

## Uji Toksisitas Akut Ekstrak Air Buah Pepaya (*Carica papaya* L.) Muda pada Mencit (*Mus musculus*) melalui Penentuan LD50 dan Pengamatan Karakteristik Efek Toksik

<sup>1</sup>Laila Dinda Nadiyah, <sup>2</sup>Yuktiana Kharisma, <sup>3</sup>Yuniarti

<sup>1,2,3</sup>*Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Bandung, Jl. Hariangbangga No.20 Bandung 40116*

e-mail: <sup>1</sup>laila.dinda.nadiyah.xi.si.1@gmail.com, <sup>2</sup>yuktiana@gmail.com, <sup>3</sup>candytone26@gmail.com

**Abstract.** Papaya (*Carica papaya* L.) was generally used as herbal medicine by people to overcome health disease. Saponin, alkaloid, flavonoid, tannin, triterpenoid, and quinone are phytochemical substances of unripe papaya fruit. The consumption of phytochemical substance at high dose level would reveal toxicities through the organ or human body. The aim of this study was to know the acute toxicity of unripe papaya fruit by lethal dose 50 (LD50) determination and observe the toxic effect characteristics in mice. This study used experimental laboratory method. Determination of LD50 in this acute toxicity study was using propose (new) recommended method and 12 female mice as subject which were divided into three stages toxicity test and one confirmatory test. At the first stage, four mice were administered oral dose 50, 200, 400, 800 mg/kg BW. At the second and third stage, each three mice were administered oral dose 1000, 1500, 2000 mg/kg BW and 3000, 4000, 5000 mg/kg BW. At the end of study, confirmatory test was conducted to mice. Observation on toxic effect characteristics in this study was conducted in mice every two hours in one day. The study revealed that LD50 of unripe papaya fruit aqueous extract on this acute toxicity study was >5000 mg/kg BW. Observation of toxic effect characteristics in mice showed no alteration in general appearance, behavioral, neurological, and autonomic profile. In this study, the aqueous extract of unripe papaya fruit was classified as Practically Non Toxic (PNT) substance. The extract can be considered to be consumed widely by the people since it had minimal toxic effect.

**Key words:** Acute toxicity, LD50, toxic effect, Unripe papaya fruit

**Abstrak.** Pepaya (*Carica papaya* L.) umum dimanfaatkan sebagai tanaman obat oleh masyarakat untuk mengatasi masalah kesehatan. Saponin, alkaloid, flavonoid, tannin, triterpenoid, dan quinon merupakan substansi fitokimia yang terkandung dalam buah pepaya muda. Konsumsi substansi fitokimia pada dosis tinggi dapat menimbulkan toksisitas terhadap organ ataupun tubuh manusia. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui toksisitas akut dari buah pepaya muda melalui penentuan *lethal dose* 50 (LD50) dan pengamatan terhadap karakteristik efek toksik pada mencit. Penelitian ini menggunakan metode eksperimental laboratorium. Penentuan LD50 dalam uji toksisitas akut ini menggunakan *proposed (new) recommended method* dengan subjek 12 ekor mencit betina yang terbagi kedalam tiga tahap uji toksisitas dan satu uji konfirmasi. Tahap pertama, empat mencit diberi dosis oral 50, 200, 400, 800 mg/kg BB. Tahap kedua dan ketiga, masing-masing tiga ekor mencit diberi dosis oral 1000, 1500, 2000 mg/kg BB dan 3000, 4000, 5000 mg/kg BB. Pada akhir penelitian dilakukan uji konfirmasi terhadap mencit. Pengamatan karakteristik efek toksik pada uji ini dilakukan setiap dua jam selama satu hari. Hasil penelitian menunjukkan bahwa LD50 dari ekstrak air buah pepaya muda pada uji toksisitas akut diperoleh sebesar >5000 mg/kg BB. Pengamatan karakteristik efek toksik pada mencit menunjukkan tidak ada perubahan gejala umum, profil perilaku, neurologis, dan autonomik. Pada penelitian ini, ekstrak air buah pepaya muda dapat diklasifikasikan kedalam substansi yang Praktis Tidak Toksik (PTT). Efek toksik yang minimal menjadikan ekstrak ini dapat dipertimbangkan untuk dikonsumsi secara luas oleh masyarakat.

