

Perubahan Morfologi Jaringan Hati Tikus pada Pemberian Ekstrak Daun Sirsak Jangka Panjang

Meta Syafitri¹, Maya Tejasari², Cice Tresnasari³

¹Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Bandung,

²Departemen Histologi, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Bandung,

³Departemen Ilmu Kedokteran Fisik dan Rehabilitasi, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Bandung

Abstrak

Hati dapat mengalami kerusakan yang dapat disebabkan oleh obat-obatan (*drug induced liver injury*). Tanaman sirak banyak digunakan sebagai obat-obatan seperti antioksidan, antitumor, antimikroba dan antiparasit. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perubahan morfologi jaringan hati tikus pada pemberian sediaan ekstrak daun sirsak (*Annona muricata*) jangka panjang. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo* dengan desain penelitian Rancangan Acak Lengkap terhadap tikus jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*) yang terbagi dalam empat kelompok, yaitu kelompok kontrol positif (normal) dan tiga kelompok perlakuan dengan dosis ekstrak daun sirsak 20 mg/kgBB; 40 mg/kgBB dan 80 mg/kgBB yang diberikan selama 60 hari. Semua perlakuan diberikan secara oral. Setelah diberi perlakuan 60 hari, tikus dikorbankan dan diambil organ hatinya, kemudian dibuat sediaan histopatologi dan dilihat menggunakan mikroskop cahaya. Hasil penelitian menunjukkan adanya peningkatan jumlah hepatosit yang membengkak pada ketiga kelompok perlakuan dengan konsentrasi paling signifikan adalah 80 mg/kgBB, dan penurunan jumlah *central vein* yang utuh tanpa area nekrosis pada ketiga kelompok perlakuan dengan konsentrasi paling signifikan adalah 40 mg/kgBB. Keduanya menggambarkan efek cedera pada sel hati. Kesimpulan penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun sirsak jangka panjang berpengaruh terhadap peningkatan jumlah hepatosit yang membengkak dan penurunan jumlah *central vein* yang utuh.

Kata kunci: Daun sirsak (*Annona muricata*), *Drug induced liver injury*, Pembengkakan hepatosit.

Morphological Changes of Rat Liver Tissue on Long-term Soursop Leaves Extract

Abstract

The liver can experience damage induced by drug (*drug induced liver injury*). Soursop plants are widely used as medicines such as antioxidants, antitumors, antimicrobials and antiparasites. The aim of this study is to determine morphological changes of rat liver tissue given long-term soursop leaves extract preparation (*Annona muricata*). This research was an experimental *in vivo* study with a Randomized Complete Design against Wistar strain rats (*Rattus norvegicus*) which divided into four groups: positive control group (normal) and three treatment groups with dosage of 20 mg/kg body weight soursop leaf extract; 40 mg/kg body weight and 80 mg/kg body weight given

Korespondensi: Meta Syafitri, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Bandung,
Jl. Hariang Baga No. 2, Bandung, Jawa Barat, E-mail: syafitri.metha@yahoo.co.id

over 60 days. All treatments are administered orally. After 60 days of treatment, the rats were sacrificed and the liver was taken, then the histopathologic preparations were made and viewed using a light microscope. The results of the study showed an increase in the number of swollen hepatocytes in the three treatment groups with the most significant concentration of 80 mg / kgBW, and the decrease of intact central vein without necrosis area in the three treatment groups with the most significant concentration was 40 mg / kgBW. Both illustrate the effects of injury on liver cells. The conclusions of this study indicate that the provision of long-term soursop leaves extract affects the increase in the number of hepatocytes swell and decrease the number of central vein intact.

Keywords: Drug induced liver injury, Hepatocyte swelling, Soursop leaves (*Annona muricata*)

Pendahuluan

Hati merupakan organ paling penting yang berperan dalam menjaga berbagai proses fisiologis dalam tubuh. Hati berfungsi sebagai pusat detoksifikasi dan ekskresi senyawa eksogen dan endogen. Retikulum endoplasma halus dalam hati adalah pokok "*metabolic clearing house*" untuk bahan kimia endogen (antara lain kolesterol, hormon steroid, asam lemak, dan protein), dan zat eksogen (antara lain obat-obatan).^{1,2} Hati dapat mengalami kerusakan atau masalah yang dapat disebabkan oleh beberapa hal, diantaranya penggunaan obat-obatan seperti obat sintetik maupun obat herbal yang sering dikonsumsi serta melebihi kadar yang tidak jelas dikonsumsi, toksin dari makanan, alkohol, dan mikroorganisme patogen seperti virus dan bakteri.³

