

---

## **TOKSISITAS ORAL AKUT SINGLE-DOSE EKSTRAK ETANOLIK DAUN GAHARU *Aquilaria malaccensis* Lamk. PADA TIKUS (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) GALUR WISTAR**

**Laksmindra Fitria<sup>1</sup>, Nadhira Cannadianti<sup>2</sup>, and Isma Cahya Putri Gunawan<sup>3</sup>**

<sup>1,2,3</sup>Laboratorium Fisiologi Hewan, Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Sleman,  
D.I. Yogyakarta 55281, Indonesia

Received : 12 Juli 2024

Accepted : 01 Oktober 2024

Published : 30 Oktober 2024

---

### **ABSTRACT**

*Aquilaria malaccensis* Lamk., one of tree species producing agarwood, has been utilized by the people of Southeast Asia (particularly Indonesia and Malaysia) as a component in traditional medicine due to their phytochemical constituents. This study was carried out to assess acute toxicity of oral administration of ethanolic extract of *A. malaccensis* (EEAM) using female Wistar rats as model animal. Procedure in accordance with OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 423 with administration dose of 2000 mg/kg bw (single-dose). Parameters observed including signs of toxicity, body weight, body temperature, hematological profile (complete blood count), as well as evaluation of liver function (ALT and bilirubin) and renal function (BUN and creatinine). Data were analyzed statistically based on one-way ANOVA ( $\alpha=0.05$ ) continued with Duncan's post hoc test ( $\alpha=0.05$ ) and visualized as line charts. Results showed that neither mortality nor sublethal effects were recorded during 14 days of the experiment. The chart exhibited that the group received EEAM demonstrated a comparable trend to the control group for all parameters. Therefore, it can be concluded that EEAM is safe or no-observed-adverse-effect-level (NOAEL) for single-dose oral administration at the dose of 2000 mg/kg bw. If standardized following the Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS), EEAM is classified in Category 5 ( $LD_{50} > 2000$  mg/kg bw). Based on this finding, we will continue to conduct further study to assess the repeated-dose acute oral toxicity of EEAM (subacute period).

**Keywords:** agarwood; drug discovery; safety assessment

*Aquilaria malaccensis* Lamk., salah satu spesies pohon penghasil gaharu, telah dimanfaatkan oleh penduduk Asia Tenggara (terutama Indonesia dan Malaysia) sebagai bahan obat tradisional karena kandungan fitokimianya. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari toksisitas oral akut ekstrak etanolik *A. malaccensis* (EEAM) menggunakan tikus Wistar betina sebagai hewan model. Prosedur sesuai dengan OECD *Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 423* dengan dosis 2000 mg/kg bb (dosis tunggal). Parameter yang diamati meliputi tanda-tanda ketoksikan, berat badan, suhu badan, profil hematologi (hitung darah lengkap), serta evaluasi fungsi hati (aktivitas ALT dan AST) dan fungsi ginjal (kadar BUN dan kreatinin). Data dianalisis secara statistik berdasarkan ANOVA satu arah ( $\alpha=0,05$ ) dilanjutkan dengan uji *post hoc* Duncan's ( $\alpha=0,05$ ) dan divisualisasikan dalam bentuk diagram garis. Hasil menunjukkan bahwa tidak ada kematian maupun efek subletal yang ditemukan dalam kurun waktu 14 hari percobaan. Grafik menunjukkan bahwa kelompok yang diberi EEAM menunjukkan pola yang mirip dengan kelompok kontrol untuk semua parameter. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa konsumsi EEAM dosis tunggal selama periode akut bersifat aman atau *no-observed-adverse-effect-level* (NOAEL) pada dosis 2000 mg/kg bb. Jika distandarisasi mengikuti *Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals* (GHS), EEAM diklasifikasikan dalam Kategori 5 ( $LD_{50} > 2000$  mg/kg bb). Berdasarkan temuan ini, penelitian akan dilanjutkan untuk mempelajari toksisitas oral EEAM dengan dosis berulang dan jangka waktu yang lebih panjang (periode subakut).

**Kata kunci:** gaharu; penemuan obat; uji keamanan

---

**Corresponding Author:**

Laksmindra Fitria

Laboratorium Fisiologi Hewan, Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Sleman, D.I. Yogyakarta 55281, Indonesia

Email: [laksmindraf@ugm.ac.id](mailto:laksmindraf@ugm.ac.id)

---

**PENDAHULUAN**

*Aquilaria malaccensis* Lamk. adalah salah satu spesies pohon gaharu yang banyak tumbuh di Asia Tenggara, khususnya Indonesia. Selain *A.malaccensis*, di Indonesia terdapat 6 spesies *Aquilaria* lainnya, yaitu: *A.beccariana*, *A.crasna*, *A.filarial*, *A.hirta*, dan *A.microcarpa*. Secara tradisional, daun *A.malaccensis* telah dikonsumsi sebagai minuman seduhan (teh) untuk mengobati berbagai penyakit, seperti: penyakit ginjal, hati, TBC, reumatik, malaria, tukak lambung, sakit kepala, insomnia, meningkatkan stamina pria, mencegah masuk angin, meredakan stres, dan membersihkan racun (Ginting *et al.*, 2015). Di Malaysia daun *A.malaccensis* dimanfaatkan untuk mengobati arthritis, asma, asam urat, afrodisiak, stimulan, dan agen karminatif (Razak *et al.*, 2019). Kajian farmakologi melaporkan bahwa daun *A.malaccensis* menunjukkan aktivitas antioksidan, antikanker, antiarthritis, antimikrobia, antibakterial, antifungal, analgesik, antipiretik, antiinflamasi, antihipertensi, antihiperlikemik, antidiabetes, antihiperlipidemia, hepatoprotektif, neurotropik, dan memperbaiki kualitas spermatozoa (Ginting *et al.*, 2015; Razak *et al.*, 2019; Mokhtar *et al.*, 2021). Kajian fitokimia melaporkan bahwa daun *A.malaccensis* mengandung sejumlah metabolit sekunder yang memiliki efek terapeutik, di antaranya:  $\beta$ -sitosterol, asam fenolik, flavonoid, alkaloid, dan terpenoid (Adam *et al.*, 2017). Pohon *A.malaccensis* dan daun yang dapat diolah untuk bahan obat herbal dapat dilihat pada **Gambar 1**.