**Kata kunci :** Buah pepaya muda, efek toksik, LD50, toksisitas akut

## A. Pendahuluan

Pepaya merupakan salah satu jenis tanaman obat yang umum dimanfaatkan oleh masyarakat secara empiris dalam upaya pencegahan penyakit atau pengobatan secara tradisional, salah satunya untuk mengatasi gangguan pencernaan. Berdasarkan penelitian Aravind dkk, hampir semua bagian pepaya yaitu buah, daun, biji, dan akar terbukti bermanfaat secara farmakologis. Buah pepaya khususnya memiliki efek gastroprotektif, aktivitas anti ulkus, laktagogum, antibakterial, dan *laxative*.<sup>1,2</sup>

Studi mengenai evaluasi nilai nutrisi buah pepaya dalam berbagai tingkat kematangan menunjukkan bahwa buah pepaya muda memiliki kandungan nutrisi yang lebih tinggi dibandingkan buah pepaya matang. Buah pepaya muda memiliki kandungan kimia berupa saponin, alkaloid, tannin, dan flavonoid. Kandungan saponin, alkaloid, flavonoid, tannin, triterpenoid, dan quinon pada tumbuhan terbukti memiliki berbagai manfaat, namun berdasarkan beberapa penelitian konsumsi tumbuhan dengan kandungan kimia yang tinggi dapat memberikan efek samping salah satunya berupa efek toksisitas.<sup>3</sup>

Pada hakikatnya pengembangan penelitian tumbuhan obat dilakukan agar tanaman obat mampu dimanfaatkan untuk pengobatan bagi manusia, sehingga uji toksisitas sebagai suatu uji preklinik sangat diperlukan untuk mengetahui tingkat keamanan tanaman obat dan efek samping yang mungkin dapat ditimbulkan. Salah satu jenis uji preklinik adalah uji toksisitas akut.<sup>4</sup>

Uji toksisitas akut merupakan cara untuk mendeteksi efek toksik suatu substansi fitofarmaka yang muncul secara singkat setelah pemberian zat dalam waktu 24 jam dan berperan sebagai langkah awal evaluasi karakteristik toksik yang dimiliki suatu substansi fitofarmaka.<sup>5</sup> Penilaian toksisitas akut suatu substansi fitofarmaka dapat dilakukan melalui berbagai metode, salah satu metode kuantitatif yang paling sering digunakan adalah penentuan *lethal dose 50* (LD50).<sup>6</sup> Hasil LD50 dapat menentukan suatu substansi fitofarmaka tergolong kedalam kriteria deajat toksisitas tertentu.<sup>5</sup>

Pada pelaksanaan uji toksisitas selain dilakukan pengamatan terhadap kematian hewan uji, dilakukan juga pengamatan sifat toksik suatu zat yang ditentukan melalui penilaian karakteristik efek toksik yang muncul pada hewan uji. Karakteristik efek toksik tersebut meliputi perubahan profil perilaku, neurologis, autonomik, dan gejala umum.<sup>5,7</sup>

Penelitian sebelumnya mengenai uji toksisitas ekstrak air buah pepaya (*Carica papaya* L.) muda di Nigeria oleh Oduola dkk menunjukkan bahwa nilai LD50 pada tikus sebesar 2520 mg/kg.<sup>8</sup> Hingga saat ini belum terdapat data penelitian mengenai uji toksisitas akut buah pepaya (*Carica papaya* L.) muda di Indonesia dan belum ada laporan tentang efek samping yang membahayakan serta efek toksisitas yang muncul akibat mengonsumsi pepaya. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui toksisitas akut ekstrak air buah pepaya (*Carica papaya* L.) muda pada mencit melalui penentuan LD50 dan pengamatan karakteristik efek toksik yang ditimbulkannya.