Berbagai survei di dunia menunjukkan bahwa *drug induced liver injury* (DILI) sebagai penyebab penyakit hati akut maupun kronik dilaporkan sebesar 1:10.000 sampai 1:100.000 pasien. Pada sebagian besar kasus, mekanisme DILI diawali dengan bioaktivitas obat menjadi metabolit reaktif yang mampu berinteraksi dengan makromolekul seluler, seperti protein, lemak, dan asam nukleat. Hal ini menyebabkan disfungsi protein, peroksidasi lipid, kerusakan DNA, dan stres oksidatif. Selain itu, metabolit reaktif ini dapat mencetuskan gangguan pada gradien ionik dan penyimpanan kalsium intraseluler, menyebabkan terjadinya disfungsi mitokondria dan gangguan produksi energi. Hilangnya fungsi mitokondria dan deplesi ATP yang menyebabkan pembengkakan dan lisis sel yang merangsang terjadinya proses inflamasi lokal. Gangguan fungsi seluler ini pada akhirnya dapat menyebabkan kematian sel (nekrosis) dan gagal hati.⁴

Herbal medicine-related hepatotoxicity merupakan penyebab kedua DILI paling sering di negara Barat, sementara di Timur produk herbal merupakan penyebab umum DILI.⁵ Obat herbal sudah digunakan sejak berabad-abad yang lalu oleh masyarakat Mesir Kuno, Cina, India, dan Sumeria.⁶ Penggunaan obat herbal dalam waktu jangka panjang kemungkinan dapat menimbulkan gejala toksisitas seperti toksisitas kronis, karsinogenik, mutagenik dan teratogenik.⁷

Salah satu tanaman yang biasa digunakan sebagai obat herbal adalah sirsak (*Annona muricata L.*). Tanaman sirsak yang paling sering digunakan untuk obat yaitu daun. Daun sirsak mengandung beberapa senyawa kimia seperti *flavonoid*, *alkaloida*, *saponin*, *tannin*, *glikosida*, *glikosida antrakuinon*, *steroid/ triterpenoid*, *kumarin* dan *acetogenin*. Senyawa yang terkandung di dalam daun sirsak tersebut menampilkan

beberapa reaksi biologis atau farmakologis yang berperan sebagai antioksidan, anti-tumor, sitotoksitas selektif, anti-mikroba, anti-parasit dan pestisida properti.⁸

Senyawa kimia tanaman sirsak yang dapat memberikan efek toksik adalah *annonaceous acetogenin*. Pada penelitian terbaru menunjukkan bahwa buah sirsak dengan *annonacin* sebagai *annonaceous acetogenin* utama berpotensi besar dalam proses degeneratif seperti penyakit parkinson. Tetapi penelitian *acetogenin* pada hati belum ada.⁹

Berdasarkan penelitian yang di lakukan oleh Rasyad AA, dkk pada tahun 2015 didapatkan hasil bahwa penggunaan ekstrak etanol daun sirsak dengan dosis 450 mg/kgBB selama 35 hari pada tikus menyebabkan nekrosis pada sebagian kecil sel hati.⁷ Sementara penelitian yang di lakukan oleh Harissa M, pada tahun 2012 didapatkan hasil bahwa pemberian ekstrak etanol daun sirsak pada mencit dengan lama pemberian 60 hari dengan dosis 200 mg/kgBB menunjukkan pengaruh yang signifikan pada aktivitas SGPT (*Serum Glutamic Piruvic Transaminase*) dan rasio berat organ hati.¹⁰ Pada penelitian ini dilakukan jangka panjang yaitu selama 60 hari pada tikus dengan dosis 20 mg/kg BB, 40 mg/kg BB dan 80 mg/kg BB.

Penelitian tentang efek kuratif dan preventif dari daun sirsak telah banyak dilakukan sebelumnya, akan tetapi penelitian tentang efek jangka panjang sediaan ekstrak daun sirsak terhadap perubahan morfologi hati masih jarang dilakukan.

