

Toksistas Akut Ekstrak Etanol dari Simplisia Daun Sirsak (*Annona muricata L.*) yang Diawetkan dengan Iradiasi Gamma

*Acute Toxicity of Ethanol Extract from Soursop Leaves Simplisia (*Annona muricata L.*) Preserved by Gamma Irradiation*

E.K. Harantung*, Susanto, H. Winarno

Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi, Badan Tenaga Nuklir Nasional
Jl. Lebak Bulus Raya No. 49, Jakarta 12440, Indonesia
E-mail: erminkk@batan.go.id

ABSTRAK

Daun sirsak (*Annona muricata L.*) banyak digunakan sebagai obat tradisional dan suplemen oleh masyarakat Indonesia. Daun sirsak mengandung banyak metabolit sekunder yang berkhasiat sebagai antioksidan, antiinflamasi, anti bakteri dan antikanker. Penanganan simplisia maupun sediaan obat herbal daun sirsak sangat penting agar terhindar dari kontaminasi jamur dan bakteri. Teknik iradiasi gamma dapat digunakan untuk memperpanjang masa simpan simplisia/sediaan obat herbal. Pada penelitian ini dilakukan iradiasi daun sirsak kering pada dosis 7,5 kGy dan pengujian toksistas akut pada mencit untuk mengetahui efek toksistas akut sediaan uji ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata L.*) yang tidak diradiasi (0 kGy) dan yang diradiasi (7,5 kGy) pada laju dosis 7,0 kGy/jam. Pengujian toksistas akut oral dilakukan sesuai prosedur menurut WHO dan OECD guideline 423 (*Acute toxic class method*) menggunakan mencit galur ddY jantan dan betina, umur 2-3 bulan, bobot badan antara 20-30 g. Ekstrak etanol daun sirsak merupakan bahan natural, sehingga *starting* dosis dimulai pada uji limit dosis 2000 mg/kg BB. Pengamatan dilakukan terhadap gejala-gejala toksik, kematian hewan uji, perubahan kenaikan berat badan (*Average Daily Gain*: ADG) dan manifestasi efek toksik sampai hari ke-14. Pada akhir uji, mencit dikorbankan dan diambil organ-organ vital dan dievaluasi adanya kelainan secara gross patologi (makroskopi) dan histopatologi. Hasil uji toksistas akut menunjukkan bahwa pemberian sediaan uji ekstrak etanol daun sirsak yang tidak diradiasi (0 kGy) dan yang diradiasi (7,5 kGy) pada dosis ekstrak 2000 mg/kg BB dan 5000 mg/kg BB tidak menunjukkan gejala-gejala toksik maupun kematian mencit jantan dan betina. Pada pemeriksaan organ-organ vital secara gross patologi dan histopatologis juga tidak ditemukan adanya perubahan yang berarti pada organ organ vital hewan coba. Nilai LD₅₀ sediaan uji ekstrak etanol daun sirsak adalah > 5000 mg/kg BB pada mencit, termasuk kategori 5 (tidak terklasifikasi= *unclassified*) atau minimal praktis tidak toksik.

Kata kunci: daun sirsak, *Annona muricata*, toksistas akut oral, iradiasi gamma

ABSTRACT

Soursop leaves (*Annona muricata L.*) are widely used as traditional medicines and supplements by Indonesian people. Soursop leaves contain many secondary metabolites which have efficacy as antioxidant, anti-inflammatory, anti-bacterial and anti-cancer properties. Handling of simplisia and/or herbal medicinal of soursop leaves is very important in order that there are protected from fungal and bacterial contaminations. Gamma irradiation technique can be used to extend the shelf life of simplisia/herbal medicinal preparations. In this study, dried soursop leaves were irradiated at a dose of 7.5 kGy and acute oral toxicity test in mice was conducted to determine the acute toxicity effect of the ethanol extract of unirradiated (0 kGy) and irradiated (7.5 kGy) soursop leaves at a dose rate of 7.0 kGy/h. The acute oral toxicity test was carried out according to the procedures of WHO and OECD guideline 423 (*acute toxic class method*) by using male and female of ddY mice, aged 2-3 months with the body weight (BW) of 20-30 g. The ethanol extract of soursop leaves was a natural ingredient, so the initial dose was started at the limit test dose of 2000 mg/kg BW. The observations had been carried out on toxic symptoms, mortality of tested animals, changes in body weight gain (*Average Daily Gain*: ADG) and the manifestation of a toxic effect until the day-14. At the end of the test, the mice were sacrificed and vital organs were taken and evaluated for gross pathology (macroscopy) and histopathological abnormalities. The results of the acute toxicity test showed that the administration of unirradiated (0 kGy) and irradiated (7.5 kGy) of ethanol extract's soursop leaves at an extract doses of 2000 and 5000 mg/kg BW did not show any toxic symptoms or death of male and female mice. The observation of vital organs gross, pathology, and histopathology also did not find any significant changes in the vital organs of animals. The LD₅₀ value of the ethanol extract's soursop leaves was > 5000 mg/kg BW in mice, it was included as category 5 (*unclassified*) or at least practically non-toxic.

Keywords: soursop leaves, *Annona muricata*, acute oral toxicity, gamma irradiation

PENDAHULUAN

Daun sirsak (*Annona muricata* L.) merupakan keluarga Annonaceae, dan oleh sebagian masyarakat Indonesia digunakan untuk mengobati berbagai penyakit, bahkan secara komersial telah diproduksi oleh industri obat herbal [1]. Metabolit sekunder yang terkandung di dalamnya memiliki potensi sebagai antihipertensi dan antimikroba [1], antioksidan [1][2], antiinflamasi dan antikanker [1][3][4][5]. O.O. Elizabeth *et al.* [2], melaporkan bahwa metabolit sekunder yang terdapat dalam daun sirsak adalah alkaloid, saponin, tanin, steroid, glikosida, dan flavonoid, sementara A.V. Coria-Télez [6] juga menemukan adanya asetogenin, alkaloid, fenolik, dan megastigman, selanjutnya S. Ramasamy [3] telah mengisolasi senyawa murikureasin dan murihexosin C dari daun sirsak.

Bioaktivitas daun sirsak menunjukkan bahwa ekstrak metanol, ekstrak etanol, dan ekstrak air dari daun sirsak mempunyai aktivitas sebagai antikanker, antara lain: kanker hati, kanker paru, kanker prostat, dan leukemia [3], lebih lanjut Najmuddin dkk. mengungkapkan bahwa ekstrak air daun sirsak memiliki aktivitas antiproliferasi terhadap sel kanker payudara MCF7, MDAMB231, dan 4T1 dengan nilai IC_{50} masing-masing 220, 350 dan 250 $\mu\text{g/mL}$ [7]. N.N.N. Daud *et al.* (2016) melaporkan bahwa senyawa asetogenin yang diisolasi dari ekstrak etanol daun sirsak memiliki aktivitas sangat kuat dalam menghambat pertumbuhan sel kanker kolon HT-29 dengan nilai IC_{50} 1,0 $\mu\text{g/mL}$ [8]. Sementara Y.W.A. Asbanu, dkk. (2019) melaporkan bahwa ekstrak etil asetat dan ekstrak metanol daun sirsak memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} masing-masing 56,9 dan 24,9 $\mu\text{g/mL}$, dan kedua ekstrak tersebut mengandung alkaloid, flavonoid, dan steroid [9], sementara A.I. Yajid [10] melaporkan bahwa *A. muricata* memiliki potensi sebagai obat kanker dan dapat dikembangkan lebih lanjut.

