



In Vivo Study: Hypnotic-Sedative Activity and Acute Toxicity of the Ethyl Acetate Fraction of *Polypodium feei*

Deden W. Suwandi¹, Imas Siti¹, Muhammad Akbar¹, Nurul Auliasari¹, Siva Hamdani^{1*}

¹Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Garut, Garut

Submitted 29 December 2022; Revised 24 March 2023; Accepted 05 April 2023; Published 07 June 2024

*Corresponding author: siva@uniga.ac.id

Abstract

Polypodium feei is a plant that is used by the community as traditional medicine. Previous research reported that the ethyl acetate fraction of *P. feei* root has strong analgesic activity at a dose of 200 mg/kg BW. The acute toxicity of its extract is a depressant by reducing motor activity. This study aims to determine the effective and safe dose of *P. feei* root fraction as a hypnotic-sedative. This research began with testing the sedative hypnotic activity animals induced by interperitoneal phenobarbital as well as testing acute toxicity through observing animal behavior, macropatology, and the LD50 value. The results of testing the hypnotic-sedative activity of the ethyl acetate fraction at doses of 50, 100, and 200 mg/kg BW had hypnotic-sedative activity in experimental animals. This test showed that increasing the dose could increase the hypnotic-sedative activity which was significantly different when compared to the control group ($P < 0.05$). Acute toxicity testing resulted in a decrease in motor activity. The highest dose, namely 5,000 mg/kg BW, can cause fatty liver disease (Steatosis). Based on these tests, the use of the ethyl acetate fraction has hypnotic-sedative activity with an effective dose of 50 mg/kg BW which is safe in experimental animals.

Keywords: Acute toxicity, Ethyl acetate fraction, *Polypodium feei* root, Sedative-hypnotic

Studi In Vivo: Aktivitas Hipnotik-Sedatif dan Toksisitas Akut dari Fraksi Etil Asetat Akar Pakis Tangkur (*Polypodium feei*)

Abstrak

Tanaman pakis tangkur merupakan tanaman yang dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai obat tradisional. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa fraksi etil asetat akar pakis tangkur memiliki aktivitas analgetik kuat pada dosis 200 mg/kg BB. Pengujian toksisitas akut ekstrak akar pakis tangkur bersifat depresan dengan menurunkan aktivitas motorik dan jumlah jengukan hewan. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan dosis efektif dan aman dari fraksi akar pakis tangkur sebagai hipnotik-sedatif. Penelitian ini diawali dengan pengujian aktivitas hipnotik sedatif dari fraksi etil asetat akar pakis tangkur berdasarkan parameter jumlah jatuh, onset dan durasi tidur pada hewan yang diinduksi fenobarbital secara interaperitoneal serta pengujian toksisitas akut melalui pengamatan perilaku hewan, penentuan bobot badan, indeks organ dan pengamatan makroskopik organ, serta penentuan nilai LD50. Hasil pengujian aktivitas hipnotik-sedatif fraksi etil asetat akar pakis tangkur dosis 50, 100, dan 200 mg/kg BB memiliki aktivitas hipnotik-sedatif pada hewan percobaan. Pengujian ini diperoleh adanya peningkatan dosis dapat meningkatkan aktivitas hipnotik-sedatif yang berbeda bermakna apabila dibandingkan kelompok kontrol ($P < 0,05$). Pengujian toksisitas akut menyebabkan penurunan aktivitas motorik dan jumlah jengukan hewan. Dosis tertinggi yaitu 5.000 mg/kg BB dapat menimbulkan perlemakan (Steatosis) organ hati. Berdasarkan pengujian tersebut penggunaan fraksi etil asetat memiliki aktivitas hipnotik-sedatif dengan dosis efektif 50 mg/kg BB yang aman pada hewan percobaan.