**Gambar 1.** Pohon, daun segar, dan daun kering gaharu *Aquilaria malaccensis* Lamk. (Sumber: internet)

Metabolit sekunder merupakan produk samping tumbuhan yang berperan dalam mekanisme pertahanan diri terhadap organisme lain dan mengatasi stres dari lingkungan sekitarnya. Metabolit sekunder berpotensi toksik bagi organisme lain. Sementara itu, dosis bahan obat yang tidak tepat dapat menimbulkan berbagai efek samping termasuk keracunan. Oleh karena itu, kajian toksisitas dan keamanan menggunakan hewan coba (uji praklinis) perlu dilakukan (Fitria *et al.*, 2022).

Zat toksik yang diadministrasikan *per oral* pada umumnya menyebabkan gangguan pencernaan, mengurangi bahkan menghilangkan nafsu makan sehingga dapat menurunkan berat badan secara signifikan (Morita *et al.*, 2017). Selain itu, zat toksik mempengaruhi termoregulasi yang berdampak langsung terhadap kondisi fisiologis, perilaku, dan patologis (Gordon *et al.*, 2008). Zat toksik juga dapat menekan sistem imun, meningkatkan kerentanan terhadap penyakit, menyebabkan anemia, disfungsi organ, gangguan metabolisme, hingga masalah psikologis (Wang *et al.*, 2019). Analisis hematologi serta evaluasi fungsi hati dan ginjal menyediakan data yang komprehensif mengenai sifat ketoksikan suatu bahan sebagai fondasi untuk penelitian farmakologi (Fitria *et al.*, 2022). Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari toksisitas ekstrak etanolik daun gaharu *A. malaccensis* (EEAM) yang diadministrasikan *per oral* secara *single-dose* selama periode akut (14 hari) pada tikus (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) Galur Wistar sebagai model hewan.

## **BAHAN DAN METODE**

### ***Ethical Clearance***

Semua prosedur yang berkaitan dengan hewan coba dalam penelitian ini telah memenuhi persyaratan etik untuk penelitian praklinik. Hal ini didukung dengan telah diterbitkannya Sertifikat *Ethical Clearance* oleh Komisi *Ethical Clearance* untuk Penelitian Praklinik Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada (LPPT-UGM) Yogyakarta Nomor 00044/04/LPPT/V/2017 tanggal 2 Mei 2017.

### **Waktu dan Tempat**

Penelitian berlangsung pada Bulan Desember 2017. Pemeliharaan dan perlakuan hewan coba serta analisis darah untuk profil hematologi dilaksanakan di fasilitas hewan (*Animal Room*) Laboratorium Fisiologi Hewan Fakultas Biologi UGM. Proses pembuatan EEAM dan analisis darah untuk evaluasi fungsi hati dan ginjal dilaksanakan di LPPT-UGM.

### **Pengadaan Bahan Uji dan Metode Ekstraksi**

Bahan uji berupa daun gaharu *Aquilaria malaccensis* Lamk. yang diperoleh dari perkebunan gaharu di Kecamatan Jatiluwih, Kabupaten Kediri,

Provinsi Jawa Timur. Daun yang dipilih adalah daun yang tidak diinfeksi oleh bakteri penghasil resin sebagai cikal bakal gaharu. Daun dibersihkan menggunakan air mengalir kemudian dikeringanginkan. Selanjutnya daun dikeringkan dalam inkubator suhu 40 °C dan dihaluskan menjadi serbuk menggunakan blender.

Metode ekstraksi adalah “Soxhletasi” mengikuti *standard operating procedure* (SOP) di LPPT-UGM sebagai berikut: Serbuk daun gaharu dikemas dalam kantong yang dibuat dari kertas saring sebanyak 20 g/kantong, kemudian dimasukkan ke dalam *Apparatus Soxhlet*. Selanjutnya ditambahkan etanol 70 % dan dipanaskan pada suhu 80-90 °C sampai sirkulasi filtrat terlihat jernih. Filtrat diuapkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* dan *waterbath* suhu 60 °C. Ekstrak kental yang diperoleh dituang ke dalam cawan porselin dan dipanaskan kembali menggunakan *waterbath* suhu 70 °C sambil diaduk sesekali. Hasil akhir dimasukkan ke dalam botol gelap, ditutup menggunakan aluminum foil, kemudian disimpan di dalam kulkas untuk mencegah pertumbuhan jamur.

### **Hewan Uji**

Hewan uji berupa 6 ekor tikus (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) Galur Wistar berjenis kelamin betina, umur 2 bulan, berat badan 100-150 g, diperoleh dari LPPT-UGM. Hewan dibagi menjadi 2 kelompok (kontrol dan perlakuan) dengan ulangan 3 ekor/kelompok, dipelihara dalam kandang kaca persegi empat berukuran 38×25×23,5 cm<sup>3</sup> yang diberi penutup kawat tahan karat. Kandang diberi alas tidur (*bedding*) berupa serutan kayu, dilengkapi dengan wadah pakan dan botol minum. Sebelum percobaan dimulai, hewan diaklimasi selama 7 hari di dalam *Animal Room* dengan suhu ruangan 25-29 °C, kelembapan udara 68-81 %, dan siklus gelap:terang 12 jam. Pakan berupa pelet AD-II (P.T. Japfa Comfeed Indonesia) dan air minum berupa air mineral (Sistem Penyediaan Air Minum (SPAM) TOYAGAMA UGM diberikan secara *ad libitum*. Kandang dibersihkan 2× seminggu dengan deterjen dan desinfektan. Prosedur pemeliharaan hewan telah diupayakan mengikuti standar pemeliharaan tikus laboratorium (NRC, 2011).