Metode

Penelitian ini dilakukan intervensi berupa uji pemberian sediaan ekstrak etanol daun sirsak terhadap hewan coba yaitu tikus jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*). Sebelum dilakukan penelitian ini, subjek penelitian diadaptasi selama tujuh hari. Setelah diadaptasikan, subjek penelitian dibagi menjadi empat kelompok. Kriteria inklusi Subjek penelitian adalah tikus jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*), usia dewasa 8-10 minggu dengan berat 150-200 gram, serta berbadan sehat dengan ciri-ciri lincah, awas (*alert*), telinga berdiri tegak, tidak ada luka. Kriteria eksklusi adalah tikus yang pernah dijadikan objek penelitian sebelumnya dan tikus yang mati selama masa adaptasi dan perlakuan. Jumlah subjek penelitian yang digunakan pada penelitian ini menggunakan perhitungan rumus Federer, yaitu digunakan enam tikus untuk setiap kelompok sehingga jumlah penelitian adalah 28 ekor tikus.

Bahan penelitian yang digunakan adalah Ekstrak daun sirsak, Pakan tikus standar merupakan pelet jadi yang dibeli di toko hewan dengan kandungan nutrisi seimbang dan air minum, *Aquadest*, Larutan *normal saline* (NaCl), Formalin 10%, *Xylol*, Alkohol 70%, 80%, 90%, dan 96%, *Hematoxylin & Eosin* (H&E), Alat perekat (entelan).

Alat yang dipergunakan pada penelitian ini adalah kandang tikus, tempat makan dan minum tikus, alat pengiris, alat grinding, masetor, kertas saring, *rotari evaporator*, pisau bedah, gunting, papan bedah, kapas steril, medium transpor hati, *tissue processor*, mikrotom, *object glass*, *hot plate*, *cover glas*, *sonde oral*, mikroskop, sarung tangan, alat timbangan, label nama, dan spidol.

Rancangan penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratorium murni *in vivo* dengan desain penelitian Rancangan Acak Lengkap (RAL). Subjek dibagi menjadi 4 (empat) kelompok terdiri atas kelompok I diberi pakan standar dan air minum, kelompok II diberi pakan standar peroral dan air minum kemudian diberikan sediaan ekstrak daun sirsak dengan konsentrasi 20 mg/kgBB/hari, kelompok III diberi pakan standar peroral dan air minum kemudian diberikan sediaan ekstrak daun sirsak dengan konsentrasi 40 mg/kgBB/hari, kelompok IV diberi pakan standar peroral dan air minum kemudian diberikan sediaan ekstrak daun sirsak dengan

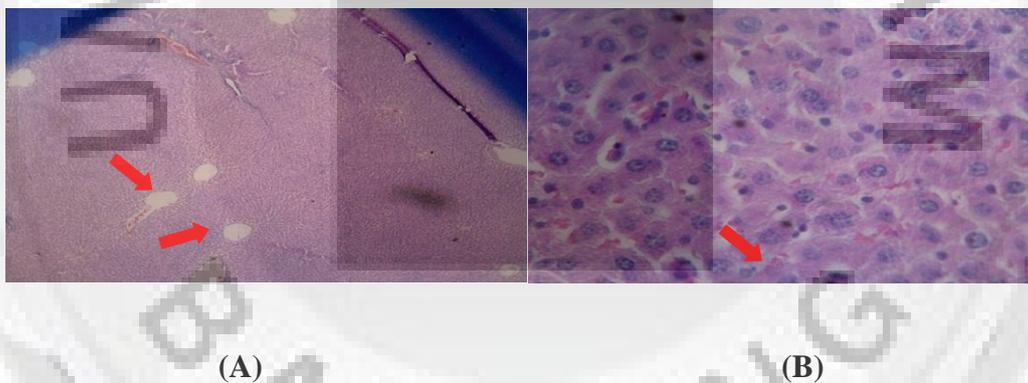
konsentrasi 80 mg/kgBB/hari. Semua subjek penelitian akan menjalani masa adaptasi selama tujuh hari.

