

Potensi Ekstrak Etanol Daging Buah *Citrullus lanatus* sebagai Imunomodulator melalui Pengamatan Diameter Pulpa Alba Limpa Mencit BALB/c

The Potential of Citrullus lanatus Ethanol Extract as Immunomodulators through Observation of Spleen Alba Pulp Diameter in BALB/c Mice

Ulinna`ma Hayati Wardhani¹, S. N. Nurul Makiyah²

¹Mahasiswa Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UMY, ²Bagian Histologi Fakultas Kedokteran dan Kesehatan UMY

Email: ulinwrhni@yahoo.com

Intisari

Citrullus lanatus memiliki kandungan flavonoid yang digunakan sebagai agen imunomodulator. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perubahan diameter pulpa alba limpa mencit BALB/c yang diinduksi Ovalbumin (OVA) setelah pemberian ekstrak etanol buah *C. lanatus*. Jenis penelitian ini adalah eksperimental dengan *post-test only control group design*. Sebanyak 30 ekor mencit BALB/c jantan dibagi menjadi enam kelompok yaitu tiga kelompok kontrol (normal, negatif, dan Metilprednisolon) dan tiga kelompok perlakuan ekstrak *C. lanatus* (dosis 175 mg/kgbb, 350 mg/kgbb, dan 700 mg/kgbb per hari). Ekstrak dan Metilprednisolon diberikan selama 28 hari, sedangkan OVA diberikan pada hari ke-15 dan ke-22 secara intraperitoneal, dan peroral pada hari ke-23 hingga ke-28. Pada hari ke-29, mencit dikorbankan dan limpa diambil untuk dibuat preparat histologi dengan pengecatan HE. Efek imunomodulator ekstrak dinilai dari rata-rata diameter pulpa alba limpa. Data diameter pulpa alba limpa dianalisis dengan uji non parametrik *Kruskal-Wallis* dilanjutkan uji *Mann-Whitney*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa diameter pulpa alba limpa mengalami peningkatan setelah diinduksi OVA, pemberian ekstrak *C. lanatus* dosis 700 mg/kgbb dan Metilprednisolon menyebabkan penurunan diameter pulpa alba secara bermakna ($p < 0.05$), tetapi ekstrak *C. lanatus* dosis 175 dan 350 mg/kgbb tidak menurunkan diameter pulpa alba. Ekstrak etanol *C. lanatus* dosis 700 mg/kgbb mampu menurunkan diameter pulpa alba pada limpa mencit BALB/c yang diinduksi OVA sehingga berpotensi sebagai agen imunomodulator.

Kata kunci: *Citrullus lanatus*, imunomodulator, Ovalbumin, pulpa alba limpa

Abstract

Citrullus lanatus contains flavonoids that are used as an immunomodulatory agent. This study aimed to determine changes in the diameter of the spleen alba pulp of Ovalbumin (OVA)-induced BALB/c mice after giving *C. lanatus* ethanol extract. This research used experimental with *post-test only control group design*. Thirty male BALB/c mice divided into six groups consists of a three control groups (normal, negative, and Methylprednisolone) and three *C. lanatus* extract treatment groups (175mg/kgbb, 350mg/kgbb, and 700mg/kgbb dose per day). The extract and Methylprednisolone are given for 28 days, while OVA is given on 15th and 22nd day (intraperitoneal) and 23rd until 28th day (peroral). On the 29th day the mice are sacrificed and the spleen is taken to be made into histological preparation with HE staining. The immunomodulatory effect is assessed by the average of the alba pulp of spleen diameter. The data were analyzed with non-parametric test *Kruskal-Wallis* continued with *Mann-Whitney* test. The results showed that the spleen alba pulp diameter increased after OVA induction, *C. lanatus* extract dose of 700 mg/bw and Methylprednisolone caused a decrease in pulp alba diameter significantly ($p < 0.05$), but *C. lanatus* extract doses of 175 and 350 mg/bw did not lower the alba pulp diameter. 700 mg/kgbb dose *C. lanatus* ethanol extract has effect to decrease the average size of the alba pulp of spleen diameter in OVA-induced BALB/c mice, so it has potency as an immunomodulatory agent.

