

The immunomodulatory activity of ethanol extract of attarasa bark and fruit (*Litsea cubeba* (Lour.) Pers.) toward carbon clearance of mice (*Mus musculus*)

Aktivitas imunomodulator ekstrak etanol kulit batang dan buah attarasa (*Litsea cubeba* (Lour.) Pers.) terhadap klirens karbon mencit (*Mus musculus*)

Vivi Asfianti^{1*}, Alfi Sapitri¹, Eva Diansari Marbun¹

¹Fakultas Farmasi dan Ilmu Kesehatan, Universitas Sari Mutiara Indonesia, Medan, Indonesia

*Corresponding author: vivi.asfianti@yahoo.com

Abstract

Background: Attarasa (*L.a cubeba* (Lour.) Pers.) is a potential Indonesian medicinal plant that is used as a cold remedy, head ulcers, antimicrobials, antioxidants, and anticancer drugs.

Objective: This research was conducted to analyze the immunomodulatory effect of bark (EEKBA) and fruit of attarasa ethanolic extract (EEBA) by detecting its phagocytosis activity in male mice using carbon clearance method.

Method: Total of 24 male mice were divided into 6 groups. Extract was orally administered to mice for 7 days at the dose of 100 mg/kg BW, 200 mg/kg BW, and 400 mg/kg BW. Imboost[®] suspension at the dose of 32.5 mg/kg BW and CMC-Na 1 % suspension was orally administered in positive control, negative control and normal groups. On the 8th day, 0.1 ml carbon suspension was given through intravenous tail injection. The blood samples were withdrawn at 5, 10, 15, and 20 minutes after injection of carbon suspension to find out the carbon absorbance contained in the blood that was measured using spectrophotometer then the carbon elimination speed, phagocytic index, and the stimulation index has been calculated

Result: EEKBA and EEBA at the dose of 400 mg/kg BW induced the higher carbon elimination rate in mice compared to EEKBA and EEBA dose of 100 and 200 mg/kg BW. Phagocytic index of macrophage in mice given with EEKBA and EEBA at dose of 100, 200, dan 400 mg/kg BW were 3.429, 3.501, and 3.925 for EEKBA consecutively; 4.289, 4.375 and 4.732 for EEBA respectively. Stimulation index of macrophage in mice given with EEKBA and EEBA at dose of 100, 200, and 400 mg/kg BW were 1.00; 1.20, 1.02; 1.23, and 1.13; 1.33. Based on the results of statistical test, EEKBA and EEBA administration at the dose of 100, 200, and 400 mg/kg BW stimulate the phagocytosis activity of the macrophage of male mice and significantly has different result compared to normal control group ($p < 0.05$). Phagocytosis activity was best shown at the mice group that administered EEKBA and EEBA at dose of 400 mg/kg BW and was shown not significantly different compared to positive control group ($p > 0.05$).

Conclusion: EEKBA and EEBA have immunomodulatory effect by increasing the phagocytosis activity of mice.

Keywords: immunomodulatory, *Litsea cubeba*, carbon clearance, phagocytosis activity

Intisari

Latar belakang: Attarasa (*Litsea cubeba* (Lour.) Pers.) merupakan tumbuhan obat potensial Indonesia yang digunakan sebagai obat flu, borok dikepala, antimikroba, antioksidan dan antikanker.

Tujuan: Penelitian ini dilakukan untuk dapat mengamati efek imunomodulator Ekstrak Etanol Kulit Batang (EEKBA) dan Ekstrak Etanol Buah Attarasa (EEBA) terhadap aktivitas fagositosis pada mencit jantan dengan menggunakan metode *carbon clearance*.

Metode: Sebanyak 24 ekor mencit jantan dibagi menjadi 6 kelompok. Ekstrak diberikan secara per oral selama 7 hari pada mencit jantan dengan dosis 100, 200, dan 400 mg/kg BB. Suspensi imboost[®] dengan dosis 32,5 mg/kg BB, suspensi CMC-Na 1% diberikan pada kelompok kontrol positif, negatif, dan normal. Pada hari ke-8 disuntikkan suspensi karbon 0,1 ml secara intravena di ekor mencit. Sampel darah dikumpulkan pada menit ke-5, 10, 15, dan 20 setelah diinjeksi dengan suspensi karbon untuk mengetahui

absorbansi karbon dalam darah yang diukur menggunakan spektrofotometer kemudian dihitung kecepatan eliminasi karbon, indeks fagositosis, dan indeks stimulasinya.