Kata Kunci: Toksisitas akut, Fraksi etil asetat, Akar pakis tangkur, Hipnotik-sedatif

1. Pendahuluan

Tumbuhan Pakis tangkur (*Polypodium feei.*, METT) merupakan salah satu tanaman herbal yang rebusan akarnya digunakan oleh masyarakat sebagai obat reumatik, tekanan darah, sakit pinggang, memperlancar buang air kecil dan sebagai afrodisiaka. Tumbuhan ini banyak ditemukan di sekitar pegunungan vulkanik salah satunya di gunung tangkuban perahu, Bandung.¹

Kandungan senyawa kimia yang terdapat dalam akar pakis tangkur yaitu kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside-7-O- α -L-rhamno pyranoside, flavonoid glycoside, (-)-4 β -carboxymethyl epiafzelechin (3'-deoxydryopteris acid), (+)-afzelechin-O- β -4'-D-glucopyranoside, dan Selliguesin A and selliguesin B yang dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi.^{2,3}

Selliguesin A merupakan senyawa yang diisolasi dalam fraksi etil asetat akar pakis tangkur yang aktif sebagai analgetika dan antiinflamasi dengan mekanisme kerja menghambat enzim Siklooksigenase (COX) dan *inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS).¹ Uji toksisitas akut ekstrak akar pakis tangkur dilaporkan dapat bersifat depressant pada psikomotor hewan mencit.⁴ Obat yang memiliki aktivitas analgetik kuat biasanya disertai efek mengantuk dan menenangkan.⁵

Berdasarkan latar belakang di atas, maka perlu dilakukan pengujian aktivitas fraksi etil asetat sebagai hipnotik-sedatif dan pengujian keamanannya. Tujuan penelitian ini adalah menguji aktivitas hipnotik-sedatif dan menguji toksisitas akut dari fraksi etil asetat pada hewan percobaan.

2. Metode

2.1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *rotarod* (Intralab, Indonesia), evaporator (Buchi R-3 HB, Switzerland), pH meter (Hanna, Indonesia), *moisture balance* (Sartorius, Indonesia), dan *flowability tester* (Hanna, Indonesia).

2.2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah akar pakis tangkur (*Herbarium*

voucher number: 5266/11.CO2.2/PL/2020), fenobarbital injeksi (Phapros, Indonesia), tragakan 1%, etanol 70% (Bratachem, Indonesia), etil asetat (Bratachem, Indonesia).

2.3. Hewan

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit jantan putih galur swiss webster berumur 2-3 bulan dengan bobot badan rata-rata 20-30 gram yang diperoleh dari Institut Teknologi Bandung (ITB).

2.4. Prosedur

2.3.1. Pembuatan Ekstrak dan Fraksi

Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi terhadap serbuk simplisia akar pakis tangkur diekstraksi dengan etanol 70% (3x24 jam) pada temperatur ruangan hingga diperoleh ekstrak encer. Ekstrak encer selanjutnya diuapkan pelarutnya dengan alat *rotary evaporator* dengan suhu 50°C untuk mendapatkan ekstrak kental.

Ekstrak kental difraksinasi dengan dengan pelarut n-heksan, etil asetat, dan aquadest. Selanjutnya diuapkan pelarutnya menggunakan alat *rotary evaporator* hingga kental, kecuali fase air dihilangkan pelarutnya dengan cara kering beku (*freeze dry*).

2.3.2. Pengujian Hipnotik-Sedatif

Pengujian aktivitas hipnotik-sedatif dilakukan pada kelompok hewan yang terdiri dari kelompok kontrol negatif diberi aquadest secara oral, kelompok kontrol positif diberi larutan tragakan 1% secara oral, dan kelompok uji diberi Fraksi Etil Asetat Akar Pakis Tangkur (FEAPT) dosis 50, 100, dan 200 mg/kg BB secara oral. Kemudian 30 menit setelah perlakuan, semua kelompok hewan kecuali kontrol negatif, diinjeksikan larutan fenobarbital dosis 90 mg/kg BB secara intraperitoneal. Setelah satu jam pemberian fenobarbital, jumlah jatuh hewan dihitung pada mesin *rotarod* (10 rpm) selama 3 menit dengan interval 1 menit, kemudian diamati onset dan durasi tertidurnya hewan melalui pengamatan *righting reflex* yaitu ketika hilangnya refleks mencit membalikkan kembali posisi tubuhnya ketika

diterlentangkan karena terjadinya penurunan kesadaran sebagai efek senyawa hipnotik seperti senyawa fenobarbital.⁶

