

Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimumsanctum*) Diukur dari Nilai LD₅₀ dan Histopatologi Ginjal

Acute Toxicity Tests of Basil Leaves (*Ocimumsanctum*) Ethanolic Extract Determined By LD₅₀ and Renal Histopathology

Cholis Abrori¹, Khana Nurfadhila², Elly Nurus Sakinah¹

¹Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran Universitas Jember

²Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Jalan Kalimantan No.37, Jember, Indonesia, 68121

e-mail korespondensi: cholisabrori.fk@unej.ac.id

Abstrak

Daun kemangi banyak digunakan sebagai obat herbal dan telah terbukti memiliki banyak manfaat karena kandungan fitonutrien termasuk antioksidan, namun pada dosis tertentu suatu senyawa tetap memiliki probabilitas dalam menyebabkan toksisitas dalam tubuh. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui toksisitas akut ekstrak etanol daun kemangi dilihat dari nilai kisaran LD₅₀ dan gambaran histopatologi ginjal yang merupakan organ vital target toksisitas dalam tubuh. Uji toksisitas akut oral dilakukan dengan metode OECD 420 *fix dose procedure* dengan sekelompok mencit Balb/c betina 5 ekor diberikan dosis bertingkat menggunakan metode *fix doses*. Dosis awal 2000 mg/KgBB dipilih dari uji pendahuluan sebagai dosis yang dapat menimbulkan gejala toksisitas ringan tetapi tidak menimbulkan kematian. Terdapat 2 kelompok pada penelitian yakni perlakuan dengan dosis pada nilai LD₅₀ dan kontrol. Hasil penelitian didapatkan kisaran nilai LD₅₀ ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimumsanctum*) > 2000 mg/KgBB. Rerata skor histopatologi ginjal antara kelompok kontrol dan perlakuan berbeda bermakna dengan uji *Mann-Whitney* didapatkan p=0,018. Ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) termasuk kategori senyawa tidak toksik namun terdapat perubahan gambaran histopatologi ginjal mencit berupa lesi fokal setelah pajanan akut pada dosis tertinggi pada metode OECD 420.

Kata kunci: uji toksisitas akut, histopatologi ginjal, daun kemangi

Abstract

*Basil leaves are widely used as herbal remedies and have proven many benefits because the content of phytonutrients includes antioxidants, but at certain doses a compound retains a probability of causing toxicity in the body. This study aims to determine the acute toxicity of ethanolic extract of basil leaves seen from the value of LD₅₀ range and renal histopathology which is the vital organ of the target of toxicity in the body. The method of acute oral toxicity test was OECD 420 fix dose procedure method with a group of 5 Balb/c female mice given a multilevel dosage. The initial dose is 2000 mg/Kg.b.w selected on a sighting study as a dose that may cause mild toxicity symptoms but does not cause death. There are 2 groups consist of treatment with dose at LD₅₀ value and control. The result of this research showed that LD₅₀ value of ethanol extract of *Ocimum sanctum* > 2000 mg/Kg.b.w. The mean renal histopathologic scores between the control and the treatment were significantly different by The Mann-Whitney test with significance value of p=0.018. *Ocimum sanctum* ethanolic extract is classified as non-toxic compounds but there was a change in renal histopathology of mice in the form of focal lesions after acute exposure at highest dose of OECD 420 method.*

Keywords: acute toxicity test, renal histopathology, basil leaves

Pendahuluan

Penggunaan tanaman sebagai obat diyakini oleh banyak masyarakat di Indonesia, salah satunya adalah daun kemangi (*Ocimum sanctum*). Kemangi termasuk dalam famili *Lamiaceae* yang populer sebagai tanaman obat dan memiliki banyak kandungan antioksidan dan fitonutrien. Ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) terbukti sebagai hepatoprotektor pada mencit yang diinduksi isoniazid (Safitri, 2016), ekstrak *aqueous Ocimum sanctum* berfungsi menurunkan serum glukosa, total kolesterol, trigliserida, kreatinin, SGOT, SGPT, ALP, dan kadar bilirubin pada tikus diabetik (Jayant and Srivastava, 2016) dan potensi antioksidan daun kemangi (*Ocimum sanctum*) bermanfaat pada kerusakan jaringan saraf (Mundey et al., 2013). Ketiga penelitian ini menunjukkan manfaat dari ekstrak daun kemangi karena kandungan flavonoid, fenolik, dan eugenolnya sebagai antioksidan.

