

**UJI TOKSISITAS SUBKRONIK PRODUK HERBAL
HEPATOPROTEKTOR (HEPARMIN®)
DENGAN PARAMETER DIFERENSIAL LEUKOSIT
PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)**

**SUBCHRONIC TOXICITY TEST OF
HEPATOPROTECTOR HERBAL PRODUCT
(HEPARMIN®) WITH LEUKOCYTE DIFFERENTIAL
PARAMETER IN WHITE RATS (*Rattus norvegicus*)**

**ZALWA NURUL SHAFIRA
N011191149**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

**UJI TOKSISITAS SUBKRONIK PRODUK HERBAL
HEPATOPROTEKTOR (HEPARMIN®)
DENGAN PARAMETER DIFERENSIAL LEUKOSIT
PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)**

**SUBCHRONIC TOXICITY TEST OF
HEPATOPROTECTOR HERBAL PRODUCT
(HEPARMIN®) WITH LEUKOCYTE DIFFERENTIAL
PARAMETER IN WHITE RATS (*Rattus norvegicus*)**

**ZALWA NURUL SHAFIRA
N011 19 1149**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

**UJI TOKSISITAS SUBKRONIK PRODUK HERBAL
HEPATOPROTEKTOR (HEPARMIN®)
DENGAN PARAMETER DIFERENSIAL LEUKOSIT
PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)**

**SUBCHRONIC TOXICITY TEST OF
HEPATOPROTECTOR HERBAL PRODUCT (HEPARMIN®)
WITH LEUKOCYTE DIFFERENTIAL PARAMETER
IN WHITE RATS (*Rattus norvegicus*)**

SKRIPSI

**untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi
syarat-syarat untuk mencapai gelar sarjana**

**ZALWA NURUL SHAFIRA
N011191149**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

UJI TOKSISITAS SUBKRONIK PRODUK HERBAL
HEPATOPROTEKTOR (HEPARMIN®)
DENGAN PARAMETER DIFERENSIAL LEUKOSIT
PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)

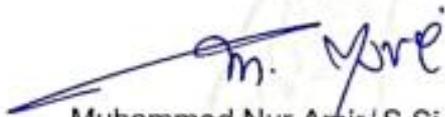
ZALWA NURUL SHAFIRA

N011191149

Disetujui oleh

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,



Muhammad Nur Amir/ S.Si., M.Si., Apt.
NIP. 19861111 201504 1 001



Usmar, S.Si., M.Si., Apt.
NIP. 19710109 199702 1 001

Pada tanggal, 15 Maret 2023

SKRIPSI

UJI TOKSISITAS SUBKRONIK PRODUK HERBAL
HEPATOPROTEKTOR (HEPARMIN®)
DENGAN PARAMETER DIFERENSIAL LEUKOSIT
PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)

SUBCHRONIC TOXICITY TEST OF
HEPATOPROTECTOR HERBAL PRODUCT (HEPARMIN®)
WITH LEUKOCYTE DIFFERENTIAL PARAMETER
IN WHITE RATS (*Rattus norvegicus*)

Disusun dan diajukan oleh :

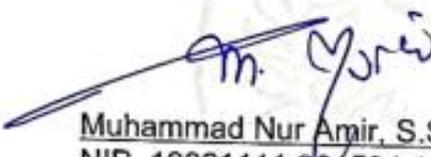
ZALWA NURUL SHAFIRA
N011191149

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
pada tanggal 10 Maret 2023
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui,

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,


Muhammad Nur Amir, S.Si., M.Si., Apt.
NIP. 19861111 201504 1 001


Usman, S.Si., M.Si., Apt.
NIP. 19710109 199702 1 001

Ketua Program Studi S1 Farmasi,
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin


Nurhasni Hasan, S.Si., M.Si., M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt.
NIP. 19860116 201012 2 009

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Zalwa Nurul Shafira
Nim : N011 19 1149
Program Studi : Farmasi
Jenjang : S1

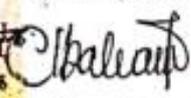
Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya dengan judul "Uji Toksisitas Subkronik Produk Herbal Heparoprotektor (Heparmin®) Dengan Parameter Diferensial Leukosit Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)" adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilalihan tulisan orang lain bahwa skripsi yang saya tulis benar benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 15 Maret 2023



ig menyatakan,


Zalwa Nurul Shafira

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah Subhanahu Wa Ta'ala atas berkat dan rahmat-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "Uji Toksisitas Subkronik Produk Herbal Hepatoprotektor (Heparmin®) Dengan Parameter Diferensial Leukosit Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)" dengan baik.

Dalam penyusunan skripsi ini penulis menyadari terdapat berbagai hambatan dan rintangan, namun berkat bantuan dari berbagai pihak atas segala doa, dukungan moril, materil, serta selalu memberikan semangat kepada penulis, skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik.

Penulis juga ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Muhammad Nur Amir, S.Si., M.Si., Apt., selaku pembimbing utama dan Bapak Usmar, S.Si., M.Si., Apt., selaku pembimbing pendamping dengan ikhlas dan sabar telah meluangkan waktu, tenaga, serta ilmu dan arahan dalam penelitian dan membimbing penulis dalam penyusunan skripsi ini.
2. Bapak Firzan Nainu, S.Si., M.Biomed.Sc., Ph.D., Apt., dan Ibu A. Anggriani, S.Si., M.Clin.Pharm., Apt., selaku tim penguji yang telah meluangkan waktu dan memberikan saran yang membangun dalam penyusunan skripsi ini.