2.3.3. Pengujian Toksisitas Akut

Pengujian dilakukan secara *in vivo* terhadap hewan coba mencit betina yang diambil secara acak dengan pemilihan hewan berdasarkan kriteria inklusi hewan sehat, bobot badan 20-30 gram, umur 6-8 minggu, dikelompokkan menjadi 5 kelompok masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor dengan 4 kelompok uji dan 1 kelompok kontrol. Pada penelitian ini, hewan dipuasakan 3-4 jam sebelum pemberian sediaan uji dengan dosis tunggal dari dosis terendah sampai tertinggi (300, 1000, 2000, dan 5000 mg/kg BB) dan uji kontrol PGA 1%. Parameter yang diamati yaitu perilaku hewan, bobot badan, indeks organ dan kematian untuk menentukan LD₅₀. Waktu pengamatan hewan dilakukan setiap hari selama 14 hari.

Pada waktu satu hari pengamatan (30 menit setelah pemberian obat), respon hewan diamati diantaranya aktivitas motorik, straub, piloereksi, ptosis, refleks pineal, refleks kornea dan lakrimasi, *retabliment*, fleksi, *hafner*, mortalitas, *grooming*, defekasi, urinasi, salivasi, vokalisasi, pernafasan, *writhing*, dan katalepsi. Setelah pengamatan hewan berakhir (14 hari), perilaku hewan diamati kembali. Selanjutnya, hewan dikorbankan/*euthanasia* secara fisik menggunakan teknik dislokasi leher dengan cara ekor mencit ditarik secara berlawanan dari bagian badannya dengan leher diberi penahan batang logam hingga mencit meregangkan badannya dan terbunuh.

Selanjutnya, dilakukan pembedahan dan diisolasi organ-organ vitalnya untuk diidentifikasi secara makroskopis dan bobotnya, untuk memperoleh indeks organ setiap kelompok uji (Persetujuan etik uji toksisitas akut: 956/UN6.KEP/EC/2022).⁷

2.3.4. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan menggunakan software SPSS (*Statistical Product and Service Solution*), menggunakan metode ANOVA dan uji lanjut LSD dengan $P < 0,05$.

2.3.5. Persetujuan Etik

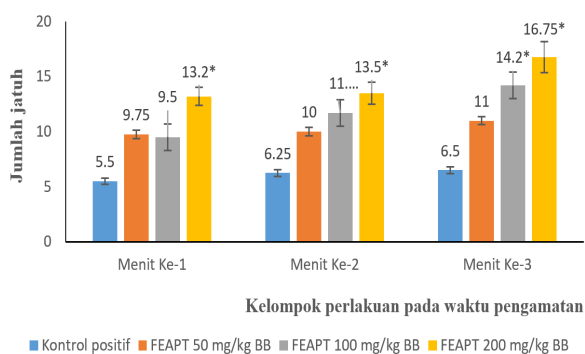
Pengujian aktivitas hipnotik-sedatif ini disetujui dan memperoleh rekomendasi dan komite etik Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran dengan Nomor: 956/UN6.KEP/EC/2022.