Pada dosis tertentu suatu senyawa tetap memiliki probabilitas toksisitas dalam tubuh. Uji toksisitas akut merupakan salah satu evaluasi toksikologi dari ekstrak obat herbal yang dilakukan sebelum uji klinis (Sharwan et al., 2015). Nilai potensi toksisitas akut yang diukur dari besaran *lethal dose* 50 (LD₅₀) merupakan parameter yang digunakan pada uji toksisitas akut oral. Selain itu, uji toksisitas dapat dilihat dari perubahan struktur maupun fungsi organ vital seperti ginjal yang merupakan tempat ekskresi senyawa asing seperti obat atau senyawa toksin yang masuk dalam tubuh. Ginjal merupakan salah satu organ yang rentan terhadap senyawa yang melewatinya karena nefron berfungsi mengonsentrasikan bahan toksik sehingga terjadi peningkatan kadar paparan bahan toksik di dalam tubulus (Hodgson, 2004).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui toksisitas akut ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) yang diukur dari kisaran nilai LD₅₀ dan perubahan gambaran histopatologi ginjal mencit. Dengan uji toksisitas ini diharapkan dapat diketahui keamanan suatu senyawa dan selanjutnya apabila diperoleh hasil yang aman dapat dilanjutkan dengan uji klinis, sehingga ekstrak daun kemangi dapat dijadikan obat yang digunakan masyarakat secara luas.

Metode Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah *quasi experimental* dengan rancangan penelitian *post test non-equivalent control group design*, bertujuan

untuk mengetahui toksisitas akut ekstrak etanol daun kemangi dengan mengukur kisaran LD₅₀ dan gambaran histopatologi ginjal pada mencit. Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Jember, dan Laboratorium Patologi Anatomi RSD dr. Soebandi. Jumlah sampel yang digunakan sebanyak 12 mencit strain Balb/c dengan usia 8-12 minggu dengan variasi berat badan 16-26 gram dan diadaptasi selama 5 hari.

Pembuatan ekstrak daun kemangi dilakukan dengan metode maserasi. Daun kemangi dicuci bersih dengan air, kemudian dikeringkan dan dijadikan serbuk. Serbuk kering daun kemangi sebanyak 400 gram dimasukkan ke dalam toples kaca, setelah itu ditambahkan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:7,5 yang didiamkan selama 72 jam. Pembuatan ekstrak daun kemangi dilakukan dengan metode maserasi. Daun kemangi dicuci bersih dengan air, kemudian dikeringkan dan dijadikan serbuk sebanyak ± 400 gram, kemudian ditambahkan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:7,5 dan didiamkan selama 72 jam. Filtrat disaring dan dilakukan evaporasi dengan menggunakan *rotatory evaporator* dengan suhu 50^o C hingga pelarut etanol 70% menguap dan didapatkan hasil ekstrak semi kental etanol daun kemangi. Sebelum diberikan kepada mencit, ekstrak etanol daun kemangi dilarutkan terlebih dahulu ke dalam *tween* 80 sebanyak 0,01 mL/20 gram mencit, kemudian diencerkan dengan akuades hingga volume menjadi 0,5 mL.

Uji toksisitas akut oral pada penelitian ini menggunakan metode OECD 420 *fix dose procedure* yang memiliki 3 jenis perlakuan yaitu uji pendahuluan, *limit test* (uji pembatasan), dan *main test* (uji utama). Tujuan dari uji pendahuluan adalah mencari dosis awal yang sesuai untuk uji utama dengan 1 ekor mencit. Berdasarkan OECD 420, dosis awal pada uji pendahuluan dapat dipilih dari tingkatan *fix dose* yaitu 5, 50, 300, dan 2000 mg/KgBB sebagai dosis yang diharapkan dapat menimbulkan efek toksik. Sampai saat ini belum ada penelitian yang menunjukkan LD₅₀ dari ekstrak etanol 70% daun kemangi, sehingga untuk tahap awal dalam rangka mencari kisaran LD₅₀ dianjurkan dimulai pada dosis 300 mg/KgBB. Dosis tersebut dapat diturunkan apabila terdapat kematian dan dinaikkan apabila tidak terdapat bukti toksisitas atau

kematian. Uji pendahuluan dihentikan apabila terbukti adanya bukti toksisitas berupa perubahan aktivitas otonom hewan uji seperti berjalan menggunakan perut, diare, *discharge* dari hidung, menyiksa diri sendiri, perdarahan di orifisium, atau tidak terdapat bukti toksisitas pada dosis 2000 mg/KgBB, sehingga dapat ditentukan dosis yang digunakan pada uji utama sesuai dengan prosedur OECD (OECD, 2001).

