

Gel Kombinasi Ekstrak Daun Sirsak dan Daun Jambu Biji Sebagai Obat Anti Jerawat

Rika Yulianti, Marline Abdassah, Rizky Abdulah, dan Emma Surachman

ABSTRACT: *This study aims to determine the formulation and testing of anti-acne combination gel activity of ethanol extract of leaves of soursop (*Annona muricata L.*) and leaves of guava (*Psidium guajava L.*) in in - vitro and in - vivo. Soursop leaf is traditionally used to treat acne . It is known that asetogenin soursop leaves contains compounds acetogenin, tannins, phytosterols, calcium oxalate, murisin alkaloids, flavonoids and steroid. Research on anti- acne activity of guava leaf extract has been carried out by Qa'dan et al in 2005. Samples were obtained from a combination of extracts of leaves of soursop (*Annona muricata L.*) and leaves of guava (*Psidium guajava L.*) using the method of maceration with 96 % ethanol. The preparation is formulated in the form of a gel and tested the minimum inhibitory concentration and antibacterial activity against *Propionibacterium acne* using Cindala ® gel for comparison. In-vivo studies conducted using rats (*Rattus novergicus*) galus Wistar as test animals by administration of *Propionibacterium acne* bacteria colonies suspense as inducers. The results showed that the combination gel of soursop leaf extract and guava leaf extrac thasanti bacterial activity against *Propionibacterium acne*-with carbomergel formulation usingasa base. In vivotesting results show that the gel-hasanti acne activity and statistically significantly differentto the negative control.*

Keywords : *acne, extract, gel*

ABSTRAK : Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui formulasi dan uji aktivitas anti jerawat kombinasi gel ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata L.*) dan daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) secara in vitro maupun in vivo. Daun sirsak secara tradisional digunakan untuk mengobati jerawat. Diketahui bahwa daun sirsak mengandung senyawa asetogenin, tanin, fitosterol, kalsium oksalat, alkaloid murisin, flavonoida dan steroida. Penelitian mengenai aktivitas anti jerawat ekstrak daun jambu biji telah dilakukan oleh Qa'dan et al pada tahun 2005. Sampel diperoleh dari kombinasi ekstrak daun sirsak (*Annona muricata L.*) dan daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96 %. Sediaan diformulasi dalam bentuk gel dan diuji konsentrasi hambat minimum dan aktivitas antibakteri terhadap *Propionibacterium acne* dengan menggunakan gel Cindala® sebagai pembanding. Studi in vivo dilakukan menggunakan tikus (*Rattus novergicus*) galus Wistar sebagai hewan uji dengan pemberian suspensi koloni *Propionibacterium acne* sebagai penginduksi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa gel kombinasi ekstrak daun sirsak dan ekstrak daun jambu biji memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Propionibacterium acne* dengan formulasi gel menggunakan karbomer sebagai basis. Pengujian secara in vivo menunjukkan hasil bahwa gel tersebut memiliki aktivitas antijerawat dan berbeda secara signifikan secara statistik terhadap kontrol negatif.

Kata kunci : jerawat, ekstrak, gel

Jurusan Teknologi Farmasi dan Kosmetika, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Sumedang, Jawa Barat, Indonesia 45363

Korespondensi:

Rika Yulianti

Email: yulianti_kamil@yahoo.co.id

PENDAHULUAN

Kelainan kulit yang paling umum terjadi di seluruh dunia adalah jerawat (*acne vulgaris*), yang merupakan penyakit inflamasi kronik yang terjadi pada unit pilosebaceus. Penyakit ini terjadi terutama pada usia dewasa muda dan dapat sembuh sendiri. Akne juga merupakan penyakit multifaktorial yang berkembang di dalam folikel sebaceus. Patofisiologi akne terjadi karena adanya 4 faktor yang saling berpengaruh yaitu hiperkeratinisasi folikuler, kolonisasi bakteri *Propionibacterium acnes*, peningkatan produksi sebum, dan inflamasi¹.

