

## Aktivitas Herbal Antidepresan Kombinasi Biji Salak dan Kulit Jeruk Terhadap Mencit yang Diperlakukan Tail Suspension Test (TST)

### *Antidepressant Activity of the Combination of Salak Seeds and Orange Peel on Tail Suspension Test (TST)-Treated Mice*

Fahri Fahrudin<sup>1\*</sup>, Dinda Rama Haribowo<sup>2</sup>, Fathin Hamida<sup>3</sup>, Farianita Mirliana<sup>1</sup>, Hajar Indra Wardhana<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi – Universitas Islam Negeri (UIN) Syarif Hidayatullah Jakarta

<sup>2</sup>PLP Biologi, Pusat Laboratorium Terpadu, Fakultas Sains dan Teknologi – Universitas Islam Negeri (UIN) Syarif Hidayatullah Jakarta

<sup>3</sup>Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi – Institut Sains dan Teknologi Nasional (ISTN)

\*E\_mail: [fahri.fahrudin@uinjkt.ac.id](mailto:fahri.fahrudin@uinjkt.ac.id)

Diterima: 22 Mei 2021

Direvisi: 12 Agustus 2021

Disetujui: 17 September 2021

#### ABSTRACT

*Depression is a mental illness that has increased from 2005 to the present. Depression can be treated with the consumption of antidepressant synthetic drugs, however, has side effects dependence. The aim of this study was to make a herbal antidepressant formula from zalacca seeds and orange peel as an alternative to synthetic antidepressants. The method used is the Tail Suspension Test (TST) to animal's model of depression. Forced Swimming Test (FST) is used to view immobility time (IMT) as an evaluation of the depression level. There were five mixed formulas (the combination of salak seeds and orange peel) that dissolved in water (45°C) and were administrated orally on mice. The antioxidant test was carried out on five formulas and a urine chemical characterization test in all treatment groups. The result showed that all formulas were significantly different ( $p < 0.05$ ) was compared to pain controls (depression). There were four formulas that were not significantly different ( $p > 0.05$ ) and one formula was significantly different ( $p < 0.05$ ) compared to the synthetic antidepressant. The formula blend still contains quite antioxidants. The chemical characterization of urine showed normal values in all treatment groups. The conclusion is that the formula tested has the potential to be an herbal antidepressant formula.*

**Keywords:** antidepressant herbs, FST, orange peel, TST, zalacca seeds

#### ABSTRAK

Depresi merupakan penyakit mental yang mengalami peningkatan sejak 2005 hingga saat ini. Depresi dapat diatasi dengan konsumsi obat antidepresan sintesis, namun memiliki efek ketergantungan. Diperlukan antidepresan herbal yang lebih aman. Tujuan penelitian adalah membuat formula antidepresan kombinasi biji salak dan kulit jeruk. Metode TST digunakan untuk membuat model hewan depresi. *Forced Swimming Test* (FST) digunakan untuk melihat *immobility time* (IMT) sebagai evaluasi terhadap depresi. Lima formula kombinasi (biji salak dan kulit jeruk) dilarutkan dalam air (45°C) diberikan secara oral pada mencit. Total 40 ekor mencit jantan dibagi delapan kelompok perlakuan (P0–P7) dan diamati nilai IMTnya. Hasil uji FST menunjukkan lima formula antidepresan memiliki nilai IMT lebih rendah ( $p < 0,05$ ) dibandingkan dengan P2 (kontrol depresi). Dilakukan uji antioksidan pada lima formula (P3–P7) serta karakterisasi kimia urin pada semua kelompok perlakuan untuk mengetahui keamanan dari formula antidepresan. Terdapat empat formula yang tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ) dan satu formula (P6) berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dengan obat antidepresan sintesis (P1). Semua formula terdeteksi memiliki kadar antioksidan secara kualitatif. Karakterisasi kimia urin menunjukkan nilai normal dan tidak ada perbedaan nyata ( $p > 0,05$ ) pada semua kelompok perlakuan. Dengan demikian formula kombinasi biji salak dan kulit jeruk berpotensi sebagai formula herbal antidepresan.

**Kata kunci:** biji salak, FST, herbal antidepresan, kulit jeruk, TST

## Pendahuluan

Depresi adalah penyakit yang mempengaruhi perasaan, pola berpikir, dan cara bersikap seseorang.<sup>1</sup> Jumlah penderita depresi di dunia cenderung mengalami peningkatan. Pada tahun 2017 menyatakan jumlah penderita depresi di dunia mencapai 322 juta jiwa atau terjadi peningkatan sebesar 18,4% pertahun sejak tahun 2005.<sup>2</sup> Banyaknya masalah dan tekanan dalam kehidupan seseorang berpotensi terhadap menderita gangguan mental kemudian mengarah depresi.<sup>3</sup> Laveque *et al.* menyatakan bahwa, depresi dapat terjadi pada mahasiswa pascasarjana akibat adanya tekanan berat dalam proses belajar. Depresi dapat menyerang siapa pun, oleh karena itu kebutuhan obat untuk menangani depresi masih cukup tinggi.<sup>4</sup>

Depresi dapat diatasi dengan mengonsumsi obat yang disebut antidepresan.<sup>5</sup> Mayoritas penderita depresi mengonsumsi obat antidepresan sintesis dengan bahan aktif seperti imipramien, amitripilin dan alprazolam, akan tetapi kesemuanya memiliki efek samping seperti ketergantungan hingga gagal jantung kronis.<sup>6</sup> Adanya efek samping yang ditimbulkan akibat konsumsi obat antidepresan sintesis, memicu masyarakat mengurangi penggunaan obat antidepresan sintesis dan beralih kepada obat herbal. Kandungan bahan aktif pada herbal yang dijadikan obat antidepresan diyakini tidak mengakibatkan efek samping.<sup>7</sup>

Beberapa penelitian tentang antidepresan herbal telah dilaporkan, akan tetapi masih terbatas hanya menggunakan herbal tunggal. Ekstrak tunggal daun *Eclipta alba* (urang-aring) terbukti berkhasiat sebagai antidepresan dan tidak berbeda nyata dengan obat antidepresan sintesis (fluoxetine dan imipramine) yang dijadikan kontrol positif.<sup>8</sup> Puspitasari<sup>9</sup> mengungkapkan bahwa ekstrak daun pandan wangi mampu mengatasi depresi pada tikus jantan galur wistar dengan menurunkan *immobility time* dan kadar kortisol pada darah. Terdapat beberapa limbah dari tanaman berpotensi memiliki

kandungan fitokimia yang dapat dijadikan pemicu relaksasi, seperti biji salak dan kulit jeruk. Biji salak memiliki kandungan antioksidan dan rendah kafein<sup>19</sup>, sedangkan minyak atsiri dari kulit jeruk berpotensi sebagai antidepresan.<sup>20</sup>