Key word: alba pulp of spleen, *Citrullus lanatus*, immunomodulatory, Ovalbumin

Pendahuluan

Angka kejadian alergi terus meningkat di seluruh dunia dalam beberapa tahun terakhir ini. Alergen berupa protein makanan yang masuk ke dalam tubuh akan menimbulkan reaksi hipersensitivitas tipe I (*immediate*) yang dimediasi oleh IgE. Sel limfosit T dan B mempunyai peran penting dalam pembentukan antibodi tersebut.^{1,2}

Limpa terdiri dari dua area histologi yang berbeda yaitu pulpa putih (*alba*) dan pulpa merah (*rubra*). Pulpa putih terdapat kumpulan nodus limfatikus yang menggambarkan berbagai fungsi imunologis seperti produksi antibodi dan pematangan dari limfosit T dan B serta makrofag.³ Aktivitas sistem imun pada limpa dapat diketahui dari ukuran diameter pulpa alba. Diameter pulpa alba limpa yang lebih besar menunjukkan adanya peningkatan aktivitas sistem imun pada limpa.⁴

Zat imunomodulator digunakan pada kondisi sistem imun yang abnormal. Saat ini imunomodulator alamiah mulai banyak dikembangkan. Salah satu tanaman buah yang sudah digunakan secara luas untuk pengobatan tradisional adalah semangka (*Citrullus lanatus*). Tumbuhan ini kaya akan flavonoid, alkaloid, saponin, glikosid, tannin, dan fenol.⁵ Senyawa flavonoid adalah kelompok fenol yang tersebar luas di semua tanaman. Flavonoid merupakan salah satu golongan senyawa metabolit sekunder yang diteliti mempunyai aktivitas biologis dan farmakologis, antara lain sebagai antiinflamasi, antibakteri karena flavonoid mempunyai gugus hidroksil, aktivitas alergi, dan aktivitas tumor sitotoksik.⁶

Sebagai imunomodulator, kandungan flavonoid pada tumbuhan tidak semata-mata berefek meningkatkan sistem imun, namun juga menekan sistem imun apabila aktivitasnya berlebihan. Jadi tanaman obat yang mengandung flavonoid berfungsi sebagai penyeimbang sistem imun.⁷

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui perubahan diameter pulpa alba limpa mencit BALB/c yang diinduksi Ovalbumin setelah pemberian ekstrak etanol buah *Citrullus lanatus*.

Metode

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental *in vivo* pada hewan uji dengan *post-test only control group design*. Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etanol *Citrullus lanatus* dosis 175 mg/kgbb/hari; 350 mg/kgbb/hari; dan 700 mg/kgbb/hari selama 28 hari berturut-turut. Variabel tergantung adalah diameter pulpa alba limpa mencit BALB/c. Variabel terkendali adalah mencit BALB/c jantan, umur 8 minggu, berat \pm 20 gram yang dilakukan aklimatisasi selama 1 minggu, dipelihara dalam kandang, pencahayaan yang sama, diberi pakan standar BR 1 dan minum akuades.

Ekstrak didapatkan dari buah *Citrullus lanatus* matang yang dibuat menjadi simplisia, dimaserasi selama 7 hari menggunakan larutan penyari etanol 80% dan diuapkan hingga didapatkan ekstrak kental. Ekstrak etanol diberikan peroral dengan alat bantu sonde pada mencit BALB/c selama 28 hari.

