

Evaluasi Keamanan dari Pengembangan Formula Nanopartikel Kurkumin pada Mencit dan Potensi Antioksidan *In-Vitro*

(Safety Evaluation of Curcumin Nanoparticle Formula in Mice and Antioxidants Potency In-Vitro)

NI MADE DWI SANDHIUTAMI*, RIKA SARI DEWI, SONDANG KHAIRANI, SANG AYU MADE WIDYADARI

Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Jalan Raya Lenteng Agung, Srengseng Sawah Jagakarsa, Jakarta Selatan, 12640, Indonesia

Diterima 9 Januari 2022, Disetujui 7 April 2022

Abstrak: Kurkumin memiliki berbagai aktivitas seperti antioksidan, anti-inflamasi, antitumor, dan antibakteri. Bioavailabilitas kurkumin rendah dan perlu dioptimalkan. Pembuatan nanopartikel kurkumin dengan beberapa pelarut merupakan salah satu cara untuk meningkatkan bioavailabilitas kurkumin. Penelitian ini bertujuan menguji keamanan nanopartikel kurkumin melalui uji toksisitas akut dan subkronis serta aktivitas antioksidan formula nanopartikel kurkumin. Uji toksisitas akut dilakukan dengan metode OECD 425, menggunakan perangkat AOT425StatPgm untuk penentuan LD₅₀. Uji toksisitas subkronik dilakukan dengan metode OECD 407 menggunakan 4 kelompok dosis yaitu normal, dosis 50;100; dan 200 mg/kg BB selama 28 hari, serta dilakukan evaluasi berat badan, parameter biokimia klinis, dan parameter hematologi. Uji aktivitas antioksidan kurkumin dan nanopartikel kurkumin secara *in vitro*, dilakukan dengan menggunakan DPPH. Hasil penelitian menunjukkan yaitu nilai LD₅₀ nanopartikel kurkumin >5000 mg/kgBB dan hasil uji toksisitas subkronik ($p>0,05$) tidak menunjukkan adanya perbedaan bermakna pada AST, ALT, BUN, kreatinin, albumin dan hematologi dibandingkan dengan kelompok kontrol. Nilai rata-rata IC₅₀ kurkumin dan nanopartikel kurkumin adalah 118,76 μ g/mL dan 90,87 μ g/mL. Dapat disimpulkan bahwa nanopartikel kurkumin aman dan tidak mempengaruhi fungsi ginjal dan hati serta aktivitas antioksidan formulasi nanopartikel kurkumin lebih besar dibandingkan dengan kurkumin.

Kata kunci: nanopartikel kurkumin, toksisitas akut, toksisitas subkronik, antioksidan, DPPH.

Abstract: Curcumin has various activities such as antioxidant, anti-inflammatory, antitumor, and antibacterial. The bioavailability of curcumin is low and needs to be optimized. The manufacture of curcumin nanoparticles with several solvents is one way to increase the bioavailability of curcumin. This study aims to examine the safety of curcumin nanoparticles through acute and subchronic toxicity tests and the antioxidant activity of the formula. Acute toxicity test was performed by OECD 425 method, using AOT425StatPgm device for the LD₅₀. Subchronic toxicity test was carried out by OECD 407 method using 4 groups: normal, a dose of 50;100; and 200 mg/kg BW for 28 days, then evaluate body weight, clinical biochemistry, and hematology. An antioxidant activity test was carried out using DPPH. The results showed were the LD₅₀ value of curcumin nanoparticles was >5000 mg/kg BW and the results of the subchronic toxicity test ($p>0.05$) did not show any significant differences in AST, ALT, BUN, creatinine, albumin, and hematology compare to the normal group. The IC₅₀ of curcumin and curcumin nanoparticles were 118.76 μ g/mL and 90.87 μ g/mL, respectively. It can be concluded that curcumin nanoparticles are safe and do not affect kidney and liver function and the antioxidant activity of the curcumin nanoparticle formulation is greater than that of curcumin.

Keywords: curcumin nanoparticles, acute toxicity, subchronic toxicity, antioxidant, DPPH.

*Penulis korespondensi
Email: dwisandhiutami@univpancasila.ac.id

PENDAHULUAN

INDONESIA merupakan tempat tumbuh bagi 80 persen tanaman obat yang ada di dunia yang diantaranya sudah digunakan sebagai bahan baku obat tradisional. Salah satu bahan alam yang telah banyak diuji memiliki efek farmakologi adalah kurkumin. Kurkumin merupakan senyawa polifenol dari *Curcuma longa* yang tidak larut dalam air yang bersifat lipofilik, tetapi larut dalam etanol, dimetilsulfoksida dan aseton. Dalam dua dekade terakhir, telah banyak penelitian tentang kurkumin dikarenakan kemampuannya sebagai antikanker, antioksidan, anti-inflamasi, antitumor dan antibakteri⁽¹⁾. Hanya saja penggunaan senyawa kurkumin dalam pengobatan memiliki beberapa kekurangan seperti ketidaklarutan kurkumin dalam air, dapat terdegradasi dalam pH alkali dan dapat mengalami fotodegradasi⁽²⁾. Selain itu, kurkumin memiliki penyerapan pada usus yang rendah, serta waktu pencernaan yang terlalu cepat dalam tubuh, sehingga dalam penggunaannya kurkumin menjadi terbatas⁽³⁾.

Upaya untuk meningkatkan penyerapan di saluran cerna adalah dengan modifikasi bentuk kurkumin yaitu menjadi bentuk nanopartikel. Modifikasi kurkumin menjadi bentuk nanopartikel dapat meningkatkan kelarutannya sehingga akan meningkatkan penyerapan dan bioavailabilitasnya serta dapat memberikan efek terapi secara cepat dan optimal⁽⁴⁾.

Modifikasi bentuk kurkumin menjadi bentuk nanopartikel telah dikembangkan, dievaluasi dan dikarakterisasi oleh peneliti sebelumnya. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Arozal dkk. (2021), sediaan nanopartikel kurkumin dibuat dengan mendispersikan kurkumin ke dalam pelarut campur serta menggunakan polimer kitosan dan ditautkan dengan Natrium Tripolifosfat (NaTTP)⁽⁵⁾. Setiap pelarut campur yang digunakan memiliki tingkat toksisitas yang berbeda-beda sehingga perlu diketahui tingkat toksisitas nanopartikel kurkumin. Dengan modifikasi tersebut, ukuran partikel kurkumin menjadi lebih kecil. Pengubahan ukuran partikel ke dalam skala nano dapat menghasilkan peningkatan bioavailabilitas serta ketersediaan obat didalam organ. Peningkatan jumlah obat dalam darah pada penghantaran sistemik juga akan meningkatkan resiko munculnya efek samping maupun efek balik, hingga pada resiko tercapainya batas kadar toksik⁽⁶⁾.

