

**Aktivitas Imunomodulator Ekstrak Etanol Daun Kedondong
(*Spondias Pinnata*) (L.F) Kurz) terhadap Proliferasi Sel Limfosit Mencit Balb/C
beserta Uji Kandungan Flavonoid**

**Immunomodulatory Activity of Kedondong Leaf Ethanol Extract (*Spondias Pinnata*) (L.F) Kurz) against the Proliferation of Balb/C Mice Lymphocyte Cells
Along with Flavonoid Content Tests**

Muhammad Saiful Mu'min, Maria Ulfah*

Fakultas Farmasi, Universitas Wahid Hasyim, Semarang, Jawa Tengah, Indonesia

*Email Korespondensi: mariau_astra@yahoo.com

Abstrak

Paparan benda asing yang bersifat patogen secara terus menerus dapat menurunkan sistem imun, sehingga tubuh membutuhkan senyawa imunomodulator yang mengandung flavonoid. Flavonoid dapat meningkatkan proliferasi sel limfosit. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas imunomodulator ekstrak etanol daun kedondong terhadap proliferasi sel limfosit mencit galur balb/c yang diinduksi vaksin hepatitis B beserta uji kandungan flavonoid. Ekstrak daun kedondong diekstraksi secara maserasi dengan etanol 96%. Ekstrak diberikan secara p.o pada kelompok perlakuan dosis 5, 10 dan 20% kontrol positif levamisol 10,45 mg/20gram BB, kontrol dengan vaksin CMC-Na 0,5% dan kontrol normal selama 46 hari. Sel limfosit diisolasi dari limpa dan diuji proliferasi sel limfosit menggunakan MTT Assay. Identifikasi senyawa flavonoid ekstrak dengan pereaksi Mg dan HCL. Hasil Optical Density (OD) dianalisis statistik Kruskal-Wallis Test dilanjutkan Mann-Whitney taraf kepercayaan 95%. Sedangkan identifikasi kandungan kimia dibandingkan dengan pustaka acuan. Hasil analisis menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun kedondong memiliki aktivitas terhadap peningkatan proliferasi sel limfosit pada konsentrasi 10% dan mengandung senyawa flavonoid. Ekstrak etanol daun kedondong memiliki aktivitas imunomodulator dan mengandung senyawa flavonoid.

Kata Kunci: ekstrak etanol daun kedondong, imunomodulator, OD, flavonoid

Abstract

Continuous exposure to pathogenic foreign bodies can lower the immune system, so the body needs immunomodulatory compounds containing flavonoids. Flavonoids can increase lymphocyte cell proliferation. This study aims to determine the immunomodulatory activity of kedondong leaf ethanol extract against the proliferation of balb/c strain mice lymphocyte cells induced by hepatitis B vaccine along with flavonoid content tests. Kedondong leaf extract was extracted by maceration with 96% ethanol. The extract was administered on a p.o basis in the treatment group of doses 5, 10 and 20% positive control of levamisol 10.45 mg/20gram BB, control with CMC-Na vaccine 0.5% and normal control for 46 days. Lymphocyte cells were isolated from the spleen and tested for lymphocyte cell proliferation using MTT Assay. Identify flavonoid extract compounds with Mg and HCL reagents. Optical Density (OD) results analyzed by Kruskal-Wallis Test statistics followed by Mann-Whitney with a 95% confidence level. Meanwhile, the identification of chemical content is compared to the reference library. The results showed that kedondong leaf ethanol extract has activity against increasing lymphocyte cell proliferation at a concentration of 10% and contains flavonoid compounds. Kedondong leaf ethanol extract has immunomodulatory activity and contains flavonoid compounds.

