

Uji Toksisitas Subkronis Kombinasi Ekstrak Kedelai dan Jati Belanda terhadap Hematologi Tikus Wistar

(Subchronic Toxicity Test of Combination of Soybean and Jati Belanda Extract towards Wistar Rat Hematology)

MEILINAH HIDAYAT^{1*}, SIJANI PRAHASTUTI², ESTHEROLITA DEWI³, DEWI SAFITRI⁴, SITI FARAH⁴, ANDREANUS A.SOEMARDJI⁴

¹Bagian Nutrisi Universitas Kristen Maranatha Bandung

²Bagian Biokimia Universitas Kristen Maranatha Bandung

³Universitas Kristen Maranatha Bandung

⁴Bagian Farmakologi, Sekolah Farmasi Institut Teknologi Bandung
Jalan Prof Drg. Suria Sumantri MPH no 65 Telp: (022)2012186 Bandung 40163

Diterima 26 Desember 2016, Disetujui 2 Maret 2017

Abstrak: Uji toksisitas subkronis dilakukan untuk mengevaluasi efek dan memantau toksisitas suatu senyawa. Penggunaan kombinasi ekstrak etanol kedelai *Detam 1* (EEKD) dan jati Belanda (EEJB) sebagai terapi penurunan berat badan akan dikonsumsi untuk waktu yang panjang dan berulang, oleh karena itu perlu dilakukan uji toksisitas. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui efek toksik subkronis dari bahan uji terhadap hematologi tikus Wistar. Penelitian dilakukan sesuai ketentuan uji toksisitas yang ditetapkan Badan Pengawasan Obat dan Makanan (BPOM) Indonesia pada 120 ekor tikus Wistar (60 ekor jantan, 60 ekor betina) selama 90 hari dan 120 hari (satelit). Tikus dibagi menjadi 6 kelompok: I: Kontrol Negatif, II: dosis rendah, III: dosis tengah, IV: dosis tinggi, Kelompok Satelit (V dan VI) selama 120 hari: V: Satelit Kontrol Negatif, VI: Satelit dosis tinggi. Parameter yang diukur adalah kadar leukosit, hemoglobin, MCH, MCHC, MCV, hematokrit, RBC, dan trombosit menggunakan alat *Hematology Analyzer* dengan prinsip kolorimetri. Hasil penelitian menunjukkan bahwa efek bahan uji terhadap semua parameter hematologi tidak berbeda dengan kelompok kontrol ($p < 0,005$), kecuali kadar Leukosit pada tikus jantan, MCH dan trombosit pada tikus betina yang hasilnya dapat diabaikan. Simpulan, uji toksisitas subkronis pemberian kombinasi EEKD dan EEJB adalah aman dan tidak toksik terhadap hematologi darah tikus Wistar.

Kata kunci: ekstrak etanol, kombinasi kedelai *Detam 1*, daun jati belanda, uji toksisitas subkronis, hematologi, tikus Wistar.

Abstract: Subchronic toxicity test is performed to evaluate the effect and monitor the toxicity effects of a compound. The use of combination of ethanol extract of Detam 1 soybean (EEDS) and Jati Belanda (EEJB) as an antiobesity therapy will be consumed for a long time, therefore this test need to be done. The purpose of this research is to know the subchronic toxic effect of the test material on Wistar rat hematology. The study was conducted in accordance with the toxicity test stipulated by the Food and Drug Supervisory Agency of Indonesia, on 120 Wistar rats (60 male, 60 females) for 90 days and 120 days (satellite). Rats were divided into 6 groups. Parameters measured were leukocyte, hemoglobin, MCH, MCHC, MCV, hematocrit, RBC, and platelets using the Hematology Analyzer with the principle of colorimetry. The results showed that the effect of the test material on all hematologic parameters was not different from the control group ($p < 0.005$), except for the leukocyte, MCH and platelet levels, but the results could be negligible. Conclusion: subchronic toxicity assay of combination EEKD and EEJB is safe and not toxic to hematologic parameters in Wistar rats.

Keywords: subchronic toxicity test, combination of ethanol extract of Detam 1, soybean and Jati Belanda, hematology, Wistar rats.

* Penulis korespondensi, Hp. 08122163203
e-mail: mellahidayat@yahoo.com.