Pengembangan formula nanopartikel kurkumin agar dapat digunakan dalam pengobatan harus melalui berbagai pengujian, baik pengujian keamanan atau toksisitas dan aktivitas. Uji toksisitas penting untuk dilakukan untuk menjamin keamanan sediaan saat digunakan. Selain itu, sediaan nanopartikel

kurkumin juga banyak ditujukan untuk digunakan dalam bentuk suplemen ataupun sebagai obat kanker, yang dimana dalam penggunaannya digunakan untuk penggunaan secara jangka panjang. Hingga saat ini belum ada data yang mendukung informasi keamanan mengenai sediaan nanopartikel tersebut. Oleh karena itu, agar sediaan dapat digunakan secara aman dibutuhkan pengujian toksisitas sediaan nanopartikel kurkumin tersebut. Keamanan dalam penggunaan obat tradisional berkaitan dengan segi toksikologi dan efek yang tidak dikehendaki pada obat tradisional. Untuk mendapatkan obat tradisional yang aman, profil toksisitas penting untuk diteliti lebih jauh seperti halnya pada obat sintetik⁽⁷⁾.

Secara umum toksisitas dibedakan menjadi toksisitas akut, toksisitas subkronik dan toksisitas kronik⁽⁸⁾. Salah satu metode yang dapat digunakan untuk uji toksisitas adalah metode OECD (*The Organisation for Economic Co-operation and Development*). OECD merupakan standar yang diterima secara internasional untuk menguji keamanan produk, meliputi bahan kimiawi, pestisida, perawatan dan lain-lain. Metode ini dipilih untuk menguji keamanan dengan memperkirakan dosis toksik senyawa tersebut. Metode ini dianggap sebagai metode yang lebih ideal dikarenakan metode ini menggunakan jumlah hewan coba yang sedikit sehingga sesuai dengan kriteria *animal welfare* yang lebih baik, aplikasi metode yang lebih mudah, waktu uji yang relatif cepat serta dapat sekaligus memperkirakan nilai LD₅₀ dari suatu senyawa⁽⁹⁾.

Hasil pengembangan formula nanopartikel kurkumin juga perlu diteliti secara ilmiah aktivitasnya, salah satunya adalah dengan membuktikan aktivitas antioksidan yang lebih baik dibandingkan kurkumin tanpa modifikasi. Sebagai senyawa antioksidan, kurkumin dapat mengurangi atau mencegah berbagai kerusakan sel. Secara umum, antioksidan merupakan senyawa yang dapat menunda, memperlambat, dan mencegah proses oksidasi, atau secara khusus merupakan zat yang dapat mencegah terjadinya reaksi radikal bebas dalam oksidasi lipid. Aktivitas antioksidan kurkumin diperoleh dari gugus fenolik OH yang ditunjukkan dengan adanya penghambatan lipid peroksidasi dan penangkal radikal bebas DPPH (*1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl*, radikal oksida nitrit).⁽¹⁰⁾ Berdasarkan uraian tersebut, maka dilakukan uji toksisitas akut sediaan nanopartikel kurkumin menggunakan metode OECD 425 dan pengujian toksisitas subkronik dengan metode OECD 407 pada hewan coba mencit serta uji aktivitas antioksidan hasil pengembangan formulasi nanopartikel kurkumin secara *in vitro*.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Bahan yang digunakan yaitu Kurkumin (PT. Plamed Green Science Limited); Kitosan (Aldrich, Indonesia); Kremofor (Aldrich, Indonesia); Natrium Tripolifosfat (PT. Brataco); Tween 80; Gliserin; Etanol 70%; Propilen Glikol; DMSO; Maltodekstrin; CMC Na; Etanol 96%; Aqua Desilata; Na EDTA 10%; Pereaksi AST (Reiged Diagnostics); Pereaksi ALT (Reiged Diagnostics); Pereaksi BUN (Reiged Diagnostics); Pereaksi Kreatinin (Reiged Diagnostics); Pereaksi Albumin (Reiged Diagnostics); Vitamin C; serbuk DPPH; Methanol pro analisis dan hewan coba mencit jenis kelamin betina dan jantan dengan galur DDY berumur 2-3 bulan dengan berat 20-30 gram.

ALAT. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Timbangan Analitik AG204 (Mettler, Amerika); Alat-Alat Gelas (Pyrex, Jerman); Spektrofotometer UV-Vis 1900-UV (Shimadzu, Jepang); *Hematology Analyzer* MEK 6450 K (Nihon, Jepang); *Microlab 300 & 300 LX EliTech Clinical Systems; Sputi*; Sonde; Botol Coklat; Mikropipet (Dragonlab); Pipa Kapiler Darah; Tabung Mikrotube K₃EDTA (Vaculab); Tabung Appendorf; Sentrifugator PLC-03 (Gemmy, Taiwan). Perangkat lunak berupa AOT425StatPgm (*Westat, U.S Enviromental Protection Agency*).

METODE. Pembuatan Nanopartikel Kurkumin. PKitosan dilarutkan dalam asam asetat glasial menggunakan *magnetic stirer*. Senyawa aktif kurkumin ditambahkan pelarut campur (propilen glikol, etanol 70%, DMSO, tween 80, gliserin, dan kremofor). Kemudian ditambahkan larutan kitosan 1% dan diaduk menggunakan menggunakan *magnetic stirer*. Selanjutnya ditetesi dengan NaTTP dalam *magnetic stirer* rpm 300 hingga terbentuk nanopartikel. Setelah itu, nanopartikel tetap distirer diatas magnetic stirer selama 15 menit agar didapat larutan nanopartikel kurkumin yang stabil. Pembuatan dan karakterisasi nanopartikel kurkumin yang digunakan pada penelitian ini, telah dilakukan pada penelitian sebelumnya⁽⁵⁾.

Pembuatan Serbuk Nanopartikel Kurkumin. Nanopartikel kurkumin dikeringkan dengan menggunakan pengering semprot (*spray drying*) dengan maltodekstrin sebagai bahan pengisi. Suhu *inlet/outlet* yang digunakan sebesar 160°C dan 80°C⁽¹¹⁾.

Pengujian Toksisitas Akut. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dan dilakukan setelah mendapatkan persetujuan etik dari Komite Etik

Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia-RSUPN Dr. Cipto Mangunkusumo dengan nomor: KET-65/UN2.F1/ETIK/PPM.00.02/2021. Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Srengseng Sawah Jagakarsa, Jakarta Selatan. Uji toksisitas akut dilakukan untuk mengetahui adanya efek toksik yang dapat timbul setelah pemberian nanopartikel kurkumin secara akut serta untuk menentukan nilai LD₅₀ nanopartikel kurkumin. Hewan uji yang digunakan mencit, terlebih dahulu dilakukan aklimatisasi dalam waktu 1 minggu. Kondisi ruangan percobaan juga dijaga setiap hari. Suhu ruangan diatur pada rentang 27 ± 2°C, dengan kelembapan ruangan pada rentang 50-70%. Pencahayaan pada mencit disesuaikan dengan aturan OECD yaitu pada 12 jam terang dan 12 jam gelap. Dosis uji diberikan secara oral menggunakan sonde lambung dengan dosis tunggal.

