

## Uji Toksisitas Oral *Single-Dose* Ekstrak Kloroform Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix* DC.) pada Tikus Wistar (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769)

### Single-Dose Oral Toxicity Study of Chloroform Extract of Kaffir Lime (*Citrus hystrix* DC.) Leaves in Wistar Rats (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769)

Laksmindra Fitria<sup>1\*</sup>, Maura Indria Meidianing<sup>1</sup>, Wilda Bunga Tina Sanjaya<sup>1</sup>, Isma Cahya Putri Gunawan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departemen Biologi Tropika, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, D.I.Y., Indonesia;

\*Corresponding Author, email: [laksmindraf@ugm.ac.id](mailto:laksmindraf@ugm.ac.id)

**Abstract:** Leaves of kaffir lime (*Citrus hystrix*) are commonly used as a seasoning in various Indonesian and Southeast Asian dishes. Phytochemical studies reported various secondary metabolites that possess medicinal properties. Before exploring their potential as therapeutic agent, a series of toxicity studies must be conducted to assess the toxicity and safety levels. This research aimed to study the single-dose acute oral toxicity of chloroform extract of kaffir lime leaves (CECHL) in female Wistar rats (*Rattus norvegicus*) as experimental animal. The procedure followed OECD Test Guideline No.420 with the dose 2000 mg/kg body weight for 14 days (sighting study). Parameters consisted of mortality, clinical signs of sublethal effect based on changes in general appearance and daily activity/behavior, hematological profile, and blood clinical biochemistry. Neither mortality nor sublethal effects were found during the experiment. All blood parameter values (erythrocytes, leukocytes, thrombocytes, ALT, AST, creatinine, BUN, glucose, cholesterol, and triglycerides) were within reference interval, indicating that CECHL is not harmful to normal physiology. In conclusion, single-dose oral administration of CECHL is safe, no-observed-adverse-effect-level (NOAEL) at dose 2000 mg/kg body weight or included in Category 5 based on the Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS).

**Key words:** chloroform extract, kaffir lime, natural product, OECD 420, single-dose acute oral toxicity

**Abstrak:** Daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) merupakan salah satu bahan yang lazim digunakan sebagai bumbu penyedap dalam berbagai hidangan khas Indonesia dan Asia Tenggara. Kajian fitokimia menunjukkan sejumlah metabolit sekunder yang berkhasiat obat. Sebelum eksplorasi potensinya sebagai bahan obat, serangkaian uji toksisitas harus dilakukan untuk mempelajari tingkat ketoksikan dan keamanannya. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari toksisitas oral *single-dose* ekstrak kloroform daun jeruk purut (EKDJP) pada tikus (*Rattus norvegicus*) Wistar betina sebagai hewan coba. Prosedur mengikuti *OECD Test Guideline* No.420 dengan dosis 2000 mg/kg berat badan selama 14 hari (*sighting study*). Parameter yang diamati meliputi: mortalitas, tanda-tanda klinis ketoksikan subletal berupa perubahan penampilan secara umum dan aktivitas/perilaku harian, profil hematologis, serta uji biokimia klinis darah. Tidak ada hewan yang mati maupun efek subletal yang ditemukan selama percobaan. Semua nilai parameter darah (eritrosit, leukosit, trombosit, ALT, AST, kreatinin, BUN, glukosa, kolesterol, dan trigliserida) berada dalam kisaran rujukan yang mengindikasikan bahwa EKDJP tidak mengganggu fisiologis normal. Dapat disimpulkan bahwa administrasi oral EKDJP *single-dose* bersifat aman, *no-observed-adverse-effect-level* (NOAEL) pada dosis 2000 mg/kg berat badan atau termasuk dalam Kategori 5 berdasarkan *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* (GHS).

**Kata kunci:** jeruk purut, ekstrak kloroform, produk alam, toksisitas oral akut *single-dose*, OECD 420

Dikumpulkan: 27 November 2022    Direvisi: 4 Desember 2023    Diterima : 20 April 2024    Dipublikasi:30 April 2024

## Pendahuluan

Jeruk purut (*Citrus hystrix* DC.) adalah salah satu spesies jeruk yang banyak tumbuh di kawasan tropis meliputi Asia Tenggara hingga Cina Selatan. Daun jeruk purut merupakan salah satu bahan penting dalam masakan Asia Tenggara karena menciptakan aroma dan rasa yang khas (Lim, 2012). Selain sebagai bahan masakan, daun jeruk purut berpotensi sebagai bahan obat karena kaya akan berbagai senyawa bioaktif yang berperan penting dalam perawatan kesehatan. Senyawa bioaktif pada umumnya adalah golongan metabolit sekunder. Metabolit sekunder merupakan senyawa yang diproduksi oleh tumbuhan, berfungsi sebagai perlindungan diri dalam menghadapi berbagai cekaman dan gangguan dari organisme lain. Oleh karena itu, metabolit sekunder berpotensi toksik bagi organisme lain (Oduola *et al.*, 2010). Di sisi lain, metabolit sekunder dalam dosis yang tepat dapat berkhasiat sebagai obat (Fitria *et al.*, 2022a).

Kajian fitokimia menunjukkan bahwa daun jeruk purut mengandung berbagai metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, glikosida, saponin, tannin, dan triterpen (Nasution *et al.*, 2021). Daun jeruk purut juga memiliki senyawa bioaktif seperti limonoid, asam fenolat, dan flavonoid yang tinggi (Jamilah *et al.*, 2011; Loh *et al.*, 2011). Flavonoid memiliki manfaat antara lain sebagai antikanker, antioksidan, anti-inflamasi, dan antivirus. Terdapat berbagai tipe flavonoid pada daun jeruk purut seperti quercetin, luteolin, hesperetin, peonidin, myricetin, cyanidin, isoharmnetin, dan apigenin (Miean & Mohamed, 2001; Butryee *et al.*, 2009). Daun jeruk purut juga mengandung  $\alpha$ -tocopherol (AT) yang tinggi, termasuk tertinggi kedua setelah daun katuk (*Sauropus androgynus*) (Ching & Mohamed, 2001). AT adalah salah satu isoform vitamin E yang bermanfaat antara lain sebagai antioksidan, antitumor, antiinflamasi, dan antimikroba (Murakami *et al.*, 1995; Jamilah *et al.*, 2011; Loh *et al.*, 2011). Ekstrak kloroform daun jeruk purut (EKDJP) juga mengandung senyawa terpenoid berupa farnesol, nerodilol, spatulenol, dan mirtanol yang berperan sebagai antiinflamasi (Saptanti *et al.*, 2021).

Proses pengembangan dan pengujian bahan obat baru (*drug discovery*) memiliki beberapa tahapan untuk memastikan agar suatu

agen terapeutik benar-benar bermanfaat dalam kebutuhan medis. Uji *in vivo* praklinis adalah tahap penting untuk meminimalisir kegagalan dalam uji klinis akibat ketoksikan dosis (Svendson *et al.*, 2006). Bahan yang memiliki potensi terapeutik harus diuji terlebih dahulu sifat ketoksikannya terhadap tubuh. Toksisitas sistemik dapat terjadi pada organisme yang diberikan administrasi oral bahan asing (xenobiotik) seperti obat herbal maupun sintesis. Kandungan dalam bahan asing tersebut akan berinteraksi dengan komponen sel/jaringan tubuh yang selanjutnya berpengaruh secara positif atau negatif terhadap kondisi fisik, perilaku, dan fisiologis organisme (Arika *et al.*, 2016).