Limit test atau uji pembatasan digunakan apabila peneliti telah memiliki informasi yang menunjukkan bahwa bahan uji cenderung tidak toksik atau memiliki toksisitas hanya melebihi batas dosis yang telah ditentukan. Uji pembatasan dilakukan apabila nilai LD₅₀ senyawa yang diharapkan melebihi 2000 mg/KgBB atau dalam kisaran 2000-5000 mg/KgBB. Kriteria tersebut yakni, senyawa yang dimaksud merupakan senyawa uji termasuk klasifikasi GHS 5 yang mempunyai bahaya toksisitas akut yang relatif rendah namun dalam keadaan tertentu dapat menimbulkan bahaya bagi populasi yang rentan. Adanya kebutuhan untuk melindungi kesejahteraan hewan, pengujian pada 5000 mg/KgBB hanya boleh dipertimbangkan bila ada kemungkinan kuat bahwa hasil uji akan memiliki relevansi langsung untuk melindungi kesehatan hewan atau manusia (OECD, 2001).

Uji utama digunakan untuk melakukan uji yang sebenarnya, bertujuan mengetahui kisaran nilai LD₅₀ suatu senyawa dengan 5 mencit pada setiap tingkatan dosis yaitu 5, 50, 300, dan 2000 mg/KgBB ekstrak etanol daun kemangi. Dosis awal yang digunakan telah ditentukan pada uji pendahuluan, kemudian dilakukan pengamatan secara intensif setiap 30 menit selama 4 jam pertama, setiap 4 jam selama 24 jam dan sehari sekali selama 14 hari. Apabila tidak terdapat kematian maka diberikan dosis satu tingkat lebih tinggi dari dosis awal. Apabila didapatkan ≥ 2 hewan uji mati maka dosis diturunkan satu tingkat lebih rendah dari dosis awal. Apabila terdapat ≥ 1 bukti toksisitas dan/atau ≤ 1 kematian hewan uji maka dapat langsung ditentukan kisaran nilai LD₅₀ (OECD, 2001). Pemberian ekstrak etanol daun kemangi pada uji utama ini dilakukan bersama dengan kelompok kontrol masing-masing terdiri dari 5 ekor mencit selama 14 hari.

Mencit diterminasi pada hari ke-14 dan diambil organ ginjal untuk diproses menjadi preparat histopatologi yang dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi RSD dr. Soebandi. Proses pembuatan preparat histopatologi meliputi proses

dehidrasi, *clearing*, *embedding*, pemotongan jaringan, dan pewarnaan hematoksin eosin (H&E). Pengamatan dilakukan dengan metode *double blinding*. Preparat histopatologi ginjal diamati di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 100 kali untuk melihat dilatasi tubulus proksimal kemudian 400 kali untuk melihat degenerasi tubulus dan nekrosis sel pada 5 lapang pandang yang diambil dari keempat sudut dan bagian tengah preparat (Satyatami, 2014). Skoring gambaran histopatologi ginjal dilakukan dengan menilai nekrosis inti, degenerasi tubulus, dilatasi tubulus proksimal dengan skor 0 untuk histologi ginjal normal, 1 untuk lesi fokal, dan 2 untuk lesi difus (Suhita *et al.*, 2013). Hasil skoring dibandingkan antara kedua kelompok kontrol dan perlakuan.

