

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN SIRIH MERAH (*PIPER CROCATUM*) DOSIS BERTINGKAT TERHADAP PROLIFERASI LIMFOSIT LIMPA MENCIT BALB/C YANG DIINFEKSI *SALMONELLA* TYPHIMURIUM

Asevano Christobed¹, Ratna Damma Purnawati², Neni Susilaningsih²

¹Mahasiswa Program Pendidikan S-1 Kedokteran Umum, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

²Staf Pengajar Ilmu Histologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. H. Soedarto, SH., Tembalang-Semarang 50275, Telp. 02476928010

ABSTRAK

Latar Belakang: Salah satu tanaman obat keluarga yang terdapat di Indonesia adalah sirih merah (*Piper crocatum*). *Piper crocatum* mengandung alkaloid, flavonoid, dan tannin yang merupakan antioksidan. Pemberian alkaloid dalam jangka waktu panjang menunjukkan peningkatan jumlah leukosit total, sel darah merah, dan hemoglobin. Flavonoid dapat meningkatkan pertumbuhan sel-sel limfosit meskipun dalam dosis rendah. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun *Piper crocatum* terhadap respon imun mencit dalam melawan infeksi *Salmonella* Typhimurium dengan proliferasi limfosit sebagai parameternya.

Tujuan: Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun sirih merah dosis 10, 30, 100 mg/hari/mencit terhadap proliferasi limfosit pada limpa mencit Balb/c yang diinfeksi *Salmonella* Typhimurium.

Metode: Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan pendekatan *Post Test Only Control Group Design*. Sampel merupakan mencit Balb/c jantan yang berumur 8-12 minggu, berat 20-25 gram, dan tidak terdapat kecacatan anatomis. Sampel dibagi ke dalam 5 kelompok yaitu kelompok kontrol yang terdiri dari K1 yang hanya diberi ekstrak daun *Piper crocatum* 10 mg/hari/mencit dan K2 yang hanya diinfeksi *Salmonella* Typhimurium dengan injeksi intraperitoneal. Kelompok perlakuan (P1, P2, P3) yang diinfeksi *Salmonella* Typhimurium dan diberi ekstrak daun *Piper crocatum* dosis bertingkat (10, 30, 100 mg/mencit/hari).

Hasil: Rerata indeks proliferasi limfosit pada limpa mencit masing-masing kelompok adalah K1=0,264; K2=0,222; P1=0,292; P2=0,339; dan P3=0,158. Perbedaan indeks proliferasi limfosit bernilai signifikan antara K1-P3, K2-P2, P1-P3, dan P2-P3.

Simpulan: Pemberian ekstrak daun *Piper crocatum* memberikan peningkatan proliferasi limfosit pada dosis 30 mg/mencit/hari.

Kata Kunci: *Piper crocatum*, indeks proliferasi, *Salmonella* Typhimurium

ABSTRACT

EFFECTS OF MULTILEVEL DOSES EXTRACTS FROM RED BETEL (*PIPER CROCATUM*) LEAVES ON LYMPHOCYTE PROLIFERATION OF BALB/C MICE INFECTED WITH *SALMONELLA* TYPHIMURIUM

Background: One of medicinal plants found in Indonesia is red betel (*Piper crocatum*). *Piper crocatum* contains alkaloids, flavonoids, and tannins which are antioxidants. Provision of alkaloids in the long term showed an increase in total leukocyte count, red blood cells, and hemoglobin. Flavonoids can enhance the growth of lymphocytes even in low doses. This

study aimed to determine the effect of extract of *Piper crocatum* leaves on the immune response in mice against infection with *Salmonella Typhimurium* lymphocyte proliferation as a parameter.

Aim: To understand the effect of *Piper crocatum* leaf extract doses 10, 30, 100 mg/day/mice onto lymphocyte proliferation of *Salmonella Typhimurium* infected Balb/c mice.