### **Rancangan Percobaan**

Prosedur uji toksisitas oral akut *single-dose* mengacu pada OECD *Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 423* (OECD, 2002) dengan dosis bahan uji sebanyak 2000 mg/kg bb (*Limit Test*). EEAM diadministrasikan *per oral* dengan volume 1 mL/individu pada awal percobaan (hari ke-0). Sebagai kontrol berupa air suling yang diadministrasikan dengan cara dan volume yang sama.

Parameter yang diamati berupa parameter kualitatif dan kuantitatif. **Parameter kualitatif** berupa tanda-tanda ketoksikan yang meliputi: ada tidaknya

kematian (mortalitas) dan efek subletal (manifestasi klinis) yang diamati melalui pemeriksaan fisik, perilaku/aktivitas individu dan sosial, serta kondisi feses (Fitria *et al.*, 2022). Parameter tersebut dipantau segera setelah pemberian, secara intensif selama 4 jam pasca pemberian, dan dilanjutkan setiap hari hingga hari ke-14. **Parameter kuantitatif** berupa berat badan, suhu badan, profil hematologi (hitung darah lengkap meliputi eritrosit, leukosit, dan trombosit), uji fungsi hati (*alanine aminotransferase*/ALT dan bilirubin), serta uji fungsi ginjal (*blood urea nitrogen*/BUN dan kreatinin). Semua parameter diamati pada hari ke 0, 4, 7, dan 14.

### **Anestesi dan Eutanasi**

Sebelum dilakukan koleksi darah, tikus dianestesi melalui injeksi intramuskular menggunakan *cocktail* Ketamine (100 mg/kg) dan Xylazine (10 mg/kg bb) dengan volume 0,1 mL/100 g bb (Noor *et al.*, 2022). Pada hari terakhir percobaan (hari ke-14), tikus dieutanasi dengan prosedur anestesi yang sama diikuti eksanguinasi intrakardial (AVMA, 2020).

### **Analisis Darah**

Sampel darah untuk analisis profil hematologi dan uji fungsi organ diambil dari *sinus orbitalis* sebanyak 1 mL, ditampung dalam *microtube* 1,5 mL yang telah dilapisi *ethylene-diamine-tetra-acetic acid* (EDTA) sebagai antikoagulan. Profil hematologi dianalisis menggunakan *fully automated hematology analyzer* Sysmex<sup>®</sup>XP-100, sementara uji fungsi organ dilakukan menggunakan *semi automated clinical chemistry analyzer* Microlab<sup>®</sup>300.

### **Analisis data**

Data kualitatif ditampilkan dalam bentuk deskripsi, sedangkan data kuantitatif dianalisis secara statistik berdasarkan *one-way* ANOVA ( $\alpha=0,05$ ) menggunakan IBM<sup>®</sup>SPSS<sup>®</sup>v.23. Jika terdapat perbedaan yang signifikan ( $p<0,05$ ), pengujian dilanjutkan dengan uji *post hoc* Duncan's ( $\alpha=0,05$ ). Hasil ditampilkan dalam bentuk grafik garis untuk visualisasi tren secara lebih jelas. Grafik dilengkapi dengan kisaran *baseline* yang diperoleh berdasarkan nilai terendah dan tertinggi untuk setiap parameter dari populasi hewan dalam penelitian ini yang diukur pada awal percobaan (Poitout-Belissent & McCartney 2010).

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Tanda-tanda ketoksikan**

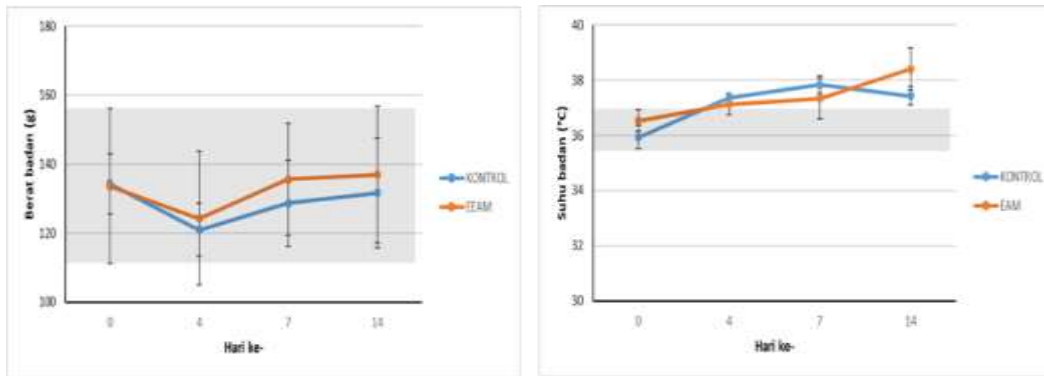
Prosedur uji toksisitas mengikuti OECD karena pemilihan hewan coba, penentuan dosis, dan parameter pengamatan telah terstandarisasi dan diacu secara luas di seluruh dunia. Dari daftar panduan uji toksisitas menurut OECD, prosedur yang dipilih adalah No. 423 dengan pertimbangan bahan uji yang digunakan

berupa ekstrak atau konsentrat sehingga berpotensi menimbulkan kematian (mortalitas) atau penderitaan karena gangguan fisiologis sebagai manifestasi klinis efek subletal (OECD, 2002). Menurut Fitria *et al.* (2022), uji toksisitas tidak hanya berfokus pada penentuan LD<sub>50</sub> atau LC<sub>50</sub> karena tidak semua bahan kimia menyebabkan kematian pada hewan coba. Hewan mungkin tetap hidup selama percobaan tetapi menderita karena kesehatannya menurun akibat gangguan fisiologis. Oleh karena itu, tanda-tanda ketoksikan subletal harus diamati.