Pengujian toksisitas akut OECD 425 (*Up-and-Down Procedure*) dilakukan sebagai berikut: Dalam waktu 48 jam, mencit diberikan dosis secara bertahap. Respon pada mencit menentukan perlakuan pada mencit selanjutnya. Pada pengujian pertama dilakukan pemberian dosis awal pada mencit yaitu dengan dosis 175 mg/kg BB. Apabila hewan tersebut hidup, maka hewan selanjutnya diberikan dosis yang lebih tinggi tetapi apabila mencit mati atau sekarat, mencit selanjutnya diberikan dengan dosis yang lebih rendah. Pemberian dosis dengan cara ini dilakukan secara berulang hingga memenuhi kriteria penghentian pengujian oleh OECD. Pengujian dihentikan bila memenuhi kriteria tiga hewan hidup pada batas atas pengujian yaitu 5000 mg/kg BB. Lima pengulangan muncul pada 6 hewan yang diujikan. Ketika dosis terendah saat ditemukan hewan uji yang hidup, setelah itu dilakukan uji pada konsentrasi diatas dosis terendah tersebut dan uji pada kedua konsentrasi ini dilakukan sebanyak 2 kali serta pengujian dihentikan apabila ditemukan 3 kali kematian pada 4 konsentrasi uji yang sama. Pengamatan hewan uji pertama dilakukan secara individual minimal 30 menit sampai dengan 24 jam kemudian dilakukan hingga 7 hari kecuali jika hewannya mati maka pengamatan dihentikan. Berdasarkan OECD 425, waktu pengamatan adalah 14 hari, maka dilakukan pengamatan dalam waktu 14 hari sebagai data pembanding. Pengamatan pada hewan uji dilakukan untuk mendapatkan informasi adanya pengaruh pemberian sediaan uji terhadap aktivitas hewan uji dan gejala toksisitas yang timbul pada hewan uji. Pengamatan gejala klinis berdasarkan kriteria yang ditentukan oleh OECD 425 yang nantinya akan menjadi data kualitatif. Selain itu dilakukan pengamatan pada gejala toksisitas melalui observasi

pada tremor, konvulsi, salivasi, diare, alergi, koma, reaksi pada kulit, mata, *righting reflex* dan aktivitas. Data dan pelaporan hasil pengujian disajikan dalam bentuk tabel meliputi jumlah hewan, berat badan saat kematian serta parameter gejala toksisitas yang terjadi. Penentuan LD₅₀ dilakukan secara statistik mengikuti prinsip *maximum likelihood method*. Seluruh dosis dan respon hewan uji yang dihasilkan dimasukkan ke dalam software AOT425StatPgm untuk kemudian ditentukan estimasi nilai LD₅₀⁽¹²⁾.

Pengujian Toksisitas Subkronik. Uji Toksisitas Subkronik yang dilakukan pada penelitian ini mengacu pada metode OECD 407: *Acute Oral Toxicity – Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents* yang berlangsung selama 28 hari dengan menggunakan 4 kelompok dosis yaitu kelompok kontrol normal, kelompok dosis 50 mg/kg BB, kelompok dosis 100 mg/kg BB, dan kelompok dosis 200 mg/kg BB. Tiap kelompok dosis menggunakan 5 ekor mencit betina dan 5 ekor mencit jantan. Sediaan uji berupa nanopartikel kurkumin diberikan pada hewan uji setiap hari atau minimal 5 hari dalam 1 minggu selama 28 hari. Percobaan dimulai dengan melakukan aklimatisasi terhadap hewan uji di ruang percobaan selama kurang lebih 7 hari. Empat puluh ekor hewan uji dikelompokkan secara acak sehingga penyebaran berat badan merata untuk semua kelompok dosis dengan variasi berat badan tidak lebih dari 20% dari rata-rata berat badan⁽¹³⁾. Setelah dilakukan uji toksisitas subkronik dilakukan pengambilan darah melalui sinus orbitalis menggunakan pipa kapiler. Sebanyak 0,5 mL darah dimasukkan kedalam tabung mikrotube K₃EDTA yang telah diisi antikoagulan (EDTA) sebanyak 10 µL. Pemeriksaan profil hematologi dilakukan secara *automatic* dengan prinsip *electrical impedance* (WBC, RBC, RDW, platelet), Kolorimetri (Hemoglobin), Kalkulasi (MCV, MHC, MCHC, Hematokrit) menggunakan alat *Auto Hematology Analyzer* Nihon Kohden MEK 6450 K di Laboratorium Pusat Studi Satwa Bogor. Pemeriksaan biokimia klinis dilakukan untuk parameter AST (*Aspartate aminotransferase*) atau SGOT (*Serum glutamic axaloacetic transaminase*), ALT (*Alanine aminotransferase*) atau SGPT (*Serum glutamic pyruvic transaminase*), BUN (*Blood Urea Nitrogen*), Kreatinin, Albumin dengan mengikuti prosedur yang terdapat pada kit pengujian.

Analisis Data Pengujian Toksisitas Subkronik. Hasil analisis data diberikan dalam bentuk nilai rata-rata ± SD. Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan metode *oneway ANOVA* yang sebelumnya data telah di uji homogenitas dan normalitasnya. Apabila terdapat perbedaan antar kelompok maka dilakukan uji dengan metode *least*

significancy difference (LSD) atau biasa disebut uji Beda Nyata Terkecil (BNT). Semua analisis statistik dilakukan menggunakan program IBM SPSS V.22 pada tingkat kepercayaan 95% (p=0,05).

Pengukuran Aktivitas Antioksidan Secara *In Vitro*. Dibuat larutan DPPH (0,4 mM) dalam metanol proanalisis hingga 100,0 mL, kemudian ditempatkan dalam botol gelap. Larutan vitamin C untuk dibuat dengan konsentrasi 2 µg/mL, 4 µg/mL, 6 µg/mL, 8 µg/mL, 10 µg/mL. Nanopartikel kurkumin dan kurkumin dibuat dalam konsentrasi 30 µg/mL, 60 µg/mL, 90 µg/mL, 120 µg/mL dan 150 µg/mL. Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan dengan masing-masing konsentrasi zat uji ditambahkan 1 ml larutan DPPH 0,4 mM kemudian ditambahkan metanol sampai tanda 5,0 ml lalu dihomogenkan. Setelah homogen diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Serapan diukur pada panjang gelombang 515 nm. Parameter yang digunakan untuk uji penangkapan radikal DPPH ini adalah nilai IC₅₀. IC₅₀ yaitu konsentrasi antioksidan (µg/mL) yang mampu menghambat 50% aktivitas radikal bebas DPPH. Nilai IC₅₀ didapatkan dengan cara membuat kurva hubungan konsentrasi (x) terhadap % hambatan (y). nilai IC₅₀ didapat dengan menggunakan persamaan $y = a + b x$, dimana y= 50 dan nilai x menunjukkan nilai IC₅₀.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Toksisitas Akut Nanopartikel Kurkumin. Pada penelitian ini, nilai LD₅₀ dari nanopartikel kurkumin adalah lebih besar dari 5000 mg/kgBB. Nilai tersebut menunjukkan nanopartikel kurkumin termasuk ke dalam kategori praktis tidak toksik, baik dalam waktu 24 jam sampai dengan 14 hari pada dosis terkecil 175 mg/kg BB maupun terbesar 5000 mg/kg BB tidak menunjukkan adanya kematian pada hewan uji. Hasil penentuan nilai LD₅₀ dengan menggunakan perangkat lunak AOT425StatPgm, dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil LD₅₀ nanopartikel kurkumin.

