

KAJIAN AKTIFITAS IMMUNOMODULATOR EKSTRAK DAUN BANGUN BANGUN (*Coleus amboinicus* L.) PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus* L.)

Melva Silitonga¹ dan Pasar Maulim Silitonga²

^{1,2}Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Medan, Jln. Willem Iskandar Pasar V, Medan 20221

Diterima 7 Januari 2012, disetujui untuk publikasi 22 Februari 2012

Abstract Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji bagaimana keterlibatan ekstrak air daun bangun-bangun (*Coleus amboinicus* Lour) dalam menstimulir tubuh untuk meningkatkan imunitas terhadap antigen spesifik. Penelitian ini mengkaji tentang jumlah total leukosit IgG dan gambaran Histologi limpa. Penelitian ini bersifat eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Dosis ekstrak air daun bangunbangun (EADB) terdiri dari 3 taraf yaitu 0.0, 19.0, dan 31,5 gr /kg BB. Digunakan dua puluh empat ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) umur 2,5 - 3 bulan dengan berat badan rata-rata 140-200 gram. Kelompok A sebagai plasebo diberi aquadest 19,0 g/Kg BB per oral tiap hari. Kelompok B dan C diberi ekstrak air daun bangun-bangun 15% dengan dosis 19,0 dan 31,5g/kg BB, kelompok D dan E diberi ekstrak air daun bangun-bangun 15% dengan dosis 19,0 dan 31,5g/kg BB ditambah DPT, sedang kelompok F diberi aquadest 19,0 g/Kg BB tiap hari dan DPT. Masa pemberian perlakuan adalah 30 hari. Selama pemeliharaan dan perlakuan diberi makan dan minum *ad libitum*. Pada hari ke 31, dilakukan dekapitasi leher untuk mengambil darah bagi analisis TLC, IgG, dan histopatologi limfa. Analisis TLC, dilakukan dengan menggunakan alat ABX 70, uji spesifitas IgG secara kuantitatif dengan metode *enzym linked immunosorbent assay* (ELISA) menggunakan IgG Kit (Sigma), sedang preparat histologi dilakukan dengan pewarnaan hematoksilin-eosin. Antigen yang diberikan adalah vaksin DPT. Suntikan DPT ini dilakukan satu dan dua minggu sebelum pengambilan darah. Hasil penelitian menunjukkan Ekstrak air daun bangunbangun meningkatkan jumlah total leukosit pada tikus secara sangat signifikan ($\alpha < 0.01$). Kadar IgG pada tikus yang diberi Ekstrak air daun bangunbangun lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol ($\alpha < 0.05$). Gambaran histologi organ limfa pada tikus yang diberi ekstrak daun bangunbangun semuanya dalam keadaan normal, akan tetapi limpa tikus yang diberi DPT tanpa ekstrak mengalami pelebaran dalam ukuran follikel.

Pendahuluan

Obat tradisional memegang peran penting dalam memelihara kesehatan tubuh. Sekitar tiga perempat populasi penduduk dunia yakin pada tanaman dan ekstrak tanaman untuk memelihara kesehatan (Gabhe, Tathe and Khan, 2006). Lee, *et al.*, (2010) menjelaskan bahwa banyak bukti yang menunjukkan tanaman efektif dalam meningkatkan sistem

imun dan meningkatkan aktivitas antioksidan pada manusia. (*Coleus amboinicus* Lour) tergolong genus *Coleus*/*Plectranthus* yang telah digunakan sebagai obat tradisional. Sunita *et al.* (2010) melaporkan, ekstrak daun bangun-bangun mampu menyembuhkan borok (Epizootic ulcerative syndrom = EUS) pada ikan yang disebabkan oleh jamur *Aphanomyces invades*. Selain hal tersebut dilaporkan juga bahwa ekstrak daun bangunbangun potensial

Kata kunci:
Bangunbangun, total leukosit, IgG,

digunakan sebagai immunostimulan pada "murrel culture". Dengan meningkatnya sifat fagositik netrofil diduga jumlah leukosit secara keseluruhan akan meningkat, bahkan titer antibodi akan meningkat sebagai respon tubuh terhadap antigen yang ada. Beberapa penelitian juga telah menunjukkan bahwa ekstrak bangun-bangun atau campuranherbal dengan *Origanum spp.*, memiliki aktivitas antivirus invitro atau memiliki efek imunostimulating baik invitro maupun invivo (Baricevic and Bartol, 2002).