## B. Kajian Pustaka

### Pepaya

Pepaya memiliki kandungan nutrisi yang sangat bermanfaat bagi kesehatan. Berdasarkan penelitian Iwuagwu dkk tahun 2013, kandungan nutrisi buah pepaya muda lebih tinggi dibanding pepaya matang terutama kandungan serat, protein, lemak,

karbohidrat, vitamin C, dan mineral (kalsium, magnesium, fosfor, dan kalium). pada buah pepaya terdapat kandungan kimia berupa saponin, alkaloid, tannin, dan flavonoid.<sup>3</sup>

### Uji Toksisitas

Uji toksisitas merupakan suatu uji untuk mendeteksi efek toksik suatu zat pada sistem biologi dan untuk memperoleh data dosis-respon yang khas dari sediaan uji. Uji toksisitas merupakan salah satu tahapan uji preklinik yang menggunakan hewan sebagai model. Penggunaan model hewan berguna untuk melihat adanya reaksi biokimia, fisiologik dan patologik. Jenis uji toksisitas umum terdiri dari uji toksisitas akut, subkronik, dan kronik. Uji toksisitas akut merupakan uji yang dilakukan dengan pemberian suatu substansi pada kelompok hewan uji dalam dosis tunggal atau berulang dalam waktu 24 jam. Uji toksisitas akut ini bertujuan untuk memperoleh nilai LD50 suatu substansi fitofarmaka, menentukan penggolongan substansi fitofarmaka, dan memperoleh informasi bahaya setelah pemaparan suatu zat secara akut.<sup>5,9</sup>

### Lethal Dose (50)

*Lethal Dose* 50 (LD50) merupakan dosis yang terbukti letal atau menyebabkan kematian pada 50% populasi hewan uji.<sup>9</sup> Penentuan LD50 merupakan metode yang umum digunakan dalam uji toksisitas akut. Melalui LD50 dapat ditentukan suatu substansi memiliki rentang dosis yang aman atau justru membahayakan apabila dikonsumsi oleh manusia.<sup>5</sup> Penentuan LD50 dapat dilakukan melalui berbagai metode, diantaranya metode Lorke, metode Karber, up and down method, dan proposed new recommended method. Proposed new recommended method berdasarkan penelitian Chinendu dkk memiliki beberapa kelebihan dibandingkan dengan metode yang lain yaitu diantaranya berupa hasil penelitian yang lebih akurat, penggunaan hewan uji dengan jumlah yang lebih sedikit, proses uji toksisitas yang lebih sederhana, dan durasi penelitian yang lebih singkat.<sup>10</sup>

### Karakteristik Efek Toksik Pada Hewan Uji

Pengamatan yang dilakukan pada uji toksisitas akut meliputi pengamatan terhadap profil perilaku, profil neurologis, profil saraf autonom, dan gejala umum. Pengamatan profil perilaku berupa respon mencit terhadap rangsangan sentuhan, nyeri, dan perilaku *grooming*. Pengamatan profil neurologis berupa pengamatan eksitasi sentral (*straub*, tremor, *convulsion*) dan inkoordinasi motorik (ataksia, *righting reflex*). Pengamatan profil autonomik berupa pengamatan terhadap indra penglihatan dan fungsi sekretori. Pengamatan gejala umum berupa penilaian adanya perubahan warna kulit, piloereksi, dan gejala *writhing*.<sup>7</sup>

### C. Metode

Subjek penelitian adalah mencit betina (25-30 gr) dengan usia sekitar 6-8 minggu yang didapatkan dari Pusat Antar Universitas-Hayati Institut Teknologi Bandung (PAU-ITB). Mencit diaklimatisasi selama 7 hari sebelum dilakukan uji toksisitas.