Kandang tikus dalam percobaan ini dibuat dari kaca transparan sehingga aktivitas/perilaku hewan dapat diamati tanpa mendekati kandang. Rodensia memiliki kapasitas pendengaran dan pembauan yang sensitif sehingga intervensi manusia sangat mempengaruhi aktivitas/perilakunya (Burke & Kobrina, 2022). Selain itu, ukuran tinggi kandang memungkinkan tikus dapat leluasa bergerak secara vertikal. Selain menggali, berdiri tegak dan memanjat adalah perilaku alami yang penting bagi tikus. Kandang konvensional beratap rendah tidak memungkinkan gerakan vertikal sehingga tikus menjadi stres. Jika hal ini terjadi maka menyebabkan bias sehingga data tidak valid (Makowska & Weary, 2016).

Selama 14 hari percobaan, tidak ada tikus yang mati atau sakit berdasarkan pengamatan fisik secara umum. Aktivitas/perilaku individual maupun sosial pada kelompok EEAM tidak menunjukkan perbedaan dibandingkan kontrol. Hal ini berarti EEAM tidak menimbulkan efek toksik yang mengganggu fisiologis normal maupun psikologis (*distress*) pada tikus. Tikus yang sakit atau stres bersifat pasif/aktivitas berkurang, nafsu makan-minum menurun, destruktif/agresif dan vokal jika dipegang. Tikus yang tidak sehat mempunyai penampilan yang berantakan karena tidak melakukan *grooming*, rambut tampak kotor, kasar, dan tegak (piloereksi), postur membungkuk, mata sayu dan mengeluarkan cairan seperti darah akibat sekresi porfirin, hidung mengeluarkan cairan seperti ingus, nafas cepat dan dangkal disertai suara mengorok, serta detak jantung tidak teratur (Carstens & Moberg 2000; Wang *et al.*, 2019). Tanda-tanda ini tidak ditemukan pada semua hewan dalam percobaan ini.

Zat toksik yang diadministrasikan *per oral* pada umumnya menyebabkan gangguan pencernaan (diare), menurunkan/menghilangkan nafsu makan-minum (Morita *et al.*, 2017). Berat badan merupakan indikator penting adanya efek toksik suatu ekstrak atau obat-obatan. Penurunan berat badan bersifat signifikan jika terjadi secara cepat/akut sebesar 15-30 % (Mudimba *et al.*, 2020) . Hasil penelitian menunjukkan bahwa EEAM tidak menyebabkan diare atau gangguan pencernaan lain karena konsistensi feses normal sebagaimana kontrol. Berat badan sempat mengalami penurunan pada hari ke-4 namun kembali naik dengan pola yang sama dengan kontrol sehingga penurunan berat badan dalam hal ini bukanlah efek toksik EEAM (**Gambar 2**).



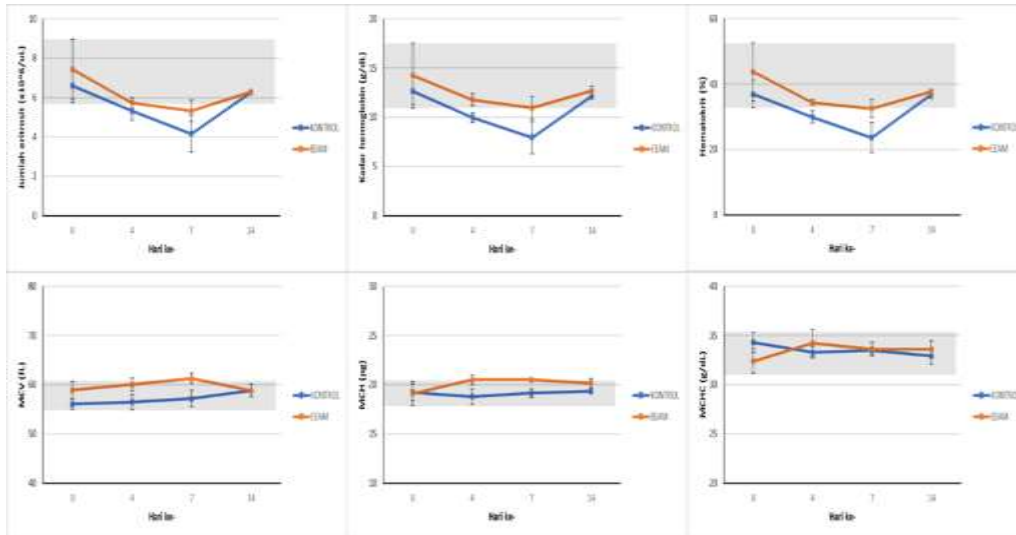
**Gambar 2.** Berat badan dan suhu badan tikus dalam percobaan uji toksisitas oral akut *single-dose* ekstrak etanolik daun gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk.)

Suhu badan tikus laboratorium rentan terhadap berbagai zat toksik. Oleh karena suhu badan secara langsung mempengaruhi reaksi biokimiawi dalam tubuh, maka perubahan suhu badan akibat toksikan akan berdampak langsung terhadap kondisi fisiologis, perilaku, dan patologis (Gordon *et al.*, 2008). Hasil penelitian menunjukkan bahwa terjadi peningkatan suhu badan baik pada kelompok EEAM maupun kontrol secara signifikan hingga di atas kisaran *baseline*. Pada tikus, paparan zat toksik menyebabkan penurunan suhu badan (hipotermia) (Gordon *et al.*, 2008), sedangkan peningkatan suhu badan (hipertermia) akut disebabkan oleh stres (Mota-Rojas *et al.*, 2021). Hal ini mempertegas bahwa perubahan suhu badan dalam penelitian ini bukanlah efek toksik EEAM. Namun demikian perlu dipelajari lebih lanjut apakah benar tikus mengalami stres. Menurut Shevchyk *et al.* (2021) profil hematologi dapat menggambarkan apakah hewan laboratorium mengalami stres selama percobaan berlangsung dan mempelajari sejauh mana stres tersebut mengganggu kondisi fisiologis dan kesehatan hewan