Kandungan zat bio aktif yang diduga berperan sebagai immunostimulan adalah flavonoid, steroid, dan polifenol. Flavonoid bersifat antioksidan dan mencegah oksidasi lipoprotein densitas rendah (LDL) dan menurunkan risiko terhadap atherosclerosis. Antioksidan alami seperti yang terdapat pada tumbuhan dapat meningkatkan kapasitas antioksidan plasma dan menurunkan risiko terhadap penyakit tertentu seperti kanker, penyakit jantung dan stroke (Negi and Bhatt 2012). Antioksidan yang terkandung pada makanan dapat menstimulasi imunitas seluler dan membantu mencegah komponen selular terhadap kerusakan oksidatif. Berbagai vitamin yang terkandung di dalam bangun-bangun seperti vitamin C, B12, dan beta karoten dapat berfungsi dalam meningkatkan imunitas di dalam tubuh. Telah dilaporkan bahwa ekstrak etanol *Origanum vulgare* (termasuk daun bangunbangun) menghambat perkembangan virus ECHO9 Hill dan juga menunjukkan aktivitas stimulasi interferon secara invitro. Flavonoid, luteonin adalah komponen tanaman bangunbangun yang diduga bertanggung jawab untuk induksi substansi "interferon like" (Lee, et al., 2010).

Aktivitas immunomodulator dapat diamati melalui tes serologis dan hematologi (Kumar, Gupta, Sharma and Kumar, 2011). Tes serologis misalnya pengamatan imunoglobulin, total protein, dan sebagainya. Sedangkan tes hematologis melalui pengamatan total leukosit, hitung jenis, sel darah merah dan Hb, trombosit dan komponen lainnya..

Metode Penelitian

Hewan Uji

Dalam penelitian ini digunakan 24 ekor tikus putih dewasa (Strain Wistar) berumur 2-3 bulan dengan berat badan 140-200 gram, jenis kelamin jantan. Tikus induk diperoleh dari Laboratorium Farmasi Universitas Sumatera Utara, dan dibiakkan di rumah hewan Fakultas FMIPA Unimed. Selama pemeliharaan dan perlakuan tikus diberi pakan komersial dalam bentuk pelet dan air minum secara *ad libitum*. Tikus dipelihara dalam kondisi standar, suhu $(23 \pm 2) ^\circ\text{C}$, dan siklus siang dan malam 10 – 12 jam.

Penyediaan Ekstrak air Daun bangunbangun (EADB) dan Penentuan Dosis

Daun bangunbangun segar diperoleh dari kebun tanaman obat jurusan Biologi FMIPA Unimed.. Pembuatan ekstrak dilakukan secara maserasi sesuai dengan penelitian Alvin, Ibrahim, and Janardhanan (2005) dengan menggunakan pelarut aquades. Sebanyak 6 kg daun bangunbangun segar dicuci, lalu diangin-anginkan hingga air cucian benar-benar tiris, kemudian daun tersebut dipotong-potong kecil. Potongan-potongan daun tersebut dihaluskan dengan menggunakan mortar. Setelah daun bangunbangun dihaluskan ditambahkan aquades dengan perbandingan 1:10 hingga mendapatkan juice segar. Juice segar yang diperoleh diperas dan disaring untuk mendapatkan ekstrak segar daun bangunbangun. Ekstrak segar dimasukkan kedalam botol gelap dan disimpan didalam lemari pendingin selama 3 hari. setiap harinya ekstrak diaduk supaya ekstrak homogen. Setelah tiga hari ekstrak segar bangunbangun disaring. Hasil saringan dimasukkan kedalam panci untuk *hotplate* sampai ekstrak benar-benar mengental. Hasil akhir berupa EADB diperoleh sebanyak 250 ml dimasukkan kedalam botol kaca lalu disimpan dilemari pendingin agar tidak terkontaminasi. Hasil akhir ekstrak pekat daun Bangunbangun ini dibuat menjadi larutan infus 15% seperti yang tercantum pada Depkes RI, (1972), dan Silitonga, (1993). Dosis ekstrak air bangunbangun untuk tikus ditentukan berdasar konsumsi harian masyarakat Batak (Santosa,et. al 2002), yaitu 150 gr/50 Kg BB,