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental laboratorik dan dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Unisba. Penentuan LD50 dalam uji toksisitas akut menggunakan metode *proposed (new) recommended* dengan 12 ekor

mencit yang terbagi kedalam tiga tahapan uji toksisitas dan satu uji konfirmasi. Setiap satu ekor mencit di tiap kelompok pada tahapan uji toksisitas akut mendapatkan dosis uji yang berbeda-beda. Uji toksisitas tahap pertama yang terdiri dari 4 ekor mencit diberi dosis ekstrak per oral sebesar 50, 200, 400, 800 mg/kg BB sementara tahap kedua dan ketiga masing-masing yang terdiri dari 3 ekor mencit diberi dosis ekstrak per oral sebesar 1000, 1500, 2000 mg/kg BB dan 3000, 4000, 5000 mg/kg BB. Pada uji konfirmasi digunakan 2 ekor mencit yang diberikan dosis ekstrak terendah yang menyebabkan mortalitas.

Mencit yang telah diberikan dosis tertentu ekstrak air buah pepaya muda diamati selama 24 jam dan setiap mencit yang mati dicatat. Selain itu, tiap dua jam dalam 24 jam dilakukan pengamatan karakteristik efek toksik pada mencit berupa perubahan gejala umum, profil perilaku, profil neurologis, dan profil autonomik.

Data mortalitas mencit pada uji toksisitas akut kemudian dihitung menggunakan rumus penentuan LD50 yang merujuk pada metode *proposed (new) recommended*.

$$LD50 = \frac{(M_0 + M_1)}{2}$$

Keterangan :

$M_0$  = dosis tertinggi dari ekstrak air buah pepaya muda yang tidak menimbulkan kematian.

$M_1$  = dosis terendah dari ekstrak air buah pepaya muda yang menimbulkan kematian.

#### D. Hasil

##### Hasil Uji Toksisitas Akut dan Uji Konfirmasi Ekstrak Air Buah Pepaya (*Carica papaya L.*) Muda Terhadap LD50 Pada Mencit

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian dosis ekstrak air buah pepaya (*Carica papaya L.*) muda pada uji toksisitas tahap satu hingga tahap tiga yang dimulai dari dosis 50 hingga 5000 mg/kg BB per oral (p.o.) tidak menimbulkan efek toksisitas akut berupa kematian mencit. Pada penelitian ini dikarenakan tidak ditemukan mencit yang mati pada tahap satu hingga tahap ketiga, maka dilakukan uji konfirmasi pada dosis tertinggi yang tidak menimbulkan kematian yaitu sebesar 5000 mg/kgBB. Pada hasil uji konfirmasi toksisitas akut ekstrak air buah pepaya (*Carica papaya L.*) muda pada dosis 5000 mg/kgBB tidak terdapat mencit yang mati. Hal tersebut menunjukkan bahwa LD50 ekstrak air buah pepaya (*Carica papaya L.*) muda adalah sebesar >5000 mg/kgBB.

**Tabel 1. Hasil Uji Toksisitas Akut dan Uji Konfirmasi Ekstrak Air Buah Pepaya (*Carica papaya L.*) Muda Terhadap LD50**

Kelompok Uji	No. Mencit	Dosis* (mg/kgBB per oral)	Berat Badan Mencit (gr)	Toksisitas Akut (Mati/Hidup)
Tahap I	1	50	29	Hidup
	2	200	29	Hidup
	3	400	27	Hidup



	4	800	30	Hidup
Tahap II	1	1000	27	Hidup
	2	1500	30	Hidup
	3	2000	30	Hidup
Tahap III	1	3000	28	Hidup
	2	4000	28	Hidup
	3	5000	26	Hidup
Konfirmasi	1	5000	30	Hidup
	2	5000	29	Hidup

Keterangan: \*Dosis berdasarkan *proposed (new) recommended method*.<sup>10</sup>