Hasil: EEKBA and EEBA dosis 400 mg/kg BB menghasilkan kecepatan eliminasi karbon yang paling tinggi dibandingkan dengan EEAB dan EEAF 100 dan 200 mg/kg BB. Indeks fagositosis yang dihasilkan dari pemecahan EEKBA and EEBA dosis 100, 200, dan 400 mg/kg BB terhadap hewan uji yaitu 3,429; 4,289; 3,501; 4,375 dan 3,925; 4,732. Indeks stimulasi makrofag yang diperoleh setelah hewan uji dipejani dengan EEKBA and EEBA dosis 100, 200, dan 400 mg/kg BB yaitu 1,00; 1,20, 1,02; 1,23, dan 1,13; 1,33. Berdasarkan hasil uji statistik, pemberian EEKBA and EEBA pada dosis 100, 200, dan 400 mg/kg BB dapat meningkatkan aktivitas fagositosis pada mencit jantan dan terdapat perbedaan yang signifikan dengan CMC-Na 1% dan kelompok normal ($p < 0,05$). Aktivitas fagositosis yang paling baik ditemukan pada pemberian EEKBA and EEBA dengan dosis 400 mg/kg BB dengan perbedaan yang tidak signifikan terhadap kelompok hewan uji yang diberi Imboost® ($p > 0,05$).

Kesimpulan: EEKBA and EEBA mempunyai efek imunomodulator dengan meningkatkan aktivitas fagositosis pada mencit jantan

Kata kunci: imunomodulator, *Litsea cubeba*, carbon clearance, aktivitas fagositosis.

1. Pendahuluan

Tubuh manusia telah dilengkapi dengan sistem pertahanan yang sangat kompleks untuk menjaganya agar tetap sehat, yang dikenal dengan istilah imun. Imunitas dapat didefinisikan sebagai pertahanan terhadap penyakit, utamanya penyakit yang disebabkan karena infeksi. Sementara itu, sistem imun adalah gabungan antara sel, jaringan, dan molekul yang memerantai pertahanan terhadap infeksi (Sasmito, 2017).

Sediaan farmasi yang memiliki aktivitas sebagai imunomodulator menjadi sangat populer di lingkup industri obat bahan alam ketika masyarakat menyadari peran penting sistem imun dalam mencegah dan membantu pemulihan penyakit infeksi serta memelihara kesehatan (Sasmito, 2017). Namun demikian penggunaan imunomodulator dalam terapi dapat mengalami hambatan, salah satunya adalah mahalnya imunomodulator yang tersedia di pasar obat dalam bentuk paten dan mayoritas diimpor dari luar negeri. Dalam keadaan demikian, sangatlah perlu dipertimbangkan untuk memperoleh imunomodulator dari bahan alam agar faktor harga dapat ditekan (Rahman, dkk, 2016).

Tanaman attarasa adalah penghasil minyak atsiri yang bernilai ekonomis tinggi. Minyak atsiri attarasa dimanfaatkan sebagai bahan baku untuk kosmetika, sabun, minyak wangi, aromaterapi dan obat-obatan. Namun, kandungan minyak atsiri yang terbanyak terdapat pada kulit batang dibandingkan buahnya. Kulit batang attarasa mengandung saponin, flavonoid dan tanin (Kurniaty, dkk, 2014). Salah satu senyawa yang berpotensi sebagai agen imunomodulator adalah flavonoid. Kandungan senyawa antioksidan ekstrak etanol kulit batang dan buah attarasa berpotensi menghasilkan efek imunomodulator (Azizah, dkk, 2017).

Metode bersihan karbon (*carbon clearance*) merupakan pengukuran secara

spektrofotometri laju eliminasi partikel karbon dari darah hewan. Metode ini dapat merepresentasikan aktivitas fagositosis (Linsentia, 2011).

2. Metode

2.1. Bahan dan alat

Dalam penelitian ini beberapa bahan yang digunakan antara lain: kulit batang dan buah attarasa, etanol p.a (Merck), akuades, tinta cina merk pelican B-17, CMC-Na, tablet imboost® (Soho), natrium sitrat 1%, asam asetat 1%, larutan NaCl 0,9%.