Setelah masa adaptasi, tikus akan diberi perlakuan sesuai dengan kelompoknya selama 60 hari. kemudian tikus dikorbakan dengan cara dibedah, diambil organ hatinya, dan kemudian dibuat preparat dengan pewarnaan *Hematoxylin* dan *Eosin* (H&E). Selanjutnya preparat diperiksa dan diobservasi menggunakan mikroskop untuk melihat perubahan jaringan hati. Preparat dibaca berdasarkan setiap lapang pandang yang terlebih dahulu telah dibagi menjadi 9 kotak, kemudian seluruh preparat tersebut diberi tanda 1 sampai 9 kotak dan dibaca pada kotak ke 2, 4, 5, 6, 8 dimana dari setiap kotak terdiri dari 4 lapang pandang. Preparat dibaca menggunakan mikroskop pada pembesaran 40x untuk melihat struktur *central vein* dan pada pembesaran 400x untuk melihat hepatosit yang membengkak dan area nekrosis.

Penelitian ini sudah mendapatkan persetujuan oleh Komite Etik Penelitian Kesehatan (*ethical approval*), Fakultas Kedokteran Universitas Islam Bandung dengan Nomor: 126/Komite Etik.FK/III/2017 pada tanggal 6 Maret 2017.

Hasil

Hasil pembacaan preparat kelompok I (kontrol positif) didapatkan gambaran jaringan hati dengan arsitektur lobulus hati yang normal. Ditemukan sedikit sekali hepatosit yang mengalami pembengkakan, lempeng hepatosit tersusun secara radier mengelilingi *central vein* yang utuh dan tidak ditemukannya area nekrosis. Dapat dilihat pada Gambar 1.



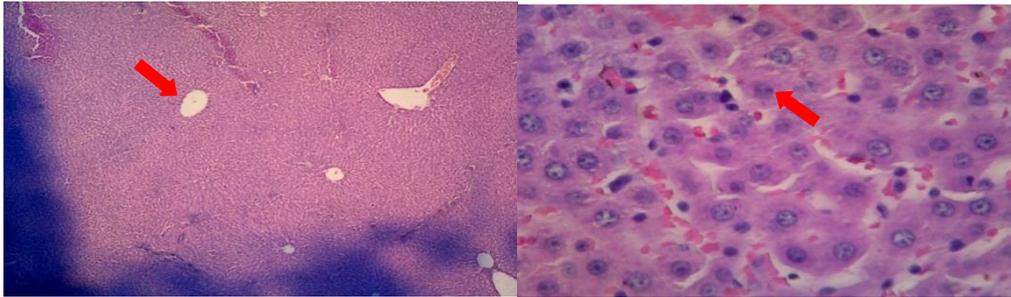
Gambar 1. Kelompok Kontrol Positif

Keterangan:

(A) pembesaran 40x menunjukkan *central vein* yang utuh tanpa area nekrosis

(B) pembesaran 400x menunjukkan hepatosit berukuran normal dalam lempeng hepatosit yang radier.

Kelompok II (perlakuan I) didapatkan gambaran lempeng hepatosit yang masih memiliki pola radier namun sudah ditemukan hepatosit yang mengalami pembengkakan, jumlah *central vein* yang masih utuh tanpa area nekrosis menjadi lebih sedikit dibandingkan pada kelompok 1, serta tidak ditemukan adanya area nekrosis. Dapat dilihat pada Gambar 2.



(A)

(B)

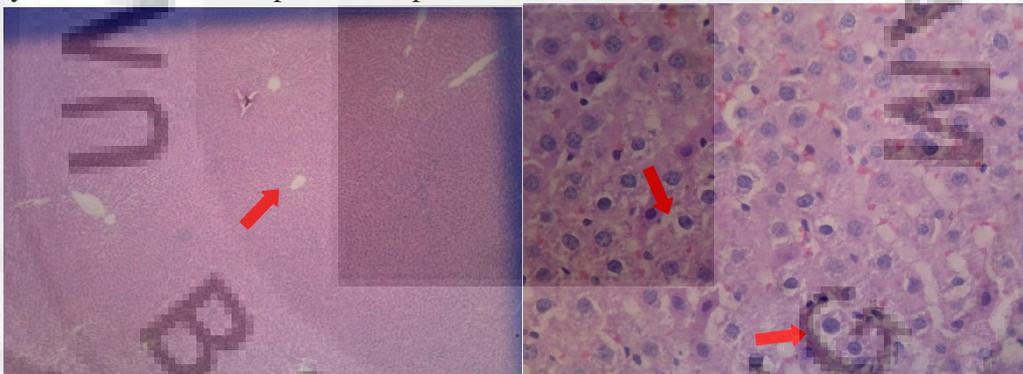
Gambar 2. Kelompok II (Perlakuan I)

Keterangan:

(A) pembesaran 40x menunjukkan *central vein* yang utuh tanpa area nekrosis

(B) pembesaran 400x menunjukkan beberapa hepatosit yang mengalami pembengkakan.

