

Uji Toksisitas Subkronik Jamu Asam Urat pada Hati Mencit Galur Balb-C (*Subchronic Toxicity Study of Jamu Asam Urat in Liver of Balb-C Mice*)

M. Nuril Huda, Diana Holiday, Fifteen Aprilia Fajrin
Fakultas Farmasi Universitas Jember
Jl. Kalimantan No. 37 Jember 68121
email korespondensi: diana.farmasi@unej.ac.id

Abstract

Jamu asam urat is one of the most-consumed herbal medicine product to threat gout arthritis. This study aimed to determine of jamu asam urat effect for long-term consumption on mice's liver. Mice were divided into 4 groups of 10 each group. A control group was administered with aquadest and 3 treatment groups were administered with jamu sample per oral in dose of 1,800 (D1); 3,600 (D2); and 7,200 mg/kg BW (D3) in 28 days. The examination included GPT and GOT serum level measurement and liver histopathology. The result showed that GPT serum level was 34.33 ± 2.48 U/L (D1), 41.20 ± 1.94 U/L (D2), and 46.32 ± 2.84 U/L (D3), while GOT serum was 44.60 ± 2.94 U/L (D1), 55.53 ± 3.22 U/L (D2), and 63.31 ± 2.63 U/L (D3), respectively. Parenchymatous degeneration and necrosis in liver were found in histopathology examination. Increase of GPT, GOT level, and parenchymatous degeneration liver changes at D1 and D2 counted as mild degeneration, meanwhile necrosis change at D3 counted as moderate degeneration but it didn't greatly affect liver function. Thus jamu asam urat is still save to be consumed.

Keywords: *subchronic toxicity, jamu asam urat, GPT, GOT, liver histopathology*

Abstrak

Jamu asam urat merupakan salah satu produk jamu yang sering dikonsumsi untuk menyembuhkan gout arthritis. Penelitian ini bertujuan mengetahui efek toksik jamu asam urat dalam penggunaan jangka panjang terhadap hati mencit. Mencit dibagi menjadi 4 kelompok masing-masing 10 ekor mencit. Kelompok kontrol diberi akuades dan 3 kelompok dosis diberi sampel jamu secara peroral pada dosis 1.800 (D1), 3.600 (D2), dan 7.200 mg/kg BB (D3) selama 28 hari. Pengamatan yang dilakukan adalah pengukuran kadar SGPT, SGOT dan pengamatan histopatologi hati. Hasil penelitian menunjukkan kadar SGPT sebesar $34,33 \pm 2,48$ U/L (D1), $41,20 \pm 1,94$ U/L (D2), dan $46,32 \pm 2,84$ U/L (D3) dan pada SGOT sebesar $44,60 \pm 2,94$ U/L (D1), $55,53 \pm 3,22$ U/L (D2), dan $63,31 \pm 2,63$ U/L (D3). Degenerasi parenkim dan nekrosis hepatosit ditemukan pada pemeriksaan hispatologi. Kenaikan kadar SGPT dan SGOT masih dalam batas normal, degenearsi parenkim pada D1 dan D2 masuk dalam kategori degenerasi ringan sedangkan nekrosis pada D3 masuk dalam kategori sedang tetapi tidak menyebabkan dampak besar pada fungsi hati. Dengan demikian jamu asam urat masih aman dikonsumsi.

Kata kunci: toksisitas subkronik, jamu asam urat, SGPT, SGOT, histopatologi hati

Pendahuluan

Pengobatan tradisional di Indonesia telah berlangsung sejak dahulu dan telah digunakan secara meluas turun-temurun. Secara umum

obat tradisional digunakan untuk memelihara kesehatan, mencegah penyakit, mengobati penyakit, maupun memulihkan kesehatan [1]. Obat tradisional dikalangan masyarakat lebih dikenal dengan istilah jamu. Jamu adalah obat

tradisional berbahan baku simplisia yang sebagian besar belum mengalami standarisasi, bentuk sediaan masih sederhana berwujud serbuk seduhan atau rajangan untuk seduhan [2]. Penggunaan jamu di Indonesia saat ini cukup besar, hal ini ditunjukkan setidaknya sebanyak 49,53% penduduk Indonesia masih mengkonsumsi jamu [3]. Penggunaan jamu lebih banyak ditujukan kepada pengobatan penyakit-penyakit generatif dengan tujuan pemeliharaan agar penyakit tidak bertambah parah [4]. Salah satu penyakit yang sering diterapi menggunakan jamu adalah *gout arthritis*.