Biji salak dan kulit jeruk pada umumnya tidak dimanfaatkan secara maksimal dan hanya menjadi limbah. Minyak atsiri dari kulit jeruk manis memiliki senyawa aktif seperti limonene, linalool, linaliasetat, serta terpineol yang diyakini dapat mengatasi gangguan depresi.<sup>10</sup> Senyawa limonene mampu mengurangi depresi dengan meningkatkan konsentrasi dopamin di otak.<sup>11</sup> Mengonsumsi herbal yang hanya berbahan kulit jeruk saja akan memiliki cita rasa yang kurang enak, sehingga diperlukan bahan lain untuk dijadikan bahan tambahan yang digunakan untuk mengilangkan rasa getir dari minyak atsiri.

Serbuk biji salak dapat dijadikan alternatif sebagai bahan tambahan yang dikombinasikan dengan minyak atsiri. Biji salak dapat dijadikan sebagai minuman pengganti kopi karena memiliki kandungan kafein yang rendah<sup>12</sup>, serta potensi antioksidan yang tinggi dari golongan alkaloid dan polifenolat.<sup>13</sup> Diharapkan serbuk biji salak dapat menetralsir rasa getir pada ekstrak kulit jeruk dan memberikan aroma yang khas. Tujuan penelitian adalah membuat formula antidepresan kombinasi biji salak dan kulit jeruk.

## Metode

### Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan untuk pembuatan formula antidepresan adalah simplisia kulit jeruk, biji salak, dan aquades. Kalium permanganat ( $\text{KMnO}_4$ ), asam asetat anhidrat ( $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ ), dan asam sulfat pekat digunakan untuk deteksi minyak atsiri. HCl, NaCl, Mg, pereaksi mayer, dan pereaksi wagner adalah bahan-bahan untuk uji alkaloid dan flavonoid. Hewan yang digunakan adalah mencit

jantan (*Mus musculus* L.) sebanyak 45 ekor.

### **Pembuatan Formula Antidepresan**

Kulit jeruk dikering-anginkan selama dua hari kemudian dihaluskan. Simplisia kulit jeruk diekstraksi untuk mendapatkan minyak atsiri menggunakan metode destilasi dengan perbandingan 1:3 (100 g kulit jeruk dan 300 mL aquades). Biji salak dikeringkan kemudian ditumbuk hingga halus menjadi serbuk. Formula antidepresan dibuat dengan cara melarutkan minyak atsiri dengan serbuk biji salak dalam aquades ( $\pm 45^{\circ}\text{C}$ ).

Dibuat lima formulasi antidepresan dari perbandingan minyak atsiri dan serbuk biji salak (3:1; 2:1; 1:1; 1:3; dan 1:2). Komposisi formula perbandingan antara minyak atsiri, serbuk biji salak dan aquades adalah sebagai berikut:

1. Formula 1 : 3,375 mL minyak atsiri 1,125 g serbuk biji salak dan 3 mL aquades.
2. Formula 2 : 3 mL minyak atsiri 1,5 g serbuk biji salak dan 3 mL aquades.
3. Formula 3 : 2,25 mL minyak atsiri 2,25 g serbuk biji salak dan 3 mL aquades.
4. Formula 4 : 1,125 mL minyak atsiri 3,375 g serbuk biji salak dan 3 mL aquades.
5. Formula 5 : 1,5 mL minyak atsiri 3 g serbuk biji salak dan 3 mL aquades

### **Uji Sensorik dan Motorik**

Uji sensorik dan motorik dilakukan pada 45 mencit (*Mus musculus* L.) jantan usia 4-5 minggu yang diperoleh dari BPPOM Jakarta. Mencit yang lulus uji sensorik dan motorik, selanjutnya dijadikan sebagai hewan model untuk uji formula antidepresi. Pada uji sensorik dan motorik, mencit dibagi ke dalam sembilan kelompok, masing-masing kelompok berisi lima ekor mencit. Tujuan dilakukannya uji sensorik dan motorik adalah untuk mengetahui ada atau tidak kelainan syaraf sensorik dan motorik mencit. Jika terdapat mencit yang tidak

lulus uji sensorik dan motorik, maka mencit tersebut tidak akan digunakan sebagai hewan model depresi. Uji sensorik dan motorik meliputi uji penciuman (*olfactory avoidance test*), *surface righting reflex tests*, *cliff avoidance reflex test*, *negative geotaxis reflex test*, serta uji lokomosi (berjalan dan berenang)<sup>14</sup>.

### **Uji fitokimia formula antidepresan Uji minyak atsiri**

Minyak atsiri diidentifikasi pada masing-masing dosis formula antidepresan secara kuantitatif dengan metode Hanani<sup>15</sup>. Deteksi minyak atsiri dengan melihat perubahan ada tidaknya warna (hijau atau biru) pada setiap sampel. Disiapkan sampel uji formula antidepresan sesuai dosisnya masing-masing sekitar 2 mL. Selanjutnya teteskan larutan kalium permanganat ( $\text{KMnO}_4$ ) sebanyak lima tetes pada masing-masing sampel, maka akan terjadi perubahan warna  $\text{KMnO}_4$  menjadi pucat atau hilang. Kemudian sampel ditambahkan 1 mL asam asetat anhidrat ( $\text{CH}_3\text{CO}$ )<sub>2</sub>O dan 1 mL asam sulfat pekat sehingga timbul warna hijau biru<sup>15</sup>.

### **Uji alkaloid**

Uji alkaloid berdasarkan protokol yang disusun Depkes<sup>16</sup> menggunakan metode Mayer, Wagner, dan Dragendorff. Sampel sebanyak 3 ml diletakkan dalam mortar, ditambahkan 5 ml HCl 2 M, diaduk dan didinginkan pada temperatur ruang. Setelah sampel dingin ditambahkan 0,5 g NaCl lalu diaduk dan disaring. Filtrat yang diperoleh ditambahkan HCl 2 M sebanyak tiga tetes, kemudian dipisahkan menjadi mbagian yaitu A, B, C, dan D. Filtrat A sebagai blangko, filtrat B ditambahkan pereaksi Mayer, filtrat C ditambahkan pereaksi Wagner. Apabila terbentuk endapan pada penambahan pereaksi Mayer dan Wagner maka menandakan adanya alkaloid.