Hewan uji yang digunakan berjumlah 30 ekor dan dibagi ke dalam 6 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 5 mencit. Keenam kelompok tersebut terdiri dari kelompok kontrol normal (K-N), kelompok kontrol yang

hanya disensitisasi dengan Ovalbumin (K-OVA), kelompok kontrol yang disensitisasi dengan OVA dan diberi Metilprednisolon 0.13 mg/hari (K-MP), dan tiga kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol *C. lanatus* dosis 175 mg/kgbb/hari (K-P1), dosis 350 mg/kgbb/hari (K-P2), dosis 700 mg/kgbb/hari (K-P3).^{8,9}

Mencit dibuat alergi saluran pencernaan dengan cara sensitisasi secara intraperitoneal pada hari ke-15 dengan 0.15 cc OVA dalam Al(OH)₃/mencit dari 2.5 mg OVA yang dilarutkan pada 7.75 ml aluminium hidroksida dan pada hari ke-22 dengan 0.15 cc OVA dalam akuades/mencit dari 2.5 mg OVA yang dilarutkan pada 10 ml akuades. Pada hari ke-23 hingga hari ke-28, mencit dipapar lagi peroral dengan 0.15 cc OVA dalam akuades yang dibuat dari 2.5 mg OVA dalam 2.5 ml akuades. Mencit dikorbankan 24 jam setelah pemberian OVA yang terakhir.^{10,11}

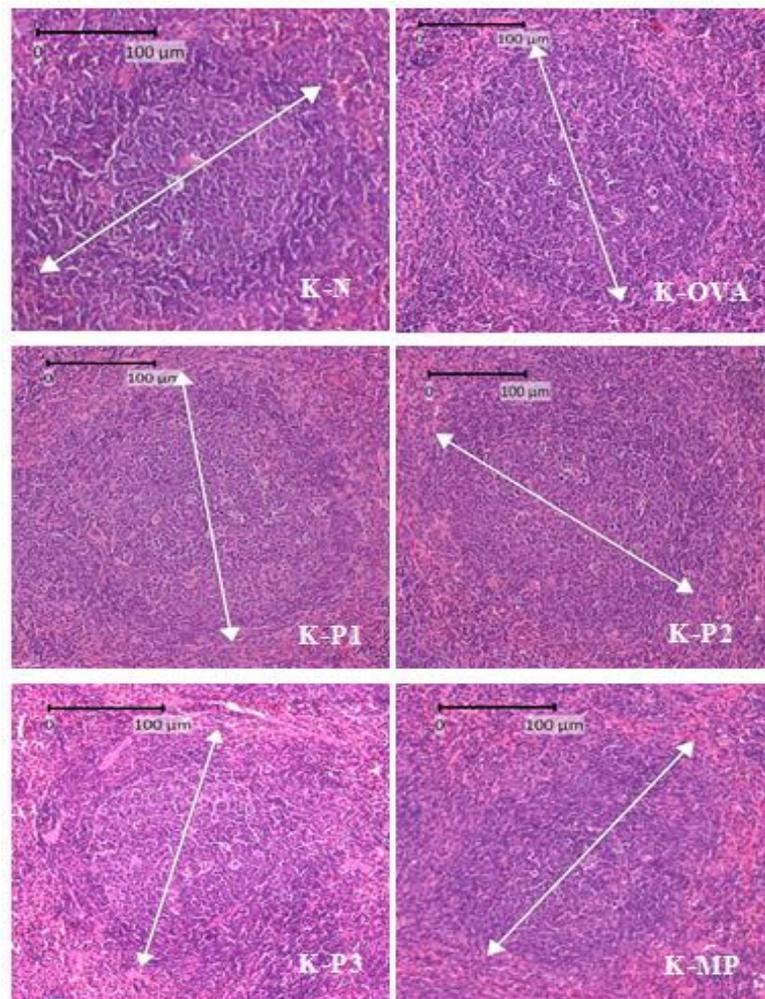
Pembedahan mencit dilakukan pada hari ke-29. Mencit dikorbankan, diambil organ limpanya untuk dibuat menjadi preparat dengan metode blok parafin. Setelah itu, dilakukan pewarnaan preparat dengan *Hematoxylin Eosin*. Pengamatan diameter pulpa alba limpa mencit menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 10x10 pada 10 lapang pandang.¹² Pulpa alba yang diamati setiap preparat berjumlah 15 pulpa. Diameter didapatkan dari diameter maksimum pulpa yang dirata-rata dengan diameter maksimum tegak lurus.¹³

Data penelitian ini berupa rata-rata diameter pulpa alba limpa yang didapatkan diuji normalitas distribusinya dengan menggunakan *Kolmogorov-*

Smirnov. Data dianalisis dengan *Kruskal-Wallis* dilanjutkan dengan *Mann-Whitney*.

