

UJI TOKSISITAS SUB AKUT INFUSA DAUN AFRIKA (*Vernonia amygdalina* Del.) TERHADAP HISTOPATOLOGI GINJAL MENCIT GALUR BALB/C

Nida Faradisa¹, Nurul Marfu'ah², Surya Amal³

¹ Mahasiswa Program Studi Farmasi UNIDA GONTOR

^{2,3} Staf Pengajar Program Studi Farmasi UNIDA GONTOR
Pondok Modern Gontor Putri 1, Mantingan, Ngawi 63257 INDONESIA
faradisanida@gmail.com

ABSTRAK

Allah menciptakan segala sesuatu di alam semesta ini untuk diambil manfaatnya, salah satunya adalah tanaman Daun Afrika. Salah satu manfaat daun ini adalah untuk mengobati diabetes mellitus, malaria dan disentri. Daun Afrika mengandung senyawa golongan saponin, flavonoid dan glikosida steroid. Obat yang masuk ke dalam tubuh akan melalui fase metabolisme di hati dan ekskresi di ginjal. Ginjal berfungsi untuk membuang sampah metabolisme dan racun tubuh dalam bentuk urin. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh infusa Daun Afrika terhadap histopatologi ginjal mencit galur BALB/c. Sampel berupa mencit jantan galur BALB/c sebanyak 12 ekor dibagi dalam 4 kelompok perlakuan yaitu kontrol (aquades), infusa Daun Afrika 10% b/v, 20% b/v dan 30% b/v yang diberikan secara peroral selama 28 hari. Data dianalisa dengan uji Kruskal Wallis dan menunjukkan nilai kongesti $0,241 > p 0,05$ dan nilai hemorragi $0,070 > p 0,05$ yang berarti tidak terdapat perbedaan yang nyata antar kelompok perlakuan. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa pemberian infusa Daun Afrika tidak berpengaruh terhadap histopatologi ginjal mencit galur BALB/c. Meskipun demikian, kecenderungan hasil dalam penelitian ini menunjukkan bahwa peningkatan dosis yang diberikan kepada mencit dapat mengurangi kongesti dan hemorragi pada ginjal.

Kata kunci: Uji Toksisitas, Infusa, Daun Afrika, Histopatologi Ginjal

ABSTRACT

Allah created everything in this universe to take benefit from it, including African Leaf plant. One of the benefits of this leaf is to treat diabetes mellitus, malaria and dysentery. African leaf contains saponin type compounds, flavonoids and steroid glycosides. Drugs that enter the body will go through the phase of metabolism in the liver and excretion in the kidneys. Kidney that serves to dispose of metabolic waste and body toxins in the form of urine. The purpose of this research is to know the effect of African Leaf infusion on histopathology of mice kidney BALB/c. Samples in the form of BALB/c male strain of mice were 12 samples were divided into 4 treatment types with 3 replications. Treatment of control (aquades), African leaf infusion 10% b/v, 20% b/v and 30% b/v infused orally for 28 days. The data obtained were analyzed by Kruskal Wallis test and the data shows congestion value $0.241 > p 0.05$ and hemorrhagic value $0.070 > p 0.05$ which means there is no significant difference between treatment types. Therefore, it can be concluded that African leaf infusion has no effect on histopathology of renal mice BALB/c. However, the trend of results in this study indicates that the increased dose given to mice can reduce congestion and hemorrhage in the kidneys.

Keywords: Toxicity Test, Infuse, African Leaves, Kidney Histopathology

1. Pendahuluan

Allah SWT berfirman dalam Surat 'Abasa ayat 27-32 yang berbunyi:

فَأَنْبَتْنَا فِيهَا حَبًّا ﴿٢٧﴾ وَعِنَبًا وَقَضْبًا ﴿٢٨﴾ وَزَيْتُونًا
وَنَخْلًا ﴿٢٩﴾ وَخَدَائِقَ غُلْبًا ﴿٣٠﴾ وَفَاكِهَةً وَأَبًّا ﴿٣١﴾
مَتَاعًا لَّكُمْ وَلِأَنْعَامِكُمْ ﴿٣٢﴾

Artinya: Kemudian Kami tumbuhkan biji-bijian di bumi itu (27) Anggur dan sayur-sayuran (28) Zaitun dan kurma (29) Kebun-kebun (yang) lebat (30) Dan buah-buahan serta rumput-rumputan (31) Untuk kesenanganmu dan untuk binatang-binatang ternakmu (32).