Dosis (mg/kgBB)	Respon Jangka Pendek	Respon Jangka Panjang
175	O	O
550	O	O
1750	O	O
5000	O	O
5000	O	O
5000	O	O

Keterangan: O = hewan hidup, X= hewan mati

Pada tabel 1. dapat dilihat pada semua dosis pemberian tidak ditemukan adanya kematian baik pada pengamatan jangka pendek (48 jam) ataupun pengamatan jangka panjang (14 hari). Pengujian dihentikan setelah memenuhi kriteria penghentian pengujian berdasarkan OECD, dimana tidak ditemukan adanya kematian hewan uji pada pemberian dosis tertinggi yaitu 5000 mg/kgBB sebanyak tiga kali. Hasil pengamatan perilaku hewan uji yang telah dilakukan pada menit ke-30 sampai dengan 14 hari menunjukkan tidak terjadi reaksi alergi pada mencit. Hewan uji mampu menggelayut dan membalikan badannya dengan cepat serta tidak terjadi gejala tremor, salivasi, diare, konvulsi ataupun koma serta mata dan kulit hewan uji masih normal yang ditandai dengan tidak berdirinya bulu pada hewan uji dan mata hewan uji berwarna jernih. Pengamatan terhadap gejala tremor dilakukan dengan mengamati terjadinya gerakan gemetar pada hewan coba dimana menurut Grimaldi G, tremor merupakan serentetan gerakan involunter, ritmis, berbentuk getaran, pada satu atau lebih bagian tubuh⁽¹⁴⁾.

Pengamatan terhadap gejala konvulsi dilakukan dengan mengamati terjadinya kejang pada hewan coba dimana pengamatan dilakukan dengan membandingkan kelompok uji dengan kelompok normal. Pengamatan terhadap gejala diare dilakukan dengan mengamati feses pada hewan coba, dimana feses normal pada mencit adalah berwarna hitam, tidak lembek dan tidak berlendir. Pengamatan terhadap gejala koma dilakukan dengan mengamati ada tidaknya gangguan kesadaran pada hewan uji dimana menurut Pulm *et al.*, koma merupakan penurunan kesadaran maksimal dimana tidak terdapat respons fisiologis terhadap stimulus eksternal atau kebutuhan dalam diri sendiri⁽¹⁵⁾. Selain itu, pada dosis 175 mg/kgBB tidak terjadi penurunan aktivitas motorik pada hewan dibandingkan dengan hewan uji pada kelompok normal. Hasil tersebut menunjukkan tidak adanya gejala toksisitas yang terjadi pada pemberian dosis 175 mg/kg BB secara akut.

Hasil pengamatan perilaku hewan uji pada dosis 550 mg/kg BB menunjukkan tidak adanya reaksi alergi pada mencit baik pada menit ke-30 setelah pemberian hingga 14 hari setelah pemberian. Hewan uji mampu menggelayut dan membalikan badannya dengan cepat serta tidak terjadi gejala tremor, salivasi, diare, konvulsi ataupun koma serta mata dan kulit hewan uji masih normal. Selain itu tidak terjadi penurunan aktivitas motorik pada hewan. Hasil tersebut menunjukkan tidak adanya gejala toksisitas yang terjadi pada pemberian dosis 550 mg/kg BB secara akut. Hasil pengamatan perilaku hewan uji pada dosis 1750 mg/kg BB dan 5000 mg/kg BB

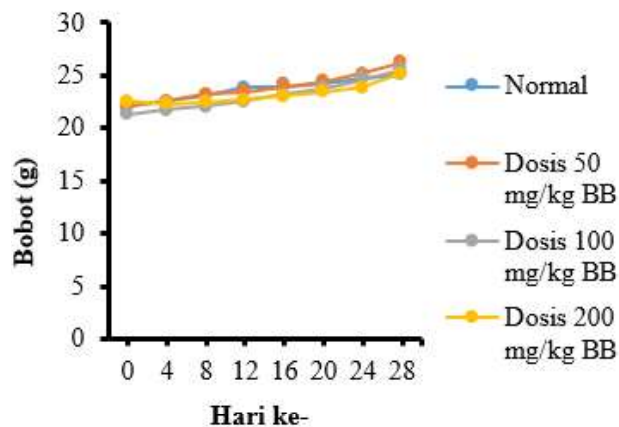
menunjukkan tidak adanya reaksi alergi pada mencit pada menit ke-30 setelah pemberian hingga 14 hari setelah pemberian. Hewan uji mampu menggelayut dan membalikan badannya dengan cepat serta tidak terjadi gejala tremor, salivasi, diare, konvulsi ataupun koma serta mata dan kulit hewan uji masih normal. Selain itu tidak terjadi penurunan aktivitas motorik pada hewan. Hasil tersebut menunjukkan tidak adanya gejala toksisitas yang terjadi pada pemberian dosis 1750 mg/kg BB dan 5000 mg/kg BB secara akut.

Uji Toksisitas Subkronik Nanopartikel Kurkumin. Pada penelitian ini hasil pengujian toksisitas subkronik yang meliputi evaluasi berat badan mencit, pemeriksaan hematologi dan pemeriksaan biokimia klinis, menunjukkan tidak terdapat gejala toksisitas pada hewan coba pada semua tingkatan dosis.

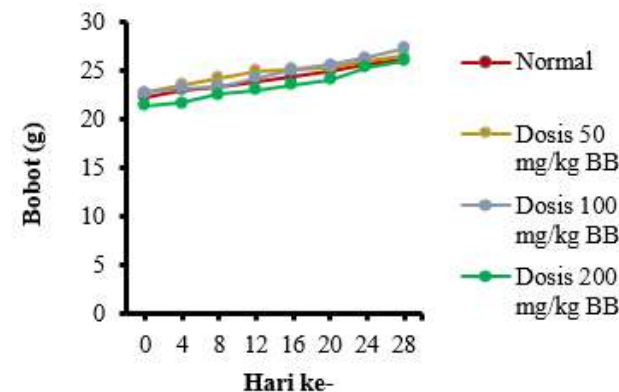
Evaluasi Berat Badan Mencit Selama 28 Hari.

Grafik pemantauan berat badan mencit jantan selama uji toksisitas subkronik dapat dilihat pada gambar 1 dan pemantauan berat badan mencit betina selama uji toksisitas subkronik dapat dilihat pada gambar 2.

Berdasarkan tabel dan grafik diatas dapat terlihat bahwa berat badan mencit jantan rata-rata sebelum perlakuan hingga hari ke-28 perlakuan dari setiap kelompok dosis berfluktuasi. Namun secara umum



Gambar 1. Peningkatan berat badan mencit jantan sampai hari ke-28



Gambar 2. Peningkatan berat badan mencit betina sampai hari ke-28

terdapat peningkatan pada semua kelompok uji, hal tersebut menunjukkan tidak adanya gejala toksisitas ataupun kondisi yang dapat menyebabkan hilangnya nafsu makan pada mencit.