Method: This research is an experimental laboratory design of Post Test Only Control Group Design. Samples are Balb/c mice males aged 8-12 weeks, weighing 20-25 grams which have no anatomical defects. The samples were divided into 5 groups: control group consists of K1 only given the extract of *Piper crocatum* leaves 10 mg/day/mouse and K2 only infected with *Salmonella Typhimurium* through intraperitoneal injection. Group consists of P1, P2, P3 were infected *Salmonella Typhimurium* and given the extract of *Piper crocatum* leaves with multilevel dose (10, 30, 100 mg/mouse/day).

Result: Average Indexes of Lymphocyte Proliferation on each group were: C1=0,264; C2=0,222; P1=0,292; P2=0,339; and P3=0,158. There were significant differences between C1-P3, C2-P2, P1-P3, and P2-P3.

Conclusion: Provision the extract of *Piper crocatum* leaves doses 30 mg/day/mice improved lymphocyte proliferation.

Keywords: *Piper crocatum*, lymphocyte proliferation, *Salmonella Typhimurium*

PENDAHULUAN

Pengobatan herbal mulai menjadi perhatian karena potensi luas yang dimilikinya. Salah satu tanaman obat keluarga yang terdapat di Indonesia adalah sirih merah (*Piper crocatum*). Sirih merah sering digunakan sebagai obat tradisional oleh orang-orang di Sumatera Utara dan Sumatera Barat untuk mengobati berbagai penyakit seperti diabetes, hepatitis, gagal ginjal, stroke, hipertensi, hiperglikemia, dan lain-lain.^{1,2}

Piper crocatum ditemukan memiliki potensi sebagai antimikroba. Ekstrak metanol dari *Piper crocatum* dapat menurunkan jumlah total koloni bakteri pada tangan.³ *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* dan *Shigella dysentriae* dapat dicapai dengan nilai 6% dan 7% secara berturut-turut dengan memberikan ekstrak etanol daun *Piper crocatum*.⁴ Ekstrak daun *Piper crocatum* memiliki daya hambat yang signifikan terhadap patogen *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.⁵

Piper crocatum mengandung alkaloid, saponin, flavonoid, dan tannin yang merupakan antioksidan.^{3,6} Pemberian alkaloid dalam jangka waktu panjang menunjukkan peningkatan jumlah leukosit total, sel darah merah, dan hemoglobin.⁷ Alkaloid juga dapat meningkatkan proliferasi splenosit yang berperan dalam proliferasi limfosit.⁸ Flavonoid dapat meningkatkan pertumbuhan sel-sel limfosit meskipun dalam dosis rendah.⁹

Salmonella Typhimurium merupakan bakteri Gram-negatif yang sering menyebabkan penyakit pada saluran pencernaan seperti demam tifoid dan gastroenteritis.¹⁰ *S. Typhimurium* memiliki beberapa faktor virulensi yang membantu dalam melawan sistem imun hostnya seperti *Salmonella Pathogenicity Islands* (SPI), pSLT plasmid, adhesin, dan flagella.¹¹ *Salmonella* ditularkan secara oral melalui makanan dan minuman yang sudah terkontaminasi. Dosis infeksi untuk *Salmonella* adalah 10^5 - 10^{10} .¹²

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun *Piper crocatum* yang meningkatkan respon imun mencit dalam melawan infeksi *Salmonella* Typhimurium dengan proliferasi limfosit sebagai parameternya.

METODE

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental dengan pendekatan *Post Test Only Control Group Design* yang menggunakan binatang coba sebagai objek penelitian. Data yang digunakan adalah data primer, yaitu hasil penghitungan jumlah limfoblas dan limfosit. Kriteria inklusi adalah mencit Balb/c jantan, usia 8-12 minggu, berat 20-25 gram, dan tidak terdapat kelainan anatomis. Jumlah sampel pada penelitian ini adalah 30 ekor mencit. Kelompok penelitian akan dibagi menjadi 5 kelompok yaitu Kontrol 1 (K1), Kontrol 2 (K2), Perlakuan 1 (P1), Perlakuan 2 (P2), dan Perlakuan 3 (P3). Kontrol 1 hanya diberikan ekstrak daun *Piper crocatum* 10mg/hari/mencit selama 14 hari, Kontrol 2 hanya diinfeksi dengan *Salmonella* Typhimurium pada hari ke-10 melalui injeksi intraperitoneal. Perlakuan 1, Perlakuan 2, dan Perlakuan 3 diberikan ekstrak daun *Piper crocatum* dengan dosis masing-masing 10mg/hari/mencit, 30mg/hari/mencit, dan 100mg/hari/mencit selama 14 hari dan pada hari ke-10 ketiga kelompok ini diinfeksi dengan *S. Typhimurium*.