Hasil Penelitian

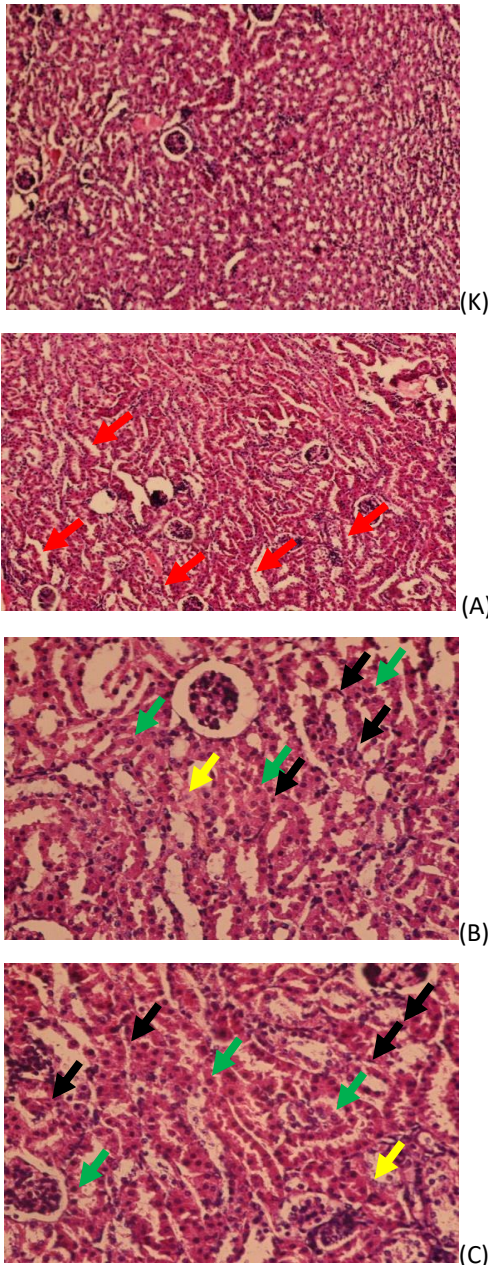
Hasil uji pendahuluan pada dosis 300 dan 2000 mg/KgBB tidak ditemukan adanya bukti toksisitas maupun kematian mencit, sehingga dosis awal untuk dilakukan uji utama adalah 2000 mg/KgBB. Pada uji utama didapatkan mencit bertahan hidup dan tidak terdapat bukti toksisitas pada dosis 2000 mg/KgBB yang diberikan selama 14 hari. Kisaran nilai LD₅₀ ekstrak etanol daun kemangi dapat diperkirakan pada dosis > 2000 mg/KgBB.

Gambar histopatologi ginjal secara umum dapat dilihat pada Gambar 1. Tampak gambaran sel normal pada panah hijau, nekrosis inti pada panah hitam, degenerasi tubulus pada panah kuning, dan dilatasi tubulus proksimal pada panah merah. Gambaran histopatologi ginjal pada kelompok kontrol tidak ditemukan kelainan dengan skor $0,00 \pm 0$, sedangkan pada kelompok perlakuan didapatkan perubahan patologis dengan rerata skor $0,74 \pm 0,42$. Hasil uji *Mann-Whitney* rerata skor histopatologi ginjal antara dua kelompok berbeda bermakna dengan nilai $p=0,018$.

Pembahasan

Penggunaan obat herbal yang aman perlu dilengkapi dengan data dosis standar serta bukti ilmiah bahwa status toksisitas bahan tersebut tidak menimbulkan kekhawatiran. Oleh karena itu, penilaian keamanan dan toksisitas obat herbal sebelum dikonsumsi oleh manusia adalah hal yang sangat dibutuhkan (Raina *et al.*, 2015). Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kisaran nilai LD₅₀ ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) yakni > 2000 mg/KgBB, yang termasuk dalam kategori 5 GHS dengan

pernyataan ketoksikan bahwa senyawa tidak toksik dan mungkin berbahaya bila tertelan. Hal tersebut dibuktikan dengan tidak adanya kematian dan bukti toksik hewan uji pada dosis 2000 mg/KgBB. Sadashiv (2010) membuktikan bahwa bubuk daun *Ocimum sanctum* pada dosis tertinggi yakni 7 g/KgBB tidak memiliki efek toksik yang signifikan pada mencit.



Gambar 1. Gambaran histopatologi ginjal pada pewarnaan H&E. Kelompok kontrol dan perlakuan dengan perbesaran 100 kali (K) dan (A), kelompok perlakuan perbesaran 400 kali (B) dan (C).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Rahman (2011), pemberian ekstrak *aqueous* daun kemangi (*Ocimum sanctum*) tidak menimbulkan gejala toksisitas akut pada dosis 5 g/KgBB maupun ekstrak alkohol pada dosis 4 g/KgBB. Selain itu, penelitian Gautam and Goel (2014) yang melakukan uji toksisitas akut selama periode 14 hari, menunjukkan mencit bertahan hidup pada dosis 2000 mg/KgBB. Pada penelitian tersebut juga dilakukan uji toksisitas subakut selama 28 hari, ekstrak etanol 50% dari *Ocimum sanctum* pada dosis 200, 400, dan 800 mg/KgBB tidak menimbulkan kematian pada mencit jantan dan betina. Dari ketiga penelitian tersebut diketahui bahwa baik dalam bentuk bubuk, ekstrak *aqueous*, ekstrak alkohol, maupun ekstrak etanol 50% daun kemangi tidak menunjukkan toksisitas.