Berdasarkan tabel dan grafik diatas dapat terlihat bahwa berat badan mencit betina rata-rata pada hari sebelum perlakuan hingga hari ke-28 perlakuan dari setiap kelompok berfluktuasi. Namun secara umum, terdapat peningkatan berat badan pada semua kelompok uji, hal tersebut menunjukkan tidak adanya gejala toksisitas yang dihasilkan zat uji ataupun kondisi yang dapat menyebabkan hilangnya nafsu makan pada mencit. Perubahan berat badan secara nyata merupakan indikator yang paling mudah terlihat dan menjadi indikator awal dari adanya efek toksik sampel uji yang diberikan.

Parameter Hematologi. Pada uji toksisitas subkronik ini dilakukan pemeriksaan parameter hematologi sesuai dengan pedoman OECD 407 : *Acute Oral Toxicity – Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents*. Adapun hasil pemeriksaan hematologi pada mencit betina dan jantan dapat dilihat pada tabel 2.

Pengukuran darah mencit yang diberikan nanopartikel kurkumin meliputi delapan parameter yaitu kadar RBC (*Red Blood Cell*), WBC (*White Blood Cell*), HGB (Hemoglobin), MCV (*Mean Corpuscular Volume*), HCT (Hematokrit), MCH (*Mean Corpuscular Hemoglobin*), MCHC (*Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration*), dan PLT (Platelet atau Trombosit). Dalam pemeriksaan hematologi, terdapat beberapa hal yang harus diperhatikan terutama adalah antikoagulan, jeda waktu setelah sampel diperoleh hingga dilakukan pemeriksaan dan penyimpanan. Penyimpanan sampel darah serta perbedaan antikoagulan yang digunakan dapat menentukan validitas dan reliabilitas hasil pengujian hematologis. Penundaan pemeriksaan dapat menyebabkan perubahan hasil uji dikarenakan sifat

darah yang mudah rusak apabila dibiarkan di dalam kondisi yang tidak ideal⁽¹⁶⁾.

Sel darah merah (Eritrosit) merupakan salah satu sel darah dengan jumlah paling banyak dibandingkan dengan sel darah lainnya. Fungsi utama sel darah merah adalah membawa oksigen dari paru-paru ke jaringan untuk metabolisme dalam tubuh. Menurut Kusumawati dkk., nilai sel darah merah normal pada mencit adalah $6,86 - 11,7 \times 10^6/\mu\text{L}$ ⁽¹⁷⁾. Nilai sel darah merah pada kelompok uji memiliki nilai sedikit lebih rendah dari nilai normal. Hal tersebut dapat terjadi akibat adanya variasi genetik ataupun perbedaan kondisi lingkungan yang menyebabkan perbedaan nilai normal pada mencit.

Leukosit merupakan sel darah putih yang diproduksi oleh jaringan hematopoetik untuk jenis bergranula (polimorfonuklear) dan jaringan limpatik untuk jenis tak bergranula (mononuklear), berfungsi dalam sistem pertahanan tubuh terhadap infeksi⁽¹⁸⁾. Nilai sel darah putih normal pada mencit adalah $5,1 - 11,6 \times 10^3/\mu\text{L}$ ⁽¹⁷⁾. Nilai sel darah putih pada keempat kelompok uji, baik pada mencit betina maupun jantan berada dalam rentang nilai sel darah putih normal pada mencit.

Hemoglobin merupakan protein utama dalam tubuh manusia yang berfungsi untuk mengangkut oksigen dari paru-paru ke jaringan perifer dan mengangkut CO_2 dari jaringan perifer ke paru-paru⁽¹⁹⁾. Nilai hemoglobin normal pada mencit adalah $10,7 - 11,5 \text{ g/dL}$ ⁽¹⁷⁾. Nilai hemoglobin pada mencit pada beberapa kelompok uji memiliki nilai sedikit lebih rendah dibandingkan dengan nilai normal. Hal tersebut dapat terjadi akibat adanya variasi genetik ataupun perbedaan kondisi lingkungan yang menyebabkan perbedaan nilai normal pada mencit. Hematokrit adalah presentase volume seluruh eritrosit yang ada di dalam darah dan diambil dalam volume eritrosit yang dipisahkan dari plasma dengan cara pemutaran di dalam tabung khusus dalam waktu dan kecepatan

Tabel 2. Hasil pemeriksaan hematologi mencit betina dan jantan.

Parameter	Satuan	Normal		Dosis 50 mg/kg BB		Dosis 100 mg/kg BB		Dosis 200 mg/kg BB	
		Betina	Jantan	Betina	Jantan	Betina	Jantan	Betina	Jantan
WBC	$10^3/\mu\text{L}$	$7,3 \pm 1,6$	$7,9 \pm 3,2$	$7,9 \pm 1,6$	$8,1 \pm 3,1$	$8,1 \pm 2,8$	$8,4 \pm 2,1$	$8,3 \pm 1,7$	$8,44 \pm 1,8$
RBC	$10^6/\mu\text{L}$	$6,4 \pm 0,6$	$5,6 \pm 0,6$	$5,7 \pm 0,7$	$5,9 \pm 0,7$	$6,1 \pm 0,9$	$6,8 \pm 1,0$	$5,8 \pm 0,6$	$5,6 \pm 0,7$
HGB	g/dL	$11,4 \pm 1,0$	$9,84 \pm 1,1$	$10,5 \pm 1,1$	$10,1 \pm 1,0$	$10,4 \pm 1,6$	$11,5 \pm 1,8$	$10,3 \pm 0,6$	$9,4 \pm 1,2$
HCT	%	$34,8 \pm 2,6$	$30,0 \pm 3,0$	$32,4 \pm 2,9$	$31,5 \pm 3,0$	$32,2 \pm 5,2$	$35,2 \pm 5,0$	$30,9 \pm 2,5$	$30,3 \pm 4,0$
MCV	fL	$54,5 \pm 1,2$	$53,3 \pm 3,5$	$55,4 \pm 2,0$	$53,6 \pm 2,8$	$53,2 \pm 3,6$	$51,5 \pm 1,4$	$53,4 \pm 3,8$	$54,5 \pm 3,1$
MCH	Pg	$17,7 \pm 0,2$	$17,5 \pm 1,3$	$17,9 \pm 0,7$	$17,2 \pm 0,8$	$17,2 \pm 0,8$	$16,8 \pm 0,8$	$17,8 \pm 0,8$	$16,9 \pm 0,4$
MCHC	g/dL	$32,6 \pm 0,7$	$32,8 \pm 0,7$	$32,3 \pm 1,1$	$32,0 \pm 0,4$	$32,4 \pm 0,7$	$32,7 \pm 0,9$	$33,4 \pm 2,1$	$31,1 \pm 1,1$
PLT	$10^3/\mu\text{L}$	$548,8 \pm 41$	$579,6 \pm 56$	$655,4 \pm 44$	$669,0 \pm 37$	$689,0 \pm 29$	$683,6 \pm 25$	$646,8 \pm 39$	$671,4 \pm 36$