Penelitian eksperimental dengan rancangan *one group pre and post design* untuk mengetahui perbedaan kecepatan jalan sebelum dan sesudah diberikan *circuit training*. Data yang digunakan adalah data primer, yaitu hasil tes kecepatan jalan anak dengan obesitas. Kriteria inklusi penelitian ini adalah anak obesitas yang terdapat di SDN Bojongsalaman 2 Semarang yang berusia 9-12 tahun, mendapat izin dari orang tua untuk diikutsertakan dalam penelitian, anak dalam kondisi sadar, kooperatif, dan bersedia ikut dalam penelitian serta sanggup melakukan latihan. Kriteria Eksklusi penelitian ini adalah mempunyai riwayat trauma ekstremitas bawah dan riwayat merokok aktif.

Mencit dianestesi dengan eter kemudian diterminasi dengan dislokasi tulang leher. Masing-masing mencit diambil limpanya dan diisolasi splenositnya dengan metode Mishell (1980) dan Ding (1994). Selanjutnya dilakukan penghitungan jumlah limfosit dan limfoblas.

Data yang diperoleh diolah dengan program komputer SPSS, kemudian variabel tergantung diuji normalitasnya dengan uji Saphiro Wilk. Bila diperoleh distribusi data normal, uji hipotesis dilakukan dengan menggunakan statistik parametrik *one-way analysis of variance* (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji Post Hoc untuk perbandingan tiap kelompok. Jika distribusi data tidak normal, uji hipotesis dilakukan dengan menggunakan statistik non parametrik Kruskal-Wallis dan dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney.

HASIL

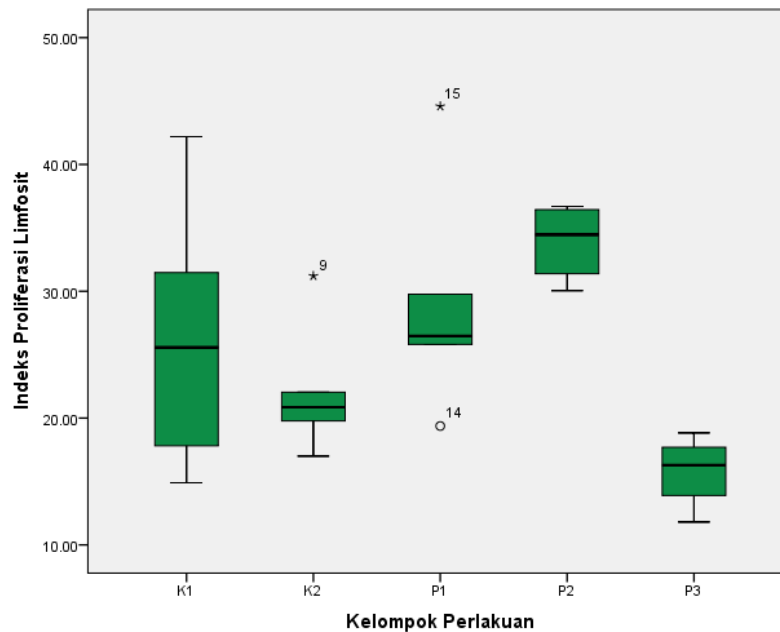
Hasil Analisis Deskriptif

Hasil pembacaan indeks proliferasi limfosit adalah rerata pembacaan dari dua orang pembaca. Hasil bacaan yang didapatkan diuji terlebih dahulu dengan Uji Kappa untuk menilai kesesuaian antara kedua pembaca yang berbeda. Hasil Uji Kappa untuk perhitungan indeks proliferasi limfosit adalah 0.625 (sedang), artinya ada perbedaan hasil pembacaan $\pm 35\%$ antara kedua pembaca.¹³ Data yang diperoleh merupakan data rasio. Deskripsi data yang digunakan adalah *mean* dan standar deviasi.