2.2 Identifikasi tumbuhan attarasa dan pembuatan ekstrak etanol kulit batang dan buah attarasa

Sebelum proses ekstraksi dilakukan determinasi tanaman di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Cibinong Science Center, Jl. Raya Jakarta – Bogor KM.46 Cibinong 16911. Ekstraksi dilakukan dengan maserasi. Sebanyak 500 gram serbuk simplisia dimasukkan ke dalam sebuah bejana, ditambahkan dengan 3750 etanol, kemudian ditutup dan dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil dilakukan pengadukan beberapa kali. Setelah selesai maserasi, maserat dipisahkan dengan ampas. Dilakukan remaserasi kembali selama 2 hari. Maserat yang dihasilkan kemudian dikumpulkan dan diuapkan hingga dihasilkan ekstrak (Ditjen POM, 2000).

2.3 Pembuatan suspensi karbon

Pembuatan suspensi karbon dilakukan dengan cara mensuspensikan 1,6 mL tinta cina pelican B-17 ke dalam 8,4 mL suspensi CMC Na 1% dalam larutan fisiologis NaCl 0,9% (Faradilla dan Maria, 2014).

2.4 Pembuatan suspensi ekstrak etanol kulit batang dan buah attarasa

Sebanyak 1 gram ekstrak etanol kulit batang attarasa ditambahkan sedikit demi sedikit suspensi CMC Na 1% hingga homogen. Setelah homogen, larutan dituangkan dalam labu ukur 100 mL dan dicukupkan dengan suspensi CMC Na 1% hingga garis tanda hingga diperoleh konsentrasi ekstrak etanol kulit batang attarasa 1% (Tambusai, 2018).

2.5 Pengujian efek imunomodulator metode klirens karbon

Uji efek imunomodulator ekstrak etanol kulit batang dan buah Attarasa ditentukan menggunakan metode bersihan karbon dengan mengukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Sejumlah 36 ekor mencit dibagi menjadi 9 kelompok dosis dengan rincian pemejanannya secara peroral satu kali sehari selama 7 hari sebagai berikut:

- Kelompok 1 : tanpa pemejanan
- Kelompok 2 : suspensi CMC-Na 1%
- Kelompok 3 : Imboost® dosis 32,5 mg/kg bb

Kelompok 4	: EEKBA dosis 100 mg/kg bb
Kelompok 5	: EEKBA dosis 200 mg/kg bb
Kelompok 6	: EEKBA dosis 400 mg/kg bb
Kelompok 7	: EEBA dosis 100 mg/kg bb
Kelompok 8	: EEBA dosis 200 mg/kg bb
Kelompok 9	: EEBA dosis 400 mg/kg bb

Pada hari ke-8 setelah 7 hari pemberian suspensi sampel pada masing-masing kelompok, ujung ekor mencit dipotong kemudian darah ditampung dalam tabung yang telah diisi dengan Na-sitrat. Sebanyak 10 µl darah ditambahkan 4 mL asam asetat 1% untuk meliliskan sel darah merah kemudian diukur absorbansinya pada 632 nm menggunakan spektrofotometer. Sampel darah yang pertama kali diambil (menit ke-0) digunakan sebagai blanko. Sebesar 0,1 mL suspensi karbon disuntikkan secara intravena melalui pembuluh darah ekor, dan pada menit ke-5, 10, 15 dan 20 setelah penyuntikan karbon, darah kembali ditampung kemudian dilakukan langkah yang sama seperti pada blanko. Setelah 12 jam diambil darahnya, kemudian hati dan limfa dicatat beratnya (Aldi, dkk., 2013). Setelah pengambilan darah pada ujung ekor mencit tersebut dihitung konstanta kecepatan eliminasi karbon (K), indeks fagositosis (α) dan indeks stimulasi dengan menggunakan rumus:

$$\text{Konstanta kecepatan eliminasi karbon (K)} = \frac{\log OD_5 - \log OD_{20}}{T_2 - T_1}$$

$$\text{Indeks fagositosis} = \frac{k_3^1 \times \text{berat hewan}}{\text{berahati} + \text{berat limfa}}$$

$$\text{Indeks stimulasi} = \frac{\text{indeks fagositosis kelompok uji}}{\text{indeks fagositosis kelompok kontrol}}$$

Keterangan:

OD₅ = absorbansi pada menit ke 5

OD₂₀ = absorbansi pada menit ke 20

T₁ = waktu pertama pengambilan darah

T₂ = waktu terakhir pengambilan darah

= Indeks fagositosis dan indeks stimulasi dari tiap kelompok uji dibandingkan dengan kelompok kontrol (Kala *et al.*, 2015)