PENDAHULUAN

BAHAYA akibat pemaparan suatu zat pada manusia dapat diketahui dengan mempelajari efek kumulatif, dosis yang dapat menimbulkan efek toksik pada manusia. Pada umumnya dilakukan dengan cara menggunakan hewan uji sebagai model uji toksisitas. Uji toksisitas subkronis oral adalah suatu pengujian untuk mendeteksi efek toksik yang muncul setelah pemberian sediaan uji dengan dosis berulang yang diberikan secara oral pada hewan uji selama sebagian umur hewan, tetapi tidak lebih dari 10% seluruh umur hewan. Prinsip dari uji toksisitas subkronis oral adalah sediaan uji dalam beberapa tingkat dosis diberikan setiap hari pada beberapa kelompok hewan uji selama 90 hari, akan lebih baik apabila ditambahkan kelompok satelit untuk melihat adanya efek tertunda atau efek yang bersifat *reversible*^(1,2).

Dalam pengembangan suatu obat baru, syarat yang harus dipenuhi untuk dapat meningkat ke tahap penggunaan selanjutnya adalah aman dan tidak toksik. Untuk keperluan tersebut dibutuhkan pemeriksaan uji toksisitas, baik toksisitas akut maupun subkronis. Uji toksisitas subkronis dilakukan untuk mengevaluasi efek senyawa, diberikan kepada hewan uji secara berulang-ulang. Senyawa yang diberikan biasanya diberikan setiap hari selama kurang lebih 10% dari masa hidup hewan, yaitu 3 bulan atau 90 hari untuk tikus^(1,2).

Metode uji toksisitas dapat dibagi menjadi dua jenis yaitu, uji toksisitas yang dirancang untuk mengevaluasi seluruh efek umum suatu senyawa, dan secara rinci toksisitas spesifik. Penelitian ini difokuskan pada toksisitas spesifik yaitu aspek hematologi. Pengujian hematologi diperlukan untuk membantu menegakkan diagnosis dan memantau toksisitas yang terjadi pada hewan uji. Pemeriksaan hematologi dapat memberikan informasi efek yang disebabkan senyawa uji terhadap darah dan jaringan pembentuk darah. Leukosit berperan dalam pertahanan selular dan humoral dari organisme terhadap materi asing⁽³⁾.

Kedelai (*Glycine max L.Merr*) varietas *Detam 1* adalah kedelai varietas unggul hasil pemuliaan tanaman dari perkebunan Balitkabi Malang. Penelitian pendahuluan yang menguji efek kedelai ini terhadap berat badan tikus Wistar jantan selama 14 hari dengan perlakuan 11 jenis ekstrak yang berbeda, menunjukkan bahwa ekstrak yang mempunyai aktivitas paling baik terhadap penurunan berat badan adalah ekstrak protein kedelai varietas *Detam 1* dengan dosis 20 mg/kg BB ($p = 0,022$)^(4,5). Kombinasi dari kedelai *Detam 1* dan daun jati Belanda (*Guazuma ulmifolia Lamm*) yang

ditanam di perkebunan Bumi Herbal Dago telah diteliti dan terbukti memiliki efek sebagai penurun berat badan dan antihiperlipidemia^(6,7,8,9,10). Sebagai obat penurun berat badan, kombinasi dari kedelai *Detam 1* dan daun jati Belanda akan dikonsumsi untuk waktu yang cukup lama sehingga perlu dilakukan pengujian toksisitas subkronis.

Pada penelitian ini dilakukan penelitian uji toksisitas subkronis dari efek pemberian kombinasi ekstrak etanol biji kedelai *Detam 1* (EEKD) dan ekstrak etanol jati Belanda (EEJB) secara *in vivo* selama 90 hari terhadap aspek hematologi tikus Wistar jantan dan betina.

Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui keamanan dan efek toksik subkronis dari pemberian kombinasi EEKD dan EEJB terhadap hematologi tikus Wistar setelah diberi perlakuan selama 90 hari, dilanjutkan pengamatan 30 hari berikutnya (satelit) untuk kelompok yang tidak diberi perlakuan dan perlakuan dosis tinggi.

BAHAN DAN METODE

BAHAN DAN METODE. Penelitian yang digunakan adalah biji kedelai varietas *Detam-1* asal Balitkabi Malang dan simplisia daun jati Belanda varietas Bumi Herbal Dago^(11,12,13,14,15). Pembuatan ekstrak etanol kedua bahan tersebut menggunakan proses maserasi sederhana⁽¹⁶⁾.