Kelompok III (perlakuan II) didapatkan gambaran jaringan hati yang mulai kehilangan susunan radier lempeng hepatositnya, hepatosit yang mengalami pembengkakan lebih banyak dari kelompok I dan II, jumlah *central vein* yang utuh tanpa area nekrosis paling sedikit ditemukan pada kelompok ini dan tidak ditemukan adanya area nekrosis. Dapat dilihat pada Gambar 3.



(A)

(B)

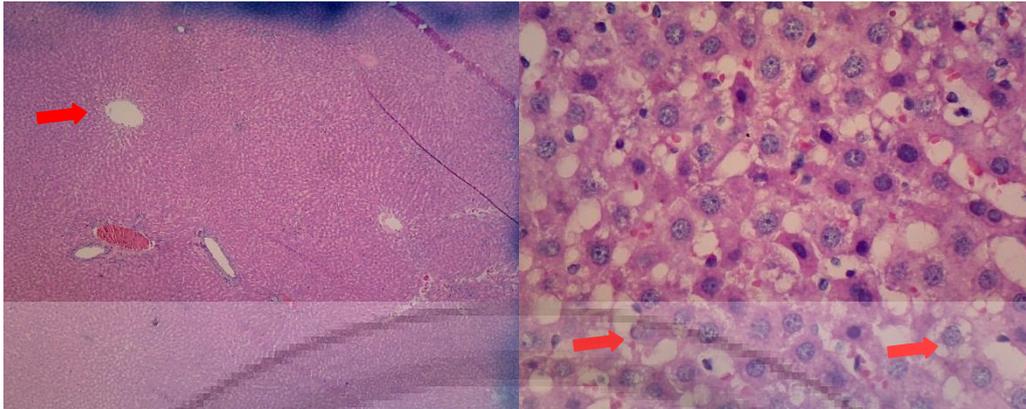
Gambar 3 Kelompok III (Perlakuan II)

Keterangan:

(A) pembesaran 40x menunjukkan *central vein* yang utuh tanpa area nekrosis

(B) pembesaran 400x menunjukkan beberapa hepatosit mengalami pembengkakan dan mulai kehilangan susunan radier lempeng hepatositnya

Kelompok IV (perlakuan III) didapatkan gambaran preparat jaringan hati sudah kehilangan susunan radier lempeng hepatositnya, hepatosit yang mengalami pembengkakan paling banyak pada kelompok ini, jumlah *central vein* yang masih utuh tanpa area nekrosis menjadi lebih sedikit dibandingkan pada kelompok sebelumnya dan tidak ditemukan adanya area nekrosis. Dapat dilihat pada Gambar 4.



(A) (B)

Gambar 4. Kelompok IV (Perlakuan III)

(A) pembesaran 40x menunjukkan *central vein* yang utuh tanpa area nekrosis
 (B) pembesaran 400x menunjukkan hilangnya gambaran radier lempeng hepatosit serta banyaknya hepatosit yang mengalami pembengkakan.

Uji normalitas yang dipergunakan adalah metode uji normal Shapiro-Wilk Test untuk mengetahui distribusi data numerik dengan jumlah <50 data. Hasil uji normalitas dapat terlihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil Uji Normalitas Jumlah Hepatosit yang Membengkak dan Central Vein yang Utuh Tanpa Area Nekrosis

Kelompok	Jumlah Hepatosit yang Membengkak		Jumlah <i>Central Vein</i> yang Utuh Tanpa Area Nekrosis	
	Nilai p	Distribusi	Nilai p	Distribusi
Kontrol	0,728	Normal	0,771	Normal
Perlakuan I	0,081	Normal	0,743	Normal
Perlakuan II	0,714	Normal	0,434	Normal
Perlakuan III	0,893	Normal	0,772	Normal

*Shapiro wilks test

Hasil dari pengujian normalitas memperlihatkan bahwa data jumlah hepatosit yang membengkak dan jumlah Central Vein yang utuh tanpa area nekrosis ($p > 0,05$). Selanjutnya, karena distribusi data normal maka dapat dilakukan uji beda menggunakan One Way ANOVA (Analysis of Variance) untuk menilai perbedaan antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Hasil uji tersebut dapat dilihat pada tabel 2.