3. Ibu Nurhasni Hasan, S.Si., M.Si., M.Pharm.Sc., Ph.D, Apt., selaku dosen pembimbing akademik penulis atas segala ilmu dan arahan selama penulis menempuh menjalani studi.
4. Dekan dan Para Wakil Dekan Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.
5. Seluruh staf dosen dan pegawai Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin atas ilmu, motivasi, bantuan, dan segala fasilitas yang diberikan kepada penulis selama menempuh studi hingga menyelesaikan penelitian ini.
6. Teman-teman Korps Asisten Biofarmasi dan Farmakologi-Toksikologi, atas segala support, ilmu, dan bantuan yang telah banyak diberikan kepada penulis. Terkhusus laboran tercinta Ibu Syamsiah atas nasihat, arahan, serta support yang diberikan kepada penulis selama penulis melakukan penelitian dan menempuh studi di Fakultas Farmasi.
7. Teman-teman seperjuangan, sehati, sejiwaku yakni Nadiyyah Mardhatillah Armin, Tiara Indah Dhiya Ihsani, Aulia Zahraeni, Pebbi Atu Putri, Alya Raihana Sakila, Wahdaniyah Muslimin, Ulfah Mahfufah, Asmaria, Rabihul Fauziah, Nor Atikah Syahirah, Finsyani Putri Virashtriana, Yusnita Damayanti, Fitri Ramadhani, Armelyani Putri, dan Eka Yulianti yang selalu memberikan dukungan dan semangat, serta tempat meluangkan berbagi keluh-kesah, suka maupun duka selama proses perkuliahan dan dalam penyusunan skripsi ini.

8. Teman-teman pejuang penelitian “Royal”, Fitriani, Nurfadilla Wafiah, Muhammad Fadel Rahmansyah, Venturini Vernanda Kombong Kila, dan Hikmat Al-Hakim yang telah memberikan dukungan dan membantu penulis selama proses penelitian serta dalam penyusunan skripsi ini.
9. Teman-teman “Seroja” serta angkatan 2019 (DEX19EN), Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin, atas dukungan, ilmu, serta kebersamaan selama penulis menempuh studi di Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin.

Ucapan terima kasih tak hentinya penulis kepada Ayahanda luar biasa, Bapak Asri dan wanita tangguh, Ibunda Bungalia untuk semua doa, dukungan, energi positif, dan hangatnya kasih sayang kepada penulis. Serta kepada semua keluarga yang juga menjadi pendukung penulis.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan adanya saran maupun tanggapan dari berbagai pihak sehingga dapat menjadikan skripsi ini ke arah yang lebih baik.

Semoga skripsi ini dapat bermanfaat demi pengembangan ilmu pengetahuan dan dipergunakan sebaik-baiknya.

Makassar, 15 Maret 2023

ABSTRAK

ZALWA NURUL SHAFIRA. *Uji Toksisitas Subkronik Produk Herbal Hepatoprotektor (Heparmin®) Dengan Parameter Diferensial Leukosit Pada Tikus Putih (Rattus norvegicus)* (dibimbing oleh Muh. Nur Amir dan Usmar).

Heparmin® merupakan salah satu produk obat herbal berupa jamu yang diindikasikan untuk menjaga fungsi hati atau hepatoprotektor. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh dan dosis suspensi isi kapsul produk Heparmin® yang menyebabkan toksisitas subkronik terhadap Parameter Diferensial Leukosit tikus putih (*Rattus norvegicus*) yaitu basofil, eosinofil, monosit, dan limfosit. Sebanyak 40 ekor hewan uji tikus dikelompokkan menjadi 4 kelompok perlakuan yaitu kelompok 1 kontrol natrium CMC 0,5%, kelompok 2 dosis rendah produk herbal hepatoprotektor (Heparmin®) (128,25 mg/kgBB), kelompok 3 dosis tengah produk herbal hepatoprotektor (Heparmin®) (359 mg/kgBB), dan kelompok 4 dosis tinggi produk herbal hepatoprotektor (Heparmin®) (1000 mg/kgBB). Berdasarkan analisis statistik diperoleh bahwa semua kelompok perlakuan tidak menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol ($p > 0,05$), dan diperoleh persentase rata-rata jumlah diferensial leukosit berada dalam kisaran nilai normal. Hal ini menunjukkan bahwa produk herbal hepatoprotektor (Heparmin®) tidak menimbulkan pengaruh toksisitas pada parameter diferensial leukosit berupa basofil, eosinofil, monosit, dan limfosit pada tikus putih selama 90 hari.

Kata kunci: Heparmin®, Toksisitas Subkronik, Diferensial Leukosit

ABSTRACT

ZALWA NURUL SHAFIRA. Subchronic Toxicity Test of Hepatoprotector Herbal Product (Heparmin[®]) With Leukocyte Differential Parameter in White Rats (*Rattus norvegicus*) (supervised by Muh. Nur Amir and Usmar).

Heparmin[®] is a herbal medicinal product that is indicated to maintain liver function or as a hepatoprotection. This study was conducted to determine the effect and dosage of Heparmin[®] product capsule suspension causing subchronic toxicity on the Differential Parameters of Leukocytes in white rats (*Rattus norvegicus*) namely basophils, eosinophils, monocytes, and lymphocytes. A total of 40 rats were divided into 4 groups. The different groups were administered daily with different dosages (CMC 0.5% as control, Heparmin[®] 128.25 mg/kgBB as low dose, Heparmin[®] 359 mg/kgBB as middle dose, Heparmin[®] 1000 mg/kgBB as high dose) for 90 days. Based on statistical analysis, it was found that all treatment groups did not show any significant differences with the control group ($p > 0.05$), and it was obtained that the average proportion of the number of differences in leukocytes was within the normal value range. This shows that the hepatoprotective herbal product (Heparmin[®]) does not have a toxic effect on the differential parameters of leukocytes in the form of basophils, eosinophils, monocytes, and lymphocytes in white rats for 90 days.