3. Hasil

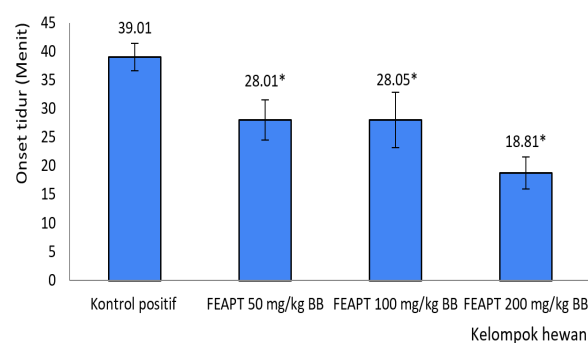
Simplisia serbuk akar pakis tangkur sebanyak 4,52 Kg dimaserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Ekstrak kental yang diperoleh sebanyak 1.232,7 gram (rendemen 27,27%). Hasil fraksinasi akar pakis tangkur dengan pelarut etil asetat diperoleh 513,75 gram.

Pengujian fraksi etil asetat akar pakis tangkur, pertama-tama dilakukan pengujian aktivitas hipnotik-sedatif. Hasil pengamatan dapat dilihat pada Gambar 1, 2, dan 3.

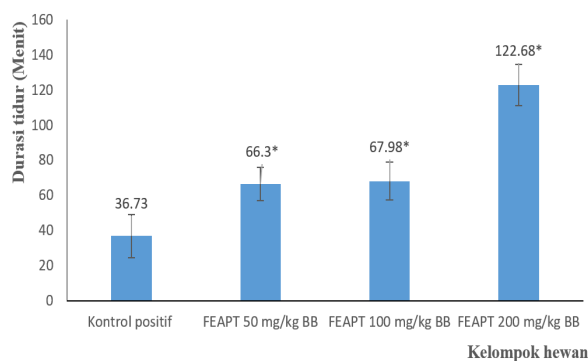
Fraksi etil asetat akar pakis tangkur, selanjutnya dilakukan pengujian keamanan melalui uji toksisitas akut terhadap mencit putih betina galur *swiss webster*. Parameter



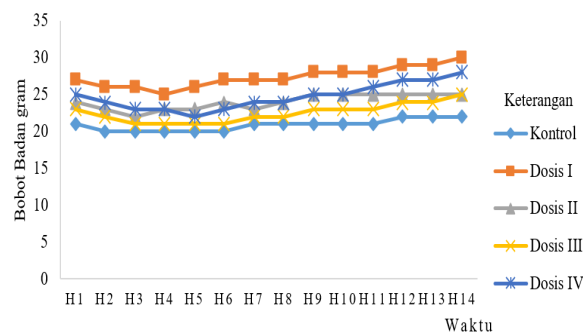
Gambar 1. Jumlah jatuh mencit setelah perlakuan (Keterangan: *= Berbeda bermakna terhadap kelompok kontrol ($P < 0,05$))



Gambar 2. Onset tidur mencit setelah perlakuan (Keterangan: *= Berbeda bermakna dengan kontrol positif ($p < 0,05$))



Gambar 3. Durasi tidur mencit setelah perlakuan (Keterangan: *= Berbeda bermakna terhadap kelompok kontrol ($P < 0,05$))



Gambar 4. Rata-rata Bobot Badan Mencit

pengamatan uji toksisitas akut yang pertama adalah pengamatan bobot badan mencit (Gambar 4) yang dilakukan penimbangan setiap hari selama 14 hari pemeliharaan sejak awal pemberian sediaan uji hingga berakhirnya masa pengamatan. Hasil pengujian menunjukkan semua hewan uji memiliki bobot badan yang stabil, bahkan mengalami peningkatan bobot badan meskipun tidak berbeda bermakna ($P > 0,05$).

Pengamatan berikutnya adalah perilaku hewan sebelum dan sesudah pemberian fraksi akar pakis tangkur dalam dosis sekali pemberian. Parameter yang diamati yaitu aktivitas motorik dan jumlah jengukan pada meja platform, piloereksi, refleks hewan diantaranya ptosis, pineal, korneal, *haffner* dan fleksi, *grooming*, lakrimasi, *retabliment*, *straub*, aktivitas defekasi dan urinasi, salivasi, vokalisasi, *writhing*, dan katalepsi. Data yang diperoleh ditetapkan sebagai persen jumlah

hewan yang menimbulkan respon setelah pemberian sediaan uji (Hasil pengamatan tidak ditampilkan). Serta hewan uji dikorbankan untuk menentukan nilai indeks organ. Hasilnya dapat dilihat pada Tabel 1.