Data disajikan dalam rerata \pm SD

tertentu yang nilainya dinyatakan dalam persen⁽²⁰⁾. Nilai hematokrit normal pada mencit adalah 33,1 – 49,9%⁽¹⁷⁾. Nilai hematokrit pada kelompok uji baik jantan maupun betina memiliki nilai sedikit lebih rendah dari nilai normal. Hal tersebut dapat terjadi akibat adanya variasi genetik ataupun perbedaan kondisi lingkungan yang menyebabkan perbedaan nilai normal pada mencit. Indeks Korpuskular atau *Mean Corpuscular Value* adalah suatu nilai rata-rata yang dapat memberi keterangan mengenai rata-rata eritrosit dan mengenai banyaknya hemoglobin per-eritrosit⁽²¹⁾. Menurut John Wiley *et al.*, nilai normal MCV; MCH; dan MCHC pada mencit masing-masing sebesar 45 – 55 fl; 15 – 18 pg; dan 30-38 g/dl⁽²²⁾. Nilai MCV, MCH dan MCHC pada keempat kelompok uji baik pada mencit betina ataupun jantan berada dalam rentang nilai normal MCV, MCH serta MCHC pada mencit.

Platelet atau Trombosit adalah fragmen sitoplasma megakariosit yang tidak berinti dan terbentuk di sumsum tulang. Trombosit matang berukuran 2-4 μm , berbentuk cakram bikonveks dengan volume 5-8 fl⁽²³⁾. Fungsi utama trombosit adalah membentuk sumbat yang merupakan respons hemostatik normal terjadinya cedera vaskular yang dapat terjadi kebocoran spontan darah melalui pembuluh halus. Fungsi trombosit ada tiga yaitu perlekatan (adhesi), penggumpalan (agregasi), dan reaksi pelepasan⁽²⁴⁾. Nilai platelet normal pada mencit adalah 100-1100 $\times 10^3/\text{uL}$ ⁽²²⁾. Nilai platelet pada keempat kelompok uji baik pada mencit betina ataupun jantan berada dalam rentang nilai normal platelet pada mencit. Berdasarkan hasil pengukuran parameter hematologi yang terdiri dari RBC, WBC, HCT, MCH, HGB, MCHC, MCV, dan PLT didapatkan bahwa parameter tersebut tidak memiliki perbedaan bermakna ($p > 0,05$) antara kelompok normal dengan ketiga kelompok dosis yaitu 50 mg/kg BB, 100 mg/kg BB, dan 200 mg/kg BB. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pemberian nanopartikel kurkumin selama 28 hari tidak mempengaruhi profil hematologi.

Parameter Biokimia Klinis. Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan biokimia klinis pada mencit jantan dan betina setelah pemberian nanopartikel kurkumin selama 28 hari. Pemeriksaan biokimia klinis dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian nanopartikel kurkumin selama 28 hari terhadap fungsi ginjal dan hati. Hasil pemeriksaan biokimia klinis pada mencit betina dan jantan dapat dilihat pada tabel 3.

Berdasarkan hasil yang diperoleh kadar BUN (*Blood Urea Nitrogen*) dan Kreatinin sebagai parameter fungsi ginjal menunjukkan nilai kedua parameter tersebut tidak berbeda bermakna antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol ($p > 0,05$). Hal tersebut menunjukkan jika pemberian sediaan nanopartikel kurkumin selama 28 hari pada ketiga dosis uji tidak menimbulkan gangguan pada kadar BUN (*Blood Urea Nitrogen*) dan Kreatinin. Menurut Mitruka (1977), kadar BUN normal pada mencit sebesar 13,9-28,3 mg/dl⁽²⁵⁾, dimana nilai BUN pada keempat kelompok uji baik pada mencit jantan maupun betina berada dalam nilai normal. Menurut Kusumawati (2004), nilai kreatinin normal pada mencit adalah 0,3 – 1,00 mg/dL⁽¹⁷⁾. Nilai kreatinin pada keempat kelompok uji baik pada mencit jantan ataupun betina berada di atas nilai normal. Hal tersebut dapat terjadi akibat adanya variasi genetik dengan mencit yang digunakan maupun perbedaan kondisi lingkungan.

Nitrogen urea berasal dari metabolisme protein normal dan diekskresikan melalui urin. Kemampuan ginjal untuk mengekskresikan urea dapat ditentukan melalui jumlah ureum pada darah. Urea akan terakumulasi dalam darah apabila ginjal mengalami kerusakan. Terjadinya peningkatan urea dalam darah dapat menunjukkan kegagalan ginjal dalam melakukan fungsi filtrasinya. Kadar BUN juga dapat dipengaruhi oleh kurangnya zat makanan serta hepatotoksitas yang merupakan efek umum dari beberapa toksikan⁽²⁶⁾. Urea terbentuk dalam jalur siklik yang dikenal hanya sebagai siklus urea, dalam siklus ini gugus amino yang disumbangkan oleh ammonia dan L-aspartat

Tabel 3. Hasil pemeriksaan biokimia klinis mencit betina.

Parameter	Satuan	Kelompok							
		Normal		Dosis 50 mg/kg BB		Dosis 100 mg/kg BB		Dosis 200 mg/kg BB	
		Betina	Jantan	Betina	Jantan	Betina	Jantan	Betina	Jantan
AST	u/L	49,8 \pm 5,2	50,3 \pm 3,9	51,3 \pm 4,3	54,1 \pm 4,3	51,7 \pm 3,0	52,1 \pm 5,1	52,3 \pm 3,2	54,0 \pm 4,8
ALT	u/L	28,7 \pm 3,7	28,8 \pm 3,5	30,4 \pm 6,3	30,5 \pm 3,2	32,1 \pm 4,0	33,0 \pm 4,5	33,8 \pm 4,2	32,9 \pm 2,9
Albumin	g/dL	0,4 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1
BUN	mg/dL	27,9 \pm 0,6	27,3 \pm 0,5	28,3 \pm 0,6	27,5 \pm 0,6	28,3 \pm 0,5	27,8 \pm 0,5	29,2 \pm 1,1	28,1 \pm 1,2
Kreatinin	mg/dL	1,7 \pm 0,1	1,7 \pm 0,1	1,8 \pm 0,1	1,8 \pm 0,1	1,8 \pm 0,1	1,8 \pm 0,1	1,9 \pm 0,1	1,9 \pm 0,1

Data disajikan dalam rerata \pm SD

diubah menjadi urea. Urea dilarutkan dalam darah (pada manusia konsentrasi 2,5 – 7,5 mmol/liter) dan dikeluarkan oleh ginjal dalam urin, selain itu sejumlah kecil urea diekskresikan (bersama dengan natrium klorida dan air) dalam keringat⁽²⁷⁾.