Hasil Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan efek ekstrak etanol *Citrullus lanatus* terhadap perubahan diameter pulpa alba limpa mencit BALB/c yang diinduksi Ovalbumin. Gambaran histologi pulpa alba limpa mencit yang diamati dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Histologi pulpa alba limpa mencit BALB/c dengan perwarnaan HE perbesaran 10x pada kelompok normal (K-N), kontrol negatif (K-OVA), kontrol positif (K-MP), dan kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol *C. lanatus* dosis 175 mg/kgbb (K-P1), 350 mg/kgbb (K-P2), 700 mg/kgbb selama 28 hari. Keterangan: ↔ : Diameter pulpa alba limpa

Setelah dilakukan pengukuran diameter pulpa alba limpa pada keenam kelompok, dilakukan penghitungan rata-rata yang dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rata-rata diameter pulpa alba limpa mencit ($x \pm SD$) dalam satuan μm pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan setelah 28 hari perlakuan

No.	Kelompok	Diameter Pulpa Alba Limpa (μm)
1	K-N	276.67 ± 67.43^a
2	K-OVA	286.48 ± 59.85^{ab}
3	K-P1	306.05 ± 72.65^{bc}
4	K-P2	318.57 ± 80.86^c
5	K-P3	258.63 ± 51.92^{ad}
6	K-MP	256.05 ± 45.01^{ad}

Keterangan: SD: standar deviasi; ^{a,b,c,d}: angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak menunjukkan beda yang nyata antar kelompoknya.

Kelompok perlakuan ekstrak etanol buah *Citrullus lanatus* dosis 350 mg/kgbb dan disentisisasi dengan OVA (K-P2) memiliki rata-rata diameter pulpa alba yang paling tinggi yaitu $318.57 \pm 80.86 \mu\text{m}$., sedangkan kelompok kontrol positif dengan pemberian Metilprednisolon peroral dengan dosis 0.13 mg dan disentisisasi dengan OVA (K-MP) memiliki rata-rata diameter pulpa alba paling rendah yakni $256.05 \pm 45.01 \mu\text{m}$. Pada kelompok perlakuan ekstrak etanol *C. lanatus* hanya kelompok ekstrak etanol buah *C. lanatus* dosis 700 mg/kgbb yang menunjukkan penurunan rata-rata diameter pulpa alba yakni $258.63 \pm 51.92 \mu\text{m}$. Kelompok ini memiliki rata-rata lebih rendah dibanding kelompok kontrol normal dan hampir sama dengan kelompok kontrol Metilprednisolon.

Setelah pengukuran rata-rata, dilakukan pengujian normalitas data menggunakan *Kolmogorov-Smirnov* karena jumlah sampel lebih dari 50. Hasil uji

normalitas menunjukkan bahwa K-P1 memiliki nilai $p=0.007$ ($p<0.05$) sehingga distribusi data pada kelompok ini tidak normal. Sedangkan pada kelompok lain didapatkan nilai $p>0.05$ sehingga distribusi datanya normal. Pada uji homogenitas varians didapatkan hasil $p<0.05$, menunjukkan bahwa data memiliki varians yang tidak sama. Data memiliki distribusi yang tidak normal dan varians yang berbeda maka tidak memenuhi syarat uji parametrik. Uji statistik yang dipilih adalah uji non prametrik *Kruskal-Wallis*. Hasil uji *Kruskal-Wallis* didapatkan $p=0.00$ ($p<0.05$) berarti rata-rata diameter pulpa alba limpa pada keenam kelompok perlakuan memiliki perbedaan. Kemudian dilakukan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui kelompok mana dari keenam kelompok tersebut yang memiliki perbedaan.