Keywords: Heparmin[®], Subchronic toxicity, Leukocyte Differential

DAFTAR ISI

	Halaman
UCAPAN TERIMA KASIH	vii
ABSTRAK	x
ABSTRACT	xi
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Rumusan Masalah	4
I.3 Tujuan Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
II.1 Produk Herbal Hepatoprotektor (Heparmin®)	5
II.2 Uji Toksisitas	6
II.3 Uji Toksisitas Subkronik Oral	7
II.4 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	8
II.5 Darah	10
II.5.1 Sel Darah Putih	11
II.5.2 Diferensial Leukosit	13
BAB III METODE PENELITIAN	20
III.1 Alat dan Bahan	20

III.2 Metode Kerja	20
III.2.1 Penyiapan Hewan Uji	20
III.2.2 Pembuatan Sediaan Uji	21
III.2.2.1 Pembuatan Larutan Koloidal natrium CMC 0,5%	21
III.2.2.2 Pembuatan Suspensi Isi Kapsul Heparmin®	21
III.2.3 Perlakuan pada Hewan Uji	21
III.2.4 Pengambilan Darah Hewan Uji	22
III.2.5. Pemeriksaan Diferensial Leukosit Hewan Uji	23
III.2.5 Pembahasan dan Analisis	23
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	25
BAB V PENUTUP	35
V.1 Kesimpulan	35
V.1 Saran	35
DAFTAR PUSTAKA	36
LAMPIRAN	41

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Hasil Perhitungan Diferensial Leukosit	26
2. Hasil Pemeriksaan Nilai Rata-rata Jumlah Basofil	27
3. Hasil Pemeriksaan Nilai Rata-rata Jumlah Eosinofil	28
4. Hasil Pemeriksaan Nilai Rata-rata Jumlah Monosit	30
5. Hasil Pemeriksaan Nilai Rata-rata Jumlah Limfosit	32

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Sampel Kapsul Produk Heparmin®	6
2. Tikus Putih	8
3. Neutrofil stab dan Segmen	14
4. Basofil	15
5. Eosinofil	16
6. Monosit	17
7. Limfosit	18
8. Grafik nilai rata-rata jumlah Basofil	27
9. Grafik nilai rata-rata jumlah Eosinofil	28
10. Grafik nilai rata-rata jumlah Monosit	30
11. Grafik nilai rata-rata jumlah Limfosit	32
12. Proses penyiapan hewan uji	53
13. Proses penyiapan Heparmin®	53
14. Proses menimbang bahan	53
15. Proses pembuatan larutan koloidal natrium CMC 0,5%	53
16. Proses pembuatan suspensi isi kapsul Heparmin®	53
17. Pemberian secara oral pada hewan uji	53
18. Pengambilan sampel darah pada tikus	54
19. Sampel darah	54

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Skema	41
2. Skema kerja umum	42
3. Perhitungan	43
4. Data analisis statistik	45
5. Dokumentasi penelitian	53
6. Surat kode etik	55

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan salah satu negara yang memiliki banyak tanaman obat tradisional yang dapat digunakan masyarakat sebagai alternatif pengobatan (Dewantari *et al.*, 2018). Sampai saat ini, masyarakat masih sering memanfaatkan obat tradisional karena dianggap berkhasiat, dan dapat mengobati berbagai macam penyakit (Adiyasa & Meiyanti, 2021). Obat tradisional merupakan bahan atau ramuan bahan yang berupa bahan tumbuhan, bahan hewan, bahan mineral, sediaan sarian (galenik) atau campuran dari bahan tersebut yang telah digunakan untuk pengobatan secara turun temurun (PerBPOM 32/2019). Obat tradisional atau obat bahan alam Indonesia dikelompokkan menjadi 3 jenis yaitu jamu, obat herbal terstandar, dan fitofarmaka. Jenis obat tradisional yang umum dikenal masyarakat adalah jamu (Pratiwi *et al.*, 2018). Jamu merupakan sediaan berbentuk simplisia yang terbuat dari bahan obat alami yang telah terbukti secara empiris status keamanan, dan khasiatnya (Adiyasa & Meiyanti, 2021).

Menurut Linda wati *et al.* (2021), jumlah penduduk Indonesia yang pernah mengonsumsi obat tradisional atau jamu sebanyak 59,12%. Balitbangkes (2018) melaporkan bahwa hasil Riset Kesehatan Dasar menunjukkan proporsi jenis pelayanan kesehatan tradisional yang

dimanfaatkan masyarakat sebesar 48% menggunakan ramuan jadi sebesar 31,8% menggunakan ramuan buatan sendiri, dan sebesar 98,5% merasakan manfaatnya pada semua kelompok umur, status ekonomi yang tersebar di beberapa wilayah. Bentuk sediaan jamu yang paling disukai masyarakat adalah bentuk cairan, kemudian diikuti dengan jamu dalam bentuk seduhan/serbuk, rebusan/rajanan dan bentuk kapsul/pil/tablet (Wardhina *et al.*, 2019).

