah dan meningkatkan resiko aterosklerosis (Anwar, 2004). Secara fisiologis, fungsi utama LDL adalah memasok kolesterol ester untuk

kebutuhan metabolik, seperti pembentukan hormon dan membran sel di seluruh jaringan tubuh. Di jaringan ikat longgar sub-endotel kapiler, LDL mudah mengalami oksidasi akibat terjadinya peroksidasi asam lemak tidak jenuh majemuk pada membran LDL karena meningkatnya radikal bebas oksigen. Peroksidasi LDL yang ringan menyebabkan timbulnya disfungsi endotel, sedangkan peroksidasi LDL lebih lanjut menyebabkan LDL teroksidasi secara maksimal menimbulkan sel awal aterosklerosis (Muljadi, 2010). Menurut Setyawati dkk., (2010), kadar LDL plasma darah normal pada tikus jantan dan betina adalah 7 – 27,2 mg/dL.

4) Trigliserida

Trigliserida merupakan salah satu jenis lemak yang terdapat dalam darah dan berbagai organ dalam tubuh yang tersusun atas gliserol yang mengikat 3 gugus asam lemak. Trigliserida berperan dalam menyediakan dan memberi energi untuk tubuh yang tersimpan dalam jaringan adiposit (Guyton dan Hall, 2007 dalam Pratiwi, 2010). Trigliserida dalam jaringan adiposit dipecah menjadi asam lemak dan gliserol oleh enzim lipase hormon sensitivi. Asam lemak diangkut oleh albumin ke dalam peredaran darah kemudian masuk dengan transpor khusus ke dalam sel otot, melalui reaksi β oksidase maka asam lemak akan diubah menjadi CO_2 dan ATP untuk energi (Mayes, 2003). Kadar trigliserida darah normal pada tikus jantan dan betina adalah 26 – 145 mg/dl (Gani dkk., 2013).

Kadar trigliserida yang melebihi normal dapat mempercepat pembentukan atheroma sehingga darah lebih cepat menggumpal dan

meningkatkan risiko timbulnya serangan jantung. Trigliserida dapat menambah faktor risiko pembentukan aterosklerosis karena dipengaruhi peningkatan insulin dalam darah (Soeharto, 2000). Peningkatan trigliserida disebabkan oleh insulin resisten sehingga insulin tidak mampu mendistribusikan glukosa kepada sel – sel tubuh menyebabkan kadar glukosa meningkat dan menumpuk dalam darah. Kadar glukosa yang tinggi merangsang pembentukan glikogen, sintesis asam lemak dan kolesterol dari glukosa akibatnya pembentukan trigliserida di dalam hati meningkat sehingga kadar trigliserida dalam darah juga meningkat (Ekawati, 2012).

Tingginya kadar trigliserida juga dipengaruhi oleh adanya kilomikron dan VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*). Kilomikron berperan dalam membawa trigliserida yang berasal dari makanan dari usus menuju hati, sedangkan VLDL berperan dalam mengeksport hasil metabolisme dari hati menuju seluruh tubuh. Oleh sebab itu, trigliserida tinggi cenderung disertai dengan VLDL dan LDL yang tinggi, sementara HDL rendah (Wahyudi dkk., 2015).

Kadar kolesterol total, HDL kolesterol, dan LDL kolesterol dapat diukur dengan tes fotometrik enzimatis CHOD-PAP (*Cholesterol Oxidase-Peroxidase Aminoantipyrine Phenol*) (Hans dkk., 1980). Metode CHOD-PAP mempunyai prinsip yaitu pengukuran kadar kolesterol setelah terjadi reaksi oksidasi dan hidrolisis enzimatis. Kolesterol ester pada lipoprotein akan mengalami hidrolisis menjadi kolesterol dan asam lemak dengan bantuan enzim kolesterol esterase, kemudian kolesterol mengalami oksidasi dengan bantuan

enzim kolesterol oksidase membentuk senyawa *cholest-4-ene-3-one* dan hidrogen peroksida (H_2O_2). Hidrogen peroksida berikatan dengan 4-aminoantipirin dan fenol yang dikatalis enzim peroksidasi menghasilkan senyawa quinoneimine berwarna merah yang diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm (Barham dan Trinder, 1972).