Simplisia daun sirsak kering sangat rentan terkontaminasi mikroba dan bila mikroba terbawa dalam produk obat herbal berbasis daun sirsak maka hal ini berbahaya bagi konsumen. Iradiasi gamma pada bahan obat herbal atau sediaan obat herbal telah dilakukan oleh industri di fasilitas iradiasi di BATAN. Iradiasi gamma bertujuan untuk memperpanjang masa simpan simplisia atau sediaan obat herbal tersebut. Pada penelitian terdahulu, dinyatakan bahwa dosis 7,5 kGy merupakan dosis maksimum untuk

memperpanjang masa simpan simplisia daun sirsak tanpa menghilangkan bioaktivitasnya dan tidak mengubah profil kromatogramnya. Pada penelitian tersebut juga dilaporkan bahwa ekstrak etil asetat merupakan ekstrak paling aktif dalam menghambat pertumbuhan sel leukemia L1210 dengan IC_{50} 7,4 $\mu\text{g/mL}$ [13].

Uji toksisitas akut daun sirsak menunjukkan bahwa ekstrak etanol memiliki nilai $LD_{50} > 5000$ mg/kg dengan kategori “praktis tidak toksik” [11], sedangkan Natacha dkk. [12] menemukan bahwa terjadi kematian pada tikus yang menerima 5000 mg/kg ekstrak etanol daun sirsak, sehingga nilai LD_{50} sebesar 3750 mg/kg dengan kategori “toksik ringan”. Sejauh ini belum ada penelitian yang mempelajari pengaruh iradiasi gamma pada simplisia daun sirsak, terhadap toksisitas akutnya, khususnya ekstrak etil asetat. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan uji toksisitas akut serbuk etil asetat daun sirsak kering yang telah diiradiasi dengan dosis 7,5 kGy untuk memastikan bahwa iradiasi gamma daun sirsak aman bagi konsumen dan aman untuk diaplikasikan pada pengawetan simplisia daun sirsak.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Daun sirsak segar diperoleh dari kelompok tani Warung Kiara di Pelabuhan Ratu, Sukabumi, Jawa Barat. Dahan dan daun sirsak dideterminasi di Herbarium Bogoriense, Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Cibinong. Hasil determinasi menunjukkan bahwa tanaman tersebut adalah *A. muricata* L. suku Annonaceae. Bahan lainnya adalah etanol, air suling, natrium CMC, air minum matang, dan pakan mencit. Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit galur ddY jantan dan betina, hewan berumur 2-3 bulan, berat 25-45 g yang diperoleh dari Unit Layanan Penelitian Pra-klinik Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT)-UGM, Yogyakarta. Peralatan yang digunakan adalah Iradiator Karet Alam (IRKA) dengan sumber radiasi gamma $Co-60$ di Fasilitas Iradiasi Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi BATAN-Jakarta, penguap putar vakum (Buchi), desikator dengan pompa vakum, timbangan analitik, timbangan mencit, mortar, stamper, alat uji aktivitas motorik mencit, kamera digital, alat bedah mencit, Erlenmeyer (volume 5 L), gelas ukur, gelas piala, sonde oral mencit, dan alat-alat gelas.

Persiapan dan iradiasi sampel

Daun sirsak segar dicuci, dibersihkan, dan dikeringkan pada suhu ruang (25-30 °C) sampai kadar airnya < 10%. Daun sirsak yang sudah kering dijadikan serbuk kasar, dibungkus dalam kantong plastik, dan ditimbang masing-masing seberat 1.000 g. Serbuk daun sirsak kering yang sudah dibungkus dalam 2 kantong plastik (@ 1000 g), satu bungkus diletakkan dalam kotak kardus kemudian diiradiasi pada dosis 7,5 kGy dengan laju dosis 7 kGy/jam selanjutnya disebut sampel B, sedangkan satu bungkus tidak diradiasi digunakan untuk kontrol pembanding yang selanjutnya disebut sampel A.

Maserasi dan pembuatan ekstrak

Serbuk kering daun sirsak yang tidak diiradiasi (sampel A) dan yang diiradiasi gamma (sampel B) @ 1.000 g masing-masing dimaserasi dengan pelarut etanol dalam Erlenmeyer 5 L. Masing-masing sampel dimaserasi berulang 10 kali untuk memastikan semua komponen tersari ke dalam pelarut. Hasil maserasi disaring dan dikumpulkan sehingga diperoleh filtrat, diuapkan, selanjutnya ekstrak dikeringkan dengan pompa vakum di dalam desikator, kemudian ditimbang. Ekstrak etanol dari sampel A selanjutnya disebut ekstrak A dan ekstrak etanol dari sampel B selanjutnya disebut ekstrak B.

Penyiapan bahan uji

Sediaan uji ekstrak etanol daun sirsak berbentuk ekstrak kental tidak larut dalam air, sehingga digunakan pembawa Na-CMC 0,5%. Penyiapan sediaan uji dibuat baru (*fresh*), karena stabilitas sediaan uji belum diketahui dengan pasti. Volume maksimum yang dapat diberikan sekali pemberian tergantung dari ukuran hewan uji. Pada rodensia mencit, volume normal pemberian tidak melebihi 0,1 mL/10 g [14].

Penetapan dosis sediaan uji. Dosis terendah sampai tertinggi dan pengujian toksistas akut ditetapkan berdasarkan prosedur dosis tetap *Acute Toxic Class Method* sesuai OECD 2002 *guideline* 423 yang dikutip oleh Rahayu [15]. Urutan dosis tetap yang digunakan adalah 2000 dan 5000 mg/kg BB. Apabila pada dosis permulaan lebih dari 2000 mg/kg BB terjadi kematian hewan uji, selanjutnya dilakukan uji limit dengan satu dosis 2000 mg/kg BB pada 6 hewan uji (3 hewan uji tiap tahap).

Subyek uji

Hewan uji berupa mencit galur ddY dipelihara pada kamar hewan dengan suhu ruangan secara otomatis dipertahankan pada $25 \pm 2^\circ\text{C}$, humiditas relatif $70 \pm 10\%$, ventilasi udara 11-13 kali per jam, dan iluminasi 12 jam per hari (jam 07.00 - 19.00 WIB). Hewan uji diberi pakan berupa pelet jenis Extra Fortuna (PT. Japfa Comfeed Indonesia) dan air minum (hasil *reverse osmosis*) secukupnya dalam botol minuman. Protokol penelitian yang digunakan telah mendapat persetujuan dari Komisi Etik untuk Penelitian Pre-klinik LPPT, UGM, Yogyakarta dengan nomor 323/KEC-LPPT/IX/2015. Hewan uji dikelompokkan secara acak, setiap hewan uji diberi tanda nomor uji menggunakan tinta minyak. Setiap kandang diberi label nomor kelompok, jalur pemberian (minum dan sampel), peringkat dosis, jenis kelamin, dan nomor urut hewan uji.

Pengelompokan dan perlakuan

Hewan uji dipuaskan makan, tetapi tetap diberi air minum selama 3-4 jam sebelum perlakuan dan 2 jam sesudah perlakuan [16]. Pengelompokan dan perlakuan hewan uji dilakukan sesuai dengan bagan alur berdasarkan metode *Acute Toxic Class* OECD 423 (*Guideline For Testing of Chemicals Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method Introduction*) yang dikutip oleh Rahayu [15]. Bahan uji ekstrak A dan ekstrak B diberikan kepada mencit jantan dan betina yang masing-masing dibagi ke dalam 5 kelompok, yaitu: 1). Kelompok I (kontrol) (3 mencit), 2). Kelompok II diberi ekstrak A 2000 mg/kg BB (6 mencit), 3). Kelompok III diberi ekstrak A 5000 mg /kg BB (3 mencit), 4). Kelompok IV diberi ekstrak B 2000 mg/kg BB (6 mencit), dan 5). Kelompok V diberi ekstrak B 5000 mg/kg BB (3 mencit).

