

UJI AKTIVITAS NEFROPROTEKTIF EKSTRAK ETANOL DAUN SIRIH HIJAU (*Piper betle L.*) PADA TIKUS PUTIH JANTAN GALUR *Spargue Dawley* YANG DIINDUKSI KARBON TETRAKLORIDA (CCl₄).

Tita Nofianti

Program Studi S1 Farmasi
STIKes Bakti Tunas Husada Tasikmalaya

ABSTRAK

Pada pengujian neproprotektif dari ekstrak etanol daun sirih hijau yang diinduksi dengan CCl₄ diperoleh data hasil penelitian yaitu dosis I (0,005 g/200 g bb tikus) sebesar 0,67 mg/dL (16,25%), dosis II (0,010 g/200 g bb tikus) sebesar 0,63 mg/dL (21,25%) dan dosis III (0,020 g/200 g bb tikus) sebesar 0,62 mg/dL (22,50%) dapat menurunkan kadar kreatinin. Sedangkan untuk parameter *Blood Urea Nitrogen* (BUN) tidak berbeda bermakna jika dibandingkan dengan kontrol negatif yaitu pada dosis I sebesar 15,87 mg/dL (17,77%) pada dosis II sebesar 18,38 mg/dL (4,77%) dan pada dosis III sebesar 18,52 mg/dL (4,04%)

Kata kunci : Neproprotektif, Sirih Hijau, Kreatinin, BUN

PENDAHULUAN

Bangsa Indonesia telah lama mengenal dan menggunakan tanaman berkhasiat obat sebagai salah satu upaya dalam menanggulangi masalah kesehatan. Pengetahuan tentang tanaman berkhasiat obat berdasar pada pengalaman dan keterampilan yang secara turun temurun telah diwariskan dari satu generasi ke generasi berikutnya (Kumalasari, 2006).

Salah satu tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai pengobatan alternatif adalah daun sirih hijau (*Piper betle L.*). Daun sirih hijau di Indonesia tidak hanya digunakan sebagai tanaman hias, melainkan sangat banyak sekali manfaat dari daun sirih diantaranya yaitu dapat mencegah kerusakan hati dan ginjal (Hamidi, 2009).

Dalam dunia kesehatan, jumlah penderita penyakit ginjal cukup besar. Penyakit tersebut merupakan penyakit yang persentasenya terus meningkat dari tahun ke tahun. Di indonesia, jumlah pasien

yang menderita penyakit ginjal kronis meningkat dengan sangat cepat (Prodjosudjadi & Suharjono, 2009).

Ginjal menjalankan fungsi yang vital sebagai pengatur volume dan komposisi kimia darah (dan lingkungan dalam tubuh) dengan mengekskresikan zat terlarut dan air secara selektif. Dalam melaksanakan fungsi ekskresi, ginjal mendapat tugas yang berat mengingat hampir 25% dari seluruh aliran darah mengalir ke ginjal. Besarnya aliran darah yang menuju ginjal menyebabkan keterpaparan ginjal terhadap bahan atau zat-zat yang beredar dalam sirkulasi cukup tinggi. Akibatnya, bahan-bahan yang bersifat toksik akan mudah menyebabkan kerusakan jaringan ginjal dalam bentuk perubahan struktur dan fungsi ginjal (Price dan Wilson, 2006).

Metode yang digunakan untuk mengobati gangguan pada ginjal diantaranya adalah metode hemodialisis, dialisis peritoneal dan pencangkokan

ginjal. Namun, metode terbaik dalam melawan penyakit ginjal tentu saja melalui pencegahan. Pencegahan yang umum dilakukan oleh masyarakat antara lain dengan melakukan gaya hidup sehat seperti berolah raga, pola makan sehat dan yang sedang populer saat ini dimasyarakat adalah dengan mengkonsumsi suplemen alami berupa tanaman tradisional (Cahyaningsih dkk, 2011). Oleh karena itu, Penelitian bertujuan untuk melihat efek nefroprotektif daun sirih hijau (*Piper betle* L.) pada tikus putih jantan yang diinduksi karbon tetraklorida ditinjau dari kadar *Blood Urea Nitrogen* dan kreatinin serum.