### Hasil Uji Toksisitas Akut Ekstrak Air Buah Pepaya (*Carica papaya* L.) Muda Terhadap Karakteristik Efek Toksik Akut Pada Mencit

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada setiap tahapan uji toksisitas akut tidak ditemukan gejala yang menunjukkan efek toksik dari pemberian dosis ekstrak air buah pepaya (*Carica papaya* L.) muda. Pada setiap tahapan uji tidak ditemukan gejala piloereksi yang merupakan gejala umum toksisitas. Hasil pengamatan profil perilaku hanya menunjukkan aktivitas *grooming* yang fisiologis, respon mencit terhadap rangsangan sentuhan (*touch*) dalam batas normal. Pada profil neurologis tidak ditemukan efek eksitasi sentral berupa gejala *straub*, tremor, dan *convulsion*. *Righting reflex* ditemukan dalam batas normal. Pengamatan profil autonomik pada mencit tidak menunjukkan adanya gejala eksoptalamus.

**Tabel 2. Hasil Uji Toksisitas Akut Ekstrak Air Buah Pepaya (*Carica papaya* L.) Muda Terhadap Karakteristik Efek Toksik Pada Mencit**

Kel. Uji	No. Mencit	Dosis* (mg/kgBB per oral)	BB mencit (gr)	Karakteristik Efek Toksik								
				Piloereksi	<i>Grooming</i>	<i>Touch</i>	<i>Straub</i>	Tremor	<i>Convulsion</i>	<i>Righting Reflex</i>	Eksoptalamus	
Tahap I	1	50	29	(-)	N	N	(-)	(-)	(-)	N	(-)	
	2	200	29	(-)	N	N	(-)	(-)	(-)	N	(-)	
	3	400	27	(-)	N	N	(-)	(-)	(-)	N	(-)	
	4	800	30	(-)	N	N	(-)	(-)	(-)	N	(-)	
Tahap II	1	1000	27	(-)	N	N	(-)	(-)	(-)	N	(-)	
	2	1500	30	(-)	N	N	(-)	(-)	(-)	N	(-)	
	3	2000	30	(-)	N	N	(-)	(-)	(-)	N	(-)	
Tahap III	1	3000	28	(-)	N	N	(-)	(-)	(-)	N	(-)	
	2	4000	28	(-)	N	N	(-)	(-)	(-)	N	(-)	
	3	5000	26	(-)	N	N	(-)	(-)	(-)	N	(-)	

Keterangan: \*Dosis berdasarkan *proposed (new) recommended method*.<sup>10</sup>

N = normal. (-) tidak ada gejala

## E. Pembahasan

Toksistas merupakan derajat dimana suatu substansi (toksin atau racun) dapat membahayakan bagi organ ataupun tubuh organisme. Semua substansi berpotensi toksik tergantung pada kuantitas metabolit toksik yang terkandung didalamnya.<sup>11</sup>

Hasil penelitian uji toksistas akut ekstrak air buah pepaya (*Carica papaya* L.) muda ini menunjukkan bahwa nilai LD50 sebesar >5000 mg/kgBB. Berdasarkan *Guideline* Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan (Perkbpom) No. 7 Tahun 2014 yang diambil dari klasifikasi menurut Hodge dan Sterner, nilai LD50 >5000 mg/kgBB dari ekstrak air buah pepaya (*Carica papaya* L.) muda dapat diklasifikasikan kedalam Praktis Tidak Toksik (PTT).<sup>5</sup>