Propionibacterium acnes adalah target utama pada pengobatan anti bakteri untuk jerawat. Sebenarnya aksi *Propionibacterium acnes* dalam perkembangan lesi jerawat masih dalam penelaahan. Namun, berdasarkan pada beberapa data, kemungkinan *Propionibacterium acnes* beraksi dengan memproduksi beberapa substansi penyebab inflamasi (seperti lipase, faktor kemotaktik, dll) yang menginduksi perkembangan lesi jerawat².

Tanaman yang terbukti secara ilmiah memiliki aktivitas anti jerawat adalah daun jambu biji (*Psidium guajava L.*). Ekstrak aseton:air (7:3) daun jambu biji memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis*³. Telah dilaporkan bahwa aktivitas anti bakteri ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) dipengaruhi karena keberadaan tanin, triterpenoid, dan glikosida flavonoid pada daunnya^{4,5}. Selain daun jambu biji, salah satu tanaman yang secara tradisional digunakan untuk mengobati jerawat adalah daun sirsak (*Annona muricata L.*).

Analisis kimia dari ekstrak daun sirsak yang telah dilakukan oleh penelitian sebelumnya, menunjukkan hasil bahwa adanya metabolit sekunder antara lain tannin, steroid, kardiak glikosida, dll. Memiliki efek anti bakteri pada beberapa strain bakteri seperti *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus pyrogenes*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella ty-*

phimurium, *Klebsiela pneumonia*, dan *Enterobacter aerogenes*⁶. Pada penelitian sebelumnya yang diujikan terhadap hewan menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata L.*) memiliki aktivitas anti inflamasi⁷.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

a. Bakteri dan Hewan Uji

Bakteri *Propionibacterium acne* yang diperoleh dari Laboratorium Biologi Institut Teknologi Bandung, tikus galur Wistar yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Institut Teknologi Bandung. Jumlah tikus yang digunakan sebanyak 20 ekor.

Kriteria inklusi : tikus dengan berat badan 200-300 gram, jenis kelamin jantan, sehat, mengalami peradangan setelah diinduksi dengan suspensi koloni *Propionibacterium acne*. Kriteria eksklusi : tikus dengan berat badan 200-300 gram, jenis kelamin jantan, sehat, tidak mengalami peradangan setelah diinduksi dengan suspensi koloni *Propionibacterium acne*.

b. Bahan kimia

Etanol 96 % (Bratachem), toluene, aquadest, methanol, ammonia 10 %, kloroform, etil astat, asam formiat, asam asetat, silica gel GF 254, AlCl₃, FeCl₃, pereaksi Dragendorf, petroleum eter, vanillin sulfat, pereaksi Mayer, NaCl 10 %, H₂SO₄ pekat, heksana, HCL, logam Mg, nutrient agar, media Muller-Hinton agar, gel klindamisin, larutan *Mc.Farland*, Carbomer 940, trietanolamin, propilenglikol, sodium benzoate (Bratachem), larutan dapar posfat pH 7.2, DMSO (dimetilsulfoksid).

c. Alat

Peralatan yang digunakan adalah neraca analitik (Shimadzu AU-Y-220), oven (Memmert), vacuum rotary evaporator (Eyela), autoklaf (LD 2X -40S dan All American no 25X), inkubator (Memmert), anaerobic pack, viscometer Rion, dan alat-alat gelas yang biasa digunakan.

Penyiapan sampel

Daun sirsak dan daun jambu biji yang telah dikumpulkan dibersihkan dari pengotor, dicuci di bawah air mengalir sampai bersih, ditiriskan, lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Sampel yang telah kering dihaluskan hingga diperoleh serbuk yang halus dan seragam.