Ayat di atas menjelaskan tentang kekuasaan dan kebesaran Allah menciptakan biji-bijian, sayur-sayuran, buah-buahan serta rumput yang menjadi bahan makanan bagi manusia dan ternak. Setiap unsur makanan ini memiliki manfaat bagi tubuh manusia yang dapat diteliti dalam kehidupan kita. Salah satu tumbuhan yang bermanfaat bagi tubuh manusia adalah Daun Afrika (*Vernonia amygdalina* Del.).

Menurut Ijeh dan Chukwunonso (2010), Daun Afrika mengandung senyawa golongan saponin, flavonoid, sesquiterpen lakton dan glikosida steroid. Menurut penelitian Akah, dkk. (2007) tentang manfaat tanaman ini dapat digunakan untuk pengobatan diabetes mellitus. Hal ini disebabkan karena adanya kandungan senyawa flavonoid yang dapat merangsang sekresi insulin. Secara tradisional, tanaman ini juga dapat digunakan sebagai anti rematik, anti malaria, anti diare, anti hipertensi dan untuk mengobati asam urat. Daun tanaman ini juga banyak dimanfaatkan sebagai sayuran (Akah, dkk., 2009).

Masyarakat pada umumnya mengkonsumsi Daun Afrika dengan cara merebus beberapa lembar daun yang masih segar. Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) juga merekomendasikan dan menyarankan penggunaan obat-obatan tradisional untuk mengobati berbagai penyakit, akan tetapi aspek keamanan penggunaan obat tradisional haruslah diutamakan dalam pemilihan obat-obatan tradisional. Pengembangan suatu bahan menjadi suatu produk tentunya memerlukan evaluasi keamanan untuk menentukan batas perlakuan yang aman. Pengujian toksisitas suatu bahan dapat dilakukan secara akut (dosis tunggal) maupun kronis (dosis berulang dalam jangka

waktu tertentu). Toksisitas suatu zat adalah kemampuan zat tersebut untuk menimbulkan kerusakan pada organisme hidup. Uji toksisitas sub akut adalah uji yang digunakan untuk mengetahui toksisitas suatu senyawa yang dilakukan pada hewan uji dengan sedikitnya tiga tingkat dosis. Umumnya dalam jangka waktu 28 hari dan dilakukan untuk mengetahui lebih jauh karakteristik pengaruh toksik spesifik dari senyawa kimia pada organ atau jaringan seperti hati dan ginjal (BPOM, 2010). Hasil penelitian Sekar, dkk. (2016) menggunakan ekstrak etanol 70% Daun Afrika, diperoleh nilai LD₅₀>16 g/kg BB pada pengujian toksisitas akut dan pada uji sub kronis tidak terjadi kematian pada kelompok dosis 1000 mg/kg BB.

Ginjal adalah organ yang mempunyai peranan penting dalam tubuh yang berfungsi untuk membuang sampah metabolisme dan racun tubuh dalam bentuk urin atau air seni. Ginjal merupakan organ tubuh yang rentan terhadap pengaruh zat-zat kimia, karena organ ini menerima 25-30% sirkulasi darah untuk dibersihkan sehingga sebagai organ filtrasi kemungkinan terjadinya perubahan patologik sangat tinggi (Corwin, 2001). Penggunaan obat tradisional khususnya Daun Afrika dengan konsentrasi tertentu diduga akan memberikan efek atau indikasi yang berbeda pada organ-organ tubuh termasuk ginjal. Oleh karena itu penelitian ini dirancang untuk mengetahui efek dari pemberian infusa Daun Afrika terhadap gambaran histopatologi ginjal mencit galur BALB/c.