Tabel 1. Hasil Analisis Deskriptif Proliferasi Limfosit Limpa

Kelompok	Indeks Proliferasi Limfosit Limpa	
	<i>Mean</i>	<i>Standar Deviasi</i>
Kontrol 1	0,264	0,110
Kontrol 2	0,222	0,054
Perlakuan 1	0,292	0,094
Perlakuan 2	0,339	0,031
Perlakuan 3	0,158	0,029

Tabel 1 menunjukkan hasil rerata proliferasi limfosit limpa. Nilai rerata proliferasi limfosit limpa paling kecil terdapat pada kelompok Perlakuan 3 yaitu $0,158 \pm 0,029$. Nilai rerata proliferasi limfosit limpa paling besar ditemukan pada kelompok Perlakuan 2 yaitu $0,339 \pm 0,031$.



Gambar 1. Grafik Boxplot Proliferasi Limfosit Limpa

Gambar 1 menunjukkan hasil rerata proliferasi limfosit limpa yang didapatkan dengan menghitung indeks proliferasi di bawah mikroskop cahaya. Kelompok Perlakuan 2 memiliki rerata proliferasi limfosit limpa paling besar dan kelompok Kontrol 1 memiliki *range* data yang paling luas.

Hasil Uji Beda

Rerata indeks proliferasi limfosit limpa dilakukan uji normalitas menggunakan Uji *Saphiro-Wilk*. Ditemukan nilai $p=0,763$ pada kelompok Kontrol 1, nilai $p=0,231$ pada kelompok Kontrol 2, nilai $p=0,357$ pada kelompok Perlakuan 1, nilai $p=0,448$ pada kelompok Perlakuan 2, dan nilai $p=0,662$ pada kelompok Perlakuan 3. Nilai $p \geq 0,05$ pada uji normalitas menunjukkan bahwa distribusi data normal.

Sebelum dilakukan Uji *One-way ANOVA* data harus diuji variansinya dengan *Levene test* dan didapatkan nilai $p=0,183$. Nilai $p \geq 0,05$ menunjukkan variansi data bersifat homogen. Data sudah memenuhi kedua syarat untuk dilakukan Uji *One-way ANOVA* yaitu memiliki distribusi normal dan sifat data homogen. Uji *One-way ANOVA* mendapatkan nilai $p=0,027$ (nilai signifikan adalah $p \leq 0,05$) yang menunjukkan bahwa terdapat perbedaan proliferasi limfosit limpa yang bermakna antar kelompok. Uji statistik dilanjutkan dengan uji *Post hoc* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok. Perbedaan dianggap signifikan pada nilai $p < 0,05$.

Tabel 2. Uji *Post Hoc* pada Data Indeks Proliferasi Limfosit Limpa

Kelompok	K2	P1	P2	P3
K1	0,385	0,559	0,151	0,049*
K2		0,155	0,031*	0,220
P1			0,360	0,016*
P2				0,003*

Keterangan : *: bermakna ($p < 0,05$), K1: Kontrol 1, K2: Kontrol 2, P1: Perlakuan 1, P2: Perlakuan 2, P3: Perlakuan 3

Tabel 2 menunjukkan ada perbedaan proliferasi limfosit limpa yang bermakna antara kelompok Kontrol 1 dengan kelompok Perlakuan 3 ($p=0,049$). Perbedaan bermakna ditemukan antara kelompok Kontrol 2 dengan kelompok Perlakuan 2 ($p=0,031$). Ada perbedaan bermakna antara kelompok Perlakuan 1 dengan kelompok Perlakuan 3 ($p=0,016$). Perbedaan bermakna juga ditemukan pada kelompok Perlakuan 2 dan kelompok Perlakuan 3 ($p=0,003$).