3. Hasil dan pembahasan

3.1. Hasil ekstraksi kulit batang dan buah attarasa menggunakan pelarut etanol p.a dengan cara maserasi

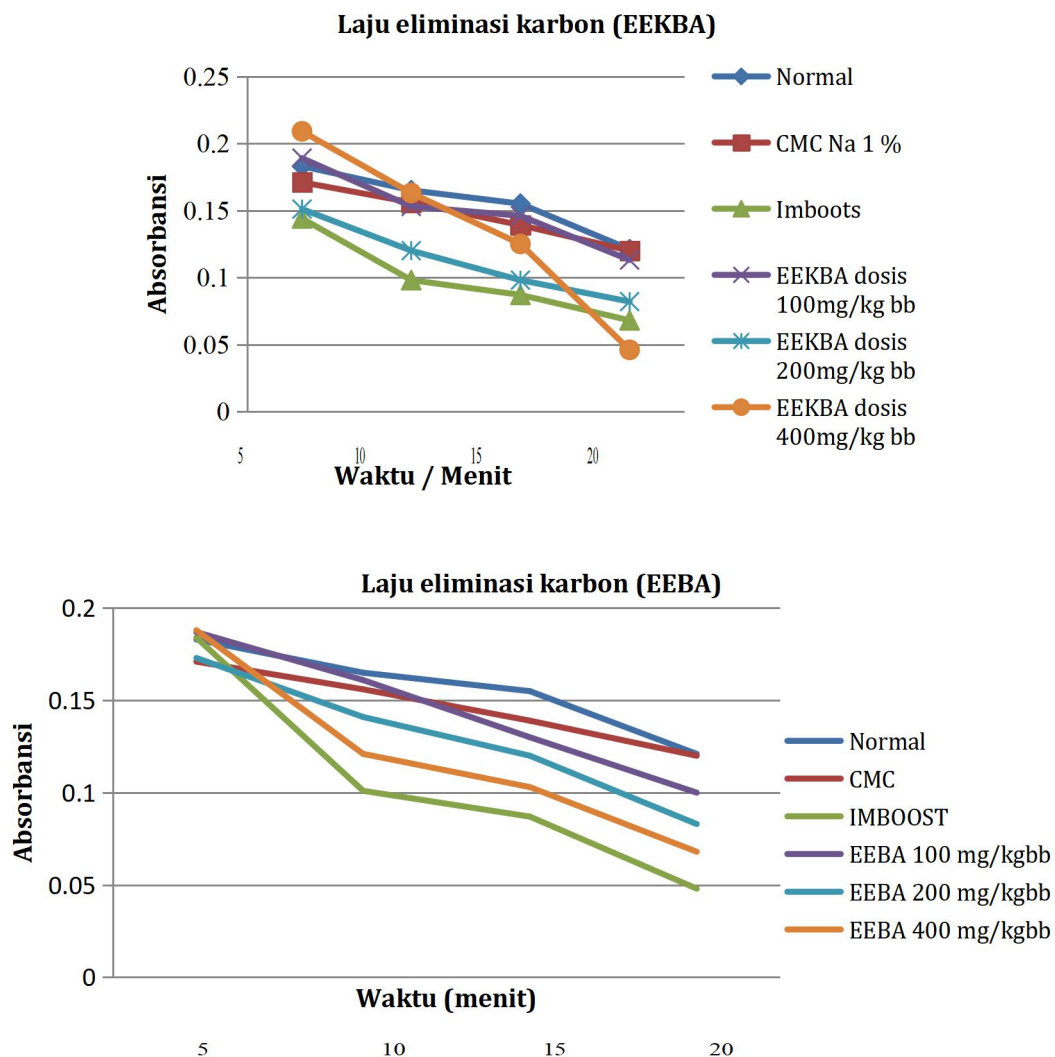
Hasil determinasi menyatakan spesies yang digunakan adalah *L. cubeba* (Lour) Pers.

Hasil penyarian serbuk simplisia kulit batang attarasa diperoleh ekstrak kental sebanyak 140 gram. Ekstraksi serbuk simplisia buah attarasa menghasilkan ekstrak kental sejumlah 150gram.