2. Tinjauan Teoritis

2.1 Tanaman Daun Afrika

Hasil penelitian Ejoh, dkk. (2007) dan Ijeh (2010) menunjukkan bahwa tanaman Daun Afrika banyak mengandung nutrisi dan senyawa kimia, antara lain protein 19,2%, serat 19,2%, karbohidrat 68,4% dan lemak 4,7%. Kandungan lainnya seperti asam askorbat 166,5 mg/100 g, karotenoid 30 mg/100 g, kalsium 0,97 g/100 g dan besi 7,5 mg/100 g. Senyawa kimia yang terkandung dalam Daun Afrika antara lain saponin (vernoniosida dan steroid saponin), sesquiterpen lakton (vernolida, vernoladol, vernolepin, vernodalin dan vernomygdin), flavonoid, kumarin, asam fenolat, lignan, xanton, terpen, peptida, luteolin, fosfor, kalium,

sulfur, natrium, mangan, tembaga, zink, magnesium dan selenium.

2.2 Infusa

Infusa adalah sediaan cair yang dibuat dengan cara mengekstraksi simplisia nabati dengan air pada suhu 90°C selama 15 menit. Cara pembuatan sediaan infusa adalah mencampurkan simplisia halus dalam panci dengan air secukupnya, kemudian dipanaskan di atas tangas air selama 15 menit dihitung mulai suhu mencapai 90°C sambil sekali-sekali diaduk. Penyaringan dilakukan selagi panas dengan kain flanel, kemudian ditambahkan air panas secukupnya melalui ampas hingga diperoleh volume infusa yang dikehendaki (BPOM, 2010).

2.3 Uji Toksisitas Sub Akut

Uji toksisitas ini dilakukan untuk mendeteksi efek toksik yang muncul setelah pemberian sediaan uji dengan dosis berulang yang diberikan secara oral pada hewan uji selama sebagian umur hewan, biasanya tidak lebih dari 10% seluruh umur hewan uji. Prinsip dari uji toksisitas ini adalah sediaan uji dalam beberapa tingkat dosis diberikan setiap hari pada beberapa kelompok hewan uji dengan satu dosis per kelompok selama 28 atau 90 hari (BPOM, 2014).

2.4 Histopatologi Ginjal

Terdapat dua perubahan morfologi yang sering terjadi pada ginjal adalah perubahan morfologi yang reversibel dan irreversibel. Perubahan reversibel antara lain adalah degenerasi sel tubulus, inflamasi sel tubulus dan terbentuknya cast, sedangkan perubahan irreversibel dari sel tubulus antara lain adalah atrofi atau dilatasi lumen, fibrosis sel tubulus dan yang paling berat adalah nekrosis sel tubulus. Perubahan irreversibel biasanya ditandai dengan hilangnya *brush border* dan inti sel memipih (Anonim, 2008).

Kongesti adalah keadaan dimana terdapat darah secara berlebihan (peningkatan jumlah darah) di dalam jaringan (Priyatna dkk, 2011). Kongesti terjadi karena proses yang disebabkan kegagalan aliran cairan keluar dari jaringan misalnya kerusakan vena. Jika dilihat secara visual, maka daerah jaringan yang mengalami

kongesti akan berwarna lebih merah atau ungu. Terdapat dua mekanisme terjadinya kongesti yaitu kenaikan jumlah darah yang mengalir ke daerah tersebut dan penurunan jumlah darah yang mengalami peradangan (Najiha, 2016).