Hasil uji *Mann-Whitney* menunjukkan bahwa K-N tidak memiliki perbedaan yang signifikan dengan K-P3 dan K-MP ($p>0.05$), sedangkan antara K-OVA dengan K-P3 dan K-MP menunjukkan perbedaan yang nyata ($p<0.05$). Hasil pengujian K-P3 dengan K-MP menunjukkan nilai $p=0.959$ ($p>0.05$) sehingga kedua kelompok ini tidak memiliki perbedaan rata-rata diameter pulpa alba yang signifikan.

Pembahasan

Pada penelitian ini, dilakukan uji efek imunomodulator ekstrak etanol *Citrullus lanatus* pada mencit BALB/c yang diinduksi oleh Ovalbumin. Seluruh mencit, kecuali kelompok kontrol normal, disensitisasi menggunakan OVA. Rata-rata diameter pulpa alba pada kelompok kontrol negatif (K-OVA) lebih tinggi

dibandingkan dengan rata-rata pada kelompok kontrol normal (K-N). Hal ini disebabkan karena OVA mampu merangsang pembentukan respon imun ke arah sel Th2 dimana akan terjadi reaksi hipersensitivitas tipe I.¹⁴ OVA akan meningkatkan sel Th2 untuk mensekresikan berbagai macam interleukin (IL-4, IL-5, IL-9 dan IL-13) yang dapat meningkatkan tingkat inflamasi.¹⁵ IL-4 merangsang sel B untuk membentuk IgE. IgE akan diikat oleh sel yang memiliki reseptor untuk IgE seperti sel mast, basofil dan eosinofil. Apabila tubuh terpajan ulang oleh alergen sel mast akan mengalami degranulasi sehingga mensekresikan histamin, prostaglandin, dan leukotriene.^{16,17}

Antigen asing dapat masuk ke dalam tubuh melalui lapisan epitel saluran pencernaan. Sel-sel dendritik di epitel akan mengikat antigen tersebut lalu masuk ke dalam saluran limfe untuk dibawa ke kelenjar getah bening regional agar diproses oleh limfosit T, sedangkan antigen yang tidak terikat sel dendritik di lapisan epitel akan bersirkulasi dalam aliran darah sehingga akan ditangkap oleh APC di dalam limpa untuk selanjutnya diproses oleh limfosit.¹⁸

Limpa adalah organ sistem imun sekunder terbesar yang mempunyai fungsi untuk melawan antigen yang terdapat pada aliran darah serta menyaring darah dari benda asing dan sel darah merah yang rusak atau tua.¹⁹ Pada limpa, limfosit mengenal fragmen antigen *non-self* yang dipresentasikan makrofag, sel dendritik, dan fagosit. Presentasi fragmen antigen *non-self* diikuti oleh sekresi IL-12 dan IL-18 yang akan menstimulasi sel T menghasilkan interferon- γ (INF- γ) yang mengaktivasi sel NK (*natural killer*) dan CD8⁺.¹⁸ Salah satu komponen limpa adalah pulpa putih (*alba*). Pulpa *alba* berperan untuk menghasilkan limfosit.