kemudian dikonversikan ke tikus. Konversi dosis dilakukan dengan melihat tabel konversi (Tabel 3.1.) yaitu ditentukan pada berat badan manusia 70 Kg dan tikus 200 g (Laurence and Bacharach, 1964 dalam Silitonga (1993)). Oleh sebab itu dosis di atas sama dengan 210 gr/70 Kg BB, dan 250 g/50 kg BB manusia. Berdasarkan perhitungan konversi dosis diperoleh konversi dosis untuk manusia-70 Kg ke tikus-200 gr adalah 0,018 sehingga dosis untuk tikus adalah $0,018 \times 210$ g atau sebesar 19 g/Kg BB tikus. Dengan perhitungan yang sama, untuk dosis 250 g/50 Kg BB manusia adalah 31.5 g/kg BB tikus .

Rancangan Percobaan

Penelitian ini bersifat eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) . Dosis ekstrak air daun bangunbangun yang terdiri dari 3 taraf yaitu 0,0, 19,0, dan 31,5 gr /kg BB, diberikan selama 30 hari. Perlakuan sebanyak enam jenis dan ulangan sebanyak empat kali. Secara rinci rancangan penelitian dijelaskan sebagai berikut :

Kelompok A (kontrol) diberi aquadest 19,0 g/Kg BB *per oral* tiap hari.

Kelompok B diberi EADB 15% dengan dosis 19,0 g/kg BB

Kelompok C diberi EADB 15% dengan dosiss 31,5g/kg BB. *per oral* tiap hari.

Kelompok D diberi EADB 15% dengan dosis 19,0 g/kg B diberi DPT

Kelompok E diberi EADB 15% dengan dosis 31,5g/kg BB diberi DPT,

Kelompok F diberi aquadest 19,0 g/Kg BB dan diberi DPT.

EADB dan aquades diberikan secara oral langsung ke dalam lambung dengan menggunakan sonde. Masa pemberian perlakuan selama 30 hari. Selama pemeliharaan dan perlakuan diberi makan dan minum *ad libitum*.

Pemberian Antigen

Untuk memproduksi antibodi tikus diberi antigen yaitu vaksin DPT 100 µl secara intra muscular di paha bagian dalam, menggunakan spoit insulin 26 G. Suntikan DPT ini dilakukan satu dan dua minggu sebelum analisis darah yaitu hari ke 30 (Rajagopala, Ashok and Ravishankar. 2011)

Pengamatan Parameter

Jumlah Total Leukosit (TLC)

Pada hari ke 31, dilakukan dekapitasi leher untuk mengambil darah bagi analisis jumlah jumlah leukosit. darah ditampung dalam tabung yang telah dilapisi dengan antikoagulan EDTA., Analisis jumlah leukosit dilakukan dengan menggunakan alat ABX Micros 60.

Kadar Immunoglobulin G (IgG)

Pada saat dekapitasi darah dikumpulkan dalam dua tempat yaitu untuk analisis TLC dan IgG. Untuk analisis IgG darah disentrifugasi pada 2500 rpm selama 10 menit (Koul and Rattan, 2013) untuk memperoleh serum. Serum yang telah dipisahkan disimpan untuk analisis IgG. Pengukuran IgG dilakukan dengan metode *enzym liked immunosorbent assay* (ELISA) menggunakan IgG Kit (Sigma).

Pembuatan Preparat Histopatologis

Pemanenan organ sistem imun tikus dilakukan pada hari ke-31 perlakuan dengan mematikan tikus. Untuk pengambilan sampel organ limforetikular dilakukan dengan mengambil organ limpha tikus pada semua perlakuan. Untuk pembuatan preparat histologis dilakukan dengan metode hematoxylin-eosin (Shenoy, at al., 2012) dengan modifikasi. Organ yang telah diambil, kemudian dipotong tipis dengan ketebalan 0,5 cm dan dimasukkan ke dalam larutan formalin 10%. Selanjunya diproses secara rutin untuk pembuatan sediaan histopatologi yang terdiri dari *dehidrasi, clearing, infiltrasi, embedding, sectioning* dan *staining*