3.2 Hasil uji efek imunomodulator ekstrak etanol kulit batang dan buah attarasa

3.2.1 Laju eliminasi karbon

Pada penelitian ini dilakukan pengujian respon imun non spesifik dengan menggunakan metode bersihan karbon. Uji ini merupakan respon non spesifik unuk mengetahui aktivitas fagositosis sel makrofag terhadap karbon sebagai zat asing (Shukla, dkk., 2009). Karbon akan berkurang jumlahnya dalam darah seiring pertambahan waktu, karena adanya peristiwa fagositosis oleh sel-sel leukosit terutama neutrophil, monosit, dan makrofag. Laju eliminasi karbon merupakan suatu metode yang digunakan utuk mengukur aktivitas fagositosis pada mencit. Hasil laju eliminasi karbon dalam darah (EEBA dan EEFA) ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Laju eliminasi karbon

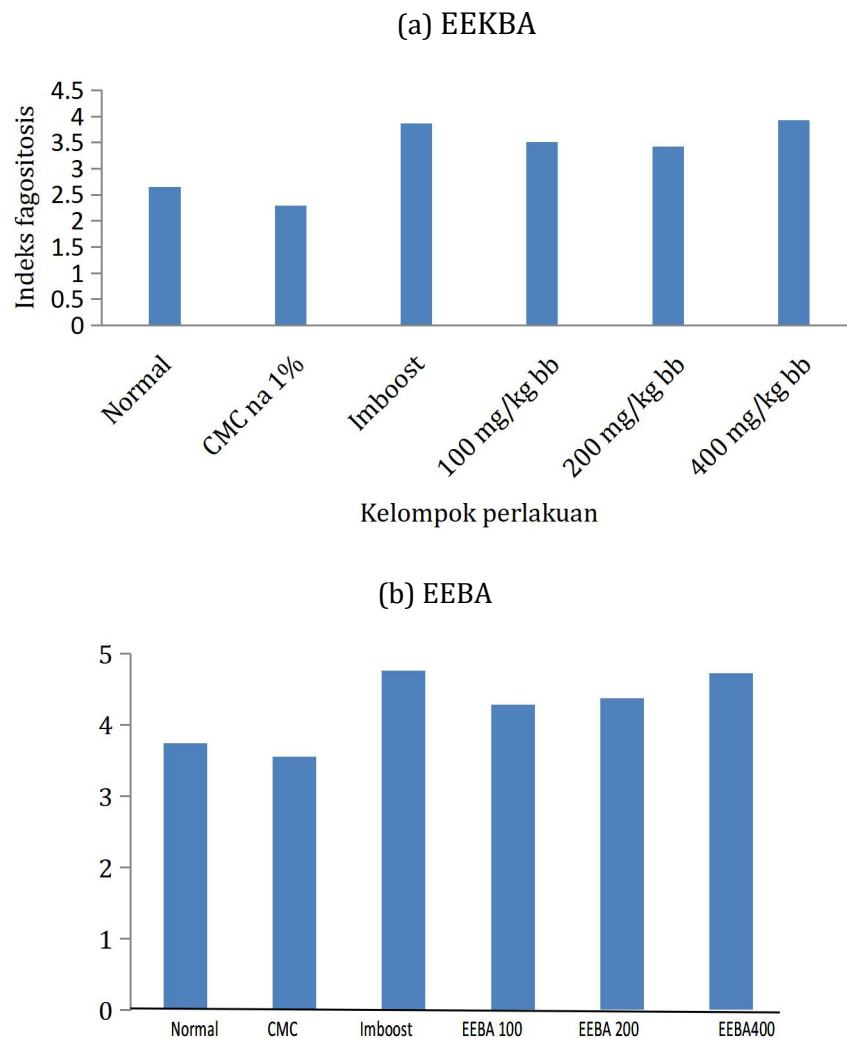
Pada Gambar 1 dapat dilihat nilai absorban panjang gelombang karbon dalam darah menurun tiap rentang waktu, berarti setiap konsentrasi ekstrak uji dapat memberikan efek imunostimulan. Penggunaan variasi konsentrasi ekstrak uji pada perlakuan ini untuk mengetahui hubungan antara peningkatan konsentrasi ekstrak uji dengan aktivitas penurunan karbon dalam darah. Pada Gambar 1 juga dapat dilihat adanya penurunan nilai absorban pada semua kelompok sediaan uji dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Penurunan nilai absorban terbesar terdapat pada dosis 400mg/kg bb, semakin menurunnya nilai absorban berarti konsentrasi karbon yang tinggal dalam darah menciit semakin sedikit. Hal ini memperlihatkan bahwa terjadi peningkatan aktivitas fagositosis pada masing-masing kelompok sediaan ekstrak uji. Penurunan nilai absorban terbesar terdapat pada dosis 400 mg/kg bb, semakin menurunnya nilai absorban berarti konsentrasi karbon yang tinggal dalam darah menciit semakin sedikit. Hal ini memperlihatkan bahwa terjadi peningkatan aktivitas fagositosis pada masing-masing kelompok sediaan ekstrak uji.