Perbedaan tidak bermakna didapatkan antara kelompok Kontrol 1 dengan kelompok Kontrol 2 ($p=0,385$), Perlakuan 1 ($p=0,559$), dan Perlakuan 2 ($p=0,151$). Perbedaan tidak bermakna ditemukan antara kelompok Kontrol 2 dengan kelompok Perlakuan 1 ($p=0,155$) dan Perlakuan 3 ($p=0,220$). Perbedaan antara kelompok Perlakuan 1 dengan kelompok Perlakuan 2 juga ditemukan tidak bermakna ($p=0,360$).

PEMBAHASAN

Limfosit termasuk dalam sel darah putih yang terdapat di sistem pertahanan tubuh manusia dan berperan pada respon imun adaptif. Limfosit memiliki dua tipe yaitu sel limfosit B dan sel limfosit T.¹⁴ Limfosit terdapat dalam jumlah besar di darah, limfe, dan organ limfoid (timus, limfonodi, limpa, dan apendiks).¹⁵ Limpa adalah organ limfoid sekunder terbesar di tubuh manusia. Parenkim limpa terbagi menjadi dua region dengan fungsi dan morfologi yang berbeda yaitu pulpa putih dan pulpa merah. Pulpa merah disusun oleh banyak pembuluh sehingga banyak dilalui oleh darah. Limpa mengambil antigen dari darah dan menyampaikannya pada APC. Hal ini akan memulai proliferasi dan diferensiasi limfosit pada pulpa putih. Proliferasi jenis ini disebut sebagai proliferasi antigenik atau terinduksi antigen.¹⁶

Kelompok Kontrol 2 yang hanya diinfeksi *Salmonella Typhimurium* memiliki indeks proliferasi limfosit limpa yang lebih rendah dibandingkan dengan Kontrol 2 yang

hanya diberikan ekstrak daun *Piper crocatum*. *Salmonella* Typhimurium masuk ke dalam sirkulasi dan menyebar ke seluruh organ retikuloendotelial (hati dan limpa). *Salmonella* Typhimurium dalam perjalanannya akan meninggalkan sel-sel fagosit yang dapat mengakibatkan hiperplasia jaringan dan nekrosis organ.¹⁷ Nekrosis pada limpa dapat berpengaruh pada menurunnya proliferasi limfosit. Infeksi *Salmonella* Typhimurium akut juga dapat menurunkan ekspresi pada gen sehingga terjadi anemia transien, trombositopenia, dan limfositopenia.¹⁸ Akan tetapi, penurunan proliferasi limfosit pada Kontrol 2 yang dibandingkan dengan Kontrol 1 tidak signifikan.

Proliferasi limfosit limpa ditemukan meingkat pada kelompok Perlakuan 1 dan 2 dibandingkan dengan kelompok Kontrol 2. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun *Piper crocatum* dapat meningkatkan proliferasi limfosit. Pemberian alkaloid menunjukkan adanya peningkatan proliferasi mitogenik yang signifikan pada splenosit. Peningkatan ini sebanding dengan peningkatan proliferasi ketika diberikan mitogen lain seperti LPS, ConA, PHA, dan PWM. Peningkatan serupa juga didapatkan pada sumsum tulang dan timus.⁸ Kandungan tannin pada *Piper crocatum* meningkatkan IL-1. IL-1 merupakan sebuah sitokin yang dihasilkan oleh makrofag dan monosit dan memiliki peran penting dalam perkembangan respon inflamasi. Sitokin ini diperlukan dalam proliferasi limfosit. Selain meningkatkan proliferasi, IL-1 memiliki efek tambahan seperti demam. Berbeda dengan endotoksin bakteri yang meningkatkan IL-1 karena proses inflamasi, tannin meningkatkan IL-1 yang langsung digunakan untuk menginduksi limfosit T.¹⁹ Saponin meningkatkan proliferasi limfosit dan ekspresi dari IL-1, IL-2, IL-12, dan TNF- α .²⁰ Namun, peningkatan proliferasi limfosit pada kelompok Perlakuan 1 tidak bermakna. Hal ini menunjukkan bahwa dosis 30 mg/mencit yang diberikan pada kelompok Perlakuan 2 merupakan dosis yang dapat memberikan efek peningkatan proliferasi limfosit limpa secara signifikan.