Pengamatan fisik (klinis) gejala-gejala toksik

Setelah hewan uji diberi perlakuan sesuai dengan kelompoknya, selanjutnya dilakukan pengamatan dan pengukuran terhadap gejala-gejala toksik dan kematian, perubahan berat badan (pengamatan fisik atau klinik), serta gros patologi dan histopatologi organ-organ penting. Masa pengamatan dilakukan selama 24 jam pertama dan perhatian penuh terutama pada 4 jam pertama, apabila tidak ada kematian hewan uji, maka pengamatan diteruskan sampai 14 hari dengan pengamatan periodik setiap hari. Pengamatan dilakukan terhadap gejala-gejala toksik, diamati sesering mungkin dalam 24 jam pertama, dan pada

masa pengamatan selanjutnya, dilakukan sekali setiap hari. Bersamaan dengan pengamatan gejala toksik, juga dicatat adanya kematian pada masing-masing kelompok hewan uji. Berat badan hewan uji ditimbang pada hari ke - 1, 3, 5, 8, 11, dan 14. Penimbangan berat hewan uji tidak dilakukan setiap hari mengingat dengan 6 kali penimbangan sudah cukup untuk menghitung atau menilai perubahan atau kenaikan berat badan hewan uji per hari.

Patologi Organ

Penimbangan dan pemeriksaan organ-organ vital serta pengawetan dengan formalin 10% untuk pembuatan preparat histopatologi. Semua hewan uji yang mengalami kematian dan yang masih hidup sampai akhir masa uji dikorbankan dengan cara dislokasi leher. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan gros patologi (makroskopi) adanya kelainan organ (hati, jantung, paru, ginjal, dan limpa) dan jaringan yang ada dalam rongga sefalik, torak, dan abdomen serta pemeriksaan histopatologi.

Analisis dan evaluasi hasil

Penghitungan harga LD_{50} sesuai klasifikasi GHS (*Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures*) yang dikutip oleh Rahayu [15] dilakukan berdasarkan data jumlah hewan yang mati atau menunjukkan gejala-gejala toksik yang nyata pada masing-masing kelompok. Apabila sampai dengan batas level dosis tetap maksimum (5000 mg/kg BB) tidak menimbulkan kematian hewan uji, maka harga LD_{50} sediaan uji dinyatakan relatif “tidak toksik” atau “tidak terklasifikasi”. Mekanisme penyebab kematian hewan uji dievaluasi berdasarkan data gejala-gejala toksik yang teramati pada fungsi vital, secara kualitatif. Data rerata ADG (*Average Daily Gain*) antar kelompok perlakuan berdasarkan data berat badan mencit pada hari ke 1, 3, 5, 8, 11 dan 14 dianalisis secara statistik berdasarkan metode Analisis Varian Satu Arah (ANOVA), diikuti uji Schiffe dengan taraf kepercayaan 95 %. ADG adalah berat hewan uji pada hari ke 14 dikurangi berat awal (pada hari ke 1) dibagi 14. Kekhasan spektrum efek toksik yang timbul secara kualitatif dievaluasi berdasarkan data hasil pemeriksaan gros patologi dan histopatologi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Maserasi

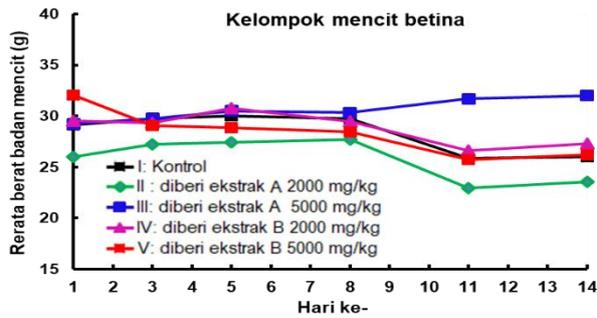
Maserasi 1000 g serbuk kering daun sirsak yang tidak diiradiasi (sampel A) dan yang diiradiasi 7,5 kGy (sampel B) diperoleh ekstrak etanol masing-masing seberat 62,0 g (6.20%) dan 62,5 g (6.25%). Baik sampel A maupun sampel B memiliki berat ekstrak yang hampir sama, menunjukkan bahwa iradiasi gamma tidak berpengaruh pada hasil ekstrak.

Potensi toksisitas akut (LD_{50})

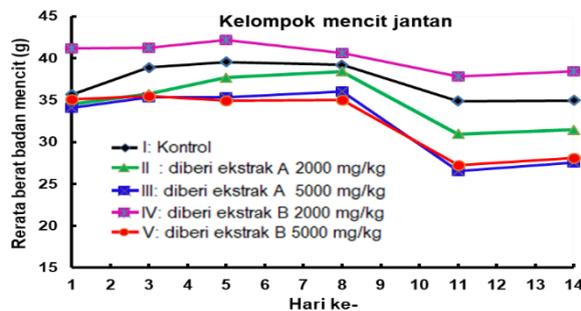
Hasil pengamatan pada hari ke-1 sampai pada hari ke 14 setelah pemberian sediaan uji dari ekstrak A dan ekstrak B melalui oral pada tingkat uji limit dosis tetap 2000 dan 5000 mg/kg BB tidak menunjukkan gejala-gejala toksik yang nyata dan tidak ditemukan adanya kematian mencit jantan maupun betina. Berdasarkan kategori klasifikasi sistem harmonisasi global (*Acute toxic class*) pada panduan OECD 423 dan klasifikasi menurut Loomis, bahwa hasil uji toksikologi dengan nilai $LD_{50} > 5000$ mg/kg termasuk *unclassified* (tidak terklarifikasi) atau minimal praktis tidak toksik [15][16]. Dosis sampai uji limit 5000 mg/kg BB ini diperkirakan setara dengan dosis 38,8 mg pada manusia dengan berat badan 70 kg.

Pengamatan Perubahan Berat Badan

Gambar 1 menunjukkan berat badan mencit betina pada kelompok I (kontrol) sampai hari ke-8 tidak mengalami penurunan, kemudian menurun pada hari ke-11, dan tidak berubah sampai hari ke-14. Kelompok II (diberi ekstrak A 2000 mg /kg BB) mengalami kenaikan sampai hari ke-8 kemudian menurun sampai hari ke-14. Pada kelompok III (diberi ekstrak A 5000 mg /kg BB) terus mengalami kenaikan berat badan sampai hari ke-14, dengan demikian pemberian ekstrak daun sirsak memberikan efek naiknya berat badan mencit. Akan tetapi pada kelompok IV (diberi ekstrak B 2000 mg /kg BB), berat badan mencit naik sampai hari ke-5, setelah itu berat badannya turun sampai hari ke-14. Kelompok V (diberi ekstrak B 5000 mg/kg BB) pada hari ke-3 sampai ke-11 mengalami penurunan berat badan, kemudian naik sedikit pada hari ke-14.