Hemorragi adalah keluarnya darah dari jaringan kardiovaskuler (Lubis dkk, 2014). Hemorragi dapat terjadi akibat adanya zat toksik yang menyebabkan rusaknya kapiler darah sehingga darah keluar dari pembuluh darah dan menyebabkan hemorragi (Adleend, 2015). Hemorragi terjadi akibat masuknya zat-zat toksik dan sisa-sisa metabolisme dalam jumlah besar ke dalam jaringan ginjal, sehingga terjadi dilatasi arteriol lokal untuk vasokonstriksi singkat. Katup prakapiler membuka, mengakibatkan aliran darah dalam kapiler meningkat, juga dibukanya anyaman kapiler, akibat anyaman venular pasca kapiler melebar dan diisi darah yang mengalir deras. Dengan demikian vaskulator pada lokasi luka melebar, berisi darah dan akhirnya pembuluh darah pecah (Robbins dan Kumar, 1995).

3. Metodologi

3.1 Persiapan dan Perlakuan

Penelitian ini menggunakan 4 kelompok perlakuan dan 3 kali ulangan dengan sampel mencit jantan galur BALB/c sebanyak 12 ekor. Perlakuan yang diberikan adalah kelompok kontrol diberikan aquades, kelompok P1 diberikan infusa Daun Afrika dosis 10% b/v, kelompok P2 dosis 20% b/v dan kelompok P3 dosis 30% b/v.

Simplisia Daun Afrika yang telah dideterminasi dihaluskan dan dipanaskan dengan 100 ml aquades pada suhu 90°C selama 15 menit sesuai dengan dosis yang dibutuhkan pada setiap konsentrasi yang diuji. Kemudian sampel disaring menggunakan kain flanel sampai volume 100 ml aquades. Berat badan mencit ditimbang setiap hari untuk mengetahui perbedaan perilaku mencit secara signifikan. Perlakuan dilakukan secara oral menggunakan spuit yang ujungnya diberi kanul dengan volume 0,25 ml selama 28 hari.

3.2 Pembuatan Preparat

Hari ke-29, mencit dikorbankan yakni dengan cara memasukkan mencit ke dalam

wadah tertutup berisi eter. Mencit yang telah dibedah kemudian diambil organ ginjal dengan menggunakan pinset dan gunting bedah. Hewan uji yang telah dibedah, dimasukkan ke dalam kantong plastik hitam dan dikubur. Kemudian ginjal dicuci dengan NaCl 0,9% dan dimasukkan ke dalam pot formalin 10% untuk diawetkan. Selanjutnya pembuatan preparat ginjal dan pewarnaan dengan hematoksin eosin.

3.3 Pemeriksaan Preparat Histopatologi

Pengamatan dilakukan pada 4 lapang pandang (LP) dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 200 kali di bagian korteks ginjal. Sasaran pembacaan preparat adalah sel ginjal yang mengalami perubahan histopatologi berupa kongesti dan hemorragi. Kemudian hasil pengamatan akan dimasukkan dalam tabel skoring menurut Banff, 1997. Skoring untuk kongesti adalah:

- 0 = bila dalam satu LP tidak ditemukan pembuluh darah yang dilatasi dan berisi eritrosit;
- 1 = bila dalam satu LP ditemukan satu pembuluh darah yang dilatasi dan berisi eritrosit;
- 2 = bila dalam satu LP ditemukan dua pembuluh darah yang dilatasi dan berisi eritrosit;
- 3 = bila dalam satu LP ditemukan tiga pembuluh darah yang dilatasi dan berisi eritrosit.

Skoring untuk hemorragi adalah:

- 0 = bila dalam satu LP tidak ditemukan eritrosit pada jaringan interstitial;
- 1 = bila dalam satu LP ditemukan sedikit eritrosit dalam jaringan interstitial ($\sim 25\%$ LP);
- 2 = bila dalam satu LP ditemukan eritrosit sedang dalam jaringan interstitial ($< 50\%$ LP);
- 3 = bila dalam satu LP ditemukan banyak eritrosit menyebar pada interstitial ($> 50\%$).