Gout arthritis adalah penyakit yang muncul akibat penumpukan asam urat pada sendi-sendi tulang. *Gout arthritis* merupakan salah satu penyakit tak menular yang banyak diderita oleh masyarakat Indonesia. Prevalensi *gout arthritis* berdasarkan diagnosis nakes di Indonesia sebesar 11,9% dan berdasarkan diagnosis gejala sebesar 24,7%. Dengan prevalensi ini *gout arthritis* menempati urutan ke-12 dari daftar penyakit tak menular yang banyak diderita oleh masyarakat Indonesia [5].

Meskipun penggunaan jamu sudah dipercaya sebagai metode penyembuhan oleh masyarakat Indonesia, jamu belum memiliki bukti ilmiah terkait khasiat dan keamanannya [6]. Untuk itu penelitian untuk mendapatkan bukti-bukti ilmiah mengenai khasiat dan keamanan jamu perlu dilakukan. Mengingat besarnya frekuensi konsumsi jamu oleh masyarakat, perlu diteliti bagaimana keamanan jamu yang dikonsumsi dalam jangka panjang terhadap tubuh, terutama pengaruhnya terhadap kesehatan organ salah satunya hati.

Hati sering menjadi sasaran toksikan karena sebagian besar toksikan memasuki tubuh melalui sistem gastrointestinal dan setelah diserap toksikan dibawa oleh vena porta ke hati. Meskipun hati memiliki aktivitas enzim yang dapat melakukan metabolisme merubah toksikan menjadi kurang toksik, namun apabila kadar toksikan terlampaui tinggi maka dapat menyebabkan kerusakan maupun kematian sel-sel hati [7].

Pada penelitian ini jamu asam urat yang digunakan sebagai sampel mengandung bahan-bahan antara lain jahe (*Zingiber officinale* Rosc.) 25%, lada hitam (*Piper nigrum* L.) 15%, kumis kucing (*Orthosiphon stamineus* Benth.) 10%, sintok (*Cinnamomum sintoc* Bl.) 10%, saga (*Abrus precatorius* L.) 25%, dan masoyi (*Massoia aromatica* Becc.) 15%.

Parameter yang digunakan dalam uji toksisitas subkronik terhadap organ hati meliputi uji kimia darah dan hispatologi organ dengan indikator yang spesifik yaitu besarnya kandungan SGPT dan SGOT dalam serum [8].

Metode Penelitian

Hewan uji yang digunakan adalah mencit galur Balb-C sebanyak 40 ekor dengan rincian 20 jantan dan 20 betina, umur 8-12 minggu, berat badan 18-25 gram. Hewan uji dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan, 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok dosis, masing-masing terdiri dari 5 ekor mencit jantan dan 5 ekor mencit betina. Penelitian dilakukan selama 28 hari, mengikuti pedoman uji toksisitas nonklinis dari BPOM [9].

Sampel jamu yang digunakan adalah jamu asam urat merk "X" yang dijual di toko jamu di daerah Jember. Sampel jamu asam urat diberikan pada hewan uji dengan dosis 1800 mg/kg BB (D1), 3600 mg/kg BB (D2), dan 7200 mg/kg BB (D3) secara per oral selama 28 hari. Setelah masa perlakuan selama 28 hari, dilakukan pembedahan pada semua hewan uji dan diambil sampel darah dan sampel organ hati. Sampel darah selanjutnya diproses untuk mendapatkan serum dan sampel organ hati diproses menjadi preparat histologi.

Pengukuran kadar SGPT dan SGOT dilakukan secara spektrofotometri menggunakan Biolyzer 100 Analyticon® pada panjang gelombang 340 nm. Histopatologi hati diamati secara mikroskopik pada perbesaran 400x sesuai dengan ketentuan yang ditunjukkan pada tabel 1.

Tabel 1. Ketentuan skoring histopatologi hati [10]

Skor	Tingkat perubahan
1	Sel hepatosit normal dengan batas yang jelas, inti bulat dengan kromatin yang tersebar dan menyerap zat warna yang sempurna
2	Degenerasi parenkim pada hepatosit hati
3	Degenerasi hidropik pada hepatosit hati
4	Nekrosis pada hepatosit hati

Dilihat lima lapangan pandang pada setiap lapangan pandang dihitung 20 sel secara acak sehingga dalam 1 preparat tersebut teramati 100 sel hati. Kemudian dihitung rata-rata bobot skor perubahan histopatologi hati dari masing-masing mencit kemudian dihitung nilai rerata skornya dengan cara mengalikan jumlah sel. Berdasarkan kriteria tersebut maka

skor minimal yang mungkin didapat adalah 100. Jika semua sel yang ditemukan dalam keadaan normal. Skor maksimal 400 jika semua sel dalam keadaan nekrosis [11]. Analisis data untuk kadar SGPT dan SGOT serta skor histopatologi hati menggunakan uji *Kruskall-Wallis* dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*.