Ekstraksi Sampel

Metode ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96 %. Serbuk simplisia ditimbang sebanyak 500 gram kemudian dimasukkan ke dalam maserator yang bagian dasarnya telah dilapisi kapas, dimasukkan pelarut etanol 96 % hingga simplisia tersebut terendam seluruhnya. Diamkan selama 3 x 24 jam, sambil sesekali dilakukan pengadukan. Setelah 3 hari, maserat dikeluarkan dan ditampung. Lakukan remerasi hingga maserat menjadi jernih. Seluruh hasil penampungan pelarut dicampurkan untuk kemudian dilakukan pemekatan ekstrak dengan menggunakan alat *vacuum rotary evaporator* dilanjutkan dengan *water bath*.

Pemeriksaan Parameter Kualitas Ekstrak

Pemeriksaan parameter ekstrak dilakukan untuk mengetahui kualitas ekstrak dari sifat fisik dan kandungan kimianya. Parameter yang diperiksa meliputi organoleptik, rendemen, kadar air ekstrak dan susut pengeringan.

Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia ekstrak meliputi uji alkaloid (dilakukan dengan metode Mayer, Wagner dan Dragendorff), uji tanin dan polifenol dengan cara 3 mL sampel diekstraksi akuades panas kemudian didinginkan. Setelah itu ditambahkan 5 tetes NaCl 10% dan disaring. Filtrat dibagi 3 bagian A, B, dan C. Filtrat A digunakan sebagai blangko, ke dalam filtrat B ditambahkan 3 tetes pereaksi FeCl_3 , dan ke dalam filtrat C ditambah garam gelatin. Kemudian diamati perubahan yang terjadi. Uji saponin yang dilakukan dengan metode Forth. Uji flavonoid dilakukan dengan metode Bate Smith-Metchalf kemudian diamati perubahan warna

yang terjadi (metode Wilstater).

Pengujian Aktivitas Antibakteri Ekstrak

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sirsak dan daun jambu biji terhadap *Propionibacterium acnes* dilakukan dengan metode difusi menggunakan cakram. Sebanyak 1-2 ose bakteri uji diinokulasikan ke dalam *Nutrien agar*, lalu diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Suspensi bakteri uji disetarakan dengan kekeruhan larutan *Mc Farland* 0,5.

Sebanyak 20 µL suspensi bakteri uji diteteskan pada agar *Mueller-Hinton* yang sudah memadat di dalam cawan petri, lalu diratakan dengan menggunakan spreader. Seluruh cawan didiamkan beberapa saat agar bakteri mencapai fase logaritmiknya. Pada agar diletakkan kertas cakram berdiameter 6 mm. Larutan uji ekstrak etanol daun sirsak dan ekstrak etanol daun jambu biji dengan berbagai konsentrasi; dimetil sulfoxid (DMSO) sebagai kontrol negatif; larutan Clindamycin 1 % sebagai kontrol positif, masing-masing diteteskan pada kertas cakram yang berbeda sebanyak 25 µL. Kemudian cawan petri diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 1x24 jam.

Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Penentuan konsentrasi hambat minimal dilakukan dengan metode cakram. Pada cawan petri ditanam bakteri yang akan diuji yang disesuaikan dengan standar *Mc Farland* 0.5, yaitu sekitar 10^8 kuman per milliliter. Setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 derajat celsius, kemudian dari setiap cawan tadi diamati cawan dengan konsentrasi antimikroba terkecil yang tidak menunjukkan pertumbuhan mikroba. Pada metode ini dapat ditentukan KHM dari suatu antimikroba terhadap uji bakteri.

Optimalisasi Formula

Air suling sebanyak 10 kali berat Carbomer dipanaskan hingga mendidih, kemudian diangkat. Carbomer ditambahkan dengan Trietanamin dikembangkan di dalamnya selama 15 menit.

Setelah mengembang, propilen glikol ditambahkan sedikit demi sedikit sambil digerus sampai homogen, lalu dipindahkan ke dalam beker gelas yang berisi basis, tambahkan ekstrak. Sodium benzoat dilarutkan dalam air suling. Terakhir cukupkan air suling dan diaduk hingga homogen.