Heparmin[®] adalah merek produk herbal hepatoprotektor produksi PT. Royal Medicalink Pharmed, merupakan jamu dalam sediaan kapsul yang mengandung 75 mg ekstrak rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*), 100 mg daun paliasa (*Kleinhovia hospita*), 100 mg jintan hitam (*Nigella sativa*), dan 100 mg ikan gabus (*Ophiocephalus striatus*). Heparmin[®] umumnya digunakan sebagai hepatoprotektor, antiinflamasi, antioksidan dan antivirus (Ibrahim *et al.*, 2012).

Heparmin[®] merupakan produk obat herbal yang memiliki banyak manfaat, namun perlu dilakukan uji toksisitas pada hewan uji untuk menjamin keamanannya. Badan Pengawas Obat dan Makanan menetapkan bahwa, salah satu uji toksisitas yang dapat dilakukan adalah uji toksisitas subkronik untuk mendeteksi efek toksik setelah pemberian sediaan uji dengan dosis berulang yang diberikan secara oral pada hewan uji selama sebagian umur hewan, tetapi tidak lebih dari 10% masa hidup hewan. Uji toksisitas subkronik bertujuan untuk memperoleh informasi adanya efek toksik zat yang tidak terdeteksi pada uji toksisitas akut,

informasi adanya kemungkinan efek toksik setelah paparan berulang terhadap sediaan dalam jangka waktu tertentu, dan mempelajari efek reversibilitas pada zat tersebut (PerBPOM 10/2022).

Parameter yang diamati dan diperiksa dalam uji toksisitas subkronik di antaranya adalah parameter hematologi yang meliputi pemeriksaan diferensial leukosit (PerBPOM 10/2022). Diferensial leukosit merupakan kesatuan dari sel darah putih yang terdiri dari dua kelompok yaitu granulosit yang terdiri atas eosinofil, basofil dan neutrofil, serta kelompok agranulosit yang terdiri atas limfosit dan monosit (Purnomo *et al.*, 2015). Leukosit (sel darah putih) berperan sebagai sistem pertahanan tubuh dalam melawan adanya agen penyakit sehingga, profil leukosit dapat digunakan sebagai indikator kesehatan (Nasrullah *et al.*, 2020). Terjadinya peningkatan dan penurunan jumlah leukosit dalam sirkulasi darah menggambarkan ketanggapan sel darah putih dalam mencegah adanya agen penyakit (Al-Fajar *et al.*, 2019). Pada uji toksisitas obat, pemeriksaan profil leukosit dapat memberikan informasi penting pada uji praklinis dan klinis suatu penelitian (Rosidah *et al.*, 2020).

Berdasarkan uraian di atas, maka perlu dilakukan pengujian terkait toksisitas sediaan Heparmin[®] secara subkronik terhadap parameter pemeriksaan diferensial leukosit tikus putih (*Rattus norvegicus*).

I.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Apakah penggunaan produk Heparmin[®] secara subkronik (90 hari) memberikan pengaruh terhadap diferensial leukosit tikus putih (*Rattus norvegicus*)?
2. Pada dosis berapa produk Heparmin[®] memberikan pengaruh terhadap diferensial leukosit tikus putih (*Rattus norvegicus*)?

I.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui pengaruh penggunaan produk Heparmin[®] terhadap diferensial leukosit tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diberikan secara subkronik selama 90 hari.
2. Untuk mengetahui pada dosis berapa produk Heparmin[®] memberikan pengaruh pada diferensial leukosit tikus putih (*Rattus norvegicus*).

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Produk Herbal Hepatoprotektor (Heparmin®)

Heparmin® adalah merek produk herbal hepatoprotektor produksi PT. Royal Medicalink Pharmed, merupakan jamu berbentuk kapsul yang mengandung 75 mg ekstrak rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*), 100 mg daun paliasa (*Kleinhovia hospita*), 100 mg jintan hitam (*Nigella sativa*), dan 100 mg ikan gabus (*Ophiocephalus striatus*). Heparmin® umumnya digunakan sebagai hepatoprotektor, antiinflamasi, antioksidan dan antivirus (Ibrahim *et al.*, 2012).

Kandungan kurkuminoid yang terdapat pada *Curcuma xanthorrhiza* memiliki efek biologis sebagai hepatoprotektor, antibakteri dan antiinflamasi. *Nigella sativa* yang memiliki kandungan utama timokuinon berperan sebagai hepatoprotektor, antioksidan, antimikroba dan antivirus. *Ophiocephalus striatus* dengan kandungan utama protein, asam amino, vitamin dan Ig yang dibutuhkan tubuh sebagai sumber energi, proses metabolisme, regenerasi sel-sel tubuh yang rusak dan untuk meningkatkan sistem pertahanan tubuh. Kandungan flavonoid dan saponin yang terdapat pada *Kleinhovia hospita* L. sebagai antioksidan, hepatoprotektif dan antimikroba (Ibrahim *et al.*, 2012).

Berdasarkan penelitian Ibrahim *et al.* (2012), menyatakan bahwa pemberian kombinasi (*polyherbal*) *Curcuma xanthorrhiza*, *Kleinhovia*

hospita, *Nigella sativa*, dan *Ophiocephalus striatus* pada mencit (*Mus musculus*) jantan dan betina tidak menyebabkan peningkatan toksisitas (LD_{50}) dari masing-masing komposisi produk Heparmin®. Potensi ketoksikan akut sediaan Heparmin® termasuk dalam kategori praktis tidak toksik ($>15000\text{mg}$).



