

PENGARUH EKSTRAK DAUN SIRSAK (*Annona muricata*) SEBAGAI IMMUNOSTIMULAN TERHADAP TITER ANTIBODI DAN LEUKOSIT PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)

Martina Restuati¹, dan Endang Sulistyarini Gultom²

^{1,2}Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Medan, Jl. Willem Iskandar Psr V Medan Estate, E-mail: t.restuati@gmail.com

Diterima 7 September 2013, disetujui untuk publikasi 22 september 2013

Abstract Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun sirsak (*Annona muricata*) terhadap jumlah hitung dan jenis leukosit serta kadar imunoglobulin M pada tikus putih (*Rattus norvegicus*), dengan sampel yang digunakan sebanyak 24 ekor Rancangan Acak Lengkap (RAL) non faktorial dengan empat perlakuan masing-masing diberi enam ulangan. Perlakuan yang dilakukan pada tikus putih adalah kelompok A₀ sebagai kontrol diberi 0,5 ml aquadest per oral tiap hari. Kelompok A₁ 250 mg ekstrak etanol daun sirsak/kg BB tanpa SRBC, kelompok A₂ 250 mg ekstrak etanol daun sirsak/kg BB + 0,1 SRBC dan kelompok A₃ 0,1 ml SRBC. Dilakukan selama 30 hari dan pemberian SRBC dilakukan pada hari ke 8 dan ke 15. Parameter yang diamati adalah hitung jenis leukosit dan titer antibodi. Selanjutnya dianalisis dengan Anava dan dilanjutkan dengan uji BNT. Ekstrak etanol sirsak memberikan pengaruh nyata terhadap peningkatan jumlah agranulosit leukosit jenis limfosit pada tikus putih. Berdasarkan hasil uji statistik dengan menggunakan ANAVA satu jalur diperoleh F hitung = 4,3 lebih besar dari F tabel (0,05) = 3,10 dan lebih kecil dari F tabel (0,01) = 4,94. Hal ini menunjukkan ekstrak etanol daun sirsak berpengaruh dalam peningkatan imunostimulan dan hitung jenis leukosit serta dapat meningkatkan imunitas humoral melalui peningkatan kadar titer antibodi. Berdasarkan hasil uji statistik dengan menggunakan ANAVA satu jalur diperoleh F hitung = 3,20 lebih besar dari F tabel (0,05) = 3,10 dan lebih kecil dari F tabel (0,01) = 4,94. Hal ini menunjukkan bahwa ada pengaruh pemberian ekstrak etanol sirsak terhadap peningkatan jumlah granulosit (jenis leukosit lainnya) pada tikus putih.

Kata Kunci : Daun Sirsak, Immunostimulan, Titer Antibodi, Leukosit

Kata kunci:
Daun Sirsak,
Immunostimulan,
Titer Antibodi,
Leukosit

Pendahuluan

Penyembuhan penyakit dengan memanfaatkan tumbuhan sebagai obat tradisional saat ini mulai sering digalakkan. Hal ini seiring dengan permasalahan pengobatan melalui kemoterapi ternyata memiliki efek samping sehingga perlu pengobatan yang aman dan mudah diperoleh. Selain itu, obat tradisional yang berasal dari tumbuhan juga tidak memiliki efek samping dibandingkan obat-obatan kimia, namun

obat-obatan yang berasal dari tumbuhan masih banyak yang belum diteliti. Penyembuhan penyakit dengan memanfaatkan tumbuhan masih belum maksimal digunakan oleh masyarakat di Indonesia.

Banyak jenis tumbuhan yang dapat dieksplorasi sebagai bahan obat tradisional khususnya untuk pengobatan penyakit kanker. Kanker adalah penyakit yang ditandai dengan perubahan genetik dan

menyebabkan transformasi progresif sel normal menjadi sel ganas (Hanahan dan Weinberg, 2000). Salah satu tumbuhan yang dapat dibuat sebagai obat tradisional adalah daun sirsak (*Annona muricata*). Daun *Annona muricata* memiliki beberapa keunggulan bila dibandingkan dengan pengobatan kemoterapi yaitu membunuh kanker secara efektif dan aman.