### **Uji flavonoid**

Uji flavonoid<sup>16</sup> dilakukan dengan

melihat perubahan warna pada sampel. Sampel dari masing-masing dosis formula antidepresan disiapkan 3 mL, kemudian ditambahkan serbuk Mg. Selanjutnya dihomogenkan dan ditambah HCl pekat. Apabila terbentuk warna oranye, merah atau kuning berarti sampel mengandung flavonoid.<sup>16</sup>

### Uji farmakologi formula antidepresan

Uji farmakologi formula antidepresan dilakukan dalam tiga tahap, yaitu uji TST (*Tail Suspension Test*), uji FST (*Forced Swim Test*), dan uji karakteristik urin. Uji TST dilakukan selama 10 hari berturut-turut. Pada hari ke-11 dilanjutkan dengan uji FST yang dilakukan dua jam setelah pemberian sampel formula antidepresan. Formula antidepresan diberikan satu kali (0,364 mg/20 g BB) secara *oral*. Koleksi urin dilakukan pada hari ke-12 untuk uji karakteristik urin.

### Pengelompokkan Hewan Uji

Dibutuhkan 40 ekor mencit yang telah lulus uji sensorik dan motorik (usia 6-7 minggu) dengan bobot badan (bb)  $\pm 20$  g. Mencit dibagi ke dalam delapan kelompok perlakuan (P0-P7), setiap kelompok perlakuan terdiri dari lima ekor mencit. Mencit yang akan digunakan untuk uji formula antidepresan dilakukan aklimatisasi kembali selama  $\pm 7$  hari di dalam ruangan dengan siklus 12 jam (terang/gelap), kelembaban  $60\% \pm 2\%$ , suhu  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , serta mendapatkan pakan/minum secara *ad libitum*.

Kelompok perlakuan uji formula antidepresan dibagi sebagai berikut;

1. P0; sebagai kontrol normal (hanya diberikan aquades dan tidak di uji FST/tidak dalam keadaan depresi),
2. P1; kelompok kontrol positif dengan obat depresan sintesis,
3. P2; kelompok kontrol sakit (depresi/tidak diberikan obat antidepresan),
4. P3; kelompok yang diberikan formula 1 antidepresan,
5. P4; diberikan formula 2 antidepresan,

6. P5; diberikan formula 3 antidepresan,
7. P6; diberikan formula 4 antidepresan,
8. P7; diberikan formula 5 antidepresan.

### *Tail suspension test (TST)*

TST bertujuan untuk mendapatkan kondisi optimal hewan model (mencit) dalam keadaan depresi. TST dilakukan pada semua kelompok perlakuan kecuali kelompok normal (P0) dengan mengikuti protokol dari Porsolt<sup>17</sup> dan Kurama<sup>18</sup> yang telah dilakukan modifikasi. TST dilakukan selama 10 hari berturut-turut. Mencit digantung menggunakan tali yang diikat dekat pangkal ekor, dilakukan selama tiga menit dengan ketinggian sekitar 30 cm dari dasar lantai. Satu hari setelah uji TST, mencit diberikan formula antidepresan sesuai dosis kelompok perlakuan masing-masing. Selanjutnya, dua jam setelah pemberian formula antidepresan dilakukan metode *Forced Swim Test (FST)* untuk melihat efektifitas reaksi formula antidepresan yang akan dibandingkan dengan tiga kelompok kontrol (kontrol normal, kontrol sakit (depresi), dan kontrol positif).

### *Forced swim test (FST)*

FST digunakan untuk melihat reaksi formula antidepresan terhadap mencit sebagai hewan model depresi dengan mencatat waktu pergerakan mencit selama berenang<sup>17</sup>. Setelah dua jam pemberian formula antidepresan dilanjutkan dengan metode renang paksa atau FST pada semua kelompok perlakuan (delapan kelompok). FST dilakukan pada akurium mini berisi air  $40^\circ\text{C}$  dengan kedalaman air 30 cm. Mencit dipaksa berenang selama delapan menit. Dilakukan pencatatan *Immobility time (IMT)* pada setiap mencit yang dilakukan FST dari setiap kelompok perlakuan. Nilai IMT (detik) dicatat pada mencit yang tidak melakukan pergerakan ketika uji FST.

### Analisis karakteristik urin

Dilakukan analisis secara kualitatif terhadap beberapa golongan senyawa

dalam urin. Analisis karakteristik urin menggunakan *urinalysis reagent strip* (Verify™). Tujuan analisis kimia urin adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian formula antidepresan pada mencit terhadap kinerja metabolisme tubuh mencit setelah dilakukan pemaparan. Urin mencit dikoleksi pada hari ke 12 atau satu hari setelah uji FST. Beberapa hal perlu diperhatikan dalam pengumpulan sampel urin, seperti kebersihan wadah penampung dan waktu pengambilan urin. Parameter urin yang dianalisis meliputi pH, protein, glukosa, keton, bilirubin, urobilinogen, dan nitrit. *Reagent strip* (Verify) dimasukkan ke dalam urin mencit yang telah ditampung. Waktu perendaman *Reagent strip* berbeda-beda tergantung dari parameter yang diukur dan mengikuti protokol dari Verify™.

### Analisis Data

Penelitian ini menggunakan Rancang Acak Lengkap (RAL) dengan lima kali ulangan pada setiap perlakuan. Analisis data menggunakan uji *One way Anova* dan dilanjutkan dengan uji lanjut DUNCAN ( $p < 0.05$ ) menggunakan *statistical software* SPSS 21.

### Hasil

#### Uji sensorik dan motorik mencit

Uji sensorik dan motorik dilakukan untuk memilih dan menyeleksi mencit yang sehat secara fisik dan psikis. Mencit yang dinyatakan lulus atau hasil uji sensorik dan motoriknya normal, maka akan dijadikan sebagai hewan model dalam uji formula herbal antidepresan. Berdasarkan hasil uji (Tabel 1), semua mencit (45 ekor, Sembilan kelompok) tidak memiliki gangguan secara sensorik maupun motorik.