Keywords: kedondong leaf ethanol extract, immunomodulators, OD, flavonoids

Received: 31 March 2023

Accepted: 09 September 2023

DOI: <https://doi.org/10.25026/jsk.v5iSE-1.2061>



Copyright (c) 2023, Jurnal Sains dan Kesehatan (J. Sains Kes.). Published by Faculty of Pharmacy, University of Mulawarman, Samarinda, Indonesia. This is an Open Access article under the CC-BY-NC License.

How to Cite:

Mu'min, M. S., Ulfah, M., 2023. Aktivitas Imunomodulator Ekstrak Etanol Daun Kedondong (*Spondias Pinnata*) (L.F) Kurz terhadap Proliferasi Sel Limfosit Mencit Balb/C beserta Uji Kandungan Flavonoid. *J. Sains Kes.*, 5(SE-1). 99-106. DOI: <https://doi.org/10.25026/jsk.v5iSE-1.2061>

1 Pendahuluan

Salah satu faktor menurunnya sistem imun akibat paparan benda asing berupa virus, bakteri dan mikroorganisme yang bersifat patogen. Untuk meningkatkan pertahanan dalam tubuh dibutuhkan suatu agen imunomodulator. Imunomodulator adalah bahan obat yang dapat mengembalikan ketidakseimbangan sistem imun [1].

Agen imunomodulator dapat berasal dari alam berupa tanaman yang mengandung senyawa flavonoid. Ekstrak etanol daun

kedondong memiliki kandungan kimia flavonoid, polifenol, tannin [2]. Flavonoid merupakan senyawa yang berpotensi sebagai imunomodulator [3].

Bahan alam yang diduga dapat meningkatkan sistem pertahanan tubuh yaitu salah satunya flavonoid karena mampu meningkatkan produksi IL-2 yang terlibat dalam aktivasi dan proliferasi sel limfosit [4]. Kandungan flavonoid seperti *quercetin* dan *epigallocatechin 3-gallate* (EGCG) dalam teh hitam dapat meningkatkan sistem pertahanan tubuh [5].

Pengobatan alami merupakan bahan kajian dan sumber penting untuk mendapatkan senyawa obat baru [6]. Penggunaan bahan alam sebagai obat secara umum dinilai lebih aman dari penggunaan obat kimia karena dianggap mempunyai efek samping yang rendah jika digunakan secara tepat [7].

Penelitian sebelumnya pada daun kedondong sebagai agen imunomodulator yaitu dapat meningkatkan fagositosis makrofag [8] dan meningkatkan antibodi IgG dan IgM [9]. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas imunomodulator ekstrak etanol daun kedondong (*spondias pinnata*) (l.f) kurz) terhadap proliferasi sel limfosit mencit balb/c beserta uji kandungan flavonoid.

2 Metode Penelitian

2.1 Preparasi ekstrak etanol daun kedondong

Serbuk simplisia daun kedondong sebanyak 2000 gram dibagi dalam 7 bejana masing-masing berisi 250 gram dilarutkan dengan cairan penyari etanol 96% sebanyak 15000 ml, ditutup dan direndam selama 3 hari dengan sesekali diaduk minimal sehari 3 kali. Setelah 3 hari, campuran simplisia dan etanol 96% diserkai sehingga diperoleh maserat I. Ampas serbuk daun kedondong dilarutkan dengan etanol 96% sebanyak 5000 ml, direndam kembali selama 2 hari dengan sesekali diaduk. Setelah 2 hari, campuran ampas dan etanol 96% diserkai kembali sehingga diperoleh maserat II. Maserat I dan II kemudian dicampur dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu < 50°C sampai diperoleh ekstrak kental etanol.

2.2 Uji Kandungan Kimia flavonoid

Ekstrak daun kedondong sebanyak 2 ml dilarutkan dalam 2 ml metanol, kemudian ditambahkan serbuk Mg dan HCl pekat sebanyak 5 tetes. Adanya senyawa flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah atau jingga [10].