### Profil hematologi

**Eritrosit** berkaitan dengan fungsi penyediaan oksigen untuk metabolisme tubuh dalam rangka aktivitas. Bahan obat tradisional tidak menutup kemungkinan bersifat toksik terhadap darah (hemotoksik) yang dapat dilihat dari penurunan parameter eritrosit (Amin *et al.*, 2020). Hasil penelitian menunjukkan bahwa terjadi penurunan jumlah eritrosit, hematokrit, dan hemoglobin secara signifikan hingga di bawah *baseline* pada hari ke-7 percobaan (indikasi anemia) namun kemudian naik kembali ke dalam kisaran *baseline* (**Gambar 3**). Karena pola ini juga terjadi pada kontrol, maka hal ini bukan efek toksik EEAM. Indeks eritrosit (MCV, MCH, MCHC) penting dilakukan untuk diagnosis anemia. Nilai ini diperoleh dari hasil perhitungan jumlah eritrosit, hematokrit, dan hemoglobin (Sonali *et al.*, 2023). Dapat dilihat bahwa nilai ketiga indeks eritrosit berada di dalam kisaran *baseline* sehingga penurunan parameter eritrosit dalam percobaan ini tidak mengakibatkan anemia (**Gambar 3**). Proses pengambilan darah secara

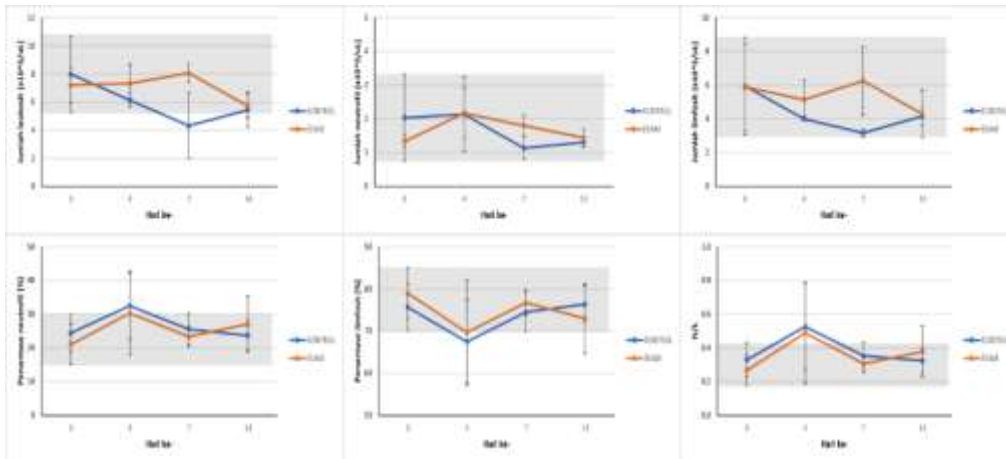
berulang (serial) dapat menurunkan parameter eritrosit, hal ini juga terjadi pada percobaan toksikologi dan toksikokinetik oleh Hattori *et al.* (2020) menggunakan tikus betina.



**Gambar 3.** Profil eritrosit tikus dalam percobaan uji toksisitas oral akut *single-dose* ekstrak etanolik daun gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk.)

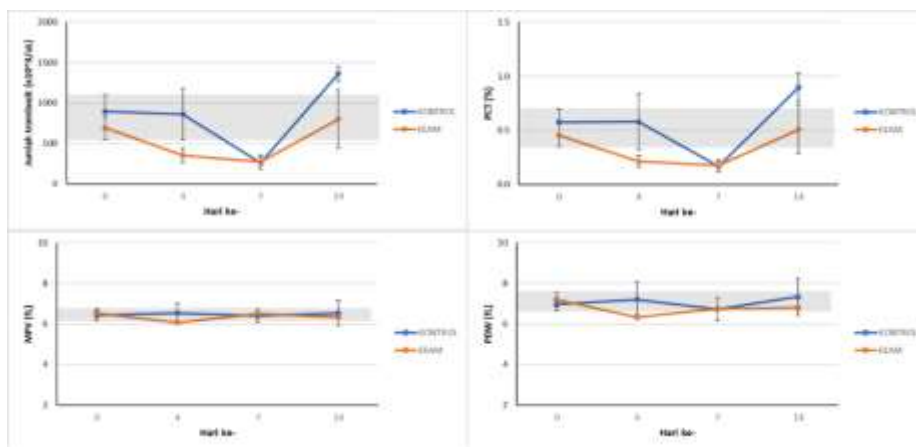
**Leukosit** dapat meningkat atau menurun jumlahnya sebagai respons terhadap masuknya zat toksik (Olayanju *et al.*, 2021). Dalam percobaan ini jumlah leukosit total dan diferensial (neutrofil dan limfosit) cenderung menurun seiring waktu. Penurunan bersifat aman karena tidak signifikan dan masih berada di dalam kisaran *baseline* (**Gambar 4**). Perhitungan leukosit diferensial pada penelitian ini hanya berfokus pada neutrofil dan limfosit dengan pertimbangan keduanya merupakan sel utama dalam respons imun sehingga perubahan persentasenya dapat menggambarkan respons imun yang sedang berlangsung. Neutrofil adalah sel utama dalam respons imun nonspesifik/akut, sedangkan limfosit adalah sel utama dalam respons imun spesifik/adaptif (Fitria & Sarto, 2014). Hasil menunjukkan bahwa persentase neutrofil dan limfosit pada kelompok EEAM identik dengan kontrol. Hal ini mengindikasikan bahwa EEAM tidak direspons sebagai antigen berbahaya yang membangkitkan respons imun. Hasil perhitungan rasio persentase neutrofil dan limfosit (N/L) juga menunjukkan hasil yang identik antara kelompok EEAM dan kontrol (**Gambar 4**). Menurut Hickman (2017), perubahan nilai N/L mengindikasikan hewan mengalami stres selama percobaan berlangsung. Dapat disimpulkan bahwa intervensi EEAM maupun prosedur yang dilakukan selama percobaan tidak memicu stres pada hewan coba.





**Gambar 4.** Profil leukosit tikus dalam percobaan uji toksisitas oral akut *single-dose* ekstrak etanolik daun gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk.)