**Tabel 1.** Rerata hasil uji sensorik dan motorik pada setiap kelompok mencit

Uji Sensorik/Motorik	Kelompok Mencit								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Uji Sensorik									
<i>Olfactory Avoidance Test</i> (nilai)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Uji Motorik									
<i>Surface Righting Reflex</i> (detik)	4	5	5	3	4	3	5	4	3
<i>Cliff Avoidance Reflex</i> (detik)	6	6	8	7	7	6	5	5	6
<i>Negative Geotaxis Reflex</i> (detik)	6	7	6	7	7	7	5	6	6
Lokomosi Berjalan (detik)	3	4	3	5	4	3	3	4	4
Lokomosi Berenang (pola anggota gerak)	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Keterangan tabel mengacu pada masing-masing metode uji motorik dan sensorik<sup>14</sup> (Brooks & Dunnett, 2009).

#### Uji fitokimia serbuk biji salak dan minyak atsiri kulit jeruk

Hasil uji fitokimia pada kelima formula antidepresan menunjukkan terdapat minyak atsiri dan senyawa antioksidan (Tabel 2). Serbuk biji salak dan minyak atsiri dari kulit jeruk terbukti dapat dikombinasikan menjadi suatu formula, karena minyak atsiri dan antioksidan (alkaloid dan flavonoid) tetap terdeteksi secara kualitatif. Pada simplisia atau ekstrak tunggalnya, biji salak

memiliki kadar antioksidan mencapai 45,96% dan rendah kafein<sup>19</sup>. Nilai rendemen serbuk biji salak 69%, sedangkan minyak atsiri hanya 3%. Kandungan utama minyak atsiri adalah limonene yang memiliki fungsi untuk relaksasi<sup>11</sup>. Kadar limonene pada minyak atsiri dapat mencapai 96,79%<sup>20</sup>. Dengan demikian komponen yang berpotensi dan dibutuhkan sebagai antidepresan keberadaannya tetap ada di dalam formula kombinasi biji salak dan kulit jeruk.

**Tabel 2.** Karakteristik fitokimia biji salak, minyak atsiri kulit jeruk, dan formula antidepresan.

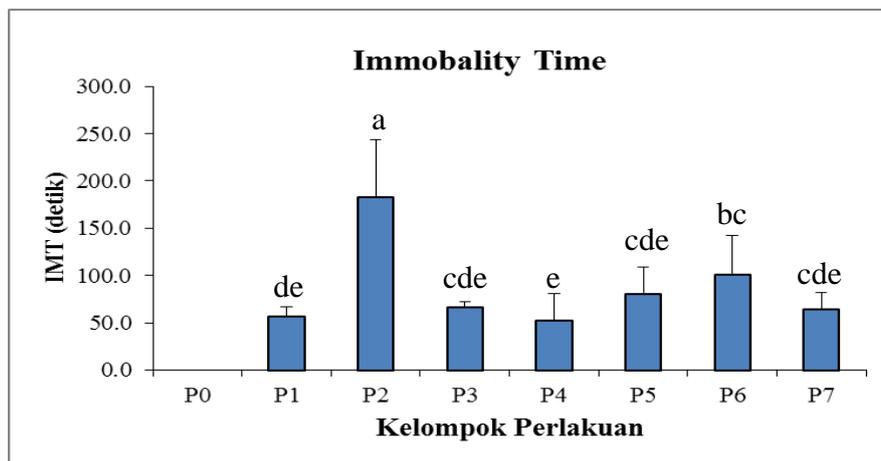
Karakteristik Fitokimia (%)	Biji Salak	Minyak Atsiri	Formula Antidepresan				
			1 (P3)	2 (P4)	3 (P5)	4 (P6)	5 (P7)
Minyak atsiri	-	-	++	++	++	++	++
Alkaloid	-	-	++	++	++	++	++
Flavonoida	-	-	++	++	++	++	++
Rendemen	69	3	-	-	-	-	-

Keterangan: tanda (-) adalah sampel yang tidak dilakukan uji karakteristik fitokimia.

### Uji formula antidepresan dengan metode TST dan FST

Hasil uji FST dengan evaluasi pada nilai *Immobility Time* (IMT), menunjukkan terdapat empat formula berpotensi sebagai antidepresan, yaitu formula pada kelompok P3, P4, P5, dan P7. Keempat formula tersebut memiliki nilai IMT tidak berbeda ( $p>0,05$ ) dengan kelompok P1 yang diberikan obat antidepresan sintetis (Gambar 1). Terdapat satu formula yang berbeda nyata ( $p<0,05$ ) dibandingkan dengan P1, yaitu formula P6. Namun, berdasarkan analisis statistik formula P6 tidak berbeda signifikan ( $p>0,05$ ) jika

dibandingkan dengan seluruh formula antidepresan. Kelompok perlakuan P2 sebagai kontrol sakit (model hewan depresi), memiliki nilai IMT yang berbeda nyata ( $p<0,05$ ) dibandingkan dengan seluruh kelompok formula antidepresan (P3 – P7) dan obat sintetis (P1). Kelompok P0 sebagai kelompok perlakuan kontrol normal, memiliki nilai IMT 0 dan tidak diikutsertakan dalam uji statistik. Pada saat uji FST, seluruh mencit pada kelompok P0 aktif bergerak selama waktu pengamatan. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok P0 tidak ada gejala depresi.



**Gambar 1.** Grafik *Immobility Time* (IMT) hasil uji FST. P0: Kelompok perlakuan normal, P1: kelompok perlakuan dengan obat antidepresan sintetis (Fluoxetine), P2: kelompok kontrol negatif (sakit), P3: kelompok formula 1 antidepresan P4: kelompok formula 2 antidepresan, P5: kelompok formula 3 antidepresan, P6: kelompok formula 4 antidepresan, dan P7: kelompok formula 5 antidepresan. Pemberian sampel pada semua perlakuan adalah 0,364 mg/20 g BB (Grafik dengan *superscript* yang berbeda, menandakan terdapat beda nyata signifikan ( $p < 0,05$ ). P0 tidak diikutsertakan dalam uji statistik).