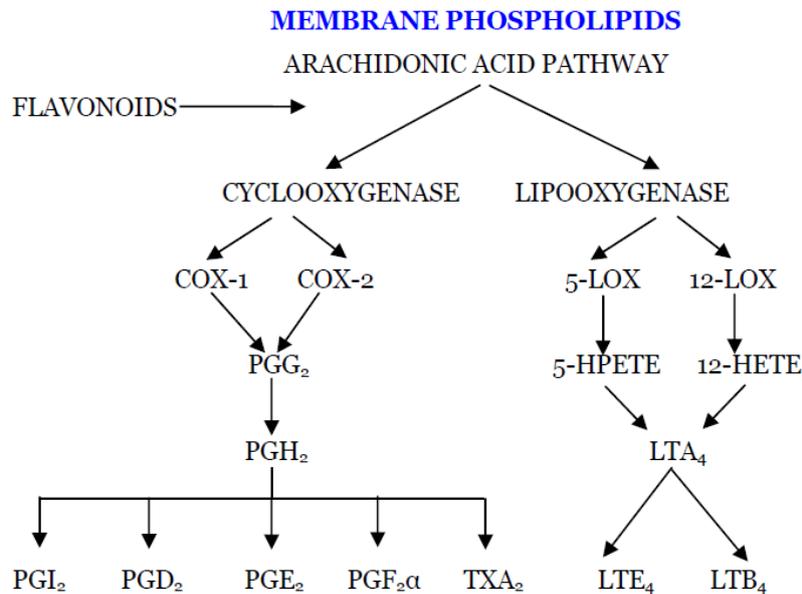
Respon imun limpa terhadap OVA adalah dengan meningkatkan aktivitas proliferasi sel-sel limfosit pada pulpa alba sehingga terjadi peningkatan ukuran diameter pulpa alba.

Peningkatan diameter pulpa alba pada K-OVA ini sesuai dengan penelitian oleh Makiyah (2004) tentang peningkatan diameter pulpa alba akibat paparan Ultraviolet C pada mencit. Sinar ultraviolet dianggap sebagai antigen sehingga terjadi proliferasi sel-sel limfosit pada pulpa alba limpa mencit.¹²

Kelompok kontrol positif (K-MP) menunjukkan rata-rata diameter pulpa alba paling rendah. Mencit diberi Metilprednisolon dosis 0.13 mg/hari selama 28 hari. Metilprednisolon adalah obat golongan kortikosteroid. Manfaatnya antara lain mengatasi radang (antiinflamasi), menekan sistem imun dalam proses alergi, mengatur metabolisme protein dan karbohidrat, mempengaruhi kadar natrium dalam darah, dan lain-lain.²⁰ Cara kerja obat tersebut sebagai agen antiinflamasi dan immunosupresan adalah dengan cara induksi limfositopenia dan menghambat diferensiasi dan proliferasi limfosit. Obat ini akan mengganggu komunikasi intraselular antara leukosit dengan produksi limfokin (IL-1, IL-2 dan TNF) sehingga fungsi makrofag akan terganggu. Namun obat ini juga memiliki efek samping yang membahayakan tubuh jika digunakan dalam jangka waktu lama. Selama penelitian berlangsung terdapat dua mencit yang mati dari kelompok tersebut. Hal ini dapat disebabkan oleh efek samping Metilprednisolon seperti atrofi otot, osteoporosis, *moon face*, *buffalo hump*, lemak ekstremitas berkurang, gangguan reabsorpsi Na^+ serta sekresi K^+ dan H^+ di ginjal, gangguan absorpsi Ca^{2+} di usus, dan gangguan neuropsikiatri.²¹

Pemberian ekstrak etanol *Citrullus lanatus* dosis 700 mg/kgbb/hari terbukti dapat menurunkan diameter pulpa alba limpa. Hasil uji statistik menunjukkan kelompok ekstrak etanol *C. lanatus* dosis 700 mg/kgbb memiliki rata-rata diameter yang tidak berbeda secara signifikan dengan kelompok kontrol normal dan kelompok kontrol Metilprednisolon. Hal ini disebabkan karena ekstrak tersebut mengandung flavonoid. Pada semangka terdapat kandungan flavonoid, alkaloid, saponin, glikosid, tannin, dan fenol.⁵

Salah satu senyawa penting yang terkandung pada semangka ini adalah flavonoid. Flavonoid adalah senyawa fenol yang dapat berperan sebagai agen antiinflamasi. Dari berbagai penelitian terdapat banyak mekanisme kerja senyawa tersebut. Pertama, flavonoid dapat menghambat enzim yang mengatur respon inflamasi, terutama tirosin dan serin-threonin protein kinase yang berperan dalam transduksi dan aktivasi sel dalam proses proliferasi sel T, aktivasi limfosit B, dan produksi sitokin oleh monosit. Kedua, flavonoid dapat mengurangi produksi asam arakidonat, prostaglandin, leukotriene, dan NO (nitrit oksida) dengan cara menghambat enzim fosfolipase A2, siklooksigenase (COX), lipooksigenase, dan nitrit oksida sintase (NOS).^{22,23}