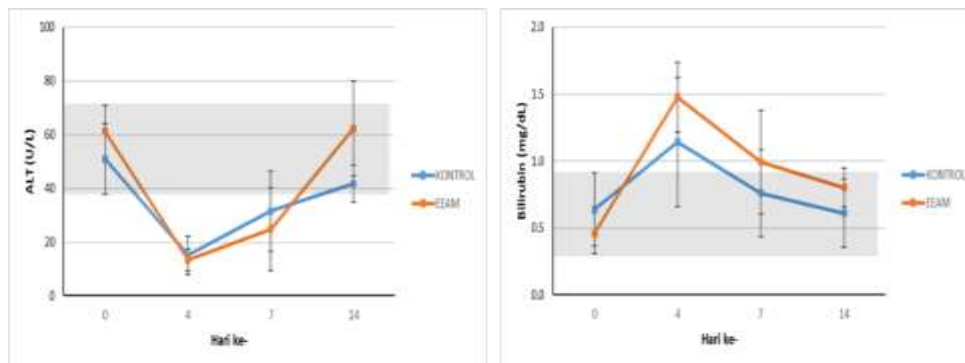
**Trombosit** adalah komponen darah yang dinamis melakukan berbagai fungsi fisiologis seperti hemostasis, trombosis, koagulasi, pertahanan tubuh terhadap mikrobia, dan peradangan. Oleh karena itu, pada kondisi normal/sehat selama periode akut jumlahnya dapat berfluktuasi tanpa indikasi klinis trombositopenia atau trombositosis. Indeks trombosit (PCT, MPV, PDW) merupakan parameter penting untuk mendiagnosis gangguan hematologis yang berkaitan dengan aktivasi sistem koagulasi, infeksi berat, trauma, reaksi inflamasi sistemik, dan penyakit trombotik. Indeks trombosit memberikan gambaran yang komprehensif tentang tingkat keparahan suatu penyakit atau kondisi kesehatan (Samuel *et al.*, 2020). Hasil menunjukkan bahwa jumlah trombosit cenderung menurun seiring waktu sebagaimana jumlah eritrosit dan leukosit. Sementara itu indeks trombosit kelompok EEAM berhimpitan dengan kontrol dan berada di dalam kisaran *baseline* (**Gambar 5**). Kedua hal ini mempertegas bahwa EEAM bersifat tidak toksik. Efek yang timbul terhadap profil hematologi adalah akibat dari teknis pengambilan darah secara berulang (Hattori *et al.*, 2020).



**Gambar 5.** Profil trombosit tikus dalam percobaan uji toksisitas oral akut *single-dose* ekstrak etanolik daun gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk.)

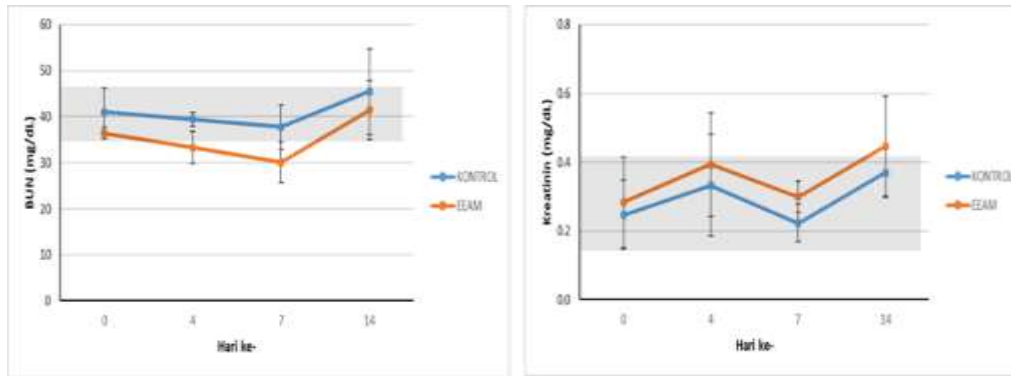
### Uji fungsi hati dan ginjal

*Alanine aminotransferase* (ALT) dan bilirubin merupakan parameter utama untuk evaluasi fungsi dan kesehatan hati. ALT adalah enzim sitosol yang ditemukan dalam konsentrasi tinggi di sel-sel hati (hepatosit), sementara itu bilirubin adalah produk akhir pemecahan hemoglobin dari eritrosit yang tua dan rusak. Bilirubin tidak larut air dan tidak dapat dikeluarkan melalui urin. Bilirubin harus dikonjugasi di hati sehingga larut air sebagai bilirubin glukuronida, dan kemudian disekresikan ke dalam empedu dan usus. Cedera hepatosit menyebabkan ALT dan bilirubin keluar dari sel dan masuk ke dalam sirkulasi darah sehingga peningkatan nilai ALT dan bilirubin terdeteksi dalam plasma atau serum (Lala *et al.*, 2023). Hasil menunjukkan bahwa nilai ALT turun signifikan pada hari ke-4 tetapi kemudian naik kembali ke kisaran *baseline*. Karena pola aktivitas ALT kelompok EEAM mirip dengan kontrol maka fenomena ini bukanlah efek toksik EEAM. Penjelasan yang sama berlaku pada hasil pengukuran bilirubin. Kadar bilirubin kelompok EEAM naik signifikan pada hari ke-4 tetapi kemudian berangsur turun kembali ke kisaran *baseline* dengan pola yang sama dengan kontrol. Dengan demikian kenaikan kadar bilirubin ini juga bukan efek toksik EEAM (**Gambar 6**).



**Gambar 6.** Aktivitas *alanine aminotransferase* (ALT) dan kadar bilirubin darah tikus dalam percobaan uji toksisitas oral akut *single-dose* ekstrak etanolik daun gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk.)