2.3 Uji Aktivitas Imunomodulator

2.3.1 Penyiapan Larutan Uji

- a) CMC-Na 0,5% ditimbang 0,5gram dilarutkan dengan air panas 100 mL diaduk sampai

homogen. Larutan CMC-Na 0,5% digunakan untuk suspensi ekstrak etanol daun kedondong.

- b) Ekstrak etanol daun kedondong yang digunakan adalah konsentrasi 5%, 10% dan 20%. yang dilarutkan dengan larutan CMC-Na 0,5%.

- c) Vaksin Hepatitis B (engerix)

Vaksin pertama dilakukan pada hari ke-7 setelah dilakukan perlakuan dan vaksin kedua dilakukan pada hari ke-28 diberi secara intraperitoneal dengan dosis 0,05 mcg/20 gBB dengan volume pemberian 0,3 ml.

- d) Levamisol

Penelitian ini menggunakan levamisol stok 25 mg. Dosis levamisol untuk mencit dengan dosis 0,7ml/0,45mg/20g BB/hari secara peroral. Pembuatan larutan levamisol dilakukan dengan cara tablet levamisol dihaluskan kemudian ditimbang dan dilarutkan dengan CMC-Na [11].

2.3.2 Perlakuan hewan uji

Perlakuan hewan uji selama 46 hari dibagi menjadi 6 kelompok yaitu kelompok kontrol normal, mencit mendapat makan dan minum tanpa induksi vaksin hepatitis B; kontrol dengan vaksin mencit mendapat CMC-Na 0,5% secara peroral dan diinduksi vaksin hepatitis B dengan dosis 0,052 mcg/20 gram BB secara intraperitoneal; kelompok kontrol positif, mencit mendapat levamisol hidroklorida dengan dosis 0,45mg/20gram BB secara peroral dan diinduksi vaksin hepatitis B dengan dosis 0,052 mcg/20 gram BB secara intraperitoneal serta kelompok perlakuan ekstrak etanol daun kedondong dengan dosis 5%, 10% dan 20% secara peroral dan diinduksi vaksin hepatitis B dengan dosis 0,052 mcg /20 gram BB secara intraperitoneal.

2.3.3 Isolasi Organ Limfosit

Isolasi sel limfosit diperoleh dari organ limpa mencit galur Balb/C. Isolasi dilakukan secara aseptis dari mencit galur Balb/C. Mencit dikorbankan dengan kloroform, diletakkan telentang pada papan bedah yang telah dibasahi dengan etanol 70% dan kemudian kulit dibersihkan dengan etanol 70%. Kulit bagian perut dibuka dengan menggunakan gunting dan pinset. Organ limpa diangkat dan diletakkan dalam cawan petri yang berisi PBS. Limpa dicuci

dengan PBS sebanyak tiga kali. Media RPMI sebanyak 10 ml dipompakan ke dalam limpa sehingga limfosit ikut keluar bersama media. Suspensi sel dimasukkan dalam tabung sentrifugasi 15 mL dan disentrifus pada 1200 rpm selama 10 menit. Pellet yang didapat disuspensikan dalam 1 mL ammonium klorida untuk melisiskan eritrosit. Sel dicampur hingga homogen dan disentrifugasi pada 1200 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan sel limfosit disuspensikan dalam medium RPMI komplit 1 ml. Sel dihitung menggunakan hemositometer dan diresuspensikan lagi dengan medium RPMI komplit sehingga diperoleh suspensi sel dengan kepadatan $1,5 \times 10^6/\text{mL}$ [12].

2.3.4 Uji Proliferasi Limfosit dengan Metode MTT Assay

Sel limfosit ($1,5 \times 10^6$ sel/mL) sebanyak 100 μL didistribusikan ke dalam sumuran *microplate* 96-wellsPlate dan diinkubasi selama 48 jam dalam inkubator dengan aliran 5% CO_2 pada suhu 37°C . Setelah diinkubasi ditambahkan 50 μL larutan 5mg/mL MTT pada tiap sumuran. Kultur kemudian diinkubasi kembali selama 4 jam pada suhu 37°C . Reaksi dihentikan dengan menambahkan 50 μL reagen *stopper* yaitu larutan 10% SDS dalam asam klorida (HCl) 0,01N. Inkubasi dilanjutkan selama 24 jam pada suhu ruang kemudian dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 550 nm [12].