TUJUAN PENELITIAN

Tujuan penelitian adalah untuk melihat efek nefroprotektif daun sirih hijau (*Piper betle* L.) pada tikus putih jantan yang diinduksi karbon tetraklorida ditinjau dari kadar *Blood Urea Nitrogen* dan kreatinin serum.

ALAT dan BAHAN

Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu seperangkat alat Maserator, *Rotary evaporator* (Eyla), Cawan penguap, Tabung reaksi (Pyrex), Pipet tetes, Mortir dan stemper, Penangas air, Kapas, Cawan Penguap, Penjepit kayu, Plat tetes, Beaker glass (Pyrex), Timbangan, Sonde oral, Stop watch, Fotometer TC3300, Sentrifugator, Tabung sentrifugasi, micropipet.

Bahan

Bahan yang digunakan yaitu daun sirih hijau, hewan uji (tikus jantan putih), minyak kelapa, karbon tetraklorida, aquadest, amonia 10%, HCl 1N, HCl 2N, logam Mg, vanillin, H₂SO₄, anisaldehyd, pereaksi *Lieberman-Buchard*, NaOH, pereaksi *Mayer*, pereaksi *Dragendroff*, pereaksi *bouchardat*, reagen kit Urea dan reagen kit kreatinin

METODE

Bahan Uji

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tumbuhan berupa daun sirih hijau (*Piper betle* L.) yang diperoleh dari perkebunan Manoko, Lembang kab. Bandung.

Pembuatan Simplisia

Daun sirih hijau (*Piper betle* L.) diperoleh dari perkebunan Manoko, Lembang Bandung yang diambil secara random. Daun sirih hijau segar ditimbang sebanyak 3000 gram yang berwarna hijau tua, dilakukan sortasi basah dengan cara dibersihkan dan dicuci, tujuannya untuk memisahkan tanah, kotoran-kotoran atau bahan-bahan asing yang masih melekat pada bahan simplisia, pencucian dilakukan dengan menggunakan air bersih dan mengalir, kemudian ditiriskan. Setelah ditiriskan daun sirih hijau dipotong menjadi beberapa bagian, kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender untuk memudahkan proses penarikan metabolit sekunder oleh pelarut. Serbuk tersebut selanjutnya disimpan pada tempat kering dalam wadah tertutup rapat.

Pembuatan Ekstrak

Serbuk daun sirih hijau (*Piper betle* L.) sebanyak 400 gram diekstraksi secara maserasi, dengan cara merendam daun sirih muda yang telah diblender dalam pelarut etanol 70% selama 24 jam. Kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring. Residu direndam lagi beberapa kali dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama sampai filtrat menjadi tidak berwarna. Setelah itu diuapkan dengan *Rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental daun sirih hijau.

Penentuan Dosis karbon tetraklorida

Pada penelitian sebelumnya (Wahyu Atmaja, 2010) larutan karbon tetraklorida dibuat dengan cara pengenceran menggunakan minyak kelapa untuk meningkatkan absorpsinya. Dosis karbon tetraklorida yang digunakan ialah 0,4 mL/kgBB. Volume pemberian ialah sebesar 1,59 g/mL. Cara penyiapan larutan karbon tetraklorida dosis 0,4 mL/kgBB ialah dengan menimbang sebanyak lebih kurang 4,24 g karbon tetraklorida, kemudian dilarutkan dalam minyak kelapa dan dicukupkan volumenya hingga 100 ml.

Penentuan Dosis Ekstrak Daun Sirih Hijau

Menurut Hamidi (2009) pemakaian daun sirih hijau sebanyak 20 g daun sirih hijau segar.