Gambar 1. Contoh kapsul Heparmin® (Dokumentasi Pribadi)

II.2 Uji Toksisitas

Uji toksisitas adalah uji yang mendeteksi efek toksik suatu zat pada sistem biologis dan memperoleh data dosis-respon yang khas dari sediaan uji. Data yang diperoleh, dapat digunakan untuk memberikan informasi tentang bahaya sediaan uji apabila terjadi paparan pada manusia, sehingga dosis penggunaannya dapat ditentukan untuk keamanan manusia. Uji toksisitas menggunakan hewan uji sebagai model berguna untuk melihat adanya reaksi biokimia, fisiologik, dan patologik manusia terhadap suatu sediaan uji (PerBPOM 10/2022).

Hasil uji toksisitas tidak dapat digunakan untuk membuktikan secara mutlak keamanan suatu bahan/sediaan bagi manusia, tetapi dapat

memberikan petunjuk adanya toksisitas dan membantu mengidentifikasi efek toksik apabila terjadi paparan pada manusia. Beberapa faktor yang menentukan hasil uji toksisitas *in vivo* yaitu pemilihan spesies hewan uji, galur dan jumlah hewan, umur dan berat badan hewan, jenis kelamin hewan, metode pemberian sediaan uji, pemilihan dosis uji, efek samping dari sediaan uji, teknik dan prosedur pengujian, termasuk cara penanganan hewan selama percobaan (PerBPOM 10/2022).

II.3 Uji Toksisitas Subkronik Oral

Badan Pengawas Obat dan Makanan menetapkan bahwa, salah satu uji toksisitas yang dapat dilakukan untuk mendeteksi efek toksik setelah pemberian sediaan uji dengan dosis berulang yang diberikan secara oral pada hewan uji selama sebagian umur hewan, tetapi tidak lebih dari 10% masa hidup hewan yaitu uji toksisitas subkronik. Uji toksisitas subkronik bertujuan untuk memperoleh informasi adanya efek toksik zat yang tidak terdeteksi pada uji toksisitas akut, informasi adanya kemungkinan efek toksik setelah paparan berulang terhadap sediaan dalam jangka waktu tertentu, dan mempelajari efek reversibilitas pada zat tersebut (PerBPOM 10/2022).

Prinsip uji toksisitas subkronis oral adalah sediaan uji dalam beberapa tingkatan dosis diberikan setiap hari (7 hari seminggu) pada beberapa kelompok hewan uji dengan satu dosis per kelompok selama 14, 28 atau 90 hari dan ditambahkan kelompok satelit untuk melihat adanya efek tertunda atau reversibel. Selama pemberian sediaan uji, hewan harus

diamati setiap hari untuk menentukan adanya toksisitas. Pada akhir periode pemberian sediaan uji, semua hewan yang masih hidup hidup dinekropsi, setelah itu dilakukan pengamatan makropatologis masing-masing organ dan jaringan. Selain itu, juga dilakukan pemeriksaan hematologi, biokimia klinis, dan histopatologi (PerBPOM 10/2022).

II.4 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)



Gambar 2. Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) (Dokumentasi Pribadi)

Hewan coba merupakan hewan yang sengaja digunakan sebagai hewan model untuk pembelajaran dan pengembangan berbagai macam bidang ilmu dalam skala penelitian atau pengamatan laboratorium. Serta, dapat digunakan sebagai penunjang dalam pengujian obat, vaksin, atau penelitian biologi. Hewan coba yang sering digunakan yaitu mencit (*Mus musculus*), Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*), dan Tikus (*Rattus norvegicus*) (Tolistiawaty *et al.*, 2014).

Tikus merupakan salah satu hewan percobaan yang umum dipakai dalam penelitian ilmiah (Rejeki *et al.*, 2018). Hewan ini dapat berkembang biak dengan cepat, mudah untuk dipelihara dalam jumlah banyak,

mempunyai variasi genetik yang cukup banyak, serta anatomi dan fisiologi yang baik. Tikus memiliki ukuran yang lebih besar dari pada mencit sehingga lebih banyak disukai dalam berbagai jenis penelitian dan lebih mudah untuk dipegang. Berat badan tikus umur 2 bulan berkisar antara 200-300 gram (Nirmawati, 2019).

Menurut Nirmawati (2019), taksonomi tikus putih dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom : Animalia
Filum : Chordata
Kelas : Mamalia
Ordo : Rodentia
Famili : Muridae
Genus : Rattus
Spesies : *Rattus norvegicus* L

Jenis tikus yang biasa digunakan sebagai penelitian laboratorium yaitu tikus wistar karena memiliki harga yang lebih murah, memiliki kemampuan metabolik yang relatif cepat, dan memiliki karakterisasi genetik yang hampir sama dengan manusia (Nirmawati, 2019). Tikus memiliki kesamaan dengan manusia dalam sistem reproduksi, sistem saraf, penyakit (kanker dan diabetes), dan kecemasan. Hal ini disebabkan karena adanya kesamaan DNA dan ekspresi gen, dimana 98% gen tikus sebanding dengan gen manusia (Rejeki *et al.*, 2018).

II.5 Darah

Darah merupakan pengangkut jarak jauh, transportasi massal bahan antara sel dan bahan lingkungan eksternal. Transportasi ini penting untuk mempertahankan homeostasis. Darah memiliki fungsi utama dalam sirkulasi sebagai media transportasi, pengaturan suhu, keseimbangan cairan, serta keseimbangan basa eritrosit selama hidupnya tetap berada dalam tubuh (Airifin, 2022).