Gambar 1. Rerata berat badan mencit betina setelah pemberian ekstrak etanol daun sirsak selama 14 hari



Gambar 2. Rerata berat badan mencit jantan setelah pemberian ekstrak etanol daun sirsak selama 14 hari

Pada mencit jantan (Gambar 2), kelompok IV (diberi ekstrak B 2000 mg/kg BB) berat badan mencit naik setelah hari ke-5, pada hari ke-8 sampai 11 menurun dan naik sedikit pada hari ke-14. Kelompok V (diberi ekstrak B 5000 mg/kg BB) pada hari ke-1 sampai ke-8 mengalami sedikit kenaikan berat badan. Semua kelompok berat badan mencit turun pada hari ke-11, dan pada hari ke-14 berat badan naik lagi. Berdasarkan hasil pengamatan berat badan mencit (Gambar 1 dan 2) pada rerata kenaikan berat badan per hari (ADG) menunjukkan bahwa pemberian sediaan uji ekstrak A dan ekstrak B dengan uji limit dosis 2000 dan 5000 mg/kg BB tidak mempengaruhi secara signifikan perkembangan berat badan mencit jantan maupun betina. Pada penelitian sebelumnya,

pemberian secara oral dosis tunggal 7500 mg/kg BB ekstrak etanol dari rimpang temulawak yang diradiasi 10 kGy pada mencit galur Swiss Webster juga tidak mempengaruhi perkembangan bobot badan secara signifikan [17]. Adanya variasi kenaikan dan penurunan bobot badan ini terjadi diduga karena perbedaan variasi biologis antar hewan uji. Auta *et al.* [18] menyatakan bahwa pemberian bahan uji pada hewan coba menyebabkan penurunan kemampuan hati pada kelompok perlakuan mengalami penurunan dalam mengkonversi nutrisi menjadi sumber energi di dalam tubuh [18]. Pada penelitian sebelumnya, pemberian ekstrak etanol herba sambiloto yang diradiasi 7,5 kGy pada mencit galur Swiss Webster menunjukkan bahwa perubahan yang terjadi hanya merupakan suatu proses adaptasi terhadap stres setelah hewan uji mengalami perlakuan, tidak ditemukan adanya perubahan warna pada semua organ secara makroskopik. Proses adaptasi ini menyebabkan hewan coba kurang nafsu makan, sehingga menyebabkan berat badan menurun, dan mengalami kenaikan setelah hari ke-11 [19]

Gejala-gejala toksik (klinik)

Pengamatan gejala-gejala toksik sampai dengan hari ke-14 setelah pemberian ekstrak A dan ekstrak B dengan uji limit dosis 2000 dan 5000 mg/kg BB pada mencit jantan dan betina tidak ditemukan adanya gejala-gejala toksik yang berarti. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian sediaan ekstrak etanol daun sirsak yang tidak diradiasi dan yang diradiasi 7,5 kGy pada uji limit dosis 2000 dan 5000 mg/kg BB, tidak berpengaruh pada sistem susunan saraf pusat dan somatomotor, saraf otonom, pernafasan, kardiovaskular, saluran cerna, genitourinari, membran mukosa, dan mata. Hasil penelitian sebelumnya, yaitu pemberian rimpang temulawak yang diradiasi 10 kGy kepada mencit jantan dan betina dosis tunggal oral sampai 7500 mg/kg BB menunjukkan tidak ada efek toksik yang bermakna dengan nilai LD₅₀ lebih besar dari 7500 mg/kg BB [17].

Tabel 1. Bobot (g) beberapa organ penting mencit jantan pada hari ke-14 setelah pemberian sediaan uji ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata L.*) yang tidak diradiasi (0 kGy) dan yang diradiasi (7,5 kGy) dosis tunggal per oral

Bahan Uji	Bobot organ mencit jantan yang dianalisis (g)							
	Jantung	Paru	Hepar	Ginjal kanan	Ginjal kiri	Lambung	Usus	Otak
Kelompok I: Kontrol [Rerata dari 3 mencit]	0,20	0,30	2,40	0,37	0,33	0,80	4,27	0,50
SD	0,00	0,00	0,36	0,06	0,06	0,10	0,45	0,00

Kel. II: Bahan uji 0 kGy (2000 mg/kg BB) [Rerata dari 6 mencit]	0,23	0,28	2,30	0,30	0,30	0,97	5,28	0,48
SD	0,05	0,04	0,43	0,06	0,06	0,23	1,00	0,04
Kel. III: Bahan uji 0 kGy (5000 mg/kg BB) [Rerata dari 6 mencit]	0,20	0,20	1,87	0,30	0,30	0,87	5,73	0,47
SD	0,00	0,00	0,21	0,00	0,10	0,47	1,06	0,06
Kel. IV: Bahan uji 7.5 kGy (2000 mg/kg BB) [Rerata dari 6 mencit]	0,20	0,20	2,17	0,33	0,33	0,70	5,90	0,41
SD	0,00	0,00	0,14	0,05	0,05	0,19	1,10	0,18
Kel. V: Bahan uji 7.5 kGy (5000 mg/kg BB) [Rerata dari 3 mencit]	0,20	0,30	1,83	0,27	0,27	0,73	4,63	0,50
SD	0,00	0,10	0,06	0,06	0,06	0,15	0,15	0,00

Tabel 2. Bobot (g) beberapa organ penting mencit betina pada hari ke-14 setelah pemberian sediaan uji ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) yang tidak diradiasi (0 kGy) dan yang diradiasi (7,5 kGy) dosis tunggal per oral

Bahan Uji	Bobot organ mencit betina yang dianalisis (g)							
	Jantung	Paru	Hepar	Ginjal kanan	Ginjal kiri	Lambung	Usus	Otak
Kelompok I: Kontrol [Rerata dari 3 mencit]	0,20	0,30	1,73	0,20	0,23	0,63	4,50	0,50
SD	0,00	0,00	0,15	0,00	0,06	0,15	1,25	0,00
Kel. II: Bahan uji 0 kGy (2000 mg/kg BB) [Rerata dari 6 mencit]	0,12	0,13	1,47	0,20	0,20	0,57	3,94	0,45
SD	0,04	0,05	0,21	0,00	0,00	0,12	0,53	0,05
Kel. III: Bahan uji 0 kGy (5000 mg/kg BB) [Rerata dari 6 mencit]	0,17	0,17	1,93	0,20	0,23	0,77	4,30	0,50
SD	0,06	0,06	0,15	0,00	0,06	0,12	0,17	0,00
Kel. IV: Bahan uji 7.5 kGy (2000 mg/kg BB) [Rerata dari 6 mencit]	0,22	0,22	1,77	0,22	0,22	0,72	4,54	0,50
SD	0,04	0,04	0,14	0,04	0,04	0,28	0,53	0,00
Kel. V: Bahan uji 7.5 kGy (5000 mg/kg BB) [Rerata dari 3 mencit]	0,20	0,23	1,53	0,20	0,20	0,70	3,57	0,47
SD	0,00	0,06	0,25	0,00	0,00	0,17	0,29	0,06

Patologi organ (spektrum efek toksik)

Hasil pemeriksaan gros patologi terhadap organ-organ penting mencit jantan maupun betina (jantung, paru, hati, ginjal, lambung, usus, limpa) setelah pemberian sediaan uji ekstrak A dan ekstrak B pada limit uji dosis 2000 dan 5000 mg/kg BB, tidak ditemukan adanya perubahan bobot organ yang berarti seperti terlihat pada Tabel 1 dan Tabel 2. Hasil pengamatan lebih lanjut mengindikasikan bahwa pemberian akut oral ekstrak A dan ekstrak B sampai uji limit dosis 2000 dan 5000 mg/kg BB tidak menunjukkan spektrum efek toksik khas yang

bermakna terhadap organ-organ pada mencit jantan dan betina. Dosis sampai limit uji dosis 5000 mg/kg BB ini diperkirakan setara dengan dosis 38,8 mg pada manusia dengan bobot 70 kg. Hal tersebut juga terjadi pada penelitian sebelumnya [17] bahwa bobot organ (jantung, paru, hati, limpa, ginjal, limpa, adrenal, testis, dan vesica seminalis) pada mencit jantan dan betina galur Swiss Webster tidak menunjukkan efek toksik akibat pemberian ekstrak rimpang temulawak pada dosis 7500 mg/kg BB.