*Blood urea nitrogen* (BUN) dan kreatinin merupakan parameter utama untuk evaluasi fungsi dan kesehatan ginjal. Urea merupakan produk akhir metabolisme protein, sementara kreatinin adalah produk akhir metabolisme kreatin di otot. Kedua limbah metabolisme ini secara konsisten diekskresikan melalui ginjal dalam bentuk urin. Oleh karena itu, peningkatan kadar keduanya dalam plasma atau serum menjadi petunjuk kerusakan fungsi ginjal (Fitria *et al.*, 2019). Hasil menunjukkan bahwa kadar BUN dan kreatinin kelompok EEAM memiliki pola yang sama dengan kontrol, sebagaimana nilai ALT dan bilirubin, sehingga dapat disimpulkan bahwa EEAM aman bagi fungsi ginjal (**Gambar 7**).



**Gambar 7.** Kadar *blood urea nitrogen* (BUN) dan kreatinin darah tikus dalam percobaan uji toksisitas oral akut *single-dose* ekstrak etanolik daun gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk.)

Berdasarkan hasil pengamatan tanda-tanda ketoksikan, berat badan, suhu badan, profil hematologi, serta evaluasi fungsi hati dan ginjal maka dapat dinyatakan bahwa administrasi *per oral* EEAM dosis 2000 mg/kg secara *single-dose* pada tikus Wistar betina bersifat aman/tidak toksik selama periode akut. Hasil penelitian ini selaras dengan Razak *et al.* (2019b) yang melakukan uji toksisitas akut dan subakut menggunakan ekstrak akuosa *A.malaccensis* pada tikus Sprague-Dawley, dan juga selaras dengan Musa *et al.* (2019) yang melakukan percobaan serupa pada mencit (*Mus musculus*). Uji toksisitas subkronik ekstrak akuosa *A.malaccensis* pada mencit juga bersifat aman/tidak toksik (Batubara *et al.*, 2016). Mengacu pada penelitian-penelitian tersebut, maka uji toksisitas lanjutan perlu dilakukan guna mendapatkan informasi ilmiah terkait toksisitas EEAM jika dikonsumsi secara berulang dalam jangka waktu yang lebih panjang (periode subakut sampai dengan kronis)

## KESIMPULAN

Administrasi *per oral* ekstrak etanolik gaharu *Aquilaria malaccensis* Lamk. secara *single-dose* 2000 mg/kg bb tidak menyebabkan kematian maupun efek subletal yang signifikan pada tikus Wistar betina sebagai hewan coba atau *no observed adverse effect level* (NOAEL). Jika distandarisi berdasarkan *Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals* (GHS), maka ekstrak etanolik gaharu *A.malaccensis* dapat diklasifikasikan dalam Kategori 5 ( $LD_{50} > 2000$  mg/kg bb).

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala Laboratorium Fisiologi Hewan Fakultas Biologi UGM yang telah memberi izin dan fasilitas untuk penelitian ini, Ibu Dr. Tri Rini Nuringtyas, S.Si., M.Sc. atas ide riset dan pengadaan sampel daun gaharu yang sangat berharga, serta Kepala dan para Staf

LPPT-UGM yang telah membantu dalam penelaahan *Ethical Clearance*, penyediaan hewan coba, pembuatan ekstrak, dan pengujian sampel darah.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Adam, A.Z., Lee, S.Y. & Mohamed, R. (2017). Pharmacological properties of agarwood tea derived from *Aquilaria (Thymelaeaceae)* leaves: An emerging contemporary herbal drink. *Journal of Herbal Medicine*, 10: 37-44. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2017.06.002>
- Amin, M.T., Fatema, K., Karmakar, P., Rahman, M.A., Haque, T. & Chouchuri, M.S.K. (2020). Investigation of hemotoxicologic potential of an ayurvedic preparation “Kutajarista” used in Sprue syndrome after chronic administration to male Sprague-Dawley rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 14(8): 08-315. <https://doi.org/10.5897/AJPP2020.5174>
- AVMA. (2020). *AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals*. 2020 edition. Schaumburg, IL: American Veterinary Medical Association. <https://www.avma.org/sites/default/files/2020-02/Guidelines-on-Euthanasia-2020.pdf>
- Batubara, R., Surjanto, S., Sihombing, T.M. & Ginting, H. (2016). The safety of tea agarwood (*Aquilaria malaccensis*) from tree induction through test of toxicity subchronic oral 90 days. *Asian Journal of Natural Product Biochemistry*, 14(2): 69-76. <https://doi.org/10.13057/biofar/f140205>
- Burke, K., & Kobrina, A. (2022). Rodentia Sensory Systems. In: *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior*. Cham: Springer Nature. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-55065-7\\_765](https://doi.org/10.1007/978-3-319-55065-7_765)
- Carstens, E. & Moberg, G.P. (2000). Recognizing pain and distress in laboratory animals. *Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) Journal*, 41(2): pp.62–71. <https://doi.org/10.1093/ilar.41.2.62>
- Fitria, L., Gunawan, I.C.P.G., Sanjaya, W.B.T. & Meidianing, M.I. (2022). 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): jtbb69389 <https://doi.org/10.22146/jtbb.69389>
- Fitria, L., Lukitowati, F. & Kristiawati, D. (2019). Nilai rujukan untuk evaluasi fungsi hati dan ginjal pada tikus (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) galur Wistar. *Jurnal Pendidikan Matematika dan IPA*, 10(2): 243-258. <https://doi.org/10.26418/jpmipa.v10i2.34144>