Kadar trigliserida dapat diukur tes enzimatik kolometrik GPO-PAP (*glycerol-3-phosphate oxidase phenol aminophenazone*) yang memiliki prinsip oksidasi dan hidrolisis enzimatik. Trigliserida akan mengalami hidrolisis menjadi gliserol dan asam lemak bebas dengan bantuan enzim lipase, kemudian gliserol akan diubah menjadi gliserol-3-fosfat oleh enzim gliserolkinase. Gliserol-3-fosfat mengalami oksidasi oleh enzim gliserol-3-fosfat oksidase menjadi dihidroksiaseton fosfat dan (H_2O_2). Hidrogen peroksida berikatan dengan 4-aminoantipirin dan 4-klorofenol yang dikatalis enzim peroksidasi menghasilkan senyawa quinoneimine berwarna merah yang dapat diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm (Anindito, 2014).

D. Uji Toksisitas Oral Sub Kronis

Uji toksisitas adalah suatu uji untuk mendeteksi efek toksik suatu bahan pada sistem biologi sehingga diperoleh data dosis-respon yang khas dari sediaan uji. Uji toksisitas merupakan salah satu uji pra klinik mutlak disamping uji farmakodinamik obat tradisional yang akan dikembangkan menjadi fitomarmaka. Hal ini dikarenakan uji tersebut bertujuan untuk menentukan

batas keamanan suatu senyawa dari obat tradisional Uji toksisitas menggunakan hewan uji sebagai model berguna untuk melihat adanya reaksi biokimia, fisiologik dan patologik pada manusia terhadap suatu sediaan uji (Widyastuti, 2008; Dewoto, 2007).

Uji toksisitas dibedakan menjadi uji toksisitas umum yang meliputi uji toksisitas akut, sub kronis, dan kronis sedangkan uji toksisitas khusus meliputi uji teratogenisitas, mutagenisitas dan karsinogenisitas. Uji toksisitas khusus bukan merupakan persyaratan mutlak bagi obat tradisional agar masuk ke tahap selanjutnya obat tradisional. Uji ini dilakukan secara selektif apabila obat tradisional mengandung senyawa kimia yang berpotensi menimbulkan efek khusus (seperti kanker dan cacat bawaan), secara epidemiologik diduga dengan penyakit tertentu (misalnya yaitu kanker), digunakan secara kronik, dan berpotensi digunakan oleh perempuan subur (Badan Pengawas Obat dan Makanan, 2014; Dewoto, 2007).

Uji toksisitas oral subkronis merupakan uji untuk mendeteksi efek toksik yang muncul setelah pemberian sediaan uji dengan dosis berulang yang diberikan *per oral* pada hewan uji, namun tidak melebihi 10 % seluruh umur hewan (Badan Pengawas Obat dan Makanan, 2014). Suatu bahan dikatakan memiliki efek toksik bila berpotensi memberikan efek berbahaya terhadap metabolisme tertentu pada hewan uji. Prinsip uji adalah bahan uji diberikan setiap hari pada beberapa kelompok hewan uji dengan satu dosis per kelompok perlakuan selama minimal 90 hari sehingga diperoleh informasi adanya efek toksik zat yang tidak terdeteksi pada uji toksisitas akut (OECD, 1988).

Pengamatan uji toksisitas subkronis meliputi pemeriksaan perubahan berat badan yang diukur paling tidak tujuh hari sekali, asupan pakan kelompok hewan uji yang ditimbang minimal dua hari sekali, gejala-gejala klinis umum yang diamati setiap hari, pemeriksaan hematologi dan kimia darah yang diukur minimal sebanyak dua kali, yaitu sebelum dan sesudah perlakuan uji toksisitas, analisis urin minimal sekali, dan pemeriksaan histopatologi organ hewan uji di akhir uji toksisitas (Donatus, 2001 dalam Putri, 2015). Pengujian toksisitas oral subkronis dapat dilakukan melalui pengamatan mortalitas, perilaku, profil hematologis, pengujian fungsi organ ginjal dan hati, serta profil kimia darah (profil lipid, glukosa, total protein, dan hormon, dan lain – lain) (OECD, 1988).