2.4 Analisis Data

Data *Optical Density* (OD) dianalisis menggunakan statistik non parametrik *Kruskal Wallis Test* dilanjutkan uji beda berupa *Mann Whitney Test* dengan taraf kepercayaan 95%. Berdasarkan hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa semakin besar nilai OD, maka semakin besar aktivitas proliferasi sel limfosit. Sedangkan uji senyawa flavonoid diidentifikasi secara deskriptif dibandingkan dengan acuan [13].

3 Hasil dan Pembahasan

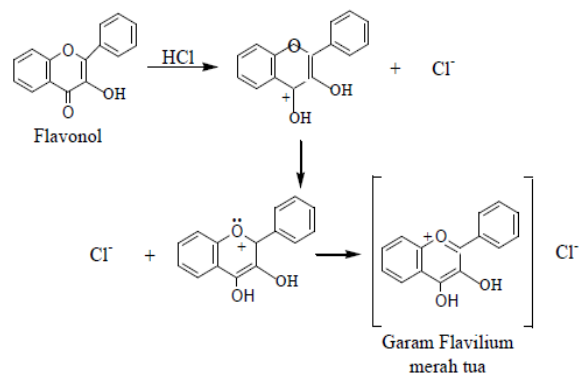
3.1 Preparasi ekstrak etanol daun kedondong

Ekstraksi daun kedondong menggunakan metode maserasi. Metode ini dipilih untuk

menjaga senyawa aktif dari kerusakan akibat pemanasan. Larutan penyari yang digunakan adalah etanol 96%. Pelarut ini dipilih karena etanol 96% merupakan pelarut universal yang mampu menyari senyawa dari yang bersifat polar, semi polar hingga senyawa non polar seperti flavonoid [14]. Selain itu kandungan terbesar flavonoid dalam ekstrak terdapat pada ekstrak etanol dengan kadar 80,82% [15]. Hasil rendemen ekstrak etanol daun kedondong yang diperoleh sebesar 24,32 %.

3.2 Uji Kandungan Kimia flavonoid

Uji kandungan kimia ekstrak etanol daun kedondong bertujuan untuk mengetahui adanya golongan senyawa flavonoid. Hasil uji flavonoid dengan penambahan pereaksi Logam Mg dan HCl pekat akan membentuk warna jingga yang menandakan positif karena terbentuknya garam flavilium yang berwarna merah atau jingga [13]. Hal ini menandakan bahwa ekstrak daun kedondong mengandung flavonoid. Reaksi flavonoid dengan Logam Mg dan HCl pekat dapat dilihat Pada Gambar 1.

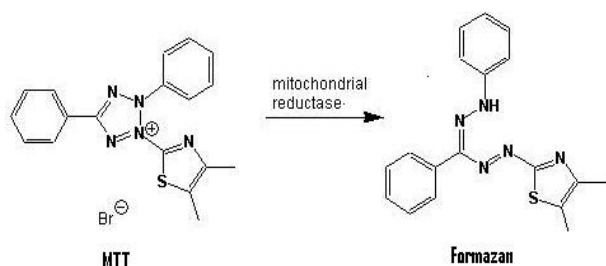


Gambar 1. Reaksi Pembentukan Garam Flavilium [13]

3.3 Uji Proliferasi Limfosit dengan Metode MTT Assay

Pengujian aktivitas imunomodulator sampel uji terhadap proliferasi sel limfosit dilakukan dengan menggunakan metode MTT Assay. Uji MTT assay memiliki kelebihan yaitu relatif cepat, sensitif, akurat dan dapat digunakan untuk mengukur sampel dalam