Selanjutnya dilakukan pengamatan makroskopik organ-organ vital untuk melihat efek yang ditimbulkan oleh sediaan uji terhadap kondisi visual dari organ-organ vital mencit. Hasilnya dapat dilihat pada Gambar 5a dan 5b.

4. Pembahasan

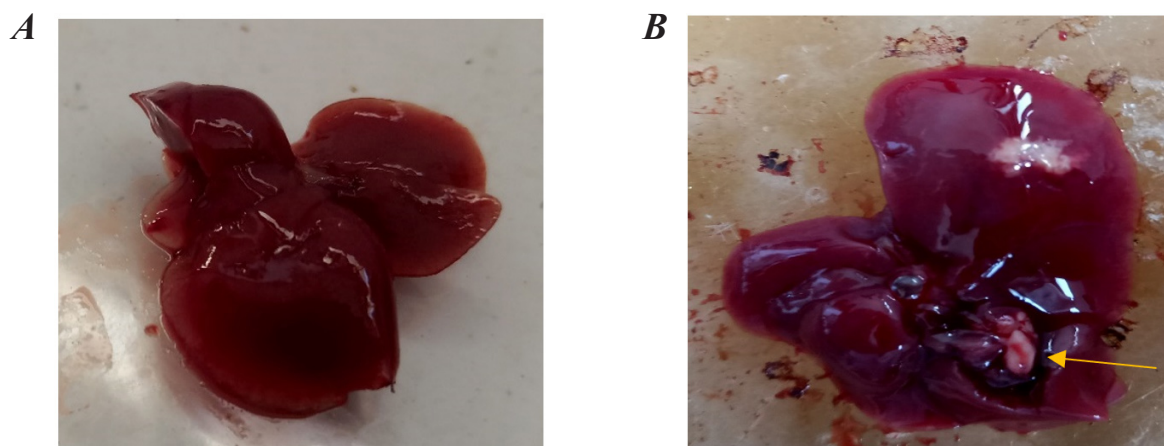
Pengujian hipnotik-sedatif dilakukan pada hewan mencit yang diinduksi dengan senyawa fenobarbital 9 mg/kg BB hingga hilangnya *righting refleks*. Fenobarbital bekerja dengan berikatan pada komponen-komponen molekular reseptor GABA pada membran neuron SSP, ikatan ini dapat menyebabkan kanal ion klorida terbuka dan

Tabel 1. Indeks Organ Vital Mencit

Kelompok hewan mg/ kg BB	Indeks organ vital mencit							
	Ginjal	Limpa	Uterus	Paru-paru	Otak	Hati	Jantung	Lambung
Kontrol	1,34	0,99	0,98	1,11	0,95	6,84	0,54	1,02
	±0,12	±0,22	±0,16	±0,12	±0,10	±0,25	±0,11	±0,12
FEAPT 300	1,31	1,04	1,05	0,91	0,78	6,82	0,66	0,91
	±0,11	±0,23	±0,17	±0,13	±0,14	±0,25	±0,13	±0,14
FEAPT 1000	1,35	1,10	0,94	0,93	0,81	6,98	0,50	0,88
	±0,10	±0,22	±0,19	±0,15	±0,10	±0,19	±0,08	±0,12
FEAPT 2000	1,30	1,09	0,99	0,94	1,05	6,12	0,42	0,98
	±0,12	±0,21	±0,18	±0,12	±0,13	±0,42*	±0,06	±0,11
FEAPT 5000	1,21	1,12	1,01	0,89	0,88	6,03	0,44	0,97
	±0,13	±0,20	±0,22	±0,12	±0,12	±0,82*	±0,05	±0,13

*Berbeda bermakna dengan kelompok kontrol ($p < 0,05$)