**Tabel 4.** Persentase potensi formula antidepresan mengembalikan kondisi depresi menjadi normal.

Kelompok Perlakuan	IMT (detik)	Level Depresi (%)	Revers (%)
P1	56,8	31,0	69,0
P2	183,2	100,0	0,0
P3	66,4	36,2	63,8
P4	52,8	28,8	71,2
P5	80,2	43,8	56,2
P6	101,0	55,1	44,9
P7	63,8	34,8	65,2

Keterangan mengacu pada keterangan pada Gambar 1

**Tabel 3.** Rerata nilai karakteristik kimia urin mencit

Kelompok Perlakuan	Karakteristik Kimia Urin						
	pH	Protein (mg/dL)	Glukosa (mg/dL)	Keton (mg/dL)	Bilirubin (mg/dL)	Urobilinogen (mg/dL)	Nitrit (mg/dL)
P0	6,6 ± 0,6	9,0 ± 8,2	Negatif	Negatif	Negatif	0,36 ± 0,3	Negatif
P1	7,0 ± 0,6	6,0 ± 8,2	Negatif	Negatif	Negatif	0,72 ± 0,7	Negatif
P2	6,2 ± 0,8	15,0 ± 10,6	Negatif	Negatif	Negatif	0,92 ± 0,9	Negatif
P3	6,7 ± 0,5	9,0 ± 8,2	Negatif	Negatif	Negatif	0,20 ± 0,0	Negatif
P4	7,2 ± 0,4	15,0 ± 0,0	Negatif	Negatif	Negatif	0,36 ± 0,3	Negatif
P5	6,3 ± 0,6	12,0 ± 6,7	Negatif	Negatif	Negatif	0,68 ± 0,4	Negatif
P6	6,4 ± 0,5	15,0 ± 0,0	Negatif	Negatif	Negatif	0,72 ± 0,7	Negatif
P7	6,6 ± 1,0	12,0 ± 6,7	Negatif	Negatif	Negatif	0,20 ± 0,0	Negatif

Keterangan table mengacu pada keterangan pada gambar 1. Karakteristik kimia urin dianalisis menggunakan *Reagent strip* (Verify™). Nilai ambang batas normal; pH (5-7), Protein (30 mg/dL), Urobilinogen (1 mg/dL)

Berdasarkan hasil evaluasi nilai IMT terhadap semua kelompok perlakuan, maka kelima formula yang diuji memiliki potensi sebagai antidepresan yang dapat mengembalikan kondisi depresi menjadi normal dengan kisaran 44,9% (P6) hingga 71,2% (P4), sedangkan obat sintesis antidepresan dengan kandungan utama fluoxetine dapat menekan tingkat depresi berkisar 69% (P1) (Tabel 4). Nilai level depresi (%) didapat dari membagi nilai IMT (kelompok ke-i) dengan nilai IMT P2 sebagai kontrol depresi. Selanjutnya nilai *Revers* (kemampuan mengembalikan kondisi depresi menjadi normal) diperoleh dari mengurangi nilai level depresi P2 dengan nilai level depresi kelompok ke-i.

#### Analisis karakteristik urin mencit sebagai hewan uji antidepresan

Analisis karakterisasi kimia urin dilakukan sebagai dasar evaluasi terhadap keamanan formula antidepresan. Hasil (buangan) dari proses metabolisme tubuh salah satunya adalah urin yang dikeluarkan melalui ginjal, maka urin dapat dijadikan sebagai media untuk diagnosis suatu penyakit. Hasil analisis kimia urin dibandingkan berdasarkan protokol acuan dari verify. Semua kelompok perlakuan (P0-P7) menunjukkan nilai karakterisasi kimia urin dalam batas ambang normal (Tabel 3). Nilai pH urin, protein, dan urobilinogen dari semua kelompok

terdeteksi dalam urin, namun kadarnya masih dalam batas normal. Kadar glukosa, keton, bilirubin, dan nitrit memiliki nilai yang negatif atau tidak ditemukan keberadaanya di dalam urin.

## **Pembahasan**

### **Uji sensorik dan motorik mencit**

mencit berjumlah 45 ekor yang telah dilakukan uji sistem saraf (sensorik dan motorik) menunjukkan semua mencit dalam keadaan sehat tanpa adanya gangguan sistem saraf. Hewan dengan hasil uji sistem saraf motorik dan sensorik menunjukkan taraf normal, dipastikan memiliki kondisi kognisi yang sehat<sup>21</sup>. Goodenough et al.<sup>22</sup> menyatakan bahwa kondisi kognisi yang sehat dan normal dapat melibatkan proses sensasi, persepsi, dan motivasi yang akan meningkatkan pada penguatan dan respon motorik seperti gerak reflex dan pola lokomosi (berjalan).

Pola lokomosi yang normal pada mencit adalah memiliki langkah lengkap, yaitu menggunakan empat kaki dan arah lokomosi sedikit berkelok. Pada umumnya pola berjalan mencit dilakukan dengan pola *alternate stepping gait*, yaitu pola berjalan yang diawali oleh kaki depan kemudian diikuti oleh kaki belakang pada sisi yang berlawanan<sup>14, 23, 21</sup>. Pada mencit yang normal dan sehat, lokomosi berenang cenderung lurus dengan kepala dan seluruh bagian telinga hampir berada di atas permukaan air dan menggunakan keempat alat geraknya untuk berenang<sup>23</sup>. Menurut Goodenough et al.<sup>21</sup> hewan yang memiliki lokomosi berenang normal, maka hewan tersebut memiliki perkembangan *neuromuscular* yang cukup aktif dan baik. Berdasarkan hasil uji sistem saraf pada mencit, maka seluruh mencit (45 ekor) dapat digunakan untuk uji formula antidepresan dengan metode TST dan FST.

### **Uji fitokimia serbuk biji salak dan minyak atsiri kulit jeruk**

Biji salak memiliki kandungan utama fitokimia berupa protein, karbohidrat, alkaloid, dan antioksidan<sup>19</sup>. Antioksidan pada biji salak termasuk pada golongan flavonoid, alkaloid dan fenolik<sup>12</sup>. Komponen fitokimia yang terkandung dalam biji salak merupakan komponen-komponen penting yang dibutuhkan bagi tubuh agar sistem tubuh selalu mencapai keseimbangan (homeostasis)<sup>24</sup>. Puspitasari<sup>9</sup> menjelaskan bahwa, golongan flavonoid dan fenolik mampu meningkatkan kadar serotonin dan norepinephrin pada otak. Serotonin dan norepinephrin dapat menjadi *neuro-transmitter* pada jalur komunikasi sel saraf<sup>24</sup>, sehingga dapat menimbulkan persepsi berupa relaksasi yang dikeluarkan oleh otak. Menurut Purwanto et al.<sup>25</sup> ekstrak biji salak praktis tidak toksik. Dengan demikian, biji salak dapat dikonsumsi dan berpotensi sebagai antidepresan.