Kajian ilmiah ketoksikan EKDJP belum pernah dilakukan padahal bahan ini sangat potensial untuk dikembangkan menjadi obat. Penelitian ini merupakan uji toksisitas tahap pertama yang bertujuan untuk mempelajari tingkat ketoksikan akut dosis tunggal EKDJP purut yang diberikan satu kali (*single-dose*). Prosedur mengikuti *OECD Guideline No.420* (OECD, 2002) yang telah menjadi acuan bagi para peneliti di berbagai negara di dunia. *The Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) merupakan sebuah forum tingkat internasional yang bertujuan untuk mengembangkan standar kebijakan guna mendorong pertumbuhan ekonomi berkelanjutan. Indonesia adalah salah satu dari 37 negara anggota OECD sejak tahun 2007 (OECD, 2022).

## Bahan dan Metode

### *Ethical Clearance*

Seluruh prosedur yang melibatkan hewan coba dalam penelitian ini telah disetujui oleh Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Hewan UGM berdasarkan Sertifikat *Ethical Clearance* Nomor 00128/EC-FKH/Eks./2021.

### Identifikasi dan ekstraksi daun jeruk purut

Daun jeruk purut dikoleksi dari kebun jeruk purut milik Ibu Tulus yang berlokasi di Desa Pekutan, Kecamatan Bayan, Kabupaten Purworejo, Jawa Tengah. Sebagian besar penduduk desa ini berprofesi sebagai pekebun

dengan produk utama jeruk purut (Anitasari, dkk., 2023). Identifikasi spesies telah dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi UGM dan dinyatakan sebagai *Citrus hystrix* DC. Berdasarkan Sertifikat Identifikasi Nomor 067/S.Tb./IV/2022.

Setelah dicuci bersih dengan air mengalir, daun jeruk purut dikeringanginkan lalu dimasukkan ke dalam inkubator bersuhu 50 °C hingga dicapai berat kering yang konstan. Daun yang telah kering dihaluskan menggunakan alat pelumat listrik hingga menjadi bubuk, kemudian direndam (maserasi) dalam kloroform selama 3 x 24 jam dengan perbandingan bubuk:kloroform = 1:3. Rendaman diaduk secara rutin untuk memaksimalkan proses penyarian. Rendaman disaring dengan kertas saring, kemudian filtrat yang terbentuk dievaporasi dengan bantuan kipas angin hingga kloroform menguap sempurna. Ekstrak kering yang diperoleh ditutup dengan *aluminum foil* dan disimpan dalam kulkas dengan suhu 4 °C hingga siap digunakan.

### Pengadaan dan pemeliharaan hewan coba

Hewan coba berupa dua belas ekor tikus (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) betina Galur Wistar umur delapan minggu *nulliparous* hasil pengembangbiakan di *Animal House* Fakultas Biologi UGM. Selama percobaan, hewan dipelihara di tempat yang sama, dalam kandang komunal berukuran 38 x 25 x 23,5 cm<sup>3</sup> dengan penutup berupa teralis dari bahan logam tahan karat. Kandang dilengkapi dengan wadah pakan, botol minum, dan alas tidur berupa serutan kayu. Pakan berupa pelet standar Ratbio<sup>®</sup> (P.T. Citra Ina Feedmill, Jakarta) dan air minum berupa air mineral dalam kemasan (P.T. Berkah Tirta Jaya, Yogyakarta). Pakan dan air minum diberikan *ad libitum*. Parameter lingkungan di fasilitas pemeliharaan adalah sebagai berikut: suhu ruang 26-28 °C, kelembapan udara 70-85 %, pencahayaan alami dengan fotoperiode standar (12 jam gelap:12 jam terang). Kandang dicuci dan disemprot dengan disinfektan 2x seminggu.

### Rancangan percobaan

Tikus dikelompokkan menjadi tiga, setiap kelompok terdiri atas empat individu sebagai ulangan: kelompok ke-1 dicekok akuades atau plasebo (KONTROL), kelompok ke-2 dicekok Tween80 5 % (TWEEN), dan kelompok ke-3

dicekok ekstrak kloroform daun jeruk purut (EKDJP). Dosis EKDJP adalah 2000 mg/kg berat badan sesuai dengan OECD *Test Guideline* No.420 (OECD, 2002) yang dilarutkan dalam akuades sebagai vehikulum. Tween80 digunakan untuk membantu melarutkan EKDJP dalam akuades. EKDJP, Tween80, dan akuades diberikan secara *oral gavage* 1 mL/ekor pada hari pertama penelitian (*single-dose*).

### Parameter dan pengambilan data

Tanda-tanda ketoksikan diamati setiap hari secara kualitatif meliputi: ada tidaknya kematian, manifestasi klinis efek subletal, terutama penampilan fisik, aktivitas/perilaku, konsumsi makan dan minum, serta kondisi feses. Parameter kuantitatif berupa berat badan, suhu badan, profil hematologis berupa hitung eritrosit, leukosit, dan trombosit, uji biokimia darah berupa aktivitas *alanine aminotransferase* (ALT) dan *aspartate aminotransferase* (AST), serta kadar kreatinin, *blood urea nitrogen* (BUN), glukosa, kolesterol total, dan trigliserida. Semua parameter tersebut diukur pada hari ke-0, 7, dan 14. Sampel darah dikoleksi dari sinus orbitalis setelah hewan tertidur akibat anestesi dengan Ketamine<sup>®</sup>-Xylazine<sup>®</sup> (K=100 mg/kg berat badan, X=10 mg/kg berat badan) secara intramuskular 0,1 mL/100 g berat badan. Sebelum dianestesi, tikus dipuaskan selama 6 jam (Norecopa, 2009). Analisis profil hematologis menggunakan alat Sysmex<sup>®</sup>-XP100, sementara itu pemeriksaan parameter biokimia darah menggunakan kit DiaSys<sup>®</sup> dan alat Microlab<sup>®</sup>300.

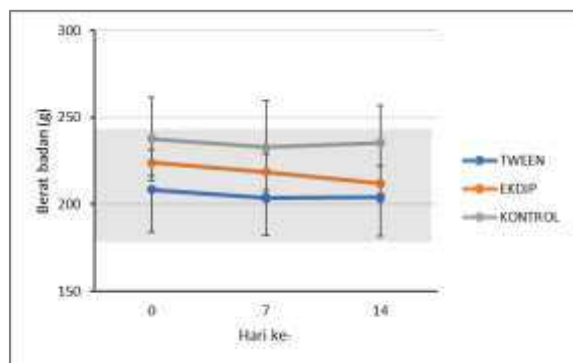
### Analisis data

Data ditabulasi dalam Microsoft<sup>®</sup>Excel<sup>®</sup> v.2019 dilanjutkan dengan analisis statistika secara deskriptif menggunakan IBM<sup>®</sup>SPSS<sup>®</sup> v.23. Data ditampilkan dalam bentuk rerata ± simpangan. Data juga dianalisis berdasarkan *Repeated Measures* ANOVA dan Duncan's *post hoc test* ( $\alpha=0,05$ ). Pemilihan metode analisis statistik ini mengikuti Park *et al.* (2009). Selain dibandingkan antarkelompok dan antarwaktu, data juga dibandingkan dengan *baseline*. *Baseline* dapat dikonstruksikan berdasarkan kisaran nilai terendah hingga tertinggi pada populasi hewan coba dalam percobaan yang diukur pada hari ke-0 (Moser, 2019).

## Hasil dan Pembahasan

Prosedur uji toksisitas yang dirancang oleh OECD menggunakan sampel hewan yang lebih sedikit dan meminimalisir efek samping terhadap hewan dibandingkan dengan uji toksisitas konvensional (uji toksisitas klasik). Uji toksisitas konvensional terutama bertujuan untuk menentukan LD50 atau LC50, padahal tidak semua zat toksik menyebabkan kematian (Fitria *et al.*, 2022a). Hewan dapat tetap bertahan hidup selama percobaan namun mengalami beberapa efek subletal akibat bahan yang diberikan. Oleh karena itu, perlu dilakukan pengamatan terhadap beberapa tanda ketoksikan subletal yang muncul pada hewan selama percobaan (OECD, 2002).