Table 2. Rerata dan Hasil Uji Beda Jumlah Hepatosit yang Membengkakkan Central Vein yang Utuh Tanpa Area Nekrosis

Kelompok	Jumlah Hepatosit yang Membengkakkan		Jumlah Central Vein yang Utuh Tanpa Area Nekrosis	
	Rerata	P value	Rerata	P value
Kontrol	6,43	0.000	32,57	0.042
Perlakuan I	40,00		27,71	
Perlakuan II	73,86		21,29	
Perlakuan III	175,29		23,71	

*ANOVA test

Berdasarkan hasil perhitungan uji beda menggunakan *One Way ANOVA* pada derajat kepercayaan 95% didapatkan pengaruh pemberian ekstrak daun sirsak jangka panjang terhadap jumlah hepatosit yang membengkakkan pada tikus secara berbeda bermakna dengan nilai $p=0,000$ (nilai $p<0,05$), dan jumlah *Central Vein* yang utuh tanpa area nekrosis pada tikus secara berbeda bermakna dengan nilai $p=0,042$ (nilai $p<0,05$). Selanjutnya, karena terdapat perbedaan yang bermakna perhitungan dilanjutkan dengan uji lanjutan *Post Hoc Test* untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan bermakna yang paling signifikan. Hasil uji lanjutan dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Uji Beda Lanjut Jumlah Hepatosit yang Membengkakkan dan Central Vein yang Utuh Tanpa Area Nekrosis

Perbandingan antar kelompok	Jumlah Hepatosit yang Membengkakkan	Jumlah Central Vein yang Utuh Tanpa Area Nekrosis
	Nilai p	Nilai p
Kelompok II -kelompok I	0,119	0,227
kelompok III -kelompok I	0,003	0,008
Kelompok IV -kelompok I	0,000	0,033

*Post HocTest

Hasil uji statistik menggunakan *Post Hoc Test* didapatkan jumlah hepatosit yang membengkakkan pada kelompok yang diberikan ekstrak daun sirsak jangka panjang dengan konsentrasi paling signifikan 80 mg/kgBB pada kelompok IV (perlakuan III) menunjukkan hasil perbedaan bermakna dengan kelompok kontrol dengan nilai $p=0,000$ ($p<0,05$). Sedangkan untuk hasil uji jumlah *Central Vein* yang utuh tanpa area nekrosis yang diberikan ekstrak daun sirsak jangka panjang dengan konsentrasi paling signifikan 40 mg/kgBB pada kelompok III (perlakuan II) menunjukkan hasil perbedaan bermakna dengan kelompok kontrol dengan nilai $p=0,008$ ($p<0,05$).

Pembahasan

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian sediaan ekstrak daun sirsak jangka panjang selama 60 hari dan peningkatan pemberian dosis ekstrak daun sirsak dapat menyebabkan kerusakan jaringan hati tikus yang lebih signifikan. Teori ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Rasyad AA, dkk pada tahun 2015 terhadap tikus. Perlakuan diberikan setiap hari selama 35 hari dengan diberikan ekstrak etanol daun sirsak dengan dosis 150 mg/kgBB, 300 mg/kgBB, dan 450 mg/kgBB. Hasil penelitian menunjukkan pada pemberian ekstrak etanol daun sirsak dosis 450 mg/kgBB/hari ditemukan fokal jaringan hati nekrosis.⁷ Penelitian lain yang dilakukan oleh Harissa M, pada tahun 2012 menunjukkan hasil bahwa pemberian ekstrak etanol daun sirsak pada mencit dengan lama pemberian 60 hari dengan dosis 200 mg/kgBB menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap gangguan fungsi pada aktivitas SGPT dan rasio berat organ hati.¹⁰ Hal ini kemungkinan disebabkan adanya kerusakan membran plasma sehingga sel hati kehilangan integritasnya dan menjadi lebih permeabel. Akibatnya adalah homeostasis kalsium akan terganggu dan masuknya natrium dan air menyebabkan terjadinya pembengkakan sel sehingga terjadi peningkatan pada berat organ hati. Selain itu, enzim-enzim yang ada di dalam hepatosit akan terdeteksi di dalam darah dalam jumlah yang meningkat seperti SGPT.¹¹ Pada penelitian Harissa M ini terjadi gangguan struktur hati.