Dosis empiris = 20 gram daun segar

Dosis empiris daun kering = 3,67 gram

Timbang daun segar 3 Kg,

Daun kering 400 gram,

Berat ekstrak kental: 64,063 gram

Konversi ke tikus : 3,67 gram x
0,018 = 0,066 gram/200 g bb tikus

Dosis ekstrak kental :

$$\frac{0,066 \text{ g}}{400 \text{ g}} \times 64,063 \text{ g} = 0,010 \text{ gram}$$

DER (Drug Ekstrak Ratio)

$$\frac{400 \text{ g}}{64,063 \text{ g}}, = 6,24 \text{ gram}$$

$$\frac{0,066 \text{ g}}{6,24 \text{ g}} = 0,010 \text{ gram}$$

Dosis I = $\frac{1}{2}$ x 0,010 gram = 0,005 g/200 g BB tikus

Dosis II = 0,010 g/200 g BB tikus

Dosis III = 2 x 0,010 = 0,020 g/200 g BB tikus

Penyiapan hewan percobaan

Sebelum percobaan mencit diadaptasikan terlebih dahulu selama 7 hari, selama adaptasi mencit diamati kesehatannya dengan cara menimbang bobot badan dan mengamati tingkah lakunya setiap hari. Mencit yang digunakan dalam percobaan adalah mencit yang sehat yaitu mencit yang selama proses pemeliharaan tersebut bobot badannya tetap atau berubah tidak lebih dari 10%. Dan secara visual tidak menunjukkan adanya kelainan tingkah laku dan penyimpangan lainnya dari keadaan normal.

Penafisan Fitokimia

Pada penelitian ini dilakukan penapisan fitokimia pada simplisia dan ekstrak etanol daun sirih hijau meliputi penapisan senyawa alkaloid, saponin, kuinon, flavonoid, tannin, polifenol, steroid dan triterpenoid. Hal tersebut dilakukan untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam perasan buah sirsak.

Pengujian Aktivitas Nefroprotektif Ekstrak Etanol Daun Sirih Hijau

Tikus Sebanyak 30 ekor diaklimatiasi selama 14 hari dalam kandang dengan kondisi temperatur standar (25°C). Pada waktu tersebut, dilakukan pengamatan terhadap keadaan umum seperti kondisi

mata yang jernih dan bulu yang tidak berdiri. Selain itu dilakukan penimbangan berat badan setiap 3 hari sekali. Kemudian setelah 14 hari dilakukan pemilihan 25 ekor tikus yang sehat untuk selanjutnya dibagi secara acak ke dalam 5 kelompok.

Tabel 1 Pembagian Kelompok Hewan Percobaan

No.	Kelompok	Perlakuan
I	Kontrol normal (5 ekor)	Diberi CMC 0,5% selama 7 hari tanpa pemberian sediaan uji secara oral dan larutan karbon tetraklorida secara oral.
II	Kontrol Induksi (5 ekor)	Diberi CMC 0,5% tanpa sediaan uji dan pada hari ke-7, 2 jam setelah pemberian CMC 0,5% diberikan larutan karbon tetraklorida secara oral
III	Dosis 1 (5 ekor)	Diberi sediaan uji dosis 0,005 g/200 g bb tikus secara oral selama 7 hari dan 2 jam setelah pemberian dosis 1 diberi larutan karbon tetraklorida secara oral.
IV	Dosis 2 (5 ekor)	Diberi sediaan uji dosis 0,010 g/200 g bb tikus secara oral selama 7 hari dan 2 jam setelah pemberian dosis 2 diberi larutan karbon tetraklorida secara oral.
V	Dosis 3 (5 ekor)	Diberi sediaan uji dosis 0,020 g/200 g bb tikus secara oral selama 7 hari dan 2 jam setelah pemberian dosis 3 diberi larutan karbon tetraklorida secara oral.

Setelah 24 jam pemberian larutan karbon tetraklorida dilakukan pengambilan sampel darah untuk pengukuran kadar *Blood Urea Nitrogen* dan kreatinin serum (Cahyaningsih, 2011).

Pemeriksaan Kadar Kreatinin

Pemeriksaan dilakukan dengan metode *jaffe reaction*, Fixed Time. Pengambilan sampel darah dilakukan dengan cara

memotong ekor tikus atau mengambil dibagian vena jungularia dan darahnya ditampung dalam tabung setrifugasi, kemudian disentrifuga selama 20 menit dengan kecepatan 2000 rpm dengan tujuan untuk memisahkan serum yang akan digunakan untuk pemeriksaan (R.Gandasoebrata, 1995). Kemudian serum dimasukkan kedalam eppendorf dan direaksikan dengan reagen uji sesuai Tabel 2.