Hasil Penelitian

Hasil pengukuran kadar SGPT dan SGOT dapat dilihat pada Tabel 2. Uji normalitas dan homogenitas varian data SGPT dan SGOT menghasilkan nilai $p = 0,037$ dan $p = 0,007$ untuk normalitas dan nilai $p = 0,096$ dan $p = 0,341$ untuk homogenitas sehingga tidak memenuhi syarat untuk dilakukan uji Anova ($p < 0,05$) kemudian dilakukan uji *Kruskall-Wallis* dan *Mann-Whitney* sebagai pengganti.

Hasil pengamatan histopatologi hati dapat dilihat pada Gambar 1. Pada kelompok kontrol terlihat stuktur jaringan hati yang tersusun dari lobulus-lobulus dengan vena sentral dan lempeng hepatosit yang teratur, hepatosit terlihat normal berbentuk inti bulat, ada batasan yang jelas, dan kromatin tersebar menyerap zat warna yang sempurna. Sinusoid, arteri, dan vena porta tidak menunjukkan tanda-tanda kelainan. Pada kelompok dosis I dan dosis II susunan lempeng hepatosit tidak teratur, terlihat peningkatan vaskularisasi pada vena, dibebberapa tempat mengalami pembesaran yang disertai perubahan dengan sitoplasma yang padat, dan terlihat perubahan degenerasi hidropik dan nekrosis pada beberapa sel hepatosit. Pada dosis III terlihat saluran sinusoid yang membesar, dinding tubulus pada vena sentral tidak utuh, susunan lempeng hepatosit yang tak teratur, terlihat beberapa fokus jaringan nekrosis disertai infiltrasi sel-sel radang kronis di intersitium sel hepatosit sekitar vena sentral.

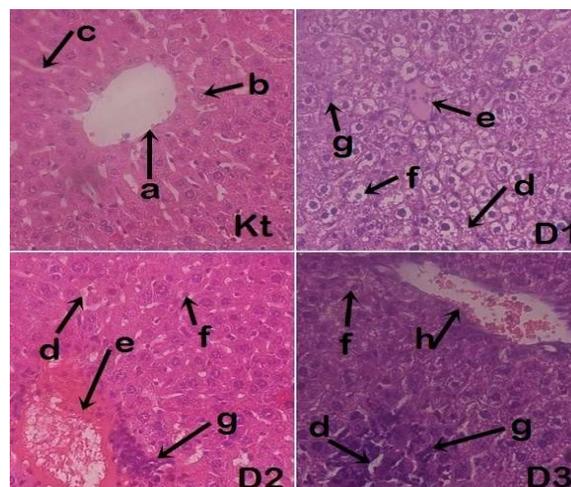
Kerusakan nekrosis tidak ditemukan pada kelompok kontrol, pada kelompok dosis I hanya beberapa sel hepatosit yang mengalami nekrosis, pada kelompok dosis II sel hepatosit yang mengalami nekrosis cukup jarang dimana distribusinya lebih rendah dibandingkan dengan sel hepatosit yang mengalami degenerasi hidropik.

Hasil skoring histologi hati dapat dilihat pada Tabel 3. Uji *Kruskall-Wallis* skor hepatosit hati menghasilkan nilai $p = 0,00$. Pada uji *Mann-Whitney* terdapat perbedaan yang signifikan antara kontrol dengan dosis I, kontrol dengan dosis II, dosis I dengan dosis III dan dosis II dengan dosis III.

Tabel 2. Kadar SGPT dan SGOT mencit

Kelompok	Kadar SGOT (U/L)	Kadar SGPT (U/L)
Kontrol	27,28 ± 5,94 ^a	25,64 ± 5,32 ^a
Dosis I	44,60 ± 2,94 ^b	34,33 ± 2,48 ^b
Dosis II	55,53 ± 3,22 ^c	41,20 ± 1,94 ^c
Dosis III	63,31 ± 2,63 ^d	46,32 ± 2,84 ^d

Data dalam rata-rata ± SD. Angka yang diikuti dengan huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$) pada uji post hoc *Mann-Whitney* (N=10).