Metode *oral gavage* lazim dilakukan dalam penelitian toksikologi dan farmakologi karena dosis yang masuk ke dalam tubuh hewan dapat dipastikan dan tidak menimbulkan efek negatif terhadap kesejahteraan hewan (Turner *et al.*, 2012). Dosis tertinggi bahan atau zat yang direkomendasikan dalam uji toksisitas menurut OECD adalah 2000-5000 mg/kg berat badan. Dosis EKDJP dalam penelitian ini adalah 2000 mg/kg berat badan karena jika menggunakan dosis 5000 mg/kg berat badan maka konsistensinya menjadi terlalu pekat sehingga tidak dapat diberikan *per oral*. Selain itu, dosis 5000 mg/kg berat badan disarankan hanya untuk ekstrak akuosa atau infusa (OECD, 2002).



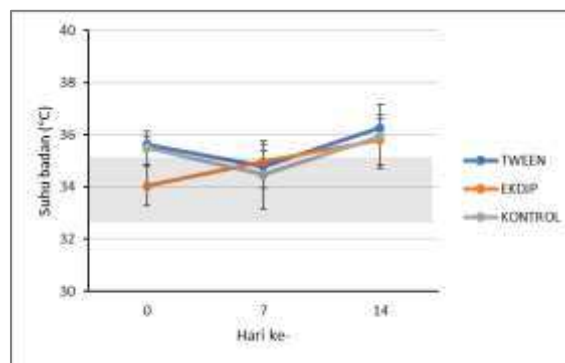
**Gambar 1.** Berat badan tikus pada uji toksisitas *single-dose* ekstrak kloroform daun jeruk purut

Tikus merupakan hewan sosial yang hidup secara komunal sehingga harus dipelihara secara berkelompok (Neff, 2021). Status kesehatan tikus tidak semata-mata akibat perlakuan suatu

Polisorbat (Tween80) digunakan sebagai emulsifier dan surfaktan karena EKDJP tidak mudah larut dalam air. Menurut Varma *et al.* (1985), Tween80 memiliki derajat toksisitas yang rendah sehingga lazim digunakan dalam penelitian farmakologi. Mahjoub *et al.* (2011) menggunakan Tween80 untuk membantu melarutkan ekstrak kloroform daun *Olea europaea*, demikian juga Fitria *et al.* (2022a) menggunakan Tween80 untuk membantu melarutkan ekstrak kloroform daun *Sansevieria trifasciata*.

### Tanda-tanda ketoksikan fisik dan perilaku

Hingga hari terakhir percobaan tidak ada tikus yang mati dan tidak dijumpai manifestasi klinis yang mengarah pada tanda-tanda ketoksikan akibat pemberian EKDJP. Kondisi fisik, aktivitas, perilaku, konsumsi makan dan minum, serta konsistensi feses tikus kelompok EKDJP relatif sama dengan tikus pada kelompok KONTROL dan TWEEN. Berat badan tikus pada ketiga kelompok dipertahankan pada kisaran *baseline*. Meskipun terjadi penurunan berat badan pada kelompok EKDJP namun tidak signifikan (**Gambar 1**). Sebaliknya, suhu badan tikus mengalami peningkatan hingga di atas kisaran *baseline*, namun karena terjadi pada ketiga kelompok, maka hal ini bukanlah efek toksik EKDJP (**Gambar 2**).



bahan, namun juga sangat dipengaruhi oleh teknis pemeliharaan (*husbandry*) sehingga selama percobaan, terutama uji toksisitas, harus diiringi dengan penerapan kondisi lingkungan

**Gambar 2.** Suhu badan tikus pada uji toksisitas *single-dose* ekstrak kloroform daun jeruk purut

dan metode pemeliharaan yang baik (NRC, 2011). Ukuran kandang juga mempengaruhi pola aktivitas, lokomosi, kemampuan membau, berdiri tegak, memanjat, menggali, minum, makan, duduk, dan pergerakan kumis tikus (Saibaba *et al.*, 1995). Selama percobaan tidak ada tikus yang mati atau sakit. Bahkan semua tikus memperlihatkan kondisi fisik yang baik serta perilaku yang normal. Tikus yang sakit dapat dideteksi dengan adanya akumulasi porfirin di sekitar mata dan hidung (bercak kemerahan). Tikus yang stres memiliki mata yang membengkak serta akumulasi lipid dan porfirin. Sekresi porfirin dan lipid lazim pada tikus yang sehat dan akan disebarkan ke sekitar wajah saat *grooming*. Tikus yang sakit atau stres tidak melakukan *grooming* dengan baik sehingga porfirin terakumulasi (Frohlich, 2020). Penampilan fisik dapat menggambarkan kondisi kesehatan tikus. Secara umum, tikus yang sehat menunjukkan postur yang baik dan tubuh yang bersih. Adanya gangguan kesehatan juga dapat ditandai dengan kepala tikus yang miring dan keseimbangan yang terganggu (Donnelly, 2004). Tikus pada semua kelompok terlihat bersih, postur tegak, tidak bungkuk, dan tidak ada gangguan keseimbangan atau berjalan miring. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan dan pemberian EKDJP tidak mengganggu fisiologis normal. Aktivitas dan perilaku hewan juga dapat menggambarkan kondisi kesehatannya. Tikus yang sehat akan aktif bergerak, menggigit, serta rutin melakukan *grooming* (Frohlich, 2020; Quesenberry & Boschert, 2020). Selama percobaan, semua tikus tampak aktif melakukan *grooming* sehingga tubuhnya selalu bersih. Semua tikus aktif bergerak, berdiri, memanjat, menggali, dan bermain-main, serta menunjukkan interaksi sosial. Selain itu, semua tikus makan dan minum secara normal, serta pengamatan feses menunjukkan tidak ada individu yang mengalami diare. Hal ini membuktikan bahwa pemberian EKDJP tidak menimbulkan efek negatif pada tikus sebagai hewan coba. Hasil ini serupa dengan uji toksisitas ekstrak daun jeruk *C. sudachi* (Bagchi *et al.*, 2016) dan *C. aurantium* (Deshmukh *et al.*, 2017).

### Profil hematologis

Hasil analisis profil eritrosit, leukosit, dan trombosit disajikan pada **Tabel 1, 2, dan 3.**

Interaksi antara zat asing yang masuk ke dalam tubuh (xenobiotik) dan sel/jaringan tubuh dapat menyebabkan perubahan fisiologis yang dapat diamati melalui analisis profil hematologis. Perubahan dapat terjadi secara cepat atau lambat tergantung dari sifat dan derajat ketoksikannya (Arika *et al.*, 2016). Secara alami, tubuh akan mempertahankan komposisi komponen darah agar tetap stabil (homeostasis). Oleh karena itu, peningkatan atau penurunan pada komponen darah dapat menjadi indikasi ketoksikan suatu bahan (Muriithi *et al.*, 2015).

Analisis profil eritrosit berguna untuk mendeteksi kejadian anemia, baik sebagai efek toksik secara langsung terhadap darah atau hemotoksitas (Fitria *et al.*, 2022b), atau efek tidak langsung sebagai respons fisiologis akibat keracunan (Debelo *et al.*, 2016). Berdasarkan **Tabel 1**, terjadi peningkatan dan penurunan (fluktuasi) pada semua nilai parameter eritrosit seiring waktu pada semua kelompok. Namun demikian, penurunan bersifat tidak signifikan sehingga tidak mengindikasikan anemia. Anemia ditandai dengan reduksi jumlah RBC, HGB, dan HCT yang signifikan (Turner *et al.*, 2022). Penetapan kejadian anemia juga ditentukan berdasarkan perhitungan indeks eritrosit (MCV, MCH, MCHC). MCV menggambarkan ukuran atau volume eritrosit, MCH mengkuantifikasi kadar hemoglobin per satuan eritrosit, dan MCHC mengindikasikan kadar hemoglobin per satuan volume (Sarma, 1990). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian EKDJP menurunkan nilai MCHC hingga di bawah *baseline* dan bersifat signifikan (**Tabel 1**). MCHC yang rendah menunjukkan abnormalitas pada proses sintesis hemoglobin dan kegagalan osmoregulasi darah (Arika *et al.*, 2016). Walaupun penurunan MCHC bersifat signifikan hingga di bawah *baseline*, tetapi masih berada dalam interval rujukan tikus Wistar yang dipelihara di *Animal House* Fakultas Biologi UGM, yaitu 32,40-38,80 g/dL, sehingga masih tergolong relatif aman (Fitria *et al.*, 2022a).