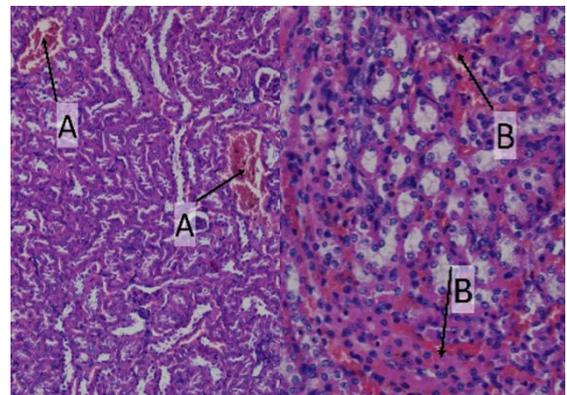
3.4 Analisis Data

Data dianalisis menggunakan uji Kruskal Wallis dengan taraf kepercayaan 95%. Program statistik yang digunakan untuk analisis adalah SPSS 16.

4. Hasil dan Pembahasan

4.1 Hasil

Pemberian infusa Daun Afrika terhadap mencit galur BALB/c dengan perlakuan kontrol, P1 (10% b/v), P2 (20% b/v) dan P3 (30% b/v) menunjukkan adanya perubahan gambaran histopatologi ginjal berupa kongesti dan hemorragi (gambar 1) dari pemeriksaan mikroskopis 200 X.



Gambar 1. (A) Kongesti (B) Hemorragi pada ginjal

Data skoring kongesti dan hemorragi diolah menggunakan uji Kruskal Wallis dan didapatkan nilai kongesti $0,241 > p 0,05$ yang berarti tidak terdapat perbedaan yang nyata. Adapun nilai hemorragi $0,070 > p 0,05$ yang berarti tidak terdapat perbedaan yang nyata. Data tersebut menunjukkan bahwa pemberian infusa Daun Afrika tidak berpengaruh terhadap histopatologi ginjal mencit galur BALB/c.

Tabel 1. Nilai rata-rata tingkat kerusakan pada ginjal

Perlakuan	Tingkat Kerusakan	
	Kongesti	Hemorragi
Kontrol	9.5	9.5
P1	6.5	8.83
P2	6.17	4.5
P3	3.83	3.17

Tabel 1 di atas menerangkan nilai rata-rata kerusakan yang terjadi pada ginjal. Nilai kongesti dan hemorragi tertinggi terjadi pada kelompok kontrol, sedangkan nilai kongesti dan hemorragi terendah terjadi pada kelompok P3.

4.2 Pembahasan

Ginjal adalah organ yang mempunyai peranan penting dalam tubuh yang berfungsi untuk membuang sampah metabolisme dan racun tubuh dalam bentuk urin atau air seni. Ginjal merupakan organ tubuh yang rentan terhadap pengaruh zat-zat kimia, karena organ ini menerima 25-30% sirkulasi darah untuk dibersihkan sehingga sebagai organ filtrasi kemungkinan terjadinya perubahan patologik sangat tinggi (Corwin, 2001).

Kongesti adalah keadaan dimana terdapat darah secara berlebihan (peningkatan jumlah darah) di dalam jaringan (Priyatna dkk, 2011). Adapun hemorragi adalah keluarnya darah dari jaringan kardiovaskuler (Lubis dkk, 2014). Dalam buku yang ditulis oleh Robbins dkk. (2007), kerusakan pada ginjal akan menyebabkan gangguan laju filtrasi ginjal, sehingga dapat menyebabkan kongesti ginjal. Secara patologi anatomi, kongesti ginjal dapat dilihat dari warna korteks dan medulla yang serupa dan bidang sayatan basah yang diikuti dengan adanya darah. Kongesti dapat disebabkan karena tekanan pembuluh darah yang sangat tinggi, sehingga menyebabkan gangguan sirkulasi vena dan arteri, hal tersebut mengakibatkan tertahannya darah di dalam ginjal.

Hemorragi pada umumnya menunjukkan rembesan darah akibat robeknya pembuluh darah. Hemorragi kapiler dapat terjadi pada keadaan kongesti kronis. Peningkatan kecenderungan terjadinya hemorragi akibat suatu luka yang biasanya tidak bermakna, terjadi pada berbagai macam gangguan klinis yang disebut sebagai diatesis hemoragis. Namun, robeknya suatu arteri atau vena besar hampir selalu disebabkan oleh cedera vaskular yaitu trauma, aterosklerosis karena radang atau neoplasia pada dinding pembuluh darah (Robbins dkk, 2007).