Minyak atsiri dari kulit jeruk memiliki kadar limonene sebagai kandungan utama serta memiliki sedikit kadar linalool<sup>26</sup>. Keduanya merupakan komponen utama yang berperan dalam proses relaksasi<sup>27, 28, 29</sup> dan berpotensi sebagai antidepresan<sup>11</sup>. Mekanisme kerja dari limonene dan linalool adalah meningkatkan pelepasan monoamine (dopamine) dari bagian otak<sup>30</sup>. Colbert<sup>26</sup> menjelaskan bahwa, Limonene juga dapat digunakan sebagai tritemen pada gangguan kecemasan atau depresi.

### **Uji formula antidepresan dengan metode TST dan FST**

Hasil evaluasi nilai IMT pada semua kelompok perlakuan, dapat dinyatakan kelima formula yang diuji memiliki potensi sebagai antidepresan. Formula herbal dengan kandungan utama antioksidan pada biji salak dan limonene serta linalool pada minyak atsiri dari kulit jeruk mampu memberikan reaksi terhadap kondisi depresi. Hasil penelitian Bousbia et al.<sup>28</sup> menyatakan bahwa, minyak atsiri memiliki kandungan utama berupa *limonene* dengan nilai persentase mencapai

95,19%. Limonene merupakan molekul siklik monoterpen dan kandungan utama pada minyak atsiri dari kulit jeruk<sup>29</sup>. Limonene cukup efektif sebagai antidepresan dengan memberikan fungsi relaksasi pada tubuh<sup>28</sup>.

Fukumoto *et al.*<sup>11</sup> menyatakan bahwa, limonene mampu meningkatkan relaksasi pada sel-sel tubuh dengan cara meningkatkan pelepasan monoamine (dopamine) pada bagian otak. Dopamine merupakan hormon yang bekerja sebagai *neurotransmitter* pada sistem saraf pusat dan juga berfungsi sebagai prekursor norepinefrin<sup>24,31</sup>. Dopamine memiliki sistem kerja dalam mengatur gerakan dan mengendalikan emosi, sehingga dapat mengurangi gangguan atau gejala depresi<sup>32</sup>.

Emosi dihasilkan dan dialami oleh sistem limbik dan bagian otak lainnya termasuk area sensorik<sup>31</sup>. Sistem limbik merupakan cincin struktur di sekitar batang otak yang mencakup amigdala, hipokampus, dan bagian-bagian thalamus<sup>33</sup>. Amigdala terletak di lobus temporal dan membantu menyimpan pengalaman emosional sebagai memori emosional<sup>24</sup>. Penggunaan obat sintesis antidepresan dalam jangka waktu yang cukup lama dapat berakibat ketergantungan. sebagian besar obat yang bereaksi dengan tujuan pada sistem saraf, mereka akan merubah pola mekanisme kerja sinaps. Seperti obat-obatan sinaptik yang dapat menghambat atau membuat efek yang tidak diinginkan. Obat-obat tersebut bekerja berdasarkan dua kemungkinan, yaitu perubahan sintesis, modifikasi interaksi *neurotransmitter*, penguraian atau penyerapan kembali *neurotransmitter*, dan pergantian *neurotransmitter*<sup>24</sup>.

Pada umumnya produksi dopamine tinggi ketika terjadi depresi dan jika terus berlanjut, maka tidak dapat dikeluarkan dari jalur sel-sel saraf<sup>34</sup>. Dopamine yang terperangkap di jalur sel-sel saraf harus direduksi agar efek lanjutan seperti kerusakan sel saraf sinapsis dan kematian

neuron dapat dihindarkan<sup>32,35</sup>. Neuron Dopamine dapat dihilangkan atau direduksi secara efisien melalui pengangkutan aktif vesikuler monoamine transporter-2 (VMAT2) dan memerlukan suplai ATP yang cukup dari mitokondria dalam aktivasi VMT2<sup>34</sup>.

Formula herbal antidepresan dengan komponen utama antioksidan pada biji salak dan limonene pada minyak atsiri, dapat mendukung dalam penguraian dopamine yang berlebihan. Hal ini terbukti dari kelima formula (P3-P7) yang diujikan pada hewan model depresi, keseluruhan formula memiliki nilai IMT lebih kecil dan berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dengan P3 sebagai kelompok kontrol sakit hewan model depresi. Semua formula antidepresan dapat mengurangi nilai IMT mencapai 72% (P4) dan tidak berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dari obat sintesis antidepresan (P1) dengan nilai IMT mencapai 69%. Diantara kelima formula antidepresan yang di uji, formula ke-2 (P4) merupakan yang lebih efektif dengan nilai IMT lebih rendah. Dengan demikian, formula antidepresan yang merupakan kombinasi antara serbuk biji salak dan minyak atsiri dari kulit jeruk memiliki potensi sebagai antidepresan.

### **Analisis karakteristik urin mencit sebagai hewan uji antidepresan**

Uji karakteristik kimia urin merupakan salah satu parameter dalam uji keamanan suatu kandidat obat<sup>16</sup>. Haryoto *et al.*<sup>36</sup> menjelaskan bahwa, karakteristik kimia urin tikus sebagai hewan uji toksisitas dengan nilai yang rendah atau di bawah ambang batas normal menandakan bahan atau sediaan yang diberikan terhadap tikus hampir dipastikan praktis aman.

Hasil penukuran pH urin dari semua kelompok perlakuan menunjukkan nilai pH urin normal. Kadar pH urin normal pada Rodensia termasuk tikus dan mencit berkisar antara pH 5 hingga pH 7<sup>37</sup>. Pada penelitian ini, pemberian pakan dan sampel pada hewan uji dilakukan secara *ad libitum*

berdasarkan protokol hewan model pada laboratorium<sup>38</sup>.

Terdeteksinya protein di dalam urin mengindikasikan telah terjadinya luka pada ginjal<sup>36</sup>, tepatnya terjadi luka pada membran glomerulus<sup>24</sup>, sehingga menyebabkan lolosnya molekul protein ke dalam urin. Hasil uji proteinuria menghasilkan kadar protein dalam batas normal (protokol Verify <30 mg/dL), dengan nilai rata-rata protein 6 mg/dL hingga 15 mg/dL. Menurut Harkness et al.<sup>39</sup> protein dalam urin Rodensia (Tikus dan Mencit) secara normal tidak melebihi ambang batasnya yaitu 30 mg/dL atau 300 gL.