Tabel 2 Prosedur Pemeriksaan Kreatinin Serum

Reagen	Blanko	Standard	Test
Reagen 1 + reagen 2	500 µl	500 µl	500 µl
Pencampuran R1 dan R2 (1:1) , dilakukan 30 menit sebelum digunakan			
Standard	-	75 µl	-
Sampel	-	-	75 µl

Campur sampai homogen, kemudian inkubasi 30 detik pada suhu 37⁰C, kemudian baca absorbansi (A₁) pada panjang gelombang 500 nm dan tepat 1 menit pada suhu 37⁰C setelah pembacaan pertama baca absorbansi (A₂).

$$\text{Perhitungan hasil : } C = \frac{\text{Abs Test}}{\text{Abs standard}} \times \text{Kons. Standar (2mg/dl)} = \text{creatinine}$$

Pemeriksaan Kadar Blood Urea Nitrogen (BUN)

Pemeriksaan dilakukan dengan metode enzimatik, Fixed Time. Pengambilan sampel darah dilakukan dengan cara memotong ekor tikus atau mengambil dibagian vena jugularia dan darahnya ditampung dalam tabung setrifugasi,

kemudian disentrifuga selama 20 menit dengan kecepatan 2000 rpm dengan tujuan untuk memisahkan serum yang akan digunakan untuk pemeriksaan (R.Gandasoebrata, 1995). Kemudian serum dimasukkan kedalam eppendorf dan direaksikan dengan reagen uji sesuai Tabel 3.

Tabel 3 Prosedur Pemeriksaan Blood Urea Nitrogen

Reagen	Blanko	Standard	Test
Reagen 1 + Reagen 2 (5:1)	500 µl	500 µl	500 µl
Standard	-	5 µl	-
Sampel	-	-	5 µl

Campur dan inkubasi selama 60 detik pada suhu 37⁰C, baca absorbansi pada panjang gelombang 340 nm (A₁) dan baca absorbansi pada selang waktu 120 detik (A₂).

$$\text{Perhitungan : } C = \frac{\text{Abs Test}}{\text{Abs standard}} \times \text{Kons. Standar (80 mg/dl)} = \text{UREA}$$

$$\text{BUN (Blood Urea Nitrogen)} = 0,467 \times \text{UREA}$$

Analisis data

Analisis data yang akan digunakan pada penelitian ini adalah analisis data secara statistik dengan ANAVA (SPSS 16).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Ekstraksi dan Penafisan Fitokimia

Simplisia daun sirih hijau (*Piper betle* L.) digunakan yaitu sebanyak 400 gram yang diekstraksi dengan menggunakan metode maserasi karena pada prosesnya menggunakan suhu ruang sehingga dapat meminimalisir kerusakan senyawa dalam ekstrak yang tidak tahan pemanasan. Proses ekstraksi menggunakan pelarut etanol 70% karena

terkait dengan toksisitasnya, sampai saat ini berlaku aturan bahwa pelarut yang diperbolehkan untuk diujikan pada hewan coba adalah air dan alkohol (etanol) serta campuran keduanya. Konsentrasi 70% dinilai cukup polar untuk menarik flavonoid sebagai senyawa aktif yang diduga berperan besar dalam penelitian ini. Selain ini juga digunakan simplisia kering karena dalam kandungan air dari etanol 70% mampu melisis sel sampel sehingga penetrasi pelarut kedalam sel lebih mudah dan tersari lebih baik, menurut farmakope herbal dinyatakan bahwa pelarut yang digunakan untuk menyari simplisia tidak dinyatakan lain

yaitu etanol 70%. Maserasi dilakukan selama beberapa hari sampai didapat maserat, maserat yang didapat kemudian diuapkan dengan rotary evaporator sampai didapat ekstrak kental sebanyak 64,063 gram sehingga rendemen yang diperoleh sebesar 16,015 %.