Darah memiliki temperatur normal pada suhu 38°C, dengan pH yang berkisar antara 7,35 hingga 7,45. pH sangat berperan penting karena sebagai sistem buffer untuk menjaga asam-basa kondisi darah yang berpengaruh pada fisiologis manusia. Darah yang memiliki kandungan oksigen tinggi akan memiliki warna merah yang lebih terang. Namun sebaliknya pada darah yang rendah kadar oksigennya akan memiliki warna merah yang lebih gelap. Manusia memiliki volume darah yang berbeda dikarenakan perbedaan pada jenis kelamin, yang menentukan proporsi ukuran tubuh. Laki-laki dewasa memiliki kisaran volume darah 5-6 L, sedangkan pada wanita dewasa berkisar antara 4-5 L (Rosita *et al.*, 2019).

Darah terdiri atas dua bagian yaitu plasma darah dan sel darah. Secara keseluruhan, volume darah yaitu satu per dua belas berat badan. Sekitar 55% adalah plasma darah, dan 45% sisanya terdiri dari sel darah. Sel darah terdiri dari tiga jenis yaitu sel darah merah (eritrosit), sel darah putih (leukosit) dan (trombosit) yang merupakan kepingan halus sitoplasma (Hervidea, 2022).

II.5.1 Sel Darah Putih (Leukosit)

Sel darah Putih atau disebut juga leukosit merupakan unit yang dapat bergerak pada sistem pertahanan imun tubuh. Dalam sistem pertahanan tubuh, leukosit berperan untuk menahan benda asing (antigen) penyebab penyakit yang masuk ke dalam tubuh manusia melalui dua cara yaitu fagositosis dan mengaktifkan respon imun tubuh (Sherwood, 2018). Leukosit mampu melawan adanya agen infeksi maupun bahan yang bersifat toksik masuk ke dalam tubuh. Selain itu, leukosit juga mampu mengenali dan melawan mikroorganisme pada reaksi imun dan membantu proses penyembuhan dan peradangan (Septianto *et al.*, 2015).

Penyebab utama leukosit berada dalam darah adalah agar cepat diangkut dari tempat produksi atau penyimpanannya ke tempat mereka di butuhkan. Tidak seperti eritrosit, leukosit mampu keluar dari darah dengan bergerak menyerupai amoeba, untuk menggeliat masuk ke pori kapiler yang sempit dan merangkat ke area yang dituju. Akibatnya, sel efektor sistem imun tersebar luas di seluruh tubuh dan dapat mempertahankan diri di lokasi manapun. Leukosit tidak memiliki hemoglobin sehingga tidak bewarna (yaitu putih) kecuali jika secara spesifik diwarnai agar dapat dilihat dengan mikroskop (Sherwood, 2018).

Jumlah total leukosit dalam keadaan normal adalah 5.000-10.000 sel/ μ l (Aliviameita & Puspitasari, 2019). Leukosit merupakan sel darah yang paling sedikit jumlahnya (sekitar 1 sel darah putih untuk setiap 700 sel darah merah), hal ini bukan karena lebih sedikit, tetapi karena sel-sel ini hanya

transit di darah. Dalam keadaan normal, sekitar dua per tiga leukosit dalam darah adalah agranulosit terutama neutrofil, sedangkan sepertiga agranulosit terutama limfosit (Sherwood, 2018). Terjadinya peningkatan jumlah leukosit dapat disebabkan oleh adanya infeksi atau kerusakan jaringan. Sedangkan penurunan jumlah leukosit atau disebut leukopenia dapat disebabkan oleh stress berkepanjangan, infeksi virus, penyakit atau kerusakan sumsum tulang, radiasi atau kemoterapi, penyakit sistemik parah seperti lupus eritematosus, dan penyakit tiroid (Aliviameita & Puspitasari, 2019).

Pemeriksaan hitung jumlah leukosit merupakan pemeriksaan darah rutin yang dilakukan di laboratorium klinik dengan menggunakan alat Automatik *hematology analyzer* dan kamar hitung *Improved Neubauer*. Metode otomatis dan manual ini memiliki kekurangan dan kelebihan masing-masing. Dalam perhitungan sel leukosit pada alat manual sangat sulit untuk mengontrol atau mendapat akurasi dan presisinya. Sedangkan alat *Automatic hematology analyzer* memiliki hasil akurasi yang mudah dievaluasi, jumlah sel yang dihitung lebih banyak dan pembacaan sampel pemeriksaan hanya memerlukan waktu yang singkat (Darmayani *et al.*, 2016).

Adapun perhitungan jumlah total leukosit dengan menggunakan alat manual berupa hemositometer (kamar hitung) yaitu sediaan darah dihisap menggunakan pipet thoma leukosit hingga tanda batas 0,5 atau 1. Kemudian larutan Turk dihisap hingga angka 11 (pengenceran 20x).

Larutan yang telah siap dilakukan penghitungan leukosit di bilik hitung. Teteskan ke dalam bilik hitung dengan cara mengalirkan sebanyak 1 tetes pada pinggir kaca penutup. Hitung leukosit di bawah mikroskop dengan pembesaran 40 kali (Sari *et al.*, 2022). Perhitungan jumlah leukosit yaitu:

$$\text{Kadar leukosit per mm}^3 = \frac{N \times P}{V} \quad \text{atau} \quad N \times 50$$

Keterangan:

N: Jumlah Sel yang dihitung

P: Pengenceran

V: Volume Bilik Hitung

II.5.2 Diferensial Leukosit

Diferensial leukosit merupakan satu kesatuan dari sel dari sel darah putih yang terdiri dari granulosit dan agranulosit. Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi jumlah diferensial leukosit antara lain kondisi lingkungan, umur, dan kandungan nutrisi pakan. Selain itu, faktor nutrisi berupa protein berperan penting dalam proses pembentukan leukosit karena protein merupakan salah satu komponen darah (Purnomo *et al.*, 2015). Pengamatan diferensial leukosit pada preparat apusan darah dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100x. Preparat tersebut ditetesi dengan minyak imersi untuk memperjelas pengamatan.