Hewan uji yang digunakan adalah tikus galur Wistar jantan dan betina berumur 6-8 minggu dengan berat antara 150-200 g. Sebanyak 120 ekor tikus dikelompokkan secara acak menjadi 6 kelompok, masing-masing 10 ekor tikus jantan dan 10 ekor tikus betina, kemudian diadaptasi selama 7 hari. Uji toksisitas subkronis dilakukan selama 90 hari (untuk kelompok perlakuan) dan 120 hari (untuk kelompok pengamatan /satelit), sesuai ketentuan uji toksisitas yang ditetapkan Badan Pengawasan Obat dan Makanan (BPOM)^(2,17,18,19). Kelompok perlakuan selama 90 hari diberikan kombinasi EEKD dan EEJB perbandingan 1:2 dalam beberapa dosis. Kelompok kontrol negatif, hanya diberi pelarut *aquadest*, dan CMC 0,5% kelompok I: kombinasi dosis rendah (EEKD:EEJB = 50:100mg/kgBB/hari), kelompok II: kombinasi dosis menengah (EEKD:EEJB = 100:200mg/kgBB/hari), kelompok III: kombinasi dosis tinggi (EEKD: EEJB = 200:400mg/kgBB/hari), kelompok satelit selama 120 hari: kelompok satelit kontrol negatif, hanya diberi *aquadest* dan pelarut CMC 0,5%, kelompok satelit dosis tinggi (EEKD: EEJB = 200:400 mg/kgBB/hari).

Parameter yang diukur adalah: kadar leukosit,

hemoglobin, *Mean Corpuscular Hemoglobin* (MCH), *Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration* (MCHC), penghitungan serapan darah atau *Mean Corpuscular Volume* (MCV), hematokrit (Ht), jumlah sel eritrosit/ *red blood cell* (RBC), dan trombosit.

Pada hari ke 91, semua tikus jantan dan betina kelompok kontrol negatif, kelompok I, II dan III dikorbankan sesuai standar komite etik. Sedangkan untuk semua tikus kelompok kontrol satelit dan kelompok satelit dosis tinggi dilakukan pada hari ke 121. Darah dari intra kardial ditampung dalam tabung *ependorf* 2,5 mL, selanjutnya disentrifus selama 10 menit pada 3000 rpm sehingga serum akan terpisah dan membentuk lapisan. Serum diperiksa menggunakan alat *Hematology Analyzer*, dengan prinsip kerja kolorimetri.

Hematokrit adalah perkiraan volume eritrosit padat per satuan volume darah. Volume hematokrit normal tikus 36-50,6%. Sedangkan volume darah normal tikus 60 mL/kg. Kadar hemoglobin normal tikus adalah 11-20 g/100 mL^(20,3).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Setelah dilakukan pemeriksaan hematologi terhadap sampel darah 60 ekor tikus jantan dan 60 ekor betina, menggunakan metode kolorimetri, dengan alat *Hematology Analyzer*. Hasil pengukuran hematologi dapat dilihat pada tabel 1 di bawah ini. Berikut adalah analisis statistika rerata kadar hematologi tikus antar

Tabel 2. Analisis statistika pemeriksaan hematologi tikus Wistar jantan.

No	JENIS PEMERIKSAAN	HASIL ANALISIS STATISTIKA
1	Lekosit	Signifikansi ANAVA: 0,000 Perbedaan yang signifikan antara kelompok satelit kontrol* dengan yang lain (78,27± 5,26) (p < 0,05), nilainya paling tinggi. Kadar Normal untuk Lekosit tikus Wistar jantan usia lebih dari 17 minggu adalah: 1,98 -11,06 x 10 ³ µL ⁻¹
2	Hb	Signifikansi ANAVA: 0,127 Menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan antar kelompok perlakuan dan kontrol (p> 0,05)
3	MCH	Signifikansi ANAVA: 0,705 Menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan antar kelompok perlakuan dan kontrol (p> 0,05)
4	MCHC	Signifikansi ANAVA: 0,671 Menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan antar kelompok perlakuan dan kontrol (p> 0,05)
5	RBC	Signifikansi ANAVA: 0,498 Menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan antar kelompok perlakuan dan kontrol (p> 0,05)
6	MCV	Signifikansi ANAVA: 0,362 Menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan antar kelompok perlakuan dan kontrol (p> 0,05)
7	Ht	Signifikansi ANAVA: 0,390 Menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan antar kelompok perlakuan dan kontrol (p> 0,05)
8	Trombosit	Signifikansi ANAVA: 0,334 Menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan antar kelompok perlakuan dan kontrol (p> 0,05)

menggunakan ANAVA dan jika signifikan dilanjutkan dengan uji beda Tukey HSD.