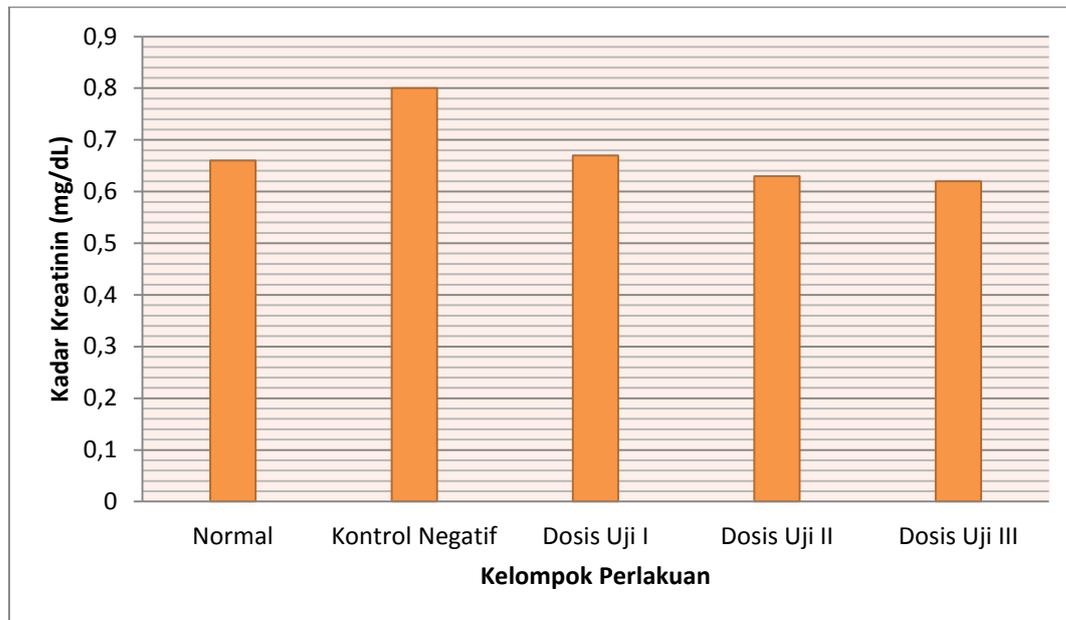
Skrining fitokimia secara kualitatif dilakukan bertujuan untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder yang terdapat pada simplisia dan ekstrak etanol daun sirih hijau (*Piper betle* L.) Skrining fitokimia pada daun sirih hijau terhadap senyawa metabolit sekunder meliputi alkaloid, flavonoid, tanin dan polifenol, saponin, kuinon, steroid dan triterpenoid, monoterpen dan seskuiterpen.

Hasil Pemeriksaan Kadar Kreatinin Serum (mg/dL)

Pemeriksaan kreatinin dilakukan dengan menggunakan metode *jaffe reaction* dengan cara *fixed time* yang dilakukan dengan dua kali pembacaan absorbansi pada panjang gelombang 500 nm. Metode ini berdasarkan reaksi pembentukan kompleks berwarna kuning-oranye antara asam pikrat dengan larutan alkali. Tingkat formasi warna tersebut sebanding dengan konsentrasi kreatinin dalam sampel. Kreatinin merupakan hasil akhir metabolisme otot yang dilepaskan dari otot dengan kecepatan yang hampir konstan dan diekskresi dalam urin dengan

kecepatan yang sama. Peningkatan kadar kreatinin menunjukkan bahwa ginjal tidak membersihkan kreatinin dan mengindikasikan adanya penyakit ginjal (Price dan Wilson, 2006).