E. Koleksi Sampel Darah

Koleksi sampel kimia darah harus disimpan dalam tabung dengan antikoagulan seperti *ethylenediaminetetraacetic* (EDTA) untuk mencegah agar penggumpalan darah tidak terjadi (Alaydrus dkk., 2015). Pengambilan darah hanya diperbolehkan maksimal sebanyak 1,25 mL/100 gram berat badan atau 10 – 15 % dari total volume darah, apabila melebihi jumlah maksimal maka dapat menyebabkan tikus *stress* dan anemia yang ditandai dengan pernafasan cepat, selaput lendir berwarna pucat, dan lemas). Pengambilan dilakukan minimal 2 minggu sekali untuk meningkatkan produksi serat jaringan ikat pada sisa – sisa pendarahan demi kelangsungan hidup hewan uji (LaRegina dan Sharp, 1998; Hoff, 2000).

Koleksi darah pada hewan uji dapat dilakukan melalui *sinus orbitalis* (Hoff, 2000). Metode tersebut memiliki keuntungan yaitu relatif cepat, mudah diambil karena terdapat pembuluh darah yang besar serta memiliki waktu pemulihan lebih cepat. Koleksi darah tikus melalui *sinus orbitalis* membutuhkan tenaga terlatih sehingga tikus tidak mengalami trauma berat akibat tusukan pipet kapiler (Heryani, 2016). Tusukan kurang benar dapat menyebabkan kebutaan akibat pipet kapiler mengenai saraf yang berada di bagian permukaan tengah mata. Selain itu, menyebabkan pergerakan yang tidak terkendali dari hewan uji sehingga dapat terjadi peradangan okuler, luka, kehilangan cairan mata, infeksi, dan keratitis (Hoff, 2000).

Koleksi darah melalui *sinus orbitalis* pada tikus dapat dilakukan dengan anestesi tikus lalu membaringkannya, tangan membuka mata tikus dengan jari hingga bola mata menonjol. Pipet kapiler hematokrit dimasukkan dari bagian bawah rongga mata dengan sudut 45° ke bagian tengah rongga mata. Pipet kapiler diputar untuk mengeluarkan darah hingga memenuhi seluruh pipet kemudian tarik sedikit namun tidak keluar dari rongga mata agar darah dapat mengalir bebas dan darah ditampung dalam tabung. Pendarahan akan berhenti segera setelah pipet dicabut, namun sebaiknya tutup mata tikus dengan jari telunjuk dan ibu jari kemudian bersihkan darah yang masih tersisa (Hoff, 2000).

F. Deskripsi Tikus Putih (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769)

Tikus putih (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) digunakan karena memiliki kemiripan dengan manusia dalam hal fisiologi, anatomi, nutrisi,

patologi, metabolisme dan lazim digunakan dalam penelitian mengenai kadar kolesterol (Harini dan Astirin, 2009). Tikus juga memiliki karakteristik genetik yang unik, mudah berkembang biak, murah dan mudah diperoleh. Tikus putih berasal dari wilayah China dan menyebar ke Eropa bagian barat. Di wilayah Asia Tenggara, tikus berkembang biak dengan baik di Filipina, Indonesia, Laos, Malaysia, dan Singapura (Sirois, 2005). Menurut Krinke (2000), tikus putih mempunyai klasifikasi sebagai berikut:

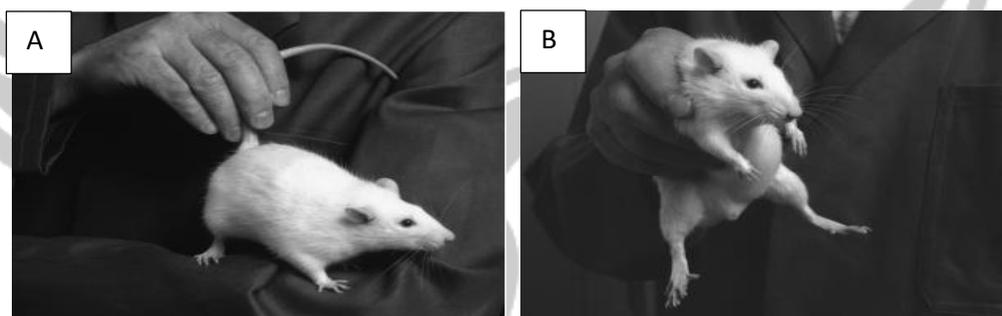
Kerajaan	: Animalia
Divisi	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Famili	: Muridae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>