Daun *Annona muricata* memiliki bau tajam menyengat dengan tangkai daun pendek sekitar 3-10 mm (Radi, 2001) dan memiliki bau tajam yang menyengat. Berbagai penelitian tentang khasiat daun *Annona muricata* sudah banyak dilakukan. Menurut Adewole dan Martin (2006), bahwa daun *Annona muricata* memiliki efek yang bermanfaat dalam meningkatkan aktifitas enzim antioksidan dan hormone insulin pada jaringan pankreas serta melindungi dan menjaga sel-sel pankreas β . Selain itu daun *Annona muricata* juga berpotensi sebagai antihipertensi, antispasmodik, obat pereda nyeri, hipoglikemik, antikanker, emetik (menyebabkan muntah), dan vermifuge (pembasmi cacing) (Holdsworth, 1990).

Acetogenin merupakan senyawa aktif yang bersifat toksik sebagai zat yang dapat menghambat dan menghentikan pertumbuhan sel kanker. Dalam Chang (1998) dijelaskan bahwa senyawa acetogenin berperan sebagai inhibitor sumber energi untuk pertumbuhan sel kanker melalui penghambatan NADH di mitokondria saat transpor elektron dan menghambat NADH oxidase pada membran plasma sel tumor.

Sel kanker membutuhkan energi yang banyak untuk berkembang, sedangkan sumber energi dalam sel akan menjadi berkurang bahkan berhenti akibat aktivitas acetogenin, maka sel kanker pun berhenti membelah dan selanjutnya sel kanker akan mati. Acetogenins secara selektif menyerang sel yang tumbuh abnormal dengan energi yang besar. Sel-sel normal yang butuh energi relatif rendah dalam pertumbuhannya tidak menjadi target senyawa acetogenins (Yuan, 2003). Hal ini yang membuat senyawa dalam daun *Annona muricata* dianggap selektif,

tidak menimbulkan efek samping dan hanya memilih sel kanker untuk diserang.

Sel kanker menunjukkan adanya antigen yang tidak ditemukan pada sel normal sehingga antigen tersebut muncul sebagai antigen asing (Finlay *et al.*, 2006). Masuknya antigen ke dalam tubuh direspon secara langsung oleh sel darah putih (leukosit). Peningkatan jumlah leukosit total menunjukkan adanya respon leukosit secara humoral dan seluler dalam mengatasi adanya sel kanker (Erlinger, 2004).

Acetogenin berperan dalam meningkatkan jumlah sel darah putih (leukosit) dalam mengatasi kanker serta mencegah dari infeksi yang mematikan. Dengan adanya antigen asing yang muncul di dalam sel normal, tubuh akan berupaya membentuk antibodi dengan bantuan acetogenin yang terdapat di dalam daun sirsak. Antibodi IgM adalah antibodi yang pertama kali timbul pada respon imun terhadap antigen dan antibodi yang utama pada golongan darah secara alami. Immunoglobulin M terbentuk dari sel darah putih jenis sel limfosit B. Berdasarkan hal tersebut maka perlu dilakukan penelitian untuk mengkaji aktifitas ekstrak daun *Annona muricata* sebagai immunostimulan terhadap jumlah hitung dan jenis leukosit serta kadar imunoglobulin M pada tikus putih (*Rattus norvegicus*).

Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan Timbangan digital, Tempat pakan, Botol minum, Bak plastik berukuran 40x20x15 cm, Kawat kasa, Blender, Gastric tube, Botol sampel, Lemari pengering, Batang pengaduk, Kertas Saring, Mikropipet, Vakum tube antikoagulan, Sentrifuge, Freezer Dryer, Timbangan, Spoit, Mikroplat 96 dasar V, Penangas air, pH meter, Pipette, Pipettors

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 24 ekor tikus putih strain Wistar jantan dan betina (induk tikus diperoleh dari Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara), pakan bentuk pellet PC 05, air minum

(akuades) yang diberikan secara *ad libitum*, sekam kayu sebagai alas kandang tikus, ekstrak etanol daun sirsak, SRBC (*sheep red blood cell*), CMC(*carboxy metyl cellulose*), formalin 10% untuk mengawetkan limpa sebelum dijadikan preparat.