FEAPT = Fraksi Etil Asetat Akar Pakis Tangkur



Gambar 5. (A) Organ Hati Normal, (B) Organ Hati (tanda panah kuning menunjukkan steatosis)

masuk ke dalam sel dan memicu terjadinya hiperpolarisasi dan menurunkan aktivitas neuron.⁸

Aktivitas hipnotik-sedatif fraksi etil asetat akar pakis tangkur ditunjukkan oleh dosis 100 dan 200 mg/kg BB. Jumlah jatuh dosis tersebut berbeda bermakna bila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif ($p < 0,05$). Aktivitas hipnotik ditandai dengan adanya kehilangan *righting refleks*. Hilangnya *righting refleks* merupakan ketidakmampuan mencit untuk kembali ke posisi normal atau berdiri dengan keempat kakinya dari posisi terlentang pada saat disentuh.⁹

Onset tidur paling cepat yaitu 18,8 menit serta durasi tidur paling lama yaitu 122,68 menit ditunjukkan oleh dosis 200 mg/kg BB. Dapat dikatakan dosis 200 mg/kg BB merupakan dosis yang berefek hipnotik-sedatif kuat. Fraksi etil asetat akar pakis tangkur mengandung metabolit sekunder flavonoid, steroid, triterpenoid, tannin, dan steroid.¹⁰ Metabolit triterpenoid, Salah satu senyawa aktif yang berperan sebagai depresan sistem saraf pusat (SSP) adalah senyawa golongan triterpenoid.¹¹ Senyawa tannin dilaporkan juga sebagai depresan SSP.¹² Senyawa steroid dapat memodulasi ikatan GABA dengan reseptornya sehingga bersifat hipnotik-sedatif.¹³

Fraksi etil asetat akar pakis tangkur mengandung *selliguaein A* yang merupakan senyawa golongan flavonoid dimana dilaporkan bahwa senyawa tersebut memiliki aktivitas analgetika kuat.¹⁴ Efek penyerta dari analgetika kuat biasanya bersifat depresan dan hipnotik sedatif. Analgetika

kuat terutama bekerja dengan mengikat reseptor μ di sistem saraf pusat yang akan meningkatkan nilai ambang nyeri. Ikatan ini juga, akan menghasilkan efek hiperpolarisasi pada saraf dengan cara mengaktivasi kanal ion kalsium melalui proses yang melibatkan G-protein. Reseptor GABA merupakan asam amino yang bertindak sebagai neurotransmitter dalam penyampaian sinyal antar sel saraf. GABA dikategorikan sebagai neurotransmitter penghambat karena bekerja dengan menghambat sinyal tertentu ke otak dan mengurangi aktivitas di sistem saraf.¹⁵

Pada pengujian toksisitas akut diamati perilaku hewan ketika sebelum pemberian sediaan uji (0 menit) ataupun setelah pemberian sediaan uji (30 menit), Semua dosis uji menunjukkan adanya penurunan aktivitas motorik dan jumlah jengukan sebanyak 3 hingga 4 ekor (75-100%). Penurunan aktivitas motorik dan jumlah jengukan merupakan parameter efek depresan pada mencit.¹⁶ Pengamatan perilaku hewan pada parameter lain seperti *straub*, *piloereksi*, *ptosis*, *pineal*, *kornea*, *lakrimasi*, *retablismen*, *fleksi*, *hafner*, *grooming*, *defekasi*, *urinasi*, *salivasi*, *vokalisasi*, *pernafasan*, *tremor*, *writhing*, dan *katalepsi*, tidak terdapat kelainan ataupun penyimpangan aktivitas. Penemuan ini dapat dijadikan pendahuluan untuk menilai aktivitas depresan hewan seperti efek hipnotik-sedatif pada dosis yang aman kepada hewan percobaan.