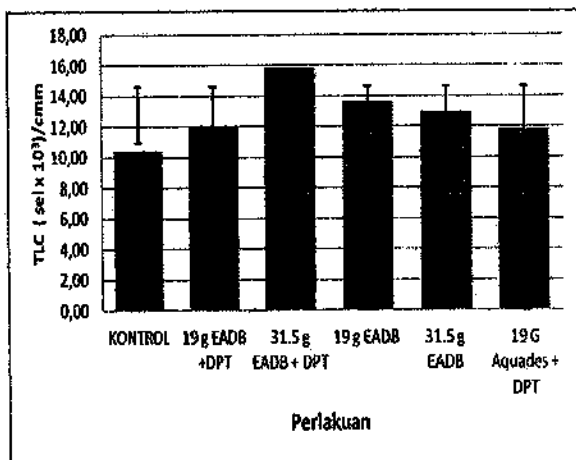
Hasil Dan Pembahasan

Jumlah Total leukosit

Jumlah TLC dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 1. Jumlah TLC paling tinggi terdapat pada perlakuan 31.5 g EADB+DPT. disusul dengan TLC tikus perlakuan 19 g/kg BB. Peningkatan ini sangat nyata secara statistik. Jumlah SDP paling rendah terdapat pada tikus kontrol tanpa diberi DPT (Gambar 1.)

Tabel 1. Efek Ekstrak Air daun bangunbangun terhadap TLC dan IgG

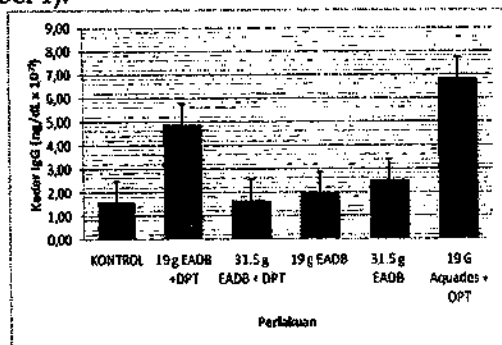
Perlakuan	TLC (sel x 10 ³ /cmm)	Kadar IgG (mg/dl x 10 ³)
KONTROL	10,40 ± 0,87 ^a	1,60 ± 0,09a
19 g EADB +DPT	13,68 ± 1,33 ^a	4,88 ± 2,64c
31.5 g EADB + DPT	15,85 ± 2,52 ^b	1,66 ± 0,63a
19 g EADB	13,60 ± 1,39 ^a	1,99 ± 0,52a
31.5 g EADB	12,93 ± 1,42 ^a	2,55 ± 1,23b
19 G Aquades + DPT	11,80 ± 4,24 ^a	6,83 ± 1,16d



Gambar 1. Pengaruh pemberian EADB terhadap jumlah Total Leukosit (TLC) tikus

Kadar Immunoglobulin G (IgG)

Pada penelitian ini kadar tertinggi IgG terdapat pada tikus yang diberi aquades 19 g/kg BB ditambah antigen DPT kemudian kadar tertinggi kedua yaitu pada tikus dengan perlakuan EADB 19 g/kg BB ditambah DPT (Tabel 1).



Gambar 2. Pengaruh EADB terhadap Kadar IgG tikus perlakuan

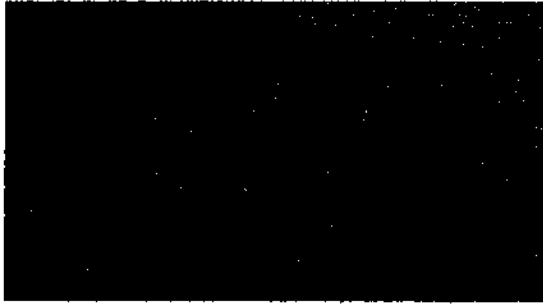
Gambaran Histologis Organ Limpa

Pengaruh pemberian EADB terhadap Gambaran Histologis Limpa tidak menimbulkan kelainan pada organ. Semua terlihat normal kecuali pada perlakuan aquadest ditambah DPT, terjadi pelebaran follikel.