Penelitian ini bersifat eksperimental, dalam perancangannya digunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) non faktorial dengan empat perlakuan masing-masing diberi enam ulangan. Dalam penelitian ini digunakan 24 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan berat rata-rata dari 100-250 gram dan diadaptasi selama 1 bulan. Masa pemeliharaan dan pemberian perlakuan dilaksanakan selama 30 hari. Selanjutnya tikus dibagi menjadi 6 kelompok masing-masing terdiri dari 4 ekor tikus. Pemberian makan dan minum secara *ad libitum*. Kelompok A sebagai kontrol diberi 0,5 ml aquadest *per oral* tiap hari. Kelompok B 250 mg ekstrak etanol daun sirsak /kg BB tanpa SRBC, kelompok C 250 mg ekstrak etanol daun sirsak/kg BB + 0,1 SRBC dan kelompok D 0,1 ml SRBC. SRBC akan diberikan pada hari ke 8 dan hari ke 15.

Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Sirsak

Simplisia daun sirsak dilakukan di laboratorium fitokimia Fakultas Farmasi USU dengan menggunakan lemari pengering dan blender pembuat serbuk. Daun sirsak segar dilakukan sortasi basah, untuk memisahkan benda asing, meliputi tangkai daun, serangga dan kotoran lainnya. Daun yang telah disortasi dicuci sebanyak 3 kali pencucian dan ditiriskan, kemudian dimasukkan ke dalam lemari pengering sampai kering, ditandai dengan bunyi rapuh bila dipatahkan. Selanjutnya diserbuk menggunakan blender. Serbuk disimpan dalam plastik. Serbuk daun sebanyak 500 g diekstraksi menggunakan Soxhlet dengan etanol 70%. Sari yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* dan dikeringkan untuk mendapatkan ekstrak etanol kering. Senyawa yang akan diambil dengan menggunakan etanol adalah flavonoid (Mulyaningsih, 2006).

Penentuan Dosis Ekstrak Sirsak

Dosis ekstrak etanol sirsak untuk tikus ditentukan dengan dosis 250 mg/kg peroral

Pemberian ekstrak sirsak diberikan peroral setiap hari dengan cara mencekok. Perlakuan diberikan selama 30 hari. Pada hari ke 30 darah tikus diambil untuk dilakukan analisis leukosit.

Pengambilan Sampel Darah

Sampel darah pada tikus didapat dari leher tikus dengan cara memotong leher setiap tikus (24 ekor) yang telah diberi masing-masing perlakuan dengan menggunakan pisau.

Pengukuran jumlah dan hitung jenis leukosit

Penghitungan total leukosit diamati dibawah mikroskop, dengan perbesaran 100 x. Untuk pemeriksaan hitung jenis leukosit, dilakukan secara manual. Pertama-tama dibuat preparat darah hapus. Kemudian, diwarnai dengan larutan giemsa. Pemeriksaan hitung jenis leukosit menggunakan perbesaran 100X obyektif. Perhitungan jenis leukosit ini mengikuti metode yang terdapat pada Depkes RI (1992).

Penentuan Kadar Imunitas Humoral dengan Metode Hemaglutinasi (HA Test)

Darah diambil dengan cara dekapitasi dari leher tikus menggunakan pisau bedah. Pengambilan darah dilakukan hari ke-30. Darah ditampung pada *vacuum tube* 3 ml steril. Darah kemudian disentrifuge dengan kecepatan 3500 rpm selama 5 menit. Serum diambil dan ditempatkan pada *microtube* 1,5 ml baru. Serum disimpan di dalam *refrigerator* 4° C sebelum digunakan. Dilakukan dekomplementasi yaitu meletakkan tabung yang berisi serum didalam penangas air yang bersuhu 56°C selama 30 menit. Kemudian dimasukkan 50 µL PBS pada mikroplat kolom kedua sampai kedua belas, sedangkan kolom pertama dibiarkan kosong. Dimasukkan 100 µL serum yang telah di komplementasikan ke dalam kolom pertama dan dilakukan pengenceran bertingkat pada mikroplat dengan cara mengambil 50 µL serum dari kolom pertama kemudian memasukkannya ke dalam kolom kedua, dihomogenkan. Setelah itu ambil 50 µL dari kolom kedua kemudian masukkan ke kolom ketiga lalu dihomogenkan, demikian seterusnya sampai kolom kedua belas. Kemudian dibuang 50 µL