Evaluasi Gel

Evaluasi terhadap gel yang diformulasi meliputi evaluasi organoleptis, pH, homogenitas, viskositas dan daya sebar.

Uji Aktivitas Antibakteri Gel Ekstrak Daun Sirsak dan Daun Jambu Biji

Larutan gel disiapkan dengan menggunakan 100 mg gel ke dalam 10 ml dimetil sulfoksid (DMSO). Aktivitas anti bakteri dilakukan dengan metoda cakram. *Propionibacterium acne* diinkubasi dalam media agar selama 48 jam dalam kondisi anaerob dengan kekeruhan 0,5Mc Farland. Lempeng agar dipadatkan disekadengan inokulum di permukaan. Dalam masing-masing kertas cakram, larutan gel dalam DMSO ditempatkan dan pelat dibiarkan pada suhu kamar selama 30 menit untuk memungkinkan pra difusi sebelum inkubasi pada 37°C selama 24 jam dalam kondisi anaerob dalam wadah anaerobik dan disimpan dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37 ± 1°. Aktivitas

anti bakteri diperkirakan dengan mengukur diameter zona hambatan. Semua tes difusi cakram dilakukan sebanyak tiga kali.

Uji *In Vivo* Gel Ekstrak Daun Sirsak dan Daun Jambu Biji

Untuk menginduksi terjadinya inflamasi secara *in vivo* menggunakan koloni *Propionibacterium acne* sebanyak 0,02 ml secara intradermal pada telinga tikus yang telah dibersihkan dan dibiarkan selama 2 x 24 jam hingga terjadi peradangan. Sediaan kombinasi gel ekstrak sirsak dan jambu biji dioleskan 3 kali sehari pagi, siang dan sore pada lokasi peradangan selama 21 hari. Sebagai kontrol negatif digunakan basis gel, dan gel yang mengandung Clindamisin (Cindala®) digunakan sebagai kontrol positif. Kemudian diamati penurunan derajat peradangan masing-masing kelompok perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini telah mendapat persetujuan etik dari Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Padjajaran nomor 193/UN6.C2.1.2/KEPK/PN/2014.

Hasil skrining fitokimia yang dilakukan ter-

Tabel 1. Hasil Pemeriksaan Karakteristik Mutu Ekstrak

Karakteristik Mutu Ekstrak	Hasil		
	Parameter	Ekstrak Daun Sirsak	Ekstrak Daun Jambu Biji
Organoleptik	Bentuk	Kental	Kental
	Warna	Hijau pekat	Hijau kecoklatan
	Bau	Khas sirsak	Khas jambu biji
Kadar Air (%)		4,74	4,74
Susut Pengerinan (%)		7,95	7,92

hadap ekstrak daun sirsak (*Annona muricata L.*) memperlihatkan hasil positif terdeteksinya senyawa golongan alkaloid, flavonoid, kuinon, dan polifenolat. Sedangkan ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava L.*), menunjukkan hasil positif terdeteksinya senyawa golongan alkaloid, flavo-

noid, kuinon, tanin dan polifenolat. Berdasarkan literatur, daun sirsak mengandung senyawa asetogenin, tanin, fitosterol, kalsium oksalat, alkaloid murisin, flavonoida dan steroida sedangkan daun jambu biji mengandung senyawa tanin, asam ur-solat, asam guajaverin, minyak atsiri dan vitamin.

Pengujian Aktivitas Antibakteri Ekstrak

Pengujian dilakukan dengan cara pengenceran ekstrak dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40% dan 50%. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak dengan menggunakan metode difusi cakram menunjukkan bahwa ekstrak daun sirsak (*Annona muricata L.*) dan ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava L.*), memiliki aktivitas antibakteri, dibuktikan dengan adanya kemampuan menghambat pertumbuhan *Propionibacterium acne* pada semua konsentrasi ekstrak

Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Pengujian dilakukan dengan cara pengenceran ekstrak dengan konsentrasi 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8% dan 9%. Hasil pengujian KHM (Konsentrasi Hambat Minimal) yang berarti

konsentrasi terkecil dari ekstrak yang memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan *Propionibacterium acne* adalah pada konsentrasi 1% untuk kedua ekstrak. Hal ini menjadi dasar pada formulasi gel yang akan dibuat. Konsentrasi kombinasi ekstrak merujuk pada perbandingan konsentrasi ekstrak daun sirsak (*Annona muricata L.*) dan ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) adalah sebesar 1:1.