Hasil pemeriksaan hematologi tikus Wistar jantan setelah pemberian perlakuan selama 90 hari, ternyata semua parameter hematologi, Hb, MCHC, eritrosit, MCV, Ht, granulosit kecuali leukosit (WBC) menunjukkan hasil yang tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol (p>0,005). Yang menunjukkan perbedaan signifikan secara statistika adalah leukosit. Kadar leukosit yang paling tinggi didapat pada kelompok satelit kontrol. Hal ini tidak

Tabel 1. Rerata kadar hematologi tikus Wistar jantan setelah perlakuan 90 & 120 hari.

GRUP	HASIL	Lekosit (X10 ³ L)	Hb (g/dL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	MCV (fl)	Ht (%)	RBC (X10 ¹² /L)	Trombosit
KONTROL	rata2	12,35	15,85	23,20	50,60	45,94	32,25	7,00	1366,13
	sd	3,80	1,81	2,84	6,85	0,86	8,46	1,72	138,94
KONTROL SATELIT	Rata2	78,27	16,09	24,34	53,32	45,70	30,56	6,68	1421,33
	sd	5,26	1,49	2,49	5,95	0,61	4,85	1,04	180,39
DOSIS RENDAH	rata2	8,36	14,49	27,91	50,52	131,54	57,33	5,24	1498,00
	sd	3,59	3,28	3,05	2,60	17,26	70,69	1,34	355,13
DOSIS TENGAH	rata2	10,88	17,56	23,34	51,03	45,83	35,80	7,76	1373,50
	sd	5,26	5,26	2,62	6,41	1,21	14,71	3,03	332,17
DOSIS TINGGI	rata2	12,80	14,20	18,27	43,05	42,25	33,20	82,34	1151,00
	sd	3,37	1,51	6,69	4,56	14,71	3,85	238,11	226,68
SATELIT TINGGI	rata2	12,05	16,20	24,71	54,29	45,57	30,25	6,63	1427,88
	sd	3,55	1,07	2,70	6,39	0,73	4,46	0,90	173,81

kelompok perlakuan, menggunakan ANAVA dan jika signifikan dilanjutkan dengan uji beda Tukey HSD. Hematologi tikus antar kelompok perlakuan,

mempengaruhi kesimpulan hasil. Diasumsikan bahwa pemberian bahan uji tidak mempengaruhi kadar hematologi tikus Wistar Jantan. Tabel 4 berikut

menampilkan hasil analisis statistika perbandingan antar kelompok dari hasil pemeriksaan hematologi tikus Wistar betina.

kontrol (120 hari) berbeda dengan hasil kelompok yang lain $(78,27 \pm 5,26) \times 10^3/\mu\text{L}$. Kelompok kontrol menunjukkan kadar leukosit $(12,35 \pm 3,80) \times 10^3/$

Tabel 3. Rerata Kadar Hematologi Tikus Wistar Betina setelah Perlakuan 90 dan 120 hari.