Hasil skrining fitokimia menunjukkan ekstrak air buah pepaya (*Carica papaya* L.) muda memiliki kandungan saponin, alkaloid, flavonoid, tannin, triterpenoid, dan quinon. Menurut Figueiredo dkk, variabilitas kandungan substansi fitokimia didalam tumbuhan dapat dipengaruhi oleh faktor genetik, varietas tumbuhan, perbedaan letak geografis, dan kondisi lingkungan.<sup>12</sup> Pada penelitian uji toksistas akut ekstrak air buah pepaya (*Carica papaya* L.) muda ini, letak geografis mempengaruhi kondisi lingkungan yang berkontribusi dalam membantu pertumbuhan buah pepaya. Kondisi lingkungan yang kemungkinan menjadi faktor penentu variasi substansi fitokimia menurut Ramakhrisna dkk adalah suhu, kelembapan, intensitas cahaya, kandungan mineral, suplai air, dan karbondioksida.<sup>13</sup>

Pada beberapa penelitian menunjukkan bahwa kandungan substansi fitokimia dalam dosis tinggi pada tumbuhan dapat memberikan efek toksistas bagi organ ataupun tubuh manusia. Dalam menimbulkan suatu efek tidak menutup kemungkinan terjadi interaksi antar substansi fitokimia. Interaksi tersebut dapat berupa interaksi positif ataupun interaksi negatif.<sup>14</sup>

Interaksi positif merupakan interaksi yang saling menguatkan kandungan suatu substansi fitokimia atau disebut juga sebagai efek potensiasi. Potensiasi interaksi suatu substansi fitokimia dapat menimbulkan efek *additive* dan *synergies*.

Interaksi negatif merupakan interaksi yang saling melemahkan atau meniadakan efek suatu substansi fitokimia sehingga efek yang dihasilkan minimal atau tidak ada. Interaksi negatif bekerja dengan menghambat seluruh aktifitas farmakologis dari substansi fitokimia dengan cara menurunkan stabilitas dan bioavailabilitas atau meningkatkan metabolisme substansi fitokimia tersebut di dalam tubuh.<sup>14</sup>

Keberagaman kandungan substansi fitokimia pada ekstrak air buah pepaya (*Carica papaya* L.) muda baik secara kuantitas maupun kualitas dapat menyebabkan interaksi yang positif ataupun negatif. Pada penelitian ini, dimungkinkan terjadi interaksi antar substansi fitokimia yang belum memadai atau belum sinergis untuk menimbulkan efek kematian pada hewan uji dan dimungkinkan interaksi tersebut bersifat protektif terhadap timbulnya efek toksistas.

Pengamatan karakteristik efek toksik akut pada mencit bertujuan untuk melengkapi data LD50 dan memberikan gambaran mengenai kemungkinan efek samping toksistas terhadap perubahan perilaku dalam tubuh. Pada pengamatan gejala umum tidak ditemukan gejala piloereksi atau gejala menegangnya bulu mencit yang dapat diakibatkan oleh kandungan alkaloid pada ekstrak yang belum cukup untuk menimbulkan perangsangan saraf simpatis.<sup>15</sup>

Pada pengamatan profil perilaku didapatkan gejala *grooming* yang fisiologis berupa perilaku menjilati bulu dan membersihkan wajah dalam intensitas minimal,

sementara itu, respon terhadap sentuhan (*touch*) masih dalam kondisi baik dan normal. Kandungan saponin, alkaloid, dan flavonoid belum cukup untuk mengakibatkan perangsangan berlebih pada sistem saraf pusat (SSP) yang dapat mempengaruhi perubahan perilaku mencit yang sifatnya patologis.<sup>2,16</sup>

Pada pengamatan profil neurologis, gejala *straub*, tremor, dan *convulsions* dapat menunjukkan adanya rangsangan terhadap susunan saraf pusat, sementara perubahan *righting reflex* menunjukkan inkoordinasi motorik dari SSP. Kandungan alkaloid, flavonoid, dan tannin pada ekstrak yang diketahui dapat bersifat toksik bagi susunan saraf pusat pada penelitian ini kemungkinan kandungannya belum cukup untuk menimbulkan efek toksisitas.<sup>17</sup> Hal tersebut dapat diakibatkan adanya kandungan triterpenoid yang sifatnya neuroprotektif.