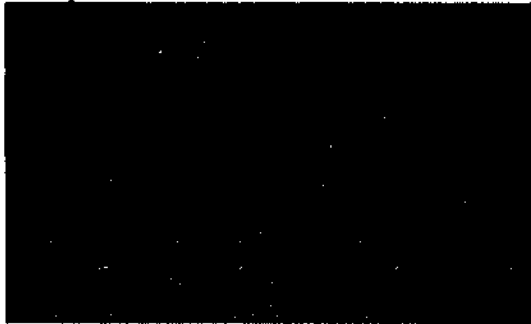


Gambar 3. Gambaran Folikel Limpa Tikus Kelompok EADB

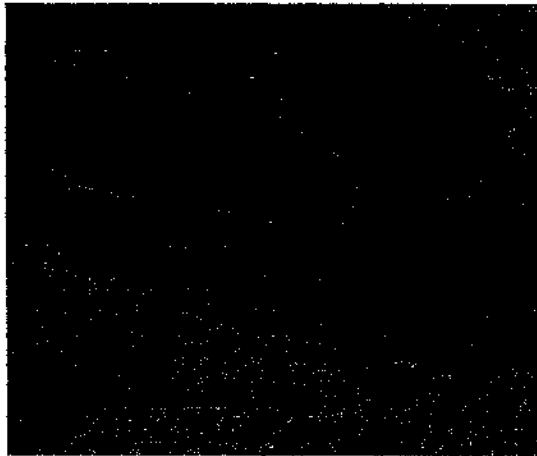
Pada gambaran mikroskopis limpa diatas yang ditandai dengan panah berwarna hitam yang menunjukkan folikel limfoid limpa. Seperti yang telah diketahui dua fungsi utama limpa adalah memproduksi respon imun spesifik dan menghancurkan sel darah merah yang abnormal. Peningkatan aktivitas fungsional dari limpa, yang disertai dengan hiperplasi sel limphoid atau makrofag biasanya disebabkan oleh adanya rangsangan antigen atau adanya benda asing di darah. Pada Gambar 5.6. gambaran mikroskopis limpa yang ditandai dengan panah berwarna hitam menunjukkan folikel limfoid limpa.



Gambar 4. Gambaran Folikel Limpa Pada Kelompok kontrol



Gambar 5. Gambaran histologis organ limpa tikus yang diberi EADB+DPT



Gambar 6. Gambaran histologis organ limpa tikus kontrol + DPT

PEMBAHASAN

Menurut Smith dan Soesanto (1988) jumlah leukosit tikus putih normalnya sekitar $5.0 - 17.0 \times 10^3/\text{mm}^3$ dan pada penelitian ini jumlah tertinggi mencapai $15,85 \times 10^3/\text{mm}^3$ yaitu pada tikus perlakuan 31.5 g EADB/kg BB tikus + DPT. Vaksinasi DPT dapat meningkatkan leukosit dan meningkatkan aktivitas leukosit. Penyuntikan vaksin DPT dapat meningkatkan

kerja dan membentuk antibodi secara cepat (Guyton and Hall, 1997).

Pada penelitian ini terjadi peningkatan leukosit pada semua tikus yang diberi EADB, Meningkatnya leukosit dalam penelitian ini terutama difasilitasi oleh antigen. Masuknya antigen akan memacu pembentukan leukosit untuk meningkatkan sistem imun di dalam tubuh. EADB juga merangsang pembentukan leukosit dengan adanya komponen kimianya seperti alkaloid dan tannin. Bangun-bangun merupakan antibiotik karena mengandung flavonoid, yaitu bahan aktif yang berfungsi sebagai antiperadangan, dapat memacu aktivitas makrofag sehingga meningkatkan sistem kekebalan tubuh yang dapat diamati melalui jumlah leukosit. Nilai TLC pada penelitian ini lebih tinggi dari hasil penelitian yang dilakukan oleh Preeja *et al* (2011). Peneliti tersebut melaporkan bahwa pemberian ekstrak metanol daun bangunbangun 200 mg/kg BB mencit, memberikan hasil TLC $5.32 \times 10^3/\text{cmm}$. Hali ini juga membuktikan bahwa bangunbangun sebagai imunostimulan dapat merangsang sistem imun pada tikus yang diberi antigen DPT. Dalam penelitian ini jumlah TLC dipengaruhi oleh pemberian EADB sehingga dapat meningkat dengan nyata ($p < 0.05$) dibandingkan dengan kontrol.