Gambar 1. Gambaran histologi hati mencit setelah pemberian jamu asam urat selama 28 hari (perbesaran 400x); Kt. Kelompok kontrol; D1. Kelompok dosis I; D2. Kelompok dosis II; D3. Kelompok dosis III; a. Vena sentral normal; b. Hepatosit normal; c. Sinusoid normal; d. Sinusoid melebar; e. Kongesti yang terjadi pada vena sentral; f. Degenerasi hidropik; g. Nekrosis; h. Vena sentral dengan dinding tubulus yang tak teratur.

Tabel 3. Skoring histologi jaringan hati mencit

Kelompok	Nilai skoring
Kontrol	100 ± 0,00 ^a
Dosis I	176 ± 8,93 ^b
Dosis II	180 ± 9,46 ^b
Dosis III	203 ± 8,21 ^c

Data dalam rata-rata ± SD. Angka yang diikuti dengan huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$) pada uji post hoc *Mann-Whitney* (N=10).

Pembahasan

Hati merupakan organ yang berperan penting dalam proses metabolisme makanan serta sebagian besar obat dan toksikan [12]. Hati dapat mengalami kerusakan karena zat toksik yang dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti jenis zat kimia yang terlibat, dosis yang diberikan, dan lamanya paparan zat tersebut [13]. Kerusakan hati selalu ditandai dengan

perubahan biokimia, oleh karena itu pemeriksaan laboratorium diperlukan untuk membantu diagnosis kerusakan hati dan tingkat keparahannya. Salah satu uji yang dapat digunakan untuk kepentingan tersebut adalah pemeriksaan *alanine transaminase* (ALT) atau dikenal dengan (GPT) *glutamat piruvat transaminase* dan *aspartate transaminase* (AST), lebih sering disebut dengan (GOT) *glutamat okseoasetat transaminase* [14].

Berdasarkan hasil pengukuran data SGPT dan SGOT pada kelompok kontrol jumlah rata-rata SGPT adalah 25,64 U/L sedangkan pada SGOT jumlah rata-ratanya adalah 27,28 U/L. Terjadi kenaikan nilai SGPT dan SGOT pada kelompok dosis I, dosis II, dan dosis III dengan jumlah rata-rata SGPT dan SGOT berturut-turut adalah 34,33 U/L ; 44,60 U/L, 41,20 U/L ; 55,53 U/L dan 46,32 ; 63,31 U/L

Terlihat dari data pengukuran SGPT dan SGOT adanya peningkatan nilai pada masing-masing perlakuan dosis (dosis I, dosis II, dan dosis III) jika dibandingkan dengan kelompok kontrol. Peningkatan nilai SGPT dan SGOT pada masing-masing kelompok dosis (dosis I, dosis II, dan dosis III) secara keseluruhan belum menyimpang atau masih berada pada kisaran batas normal karena peningkatan belum mencapai 10-100 kali. Pada kerusakan hati kadar SGPT dan SGOT akan meningkat 10-100 kali dari nilai normal hal ini disebabkan enzim transaminase hati akan keluar dan masuk ke peredaran darah [15]

Secara keseluruhan nilai SGPT dan SGOT masih dalam rentang nilai normal pada mencit sehat. Rentang SGPT normal dalam darah mencit adalah 17-77 U/L, adapun pustaka lain menyebutkan rentang nilai normal SGPT adalah 25-200 U/L. Rentang kadar SGOT dalam darah mencit normal adalah 54-298 U/L sedangkan pustaka lain menyebutkan 70-400 U/L [16,17]. Pengukuran SGPT dan SGOT dapat digunakan sebagai acuan adanya kerusakan hati, namun pemeriksaan ini kurang spesifik sehingga diperlukan pemeriksaan histopatologi hati [18].