KELOMPOK	HASIL	Lekosit ($\times 10^9$ L)	Hb (g/dL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	MCV (fl)	Ht (%)	RBC ($\times 10^{12}/$ L)	Trombosit
KONTROL	rata2	67,75	14,60	16,61	44,58	46,59	32,75	0,88	1113,13
	sd	8,54	2,28	1,233	3,53	4,60	7,48	0,20	190,43
KONTROL SATELIT	Rata2	15,10	14,60	16,43	52,14	46,05	28,00	7,60	1421,33
	sd	5,28	1,97	2,49	3,50	4,99	5,63	1,41	180,39
DOSIS RENDAH	rata2	22,22	14,49	18,315	49,02	46,70	29,56	0,79	1267,44
	sd	5,69	1,38	2,48	9,16	4,33	1,51	0,04	223,15
DOSIS TENGAH	rata2	21,84	13,64	16,04	42,53	47,18	32,30	0,86	996,60
	sd	9,08	1,04	1,36	3,92	1,71	3,62	0,10	124,52
DOSIS TINGGI	rata2	15,45	15,45	18,04	49,02	46,01	31,63	0,86	1296,50
	sd	5,36	1,37	12,23	3,63	0,50	3,16	0,08	182,45
SATELIT TINGGI	rata2	12,28	15,60	17,15	41,86	87,61	60,40	0,93	1148,20
	sd	4,10	1,54	2,07	4,19	13,04	8,08	0,16	192,82

Hasil pemeriksaan hematologi tikus Wistar betina setelah perlakuan selama 90 hari, ternyata leukosit (WBC), Hb, MCHC, eritrosit, MCV, Ht tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol. Yang menunjukkan perbedaan signifikan secara statistika adalah MCH dan trombosit. Kadar MCH dan trombosit kelompok dosis tengah lebih rendah dan berbeda signifikan dengan kelompok kontrol. Kadar leukosit kelompok satelit

μL sedangkan kadar normal untuk leukosit tikus Wistar jantan usia lebih dari 17 minggu adalah: $(1,98-11,06) \times 10^3/\mu\text{L}^{(21)}$. Kelompok satelit kontrol adalah kelompok yang tidak diberi perlakuan apapun selain *aquadest* dan pelarut CMC 0,5% dan diamati selama 120 hari. Jadi kenaikan kadar leukosit yang tinggi bukan disebabkan oleh pemberian sampel uji, namun kemungkinan diakibatkan oleh sebab yang lain, misalnya kondisi tikus kurang sehat dan hal ini merupakan keterbatasan penelitian.

Tabel 4. Analisis Statistika Pemeriksaan Hematologi tikus Wistar Betina.

No	JENIS PEMERIKSAAN	HASIL ANALISIS STATISTIKA
1	Lekosit	Signifikansi ANAVA: 0,069 Menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan antar kelompok perlakuan dan kontrol ($p > 0,05$)
2	Hb	Signifikansi ANAVA: 0,120 Menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan antar kelompok perlakuan dan kontrol ($p > 0,05$)
3	MCH	Signifikansi ANAVA: 0,000 Menunjukkan perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan dan kontrol ($16,61 \pm 1,23$) ($p > 0,05$). Nilai rerata MCH kelompok dosis tengah* adalah yang paling rendah ($16,04 \pm 1,36$). Kadar Normal untuk MCH tikus Wistar betina usia lebih dari 17 minggu adalah: $17,6-20,3 \text{ pg}^{21}$
4	MCHC	Signifikansi ANAVA: 0,021 Menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan antar kelompok perlakuan dan kontrol ($p > 0,05$)
5	RBC/Eritrosit	Signifikansi ANAVA: 0,123 Menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan antar kelompok perlakuan dan kontrol ($p > 0,05$)
6	MCV	Signifikansi ANAVA: 0,528 Menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan antar kelompok perlakuan dan kontrol ($p > 0,05$)
7	Ht	Signifikansi ANAVA: 0,356 Menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan antar kelompok perlakuan dan kontrol ($p > 0,05$)
8	Trombosit	Signifikansi ANAVA: 0,004 Menunjukkan perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan dan kontrol ($1113,13 \pm 190,43$) ($p > 0,05$). Nilai rerata Trombosit kelompok dosis tengah* adalah yang paling rendah ($996,60 \pm 124,52$). Kadar Normal untuk trombosit tikus Wistar betina usia lebih dari 17 minggu adalah: $599-1144 \text{ pg}^{21}$

MCH atau *Mean Corpuscular Hemoglobin* atau hemoglobin eritrosit rata-rata, adalah jumlah rata rata hemoglobin di dalam eritrosit. Eritrosit yang lebih besar (makrositik) biasanya memiliki MCH yang lebih tinggi. Begitupun sebaliknya, eritrosit yang lebih kecil akan memiliki nilai MCH yang lebih rendah. MCH mengindikasikan bobot kadar hemoglobin di dalam eritrosit tanpa memperhatikan ukurannya⁽²²⁾. Penelitian Olafadehan yang memberikan beberapa tingkat bahan uji kombinasi *Forage* dan Tannin pada kambing, menunjukkan hasil bahwa *Packed cell volume* (PCV), leukosit (WBC), limfosit, serum urea dan glukosa kadarnya meningkat linier dan kadar MCH menurun linier pada rasio kombinasi Tannin yang rendah ($p < 0,05$)⁽²²⁾.