Analisis profil leukosit penting karena menggambarkan fungsi imun pada hewan. Selain berpotensi antigenik atau imunogenik, masuknya xenobiotik melalui jalur oral dapat memicu inflamasi dan merusak sel/jaringan tubuh (Kumar *et al.*, 2018). Kondisi ini dapat mengaktivasi jenis leukosit tertentu sehingga

**Tabel 1.** Profil eritrosit tikus pada uji toksisitas *single-dose* ekstrak kloroform daun jeruk purut

PARAMETER	HARI	KELOMPOK			BASELINE
		KONTROL	TWEEN	EKDJP	
RBC ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	0	6,35 $\pm$ 0,84	6,94 $\pm$ 0,11	7,09 $\pm$ 0,65	5,43 – 7,75
	7	7,25 $\pm$ 0,19	6,87 $\pm$ 0,09	7,17 $\pm$ 0,30	
	14	7,10 $\pm$ 0,14	7,15 $\pm$ 0,12	7,00 $\pm$ 0,15	
HCT (%)	0	34,45 $\pm$ 4,34	38,63 $\pm$ 0,17	38,50 $\pm$ 3,93	29,10 – 41,90
	7	39,23 $\pm$ 1,24	37,97 $\pm$ 0,86	39,33 $\pm$ 1,97	
	14	38,70 $\pm$ 0,62	40,20 $\pm$ 0,45	39,00 $\pm$ 1,42	
HGB (g/dL)	0	11,85 $\pm$ 1,52	13,33 $\pm$ 0,26	13,53 $\pm$ 1,30	9,80 – 14,50
	7	13,23 $\pm$ 0,29	13,20 $\pm$ 0,41	13,67 $\pm$ 0,54	
	14	12,97 $\pm$ 0,41	13,53 $\pm$ 0,21	13,10 $\pm$ 0,57	
MCV (fL)	0	54,20 $\pm$ 0,82	55,63 $\pm$ 0,87	54,23 $\pm$ 0,98	53,10 – 56,80
	7	54,13 $\pm$ 0,31	55,30 $\pm$ 0,57	54,87 $\pm$ 0,76	
	14	54,53 $\pm$ 0,21	56,23 $\pm$ 0,42	55,70 $\pm$ 0,91	
MCH (pg)	0	18,65 $\pm$ 0,54	19,17 $\pm$ 0,12	19,07 $\pm$ 0,45	18,00 – 19,70
	7	18,23 $\pm$ 0,12	19,23 $\pm$ 0,37	19,07 $\pm$ 0,33	
	14	18,23 $\pm$ 0,21	18,93 $\pm$ 0,25	18,70 $\pm$ 0,45	
MCHC (g/dL)	0	34,43 $\pm$ 0,53	34,53 $\pm$ 0,58	35,20 $\pm$ 0,42 <sup>a</sup>	33,70 – 35,50
	7	33,73 $\pm$ 0,40	34,73 $\pm$ 0,29	34,73 $\pm$ 0,45 <sup>ab</sup>	
	14	<b>33,50 <math>\pm</math> 0,54</b>	<b>33,67 <math>\pm</math> 0,54</b>	<b>33,57 <math>\pm</math> 0,29<sup>b</sup></b>	

- **KONTROL**= akuades volume 1 mL *per oral*, **TWEEN**= Tween80 5 % volume 1 mL *per oral*, **EKDJP**= ekstrak kloroform daun jeruk purut 2000 mg/kg berat badan, volume 1 mL *per oral*
- **RBC**= red blood cell, **HCT**= hematocrit, **HGB**= hemoglobin, **MCV**= mean corpuscular volume, **MCH**= mean corpuscular hemoglobin, **MCHC**= mean corpuscular hemoglobin concentration.
- Angka yang diikuti oleh huruf yang sama dalam satu kolom menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan ( $p > 0,05$ )
- Angka yang dicetak tebal menunjukkan nilai berada di luar *baseline* (lebih rendah atau lebih tinggi)

mengubah komposisinya di dalam tubuh, terutama neutrofil dan limfosit (Fitria *et al.*, 2022b). Berbeda dari manusia, tikus memiliki persentase limfosit yang lebih tinggi daripada neutrofil (Filho *et al.*, 2018). Neutrofil dan limfosit memiliki peran yang berbeda dalam sistem imun. Neutrofil adalah sel utama dalam respons imun bawaan, sedangkan limfosit adalah sel utama dalam respons imun adaptif. Peningkatan persentase neutrofil menjadi tanda adanya inflamasi akut, sebaliknya peningkatan persentase limfosit menjadi tanda adanya infeksi virus, leukemia, dan stimulasi respons imun kronis (O'Connell *et al.*, 2015). Seperti halnya pada profil eritrosit, nilai parameter leukosit pada semua kelompok mengalami fluktuasi sering

waktu. Hampir semua nilai dipertahankan dalam kisaran *baseline*, hanya beberapa yang berada di luar kisaran *baseline* dan bersifat tidak signifikan (**Tabel 2**). Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa pemberian EKDJJP tidak berdampak negatif terhadap kesehatan tikus sebagai hewan coba. Hasil ini serupa dengan uji toksisitas akut ekstrak daun jeruk *C. sinensis* (Tarkang *et al.*, 2012). Pada hari ke-14, persentase eosinofil, basofil, dan monosit (*mixed*) yang semula 0 % meningkat menjadi 5-7 %. Karena peningkatan terjadi pada semua kelompok, maka hal ini bukanlah efek toksik EKDJJP. Perhitungan N/L merupakan parameter yang valid untuk mengukur tingkat stres pada hewan laboratorium (Hickman, 2017). Hasil penelitian menunjukkan

bahwa semua nilai N/L berada dalam kisaran *baseline* yang berarti tidak ada hewan yang mengalami stres selama percobaan berlangsung, termasuk pemberian EKDJP tidak memicu stres.

**Tabel 2.** Profil leukosit tikus pada uji toksisitas *single-dose* ekstrak kloroform daun jeruk purut

PARAMETER	HARI	KELOMPOK			BASELINE
		KONTROL	TWEEN	EKDJP	
WBC ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0	8,13 $\pm$ 3,48	9,13 $\pm$ 1,33	8,30 $\pm$ 2,09	3,80 – 13,50
	7	8,13 $\pm$ 1,47	9,03 $\pm$ 0,82	9,57 $\pm$ 1,89	
	14	6,67 $\pm$ 1,18	9,47 $\pm$ 1,14	8,67 $\pm$ 1,77	
LYM (%)	0	63,90 $\pm$ 10,53	78,30 $\pm$ 3,00	73,27 $\pm$ 1,65	45,80 – 82,20
	7	58,00 $\pm$ 15,10	<b>83,33 <math>\pm</math> 2,35</b>	67,97 $\pm$ 3,56	
	14	64,13 $\pm$ 5,86	77,23 $\pm$ 2,75	67,03 $\pm$ 6,26	
NEU (%)	0	36,10 $\pm$ 10,53	21,70 $\pm$ 3,00	26,73 $\pm$ 1,65	17,80 – 54,20
	7	42,00 $\pm$ 15,10	<b>16,67 <math>\pm</math> 2,35</b>	32,03 $\pm$ 3,56	
	14	28,03 $\pm$ 5,04	22,77 $\pm$ 2,75	27,93 $\pm$ 0,98	
MXD (%)	0	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00
	7	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	
	14	<b>5,88 <math>\pm</math> 0,29</b>	<b>5,03 <math>\pm</math> 0,26</b>	<b>7,12 <math>\pm</math> 0,36</b>	
N/L	0	0,61 $\pm$ 0,33	0,28 $\pm$ 0,05	0,37 $\pm$ 0,03	0,03 – 1,18
	7	0,85 $\pm$ 0,52	0,20 $\pm$ 0,03	0,47 $\pm$ 0,07	
	14	0,45 $\pm$ 0,11	0,30 $\pm$ 0,04	0,42 $\pm$ 0,02	