Pada pengamatan profil autonomik tidak terdapat gejala eksotalamus yang menunjukkan kandungan substansi fitokimia pada ekstrak belum cukup untuk menimbulkan hiperaktivitas dari neuron serotonergik yang mempengaruhi respon autonomik mencit.<sup>18</sup>

## F. Kesimpulan dan Saran

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh simpulan bahwa LD50 dari ekstrak air buah pepaya (*Carica papaya* L.) muda terhadap mencit dengan menggunakan metode *proposed (new) recommended* pada uji toksisitas akut diperoleh sebesar >5000 mg/kg BB. Selain itu, pemberian ekstrak air buah pepaya (*Carica papaya* L.) muda tidak menimbulkan gejala yang menunjukkan karakteristik efek toksik pada mencit.

## Daftar Pustaka

- Aravind G, Bhowmik D, Duraivel S, Harish G. Traditional and medicinal uses of *Carica papaya*. J Med plant Stud. 2013;1(1):7–15.
- Kharisma Y, Ariyoga A, Sastramihardja HS. Efek ekstrak air buah pepaya (*Carica papaya* L.) muda terhadap gambaran histologi kelenjar mamma mencit laktasi. MKB. 2011;43(4):160–5.
- Iwuagwu M, Chukwuka KS, Uka UN. Evaluation of nutritional components of *Carica papaya* L. at different stages of ripening. J Pharm Biol Sci. 2013;6(4):13–6.
- Dewoto HR. Pengembangan obat tradisional Indonesia menjadi fitofarmaka. Maj Kedokt Indon. 2007;57(7):205–11.
- Pedoman uji toksisitas nonklinik secara *in vivo*. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. 7 Tahun 2014; 2014.
- Paramveer D, Chancal M, Paresh M, Rani A, Nema RK. Effective alternative methods of LD50 help to save number of experimental animals. J Chem Pharm Res. 2010;2(6):450–3.
- Widowati L, Pudjiastuti, Nuratmi B. Uji toksisitas akut ekstrak mahkota dewa pada hewan coba. Media Litbang Kesehat. 2005;15(1):6–10.

- Oduola T, Adeniyi FAA, Ogunyemi EO, Bello IS, Idowu TO, Subair, HG. Toxicity studies on an unripe *Carica papaya* aqueous extract: biochemical and haematological effects in wistar albino rats. *J Med Plant Res.* 2007;1(1):1–4.
- Akhila JS, Shyamjith, Deepa, Alwar MC. Acute toxicity studies and detemination of median lethal dose. *Curr Sci.* 2007;93(7):917–20.
- Chinedu E, Arome D, Ameh FS. New recomended method for determining acute toxicity in animal models. *Toxicol Intl.* 2013;20(3):224–6.
- Hodgson E. Introduction to toxicology. In: Hodgson E, penyunting. A textbook of modern toxicology. Edisi ke-3. Wiley & Sons, Inc; 2004. hlm. 3-12.
- Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Scheffer JJC. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragr J.* 2008;23(4):213–26.
- Ramakrishna A, Ravishankar GA. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal Behav Landes Biosci.* 2011;6(11):1720–31.
- Lila MA, Raskin I. Health-related interactions of phytochemical. *J Food Sci.* 2005;70(1):21–7.
- Benedek M, Wilfing B, Wolfbauer RL, Katzur BH, Kaernbach C. Objective and continuous measurement of piloerection. *Physchophysiology.* 2010;47:989–93.
- Gupta RC, penyunting. *Veterinary toxicology.* Edisi ke-1. New York: Academic press; 2007. hlm. 909-911.
- Sundari D, Nuratmi B, Winarno MW. Toksisitas akut LD50 dan uji gelagat ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis* L.) Kunze) pada mencit. *Media Litbang Kesehatan.* 2009;19(4):198–203.
- Haberzettl R, Bert B, Fink H, Fox MA. Animal models of serotonin syndrome : a systemical review. *Behav Brain Res.* 2013;256:328–45.