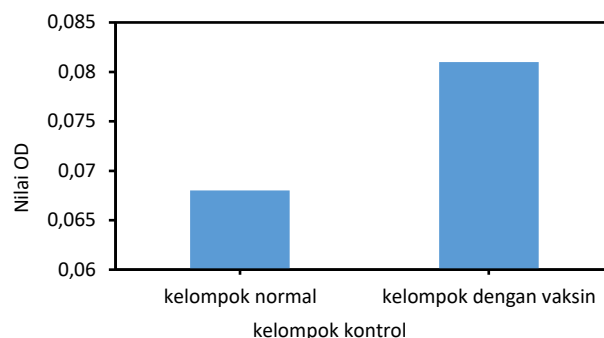
jumlah besar. Pengukuran aktivitas proliferasi sel limfosit dilakukan dengan menggunakan ELISA reader. Nilai OD yang dihasilkan dapat menunjukkan besarnya aktivitas proliferasi sel limfosit. Semakin besar nilai OD, maka semakin besar juga aktivitas proliferasi sel limfosit. Prinsip uji MTT berdasarkan pada perubahan garam tetrazolium [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide] (MTT) yang berwarna kuning menjadi formazan dalam mitokondria yang aktif pada sel hidup yang berwarna ungu. Kristal formazan yang berwarna ungu dapat larut sehingga dapat dibaca secara spektrofotometri visible pada panjang gelombang 550 nm. Jumlah kristal formazan yang terbentuk berbanding lurus dengan jumlah sel yang hidup. Semakin tinggi absorbansi yang dihasilkan maka semakin tinggi pula jumlah sel hidup yang terdapat di dalam kultur tersebut [16]. Mekanismenya reaksi MTT assay pada gambar 2.



Gambar 2. Mekanismenya reaksi MTT

Aktivitas imunomodulator dilihat dari pengaruh perbedaan seri konsentrasi dosis terhadap nilai OD. Ketika nilai OD kelompok konsentrasi sampel uji lebih tinggi secara statistik dari kelompok kontrol dengan vaksin, maka dapat dikatakan sampel uji yang memiliki aktivitas. Sebagai pembanding standar meningkatkan proliferasi sel limfosit adalah *Levamisol*. Levamisol merupakan salah satu senyawa yang poten untuk proliferasi sel limfosit, sehingga digunakan sebagai kontrol positif. Konsentrasi optimal levamisol sebagai mitogen dengan dosis 0,7ml/0,45mg/20gr BB/hari secara peroral. Hasil analisa data pada penelitian ini, berdasarkan data nilai OD pada seluruh kelompok perlakuan dan dilanjutkan

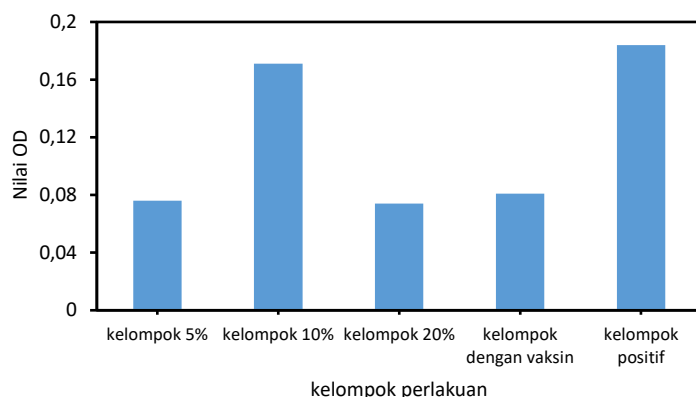
dengan uji *Mann-whitney* dengan taraf kepercayaan 95% antar kelompok dosis perlakuan dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Rata-rata Nilai OD Limfosit Kelompok Normal dan Kelompok Dengan Vaksin