- **KONTROL**= akuades volume 1 mL *per oral*, **TWEEN**= Tween80 5 % volume 1 mL *per oral*, **EKDJP**= ekstrak kloroform daun jeruk purut 2000 mg/kg berat badan, volume 1 mL *per oral*
- **WBC**= *white blood cell*, **LYM**= *lymphocyte*, **NEU**= *neutrophil*, **MXD**= *mixed (eosinophil, basophil, monocyte)*, **N/L**= *ratio of neutrophil and lymphocyte*.
- Angka yang diikuti oleh huruf yang sama dalam satu lajur dan kolom menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan ( $p > 0,05$ )
- Angka yang dicetak tebal menunjukkan nilai berada di luar *baseline* (lebih rendah atau lebih tinggi)

Pemeriksaan profil trombosit bermanfaat untuk diagnosis permasalahan perdarahan di dalam tubuh. Terdapat banyak faktor ekstrinsik yang dapat mempengaruhi jumlah trombosit, antara lain: teknis pra-analisis pada proses sampling darah dan selama analisis yaitu metode perhitungan yang digunakan (Baccini *et al.*, 2020). Analisis profil trombosit menunjukkan pola yang serupa dengan profil eritrosit dan leukosit, di mana nilai parameter trombosit pada

semua kelompok mengalami fluktuasi seiring waktu, namun tidak signifikan dan sebagian besar dipertahankan dalam kisaran *baseline*. Jika ada nilai yang berada di luar *baseline*, sifatnya tidak signifikan. (**Tabel 3**). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian EKDJP tidak mengganggu proses normal hemostasis, trombosis, dan penyembuhan luka, baik melalui perubahan jumlah, ukuran, maupun aktivitas trombosit.

**Tabel 3.** Profil trombosit tikus pada uji toksisitas *single-dose* ekstrak kloroform daun jeruk purut

PARAMETER	HARI	KELOMPOK			BASELINE
		KONTROL	TWEEN	EKDJP	
PLT ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0	842,25 $\pm$ 478,81	915,00 $\pm$ 173,77	864,00 $\pm$ 407,40	802,00 – 1322,00
	7	1062,67 $\pm$ 320,59	1136,33 $\pm$ 59,61	1216,00 $\pm$ 11,05	

	14	1337,67 ± 82,69	1188,33 ± 43,40	1100,00 ± 401,25	
<b>PCT (%)</b>	0	0,54 ± 0,29	0,59 ± 0,10	0,59 ± 0,28	
	7	0,68 ± 0,17	0,74 ± 0,02	0,80 ± 0,02	0,25 – 0,83
	14	<b>0,84 ± 0,03</b>	0,78 ± 0,02	0,72 ± 0,26	
<b>MPV (fL)</b>	0	6,55 ± 0,41	6,53 ± 0,17	6,83 ± 0,24	
	7	6,47 ± 0,47	6,50 ± 0,14	6,57 ± 0,25	5,90 – 7,00
	14	6,27 ± 0,29	6,53 ± 0,17	6,60 ± 0,16	
<b>PDW (fL)</b>	0	7,43 ± 0,69	7,33 ± 0,26	7,80 ± 0,36	
	7	7,33 ± 0,73	7,27 ± 0,12	7,47 ± 0,62	6,40 – 8,20
	14	7,03 ± 0,46	7,33 ± 0,24	7,50 ± 0,37	

- **KONTROL**= akuades volume 1 mL *per oral*, **TWEEN**= Tween80 5 % volume 1 mL *per oral*, **EKDJP**= ekstrak kloroform daun jeruk purut 2000 mg/kg berat badan, volume 1 mL *per oral*
- **PLT**= platelet or thrombocyte, **PCT**= plateletcrit, **MPV**= mean platelet volume, **PDW**= platelet distribution width.
- Angka yang diikuti oleh huruf yang sama dalam satu lajur dan kolom menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan ( $p > 0,05$ )
- Angka yang dicetak tebal menunjukkan nilai berada di luar *baseline* (lebih rendah atau lebih tinggi)

### Profil biokimia darah

Uji fungsi hati lazim dilakukan dengan menganalisis aktivitas ALT dan AST. Keduanya merupakan enzim sitosol yang akan keluar dari sel-sel hati yang rusak dan masuk ke sirkulasi darah. Oleh karena itu dapat digunakan sebagai indikator kesehatan hati (Lala *et al.*, 2022). Hasil menunjukkan bahwa nilai ALT dan AST pada semua kelompok berfluktuasi seiring waktu namun tidak signifikan dan berada dalam kisaran *baseline* (Tabel 4). Hal ini mengindikasikan bahwa pemberian EKDJP tidak mengganggu fungsi normal hati. Alih-alih bersifat hepatotoksik, beberapa ekstrak daun jeruk bahkan memiliki potensi hepatoprotektif atau mampu memperbaiki fungsi hati akibat stres oksidatif, seperti *C. maxima* (Abirami *et al.*,

2015), *C. aurantium* (Shu *et al.*, 2020), dan *C. grandis* (Anmol *et al.*, 2021).

Uji fungsi ginjal lazim dilakukan dengan mengukur kadar kreatinin dan BUN. Kedua limbah metabolisme ini aktif diekskresikan melalui urin jika ginjal berfungsi normal. Oleh karena itu, peningkatan kadar kreatinin dan BUN dalam darah menjadi indikator kerusakan fungsi ginjal (Dominguez *et al.*, 2018). Hasil pengukuran kreatinin dan BUN menunjukkan pola yang sama dengan ALT dan AST (Tabel 4), yang berarti pemberian EKDJP tidak mengganggu fungsi normal ginjal. Menurut Li *et al.* (2019) ekstrak daun *C. hystrix*, *C. aurantifolia*, *C. macrocarpa*, dan *C. sinensis* memiliki potensi nefroprotektif yakni mampu memperbaiki fungsi ginjal akibat stres oksidatif.

**Tabel 4.** Evaluasi fungsi hati dan ginjal tikus pada uji toksisitas *single-dose* ekstrak kloroform daun jeruk purut

PARAMETER	HARI	KELOMPOK			BASELINE
		KONTROL	TWEEN	CECHL	
<b>ALT (U/L)</b>	0	53,30 ± 17,18	23,80 ± 17,27	15,03 ± 2,00	
	7	52,55 ± 21,25	52,7 ± 2,78	56,67 ± 6,27	10,60 – 70,50
	14	44,93 ± 15,06	53,87 ± 5,91	67,97 ± 15,24	
<b>AST (U/L)</b>	0	98,43 ± 27,11	71,27 ± 32,21	94,73 ± 62,63	
	7	82,78 ± 12,34	82,20 ± 3,84	81,10 ± 15,22	31,60 – 172,20
	14	95,93 ± 16,90	90,40 ± 3,61	102,07 ± 25,06	

<b>CRE</b> (mg/dL)	0	0,48 ± 0,08	0,41 ± 0,07	0,27 ± 0,05	0,20 – 0,60
	7	0,41 ± 0,05	0,47 ± 0,03	0,40 ± 0,04	
	14	0,34 ± 0,04	0,38 ± 0,05	0,35 ± 0,03	
<b>BUN</b> (mg/dL)	0	23,37 ± 5,37	13,60 ± 1,46	12,31 ± 0,23	11,57 – 29,42
	7	19,77 ± 6,23	17,84 ± 3,55	15,80 ± 0,29	
	14	17,70 ± 6,90	15,43 ± 4,21	15,99 ± 0,62	