serum pada pengenceran serial terakhir pada kolom kedua belas. Dengan demikian didapatkan 12 seri pengenceran serum dengan kelipatan dua, yaitu : 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024, 1/2048. Dimasukkan 25 µL SRBC 1 % ke dalam setiap sumur, dicampurkan secara perlahan. Dilakukan pembacaan titer antibodi hasil reaksi hemaglutinasi dengan pengamatan langsung dengan mata. Pengamatan tersebut berdasarkan adanya penyebaran dan pengendapan SRBC pada dasar mikropelat yang terlihat jelas bila dilihat dari posisi atas tegak lurus terhadap dasar mikropelat dengan latar belakang putih dan pencahayaan dari atas. Dilakukan pembacaan titer antibodi diamati setelah 24 jam tes hemaglutinasi. Pengumpulan data dengan cara mengukur konsentrasi antibodi dengan cara titrasi pengenceran bertingkat. Angka hasil pembacaan titer yang berupa deret ukur (bersifat eksponensial dengan bilangan pokok dua) dikonversikan ke dalam deret hitung (Achyat, dkk., 2008) dengan rumus

$$^2\log (\text{titer}) + 1 \quad (1).$$

Teknik Analisis Data

Tabel 1. Nilai Rata-rata Jumlah Limfosit

Perlakuan	Ulangan						Total	Rata-rata
	1	2	3	4	5	6		
A ₀	76.5	63.6	78.8	77.1	73.5	63	431.7	71.95
A ₁	70.7	71.9	80.6	76.3	74.3	77	450.8	75.13
A ₂	80	88.5	79.7	68.4	64	73.8	454.4	75.73
A ₃	62.5	72.2	71.2	62.9	48.6	54	371.4	61.9
Total								71.18

Dari tabel di atas terlihat bahwa jumlah limfosit yang mengalami peningkatan adalah pada perlakuan A₁ dan A₂, sedangkan pada perlakuan dan A₃ mengalami penurunan dibandingkan dengan A₀. Hal ini disebabkan oleh aktifitas ekstrak daun sirsak (*Annona muricata*) yang berfungsi sebagai imunostimulan didukung oleh respon antigen yang disuntikkan pada tikus putih sehingga dapat meningkatkan jumlah dan hitung jenis leukosit pada tikus putih (*Rattus norvegicus*).

Metode yang digunakan adalah metode eksperimental dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Non Faktorial. Data yang diperoleh ditabulasikan kemudian dianalisis dengan analisis varians (ANOVA) 1 arah.

Hasil Dan Pembahasan

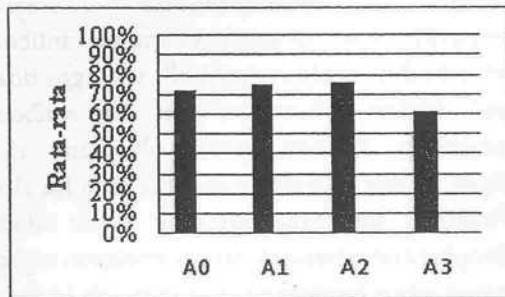
Total Limfosit

Sel limfosit mempunyai kemampuan untuk membedakan dirinya sendiri dan yang bukan dirinya sendiri (benda asing) serta mengatur penghancuran dan inaktivasi dari benda asing (Efendi, 2003). Limfosit terdiri atas dua yaitu limfosit B dan limfosit T. Sel B bertanggung jawab atas sintesis antibodi humoral yang bersirkulasi yang dikenal dengan nama immunoglobulin (Lantapi, 2011).

Nilai total limfosit dalam penelitian ini diperoleh melalui perhitungan persen limfosit. Pada tabel 5.1. dapat dilihat bahwa jumlah limfosit tikus putih setelah pemberian ekstrak etanol daun sirsak dengan perlakuan yang berbeda untuk masing-masing kelompok.