Kreatinin adalah suatu bentuk anhidrida dari kreatin yang sebagian besar dibentuk didalam otot melalui proses dehidrasi non enzimatis kreatin fosfat yang bersifat *irreversible*. Kreatin terdapat pada otot, otak, dan darah dalam bentuk fosfokreatin maupun bentuk bebas. Zat ini umumnya berasal dari metabolisme otot. Kreatinin dianggap sebagai penanda fungsi ginjal yang lebih baik dibandingkan dengan urea dikarenakan kadarnya tidak terpengaruh secara bermakna oleh faktor non ginjal sehingga kreatinin merupakan indikator fungsi ginjal yang spesifik. Meskipun kreatinin serum merupakan indikator fungsi ginjal yang spesifik, peningkatan kadar secara bermakna hanya dapat dilihat ketika nilai laju filtrasi glomerulus (GFR) berkurang sekitar 50%⁽²⁸⁾. Terdapat beberapa faktor yang dapat menyebabkan peningkatan kadar kreatinin didalam darah, antara lain dehidrasi, kelelahan yang berlebihan, penggunaan obat yang bersifat toksik pada ginjal, gangguan fungsi pada ginjal disertai infeksi, penyakit hipertensi yang tidak terkontrol, dan penyakit ginjal⁽²⁶⁾.

Pemeriksaan kadar kreatinin dan urea didalam darah dapat digunakan untuk mengetahui adanya disfungsi atau gangguan fungsi pada ginjal. Gangguan fungsi ginjal dapat mengakibatkan penurunan kecepatan filtrasi pada ginjal sehingga terjadi penumpukan sisa metabolisme (ureum dan kreatinin) dalam darah. Hal tersebut menyebabkan kadar ureum dan kreatinin dalam darah dapat digunakan sebagai indikator derajat kesehatan ginjal⁽²⁸⁾.

Selain BUN dan kreatinin, dilakukan pengukuran pada parameter fungsi hati yaitu AST, ALT dan Albumin dimana berdasarkan hasil penelitian, tidak terdapat perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol ($p > 0,05$). Hasil tersebut menunjukkan pemberian sediaan uji selama 28 hari menunjukkan tidak adanya gangguan pada parameter fungsi hati dan ginjal.

AST (*Aspartate aminotransferase*) dan ALT (*Alanine aminotransferase*) berperan dalam metabolisme asam amino alanin menjadi α -ketoglutarat dalam siklus asam sitrat. Kadar enzim ALT yang tinggi terdapat pada hati. Kadar AST dan ALT yang melebihi kontrol menunjukkan adanya gangguan terhadap keutuhan sel hepatosit. Jika ada kerusakan hepatosit, AST dan ALT akan dikeluarkan ke dalam aliran darah sehingga ditemukan kadar yang tinggi di dalam darah. Selain terdapat pada hati, AST juga terdapat pada otot, jantung, dan ginjal. ALT dianggap

lebih spesifik dibandingkan dengan AST dikarenakan kadar AST dapat meningkat pada kasus cedera otot jantung atau rangka sementara kadar ALT tidak⁽²⁹⁾. Menurut Hall (2007), nilai normal AST dan ALT pada mencit adalah 70 – 400 u/L dan 25 – 200 u/L⁽³⁰⁾. Berdasarkan hasil pengukuran, nilai AST dan ALT pada keempat kelompok uji baik pada mencit jantan dan betina berada dalam nilai normal.

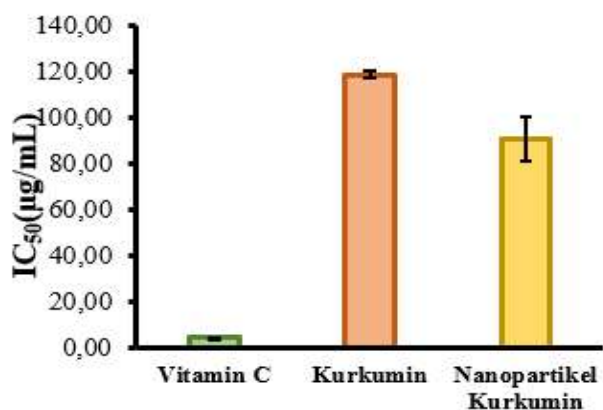
Albumin merupakan protein plasma yang paling banyak dalam tubuh manusia, yaitu sekitar 55-60% dan disintesa pada hati. Albumin dihasilkan didalam hati dalam jumlah 12 gram per hari. Di dalam tubuh albumin berfungsi untuk mempertahankan keseimbangan distribusi air (tekanan osmotik koloid) selain itu albumin juga berperan dalam transport beberapa komponen darah seperti ion, hormon, bilirubin, obat, dan enzim⁽³¹⁾. Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi kadar albumin antara lain status gizi dan gangguan fungsi hati. Peningkatan kadar albumin berkaitan erat dengan kadar hemoglobin darah. Oleh karena itu, apabila kadar albumin dalam darah mengalami penurunan maka dapat menyebabkan terjadinya penurunan kadar hemoglobin dalam darah. Penurunan kadar hemoglobin dapat terjadi karena protein merupakan salah satu unsur yang penting dalam sintesis hemoglobin dan pembawa besi, sehingga apabila terjadi penurunan kadar albumin dalam tubuh, maka dapat terjadi gangguan pada sintesis hemoglobin dan dapat mengakibatkan penurunan kadar hemoglobin dalam darah⁽³²⁾.

Menurut Kusumawati (2004), nilai normal albumin pada mencit adalah 2,52 – 4,84 g/dl⁽¹⁷⁾. Nilai albumin pada keempat kelompok uji baik pada mencit jantan ataupun betina berada dibawah nilai normal. Hal tersebut dapat terjadi akibat adanya variasi genetik dengan mencit yang digunakan maupun perbedaan kondisi lingkungan.

Berdasarkan hasil pemeriksaan biokimia klinis diatas membuktikan bahwa sediaan uji selama pemberian 28 hari pada mencit betina tidak memiliki perbedaan yang signifikan antar kelompok, dan menunjukkan bahwa nanopartikel kurkumin dengan dosis 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 200 mg/kgBB aman untuk digunakan dan tidak mempengaruhi fungsi ginjal maupun hati.

Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Secara In-Vitro Dengan Metode DPPH. Pengujian aktivitas antioksidan secara *in vitro* dilakukan dengan metode pengikatan radikal bebas DPPH. Metode DPPH dapat menggambarkan besarnya aktivitas suatu antioksidan dalam meredam radikal bebas. Metode DPPH memiliki beberapa kelebihan diantaranya secara teknis cara kerjanya mudah, cepat, cukup teliti, baik digunakan untuk pengukuran aktivitas antioksidan.

Parameter yang digunakan untuk uji penangkapan radikal DPPH ini adalah nilai IC_{50} . IC_{50} yaitu konsentrasi antioksidan ($\mu\text{g/mL}$) yang mampu menghambat 50% aktivitas radikal bebas DPPH.