- **KONTROL**= akuades volume 1 mL *per oral*, **TWEEN**= Tween80 5 % volume 1 mL *per oral*, **EKDJP**= ekstrak kloroform daun jeruk purut 2000 mg/kg berat badan, volume 1 mL *per oral*
- **ALT**= alanine transaminase, **AST**= aspartate transaminase, **KRE**= creatinine, **BUN**= blood urea nitrogen.
- Angka yang diikuti oleh huruf yang sama dalam satu lajur dan kolom menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan ( $p > 0,05$ )

Pada kajian toksisitas, perlu diamati juga efek pemberian bahan uji terhadap kadar glukosa, kolesterol, dan trigliserida sehingga diperoleh informasi bahwa bahan uji tersebut tidak mengganggu metabolisme normal nutrisi. Gangguan metabolisme karbohidrat dan lipid berpotensi meningkatkan risiko kejadian sindrom metabolik terutama diabetes melitus dan dislipidemia (Fitria *et al.*, 2022a). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian EKDJP tidak berdampak negatif terhadap kadar glukosa, kolesterol, dan trigliserida. Terjadi fluktuasi nilai seiring waktu namun tidak signifikan dan nilai dipertahankan dalam kisaran *baseline* (Tabel 5). Umran *et al.* (2020) melaporkan bahwa ekstrak daun *C. hystrix*

efektif menurunkan kadar glukosa darah pada tikus diabetes (induksi streptozotisin) karena kandungan flavonoid yang tinggi. Flavonoid juga mengendalikan kadar kolesterol dan trigliserida sehingga dapat mencegah sindrom metabolik (Mahmoud *et al.*, 2019). Kombinasi ekstrak daun *C. sinensis* dan *C. paradisi* menurunkan kadar kolesterol pada tikus hiperlipidemia (Mallick & Khan, 2016). Ekstrak daun *C. limon* dilaporkan dapat menurunkan kadar glukosa darah, kolesterol, dan trigliserida pada tikus diabetes (induksi aloksan) (Halalsheh *et al.*, 2021). Oleh karena semua hasil pemeriksaan parameter darah menunjukkan tidak ada efek negatif yang bersifat signifikan akibat pemberian EKDJP, maka pengamatan histopatologis tidak perlu dilakukan.

**Tabel 5.** Profil metabolik tikus pada uji toksisitas *single-dose* ekstrak kloroform daun jeruk purut

PARAMETER	HARI	KELOMPOK			BASELINE
		KONTROL	TWEEN	EKDJP	
<b>GLU</b> (mg/dL)	0	170,50 ± 53,06	191,33 ± 45,21	163,67 ± 10,84	118,00 – 259,00
	7	169,67 ± 52,00	158,33 ± 23,04	146,00 ± 29,02	
	14	154,67 ± 31,38	200,33 ± 37,51	129,67 ± 20,53	
<b>CHOL</b> (mg/dL)	0	94,95 ± 23,10	66,27 ± 7,83	77,30 ± 12,45	60,00 – 131,00
	7	69,29 ± 10,74	60,43 ± 4,36	83,07 ± 14,09	
	14	65,21 ± 18,01	59,60 ± 6,00	69,93 ± 4,51	
<b>TG</b> (mg/dL)	0	110,50 ± 70,24	82,90 ± 19,08	71,10 ± 18,55	25,80 – 217,60
	7	69,08 ± 34,36	57,67 ± 30,69	50,57 ± 16,01	
	14	92,93 ± 51,40	71,80 ± 9,33	60,97 ± 13,47	

- **KONTROL**= akuades volume 1 mL *per oral*, **TWEEN**= Tween80 5 % volume 1 mL *per oral*, **EKDJP**= ekstrak kloroform daun jeruk purut 2000 mg/kg berat badan, volume 1 mL *per oral*
- **GLU**= glucose, **CHOL**= total cholesterol, **TG**= triglycerides.
- Angka yang diikuti oleh huruf yang sama dalam satu lajur dan kolom menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan ( $p > 0,05$ )

- Angka yang dicetak tebal menunjukkan nilai berada di luar *baseline* (lebih rendah atau lebih tinggi)

Berdasarkan protokol uji toksisitas oleh OECD, apabila dosis tertinggi suatu bahan/zat setelah diujicobakan kepada hewan ternyata tidak menimbulkan efek buruk yang mengarah kepada tanda-tanda ketoksikan, maka akan dikategorikan sebagai *no-observed-adverse-effect level* (NOAEL) pada dosis tersebut. Dosis ini selanjutnya digunakan untuk menentukan dosis pada uji toksisitas tahap subkronik-kronik, sekaligus untuk menentukan kriteria keamanan pada manusia dalam uji klinis (OECD, 2002). Selain standardisasi protokol uji toksisitas, klasifikasi atau kategorisasi bahan/zat kimia yang berpotensi toksik juga diperlukan. Dalam hal ini kami mengacu pada *The Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals* (GHS). GHS adalah sistem internasional yang dikembangkan oleh PBB untuk menstandarisasi dan menyelaraskan klasifikasi serta pelabelan bahan kimia secara global. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa pemberian EKDJP hingga dosis 2000 mg/kg berat badan tidak menunjukkan adanya tanda-tanda ketoksikan hingga rentang waktu 14 hari. Dengan demikian, berdasarkan OECD, maka EKDJP dinyatakan aman atau NOAEL pada dosis 2000 mg/kg berat badan. Sementara itu, berdasarkan kriteria GHS, maka EKDJP termasuk ke dalam Kategori 5, yaitu substansi yang relatif aman namun memiliki potensi toksik (toksisitas rendah). Oleh karena itu, uji toksisitas EKDJP perlu dilanjutkan ke tahap berikutnya, tidak hanya tingkat subkronik hingga kronik, namun juga untuk keamanan sistem reproduksi serta pertumbuhan dan perkembangan generasi keturunannya (United Nations, 2021).

## Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini maka dapat disimpulkan bahwa administrasi oral akut (*single-dose*) ekstrak kloroform daun jeruk purut hingga dosis 2000 mg/kg berat badan bersifat aman atau tidak toksik bagi tikus Wistar betina sebagai hewan coba. Dengan kata lain kategori ketoksikan ekstrak kloroform daun jeruk purut berdasarkan OECD adalah *no-observed-adverse-effect-level* (NOAEL) pada dosis 2000 mg/kg berat badan. Sementara itu, berdasarkan *Globally*

*Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* (GHS) maka ketoksikan ekstrak kloroform daun jeruk purut termasuk dalam Kategori 5.

## Kontribusi penulis

LF mendesain percobaan dan memantau jalannya penelitian; MIM, WBTS, dan ICPG melakukan percobaan dan pengambilan data; LF dan MIM menganalisis data dan menyusun manuskrip.

## Ucapan terima kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Pengelola *Animal House* Fakultas Biologi UGM, Laboratorium Fisiologi Hewan Fakultas Biologi UGM, dan Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT-UGM) yang telah memfasilitasi penelitian ini.

## Konflik kepentingan

Tidak ada potensi konflik kepentingan yang dilaporkan oleh penulis.