Senyawa yang terdapat di dalam Daun Afrika diantaranya adalah senyawa golongan saponin dan tannin. Penelitian yang dilakukan oleh Elfadil, dkk. (2013) melaporkan bahwa pemberian tannin 5% menyebabkan tubulus ginjal melebar, lapisan epitel pipih, luas area nekrosis lokal ditunjukkan oleh endapan inti sel dan inti sel piknotik. Dalam penelitian Akipenlu, dkk. (2012) bahwa efek toksik

gabungan fraksi saponin (90:10+80:20+70:30) menyebabkan kerusakan hati, gangguan ginjal dan metabolisme pada tikus yang diobati diikuti dengan peningkatan plasma yang signifikan dan aspartat hati dan alanin aminotransferase, total bilirubin, total protein, kreatinin plasma, urea, gula total dan penurunan yang signifikan dalam plasma dan alkaline fosfatase hati, gamma glutamil transferase, kreatinin otot dan glikogen hati. Selain itu, campuran saponin menyebabkan degenerasi progresif dari hati, usus dan ginjal hewan yang diobati seperti yang diungkapkan oleh pemeriksaan histopatologi dari organ-organ. Oleh karena itu, senyawa tersebut memungkinkan memiliki efek toksik terhadap organ ginjal.

Ojiako dan Nwanjo (2006) melaporkan bahwa *Vernonia amygdalina* mungkin beracun (sama seperti beberapa sayuran lainnya) jika dikonsumsi dalam jumlah yang sangat besar, tetapi potensi bahaya tidak lebih tinggi dari yang telah diamati sebagai sayuran yang secara rutin dikonsumsi di Afrika bahkan dalam jumlah yang lebih besar.

Menurut penelitian Aufia (2018), infusa Daun Afrika berpengaruh terhadap histopatologi hati mencit galur BALB/c. Kerusakan histologi hati meliputi sel mengalami degenerasi pada dosis 10% b/v, 20% b/v dan 30% b/v, sedangkan sel mengalami nekrosis pada dosis 20% b/v dan 30% b/v. Dalam buku yang ditulis Mutschler (1991), metabolisme obat terjadi terutama di hati dan hanya dalam jumlah yang sangat rendah terjadi dalam organ lain seperti dalam usus, ginjal, paru-paru, limpa, otot, kulit atau dalam darah. Seperti halnya metabolisme, ekskresi suatu obat dan metabolitnya menyebabkan penurunan konsentrasi bahan berkhasiat dalam tubuh. Menurut Neal (2006), ekskresi ginjal memegang tanggung jawab utama untuk eliminasi sebagian besar obat. Senyawa toksik pada infusa Daun Afrika melewati fase metabolisme di hati, dimana terjadi kerusakan berupa degenerasi dan nekrosis. Sehingga ketika melakukan ekskresi di ginjal, senyawa toksik lebih sedikit dibandingkan di hati. Oleh karena itu, kerusakan yang terjadi hanyalah kongesti dan hemorragi.

Hasil penelitian ini memiliki kecenderungan bahwa pemberian infusa Daun Afrika dosis 10% b/v, 20% b/v dan 30% b/v dapat mengurangi

kerusakan kongesti dan hemorragi yang terjadi pada ginjal. Dengan kata lain, infusa Daun Afrika memiliki kemungkinan dapat memberikan pengaruh yang positif terhadap ginjal. Beberapa studi tentang *Vernonia amygdalina* melaporkan bahwa tanaman ini kaya flavonoid, tanin dan saponin yang mungkin memainkan beberapa peran dalam efek anti-oksidatif (Lolodi dkk, 2013). Dalam jurnal Ikeh dkk (2014) menjelaskan bahwa banyak penelitian telah menunjukkan bahwa *Vernonia amygdalina* mampu mendetoksifikasi tubuh karena memiliki sifat antioksidan sehingga melindungi organ-organ penting seperti hati, ginjal dan jantung. Menurut Halliwell (1994), flavonoid merupakan antioksidan kuat dan bertindak sebagai penangkap radikal-radikal bebas sehingga tidak toksisitas terhadap organ ginjal.

5. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan dapat disimpulkan bahwa infusa Daun Afrika tidak berpengaruh terhadap perubahan histopatologi ginjal mencit galur BALB/c. Meskipun demikian, kecenderungan hasil dalam penelitian ini menunjukkan bahwa peningkatan dosis yang diberikan kepada mencit dapat mengurangi kongesti dan hemorragi pada ginjal.

Daftar Pustaka

1. Adleend. 2015. Gambaran Histopatologi Ginjal Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Setelah Pemberian Meloxicam Dosis Toksik. (*Skripsi*). Makassar: Universitas Hassanudin.
2. Akah, P.; Jelemi, O.A.; Salawu, T.C. and Offiah, N.V. 2009. Effects of *Vernonia amygdalina* on Biochemical and Hematological Parameters in Diabetic Rats. *Asian Journal of Medical Sciences*, 1 (3) : 108-113.
3. Akah, P.A; Alemji, J.A; Salawu, O.A; Okoye, T.C and Offiah, N.V. 2007. Effect of *Vernonia amygdalina* Del. Leaves on Kidney Function Diabetic rats. *International Journal of Pharmacology*, 3 : 143-148.
4. Akinpelu; Ayinke, Bolajoko; Oyedapo; Oluboade, Oluookun; Iwalewa; Olugbenga, Ezekiel; Shode and Francis. 2012. Biochemical and histopathological profile of toxicity induced by saponin fraction of *Erythrophleum suaveolens* (Guill. & Perri.) bark extract. Nigeria : *Phytopharmacology*, 3(1) 38-53.
5. Al Qur'an. 2015. Departemen Agama Republik Indonesia. Shafa Media.
6. Anonim, 2014. *Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat Dan Makanan Republik Indonesia Nomor 7 Tahun 2014 Tentang Pedoman Uji Toksisitas Nonklinik Secara In Vivo, Edisi 7*. Jakarta : BPOM.
7. Anonim. 2000. *General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine*. Geneva : World Health Organization.
8. Anonim. 2008. *Patologi Ginjal dan Saluran Kemih*. Semarang: Badan Penerbit Universitas Diponegoro.
9. Anonim. 2010. *Acuan Sediaan Herbal*. Jakarta : BPOM.
10. Aufia, Wafa. 2018. Uji Toksisitas Sub Akut Infusa Daun Afrika (*Vernonia amygdalina* Del.) Terhadap Histopatologi Hati Mencit (*Mus musculus*) Galur BALB/c. (*Skripsi*). Ponorogo: Universitas Darussalam Gontor.
11. Corwin, E. J. 2001. *Buku Saku Patofisiologi*. Jakarta : EGC.
12. Ejoh, R.A.; Nkonga, D.V.; Inocent, G.; and Moses, M.C. 2007. Nutritional Components of Some Non-Conventional Leafy Vegetables Consumed in Cameroon. *Pak. J. Nutr.* 6 (1) : 712-717.
13. Elfadil A. G.; Sabahelkier, Murwan Khalid; Rayan M Y., Daa M O.; Nagla A. H. and Israa S. B. 2013. Effect Tannin and Plan Tannins on some Organs and Physic Chemical Character of Diabetic Wistar. Sudan : *International Journal of Advanced Research. Volume 1, Issue 10, 165-170*.
14. Halliwell, B. (1994). Free Radicals, Antioxidants and Human Disease: Curiosity, Cause or Consequence? *Lancet*. 344, 721-724.
15. Ijeh, Ifeoma I. and. Ejike, Chukwunonso E. C. C. 2010. Current Perspectives on the Medical Potentials of *Vernonia amygdalina* Del. *Journal of Medical Plants Research*. 57 : 1051-1061.
16. Ikeh, Chibueze Kennedy; Ikeh, Patricia Erebi; Ezike and Chioma Adaobi. 2014. Protective Potential of Aqueous Leaf extract