Histopatologi Organ

Pemeriksaan histologi dilakukan pada ketujuh organ vital yaitu: jantung, paru, hati, ginjal, lambung, usus, limpa, dan otak. Pengamatan berdasarkan atas perubahan yang terjadi pada sel penyusun organ, yaitu: perubahan ukuran, bentuk, inti, adanya infiltrasi sel radang, serta perubahan lain yang dapat menimbulkan perubahan fungsi normal organ seperti adanya nekrosis dan hemoragi.

Hasil pemeriksaan jantung (Gambar 3) terlihat otot jantung tidak mengalami perubahan baik pada kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan yang diberi ekstrak A dan ekstrak B secara oral. Pada Gambar 4 ditunjukkan hasil pemeriksaan paru, pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan tidak menunjukkan perbedaan. Pada makroskopik jaringan paru tidak terlihat adanya penebalan septa interalveolaris (Gambar 4). Penelitian yang dilakukan oleh Susantiningsih [20] menunjukkan adanya kerusakan sedang sel paru pada tikus betina galur *Sprague dawley* yang diberi DMBA 20 mg/kgBB dua kali seminggu dan ekstrak daun sirsak 20 mg/kgBB per hari. Pada gambaran paru dengan kerusakan sedang terlihat adanya infiltrasi sel radang dan atelektasis sebanyak 31-60%. Pada gambaran paru dengan kerusakan berat terlihat adanya infiltrasi sel radang, oedem paru, dan atelektasis sebanyak >60% terdapat pada kelompok hewan uji yang diberikan DMBA 20 mg/kgBB dua kali seminggu.

Hasil pemeriksaan histologi hati menunjukkan bahwa sel hepatosit masih tersusun secara radier. Ukuran sel hepatosit tidak mengalami perubahan ukuran dan inti masih terlihat jelas, tidak terlihat adanya inflamasi sel radang (Gambar 5). Hal ini berbeda dengan penelitian sebelumnya mengenai efek ekstrak jahe merah iradiasi pada hepar hewan uji. Pada penelitian tersebut, ekstrak etanol dari rimpang jahe merah yang telah diiradiasi pada dosis 10 kGy menunjukkan adanya perubahan histopatologi sel hepar hewan uji, diduga karena adanya zat aktif pada jahe merah misalnya gingerol sebagai zat toksik bagi hewan uji yang bereaksi dengan salah satu komponen dalam sel hati [21]. Kerusakan hati yang ditandai dengan berkurangnya jumlah sel hepatosit dan kerusakan pada vena sentral pada mencit jantan terjadi pada kelompok dosis uji 2000 mg/kg bb, akibat adanya zat toksik ekstrak jahe merah. Hal tersebut terjadi juga pada kelompok

mencit betina dengan dosis 1250 mg/kg BB, 2000 mg/kg BB, dan 5000 mg/kg BB.

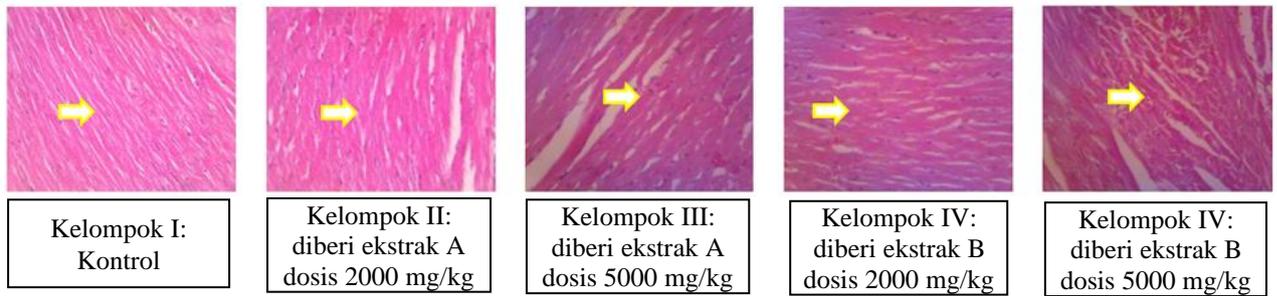
Pada Gambar 6 disajikan gambaran histologi ginjal yang menunjukkan tidak ada perubahan baik pada pada kelompok kontrol dan maupun kelompok perlakuan (diberi ekstrak A dan ekstrak B) dan keduanya tidak menunjukkan adanya perbedaan. Tanda anak panah menunjukkan glomerulus yang masih dilapisi dengan sel epitel squamus simplek. Pada pemeriksaan histopatologi ginjal, tidak ditemukan degenerasi dan nekrosis glomerulus, tubulus, dan interstitium, baik dalam kelompok kontrol dan maupun kelompok perlakuan. Begitu pula pada pemeriksaan histopatologi hati, yang juga tidak mengalami degenerasi dan nekrosis [22]. Nekrosis adalah kematian sel atau jaringan pada organisme hidup. Jika terjadi kerusakan berat pada membran sel maka enzim lisosom akan memasuki sitoplasma. Adanya enzim tersebut mengakibatkan terjadi peristiwa digesti di dalam sitoplasma yang berakhir dengan nekrosis atau kematian sel [23].

Gambaran pada lambung terlihat epitel dan glandula masih dalam kondisi normal baik pada kelompok kontrol ataupun perlakuan ditunjukkan pada Gambar 7. Berbeda dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Sundalangi dkk. [24], kelompok tikus diberikan ekstrak daun sirsak 80 mg/tikus/hari 15 menit sebelum induksi aspirin 30 mg/tikus/hari dan pada kelompok tikus yang diberi aspirin 30 mg/tikus/hari selama 10 hari dan dilanjutkan dengan pemberian ekstrak daun sirsak 80 mg/tikus/hari selama 3 hari. Kedua kelompok ini menunjukkan tanda-tanda gastritis akut. Pada kelompok perlakuan ekstrak daun sirsak menunjukkan bahwa infiltrasi sel-sel radang leukosit polimorfo nuklear (PMN) hanya terlihat pada lapisan mukosa sampai submukosa dan ada pengurangan infiltrasi leukosit.