## Referensi

- Abirami, A., Nagarani, G. & Siddhuraju, P. (2015). Hepatoprotective Effect of Leaf Extracts from *Citrus hystrix* and *C. maxima* Against Paracetamol Induced Liver Injury in Rats. *Food Sciences and Human Wellness*, 4: 35-41. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fshw.2015.02.002>
- Anitasari, M.E., Widiyatmoko, Kholis, R.N., Septiani, A.D., Cendani, E.W., Febriani, F.S., Triwahyuningsih, E., Rahmawati, N.F., Wulandari, E., Pangestu, A., Wibowo, H.S., & Wirawan, F.A. (2023). Sosialisasi Pengelolaan Limbah Sampah Serta Pengenalan Bank Sampah Di Desa Pekutan. *Karunia: Jurnal Hasil Pengabdian Masyarakat Indonesia*, 2(1): 48-52. DOI: <https://dx.doi.org/10.58192/karunia.v2i1.554>
- Anmol, R.J., Mariam, S., Hiew, F.T., Han, W.C., Kwan, L.K., Wong, A.K.Y., Khan, F.,

- Sarker, M.M.R., Chan, S.Y., Kifli, N. & Ming, L.C. (2021). Phytochemical and Therapeutic Potential of *Citrus grandis* (L.) Osbeck: A Review. *Journal of Evidence-Based Integrative Medicine*, 2021: 26. DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/2515690x211043741>
- Arika, W.M., Nyamai, D.W., Musila, M.N., Ngugi, M.P. & Njagi, E.N.M. (2016). Hematological Markers of *In Vivo* Toxicity. *Journal of Hematology & Thromboembolic Diseases*, 4: 236. DOI: <http://dx.doi.org/10.4172/2329-8790.1000236>
- Bagchi, D., Shikishima, Y., Yoshinari, O., Shiojima, Y., Moriyama, H., Bagchi, M. & Deshmukh, N. (2016). Safety and Toxicological Evaluation of a Novel Citrus Sudachi Extract Powder. *Functional Foods in Health and Disease*, 6(10): 677-690. DOI: <http://dx.doi.org/10.31989/ffhd.v6i10.301>
- Baccini, V., Geneviève, F., Jacqmin, H., Chatelain, B., Girard, S., Wuilleme, S., Vedrenne, A., Guiheneuf, E., Toussaint-Hacquard, M., Everaere, F., Soulard, M., Lesesve, J. F. & Bardet, V. (2020). Platelet Counting: Ugly Traps and Good Advice. Proposals from the French-Speaking Cellular Hematology Group (GFHC). *Journal of Clinical Medicine*, 9(3): 808. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jcm9030808>
- Butryee, C., Sungpuag, P. & Chitchumroonchokchai, C. (2009). Effect of Processing on the Flavonoid Content and Antioxidant Capacity of *Citrus hystrix* Leaf. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(S2): 162-174. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/09637480903018816>
- Ching, L.S. & Mohamed, S. (2001). Alpha-Tocopherol Content in 62 Edible Tropical Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6): 3101-3105. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jf000891u>
- Debelo, N., Afework, M., Debella, A., Makonnen, E., Ergete, W. & Geleta, B. (2016). Assessment of Hematological, Biochemical and Histopathological Effects of Acute and Sub-Chronic Administration of the Aqueous Leaves Extract of *Thymus schimperi* in Rats. *Journal of Clinical Toxicology*, 6(2): 6-7. DOI: <http://dx.doi.org/10.4172/2161-0495.1000286>
- Deshmukh, N.S., Stohs, S.J., Magar, C.C. & Kadam, S.B. (2017). *Citrus aurantium* (bitter orange) Extract: Safety Assessment by Acute and 14-Day Oral Toxicity Studies in Rats and the Ames Test for Mutagenicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 90: 318-327. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.09.027>
- Dominguez, E.R., Contreras, Y.B., Luna, A.V., Sobac, R.D. & Landa, J.F.R. (2018). Alterations of Blood Chemistry, Hepatic and Renal Function, and Blood Cytometry in Acrylamide-Treated Rats. *Toxicology Reports*, 5: 1124-1128. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.11.006>
- Donnelly, T.M. (2004). Disease Problems of Small Rodents. Ferrets, Rabbits, and Rodents. *Elsevier Public Health Emergency Collection*, pp: 299-315. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B0-72-169377-6/50031-9>
- Fitria, L. Gunawan, I.C.P., Sanjaya, W.B.T. & Meidianing, M.I. (2022a). Single-Dose Acute Oral Toxicity Study of Chloroform Extract of Snake Plant (*Sansevieria trifasciata* Prain.) Leaf in Wistar Rats (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769). *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*, 7(1): 69389. DOI: <http://dx.doi.org/10.22146/jtbb.69389>
- Fitria, L. Sari, A.L., Handayani, L. & Widiyanto, S. (2022b). Hemotoxicity of Hairy Fig (*Ficus hispida* L.f.) Fruits on Male Wistar Rats (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769). *Jurnal Biodjati*, 7(2): 56-70. DOI: <http://dx.doi.org/10.15575/biodjati.v7i2.19241>
- Filho W.J., Lima, C.C., Paunksnis, M.R.R., Silva, A.A., Perilhao, M.S., Caldeira, M., Bocalini, D. & de Souza, R.R. (2018). Reference Database of Hematological Parameters for Growing and Aging Rats. *Aging Male*. 21(2): 145-148. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/13685538.2017.1350156>

- Frohlich, J. (2020). Rats and Mice. In: *Ferrets, Rabbits, and Rodents*. Carpenter, J. (Ed.), pp: 345-367. eBook ISBN: 9780323484343  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-48435-0.00025-3>
- Halalsheh, R.A., Khattab, A.S., Alzoughool, F.E. & Alkhateeb, H.H. (2021). Effects of *Citrus limon* Leaf Extract on Blood Glucose and Lipid Profile in Alloxan Monohydrate-Induced Diabetic Rats. *Gazzetta Medica Italiana*, 180(11): 730-737. DOI: <http://dx.doi.org/10.23736/S0393-3660.21.04569-1>
- Hickman, D.L. (2017). Evaluation of the Neutrophil:Lymphocyte Ratio as An Indicator of Chronic Distress in the Laboratory Mouse. *Laboratory Animal (NY)*, 46(7): 303-307. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/labam.1298>
- Jamilah, B., Gedi, M.A., Suhaila, M. & Zaidul, I.S.M. (2011). Phenolics in *Citrus hystrix* Leaves Obtained Using Supercritical Carbon Dioxide Extraction. *International Food Research Journal*, 18(3): 941-948.
- Kumar, S., Agrawal, S., Raisinghani, N. & Khan, S. (2018). Leukocyte Count: A Reliable Marker for the Severity of Organophosphate Intoxication. *Journal of Laboratory Physicians*, 10(2): 185-188. DOI: <http://dx.doi.org/10.4103/JLP.JLP.100.17>
- Lala, V., Zubair, M. & Minter, D.A. (2022). *Liver Function Tests*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482489/>
- Li, C.J, Barkath A.A., Abdullah M.Z., Lingkan, N., Ismail, N.H.M., Pauzi, S.H.M., Kamisah, Y., Qodriyah, H.M.S., Jaarin, K., Mohamed, S. & Masbah, N. (2019). The Effects of Citrus Leaf Extract on Renal Oxidative Stress, Renal Function and Histological Changes in Rats Fed with Heated Palm Oil. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 12(1): 363-373. DOI: <http://dx.doi.org/10.13005/bpj/1649>
- Lim, T. K. (2012). *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*. Volume 1: Fruits. Springer Dordrecht. eBook ISBN 978-90-481-8661-7. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/978-90-481-8661-7>
- Loh, F.S., Awang, R.M., Omar, D. & Rahmani, M. (2011). Insecticidal Properties of *Citrus hystrix* DC Leaves Essential Oil Against *Spodoptera litura* fabricius. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(16): 3739-3744.
- Mahjoub, R.C., Khemiss, M., Dhidah, M., Dellai, A., Bouraoui, A. & Khemiss, F. (2011). Chloroformic and Methanolic Extracts of *Olea europaea* L. Leaves Present Anti-Inflammatory and Analgesic Activities. *International Scholarly Research Notices*, Article ID 564972. DOI: <http://dx.doi.org/10.5402/2011/564972>
- Mahmoud, A.M., Hernandez Bautista, R.J., Sandhu, M.A. & Hussein, O.E. (2019). Beneficial Effects of Citrus Flavonoids on Cardiovascular and Metabolic Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019: 5484138. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2019/5484138>
- Mallick, N. & Khan, R.A. (2016). Antihyperlipidemic Effects of *Citrus sinensis*, *Citrus paradisi*, and Their Combinations. *Journal of Pharmacy BioAllied Sciences*, 8(2): 112-118. DOI: <http://dx.doi.org/10.4103/0975-7406.171727>
- Miean, K.H. & Mohamed, S. (2001). Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) Content of Edible Tropical Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 3106-3112. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jf000892m>
- Moser, P. (2019). Out of Control? Managing Baseline Variability in Experimental Studies with Control Groups. In: Bepalov, A., Michel, M., & Steckler, T. (eds). *Good Research Practice in Non-Clinical Pharmacology and Biomedicine. Handbook of Experimental Pharmacology*, 257: 101-117. Springer, Cham. [http://dx.doi.org/10.1007/164\\_2019\\_280](http://dx.doi.org/10.1007/164_2019_280)
- Murakami, A., Nakamura, Y., Koshimizu, K., & Ohigashi, H. (1995). Glyceroglycolipids from *Citrus hystrix*, A traditional Herb in Thailand, Potently Inhibit the Tumor Promoting Activity of 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate in Mouse Skin. *Journal of Agricultural and Food*