Fagositosis adalah suatu mekanisme pertahanan yang dilakukan oleh sel fagosit, sel fagosit ini terdiri dari 2 jenis, yaitu fagosit mononuklear dan polimorfonuklear. Fagosit mononuklear contohnya monosit (didarah) jika berpindah ke jaringan menjadi makrofag. Fagosit polimorfonuklear adalah granulosit yaitu netrofil, eosinofil, basophil dan sel mast (dijaringan). Adapun proses fagositosis dimana mikroorganisme/partikel asing dikenali oleh sel fagosit, maka sel fagosit akan bergerak menuju partikel tersebut akan melekat dengan reseptor pada membran sel fagosit, membran sel fagosit tersebut akan menyelubungi seluruh permukaan partikel asing dan memasukkannya ke dalam sitoplasma yang mirip seperti vakuola disebut fagosom. Selanjutnya, fagosom berikatan dengan lisosom yang berisi enzim penghancur seperti *acid hydrolase* dan peroksidase bergabung dengan fagosom membentuk fagolisosom. Sistem limfoid berfungsi untuk melindungi tubuh dari kerusakan akibat zat asing. Sel sel pada sistem ini dikenal dengan imunokompeten yaitu sel yang mampu membedakan sel tubuh dengan zat asing dan menyelenggarakan inaktivasi atau perusakan zat asing. Tugas limpa sangat penting, seperti berkontribusi pada produksi sel, fagositosis, dan pembangunan kekebalan. Peningkatan bobot hati dan limpa dapat mengindikasikan adanya peningkatan proliferasi sel-sel imun yang terdapat di dalam organ-organ tersebut (Kim, dkk., 2011).

3.2.2 Indeks fagositosis

Uji aktivitas fagositosis menggunakan metode *carbon clearance* merupakan gambaran sistem imun non spesifik pada proses fagositosis terhadap partikel asing didalam darah. Metode *carbon clearance* digunakan untuk mengukur aktivitas sel-sel fagosit untuk membunuh

oragnisme patogen yang masuk kedalam tubuh. Fagositosis banyak digunakan sebagai parameter imunologi untuk mengevaluasi fungsi kekebalan tubuh. Penilaian kemampuan atau aktivitas fagositosis dalam mengeliminasi partikel karbon dinyatakan sebagai indeks fagositosis (Shukla, *et al.*, 2009). Peningkatan indeks bersihan karbon menunjukkan perbaikan fungsi fagositik dari makrofag mononuklear dan imunitas non spesifik. Indeks fagositis setelah pemberian ekstrak etanol kulit batang dan buah attarasa ditunjukkan pada Gambar 2.