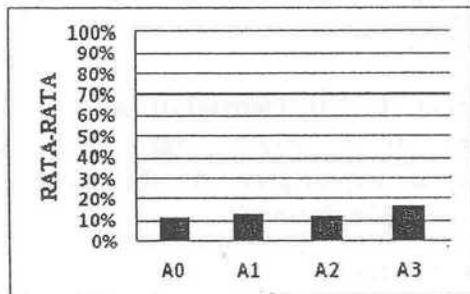
Penggunaan SRBC dilakukan sebagai antigen dikarenakan mudah diperoleh dalam suspensi yang uniform dan dapat diukur. Kemudian SRBC juga bersifat stabil dan lisis dari SRBC dapat dilihat dan dapat dibuat dengan mudah (Handojo, 2003) dalam Achyat, dkk, (2008). Penurunan sel limfosit pada perlakuan A₃ dikarenakan adanya antigen yang dimasukkan ke dalam tubuh tikus putih yang berlawanan dengan sel limfosit. Secara diagram, perbandingan nilai

jumlah rata-rata limfosit dapat dilihat pada gambar 1 berikut.



Gambar 1. Nilai rata-rata jumlah limfosit pada tiap perlakuan dalam persen (%)

Untuk mengetahui apakah perbedaan perlakuan tiap kelompok berpengaruh atau tidak, maka data di uji secara statistic dengan uji ANAVA 1 arah. Peningkatan yang paling tinggi adalah pada perlakuan A₃. Perbandingan jumlah rata-rata monosit dapat dilihat pada gambar 2 berikut ini.



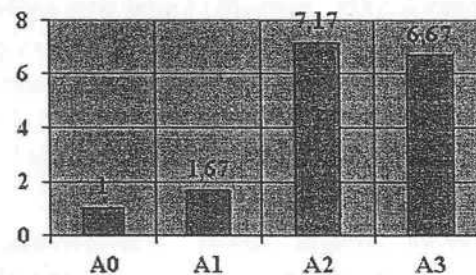
Gambar 2. Nilai Rata-rata Jumlah Monosit

Berdasarkan gambar di atas, adanya peningkatan jumlah monosit dalam darah disebabkan karena peningkatan aktifitas fagositosis terhadap benda asing, mengingat monosit dalam jaringan akan berubah menjadi makrofag (Martini *et al.* 1992). Hasil penelitian menunjukkan bahwa jika dilihat dari nilai statistik pemberian ekstrak etanol daun sirsak memberikan pengaruh nyata ($\alpha:0,05$) terhadap jumlah monosit tikus putih. Monosit tikus putih normal berkisar antara 0-5% dan nilai rata-rata monosit 13% (Smith dan Mangkoewidjoyo, 1988).

Kadar Titer Antibodi

Kadar titer antibodi dalam penelitian ini diperoleh dengan menghitung jumlah total

titer antibodi. Pada gambar 5.4 diketahui bahwa kadar titer antibodi tikus putih setelah pemberian ekstrak etanol daun sirsak untuk masing-masing kelompok memiliki rata-rata yang berbeda. Kadar titer antibodi yang diuji dengan tes Hemaglutinasi (HA Test) pada setiap perlakuan memiliki rata-rata yang berbeda setelah pemberian ekstrak etanol daun sirsak. Nilai rata-rata secara berurutan yaitu perlakuan A₀=1; A₁=1,67; A₂=7,17; A₃=6,67. Rata-rata kadar titer antibodi pada setiap perlakuan dapat dilihat dalam bentuk diagram batang berikut.



Gambar. 3 Nilai rata-rata kadar imunitas humoral tikus putih melalui pengamatan titer antibodi pada tikus putih yang diberi perlakuan ekstrak etanol daun sirsak.

Rata-rata kadar titer antibodi pada setiap perlakuan saat tes hemaglutinasi setelah pemberian perlakuan selama 30 hari kepada tikus memiliki kadar yang berbeda. Berdasarkan gambar 5.4 dapat dilihat bahwa kelompok yang tertinggi kadar titer antibodinya adalah pada kelompok perlakuan A₂. Tingginya kadar titer antibodi pada A₂ disebabkan oleh adanya imunisasi SRBC yang dilakukan 2 kali yaitu pada hari perlakuan ke-8 dan ke-15. Pada kelompok perlakuan SRBC juga ditemukan kadar titer antibodi yang cukup tinggi dimana hal ini disebabkan juga karena pernah terpapar dengan antigen SRBC sebelumnya.