Penelitian ini menggunakan ekstrak etanol 70% daun kemangi yang diketahui merupakan pelarut ekstrak yang menghasilkan senyawa antioksidan dalam tanaman yang lebih baik dibandingkan dengan bubuk, ekstrak *aqueous*, ekstrak alkohol maupun ekstrak etanol 50% (Fathurrachman, 2014). Jadi pada penelitian ini diketahui keamanan ekstrak etanol daun kemangi dengan aktivitas antioksidan tertinggi dibandingkan penelitian-penelitian sebelumnya.

Masyarakat mengonsumsi kemangi sebagai lalap sehari-hari kurang lebih 25 gram (Syamsuhidayat and Hutapea, 1991). Daun kemangi sebanyak 25 gram bila dibuat ekstrak dengan pelarut etanol sesuai yang dilakukan pada penelitian ini akan menghasilkan 3,163 gram ekstrak semikental. Jika rata-rata berat badan manusia adalah 70 Kg, maka penggunaan daun kemangi setara dengan 45,18 mg/KgBB ekstrak etanol dan penggunaan tersebut aman karena kisaran LD₅₀ ekstrak etanol daun kemangi > 2000 mg/KgBB.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Safitri (2016), didapatkan dosis efektif dari ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) sebagai hepatoprotektor pada kadar MDA hati mencit yang diinduksi isoniazid adalah 14,568 mg/20grBB atau setara dengan 728,4 mg/KgBB. Penggunaan ekstrak daun kemangi juga memberikan proteksi terhadap cedera oksidatif pada tikus yang diberi racun arsen sampai kadar antioksidan normal yaitu dengan dosis 100 mg/kgBB (Munday *et al.*, 2013). Pada penelitian Shetty (2008), ekstrak etanol daun kemangi memiliki senyawa antioksidan yang dapat mempercepat penyembuhan luka efektif pada dosis 800 mg/KgBB. Dari tiga penelitian tersebut menunjukkan manfaat

ekstrak daun kemangi dengan aktivitas antioksidan memiliki dosis di bawah kisaran nilai LD₅₀ yang didapatkan pada penelitian ini. Rentang dosis efektif dan dosis letal ekstrak daun kemangi yang besar ini menunjukkan indeks terapi dari ekstrak daun kemangi yang lebar, sehingga bahan ini aman digunakan.

Hasil gambaran histopatologi pada penelitian ini berbeda antara kelompok kontrol dan perlakuan. Perbedaan ini terletak pada kelompok kontrol semua sampel tidak terdapat perubahan histopatologi ginjal, sedangkan pada kelompok perlakuan terdapat perubahan histopatologi ginjal pada beberapa sampel meskipun dengan skor yang rendah. Penelitian Gautam *and* Goel (2014) juga menunjukkan terdapat perubahan pada histologi ginjal serta kadar serum kreatinin pada mencit yang diberi ekstrak etanol 50% daun kemangi pada dosis 200, 600, dan 2000 mg/KgBB. Perubahan gambaran histopatologi ginjal pada paparan ekstrak etanol daun kemangi dapat disebabkan oleh senyawa fitokimia antara lain flavonoid. Meskipun flavonoid mempunyai aktivitas antioksidan dan efek yang bermanfaat karena mekanisme antioksidan, pada keadaan tertentu flavonoid juga dapat menjadi prooksidan (Shirzadetal., 2011). Flavonoid merupakan salah satu polifenol yang terdapat pada tanaman obat dalam konsentrasi tinggi dimetabolisme pada fase 1 (sitokrom P450) dan enzim fase 2 (sulfonil transferase, *glucuronyl transferase* dan *glutathione transferase*) menghasilkan baik metabolit akhir maupun sekunder serta *reactive oxygen species* (ROS) sebagai prooksidan (Kopaei *and* Baradaran, 2013).