Berdasarkan gambar 3 hasil analisa kelompok normal dengan rata-rata nilai OD ± 0.068 terhadap kelompok dengan vaksin yaitu dengan rata-rata nilai OD ± 0.081 memberikan hasil berbeda bermakna yang artinya walaupun memberikan hasil berbeda berbeda bermakna. Konsentrasi optimal dari pemberian sampel uji dalam meningkatkan proliferasi sel limfosit didapatkan pada kelompok perlakuan 10%. Konsentrasi optimal dapat ditentukan dengan melihat konsentrasi dimana sampel uji memberikan aktivitas tertinggi, yang kemudian pada pemberian beberapa konsentrasi lebih tinggi terjadi penurunan aktivitas imunostimulator terhadap proliferasi sel limfosit [18]. Kelompok perlakuan 5% dan 20% belum memberikan hasil yang optimal, sehingga perlu dilakukan uji toksisitas dari kelompok tersebut agar diperoleh konsentrasi ekstrak etanol daun kedondong yang menyebabkan toksisitas. Flavonoid dapat meningkatkan proliferasi sel limfosit karena mampu meningkatkan produksi IL-2. IL-2 memiliki peranan besar dalam mengaktivasi sel limfosit T untuk berproliferasi. Proliferasi sel limfosit T yang dirangsang oleh antigen, diatur oleh ikatan antara IL-2 dengan reseptornya. Selain itu, IL-2 juga merangsang proliferasi dan diferensiasi sel limfosit B dan Natural Killer (NK) [19]. Senyawa caffeic acid dan flavonoid yang merupakan bagian polifenol dari tumbuhan *Ocimum basilicum* (Linn.) mampu meningkatkan

produksi IL-2, sehingga dapat menstimulasi proliferasi sel limfosit [4]. Hasil uji *Mann-Whitney* terhadap nilai OD kelompok konsentrasi terhadap kelompok kontrol ekstrak etanol daun kedondong pada waktu inkubasi 48 jam dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 4. Rata-rata Nilai OD Limfosit kelompok perlakuan terhadap kelompok dengan vaksin dan kelompok positif

Berdasarkan gambar 4 nilai rata-rata OD dan terlihat bahwa pemberian sampel uji memberikan hasil peningkatan terhadap proliferasi sel limfosit pada kelompok perlakuan 10% dengan rata-rata nilai OD ± 0.171 , kelompok 5% dengan nilai rata-rata ± 0.076 dan kelompok 20% dengan rata-rata nilai OD ± 0.074 . Analisa secara statistik terhadap nilai OD didapatkan hasil bahwa konsentrasi 10% memiliki aktivitas proliferasi sel limfosit dan dilihat terhadap kelompok kontrol positif menunjukkan hasil hampir sama, sedangkan kelompok perlakuan 5% dan 20% tidak memiliki aktivitas proliferasi sel limfosit. Senyawa flavonoid dapat meningkatkan aktivitas IL-2 dan proliferasi limfosit [20]. Proliferasi limfosit akan mempengaruhi sel CD4+, kemudian menyebabkan sel Th1 teraktivasi. Sel Th1 yang teraktivasi akan mempengaruhi proliferasi sel limfosit. Senyawa Flavonoid dapat meningkatkan proliferasi sel limfosit karena mampu meningkatkan produksi IL-2. IL-2 memiliki peranan besar dalam mengaktivasi sel limfosit T untuk berproliferasi. Proliferasi sel limfosit T yang dirangsang oleh antigen, diatur oleh ikatan antara IL-2 dengan reseptornya. Selain itu, IL-2 juga merangsang

proliferasi dan diferensiasi sel limfosit B dan Natural Killer (NK) [19].