IgG merupakan immunoglobulin terbanyak yang terdapat dalam serum darah, yaitu sekitar 80% sehingga disebut sebagai antibodi utama dalam serum. IgG selalu menggantikan IgM di dalam serum sepanjang menginfeksi antigen bahkan untuk infeksi yang selanjutnya pada antigen yang sama (Baker dan Allen, 1982). Flavonols adalah salah satu kadar kandungan terbanyak dari flavonoid yang terdapat dalam bangunbangun. Efek flavonoid terhadap system imun sangat kompleks dan nyata yaitu berperan sebagai imunostimulan (Carlo *et al.* 1999). Flavonols berpotensi sebagai imunostimulan karena mampu meningkatkan produksi IL2 (interleukin) yang

terlibat dalam aktivasi dan proliferasi sel T (Dewi, 2007).

Pada pengamatan mikroskopisnya dapat dilihat pengaruh yang sangat nyata yang diberikan EADB daun bangunbangun terhadap limpa tikus putih. Ini dapat dilihat pada gambaran folikel limfoid limpa tikus putih pada kelompok perlakuan EAD. Dari gambaran mikroskopis tersebut dapat dilihat bentuk folikel limfoid yang ditunjukkan dengan garis merah pada Gambar 3 yang menunjukkan gambaran yang baik. Folikel limfoid sendiri merupakan kumpulan dari sel-sel limfosit pada limpa yang berbentuk agak bulat dan dengan keadaan seperti setumpukan dan tebal serta bewarna kebiruan seperti yang ditunjukkan garis merah pada gambaran mikroskopis di atas. Folikel limfoid limpa yang belum terpapar oleh antigen tidak akan memiliki sentrum germinativum pada bagian tengahnya, namun bila sudah terpapar oleh antigen dapat dilihat adanya sentrum germinativum pada bagian tengah folikel limfoid limpa. Sentrum germinativum sendiri berbentuk padat di tengah folikel limfoid seperti bolongan yang terdapat di tengah folikel limfoid dengan warna yang lebih muda atau lebih gelap. Sentrum germinativum terjadi karena adanya infiltrasi limfosit padat.

Dari Gambar 3. dapat dilihat bahwa folikel limfoid pada kelompok perlakuan EADB memiliki limfoid yang baik karena tidak adanya sentrum germinativum di dalam folikel limfoid tikus, dapat dilihat juga ukuran folikel yang lebih baik di banding perlakuan lainnya, ini menunjukkan ekstrak EADB memberikan dampak yang baik terhadap gambaran folikel pada limpa tikus. Dibandingkan dengan kelompok kontrol, folikel limfoid pada uga tidak memiliki sentrum germinativum yang menunjukkan tidak ada serangan antigen. Namun bentuk folikel pada kelompok kontrol terlihat sangat kecil sekali dan hampir tak terlihat ini dapat dilihat pada Gambar 4. Dapat dilihat bahwa bangunbangun memberikan efek imunostimulan pada limpa tikus sehingga folikel limfoid dapat berukuran lebih besar dan bagus, ini juga menunjukkan banyaknya

limfosit yang baik yang dipacu oleh kandungan flavonoid pada bangunbangun sehingga limfosit terbentuk dalam limpa dan membentuk folikel limfoid yang lebih bagus.

Sementara itu pada kelompok perlakuan EADB dan DPT dapat dilihat gambaran folikel limfoidnya yang lebih baik dibanding kelompok DPT saja. Dapat dilihat pada Gambar 3. folikel limfoid limpa tikus memiliki sentrum germinativum di dalamnya, kehadiran sentrum germinativum ini dipicu dengan adanya penyuntikan antigen yaitu DPT pada hari ke-7 dan ke -15, tetapi jumlah dari sentrum germinativum ini sangatlah sedikit dan dalam ukuran yang sangat kecil, sementara itu pada kelompok perlakuan DPT saja dapat dilihat bahwa folikel limfoid limpanya juga memiliki sentrum germinativum, yang terbentuk akibat penyerangan antigen, tetapi pada kelompok DPT memiliki sentrum geminativum yang banyak serta ukuran yang cukup besar terlihat pada Gambar 4. Dari gambaran ini dapat diketahui bahwa bangunbangun memiliki efek imunostimulan yang tinggi dalam pembentukan antibodi untuk perlawanan terhadap antigen. Kandungan dalam bangunbangun tersebut menstimulan limpa tikus sehingga lebih banyak terbentuk antibodi pada folikel limfoid. Dapat dilihat dari kelompok yang diberikan bangunbangun dan dipaparkan antigen memiliki gambaran folikel limfoid yang lebih baik dibandingkan kelompok yang hanya dipaparkan antigen saja. Kelompok yang hanya dipaparkan saja antigen tidak memiliki stimulan yang memacu terbentuknya antibodi pada folikel limfoid limpa tikus.