Evaluasi Formula

Formula gel menggunakan karbomer sebagai basis dengan bahan tambahan lain yaitu trietanolamin, propilenglikol dan sodium benzoat sebagai pengawet. Hasil pengamatan selama 28 hari menunjukkan sediaan yang cukup stabil berdasarkan parameter organoleptis, pH, homogenitas, viskositas dan daya sebar gel yang baik.

Tabel 2. Formula Gel Kombinasi Ekstrak Daun Sirsak dan Ekstrak Daun Jambu Biji

Nama zat	Konsentrasi (gram)					
	F0	F1	F2	F3	F4	F5
Ekstrak daun sirsak	0	5	7,5	10	12,5	15
Ekstrak daun jambu biji	0	5	7,5	10	12,5	15
Karbomer	2	2	2	2	2	2
Trietanolamin	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Propilenglikol	15	15	15	15	15	15
Sodium benzoat	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Aquades	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100

Uji Aktivitas Antibakteri Gel Kombinasi Ekstrak Daun Sirsak dan Daun Jambu Biji

Gel kombinasi ekstrak daun sirsak dan ekstrak daun jambu biji dapat menghambat pertumbuhan bakteri, terlihat dari terbentuknya zona bening di sekitar kertas cakram, zona bening tersebut menunjukkan zona hambat pertumbuhan bakteri.

Formula gel yang digunakan pada uji in vivo dipilih 3 formula dengan daya hambat terhadap pertumbuhan *Propionibacterium acne* yang terbesar, yaitu F3, F4 dan F5.

Uji In Vivo Gel Ekstrak Daun Sirsak dan Daun Jambu Biji

Setelah masa inkubasi, pada telinga hewan uji muncul lesi jerawat. Pengamatan dilakukan pada hari ke-7, 14, dan 21 dengan penilaian berdasarkan derajat keparahan lesi, yaitu nilai 0 untuk kondisi kulit yang tidak terdapat lesi, nilai 1 untuk komedo (sumbatan pori tanpa adanya inflamasi), nilai 2 untuk papula (massa padat yang menonjol diatas kulit berukuran sampai 0,5mm dan berwarna merah dan tidak berisi), nilai 3 untuk pustula (lesi yang mengalami peradangan dan berisi nanah/pus).

Tabel 3. Hasil Pengamatan Lesi Jerawat

Klp	No Smpl	Setelah induksi	Nilai	Setelah perlakuan					
				Hari ke-7	Nilai	Hari ke-14	Nilai	Hari ke-21	Nilai
K (+)	1	1 papula	2	1 papula	2	sembuh	0	sembuh	0
	2	1 pustula	3	1 papula	2	sembuh	0	sembuh	0
	3	1 papula	2	1 papula	2	sembuh	0	sembuh	0
	4	1 pustula	3	1 pustula	3	1 pustula	3	sembuh	0
K (-)	5	1 pustula	3	1 pustula	3	2 papula	4	2 papula	4
	6	3 papula	6	6 papula	12	6 papula	12	6 papula	12
	7	1 papula	2	3 papula	6	3 papula	6	6 papula	12
	8	1 pustula	3	1 pustula	3	1 pustula	3	1 pustula	3
F 3	9	1 papula	2	5 papula	10	2 papula	4	1 papula	2
	10	2 papula	4	1 papula	2	5 papula	10	4 papula	8
	11	2 pustula	6	1 pustula	3	5 papula	10	4 papula	8
	12	1 pustula	3	1 pustula	3	1 pustula	3	sembuh	0
F 4	13	3 papula	6	2 papula	4	2 papula	4	sembuh	0
	14	1 papula	2	1 papula	2	1 pustula	3	sembuh	0
	15	1 papula	2	2 papula	4	2 papula	4	sembuh	0
	16	1 pustula	3	1 pustula	3	1 pustula	3	sembuh	0
F 5	17	1 papula	2	3 papula	6	sembuh	0	sembuh	0
	18	1 pustula	3	1 pustula	3	sembuh	0	sembuh	0
	19	1 papula	2	2 papula	4	sembuh	0	sembuh	0
	20	2 pustula	6	2 pustula	6	2 papula	4	2 papula	4