Gambar 3. Grafik perbandingan nilai IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)

Uji aktivitas antioksidan dilakukan terlebih dahulu pada vitamin C sebagai kontrol positif, dikatakan sebagai kontrol positif karena vitamin C merupakan senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat dengan hasil uji yang dilakukan maka diperoleh nilai IC_{50} sebesar $3,95 \mu\text{g/mL}$. vitamin C dikatakan memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat karena nilai IC_{50} kurang dari $50 \mu\text{g/mL}$. Pada sampel kurkumin di dapat nilai IC_{50} sebesar $118,76 \mu\text{g/mL}$ berpotensi memiliki aktivitas yang sedang dan pada sampel nanopartikel kurkumin didapat nilai IC_{50} sebesar $90,87 \mu\text{g/mL}$ berpotensi memiliki aktivitas yang kuat.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa pada uji toksisitas akut, semua tingkatan dosis pemberian tidak ditemukan adanya kematian baik pada pengamatan jangka pendek (48 jam) ataupun pengamatan jangka panjang (14 hari). Nilai LD_{50} dari nanopartikel kurkumin adalah lebih besar dari 5000 mg/kgBB , dan termasuk ke dalam kategori praktis tidak toksik. Pada uji toksisitas subkronik 28 hari, pemberian nanopartikel kurkumin dengan dosis 50 mg/kgBB , 100 mg/kgBB , dan 200 mg/kgBB pada mencit jantan dan betina selama 28 hari terbukti aman dan tidak mempengaruhi profil hematologi, fungsi ginjal serta fungsi hati. Kurkumin dan nanopartikel kurkumin memiliki aktivitas antioksidan secara *in vitro* dengan nilai rata-rata IC_{50} kurkumin sebesar $118,76 \mu\text{g/mL}$ (potensi sedang) dan nanopartikel kurkumin sebesar $90,87 \mu\text{g/mL}$ (potensi kuat).

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Universitas Pancasila atas dana Penelitian Hibah Internal (*In House*) Universitas Pancasila tahun 2021.

DAFTAR PUSTAKA

1. Aggarwal, B. B., dan Sung, B. Pharmacological Basis for the Role of Curcumin in Chronic Diseases: an Age-Old Spice with Modern Targets. *Trend in Pharm. Sci.* 2009;30:85-94.
2. Bisht S et al. Polymeric nanoparticle - encapsulated curcumin (nanocurcumin): a novel strategy for human cancer therapy. *J of Nanobiotechnol.* 2007;5:1-18.
3. Pan, M. H., Huang, T. M., dan Lin, J. K. Biotransformation of Curcumin Through Reduction and Glucuronidation in Mice. *Drug Metab. Dispos.* 1999;27:486-494.
4. Shimatsu A, Kakeya H, Imaizumi A et al. Clinical Application of "Curcumin, a Multi-Functional Substance. *Anti Aging Medicine.* 2012;9(2):75-83.
5. Arozal, W. L., Rahmat, D., Chendrana, P., and Sandhiutami, N. M. D. Development, characterization and pharmacokinetic profile of chitosansodium tripolyphosphate nanoparticles based drug delivery systems for curcumin. *Adv. Pharmaceut. Bull.* 2020;11(1):77-85.
6. Donaldson K, Stone V, Tran CL, Kreyling W and Borm PJA. *Nanotoxicology. Occup Environ Med.* 2004;61:727-8.
7. Akhila JS, Shyamjith, Deepa, Alwar MC. Acute toxicity studies and determination of median lethal dose. *Science.* 2007;93(7):917-20.
8. Lu, F.C. *Basic Toxicology: Fundamentals, Target Organs, and Risk Assesment* 5th ed. Informa Healthcare USA, Inc., New York. 2009;85, 108, 188-190.
9. Setzer, R.W. and Kimmel, C.,A. Use of NOAEL, benchmark dose, and other models for human risk assessment of hormonally active substances. *Pure Appl Chem.* 2003;75:2151-8.
10. Borra SK, Gurumurthy P, Mahendra J. Antioxidant and free radical scavenging activity of Triphala. *J. Med. Plant Res.* 2013;7:2680-90.
11. Chendrana, Priska. *Karakterisasi, Uji Sifat Mukoadhesif dan Aktivitas Anti-Inflamasi Nanopartikel Kurkumin.* Jakarta: Fakultas Farmasi Universitas Pancasila; 2019.
12. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). *OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure.* (<http://lysander.sourceoecd.org/>). Paris: OECD. 2001a;1-26.
13. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). *OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Test No. 407: Acute Oral Toxicity- Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents.* Paris: OECD; 2008; 2-5.

14. Grimaldi G, Manto M. Neurological tremor: sensors, signal processing and emerging applications. *Sensors* 2010;10:1399-422.
15. Posner JB, Saper CB, Schiff ND, Plum F. Plum and Posner's Diagnosis of Stupor and Coma. New York: Oxford University Press;2007.
16. Laksmindra F dkk. Pengaruh Antikoagulan dan waktu Penyimpanan Terhadap Profil Hematologis Tikus (*Rattus norvegicus Berkenhout*, 1769) Galur Wistar. 2016;33(1):22-30.
17. Kusumawati, D. Bersahabat Dengan Hewan Coba. Yogyakarta: Gajah Mada University Press; 2004.
18. Sutedjo AY. Mengenal Penyakit Melalui Hasil Pemeriksaan Laboratorium. Yogyakarta: Amara Books. 2009; 28.
19. Maylina, L.A. Hubungan Antara Konsumsi Pangan Sumber Protein, Zat Besi dan Vitamin C dengan Kejadian Anemia Siswa Sekolah Dasar [Skripsi]. Jember: Universitas Jember; 2010.
20. Sadikin, M. Biokimia Darah. Jakarta: Widyamedika; 2008.
21. Gandasoebrata R. Penuntun Laboratorium Klinik. Jakarta: Dian Rakyat; 2008.
22. Wiley, John. Exotic Animal Laboratory Diagnosis. USA: John Wiley; 2020.
23. Kosasih, E.N dan A.S Kosasih. Tafsiran Hasil pemeriksaan Laboratorium Klinik. Edisi Kedua. Tangerang: Karisma Publishing Group; 2008.
24. A.V. Hoffbrand, J.E. Petit, et al. Kapita Selekta Hematologi. Edisi 4. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC; 2009.
25. Mitruka, B. M., H. M. Rawnsley and B. V. Vadehra. Clinical Biochemical and Haematological Reference Value in Normal Experimental Animals. New York: Masson Publishing, Inc; 1977.
26. Lamb, E., Newman, D.J., & Price, C.P. Kidney Function Test.(in) Bur tis,C.A., Ashwood, E.R. & Br uns, D.E.(editors). Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Fourth edition. USA: Elsevier Saunders; 2008. p.797-832.
27. Murray, R. K., Granner, D. K., & Rodwell, V. W. Biokimia harper (27 ed.). Jakarta: Buku Kedokteran EGC; 2009.
28. Kidney Failure. High creatinine level. Jakarta: EGC; 2013.
29. Thapa BR, Walia A. Liver function test and their interpretation. *Indian Journal of Pediatrics*. 2007; 74:663-671.
30. Guyton A.C. and J.E. Hall. Buku Ajar Fisiologi Kedokteran. Edisi 9. Jakarta: EGC; 2007. p. 74,76, 80-81, 244, 248, 606,636,1070,1340.
31. Hasan I dan Indra T A. Peran Albumin dalam Penatalaksanaan Sirosis Hati. Jakarta: (ID). Divisi Hepatologi Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2008.
32. Sutedjo, SKM. Mengenal Penyakit Melalui Hasil Pemeriksaan Laboratorium. Yogyakarta: Aara Books; 2007.