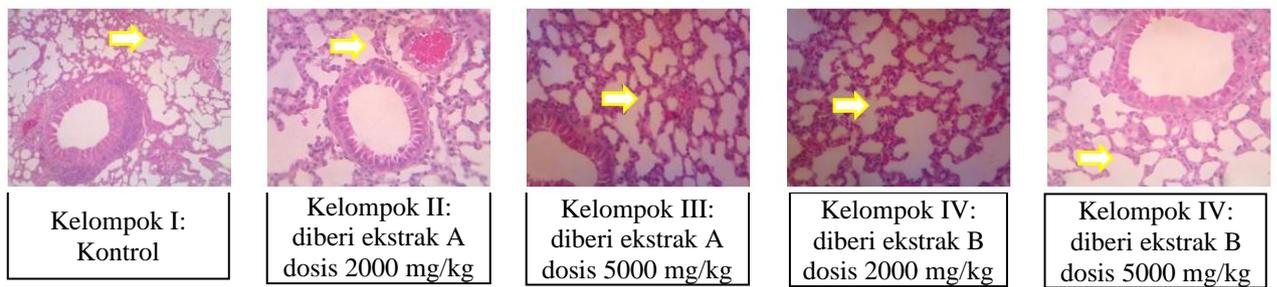
Gambaran usus terlihat *vili intestinum* masih dilapisi oleh sel kolumnar simple (Gambar 8). Tampak tidak adanya rupture sel epitel vili yang dapat digunakan sebagai salah satu penanda adanya abnormalitas organ. Struktur histologi tampak normal, tidak ada peradangan. Gambaran mikroskopik limpa pada kelompok kontrol dan perlakuan tidak menunjukkan perbedaan. Pada limpa tidak terlihat nekrosis, tidak ada pembesaran limpa (splenomegali) dan tidak ditemukan adanya keabnormalan gambaran limpa yang dapat dilihat dari kepadatan sel limfosit dan adanya hemosiderin (Gambar 9). Daun sirsak memiliki efek sebagai antioksidan dari senyawa asetogenin yang

dikandungnya [25]. Antioksidan ini diduga berperan penting untuk melindungi organ-organ dari kerusakan sel-sel limpa dan lain-lain. Pada Gambar 10 terlihat gambaran histologi otak pada setiap kelompok tidak menunjukkan perbedaan. Tidak terlihat adanya benda inklusi pada sel neuron. Hasil penelitian Purwanto dkk. [26] tentang

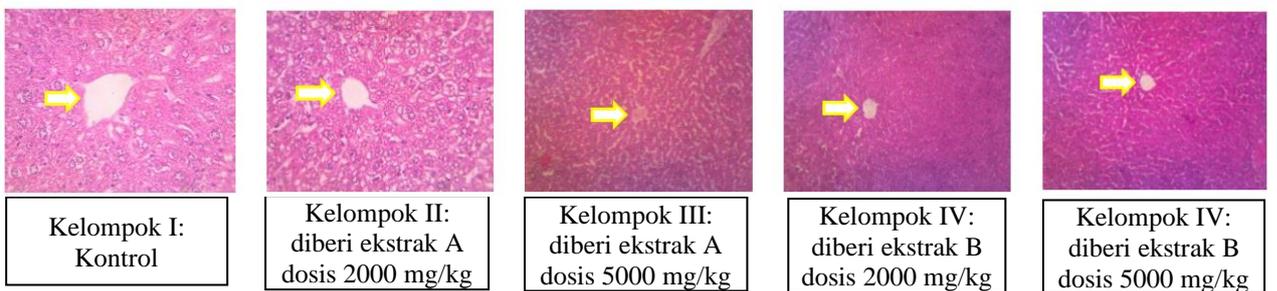
pengaruh pemberian ekstrak daun sirsak maupun kombinasi daun sirsak dengan *artemisinin-based combination therapy* terhadap leukosit otak mencit swiss yang diinfeksi oleh *Plasmodium berghei* Anka (PbA) didapatkan tidak bermakna dan inflamasi leukosit otak tidak dijumpai adanya penurunan limfosit.



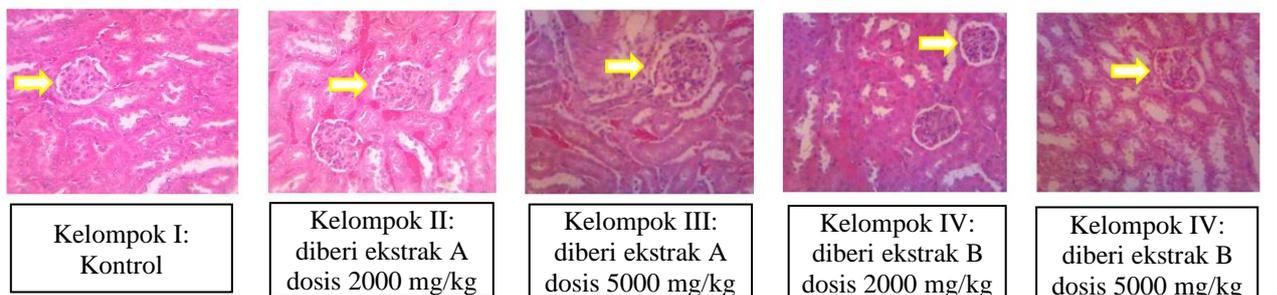
Gambar 3. Histologi jantung hewan uji mencit (perbesaran 400x)



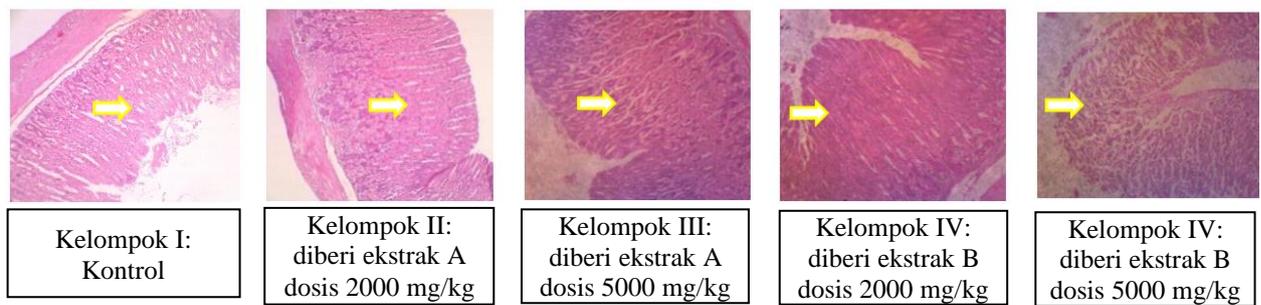
Gambar 4. Histologi paru hewan uji mencit (perbesaran 400x)



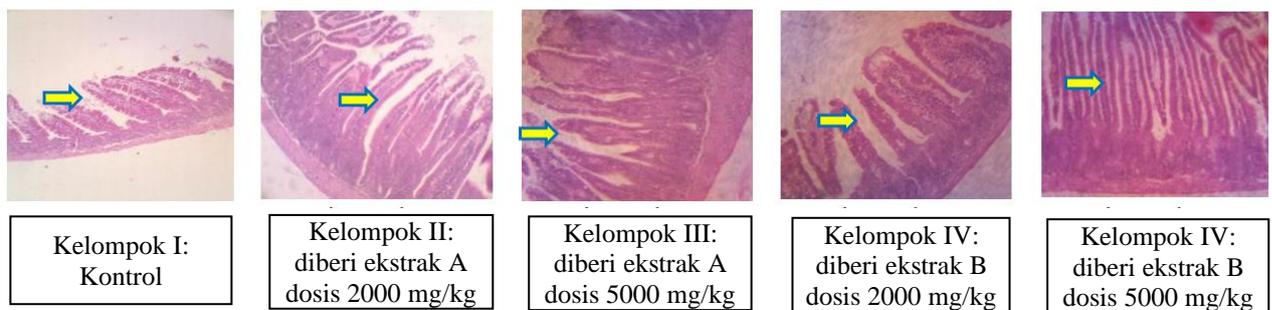
Gambar 5. Histologi hati hewan uji mencit (perbesaran 400x)