- Fitria, L. & Sarto, M. 2014. Profil hematologi tikus (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) galur Wistar jantan dan betina umur 4, 6, dan 8 minggu. *Biogenesis*, 2(2): 94-100. <https://doi.org/10.24252/bio.v2i2.473>
- Ginting, R.B., Batubara, R. & Ginting, H. (2015). Tingkat kesukaan masyarakat terhadap teh daun gaharu *Aquilaria malaccensis* Lamk. dibandingkan teh lain yang dijual dipasaran. *Peronema Forestry Science Journal*, 4(3): 214-217.
- Gordon, C.J., Spencer, P.J., Hotchkiss, J., Miller, D.B., Hinderliter, P.M. & Pauluhn, J. (2008). Thermoregulation and its influence on toxicity assessment. *Toxicology*, 244: 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.10.030>
- Hattori, N., Takumi, A., Saitu, K. & Saito, Y. 2020. Effects of serial cervical or tail blood sampling on toxicity and toxicokinetic evaluation in rats. *The Journal of Toxicological Sciences*, 45(10): 599-609. <https://doi.org/10.2131/jts.45.599>
- 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. <https://doi.org/10.1038/labam.1298>
- Lala, V., Zubair, M. & Minter, D.A. (2023). "Liver Function Tests". In: StatPearls [Online]. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482489/> [Accessed: 09-Juli-2024]
- Makowska, I.J. & Weary, D.M. (2016). The importance of burrowing, climbing and standing upright for laboratory rats. *Royal Society Open Science*, 3: 160136. <http://dx.doi.org/10.1098/rsos.160136>
- Mokhtar, A.M.A., Zan, H.H.M. & Ta, M.M. (2021). Overview of medicinal properties and toxicities of agarwood species. *EDUCATUM Journal of Science Mathematics and Technology* 8(2): 1-16. <http://dx.doi.org/10.37134/ejsmt.vol8.2.1.2021>
- Morita, J., Izumi, T., Ogawa, B., Ban, Y., Takagi, H., Sasaki, M. & Tsutsumi, S. (2017). Effects of reduced food intake for 4 weeks on physiological parameters in toxicity studies in dogs. *The Journal of Toxicological Sciences*, 42(1): 31-42. <https://doi.org/10.2131/jts.42.31>
- Mota-Rojas, D., Miranda-Cortes, A., Casas-Alvarado, A., Mora-Medina, P., Boscato-Funes, L. & Hernandez-Avalos, I. (2021). Neurobiology and modulation of stress-induced hyperthermia and fever in animal. *Abanico Veterinario*, 11: 1-17. <https://doi.org/10.21929/abavet2021.11>

- Mudimba, T.N., Mbaria, J., Maitho, T. & Tadrera, T. (2020). Acute and subacute toxicity evaluation of aqueous extracts of *Carpobrotus edulis* in Sprague Dawley rats. *The Journal of Phytopharmacology (Pharmacognosy and Phytomedicine Reasearch)*, 9(4), 265-269. <https://doi.org/10.31254/phyto.2020.9409>
- Musa, N.H.C., Zain, H.H.M., Ibrahim, H. & Jamil, N.N.M. (2019). Evaluation of acute and subacute oral toxicity effect of *Aquilaria malaccensis* Leaves Aqueous Extract in Male ICR Mice. *Natural Product Sciences*, 25(2): 157-164. <https://doi.org/10.20307/nps.2019.25.2.157>
- Noor, S.M., Wahyuwardani, S., Bakrie, B., Wasito, W., Praharani, L., Nurhayati, I.S. & Widiyanti, P.N. (2022). *Penanganan Rodensia dalam Penelitian Sesuai Kaidah Kesejahteraan Hewan. Edisi Revisi*. Jakarta: IAARD Press. <https://repository.pertanian.go.id/handle/123456789/15579>
- NRC. (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8<sup>th</sup> edition. National Research Council. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington, DC: The National Academies Press. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/>
- OECD. (2002), *Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method* OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Paris: The Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) Publishing. <https://doi.org/10.1787/9789264071001-en>
- Olayanju, A.O., Kyesmen, N.I., Jacob, R.B., Adeniyi, T.D., Enitan, S.S. & Olayanju, A.J. (2021). Effects of anti-sickling polyherbal mixture on haematological indices in normal and anaemia-induced rabbits. *Asian Journal of Medicine and Health*, 19(12): 15-26. <https://doi.org/10.9734/AJMAH/2021/v19i1230413>
- Poitout-Belissent, F.M. & McCartney, J.E. (2010). Interpretation of Hematology Data in Preclinical Toxicological Studies. In: *Schalm's Veterinary Hematology*. 6<sup>th</sup> edition. Ames, IA: Blackwell Publishing Limited, a John Wiley & Sons Publishing Limited.
- Razak, R.N.H.A., Ismail, F., Isa, M.L.M., Wahab, A.Y.A., Muhammad, H., Ramli, R. & Ismail, R.A.S.R. (2019a). Ameliorative effects of *Aquilaria malaccensis* leaves aqueous extract on reproductive toxicity induced by Cyclophosphamide in male rats. *The Malaysian Journal of Medical Sciences*, 26(1): 44-57. <https://doi.org/10.21315/mjms2019.26.1.4>

- Razak, R.N.H.A., Rahman, S.A., Hamdan, A.H., Ramli, R., Isa, M.L.M., Muhammad, H. & Hassan, N.F.N. (2019b). Evaluation of acute and sub-acute oral toxicity of the aqueous extract of *Aquilaria malaccensis* leaves in Sprague Dawley rats. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 27(1): 20-32. <https://doi.org/10.35118/apjmabb.2019.027.1.03>
- Samuel, D., Bhat, A.N. & Prabhu, V.M. (2020). Platelet indices as predictive markers of prognosis in critically ill patients: A prospective study. *Indian Journal of Critical Care Medicine*, 24(9): 817-822. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10071-23574>
- Shevchyk, L.O., Kravets, N.Y. & Grod, I.M. 2021. The effect of stress on the hematological indicators of rats *Rattus norvegicus F. Domesticus* in the conditions of the biological experiment. *Medicini Perspektivi*, 26(1): 69-77, <https://doi.org/10.26641/2307-0404.2021.1.227735>
- Sonali, S., Saloni, S., Ahlawat, D., Prajapati, T. & Singh, A.K. (2023). Role of red cell indices in the diagnosis of diseases. *Proceeding of National Conference: Recent Trends in Medical Diagnostic Technology*. Meerut. ISBN No. 987-81-964676-0-9. Pp. 336-340.
- Wang, W. Dong, Z., Zhang, J., Zhou, X., Wei, X., Cheng, F., Li, B. & Zhang, J. (2019). Acute and subacute toxicity assessment of oxyclozanide in Wistar rats. *Frontiers in Veterinary Science*, 6: 294. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00294>