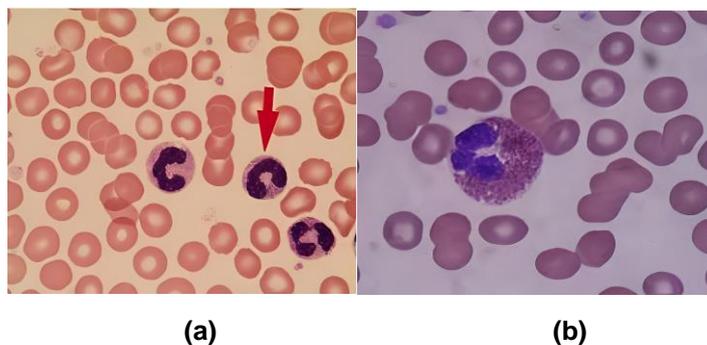
Hitung jenis leukosit (*Differential count*) merupakan perhitungan jenis leukosit dalam darah berdasarkan proporsi (%) tiap jenis leukosit dari seluruh jumlah leukosit (Indriasari, 2009). Jumlah leukosit yang dihitung adalah sebanyak 100 leukosit untuk setiap preparat. 100 leukosit tersebut

dikelompokkan berdasarkan ukuran, warna, jumlah, granula, sitoplasma, bentuk kromatin dan inti ke dalam lima kelompok yaitu neutrofil, eosinofil, basofil, monosit, dan limfosit. Hasil perhitungan dinyatakan dalam persen (%) (Mataheru & Unitly, 2020). Diferensial Leukosit (Sel darah putih) terdiri dari dua kelompok utama yaitu kelompok granulosit dan agranulosit.

II.5.2.1 Granulosit (sel yang mengandung granula)

Menurut Sherwood (2018) granulosit terdiri dari neutrofil, basofil dan eosinofil dimana inti sel-sel ini tersegmentasi menjadi lobus dengan bentuk bervariasi dan sitoplasmanya mengandung banyak granula yang terbungkus membran. Sel-sel ini juga biasa disebut polimorfonukleus.

II.5.2.1.1 Neutrofil

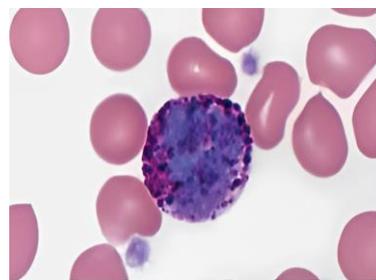


Gambar 3. (a) Neutrofil *stab* dan (b) segmen (Syarifah, 2020)

Neutrofil merupakan sel yang berperan sebagai pertahanan tubuh pertama pada infeksi akut. Neutrofil mempunyai respon lebih cepat terhadap inflamasi dan cedera jaringan daripada leukosit lainnya. Neutrofil diproduksi di dalam sumsum tulang kemudian beredar dalam pembuluh darah selama 6-10 jam sebelum berpindah menuju jaringan-jaringan. Fungsi utama neutrofil sebagai sel pemakan (fagosit). Neutrofil bergerak

secara khusus ke tempat infeksi atau peradangan di mana mereka menelan, membunuh, dan menghancurkan bakteri. Proses pindah ke tempat infeksi atau peradangan sebagai respon terhadap komponen komplemen yang diaktifkan dan sinyal kimia yang dikeluarkan oleh sel yang dikenal sebagai kemotaksis. Proses menelan bakteri oleh neutrofil disebut fagositosis (Firani, 2018). Neutrofil terbagi menjadi dua yaitu, neutrofil segmen merupakan neutrofil yang matang/matur, sedangkan stab (batang) merupakan neutrofil yang imatur dan dapat bermultiplikasi cepat pada infeksi akut (Aliviameita & Puspitasari, 2019). Jumlah neutrofil dalam tubuh manusia sekitar 60% - 70% (Sherwood, 2018). Peningkatan jumlah neutrofil terjadi pada kasus infeksi akut, radang, dan kerusakan jaringan. Sedangkan penurunan jumlah neutrofil terjadi pada infeksi virus, leukemia, dan anemia defisiensi besi (Indriasari, 2009).

II.5.2.1.2 Basofil



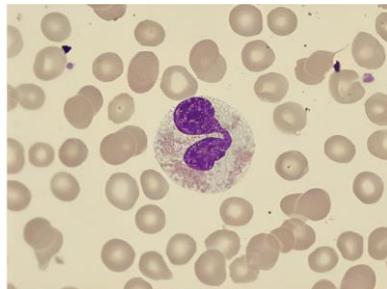
Gambar 4. Basofil (Syarifah, 2020).

Basofil merupakan salah satu jenis leukosit yang paling sedikit dimana memiliki jumlah 0,5% - 1% dari seluruh jumlah leukosit. Nilai normal dalam tubuh manusia sekitar 0 – 1% (Indriasari, 2009). Basofil mempunyai inti sel yang berlobus dan sitoplasma dipenuhi dengan granula kasar

berwarna ungu-biru. Granula ini disebut granula basofilik karena mengikat zat warna basa *methylen* blue (Firani, 2018).