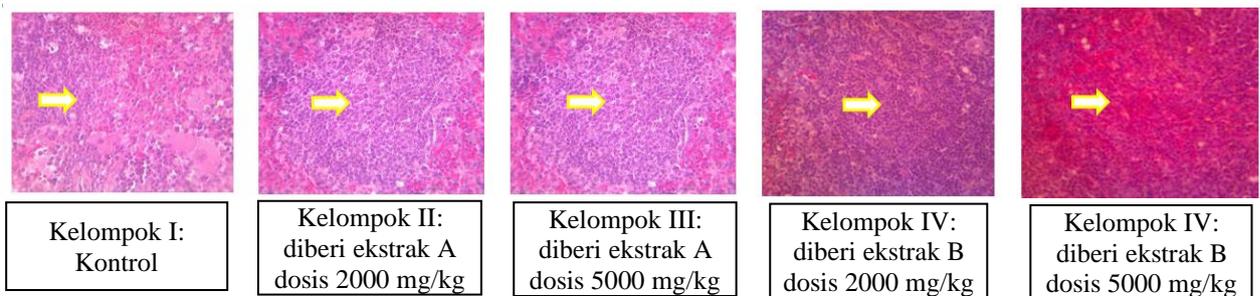
Gambar 6. Histologi ginjal hewan uji mencit (perbesaran 400x)



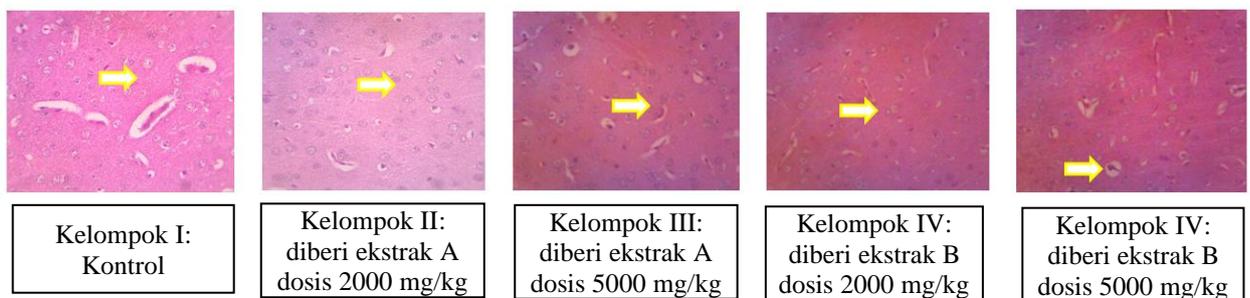
Gambar 7. Histologi lambung hewan uji mencit (perbesaran 40x)



Gambar 8. Histologi usus hewan uji mencit (perbesaran 100x)



Gambar 9. Histologi limpa hewan uji mencit (perbesaran 400x)



Gambar 10. Histologi otak hewan uji mencit (perbesaran 400x)

Secara keseluruhan berdasarkan hasil pemeriksaan histopatologi pemberian sediaan uji ekstrak etanol daun sirsak yang tidak

diradiasi (ekstrak A) dan yang diradiasi 7,5 kGy (ekstrak B) pada uji limit dosis 2000 dan 5000 mg/kg BB (Gambar 3 – 10) tidak

menunjukkan spektrum wujud efek toksik – khas yang bermakna pada organ-organ vital mencit jantan dan betina. Salah satu uji praklinik bertujuan untuk melihat efek toksik terjadi dalam waktu singkat, melalui pemberian tunggal sampel uji secara oral atau melalui dosis berulang dalam 24 jam selang [16]. Uji terhadap hewan uji menyatakan bahwa data kematian dengan *Lethal Dose 50* (LD_{50}) merupakan parameter pada akut uji toksisitas. Uji LD_{50} adalah langkah pertama untuk mengetahui keamanan bahan herbal bagi konsumen melalui penilaian jumlah dosis yang dapat menyebabkan 50% peluang kematian pada hewan uji setelah pemberian dosis tunggal. Dengan demikian terbukti bahwa ekstrak etanol daun sirsak dengan dosis 2000 dan 5000 mg/kg BB walaupun pada umumnya menyebabkan penurunan berat badan pada hari ke-8 dan ke-11, namun setelah itu berat badan mencit mulai naik atau stabil. Pemberian sampai dengan uji limit dosis 2000 dan 5000 mg/kg BB dosis tunggal tidak menyebabkan gejala-gejala toksik yang nyata maupun kematian hewan uji. Dosis sampai uji limit 2000 mg/kg BB ini diperkirakan setara dengan dosis 38,790 mg (~ 38,8 g) pada manusia dengan berat badan 70 kg. Berdasarkan hasil tersebut mengandung makna bahwa potensi toksisitas akut–oral (LD_{50}) sediaan uji ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) yang tidak diradiasi dan yang diradiasi dosis 7,5 kGy pada hewan coba (mencit jantan dan betina), termasuk kategori *unclassified* (tidak terklasifikasi). Kategori *unclassified* ini sesuai dengan “*General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine*” yang dikutip oleh Subaiea [27], ini berarti bahwa minimal praktis tidak toksik dengan $LD_{50} > 5000$ mg/kg BB menurut Loomis yang dikutip oleh Wariz *et al.* [28] yang diperkirakan setara dengan dosis 38,8 mg (~38,8 g) pada manusia (70 kg). Hasil pengamatan dan pemeriksaan fisik gejala-gejala klinis pemberian sediaan uji sampel yang tidak dan yang diradiasi dengan uji limit dosis 2000 dan 5000 mg/kg BB tidak menunjukkan gejala – gejala toksik yang nyata

dan bermakna pada hewan uji mencit jantan dan betina. Pemberian sediaan uji ekstrak etanol daun sirsak (yang tidak diradiasi dan yang diradiasi dosis 7,5 kGy pada uji limit dosis 2000 dan 5000 mg/kg BB juga tidak ditemukan spektrum wujud efek toksik – khas/signifikan pada organ-organ vital mencit jantan dan betina secara gros patologi dan histopatologi.

KESIMPULAN

Berdasarkan data kualitatif dan kuantitatif, serta evaluasi hasil uji toksisitas akut oral sediaan uji ekstrak A (ekstrak etanol daun sirsak yang tidak diradiasi dan ekstrak B (ekstrak etanol daun sirsak yang diradiasi 7,5 kGy) pada dosis tunggal sampai 5000 mg/kg BB tidak menyebabkan adanya gejala toksik yang signifikan dan tidak menyebabkan kematian pada mencit jantan dan betina galur ddY. Dengan demikian kedua ekstrak baik yang tidak diradiasi maupun yang diradiasi pada dosis sampai dengan 7,5 kGy merupakan bahan obat herbal yang aman dikonsumsi. Nilai LD_{50} ekstrak etanol daun sirsak lebih besar dari 5000 mg/kg BB, nilai tersebut masuk kategori “praktis tidak beracun”. Untuk memastikan bahwa konsumsi terus menerus lebih dari 14 hari juga aman, maka perlu juga dilakukan uji toksisitas sub kronis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Para penulis menyampaikan terimakasih sebesar-besarnya kepada PAIR-BATAN dan para staf Iradiator Gamma IRKA yang telah melakukan iradiasi sampel. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Dr. Arif Nurrochmad, M.Si., M.Sc., Apt. dan tim dari LPPT-UGM yang telah menyediakan fasilitas dan membantu pengujian toksisitas akut ekstrak etanol daun sirsak sehingga penelitian ini dapat diselesaikan dengan baik.