Pengamatan terhadap mortalitas hewan uji yaitu melihat jumlah kematian setelah pemberian fraksi etil asetat akar pakis tangkur untuk menentukan nilai LD_{50} . Dari semua

kelompok hewan uji tidak diperoleh hewan yang mati setelah pemberian sediaan uji hingga dosis 5.000 mg/kg BB. Nilai LD₅₀ di atas dosis 5.000 mg/kg BB merupakan kategori praktis tidak toksik.¹⁷ Hasil perhitungan indeks organ bahwa indeks organ hati pada dosis 2.000 dan 5.000 mg/kg BB mengalami penurunan yang nilainya berbeda bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol (<0,05), indeks organ merupakan perbandingan bobot organ terhadap bobot badan. Organ-organ vital lainnya seperti lambung, uterus, otak, ginjal, limpa dan jantung tidak ditemukan perubahan indeks organ yang berbeda bermakna apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Pengamatan makroskopik menunjukkan adanya kelainan organ hati hanya pada dosis tinggi yaitu 5000 mg/kg BB, kerusakan hati berupa perlemakan/steatosis berupa massa putih. Steatosis ini terjadi disebabkan karena adanya efek samping dari zat kimia atau adanya kelainan metabolisme karbohidrat dan lemak.^{18,19}

Timbulnya toksisitas dan kelainan organ pada hewan disebabkan oleh suatu zat aktif secara farmakologi dengan dosis yang besar ataupun frekuensi pemakaian lama.^{20,21}

5. Kesimpulan

Berdasarkan pengujian di atas dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat akar pakis tangkur memiliki aktivitas hipnotik-sedatif terhadap mencit putih galur *swiss webster* dengan dosis efektif 50 mg/kg BB. Penggunaan dosis yang aman dari fraksi etil asetat adalah maksimal 1.000 mg/kg BB.

Referensi

1. Suwandi DW, Rostinawati T, Muchtaridi M, Subarnas A. In vitro evaluation of selligueain A effects on the pro-inflammatory mediators production in RAW264.7 murine macrophages. *J HerbMed Pharmacol*. 2021;10(3):313-318. doi:10.34172/jhp.2021.36
2. Suwandi DW, Rostinawati T, Muchtaridi M, Subarnas A. Safety assessment of the *Polypodium feei* root extract: Acute and subchronic studies. *Toxicol Reports*. 2021;8(December 2019):696-704. doi:10.1016/j.toxrep.2021.03.013
3. Fu C, Wang H, Ng WL, Song L, Huang D. Antioxidant Activity and Proanthocyanidin Profile of *Selliguea feei* Rhizomes. 2013:4282-4292. doi:10.3390/molecules18044282
4. Sujana D, Suwandi DW, Rusdiana T, Subarnas A. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Akar Pakis Tangkur (*Polypodium Feei* Meet) Dari Gunung Talaga Bodas Pada Mencit Swiss Webster. *J Ilm Farm Bahari*. 2020;11(2):167. doi:10.52434/jfb.v11i2.856
5. Gertler, R., Brown, C., Mitchell. DH., Dexmedetomidine: A Novel Sedative-Analgesic Agent, *Journal of Baylor Scott & White Health*, 2017, BUMC PROCEEDINGS 2001;14:13–21.
6. Samson E, Ridwan WAH, Baszary CDU. Potensi Sedatif-Hipnotik Daun Kayu Galala (*Erythrina Lithosperma*) Sebagai Kandidat Obat Insomnia. *J Mat Sains dan Teknol*. 2019;20(2):84-94. doi:10.33830/jmst.v20i2.166.2019
7. Peraturan Kepala BPOM Republik Indonesia nomor 7. Pedoman Uji Toksisitas Nonklinis Secara In Vivo. 2014;(No. 875). <http://ditjenpp.kemendiknas.go.id/arsip/bn/2014/bn875-2014.pdf>.
8. AlDawsari, A., et al., Use of sedative-hypnotic medications and risk of dementia: A systematic review and meta-analysis, 2021, *British journal of Clinical Pharmacology*, 8 (4), 1399-1946.
9. Bhosale U, Yegnanarayan R, Pophale P, Zambare M, Somani R. Study of central nervous system depressant and behavioral activity of an ethanol extract of *Achyranthes aspera* (Agadha) in different animal models. *Int J Appl Basic Med Res*. 2011;1(2):104. doi:10.4103/2229-516x.91154
10. Aliya NH, Jutty Levita ED and AS. Analyzing the Interaction of *Selliguea feei* A: A Bioactive Compound of Pakis Tangkur (*Selliguea feei* or *Polypodium feei*) to Cyclooxygenase Enzyme by Molecular Docking. 2011;23(7):3093-3096.