Gambar 2. Mekanisme kerja flavonoid pada inflamasi²⁴

Penurunan diameter pulpa alba disebabkan efek antiinflamasi flavonoid yang menghambat proliferasi sel limfosit. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian oleh Gupta (2016) yang meneliti aktivitas antiinflamasi dan immunosupresi kandungan flavonoid pada *Santalum album*, *Butea frondosa*, *Emblica officinalis*. Kandungan flavonoid tersebut terbukti menekan proliferasi, menurunkan produksi NO dan CD14 *surface marker*.²⁵

Selain memiliki efek immunosupresi, flavonoid juga memiliki efek immunostimulasi. Terlihat dari hasil rata-rata diameter kelompok ekstrak etanol *C. lanatus* dosis 175 mg/kgbb (K-P1) dan kelompok ekstrak etanol *C. lanatus* dosis 350 mg/kgbb (K-P2) yang lebih tinggi dibanding kelompok lain, termasuk K-OVA. Hal ini dapat terjadi melalui mekanisme peningkatan IL-2 dan proliferasi limfosit. Penelitian Jiao *et al.* (2001) menyebutkan bahwa senyawa flavonoid pada daun dan batang *Astragalus membranaceus* dapat meningkatkan proliferasi limfosit dan meningkatkan aktivitas sel NK.²⁶

Kesimpulan dan Saran

Pemberian ekstrak etanol buah *Citrullus lanatus* dosis 700 mg/kgbb/hari mampu menurunkan diameter pulpa alba limpa mencit BALB/c yang diinduksi Ovalbumin secara signifikan sehingga berpotensi sebagai agen imunomodulator.

Penulis menyarankan untuk dilakukannya uji efektifitas ekstrak etanol *C. lanatus* lebih lanjut sehingga dapat dikembangkan menjadi fitofarmaka dan penelitian mengenai efek samping pemberian ekstrak etanol *C. lanatus*.