Hasil pemeriksaan kadar glukosa mencit pada semua kelompok perlakuan menunjukkan negatif. Kadar glukosa negatif berarti tidak ditemukannya kadar glukosa dalam urin. Pada mencit dan tikus yang sehat kadar glukosa secara normal tidak terdeteksi (negatif) berada di dalam urin<sup>37</sup>. Analisis kadar glukosa dalam urin pada umumnya dilakukan untuk mendiagnosa terjadinya penyakit gula atau terhambatnya sistem kerja dari insulin.

Kadar keton tidak ditemukan pada analisis kimia urin, hal ini menunjukkan pemberian formula antidepresan tidak mempengaruhi kinerja insulin dan organ ginjal berfungsi dengan baik. Kadar keton secara normal tidak ditemukan keberadaannya (negatif) di dalam urin mencit<sup>39</sup>. Jika urin terlihat berwarna merah atau keunguan, maka menandakan kadar keton tinggi dan kemungkinan berdampak pada penyakit diabetes<sup>37</sup>.

Hasil analisis kadar bilirubin dalam urin menunjukkan negatif, dengan demikian mencit dalam keadaan normal dan tidak terjadi kerusakan pada sel hati. Berdasarkan protokol dari Verify dan Quesenberry & Carpenter<sup>37</sup>, bahwa dalam keadaan normal (sehat) bilirubin tidak ada di dalam urin. Jika terdeteksi dalam urin, kadar bilirubin tidak lebih dari 1 mg/dL (Verify).

Urobilinogen dalam urin dianalisis untuk mendiagnosa kinerja atau kondisi

dari organ hati, empedu, dan ginjal<sup>37</sup>. Hasil analisis urobilinogen tidak ada yang lebih dari 1 mg/dL. Jika urobilinogen melebihi kadar 1 mg/dL, maka sangat berpotensi terjadi kerusakan pada beberapa organ yang terlibat dalam pencernaan (Verify).

Senyawa lain yang dianalisis menggunakan media urin adalah kadar nitrit dan hasil yang ditunjukkan merupakan nilai yang negatif pada semua kelompok perlakuan. Nitrit merupakan senyawa kimia hasil metabolisme dari siklus nitrogen. Pada tikus kontrol normal (sehat), tidak ditemukan kadar nitrit di dalam urin<sup>36</sup>. Berdasarkan prosedur dari Verify, kadar nitrit pada urin dalam keadaan normal adalah berkisar 0,05–1 mg/dL.

Berdasarkan protokol Verify, beberapa golongan senyawa urin yang dianalisis masih di bawah ambang batas normal. Dengan demikian, formula herbal antidepresan yang diberikan pada uji efektifitas antidepresan dalam kategori aman atau tidak membahayakan bagi proses metabolisme tubuh.

Berdasarkan hasil uji karakteristik kimia urin yang dibandingkan dengan protokol Verify, menunjukkan hasil yang masih masih di bawah ambang batas normal. Dengan demikian, pemberian formula antidepresan pada tahap uji preventif menggunakan mencit sebagai hewan uji dapat dikatakan praktis tidak berbahaya bagi metabolisme di dalam tubuh.

## **Kesimpulan**

Kombinasi serbuk biji salak dan minyak atsiri dari kulit jeruk (3 mL + 1,5 g) memiliki potensi sebagai formula antidepresan yang sebanding dengan obat depresi sintetis. Formula 2 antidepresan (P4) merupakan formula yang lebih optimal diantara formula yang diuji dengan nilai *Imobility Time* (IMT) terendah.

## **Saran**

Perlu dilakukan penelitian lanjutan uji kuratif dan uji toksisitas lengkap. Perlu

dilakukan pengukuran karakteristik kadar kimia darah secara kuantifikasi. Mencari metode alternatif untuk isolasi minyak atsiri agar menghasilkan rendemen tinggi.

### Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kami ucapkan kepada Pusat Penelitian dan Penerbitan (Puslitpen) – LPPM, UIN Syarif Hidayatullah Jakarta atas kepercayaannya dalam memberikan pendanaan penelitian (Nomor SK: B-022/LP2M-PUSLITPEN/TL.03/02/2020). Terima kasih juga kepada Direktur Pusat Teknologi Farmasi dan Medika (PTFM) – BPPT yang telah mengizinkan penggunaan sarana laboratorium.