Dari pengamatan histopatologi hati pemeriksaan hepatosit pertama kali ditentukan zona yang terdapat perubahan hepatosit hati yakni zona/daerah 3 disekitar vena sentral, terlihat kerusakan struktur hepatosit pada kelompok perlakuan dosis, yakni adanya degenerasi hidropik dan nekrosis. Pada kelompok kontrol tidak ditemukan adanya degenerasi hidropik, pada kelompok dosis I ditemukan sebaran degenerasi hidropik yang

cukup jelas disekitar vena sentral, skor yang dihasilkan pun hampir keseluruhan didapat dari degenerasi hidropik. Pada kelompok dosis II sebaran degenerasi hidropik tidak merata, skor yang dihasilkan merupakan akumulasi dari nilai degenerasi hidropik dan nekrosis. Sementara pada dosis III degenerasi hidropik yang terlihat lebih sedikit jika dibandingkan dengan kelompok dosis II. Degenerasi hidropik dicirikan dengan sel hepatosit yang bervakuola dan terisi air dalam sitoplasmanya, degenerasi hidropik terjadi akibat adanya gangguan transport aktif yang mengakibatkan sel tidak mampu memompa ion Na⁺ keluar sehingga konsentrasi ion Na⁺ dalam sel meningkat, hal ini berpengaruh pada proses osmosis yang menyebabkan influks air kedalam sel sehingga sel akan membengkak seperti vakuola dan nukleus membesar [19]. Degenerasi hidropik bersifat reversibel artinya jika rangsangan yang menyebabkan kerusakan sel dihentikan, maka sel akan kembali normal seperti saat sebelum diberikan rangsangan [20].

Kerusakan nekrosis tidak ditemukan pada kelompok kontrol, pada kelompok dosis I hanya beberapa sel hepatosit yang mengalami nekrosis, pada kelompok dosis II sel hepatosit yang mengalami nekrosis cukup jarang dimana distribusinya lebih rendah dibandingkan dengan sel hepatosit yang mengalami degenerasi hidropik. Pada kelompok dosis III distribusi sel hepatosit jelas terlihat di sekitar vena sentral, skoring penilaian kerusakan sel hepatosit kelompok dosis III menempati total skor yang tertinggi yakni sebesar 203,33 ± 8,213. Nekrosis merupakan kematian sel organisme yang bersifat irreversible. Inti sel yang mati terlihat mengeriput, terbagi dalam fragmen-fragmen, adanya kariolisis, berwarna gelap dan adanya pemecahan khromatin dalam bentuk granula yang tidak terstruktur [21].

Jamu asam urat yang digunakan dalam penelitian ini mengandung *Zingiber officinale*, *Piper nigrum*, *Orthosiphon stamineus*, *Cinnamomum sintoc*, *Abrus precatorius*, dan *Massoia aromatica*. Berbagai penelitian telah dilakukan untuk menguji toksisitas subkronik bahan-bahan tersebut. Dari uji toksisitas subkronik yang telah dilakukan, *Abrus precatorius* pada dosis 800 mg/kg BB menyebabkan kerusakan hati yang diakibatkan adanya infiltrasi foci limfosit pada vena porta hati [22]. *Cinnamomum sintoc* pada dosis 1000 mg/kgBB menunjukkan adanya perubahan pada gambaran mikroskopis sel-sel hati berupa susunan sel yang tidak beraturan, adanya

penggabungan antara sel satu dengan sel yang lain, dan terjadinya perlemakan pada sel-sel hati [23]. *Zingiber officinale*, *Piper nigrum*, dan *Orthosiphon stamineus* tidak menimbulkan efek toksik [24-26], sementara untuk *Massoia aromatica* belum ada penelitian yang membahas toksisitas subkroniknya. Dapat disimpulkan bahwa setidaknya terdapat dua bahan kandungan jamu asam urat X yang secara individu memiliki efek toksik dan diduga terdapat interaksi antar bahan sehingga meningkatkan ketoksikan jamu yang berefek pada perubahan hati mencit.

Simpulan dan Saran

Pemberian jamu asam urat pada mencit selama 28 hari dapat meningkatkan kadar SGPT dan SGOT namun masih dalam rentang kadar normal, dan pada studi histopatologi terdapat perubahan histologi hati berupa degenerasi hidropik dan nekrosis. Perlu dilakukan uji toksisitas akut pada jamu asam urat untuk menentukan dosis letal (LD_{50}) jamu. Serta penelitian lebih lanjut mengenai efek toksik jamu asam urat terhadap organ-organ lain.