Mekanisme tannin dalam mempengaruhi MCH belum jelas sepenuhnya. Kombinasi EEKD dan EEJB yang digunakan dalam penelitian ini mengandung kadar tannin yang cukup tinggi. 5,9 Pada hasil MCH tikus betina, didapat hasil terendah pada kelompok dosis tengah ($16,04 \pm 1,36$) pg. Rumus baku penghitungan MCH adalah (Hb dikalikan 10)

lalu dibagi dengan hitung eritrosit; 23 hasil yang didapat berdasarkan perhitungan adalah 15,86 pg, tidak berbeda jauh dengan hasil pemeriksaan alat 16,04 pg. Kadar normal untuk MCH tikus Wistar betina usia lebih dari 17 minggu adalah: 17,6-20,3 pg⁽²¹⁾. Kadar MCH dari kelompok kontrol: 16,61 pg, kelompok kontrol satelit: 15,43 pg hasilnya juga lebih rendah dari kadar normal. Disimpulkan bahwa MCH kadar tersebut dianggap tidak terganggu atau sama dengan kontrol.

Kadar trombosit yang rendah bisa disebabkan oleh berbagai penyebab. Beberapa penyebab turunnya trombosit, antara lain: kehamilan, penyakit idiopatik trombositopenik purpura, penyakit autoimun, infeksi bakteri parah, trombotik trombositopenik purpura, sindrom uremik hemolitik atau obat-obatan. Beberapa jenis obat dapat menurunkan jumlah trombosit dalam darah, karena mekanisme kerjanya yang mempengaruhi sistem kekebalan tubuh, seperti: heparin, kina, antibiotik sulfa, interferon, antikonvulsan dan garam emas⁽²⁴⁾.

Hasil pemeriksaan kadar trombosit kelompok dosis tengah menunjukkan kadar yang paling rendah: (996,60±124,52) pg, namun ternyata kadar normal untuk trombosit tikus Wistar betina usia lebih dari 17 minggu adalah: 599 -1144 pg⁽²¹⁾, sehingga disimpulkan bahwa pemberian kombinasi EEKD dan EEJB dengan dosis 100:200 mg tidak menyebabkan kelainan kadar trombosit dan tidak berbeda dengan kelompok kontrol. Hasil MCH dan trombosit yang rendah pada tikus betina ini tidak menunjukkan hal yang membahayakan dan dapat diabaikan.

SIMPULAN

Uji toksisitas subkronis pemberian kombinasi ekstrak etanol kedelai Detam 1 dan ekstrak etanol jati belanda adalah aman dan tidak toksik terhadap hematologi darah tikus Wistar setelah diberi perlakuan selama 90 hari, dilanjutkan pengamatan 30 hari berikutnya (satelit) untuk kelompok yang tidak diberi perlakuan dan perlakuan dosis tinggi.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih kepada Direktorat Jendral Perguruan Tinggi Republik Indonesia yang telah memberikan Hibah Penelitian Nomor: 105/SP2H/PPM/DRPM/II/2016, Tanggal 17 Februari 2016; sehingga penelitian ini dapat terlaksana.