Berdasarkan hasil pemeriksaan dapat dilihat pada Gambar 1 menunjukkan bahwa rata-rata kadar kreatinin pada kelompok normal adalah 0,66 mg/dL dan pada kelompok kontrol negatif mengalami kenaikan kadar kreatinin sebesar 0,80 mg/dL. Sedangkan pada kelompok uji dosis I,II dan III mengalami penurunan kadar kreatinin dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif, yaitu pada dosis I sebesar 0,67 mg/dL (16,25%) pada dosis II sebesar 0,63 mg/dL (21,25%) dan pada dosis III sebesar 0,62 mg/dL (22,50%). Pada kadar rata-rata kelompok dosis uji I mendekati rata-rata kadar kreatinin serum kelompok normal, hal ini menunjukkan bahwa dengan pemberian ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L) pada dosis I telah memberikan efek penurunan kadar kreatinin serum. Sedangkan rata-rata kadar kreatinin serum kelompok uji dosis II dan III menunjukkan hasil yang lebih kecil dibandingkan dengan rata-rata kadar kreatinin serum kelompok normal, tetapi hasil ini masih berada pada rentang normal kadar kreatinin serum pada tikus yaitu 0,2-0,8 mg/dL (Johnson, 1996).



Gambar 1. Rata-rata kadar kreatinin uji aktivitas neproprotektif ekstrak etanol daun sirih hijau

Berdasarkan hasil uji ANOVA didapat bahwa nilai signifikansi $0,002 < 0,05$ yang artinya H_0 ditolak, artinya data berbeda secara bermakna. Hal ini mengindikasikan ekstrak daun sirih hijau dari ketiga kelompok dosis yang diberikan selama 7 hari memberikan perbedaan yang bermakna terhadap penurunan nilai kreatinin pada tikus dengan tingkat kepercayaan 95%. Maka dari itu dilanjutkan dengan uji LSD yaitu kelompok kontrol negatif menunjukkan perbedaan yang bermakna jika dibandingkan dengan kelompok uji dosis I dengan nilai signifikansi 0,005, kelompok uji dosis II dan dosis III dengan nilai signifikansi 0,000. Artinya kelompok kontrol negatif memiliki nilai yang berbeda nyata dengan rata-rata kelompok uji dosis I, dosis II dan dosis III. Dengan demikian maka pemberian ekstrak etanol daun sirih hijau dapat menurunkan kadar

kreatinin darah tikus putih jantan yang diinduksi CCL4.

Pemeriksaan Kadar *Blood Urea Nitrogen* (BUN)

Pemeriksaan urea dilakukan dengan menggunakan metode *kinetika enzimatis* dengan cara *fixed time* yang dilakukan dengan dua kali pembacaan absorbansi pada panjang gelombang 340 nm. Metode ini berdasarkan reaksi urea dihidrolisis menjadi ion ammonium dan karbondioksida dengan bantuan enzim urease, ammonium direaksikan dengan α -ketoglutarat dengan adanya NADH membentuk L-Glutamat yang dikatalisis oleh enzim glutamat dehidrogenase (GLDH). Yang diukur adalah penurunan serapan NADH pada panjang gelombang 340 nm. Karena dalam reaksi, NADH akan berubah menjadi NAD. Semakin rendah nilai absorbansi berarti semakin banyak NADH yang digunakan untuk reaksi, berarti kadar urea semakin tinggi.

Nilai absorbansi berbanding terbalik dengan kadar urea.

Urea adalah produk akhir metabolisme protein dan asam amino yang mengandung nitrogen. Salah satu tugas penting ginjal adalah mengeliminasi urea dari tubuh. Pada penurunan fungsi ginjal, kadar nitrogen urea darah (*Blood Urea Nitrogen*) meningkat (Corwin, 2009). *Blood Urea Nitrogen* adalah konsentrasi serum, yang ditentukan dengan kandungan nitrogen, peningkatan konsentrasi BUN ini berbeda-beda, bergantung pada kadar protein dalam makanan (Price dan Wilson, 2006). Untuk mengetahui kadar *Blood Urea Nitrogen* hasil kadar urea berdasarkan pemeriksaan dikalikan faktor konversi 0,467.