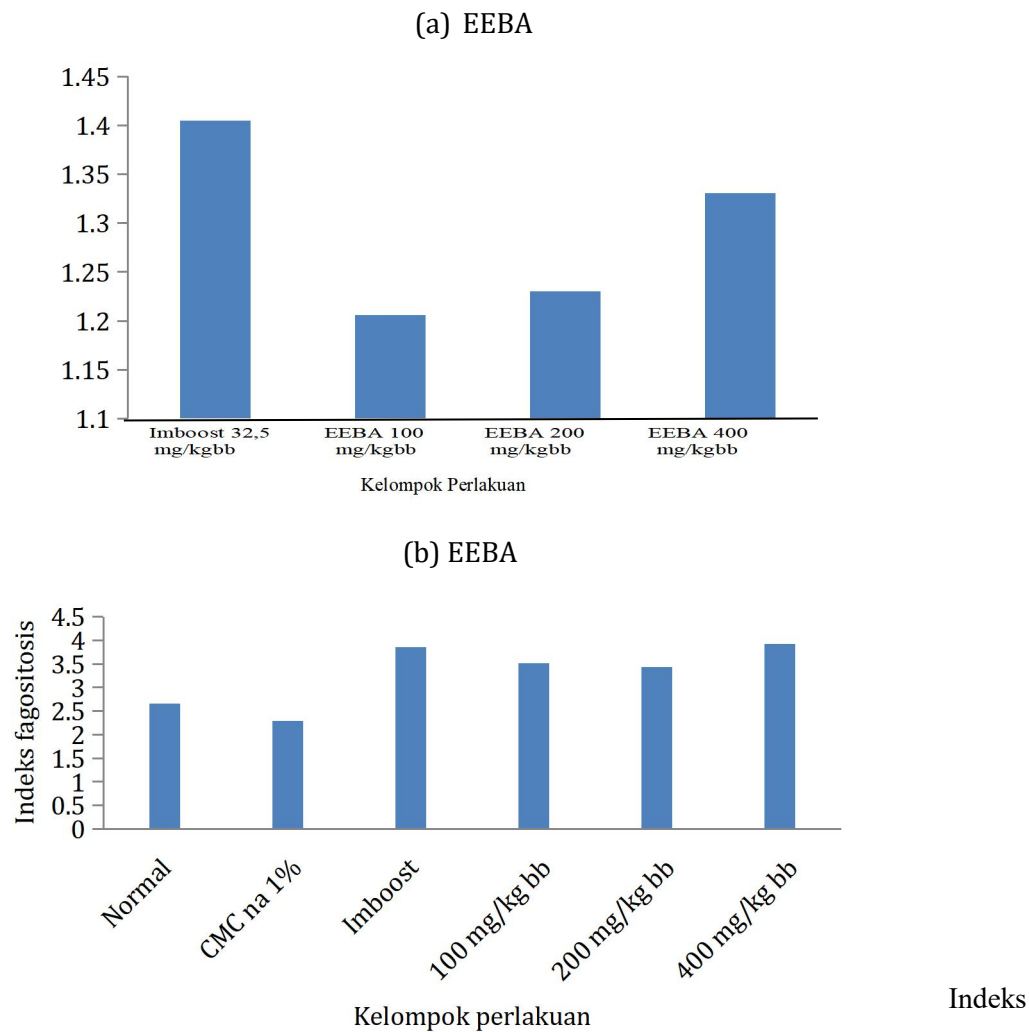
Gambar 2. Indeks fagositis

Pada Gambar 2 dapat dilihat Indeks fagositosis EEKBA and EEBA dosis 100, 200, dan 400 mg/kg BB yaitu 3,429 dan 4,289; 3,501 dan 4,375; 3,925 dan 4,732. Indeks fagositosis ekstrak dosis 100, 200, dan 400 mg/kg bb menunjukkan bahwa adanya hubungan peningkatan dosis dengan nilai indeks fagositosis, yaitu semakin besar peningkatan dosis maka nilai indeks fagositik semakin tinggi. Semakin meningkatnya indeks fagositik pada uji bersihan karbon

menunjukkan adanya peningkatan aktivitas fagositosis dari makrofag dan peningkatan imunitas non spesifik. Keefektifan sel fagosit ditandai dengan peningkatan antibodi dan C3b komplemen, yang dimulai dari kecepatan pembersihan zat asing dari dalam darah (Ghaisas, et al., 2009).

3.2.3 Indeks stimulasi

Indeks stimulasi merupakan hasil perbandingan antara kelompok uji dengan kelompok kontrol. Suatu zat bersifat imunostimulan jika indeks stimulasi lebih besar dari 1 dan bersifat immunosupresan jika indeks stimulasi lebih kecil dari 1. Indeks stimulasi setelah pemberian ekstrak etanol kulit batang dan buah attarasa ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3
stimulasi

Indeks

Pada Gambar 3 dapat dilihat Indeks stimulasi EEKBA and EEBA dosis 100, 200, dan 400 Indeks stimulasi EEKBA and EEBA dosis 100, 200, dan 400 mg/kg BB yaitu 1,00 dan 1,20; 1,02 dan 1,23; 1,13 dan 1,33. Pemberian EEKBA and EEBA pada dosis 100, 200, dan 400 mg/kg BB dapat meningkatkan aktivitas fagositosis pada mencit jantan dan terdapat perbedaan yang

signifikan dengan CMC-Na 1% dan kelompok normal ($p < 0,05$). Indeks stimulasi ekstrak dosis 100, 200, dan 400 mg/kg bb menunjukkan bahwa adanya hubungan peningkatan dosis dengan nilai indeks stimulasi, yaitu semakin besar peningkatan dosis maka nilai indeks stimulan yang didapat semakin meningkat. Imunostimulator secara tak langsung berkhasiat mereaktivasi sistem imun yang rendah dengan meningkatkan produksi molekul perantara (*messenger molecules*), yaitu sitokin, yang fungsinya adalah sebagai mediasi dan mengatur sistem imun (Sasmito, 2017). Menurut Sasmito (2017) mengenai imonomodulator bahan alami bahwa senyawa flavonoid dapat meningkatkan sistem kekebalan tubuh hingga mampu menangkal serangan virus, bakteri atau zat asing lainnya, dengan cara meningkatkan aktivitas dari makrofag yang ditunjukkan dengan meningkatnya kemampuan fagositosis, aktivitas enzim lisosomal, serta memodulasi pelepasan *nitric oxide* oleh makrofag. Senyawa flavonoid dapat bekerja terhadap limfokin (interferon γ) yang dihasilkan oleh sel T sehingga akan merangsang sel-sel fagosit untuk melakukan respon fagositosis.