Antioksidan yang terdapat pada ekstrak dengan konsentrasi tinggi telah ditemukan dapat menyebabkan sitotoksik dengan cara menginduksi stres oksidatif yang parah (Kopaei, 2012). Selain mekanisme perubahan antioksidan flavonoid menjadi prooksidan disebabkan oleh konsentrasi yang tinggi, ion logam di dalam tubuh seperti Fe juga berperan dalam proses tersebut. Ekstrak bubuk daun kemangi memiliki kandungan kuersetin sebanyak 0,85 mg/g, dan telah dibuktikan bahwa kuersetin yang merupakan salah satu dari *ortho* di/trihidroksifenolik menunjukkan aktivitas prooksidan yang poten dibandingkan fenolik lain. Perubahan ini disebabkan oleh adanya transisi ion logam terutama Fe(III) dan Cu(II) dalam tubuh (Rameshthangam *and* Chitra, 2016; Eghbaliferiz, 2016). Hal ini juga terjadi pada penelitian *in vitro* dan *in vivo* dari polifenol yang didapatkan dari anggur,

bahwa polifenol dari anggur mempunyai aktivitas prooksidan selain aktivitas antioksidan (Cotorasetal, 2014). Prooksidan menyebabkan terjadinya stres oksidatif dan dapat berlanjut menyebabkan disfungsi mitokondria sehingga terjadi nekrosis sel tubulus ginjal (Small *et al.*, 2012). Di sisi lain peningkatan radikal bebas dapat menyebabkan disfungsi endotel yang akan menyebabkan degenerasi epitel tubulus dan dilatasi tubulus (Putri *and* Thaha, 2014). Hasil-hasil penelitian tersebut mendukung terjadinya perubahan struktur histologi ginjal mencit setelah diberikan paparan ekstrak etanol daun kemangi pada dosis 2000 mg/KgBB.

Pada penelitian ini tidak dilakukan uji pembatasan dengan dosis 5000 mg/KgBB karena pada dosis 2000 mg/KgBB telah didapatkan perubahan histopatologi ginjal. Dalam rangka melindungi kesejahteraan hewan (*animal welfare*), pengujian pada dosis 5000 mg/KgBB hanya dipertimbangkan bila ada kemungkinan kuat bahwa hasil uji akan memiliki relevansi langsung untuk melindungi kesehatan hewan atau manusia. Selain itu, sampai saat ini belum terdapat dosis terapi ekstrak etanol daun kemangi yang mendekati 2000 mg/KgBB dalam pemanfaatan sebagai antioksidan atau obat herbal (Jamshidi *and* Cohen, 2017). Pengujian ekstrak dengan dosis yang lebih tinggi dikhawatirkan dapat menimbulkan kerusakan lebih lanjut, seperti pada penelitian yang dilakukan oleh Beke (2015), menunjukkan bahwa peningkatan dosis pemberian ekstrak etanol putri malu (*Mimosa pudica* L.) dapat meningkatkan jumlah sel yang mengalami nekrosis pada tubulus proksimal mencit *Swiss Webster* jantan. Meskipun ekstrak daun kemangi ini tidak toksik dan aman, penggunaan ekstrak daun kemangi harus tetap berhati-hati pada penggunaan dosis tinggi, karena pada dosis 2000 mg/KgBB telah memperlihatkan perubahan struktur histologi dari ginjal.

Kesimpulan

Ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) mempunyai kisaran LD₅₀ > 2000 mg/KgBB, sehingga termasuk dalam kategori senyawa yang tidak toksik. Pada dosis 2000 mg/KgBB yang merupakan dosis tertinggi pada metode OECD 420 sudah terdapat perubahan gambaran histopatologi ginjal mencit berupa lesi fokal setelah pajanan akut ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*). Penelitian lebih lanjut mengenai uji toksisitas subakut oral, uji toksisitas subkronis oral, dan uji toksisitas kronis oral

ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) diperlukan agar dapat dilanjutkan ke uji klinis.