Daftar Rujukan

1. Buelow, B. 2015. Immediate Hypersensitivity Reactions. *Medscape* (<http://emedicine.medscape.com/article/136217-overview#showall>, diakses 9 April 2016).
2. Dourado, L. et al. 2010. Role of IL-4 in Aversion Induced by Food Allergy in Mice. *Elsevier Cellular Immunology*, 262: 62–68.
3. Garna, B. 2004. *Imunologi Dasar*. Edisi 4. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC. hlm. 8-27.
4. Zaidah, N. 2007. *Gambaran Histologi Limpa Mencit (Mus musculus) setelah Pemaparan Sinar Ultraviolet secara Kronis*. Skripsi. Yogyakarta: Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
5. Deshmukh, C.D., Jain, A., dan Tambe, M.S. 2015. Phytochemical and Pharmacological Profile of *Citrullus lanatus* (THUNB). *Biolife*, 3(2): 483-488.
6. Erianti, F., Marisa, D., dan Suhartono, E. 2015. Potensi Antiinflamasi Jus Buah Belimbing (*Averrhoa carambola L.*) terhadap Denaturasi Protein *In Vitro*. *Berkala Kedokteran*, 11(1): 33-39.
7. Suhirman, S. dan Winarti, C. 2010. Prospek dan Fungsi Tanaman Obat Sebagai Imunomodulator. Bogor: Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik & Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian.
8. Saputri, D.A. 2010. *Pengaruh Pemberian Steroid Dosis Rendah terhadap Hitung Neutrofil pada Sepsis Tahap Awal*. Skripsi. Surakarta: Universitas Sebelas Maret.
9. Kantham, S. 2009. Influence of *Carica papaya Linn* Extracts on Paracetamol and Thioacetamide Induced Hepatic Damage in Rats. *The Internet Journal of Pharmacology*, 9(1).
10. Subijanto, A.A. dan Diding, H.P. 2008. Pengaruh Minyak Biji Jinten Hitam (*Nigella Sativa L.*) terhadap Derajat Inflamasi Saluran Napas. *Majalah Kedokteran Indonesia*, 58(6): 200-204.
11. Meilandani, S. 2014. *Proliferasi Limfosit Pada Mencit BALB/c Setelah Pemberian Ekstrak Etanol Ubi Jalar Ungu (Ipomoea Batatas L.) Diinduksi Ovalbumin*. Naskah Publikasi. Yogyakarta: Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
12. Makiyah, S.N., Iszamriach, R., dan Nofariyandi, A. 2014. Paparan Ultraviolet C Meningkatkan Diameter Pulpa Alba Limpa dan Indeks Mitotik Epidermis Kulit Mencit. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 28(1): 17-21.
13. Anggarasari, Y. 2014. Pengaruh Pemaparan Karbofuran Terhadap Gambaran Diameter Pulpa Putih Limpa Mencit (*Mus musculus*). *Veterinaria Medika*, 7(2): 100-105.
14. Kartikawati, H. 2003. *Pengaruh Polifenol Teh Hijau Terhadap Respon Alergi pada Mencit BALB/c yang Disensitisasi Ovalbumin*. Tesis. Semarang: Universitas Diponegoro.
15. Prasetyo, D. 2007. Efek Pemaparan Ovalbumin Aerosol Terhadap Eosinofilia Bronkus pada Mencit BALB/c. *Nexus Medicus*. Surakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret. hlm. 9-13.
16. Baratawidjaja, K.G. 2009. *Imunologi Dasar*, Edisi Ke Sembilan. Jakarta: Balai Penerbit FKUI.
17. Abbas, A.K. dan Lichtman, A.H. 2009. *Basic Immunology*, Edisi Ketiga. Philadelphia, Pennsylvania: Saunders Elsevier.
18. Baratawidjaja, K.G. 2006. *Imunologi Dasar*, Edisi Ke Tujuh. Jakarta: Balai Penerbit FKUI. hlm. 6-33.
19. Cesta, M.F. 2006. Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen. *Toxicologic Pathology*, 34: 455–465.
20. Novia, A. 2015. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa (Mill.) Urb.*) secara Oral pada Mencit BALB/c terhadap Pencegahan Penurunan Jumlah Sel yang Tereksresi IFN- γ dan Peningkatan Jumlah Sel yang Tereksresi CD14. *Jurnal Biosains Pascasarjana UNAIR*, 17(3).
21. Sudir, J. 2007. Efek Kortikosteroid Terhadap Metabolisme Sel; Dasar Pertimbangan Sebagai Tujuan Terapi Pada Kondisi Akut Maupun Kronik. *Dexa Media*, 20(2):77-80.
22. Garcí'a-Lafuente, Guillamón, Villares, Rostagno, dan Martínez. 2009. Flavonoids as Anti-Inflammatory Agents: Implications in Cancer and Cardiovascular Disease. *Inflammation Research*, 58: 537-552.
23. Kim, H.P., Son, K.H., Chang, H.W., dan Kang, S.S. 2004. Antiinflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences*, 96: 229-245.

24. Rang, HP, Dale, M.,M., Ritter, J.,M., Flower, R.,J., 2007. *Rand and Dale's Pharmacology*. Seventh Edition. Churchill Livingstone.
25. Gupta, A., Caphalkar, S. 2016. Anti-inflammatory and immunosuppressive activities of flavonoids from medicinal plants. *J HerbMed Pharmacol*, 5(3): 120-124.
26. Jiao *et al.* 2001. Influence of Flavonoid of *Astragalus membranaceus*'s Stem and Leaf on The Function of Cell Mediated Immunity in Mice. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*, 7(2):117-120.