Efek suatu bahan sangat erat kaitannya dengan senyawa kimia yang terkandung dalam bahan tersebut. Mekanisme imunostimulan pada buah attarasa kurang lebih sama seperti mekanisme pada tumbuhan yang mengandung senyawa ini seperti dijelaskan diatas, yaitu memiliki efek imunostimulasi pada monosit, makrofag, *natural killer cell*, dan *dendrit cell* dengan meningkatkan aktivitas IL-2, proliferasi dan aktivasi limfosit T. Proliferasi limfosit menyebabkan sel Th1 teraktivasi. Kemudian sel Th1 yang teraktivasi akan mempengaruhi IFN γ yang dapat mengaktifkan makrofag (Sasmito, 2017).

4. Kesimpulan

EEKBA dan EEBA mempunyai aktivitas imunomodulator yang bekerja dengan meningkatkan sistem imun (imunostimulan).

Daftar Pustaka

- Aldi, Y., Nisya, O., dan Handayani. (2013). Uji Imunomodulator Beberapa Subfraksi Ekstrak Etil Asetat Meniran Pada Mencit Jantan Dengan Metode Carbon Clearance. Prosiding Seminar Nasional Perkembangan Terkini Sains Farmasi Dan Klinik III
- Azizah, M., Wiwik, W., Ema, R., S. (2017). Efek Imunomodulator Ekstrak Etanol Kulit Buah Nanas Terhadap Mencit Putih Jantan Dengan Metode Bersihan Karbon. Jurnal. Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Bhakti Pertiwi. Palembang
- Ditjen POM. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Cetakan Pertama. Jakarta: Departemen Kesehatan RI. Hal. 10-11.
- Faradilla, M., Maria, I, I. 2014. Efek Imunomodulator Polisakarida Rimpang Temu Putih (Curcuma Zeodoaria (christni) Roscoe). Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia
- Ghaisas, M.M., Shaikh, S.A., dan Deshpande, A.D., 2009, Evaluation of the

- Immunomodulatory Activity of Ethanolic Extract of the Stem Bark of *Bauhinia variegata* Linn., *International Journal of Green Pharmacy*, 70- 74, Department of Pharmacology, Institute of Pharmaceutical Science and Research, India.
- Kim, K. L., Shin, K. S., Jun, W. J., Hong, B. S., Shin, D.H dan Cho, H. Y, (2011). Effects of Polysaccharides from Rhizomes of Curcuma on Macrophage Functions. *Bioscience Biotechnology*. 65 (II): Halaman 2377.
- Kurniaty, R., Dida, S., Kurniawaty, P., P., Aam, A. 2014. Kilemo (*Litsea Cubeba* L. Persoon). Bogor: Kementrian Kehutanan
- Linsentia, N., A. 2011. Aktivitas Imunomodulator Ekstrak Daun Kemangi Terhadap Mencit Jantan Dengan Metode Carbon Clearance Dan Neutrophil Adhesion. Universitas Sanata Dharma. Yogyakarta.
- Rahman, H., Yufri, A., dan Elda, M. 2016. Aktifitas Imunomodulator Dan Jumlah Sel Leukosit Dari Ekstrak Kulit Buah Naga Merah Pada Mencit Jantan. STIFARM. Padang.
- Sasmito, E. (2017). *Imunomodulator Bahan Alami*. Yogyakarta: Rapha Publishing Hal 3,16
- Shukla, S., Suresh, P.V., Pradeep, M, Jinu, J., dan Archana, M. (2009). Immunomodulatory Activities of the Ethanolic Extract of *Caesalpinia bonducella* Seeds. *Journal of Ethnopharmacology*: 125, Halaman 252-256
- Tambusai, N., A. 2018. Uji Efek Imunomodulator Ekstrak Daun Afrika Terhadap Aktivitas Fagositosis Sel Imun Pada Mencit Jantan Dengan Metode Karbon Klirens. Universitas Sumatera Utara. Medan