Berdasarkan hasil pemeriksaan pada Gambar 2 menunjukkan bahwa rata-rata kadar BUN pada kelompok normal adalah 10,27 mg/dL dan pada kelompok kontrol negatif mengalami kenaikan kadar sebesar 19,30 mg/dL. Sedangkan pada kelompok uji dosis I,II dan III mengalami penurunan kadar BUN kembali dibandingkan kelompok kontrol negatif, yaitu pada dosis I sebesar 15,87 mg/dL (17,77%) pada dosis II sebesar 18,38 mg/dL (4,77%) dan pada dosis III sebesar 18,52 mg/dL (4,04%). Pada kadar rata-rata kelompok dosis uji I masih di atas rata-rata kadar *Blood Urea Nitrogen* kelompok normal, sedangkan rata-rata kadar *Blood Urea Nitrogen* kelompok uji dosis II dan III menunjukkan hasil yang lebih kecil dibandingkan rata-rata kadar *Blood Urea Nitrogen* kelompok normal, tetapi hasil ini

masih berada pada rentang normal kadar *Blood Urea Nitrogen* pada tikus yaitu 10-21 mg/dL (Johnson, 1996).

Berdasarkan hasil uji ANOVA didapat bahwa nilai signifikansi $0,531 > 0,05$ yang artinya H_0 diterima artinya data tidak berbeda secara bermakna. Hal ini mengindikasikan ekstrak daun sirih merah dari ketiga kelompok dosis yang diberikan selama 7 hari tidak memberikan perbedaan yang bermakna terhadap penurunan nilai BUN pada tikus dengan tingkat kepercayaan 95%. Hal ini menunjukkan bahwa dengan pemberian ekstrak daun sirih hijau pada dosis I, II, III tidak memberikan efek penurunan kadar *Blood Urea Nitrogen* jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif.

KESIMPULAN

Kesimpulan dalam penelitian ini bahwa uji neproprotektif dari ekstrak etanol daun sirih hijau yang diinduksi dengan CCL_4 dengan dosis I yaitu sebesar 0,67 mg/dL (16,25%), dosis II sebesar 0,63 mg/dL (21,25%) dan dosis III sebesar 0,62 mg/dL (22,50%) dapat menurunkan kadar kreatinin. Sedangkan untuk parameter *Blood Urea Nitrogen* (BUN) tidak berbeda bermakna jika dibandingkan dengan kontrol negatif yaitu pada dosis I sebesar 15,87 mg/dL (17,77%) pada dosis II sebesar 18,38 mg/dL (4,77%) dan pada dosis III sebesar 18,52 mg/dL (4,04%).

DAFTAR PUSTAKA

Cahyaningsih, R.A. Azizahwati, D. Kusmana. 2011. Efek nefroprotektif

- infus daun sukun (*Artocarpus altilis* (Park)Fsb.) ditinjau dari kadar urea dan kreatinin plasma serta gambaran histologis ginjal pada tikus jantan yang diinduksi karbon tetraklorida. *Majalah Ilmu Farmasi* Vol.8; hal 59-71
- Corwin Elizabeth J. 2009. Handbook of Pathophysiology, 3th Edition. Jakarta: Buku Kedokteran EGC. Hal 725-730
- Fransworth, N.R. 1996. *Biological and phytochemical screening of plant* Journal of Pharmaceutical Science.vol.55:p.245-257
- Hamidi, M.Yulis., Malik, Zulkifli., MachyarMutiara Ryan. 2009. *Gambaran histopatologi kerusakan hati mencit yang diproteksi air rebusan daun sirih (Piper betle L.)*. Pekanbaru.Fakultas Kedokteran Universitas Riau
- Gandasoebrata, R. 1995. Penuntun Labolatorium Klinik. Jakarta: Dian Rakyat. hal:85-86
- Kumalasari, L.O.R. 2006. Pemanfaatan *Obat Tradisional dengan Pertimbangan Manfaat dan Keamanannya*. Majalah Ilmu Kefarmasian. Vol. III, No.1.
- Price SA., L.M. Wilson. 2006 . *Patofisiologi : Konsep klinis proses-proses penyakit* ; alih bahasa, Brahm U.Pendit ...[et. al.] ; editor edisi bahasa Indonesia, Huriawati Hartanto ...[et. al.] – ed.6 – Jakarta : EGC, pp:867-891
- Prodjosudjadi, W. & A. Suhardjono. 2009. End-stage renal disease in Indonesia: Treatment development. *Ethnicity & Disease*,19:33-36.
- Robjohns S. 2009.*Carbon Tetrachloride*. Health Protection Agency