Keterangan:

(+) : Kontrol positif Cindala gel®

K (-) : Kontrol negatif Formula gel tanpa ekstrak

F3 : Formula gel dengan ekstrak 20%

KF4 : Formula gel dengan ekstrak 25%

F5 : Formula gel dengan ekstrak 30%

Analisis uji in vivo dilakukan menggunakan metode *Repeated ANOVA* dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Bonferroni*. menunjukkan hasil nilai $p < 0.05$ untuk semua kelompok uji, yang artinya terdapat perbedaan signifikan pada kelompok-kelompok tersebut terhadap kontrol negatif.

KESIMPULAN

Gel kombinasi ekstrak daun sirsak (*Annona muricata L.*) dan daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) *Propionibacterium acnes* memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Propionibacterium acnes*. Gel dengan basis Karbomer merupakan bentuk sediaan yang baik untuk formulasi kom-

binasi ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata L.*) dan daun jambu biji (*Psidium guajava L.*). Gel kombinasi ekstrak daun sirsak (*Annona muricata L.*) dan daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) memiliki aktivitas anti jerawat pada tikus galur Wistar yang diperlihatkan pada hasil analisis statistik dengan metoda *repeated Anova* bahwa terdapat perbedaan signifikan semua formula terhadap kontrol negatif.

SARAN

Perlu dilakukan uji pelepasan zat aktif dari sediaan gel. Perlu dilakukan uji klinik terhadap formula gel yang terpilih berdasarkan uji in vivo.

DAFTAR PUSTAKA

1. Takanori Igarashi, Ko Nishino, and Shree K. Nayar. *The Appearance of Human Skin*. Department of Computer Science Columbia University New York, NY 10027, USA. 2005.
2. Gollnick H, Cunliffe W, Berson D, et al. *Management of acne : a report from a global alliance to improve outcomes in acne*. J Am Acad Dermatol, 49 (1 Suppl.): SI-S37. 2003
3. Qa'dan F, Thewani A.J., Ali D.A., Afifi R., Elkhawad A., Matalka K.Z. *The antimicrobial activities of Psidium guajava and Juglans regia leaf extracts to acne-developing organism*, Am J chin Med, 33 (2): 197-205. 2005.
4. Arima H and G. Danno. *Isolation of antimicrobial compounds from guava (Psidium guajava L) and their structural elucidation*. Biosci. Biohectnol. Biochem, 66 (8); 1727-1730. 2002.
5. Begum S.S.I Hassan and B.S.Siddiqui. *Two new triterpenoids from the fresh leaves of Psidium guajava*. *Planta med*, 68; 1149-1152. 2002.
6. Rajeswari Devi, Vijayalakshmi S and Gajalakshmi S. *Phytochemical and Pharmacological Properties of Annona Muricata : A review*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science. Vol 4, Issue 2, 3-6. 2011.
7. O.V. Sousa, G.D. Viera, R.G. Jesus, J. Pinho, C.H. Yamamoto, M.S. Alves, 2010, *Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of the Ethanol Extract of Annona muricata L. Leaves in Animal Models*. Int J Mol Sci, Vol. 11. No. 5. p.2067-2078. 2010.