Mekanisme terjadinya proliferasi sel limfosit secara umum, yaitu ketika suatu antigen berikatan dengan permukaan sel T dan sel B, bersama dengan interleukin-1 (IL-1) dari *Antigen Presenting Cell* (APC) dapat mengaktivasi G-protein yang kemudian memproduksi fosfolipase C. Enzim ini menghidrolisis fosfatidil inositol bifosfat (PIP₂) menjadi diasil gliserol (DAG) dan inositol trifosfat (IP₃). Reaksi tersebut berlangsung dalam membran plasma. DAG mengaktivasi secara langsung protein kinase C dengan cara memfosforilasi residu asam amino (serin atau treonin) pada sel target. IP₃ kemudian menstimulasi pelepasan Ca²⁺ ke dalam sitoplasma sehingga konsentrasi Ca²⁺ meningkat. Peningkatan Ca²⁺ ini berperan penting dalam menstimulasi kerja enzim protein kinase C dan 5-lipoxygenase. Protein kinase C menstimulasi produksi interleukin-2 (IL-2). IL-2 ini kemudian mengaktivasi proliferasi sel limfosit [21]. Senyawa flavonoid selain mempunyai efek imunostimulan juga memiliki efek immunosupresan [22]. Adanya efek sitotoksik dan immunosupresan memungkinkan terjadinya hambatan terhadap proliferasi limfosit pada batas dosis tertentu. Hal ini yang mungkin menyebabkan tidak adanya perbedaan jumlah limfosit yang bermakna antara kelompok perlakuan yang diberi ekstrak etanol daun kedondong dan kemungkinan kedua dari hewan uji yang digunakan sudah toksik selama perlakuan sehingga hanya kelompok perlakuan 10% yang memberikan hasil yang optimal.

4 Kesimpulan

Ekstrak etanol daun kedondong (*Spondias Pinnata* (L.F) Kurz) memiliki aktivitas imunomodulator terhadap proliferasi sel limfosit mencit galur Balb/C yang diinduksi vaksin hepatitis B pada konsentrasi 10% dan mengandung senyawa flavonoid.

5 Ucapan Terima Kasih

Terimakasih kepada Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim untuk fasilitas laboratorium.

6 Pernyataan

6.1 Penyandang Dana

Penelitian ini tidak mendapatkan pendanaan dari sumber manapun.

6.2 Konflik Kepentingan

Tidak ada konflik kepentingan.

6.3 Etik

Ethical Clearance No. 221/VIII/2017 dari Komisi Bioetik Penelitian Kedokteran/Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