KONTRIBUSI PENULIS

Masing-masing penulis (Ermin Katrin Winarno, Susanto, dan Hendig Winarno) memiliki kontribusi yang sama sebagai kontributor utama.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] L.M.A. Esparza, E. Montalvo-González, “Bioactive compounds of soursop (*Annona muricata* L.) fruit”, In: *Bioactive Compounds in Underutilized Fruits and Nuts*, H. Murthy,

- V. Bapat eds., pp. 1–15. 2020. doi:10.1007/978-3-030-06120-3_8-1.
- [2] O.O. Elizabeth *et al.*, “Comparative study on chemical composition and antioxidant activity of *Annona muricata* plant parts cultivated in Covenant University, Ota, Ogun State, Nigeria,” *Curr. Res. Nutr. Food Sci.*, 6(3), 807–815, 2018. doi: 10.12944/CRNFSJ.6.3.23.
- [3] S. Ramasamy *et al.*, “Growth inhibition of human gynecologic and colon cancer cells by *Phyllanthus watsunii* through apoptosis induction”, *PLoS One*, 7(4), e34793, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0034793.
- [4] A.S. Nugraha *et al.*, “Anti-infective and anti-cancer properties of the *Annona* species: Their ethnomedicinal uses, alkaloid diversity, and pharmacological activities”, *Molecules*, 24(4419), 2019. doi: 10.3390/molecules24234419.
- [5] L. Growther, “Anticancer activity of *Annona muricata* leaf extracts and screening for bioactive phytochemicals”, *IJPBS*, 8(1), 475–481, 2018. www.ijpbs.com or www.ijpbsonline.com.
- [6] A.V. Coria-Téllez *et al.*, “*Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity”, *Arabian J. Chem.*, 11(5), 662–691, 2018. doi: 10.1016/j.arabjc.2016.01.004.
- [7] S.U.F.S. Najmuddin *et al.*, “Anti-cancer effect of *Annona muricata* Linn leaves crude extract (AMCE) on breast cancer cell line”, *BMC Complement. Altern. Med.*, 16(1), 1–20, 2016. doi: 10.1186/s12906-016-1290-y.
- [8] N.N.N. Nik Mat Daud, H. Ya’akob, M.N.M. Rosdi, “Acetogenins of *Annona muricata* leaves: characterization and potential anticancer study”, *Integr. Cancer Sci. Ther.*, 3(4), 543-551, 2016. doi: 10.15761/icst.1000202.
- [9] Y.W.A. Asbanu, N. Wijayanti, E. Kusumo, “Identifikasi senyawa kimia ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) dan uji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)”, *Indo. J. Chem. Sci.*, 8(3), 153–160, 2019.
- [10] A.I. Yajid *et al.*, “Potential benefits of *Annona muricata* in combating cancer: A review”, *Malays. J. Med. Sci.*, 25(1), 5–15. 2018.
- [11] Khairunnisa, A.D. Utami, Marianne, “Study on acute oral toxicity of ethanolic extract of *Annona squamosa* leaves in mice (*Mus musculus*)”, *Indones. J. Pharm. Clin. Res.*, 1(1), 56–63, 2018. doi: 10.32734/idjpcr.v1i1.205.
- [12] A. Natacha *et al.*, “Evaluation of the toxicity of *Annona muricata* leaf extracts on liver and kidney function and investigation of acute and subacute toxicity in Wistar rats”, *Am. J. Pharm. Tech Res.*, 8(1), 189–217, 2018. doi: 10.46624/ajptr.2018.v8.i1.013.
- [13] E. Katrin dkk., “Aktivitas sitotoksik dan profil kromatogram daun sirsak (*Annona muricata* L.) yang diiradiasi”, *J. Ilmu Kefarmasian Indones.*, 11(1), 244–254, 2013.
- [14] Oecd, “OECD/OCDE 423 OECD Guideline for Testing of Chemicals: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method Introduction”, 2001.
- [15] K. Rahayu dkk., “Acute toxicity study of *Andrographis paniculata* (Burm.f) Ness herbs and *Gynura procumbens* (Merr) leaves extracts combination”, *J. Ilmiah Farmasi*, 16(1), 39–51, 2020.
- [16] M. Hidayat *et al.*, “High doses of soybean, jati belanda and their combination extracts have no acute toxic effects”, *Heal. Sci. J. Indones.*, 8(2), pp. 124–132, 2017. doi: 10.22435/hsji.v8i2.7381.124-132.
- [17] E. Katrin, H. Winarno, Susanto, “The acute toxicity of ethanol extract from irradiated temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) which have anticancer activity”, *A Sci. J. Appl. Isotopes Radiat.*, 7(1), 41–52, 2011.
- [18] T. Auta, A.T. Hassan, “Reproductive toxicity of aqueous wood-ash extract of *Azadirachta indica* (neem) on male albino

- mice,” *Asian Pac. J. Reprod.*, 5(2), 111–115, 2016. doi: 10.1016/j.apjr.2016.01.005.
- [19] E. Katrin, Susanto, H. Winarno, “Keamanan sambiloto (*Andrographis paniculata* nees) kering yang diiradiasi gamma berdasarkan aspek toksisitas akutnya terhadap mencit galur swiss webster,” *J. Sains Teknol. Nuklir Indones.*, 15(2), 103-118. 2014.
- [20] T. Susantiningsih, “The effect of giving soursop leaves *Annona muricata* L. extract to sialic acid level on female rats induced DMBA (7,12-dimethylbenz (a) anthracene),” *JUKE Unila*, 4(7) 125–130, 2014.
- [21] H.E Katrin dkk., “Pengaruh iradiasi gamma pada toksisitas akut oral ekstrak etanol jahe merah (*Zingiber officinale*),” *J. Ilm. Apl. Isotop Radiasi*, 1(1), 55–70, 2014.
- [22] S.Z. Moghadamtousi *et al.*, “Gastroprotective activity of *Annona muricata* leaves against ethanol-induced gastric injury in rats via Hsp70/Bax involvement,” *Drug Des. Devel. Ther.*, 8, 2099–2111, 2014. doi: 10.2147/DDDT.S70096.
- [23] G.S. Siahaan, P.M. Lintong, L.L. Loho, “Gambaran histopatologik ginjal tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi gentamisin dan diberikan ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas* L. Poir),” *J. e-Biomedik*, 4(1), 2016. doi: 10.35790/ebm.4.1.2016.12229.
- [24] C.F. Sundalangi, L. Loho, C.F. Kairupan, “Gambaran histopatologik lambung tikus wistar yang diberikan ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) setelah induksi aspirin,” *J. e-Biomedik*, 4(1), 2016. doi.org/10.35790/ebm.4.1.2016.12223
- [25] P.N. Ogbu *et al.*, “Effect of acetogenin fraction of *Annona muricata* leaves on antioxidant status and some indices of benign prostatic hyperplasia in rats,” *Redox Rep.*, vol. 25(1), 80–86, 2020. doi: 10.1080/13510002.2020.1804711.
- [26] H.N.R. Purwanto, Kisdjamiatun, “Pengaruh *Annona muricata* terhadap sebulan leukosit otak mencit malaria yang diterapi artemisinin-based combination therapy (ACT) (Studi infeksi *Plasmodium berghei* anka pada mencit Swiss),” *Jurnal Kedokt. Diponegoro*, 6(2), 592–602, 2017.
- [27] G. M. Subaiea *et al.*, “Acute toxicity testing of newly discovered potential antihepatitis B virus agents of plant origin,” *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, 10(11), 210–213, 2017. doi: 10.22159/ajpcr.2017.v10i11.20717
- [28] R. Wariz, N.W.R Asfa, A. Fauzi, “The toxicity of brown algae (*Sargassum* sp) extract to mice (*Mus musculus*),” *J. Dentomaxillofacial Sci.*, 1(2), 109–115, 2016. doi: 10.15562/jdmfs.v1i2.7.