Hasil penelitian ini tidak sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Rasyad AA, dkk pada tahun 2015. Pada penelitian ini pemberian dosis yang paling signifikan terhadap peningkatan jumlah hepatosit yang membengkak yang diberi sediaan ekstrak daun sirsak jangka panjang adalah 80 mg/kgBB/hari, dan pemberian dosis yang paling signifikan terhadap penurunan jumlah *central vein* yang utuh tanpa area nekrosis yang diberi sediaan ekstrak daun sirsak jangka panjang 40 mg/kgBB/hari.

Adanya perbedaan dengan penelitian Rasyad AA, karena dosis dan lama waktu yang digunakannya berbeda. Pada penelitian tersebut digunakan dosis yang lebih tinggi yaitu 450 mg/kgBB/hari selama 35 hari sehingga kerusakan jaringan hati yang timbul lebih berat.⁷ Sedangkan pada penelitian ini dosis yang diberikan adalah dosis yang diketahui dapat memberikan efek penurunan terhadap kadar asam sialat pada jaringan hati tikus yang diinduksi DMBA (*Dimethylbenzanthracene*), tetapi diberikan dalam jangka panjang selama 60 hari, sehingga kerusakan hati yang timbul lebih ringan.¹² Penelitian ini merupakan penelitian pertama yang meneliti tentang pemberian sediaan ekstrak daun sirsak jangka panjang terhadap perubahan morfologi jaringan hati tikus.

Simpulan

Simpulan penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun sirsak jangka panjang berpengaruh terhadap peningkatan jumlah hepatosit yang membengkak dan penurunan jumlah *central vein* yang utuh tanpa area nekrosis.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pimpinan dan dosen Fakultas Kedokteran Islam Bandung, Laboratorium Eyckman Universitas Padjajaran, Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran UNISBA, Laboratorium Ilmu Hayati ITB dan teman-teman angkatan 2013.

Daftar Pustaka

1. Ilyas U, Katare DP, Aeri V, Naseef PP. A Review on Hepatoprotective and Immunomodulatory Herbal Plants. *Pharmacogn Rev.* 2016; Jan-Jun; 10(19): 66-70.
2. Tortora GJ, Derrickson B. Principles of anatomy and physiology. 12th edition. USA: John Wiley & Sons Inc; 2009.
3. Corwin, E. J. Buku saku patofisiologis. (Nike budhi, Penerjemah). Jakarta: EGC. 2009.
4. Loho I, Hasan I. Drug-Induced Liver Injury – Tantangan dalam Diagnosis. 2014;41(3), 167–170.
5. Stournares E, Tziomalos K. Herbal medicine-related hepatotoxicity. *World J Hepatol.* 2015 Sep 8; 7(19): 2189-2193.
6. Larson AM, MD, FACP, FAASLD, AGAF. Hepatotoxicity due to herbal medications and dietary supplements. 2017 Jan 12.
7. Rasyad AA, Handayani AF, Meisyayati S. Uji hepatotoksik ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata*) terhadap tikus putih jantan galur wistra. 2015.
8. Setyorini HA, Kurniatri AA, Adelina R dan Winarsih. Karakterisasi mutu ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) dari tiga tempat tumbuh. Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan. 2016
9. Patel S, Patel JK. A review on a miracle fruits of *Annona muricata*. *J Pharmacogn Phytochem.* 2016;5(51):137-148.
10. Harissa M. Uji toksisitas sub kronis dari ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata*) terhadap hati dan ginjal pada mencit putih. 2012.
11. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster J. Robbin and Cotran pathologic basis of disease. Eighth edition. Philadelphia: ELSEVIER; 2010.
12. Selviana BY. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Sirsak (*Annona Muricata*.L) Terhadap Asam Sialat Pada Jaringan Hati Tikus yang Diinduksi Senyawa 7,12-Dimethylbenz[A] Anthracene (DMBA). 2015