7 Daftar Pustaka

- [1] Baratawidjaja dan Rengganis, 2010, *Imunologi Dasar*, Edisi Kedelapan, Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- [2] Fitriani, S, Raharjo & Guntur T, 2013, Aktivitas antifungi ekstrak daun Kedondong (*Spondias pinnata*) dalam menghambat pertumbuhan *Aspergillus flavus*, *LenteraBio*, vol. hal. 125-129
- [3] Sternberg, Z., Chadha, K., Lieberman, A., Drake, A., Hojnacki, D., Weinstock-Guttman, B., and Munschauer, F., 2009, Immunomodulatory Responses of Peripheral Blood Mononuclearcells from Multiple Sclerosis Patients Upon In Vitro Incubation Withthe Flavonoid Luteolin: Additive Effects of IFN- β , *Journal of Neuroinflammation*, 5.
- [4] Tsai, K.D., Lin, B.R., Perng, D.S., Wei, J.C., Yu, Y.W., and Ming Cherng, J., 2011, Immunomodulatory effects of aqueous extract of *Ocimum basilicum* (Linn.) and some of its constituents on human immune cells, *Journal of Medicinal Plants Research*, Vol 5(10), 1873-1883.
- [5] Neiman, D.C., Henson, U.A., Maxwell, K.R., Williams, S.R.M., Mcanulty, S.R., Jin, F., Shanely, R.A., & Lines, T.C., (2009), Effects of Quercetin and EGCG on Mitochondrial Biogenesis and Immunity, *Medicine & Science In Sports and Exercise*, Vol 9, 1467-1475
- [6] Wagner, H., and Bladt, S., 1995, *Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas*, Second Edition, 196-197, Springer, German.
- [7] Sari, K., 2006, Pemanfaatan Obat Tradisional dengan Pertimbangan Manfaat dan Keamanannya, *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 3, No.1, 01-7.
- [8] Dempo Awang, 2018, Uji Aktivitas Imunomodulator Ekstrak Etanol Daun Kedondong (*Spondias Pinnata*) (L.F) Kurz Terhadap Fagositosis Makrofag Mencit Balb/C Yang Diinduksi Vaksin Hepatitis B, *Skripsi*, Universitas Wahid Hasyim Semarang.
- [9] Maria ulfah, dkk., 2018, Aktivitas Ekstrak Etanol Daun Kedondong (*Spondias Pinnata* (L.F)Kurz.) Terhadap Antibody IgG Dan IgM Pada Mencit Balb/C Yang Diinduksi Vaksin Hepatitis B, Fakultas Farmasi, Univesitas Wahid Hasyim Semarang
- [10] Markham, K.R., 1988, *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro, 3, 20, 47, ITB, Bandung
- [11] Edianti Sasmito., Sri Mulyaningsih., Eka Katika Untari., Dan Ratna Widyningrum, 2006, Aktivitas imunostimulan susu kedelai terhadapimunoglobulin (IgG, IgA) dan proliferasi sellimfosit pada mencit Balb/c yang diinduksi hepatitis A. Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada dan FMII, UII, Yogyakarta.
- [12] Hertiani, T., Sasmito E., Sumardi, dan Ulfah, M., 2010, Preliminary Study on Immunomodulatory Effect of Sarang-Semut Tubers *Mymecodiatuberosa* and *Mymercodiapendens*, *Online Journal of Biological Sciences*, 10 (3), 136-141.
- [13] Harborne, J.B., 1987, Metode Fitokimia Edisi Kedua, ITB, Bandung, Hal:7-8
- [14] Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur G., and Kaur, H., 2011, Phytochemical Screening and Extraction: A Review, *International Pharmaceutica Sciencia*, Vol I Issue I, 101-103.
- [15] Das, J., Mannan, A., Rahman, M.M., Dinar, A.M., Uddin, M.E., Khan, I.N., Habib, M.R., and Hasan, N., 2011, Chloroform and Ethanol Extract of *Spondias pinnata* and its Different Pharmacological activity Like-Antioxidant, Cytotoxic, Antibacterial Potential and Phytochemical Screening through In-Vitro Method, *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Science*, 2 (4).
- [16] Mosmann, T., 1983, Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival; *Aplication* to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *Journal of Immunologycal Methods*, 65, 55-63.
- [17] Brescia, P. & Banks, P., 2009. *Quantifying Cytotoxicity of Thiostrepton on Mesothelioma Cells Using MT Assay and The Epoch™ Microplate Spectrophotometer*.
- [18] Herbert, T.B., Coriell, M., and Cohen, S., 1994, Analysis of Lymphocyte Proliferation Data: Do Different Approaches Yield the Same Results, *Brain Behavior Immunity*, 8, 153-162.
- [19] Baratawidjaja dan Rengganis, 2012, *Imunologi Dasar*, Edisi ke-10, Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, 29-97, 526.

- [20] Jiao Y, Wen J, Yux. *Influence of flavanoid of Astragalus membranaceus's stem and leaves on the function of cell mediated immunity in mice.* Available at: URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Accessed Juny 20, 2003
- [21] Roitt, I.M., 1997, *Roitt's Essential Immunology*, Ninth Edition, 169, University College London Medical School, London.
- [22] Middleton, E., Kandaswami C., dan Theoharides T.C. 2000. The Effect of Plant *Flavonoids* on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease and Cancer. *Pharmacological Reviews*, 52 (4):673-751