Secara struktur dan fungsi, sel basofil sangat mirip dengan sel mast, yang tidak pernah beredar dalam darah, tetapi tersebar di jaringan ikat di seluruh tubuh. Baik basofil maupun sel mast mensintesis dan menyimpan histamin dan heparin, yaitu bahan kimia poten yang dapat dibebaskan jika terdapat rangsangan yang sesuai. Pelepasan histamin berperan penting dalam reaksi alergi, sedangkan heparin mempercepat pembersihan partikel lemak dari darah setelah memakan makanan berlemak (Sherwood, 2018). Peningkatan basofil terdapat pada proses inflamasi (radang), leukemia, dan fase penyembuhan infeksi. Sedangkan penurunan basofil terjadi pada penderita stress, dan reaksi hipersensitivitas (Indriasari, 2009).

II.5.2.1.3 Eosinofil



Gambar 5. Eosinofil (Syarifah, 2020)

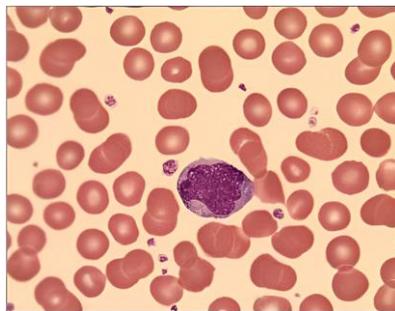
Eosinofil merupakan salah jenis leukosit yang terlibat dalam reaksi alergi dan infeksi (terutama parasit) dalam tubuh. Nilai normal eosinofil dalam tubuh manusia sekitar 1% - 4% (Indriasari, 2009). Eosinofil mempunyai granula berukuran besar dan seragam. Eosinofil terikat kuat pada zat warna eosin yang bersifat eosinofilik (suka eosin). Eosin berwarna

merah-oranye dan bersifat asam, itulah sebabnya eosinofil tampak kemerahan. Eosinofil biasanya memiliki dua atau tiga lobus yang dihubungkan oleh untaian tipis nukleus (Rosita *et al.*, 2019). Peningkatan eosinofil terdapat pada kejadian alergi, dan infeksi parasit. Sedangkan penurunan eosinofil terdapat kejadian shok, dan stres (Indriasari, 2009).

II.5.2.2 Agranulosit (Sel yang tidak mengandung granula)

Agranulosit adalah sel yang tidak memiliki segmen atau lobus pada inti dan tidak memiliki granula pada sitoplasma, terdiri atas limfosit dan monosit (Adinugroho *et al.*, 2019).

II.5.2.2.1 Monosit

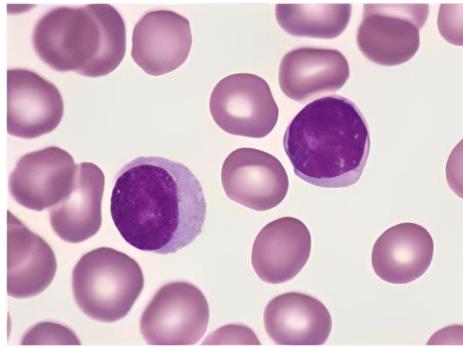


Gambar 6. Monosit (Syarifah, 2020)

Monosit merupakan jenis sel darah putih yang berukuran paling besar, Monosit memiliki inti yang berlobus berbentuk ginjal, dan sitoplasma berwarna biru keabu-abuan dan sitoplasmanya memiliki vakuola dan granula azurofilik yang halus. Di jaringan, monosit akan berdiferensiasi membentuk makrofag yang berusia lebih panjang, yang disebut sebagai histiosit (Firani, 2018). Nilai normal dalam tubuh manusia sekitar 2% - 6% dari jumlah seluruh leukosit (Sherwood, 2018). Peningkatan monosit terdapat pada infeksi virus, dan parasit (misalnya cacing). Sedangkan

penurunan monosit terdapat pada leukemia limposit dan anemia aplastik (Indriasari, 2009).

II.5.2.2 Limfosit



Gambar 7. Limfosit (Syarifah, 2020)

Limfosit memiliki nukleus yang berwarna gelap dan bulat, serta sitoplasmanya berwarna biru langit dan membentuk lingkaran di sekitar nukleus. Semakin besar sel, semakin banyak sitoplasma yang akan terlihat (Rosita *et al.*, 2019). Nilai normal dalam tubuh manusia sekitar 25% - 33% dari jumlah seluruh leukosit (Sherwood, 2018). Limfosit secara spesifik berperan untuk membentuk pertahanan imun yang berasal dari sel stem hemopoietik. Sel stem limfoid umumnya mengalami diferensiasi dan proliferasi menjadi sel B dan sel T.

Limfosit B menghasilkan antibodi, yang beredar dalam darah dan bertanggung jawab dalam imunitas humoral, atau imunitas yang diperantarai antibodi. Suatu antibodi berikatan dengan benda asing yang mengandung antigen spesifik seperti bakteri, yang memicu produksi antibodi tersebut dan menandainya untuk dihancurkan (melalui fagositosis). Sedangkan Limfosit T tidak memproduksi antibodi, dimana sel ini secara

langsung menghancurkan sel sasaran spesifiknya dengan mengeluarkan beragam zat kimia. Proses ini disebut imunitas selular (Sherwood, 2018). Peningkatan limfosit terdapat pada leukemia limfositik, infeksi virus, dan infeksi kronik. Sedangkan penurunan limfosit terjadi pada anemia aplastik, dan gagal ginjal (Indriasari, 2009).