- of *Vernonia amygdalina* in Cyclophosphamide-Induced Myelotoxicity. *Journal of Pharmacy*. Vol.4 PP ; 6-14.
17. Lolodi O. 2013. Eriyamremu GE. Effect of methanolic extract of *Vernonia amygdalina* (common bitter leaf) on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rats exposed to cycasin. *Pak J Biol Sci*.16 (13) : 642-6.
 18. Lubis, Fauzi Ahmad; Riauwaty, Morina dan Syawwal, Henni. 2014. Histology of Liver and Kidney of *Mystus nemurus* That Immersed with *Curcuma xanthorrhiza*, ROXB extract. *Jurnal Online Mahasiswa Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan*. Pekanbaru : Universitas Riau.
 19. Mutschler, E. 1991. *Dinamika Obat, Edisi V*. ITB : Bandung.
 20. Najiha. Alfin Laila. 2016. Toksisitas Akut Tablet Fraksi Etil Asetat-96 Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) Pada Hati Dan Ginjal Tikus Wistar. (*Skripsi*). Surabaya : Universitas Airlangga.
 21. Neal, M.J. 2006. *At a Glance Farmakologi Medis Edisi Kelima*. Erlangga : Jakarta pp. 85.
 22. Ojiako, O.A. and Nwanjo. 2006. Is *Vernonia Amygdalina* Hepatotoxic or Hepatoprotective? Response From Biochemical and Toxicity Studies in Rats. *African Journal of Biotechnology*, Nigeria. Vol. 5 (18), pp. 1648-1651.
 23. Priyatna, R.; S. Indarjulianto dan Kurniasih. 2011. Infeksi *Aeromonas salmonicida* dari Berbagai Wilayah di Indonesia pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). *Jurnal Biota*. Vol. 16 (2) 287-297.
 24. Racusen; Lorraine C.; Solez, Kim; Colvin, Robert B.; Bonsib, Stephen M.; Castro, Maria C.; Cavallo, Tito; Croker, Byron P.; Demetris, A. Jake; Drachenberg, Cynthia B.; Fogo, Agnes B.; Furness, Peter; Gaber, Lilian W.; Gibson, Ian W.; Glotz, Dennis; Goldberg, Julio C.; Grande, Joseph; Halloran, Philip F.; Hansen, H.E.; Hartley, Barry; Hayry, Pekka J.; Hill, Claire M.; Hoffman, Ernesto O.; Hunsicker, Lawrence G.; Lindblad, Anne S.; Marcussen, Niels; Mihatsch, Michael J.; Nadasdy, Tibor; Nickerson, Peter; Olsen, T. Steen; Papadimitriou, John C.; Randhawa, Parmjeet S.; Rayner, David C.; Roberts, Lan; Rose, Stephen; Rush, David; Madrigal, Luis Salinas; Salomon, Daniel R.; Sund, Stale; Taskinen, Eero; Trpkov, Kiril and Yamaguchi, Yutaka .1997. The Banff 97 Working Classification of Renal Allograft Pathology. *International Society of Nephrology* : Belgium.
 25. Robbins dan Kumar. 1995. *Buku Ajar Patologi 1 Edisi 4*. Jakarta : EGC.
 26. Robbins; Kumar, Vinay; Cotran, Ramzi S. 2007. *Buku Ajar Patologi Volume 1 Edisi 7*. Jakarta : EGC.
 27. Sekar, Hamira Hayuning; Syamsudin dan Andriani Keban, Sesilia. 2016. Uji Toksisitas Akut Dan Subkronis Ekstrak Etanol 70% Daun Afrika (*Vernonia amygdalina* Del.). (*Skripsi*). Jakarta : Fakultas Farmasi Universitas Pancasila.