11. Siddiqui SA, Rahman A, Rahman MO, et al. A novel triterpenoid 16-hydroxy betulinic acid isolated from *Mikania cordata* attributes multi-faced pharmacological activities. *Saudi J Biol Sci.* 2019;26(3):554-562. doi:10.1016/j.sjbs.2018.03.002
12. Sarquís PE, Menéndez-Aguado JM, Mahamud MM, Dzioba R. Tannins: The organic depressants alternative in selective flotation of sulfides. *J Clean Prod.* 2014;84(1):723-726. doi:10.1016/j.jclepro.2014.08.025
13. Rachmawati, E., Ulfa, EU., Uji Toksisitas Subkronik Ekstrak Kayu Kuning (*Arcangelisia flava* Merr) terhadap Hepar dan Ginjal, 2018, *Global Medical and Health Communication*, 6(1), 1-6.
14. Suwandi DW, Rostinawati T, Muchtaridi M, Subarnas A. Aktivitas Analgetik Ekstrak dan Fraksi-fraksi Akar Pakis Tangkur (*Polypodium feei.*, METT) Dari Gunung Talaga Bodas Secara In Vivo. *Kartika J Ilm Farm.* 2021;8(1):52. doi:10.26874/kjif.v8i1.280
15. Farrar FC, Darnell L. Pharmacologic Intervention for Pain Management. *Crit Care Nurs Clin NA.* 2017;29(4):427-447. doi:10.1016/j.cnc.2017.08.004
16. Erjon1, Putri Widya Ningsih YR. Efek Sedatif Ekstrak Etanol Umbi Wortel (*Daucus Carota L.*) Pada Mencit Putih Jantan Galur Swiss-Webster. 2019;(2):17-26.
17. Musila MF, Dossaji SF, Nguta JM, Lukhoba CW, Munyao JM. In vivo antimalarial activity, toxicity and phytochemical screening of selected antimalarial plants. *J Ethnopharmacol.* 2013;146(2):557-561. doi:10.1016/j.jep.2013.01.023
18. Renaud HJ, Cui JY, Lu H, Klaassen CD. Effect of diet on expression of genes involved in lipid metabolism, oxidative stress, and inflammation in mouse liver-insights into mechanisms of hepatic steatosis. *PLoS One.* 2014;9(2). doi:10.1371/journal.pone.0088584
19. Baharuddin, Steatosis Pada Hepar dan Fruktosa Dosis Tinggi Pada Penelitian Fruktosa, *Jurnal Kesehatan dan Kedokteran*, 2019; Vol. 1(1), 27-30, <https://doi.org/10.24123/kesdok.V1i1.2484>.
20. Irfayanti, NA., Handayani, NA., Sangka A., Uji Toksisitas Subkronis Ekstrak Herba Suruhan (*Peperomia pellucida* (L.) Kunth) Terhadap Parameter Hematologi Tikus Putih (*Rattus norvegicus*), *Jurnal Mandala Pharmacon Indonesia*, 2023, 9(2), 345-351.
21. Wahyuni, FS., Putri, IN., Arisanti, D., Uji Toksisitas Subkronis Fraksi Etil Asetat Kulit Buah Asam Kandis (*Garcinia cowa* Roxb.) terhadap Fungsi Hati dan Ginjal Mencit Putih Betina, *Jurnal Sains Farmasi dan Klinis*, 2017, 3(2), 202-212.