DAFTAR PUSTAKA

1. Darelanko MJ and Manfred AH. Handbook of Toxicology. Second Edition, USA: CRC Press; 2002.
2. BPOM. Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor 7 Tahun 2014 tentang pedoman uji toksisitas nonklinik secara *in vivo*.
3. Mitruka H, Rawnsley M. Clinical biochemical and hematological reference values in normal experimental animals and normal humans. Masson Pub. USA-Medical. 1981:413.
4. Hidayat M, Sujatno M, Sutadipura N & Setiawan. Effect several soybean (*Glycine max* L. Merr) extracts to food intake, body weight and cholecystokinin plasma in rats. Majalah Ilmu Faal Indonesia. 2009.3(3):151-8.
5. Hidayat M, Kurnia D, Sujatno M, Sutadipura N, Setiawan. Perbandingan kandungan makronutrisi dan isoflavon dari biji, tempe dan ekstrak kedelai Detam 1 dan Wilis serta potensinya dalam menurunkan bobot badan. Bionatura Jurnal Ilmu Hayati dan Fisik. 2010.12(1):5-13.
6. Hidayat M, Soeng S, Prahastuti S. Characteristics of combination of ethanol extract Detam 1 soybean (*Glycine max* L.merr) and ethanol extract of Jati Belanda leaves (*Guazuma ulmifolia*) in potential inhibition of pancreas lipase enzyme. International Seminar on Natural Products Medicine. 2012.
7. Hidayat M, Soeng S, Prahastuti S. Pengujian aktivitas lipase inhibitor ekstrak etanol dan hasil fraksionasi dari kedelai Detam 1 dan daun jati belanda. Jurnal Chimica et Natura Acta. 2014.2(1):76-82.
8. Hidayat M, Soeng S, Prahastuti S, PatriciaTH dan Yonathan K A. Aktivitas antioksidan dan antitrigliserida ekstrak tunggal kedelai, daun jati belanda serta kombinasinya. Bionatura. 2014.16(2).
9. Hidayat M, Soeng S, Prahastuti S, Tiono H, Krisetya YA and Sugiono M. Characteristics of ethanol extract of Detam 1 Indonesian soybean and jati belanda leaves and the effects of their combinations on weight gain and jejunum histopathological changes in male Wistar rats. European Journal of Medicinal Plants. 2015.7(2):87-98.
10. Krisetya YA, Hidayat M, Soeng S. Perbandingan efek ekstrak etanol kedelai Detam 1 jati belanda dan kombinasinya terhadap penghambatan kenaikan berat badan tikus Wistar jantan yang diinduksi pakan tinggi lemak. Repository Maranatha. 2013.
11. Balai Penelitian Tanaman Obat. Inventarisasi tanaman obat Indonesia (1) jilid 2. Jakarta: Departemen Kesehatan & Kesejahteraan Sosial RI. Badan Penelitian & Pengembangan Kesehatan (LitBangKes); 2001:321-2.
12. Balitkabi. Balai Penelitian Tanaman Kacang-kacangan dan Umbi-umbian. 2011. Diambil dari <http://balitkabi.litbang.deptan.go.id/index.php/Kedelai/Varietas-unggul-Kedelai-Detam-1.html>. Diunduh 28 Jan 2015.

13. Bumi Herbal Dago. 2012. Diambil dari <http://bumi-herbal.com/> Diunduh 23 Januari 2013.
14. Heyne K. Tumbuhan berguna Indonesia, jilid 2. Terjemahan Badan LitBang Kehutanan Jakarta. Jakarta: Yayasan Sarana Wana Jaya; 1987:1020-9.
15. Heyne K. Tumbuhan berguna Indonesia, Jilid III. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan Republik Indonesia. 1987.
16. Muchtadi D. Petunjuk laboratorium analisis pangan. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi. PAU Pangan dan Gizi. 1998.
17. OECD. Organization for economic cooperation and development. Guidelines for testing of Chemicals, OECD. 2001:407-8.
18. Rini Hendriani. Uji toksisitas subkronis kombinasi ekstrak etanol buah mengkudu (*Morinda citrifolia* Linn.) dan rimpang gajah (*Zingiber officinale* Rose) pada tikus Wistar. Karya Ilmiah yang tidak dipublikasikan. Fakultas Farmasi UNPAD. 2007.
19. WHO. Joint WHO/FAO expert consultation on diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: Report of a joint WHO/FAO expert consultation. Geneva, Switzerland. 2003.
20. Van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC eds. The welfare of laboratory animals. Elsevier. 2001.173-95.
21. Giknis MLA, Clifford CB. Clinical laboratory for crl: Wistar WI (Han). Charles River publisher. 2008:11-12.
22. Hematologi: MCH, MCHC, MCV. Tersedia di (www.klikdokter.com). Diunduh 12 April 2016.
23. Olafadehan OA, Adewumi MK, Okunade SA. Effects of feeding tannin-containing forage in varying proportion with concentrate on the voluntary intake, haematological and biochemical indices of goats. *Trakia Journ of Sci.* 2014.12(1):73-81.