Perbedaan ini menunjukkan bahwa antara kelompok kontrol, pemberian ekstrak etanol bangunbangun, pemberian ekstrak etanol bangunbangun dan DPT serta pemberian DPT saja memberi respon imun yang berbeda. Dari tabel-tabel di atas dapat dilihat bahwa pemberian EADB telah memulai respon imun dengan menstimuli perbanyakkan sel-sel folikel limfoid limpa tikus. Pemberian EADB memberi respon imun yang lebih baik. Folikel limpa merupakan lokasi limfosit B dimana sel

plasma yang berperan sebagai penghasil antibodi. Sehingga bila terjadi penyerangan antigen maka akan terbentuk antibodi. Antibodi akan terbentuk lebih cepat dan lebih banyak bila adanya stimulan yang diberikan, seperti bangunbangun yang memiliki banyak kandungan yang dapat memacu antibodi seperti flavonoid, saponin, vitamin C, dan vitamin A.

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil dan pembahasan diatas, kesimpulan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: (1) Ekstrak air daun bangunbangun meningkatkan jumlah total leukosit pada tikus secara sangat signifikan ($\alpha < 0.01$), (2) Kadar IgG pada tikus yang diberi Ekstrak air daun bangunbangun lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol ($\alpha < 0.05$), (3) Gambaran histologi organ limfa pada tikus yang diberi ekstrak daun bangunbangun semuanya dalam keadaan normal, akan tetapi mengalami pelebaran dalam ukuran follikel

Untuk semakin memperjelas mekanisme keterlibatan ekstrak air daun bangunbangun sebagai imunostimulan maka disarankan pengkajian lanjutan tentang parameter imunostimulan lainnya yaitu, Titer antibodi, IgM, Total protein, dan Aktivitas Lisozim. Pengamatan organ lainnya yang terlibat dalam sistem imun perlu dikaji lebih lanjut seperti limfonodus, ginjal dan hati

UCAPAN TERIMA KASIH

Dengan terlaksanya penelitian ini maka penulis mengucapkan terima kasih kepada pihak DP2M melalui dana DIPA Unimed yang telah memberi dana untuk pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

[1] Alvin, M.J., Ibrahim, S., Janardhanan. 2005. Modulatory effect of *Plectranthus amboinicus* Lour On ethylene glycol-induced nephrolithiasis in rats. Indian Journal Pharmacol. Vol 37, Issue 1: 37-45

- [2] Baricevic Dea and Tomaz Bartol. 2002. The Biological/ Pharmacological activity of the *Origanum Genus*. Pharmacology.
- [3] Carlo, G., Mascolo, N., Izzo Angelo and Francesco Capasso., (1999), *Life Science Flavonoids : Old and New Aspects of A Class of Natural Therapeutic Drugs*: 65(4):337-353
- [4] Depkes RI. 1972. *Farmakope Indonesia*. Ed. II. Jakarta : Lembaga Farmasi Nasional Dewi, P. 2007. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Lidah Buaya (Aloe Vera) Terhadap Proliferasi Limfosit Pada Mencit Balb/C Yang Diinfeksi Salmonella Typhimurium*. Semarang : UNDIP
- [5] Gabhc, S.Y., Tathe, P.A., and T.A. Khan. 2006. **Evaluation of the Immunomodulatory activity of the methanol extract of Ficus benghalensis roots in rats**. Issue 4: 271 – 275. Diakses tanggal 20 Maret 2013
- [6] Guyton and Hall. 1997. **Buku Ajar Fisiologi Kedokteran**. Ed. 9. Jakarta. ECG Fakultas Kedokteran.
- [7] Khumar, S., Gupta, P., Sharma, S. and D. Kumar. 2011. *A riviiew on immunostimulatory plants* Journal of Chinese Integrative medicine. Vol. 9, No. 2 ; 117- 128
- [8]. Lee, et all., 2010. **Flavonoid, Phenol and Polysacharide contens of Echinaceae purpurea L and its Immunostimulant Capacity In Vitro**.