Pada kelompok A₀ dan A₁ juga terbentuk imunitas humoral walaupun pada dasarnya kelompok ini tidak pernah terpapar langsung dengan antigen SRBC. Namun hemaglutinasi yang terjadi kadarnya kecil yaitu berkisar antara 0-1. Sedangkan untuk kelompok A₁ memiliki kadar yang lebih tinggi berkisar

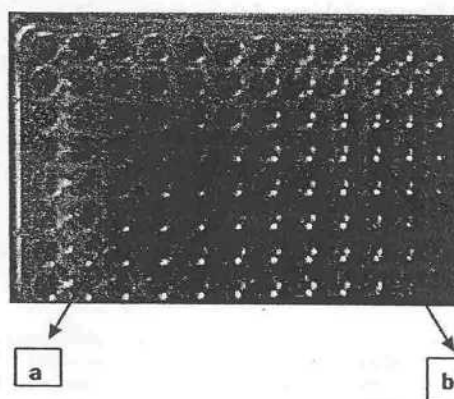
antara 1-3. Hal ini disebabkan pada serum darah manusia maupun tikus ada kemungkinan ditemukan antigen anti-SRBC walaupun diketahui sebelumnya belum pernah terpapar. Hal ini sejalan dengan penelitian terdahulu yang telah dilakukan oleh Achyat, dkk (2008), dimana antigen yang terbentuk adalah antigen alamiah (*natural antibody*). Pada kelompok SRBC ditemukan kadar titer antibodi yang cukup tinggi, hal ini dikarenakan kelompok SRBC sudah pernah diimunisasi dengan antigen SRBC sebelumnya sebanyak dua kali imunisasi. Kelompok SRBC memiliki kadar titer antibodi yang lebih tinggi dari kelompok kontrol dan ekstrak etanol karena kelompok tersebut pernah memproduksi antibodi yang lebih besar agar dapat menghancurkan antigen pada saat imunisasi dilakukan.

Dalam Achyat (2008) mengemukakan dalam penelitiannya yang menggunakan SRBC sebagai antigen menunjukkan kenaikan pada saat pemberian imunisasi dan hal ini dilakukan tes hemaglutinasi dimana kelompok SRBC lebih tinggi kadar titer antibodinya dibandingkan dengan kelompok kontrol karena kelompok SRBC memproduksi antibodi yang lebih besar agar dapat menghancurkan antigen. Antigen yang telah bergabung atau bersatu dengan immunoglobulin G atau M (IgG atau IgM) akan mengaktifkan sistem komplemen, yaitu sekelompok protein plasma yang berakibat lisis pada suatu benda asing tersebut.

Reaksi hemaglutinasi dikatakan positif apabila endapan SRBC tersebar merata menutupi seluruh atau sebagian besar dinding dasar sumur mikroplat. Endapan itu terbentuk karena ada suatu anyaman yang teratur antara antibodi dengan SRBC dengan permukaan yang luas sehingga menutupi seluruh atau sebagian besar dasar sumur mikroplat. Persatuan dari anyaman ini akan terlihat berwarna merah muda. Terjadinya reaksi hemaglutinasi negatif apabila SRBC berkumpul di bagian tengah dasar sumur mikroplate dan terbentuk seperti titik atau

kancing (Susanti, Sadikin, dkk.,1994) dalam Achyat, dkk., (2008).

Reaksi hemaglutinasi negatif memperlihatkan demikian karena antibodi tidak ada dan antigen berlebih sehingga tidak terjadi ikatan antara antigen dan antibodi. Disebabkan karena pengaruh berat dari antigen, maka antigen yang berlebih itu akan berkumpul ke tengah-tengah dasar sumur mikroplat membentuk suatu endapan seperti kancing yang berwarna merah muda (Achyat, dkk. 2008).



Gambar 4. Uji Hemaglutinasi (HA Test) serum tikus putih: (a) menunjukkan aglutinasi terjadi pada A₃, (b) menunjukkan tidak terjadi aglutinasi.

Kesimpulan

Ekstrak etanol daun sirsak berpengaruh dalam peningkatan imunostimulan dalam meningkatkan jumlah dan hitung jenis leukosit serta dapat meningkatkan imunitas humoral melalui peningkatan kadar titer antibody setelah diuji dengan statistik berpengaruh nyata atau signifikan.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Ditlitabmas Dikti Kemendikbud yang telah memberikan dana penelitian melalui Penelitian Desentralisasi Hibah Bersaing, Nomor 0019/ES.2/PL/2012, tanggal 05 Januari 2013.