Tikus galur Wistar sering digunakan sebagai model dalam penelitian karena tidak memperlihatkan perkawinan musiman, lebih mudah berkembang biak, sensitif dan lebih mudah dalam penanganan karena ukuran badan tidak terlalu besar meskipun agresif (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988; Koolhas, 2010). Ciri morfologi tikus ini yaitu bertubuh panjang dengan kepala lebih sempit, telinga tebal dan pendek dengan rambut halus, mata berwarna merah, dan ekor yang lebih panjang melebihi panjang tubuh (Sirois, 2005). Tikus Wistar dapat hidup 2,5 – 3,5 tahun dengan berat badan berkisar 450 – 520 gram (jantan) dan 250 - 300 gram (betina). Suhu badan tikus normal yang diukur melalui rektal yaitu 35,9 – 37,5 °C (LaRegina dan Sharp, 1998).

Penggunaan tikus sebagai subyek penelitian (hewan uji) juga perlu memperhatikan kebutuhan makan dan minum tikus. Tikus membutuhkan pakan

kurang lebih sebanyak 10% (pakan kering) atau 15 % (pakan basah) dari bobot tubuhnya setiap hari. Tikus dewasa membutuhkan minum kurang lebih sebanyak 20-45 mL air per harinya, namun kebutuhan minum tikus dapat berkurang apabila pakan yang diberikan sudah banyak mengandung air (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988).

Pemeliharaan tikus dalam laboratorium juga harus memperhatikan kondisi lingkungan (LaRegina dan Sharp, 1998). Suhu dari laboratorium seharusnya ± 25 °C dengan kelembaban relatif ruangan sebaiknya 70 % (± 10 %). Penerangan dan cahaya pun harus diatur sehingga tersedia 12 jam terang dan 12 jam gelap (Kurniawan, 2014). Kandang yang baik harus dilengkapi dengan ventilasi, untuk menyediakan suplai oksigen dan mengeluarkan panas sehingga dapat menjaga kelembaban dalam kandang. Pendengaran tikus berkisar dari 500 Hz sampai 60 – 80 kHz, suara yang gaduh dapat menyebabkan tikus *stress*, pergantian metabolik dan mengurangi fertilitas (LaRegina dan Sharp, 1998).



Gambar 9. Teknik *handling* tikus putih Wistar (Sumber: Koolhas, 2010). Keterangan : Teknik *handling* yang baik pada (A) tikus yang belum pernah dipegang sebelumnya dengan memegang pangkal ekor lalu meletakkannya di lengan; dan (B) tikus yang biasa dipegang dengan memegang bagian belakang dan menekan leher tikus dengan lembut menggunakan ibu jari.

Penggunaan tikus untuk penelitian profil lipid sebaiknya menggunakan tikus jantan karena tikus jantan kurang dipengaruhi oleh perubahan hormonal

khususnya hormon estrogen (Harini dan Astrin, 2009). Profil lipid yang diukur akan lebih signifikan terlihat pada tikus jantan dibandingkan tikus betina, karena adanya estrogen. Menurut Ganong (2002), estrogen pada tikus putih betina berperan dalam metabolisme lemak sebagai antioksidan dengan membuat pembuluh darah lebih lebar sehingga dapat mengurangi terjadinya arterosklerosis. Menurut Pratiwi (2010), penurunan estrogen dapat menimbulkan peningkatan kolesterol, trigliserida, LDL, dan penurunan HDL yang memungkinkan terjadinya deposit lemak pada pembuluh darah menuju otak. Namun demikian, dalam uji toksisitas oral subkronis digunakan jantan dan betina untuk mempelajari keamanan profil lipid pada keduanya selama pemberian filtrat buah luwangan sehingga dapat diterapkan sebagai obat tradisional aman yang dapat dikonsumsi oleh pria maupun wanita.

G. Hipotesis

Pemberian filtrat buah Luwangan (*Ficus hispida* L.f.) muda dan matang pada tikus putih (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) galur Wistar jantan dan betina pada uji toksisitas oral subkronis selama 98 hari aman terhadap profil lipid darah yang diindikasikan dengan kadar kolesterol total, HDL, LDL dan kadar trigliserida berada dalam kisaran normal.