### Daftar Rujukan

1. American Psychiatric Association.. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5). 5<sup>th</sup> Edition*. Washington. 2013.
2. World Health Organization (WHO). *Depression and Other Common Mental Disorders; Global Health Estimates*. Geneva: World Health Organization. 2017.
3. Izzuddin TM. *Panduan Lengkap dan Praktis Psikologi Manusia*. Gema Insani Press. Jakarta. 2006.
4. Leveque K, Anseel F, De beukelaer A, Van der Heyden, & Gisle L. Work Organization and Mental Health Problems in Ph.D. Students. *J. Research Policy*. 2017. 46(4): 868-879.
5. Ramaiah, S. *Bagaimana Mengatasi Penyebab Kecemasan*. Pustaka Populer Obor. Jakarta. 2003.
6. Tomb DA. *Buku Saku Psikiatri*. Edisi 6. Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 2003.
7. Kurama NP, Bodhi W, Wiyono W. Uji Efek Antidepresan Ekstrak Metanol Jamur Tlethong (*Psilocybe cubensis*) Pada Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*): ditinjau dari Immobility time dengan Metode Forced Swim Test. *Pharmakon Jurnal Farmasi*. 2013. 2(3):29-33.
8. Swati M, Monalisa J, Abhisek P. Evaluation of Antidepressant Activity of *Eclipta alba* Using Animal Model. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2013. 6(3): 118-120.
9. Puspitasari L. Ekstrak Etanol Daun Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius r.*) 10% menurunkan Immobility time dan Kadar Kortisol Tikus Jantan Galur Wistar yang Depresi. *Intisari Sains Medis*. 2017. (8)1: 24-30.
10. Istianto M, Muryanti. *Minyak Atsiri Jeruk: Manfaat dan Potensi Peningkatan Nilai Ekonomi Limbah Jeruk*. Litbang pertanian. Jakarta. 2014.
11. Fukumoto S, Sawasaki E, Okuyama S, Miyake Y, Yokogoshi H. Flavor Components of Monoterpenes in Citrus Essential Oils Enhance the Release of Monoamines from Rat Brain Slices. *Nutritional Neuroscience*. 2006. 9(2): 73-80.
12. Karta IW, Susila LANKE, Mastra IN, Dikta PGA. Kandungan Gizi pada Kopi Biji Salak (*Salacca zalacca*) Produksi Kelompok Tani Abian Salak Desa Sibetan yang Berpotensi Sebagai Produk Pangan Lokal Berantioksidan dan Berdaya Saing. *Jurnal Virgin*. 2015. 1(2):123-133.
13. Purwanto N, Endah R, Sadiyah ER. Uji Sitotoksik Ekstrak Biji Salak (*Salacca zalacca* (Gaert) Voss.) dengan Menggunakan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). *Jurnal Prosiding Penelitian SPESIA UNISBA*, Bandung. 2015. ISSN: 2460-6472.
14. Brooks SP, Dunnett SB. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nature Reviews: Neurosciences*. 2009. 10: 519-529. doi:10.1038/nrn2652.
15. Hanani, E.. *Analisis fitokimia*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC. 2017.
16. Departemen Kesehatan Republik Indonesia [Depkes RI]. *Parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI. 2000.
17. Porsolt, RD, Pichon, ML, & Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*. 1977. 266: 730-732.
18. Kurama NP, Bodhi W, Wiyono W. Uji Efek Antidepresan Ekstrak Metanol Jamur Tlethong (*Psilocybe cubensis*) Pada Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*): ditinjau dari Immobility time dengan Metode Forced Swim Test. *Pharmakon: Jurnal Farmasi*. 2013. 2(3):29-33.
19. Kusumo ANA, Oktafia S, Jaya GA, & Widiasputra LA. *Kandungan Gizi Biji Salak (Salacca edulis)* ditelaah dari berbagai metode pelunakan biji. Salatiga: Universitas Kristen Satya. 2012.
20. Yustinah, Fanandara D. Ekstraksi minyak atsiri dari kulit jeruk sebagai bahan tambahan pada pembuatan sabun. *Konversi*. 2016. 5(1): 25-29.
21. Wolf A, Bauer B, Abner EL, Ashkenazy-Frolinger T, Hartz AMS. A comprehensive behavioral test battery to assess learning and memory in 129S6/Tg2576 mice. *Plos One*. 2016. 11(1): e0147733. doi:10.1371/journal.pone.0147733.
22. Goodenough J, McGuire B, Jacob E. *Perspective on animal behavior*. 3<sup>rd</sup> Edition. Jhon Willy & Sons, Inc. 2010.

23. Mendes CS, Bartos I, Márka Z, Akay T, Márka S, Mann SM. Quantification of gait parameters in freely walking rodents. *BMC Biology*. 2015. 13(50): 1-11. doi: 10.1186/s12915-015-0154-0.
24. Sherwood L. *Human Physiology: From Cell to Systems, 7ed*. Cengage Learning: Canada. 2010.
25. Purwanto N, Endah R, Sadiyah ER. Uji Sitotoksik Ekstrak Biji Salak (*Salacca zalacca* (Gaert) Voss) dengan Menggunakan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). *Jurnal Prosiding Penelitian SPESIA UNISBA*, Bandung. 2015. ISSN: 2460-6472.
26. Colbert M. Terpene Profile: *Linalool*. <http://theleafonline.com/c/science/2014/09/terpene-profile-linalool>. 2014.
27. Armando, R. *Memproduksi 15 minyak atsiri berkualitas*. Swadaya. 2009.
28. Bousbia N, Vian MA, Ferhat MA, Meklati BY, & Chemat F. 2009. A new process for extraction of essential oil from Citrus peels Microwave hydro diffusion and gravity. *Journal of Food Engineering*. 90:409-413.
29. Barton A, Perlmutter J, & Hand L. 2016. *Essential Oils: All natural remedies and recipes for your mind, body, and home*. Derling Kindersley-US: New York.
30. Fukomoto S, Morashita A, Furutachi K, Terashima T, Nakayama T, & Yokogoshi H. 2008. Effect of Flavour Components in Lemon Essential Oil on Physical or Psychological Stress. *Stress and Health*. 24:3-12.
31. Rechee J, Urry L, Cain M, wasserman S, Minorsky P, & Jackson R . 2011. *Campbell Biology, 9<sup>th</sup>*. Benjamin Cummings: San Fransisco.
32. Nguyen M & Krainc D. 2018. LRRK2 phosphorylation of auxilin mediates synaptic defects in dopaminergic neurons from patients with Parkinson's disease. *Plos One*. doi:10.1073/pnas.1717590115
33. Randall D, Burggren W, & French K. 2000. *Eckert Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations*. W.H. Freeman and Company:USA.
34. Burbulla LF & Krainc D. 2019. The role of dopamine in the pathogenesis of *GBA1*-linked Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*. 132: 104545. doi:10.1016/j.nbd.2019.104545.
35. Nguyen M, Wong YC, Ysselstein D, Severino A, & Krainic D. 2019. Synaptic, mitochondrial, and lysosomal dysfunction in parkinson's disease. *J Trends Neurosci*. (42)2: 140-149. doi:10.1016/j.tins.2018.11.001.
36. Haryoto; Suhendi A; Prasnaramita E; Sujono TA; & Muhtadi. 2015. Uji toksisitas subkronik ekstrak etanol daun tumbuhan Sala (*Cynometra ramiflora* Linn.) dengan parameter kimia urin dan histopatologi organ ginjal pada tikus galur wistar. *The 2<sup>nd</sup> University Research Coloqium 2015*. ISSN 2407-9187. (dapat diakses pada <https://jurnal.unimus.ac.id/index.php/psn12012010/article/view/1634>).
37. Quesenberry KE & Karpenter JW. 2012. *Ferrets, Rabbits, and Rodents: Clinical Medicine and Surgery*. Third Edition. Elsevier Saunders: Missouri – USA.
38. Hau J & Schapiro SJ. 2014. *Handbook of Laboratory Animal Science, Volume III: Animal Model*. Third Edition. CRC Press: New York – USA.
39. Harkness JE, Turner PV, Wounde SV, & Wheler CL. 2010, *Biology and Medicine of Rabbits and Rodent*, 5<sup>th</sup> Edition, Wiley-Blackwell: USA.