Daftar Pustaka

Achyat S R, Sadikin M, dkk., (2008), *Pengaruh Pemberian Minyak Buah Merah (Pandanus*

- conoides* Lam.) terhadap Imunitas Humoral Tikus (*Rattus norvegicus* L.) Galur Wistar Melalui Pengamatan Titer Antibodi Anti-SDMD, *Jurnal Bahan Alam Indonesia*, Vol. 6, No.4.
- Adewole, S.O. 2006. Morphological Changes and Hypoglycemic Effects of *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) Leaf Aqueous Extract on Pancreatic B-Cells of Streptozotocin-Treated Diabetic Rats. *African Journal of Biomedical Research*, Vol. 9 (173 – 187).
- Anonim1, (2012), *Antibodi A*, [http://id.wikipedia.org/wiki/Antibodi A](http://id.wikipedia.org/wiki/Antibodi_A), (diakses tanggal 02 Maret 2013).
- Anonim2, (2013), *Apigenin*, <http://www.answers.com/topic/apigenin>, (diakses tanggal 1 April 2013).
- Bijanti, dkk, (2010), *Buku Ajar Patologi Klinik*.
- Chang, F.R, dkk (1998). Acetogenins From Seeds of *Annona Reticulata*. *Phytochemistry*. Vol. 47, No. 6. pp. 1057-1061.
- Effendi, Zukesti. 2003. *Peranan Leukosit sebagai Antiinflamasi Alergik dalam Tubuh*. Fakultas Kedokteran: Universitas Sumatera Utara
- Erlinger Thomas P. 2004. WBC Count and the Risk of Cancer Mortality in a National Sample of U.S. Adults: Results from the Second National Health and Nutrition Examination Survey Mortality Study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 13: 1052
- Frandsen, R.D. 1992. *Anatomi dan Fisiologi Ternak* Edisi ke-4. Gajah Mada University Press: Yogyakarta
- Guyton, Arthur C. 1983. *Fisiologi Manusia dan Mekanismenya terhadap Penyakit*. EGC: Jakarta.
- Hanahan, D. dan Weinberg, R. A. 2000. The Hall Mark Of Cancer Cell. Vol 100 : 57-70
- Handayani, Wiwik. 2008. *Asuhan Keperawatan pada Klien dengan Gangguan Sistem Hematologi*. Salemba Medika: Jakarta
- Harryadi R. 1980. Limfoma Malignum : Kanker atau Reaksi Immunologik yang Normal. *Cermin Dunia Kedokteran* No.18 : 30-32
- Hoffbrand, Victor. 2006. *At a Glance Hematology*. EMS: Jakarta
- Holdsworth D. K. (1990): "Traditional Medicinal Plants of Rarotonga, Cook Islands." Part I. *Int. J. Crude Drug Res.* 28(3), 209-218.
- Martini, F., H., Ober, W., C., Garrison C, Welleh K, (1992), i, Prentice Hall, Englewood Cliffs.
- Mulyaningsih, S., (2007), *Logika, Aktivitas Immunostimulan Ekstrak Etanol Daun Rambutan (Nephelium lappaceum L.) pada Mencit*, Vol 4, No. 1: 38-45.
- Pramesemara, (2009), *Imunoglobulin ; Mengenal Sistem Pertahanan Tubuh Manusia*, <http://pramareola14.wordpress.com/2009/08/29/imunoglobulin-mengenal-sistem-imun-manusia/>, (diakses tanggal 23 Maret 2013).
- Radi. J. 2001. *Sirsak-Budidaya dan Pemanfaatannya*. Kanisius : Yogyakarta
- Smith JB, Mangkoewidjojo S. 1988. *Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis*. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia Press.
- Weinberg R. A, (2007). *The Biology of Cancer*. New York: Garland Science.
- Yuan S. S., et al. (2003): Annonacin, a monotetrahydrofuran acetogenin, arrest cancer cells at the G1 phase and causes cytotoxicity in a Bax and caspase-3-related pathway. *Life Sci.* 72(25), 2853-2861.
- Zuhud, E. A. 2011. *Bukti Kedahsyatan Sirsak Menumpas Kanker*. Agromedia Pustaka: Jakarta