Daftar Pustaka

- Beke BMA. 2015. Uji Toksisitas Subkronik Ekstrak Etanol Mimosa pudica L. pada Histologi Organ Hati dan Ginjal Mencit Swiss Webster Jantan. [Thesis]. Widya Mandala Catholic University, Surabaya.
- Cotoras M, et al. 2014. In Vitro and In Vivo Evaluation Of The Antioxidant and Prooxidant Activity of Phenolic Compounds Obtained From Grape (Vitis Vinifera) Pomace. *Molecules*. 19: 21154–21167.
- Eghbaliferiz S and Iranshahi M. 2016. Prooxidant Activity of Polyphenols, Flavonoids, Anthocyanins and Carotenoids: Updated Review of Mechanisms and Catalyzing Metals. *Phytother. Res*.
- Fathurrachman DA. 2014. Pengaruh Konsentrasi Pelarut terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn) dengan Metode Peredaman Radikal Bebas DPPH. [Skripsi]. UIN Syarif Hidayatullah, Jakarta.
- Gautam MK and Goel RK. 2014. Toxicological Study Of Ocimum Sanctum Linn Leaves: Hematological, Biochemical, And Histopathological Studies. *Journal of Toxicology*. 2014: 1-9.
- Hodgson E. 2004. *A Textbook of Modern Toxicology*. Canada: John Wiley & Sons, Inc. Publication
- Jamshid N and Cohen MM. 2017. Review Article The Clinical Efficacy and Safety of Tulsi In Humans: A Systematic Review of The Literature. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2017:1-13.
- Jayant SK and Srivastava N. 2016. Effect of Ocimum Sanctum Against Alloxan Induced Diabetes and Biochemical Alterations In Rats. *Integrative Obesity and Diabetes Journal*. 2(5): 1-49.
- Kopaei RM. 2012. Medicinal Plants and The Human Needs. *J Herbmed Pharmacol*. 1(1): 1–2.
- Kopaei RM and Baradaran A. 2013. Plants Antioxidants: From Laboratory to Clinic. *J Nephropathol*. 2(2): 152–153.
- Munday MK, et al. 2013. Antioxidant Potential of Ocimum sanctum in Arsenic Induced Nervous Tissue Damage. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*. 6(3): 95 – 101.
- OECD. 2001. OECD Guideline For Testing Of Chemicals Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure. Paris: OECD.
- Rahman A, et al. 2011. Ocimum sanctum L.: A Review of Phytochemical and Pharmacological Profile. *American Journal of Drug Discovery And Development*.
- Raina P, et al. 2015. Evaluation of Subacute Toxicity of Methanolic/Aqueous Preparation of Aerial Parts of O. Sanctum In Wistar Rats: Clinical, Hematological, Biochemical and Histopathological Studies. *Journal of Ethnopharmacology*. 175: 509-517.
- Rameshthangam P and Chitra JP. 2016. Synergistic Anticancer Effect Of Green Synthesized Nickel Nanoparticles And Quercetin Extracted From Ocimum Sanctum Leaf Extract. *Journal of Materials Science and Technology*.
- Sadashiv PS. 2010. Acute Toxicity Study of Ocimum Sanctum. *International Research Journal of Pharmacy*. 1(1): 403-409.
- Safitri EE. 2016. Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum sanctum*) Sebagai Hepatoprotektor terhadap Kadar MDA Hati Hewan uji yang Diinduksi Isoniazid. [Skripsi]. Universitas Jember.
- Satyatami M. 2014. Pengaruh Paparan Per Oral Fluorida dalam Pasta Gigi Dengan Dosis Bertingkat terhadap Gambaran Mikroskopis Ginjal Mencit Balb/C Usia 3-4 Minggu. [Skripsi]. Universitas Diponegoro, Semarang.
- Sharwan GP, et al. 2015. Toxicity Profile of Traditional Herbal Medicine. *Journal of Ayurvedic and Herbal Medicine*. 1(3): 81-90.
- Shetty S, et al. 2008. Evaluation of Antioxidant and Wound Healing Effects of Alcoholic and

Aqueous Extract Of *Ocimum sanctum* Linn In Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 5(1): 95-101.

Shirzad H, et al. 2011. *Correlation Between Antioxidant Activity of Garlic Extracts and WEHI-164 Fibrosarcoma Tumor Growth In Balb/C Mice*. *J Med Food*, 14(9): 969–974.

Small D, et al. 2012. Oxidative Stress, Anti-Oxidant Therapies And Chronic Kidney Disease.

Nephrology Asian Pacific Society of Nephrology. 17(4): 311–321.

Suhita LPR, et al. 2013. *Histopatologi Ginjal Tikus Putih Akibat Pemberian Ekstrak Pegagan (Centella asiatica) Peroral*. *Buletin Veteriner Udayana*. 5(1): 63-69.

Syamsuhidayat SS and Hutapea JR. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*. Jilid I. Jakarta: Balitbangkes Depkes RI.