- Chemistry*, 43: 2779-2783.  
<http://dx.doi.org/10.1021/jf00058a043>
- Muriithi, N.J., Maina, G.S., Maina, M.B., Kiambi, M.J., Kelvin, J.K., Umar, A., John, M.K., Ann, N.W., Plero, N.M. & Eliud, N.N.M. (2015). Determination of Hematological Effects of Methanolic Leaf Extract of *Vernonia lasiopus* in Normal Mice. *Journal of Blood & Lymph*, 5(3): 1000139. DOI: <http://dx.doi.org/10.4172/2165-7831.1000139>
- Nasution, S.L.R., Nasution, A.N. & Nasution, S.W. (2021). An Experiment for Extracted *Citrus hystrix* Leaf Effectiveness on *Pityrosporum ovale* Fungi Growth. *Proceedings of the International Conference on Health Informatics, Medical, Biological Engineering, and Pharmaceutical (HIMBEP 2020)*. Medan, Indonesia. Scitepress, pp. 291-295. DOI: <http://dx.doi.org/10.5220/0010352902910295>
- Neff, E.P. (2021). Rats on the Rise. *Lab Animal*, 50: 205-208. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41684-021-00812-0>
- Norecopa (2009)
- Norecopa. (2009). *Fasting in Rodents*. Norecopa Veterinarinstitutet. Oslo. Pp. 1-11. <https://norecopa.no/media/6351/food-deprivation.pdf>
- NRC. (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8<sup>th</sup> edition. Washington DC: National Research Council. The National Academies Press. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/>
- O'Connell, K.E., Mikkola, A.M., Stepanek, A.M., Vernet, A., Hall, C.D., Sun, C.C., Yildirim, E., Staropoli, J.F., Lee, J.T. & Brown, D.E. (2015). Practical Murine Hematopathology: A Comparative Review and Implications for Research. *Comparative Medicine*, 65(2): 96-113.
- Oduola, T., Bello, I., Adeosun, G., Ademosun, A.W., Rahean, G. & Avwioro, G. (2010). Hepatotoxicity and Nephrotoxicity Evaluation in Wistar Albino Rats Exposed to *Morinda lucida* Leaf Extract. *North American Journal of Medical Sciences*, 2(5): 230-231. DOI: <http://dx.doi.org/10.4297/najms.2010.2230>
- OECD. (2002). *Test No. 420: Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. DOI: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264070943-en>
- OECD. (2022). The OECD and Southeast Asia, Key Partner: Indonesia. <http://www.oecd.org/southeast-asia/countries/indonesia/> Diakses pada 13 November 2022.
- Park, E., Cho, M., & Ki, C.S. (2009). Correct Use of Repeated Measures Analysis of Variance. *The Korean Journal of Laboratory Medicine*, 29(1): 1-9. <http://dx.doi.org/10.3343/kjlm.2009.29.1.1>
- Quesenberry, K.E. & Boschert, K.R. (2022). Providing a Home for a Rat. *MSD Manual Veterinary Manual*. <http://www.msdevetmanual.com/all-other-pets/rats/providing-a-home-for-a-rat>
- Saibaba, P., Sales, G.D., Stodulski, G. & Hau, J. (1996). Behaviour of Rats in Their Home Cages: Daytime Variations and Effects of Routine Husbandry Procedures Analysed by Time Sampling Techniques. *Laboratory Animals*, 30: 13-21. DOI: <http://dx.doi.org/10.1258/002367796780744875>
- Saptanti, K., Nisa, F., Pamduji, S. and Wonorahardjo, S. (2021). The Effect of Kaffir Lime (*Citrus hystrix*) Leaves Extract in Chloroform as Ladybug (*Epilachna sparsa*) Antifeedant, A Preliminary Study. *Proceedings of the International Conference on Life Sciences and Technology*. Malang, Indonesia. AIP Conference Proceedings 2353, 030091, pp. 1-6. DOI: <http://dx.doi.org/10.1063/5.0052801>
- Sarma, P.R. (1990). Red Cell Indices. In: *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*, Walker, H.K., Hall, W.D. & Hurst, J.W. (Eds.). Boston: Butterworth-Heinemann, Boston, MA. ISBN-10: 0-409-90077-X
- Shu, Y., He, D., Li, W., Wang, M., Zhao, S., Liu, L., Cao, Z., Liu, R., Huang, Y., Li, H., Yang,

- X., Lu, C. & Liu, Y. (2020). Hepatoprotective Effect of *Citrus aurantium* L. Against APAP-Induced Liver Injury by Regulating Liver Lipid Metabolism and Apoptosis. *International Journal of Biological Sciences*, 16(5): 752-765. DOI: <http://dx.doi.org/10.7150/ijbs.40612>
- Svendsen O, Ahnfelt-Rønne I, Vanhoutte P. (2006). In Vivo Pharmacology Study in Drug Discovery and Development. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 99(2): 89-90. DOI: [http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-7843.2006.pto\\_292.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-7843.2006.pto_292.x)
- Tarkang, P.A., Agbor, G.A., Armelle, T.D., Yamthe, T.L.R., David, K. & Ngadena Y.S.M. (2012). Acute and Sub-Chronic Toxicity Studies of the Aqueous and Ethanol Leaf Extracts of *Citrus sinensis* (Linnaeus) Osbeck (pro sp.) in Wistar Rats. *Der Pharmacia Lettre*, 4(5): 1619-1629.
- Turner, J., Parsi, M. & Badireddy, M. (2022). *Anemia*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499994/>
- Turner, P.V., Vaughn, E., Sunohara-Neilson, J., Ovari, J. & Leri, F. (2012). Oral Gavage in Rats: Animal Welfare Evaluation. *Journal of the American Association of Laboratory Animal Science*, 51(1): 25-30.
- Umran, N.S.S., Mohamed, S., Lau, S.F. & Mohd Ishak, N.I. (2020). *Citrus hystrix* Leaf Extract Attenuated Diabetic-Cataract in STZ-Rats. *Journal of Food Biochemistry*, 44(8): e13258. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jfbc.13258>
- United Nations. (2021). *Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS)*. The Purple Book. 9<sup>th</sup> revised edition. United Nations, New York and Geneva.
- Varma, R.K., Kaushal, R., Junnarkar, A.Y., Thomas, G.P., Naidu, M.U., Singh, P.P., Tripathi, R.M. & Shridhar, D.R. (1985). Polysorbate 80: A Pharmacological Study. *Arzneimittelforschung*, 35(5): 804-808.