Daftar Pustaka

- [1] Agoes A, Jacob T. Antropologi kesehatan: pengobatan tradisional. Jakarta: Penerbit Buku kedokteran EGC; 1992.
- [2] Ranti AS, Wong LM, Tilaar M. The green science of jamu. Jakarta: Dian Rakyat; 2010.
- [3] Tjandra YA. Jamu dan kesehatan. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan; 2014.
- [4] Wahyuni AS, Sujono TA. Studi aktivitas daya analgetik jamu pegel linu. Jurnal Penelitian Sains & Teknologi. 2004. 5 (1): 21–32.
- [5] Indonesia. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan: Riset kesehatan dasar. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI; 2013.
- [6] Siswanto. Saintifikasi jamu sebagai upaya terobosan untuk mendapatkan bukti ilmiah tentang manfaat dan keamanan jamu. Buletin Penelitian Sistem Kesehatan. April 2012. 15 (2): 203–211.
- [7] Sulaiman AH. Gastroenterologi hepatologi. Yogyakarta: Agung Seto; 1990.
- [8] Timbrell JA. Introduction to toxicology third edition. London: Taylor & Francis; 2002.
- [9] Badan Pengawasan Obat dan Makanan. Peraturan kepala badan pengawas obat dan makanan Republik Indonesia nomor 7 tahun 2014 tentang pedoman uji toksisitas nonklinik secara in vivo. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI; 2014.
- [10] Ramachandran R, Kakar S. Histological pattern in drug-induced liver disease. Journal Clin Pathol. 2009. 62:481-492.
- [11] Maulida A, Syafruddin I, Salomon A. Pengaruh pemberian vitamin C dan E terhadap gambaran histologis hepar mencit (*Mus musculus* L.) yang dipejankan monosodium glutamat. Medan: Departemen Biologi Fakultas MIPA Universitas Sumatera Utara; 2013.
- [12] Lu FC. Toksikologi dasar asas organ sasaran dan penilaian risiko edisi kedua. Jakarta: UI Press; 1991.
- [13] Moslen MT. Toxic Responses of the liver 6th ed. New York: McGraw Hill; 2001.
- [14] Tanti AS, Wahyuni SA, Diah TA. Pengaruh pemberian ekstrak etanol meniran (*Phyllanthus niruri*) selama 90 hari terhadap fungsi hati tikus. University Research Colloquium. 2015. 14: 2407-9189.
- [15] Murray RK, Granner K, Rodwell, VW. Biokimia harper edisi 27. Jakarta: Buku Kedokteran EGC; 2009.
- [16] Hall RL. Clinical pathology of laboratory animals in animal model in toxicology 2nd edition. USA: CRC Press; 2007.
- [17] Sass PM. Reference values for laboratory animal normal hematology values.[internet]. [Missoula]: Research of Animal Resources; 2009 [updated 2014; cited 2016 April10]. Available from: <http://www.ahc.umn.edu/rar/refvalues.html>
- [18] Zimmerman HJ. Hepatotoxicity. New York: Appleton Century Crofts; 1978.
- [19] Mitchell RN, Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Adaptasi sel jejas sel dan kematian sel. Jakarta: EGC; 2008.
- [20] Hayes AW. Principles and methods of toxicology student ed. New York: Raven Press; 2008.
- [21] Thompson RG. General veterinary pathology second edition. Philadelphia: WB Saunders Company; 1994.
- [22] Adedapo AA, Omoleye OA, Gabriel O. Studies on the toxicity of an aqueous extract of the leaves of *Abrus precatorius* in rats. Onderstepoort Journal of Veterinary Research. 2007. 74(2):31–36.
- [23] Sumiwi AD, Anas S, Rizki I. Efek toksisitas subkronik ekstrak etanol kulit batang sintok

- pada tikus putih galur wistar. Prosiding Seminar kongres ilmiah ISFI. 2007. 21: 3-6.
- 24] Mulyaningsih B, Pramono S, Suhardjono D. Uji toksisitas minyak atsiri jahe (*Zingiber officinale*) sebagai antiparasit pada hewan uji mencit dan tikus. B.I.Ked. Juni 1999. 31(2):71-76.
- [25] Chunlaratthanaphorn S, Lertprasertsuke N, Srisawat U, Thupia A, Ngamjariyawat A, Suwanlikhid N, Jaijoy K. Acute and subchronic toxicity study of the water extract from dried fruits of *Piper nigrum* L. in rats. Songklanakarin J. Sci. Technol., March 2007, 29(1): 109-124.
- [26] Shafaei A, Esmaili K, Farsi E, Aisha AFA, Majid AMSA, Ismail Z. Genotoxicity, acute and subchronic toxicity studies of nano liposomes of *Orthosiphon stamineus* ethanolic extract in Sprague Dawley rats. BMC Complementary Altern Med. 2015. 15:360.