Hasil penelitian ini bahwa pemberian ekstrak daun *Piper crocatum* dosis 100 mg/mencit pada kelompok Perlakuan 3 dapat mengakibatkan penurunan proliferasi limfosit. Flavonoid dalam ekstrak daun *Piper crocatum* dapat meningkatkan proliferasi limfosit walau dalam dosis rendah dengan meningkatkan produksi IL-2. Namun, flavonoid juga dapat bersifat sitotoksik dan menginduksi apoptosis sel limfoblas.²¹ Ekstrak yang memiliki kandungan flavonoid tinggi pada dosis 100 mg dapat mengakibatkan nekrosis jaringan

parenkim limpa.²² Saponin juga ditemukan bersifat lebih toksik pada administrasi parenteral dibandingkan per oral.²³ Alkaloid ditemukan dapat menghambat proliferasi limfosit pada konsentrasi yang lebih tinggi. Inhibisi proliferasi oleh alkaloid disebabkan oleh inhibisi IL-2.¹⁹ Hal ini menunjukkan bahwa dosis ekstrak daun *Piper crocatum* 100 mg/mencit yang merupakan 10x dari dosis yang diberikan pada kelompok Kontrol 1 sudah bersifat sitotoksik. Indeks proliferasi limfosit limpa pada kelompok Perlakuan 3 menunjukkan adanya penurunan proliferasi limfosit yang bermakna dari kelompok Kontrol 1, Perlakuan 1, dan Perlakuan 2.

Keterbatasan penelitian

Terdapat beberapa keterbatasan dalam pelaksanaan penelitian ini, antara lain:

1. Keterbatasan waktu

Waktu pemberian ekstrak daun *Piper crocatum* dalam penelitian ini adalah 14 hari sehingga menimbulkan efek toksisitas subakut.

2. Keterbatasan sampel

Jumlah sampel pada penelitian ini terbatas sehingga tidak terdapat kelompok kontrol yang hanya mendapatkan pakan standar sehingga tidak dapat mengetahui pengaruh infeksi *Salmonella* Typhimurium atau ekstrak daun *Piper crocatum* saja terhadap indeks proliferasi limfosit limpa.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

1. Pemberian ekstrak daun *Piper crocatum* secara per oral dengan dosis 10 mg/mencit/hari selama 14 tidak meningkatkan proliferasi limfosit pada limpa mencit Balb/c yang diinfeksi *Salmonella* Typhimurium dibanding dengan kelompok kontrol.
2. Pemberian ekstrak daun *Piper crocatum* secara per oral dengan dosis 30 mg/mencit/hari selama 14 meningkatkan proliferasi limfosit pada limpa mencit Balb/c yang diinfeksi *Salmonella* Typhimurium dibanding dengan kelompok kontrol.
3. Pemberian ekstrak daun *Piper crocatum* secara per oral dengan dosis 100 mg/mencit/hari selama 14 menurunkan proliferasi limfosit pada limpa mencit Balb/c yang diinfeksi *Salmonella* Typhimurium dibanding dengan kelompok kontrol.
4. Dosis optimal pemberian ekstrak daun *Piper crocatum* pada penelitian ini adalah 30 mg/mencit/hari secara per oral.

Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan dosis yang lebih bervariasi, rentang waktu pemberian ekstrak dan infeksi bakteri yang berbeda.
2. Perlu adanya penelitian lebih lanjut dengan menambahkan kelompok kontrol yang hanya mendapatkan pakan standar.
3. Perlu dilakukan penelitian mengenai toksisitas ekstrak daun *Piper crocatum*.
4. Perlu dilakukan uji fitokimia untuk mengetahui kandungan ekstrak daun *Piper crocatum* yang paling berpengaruh pada peningkatan proliferasi limfosit.

DAFTAR PUSTAKA

1. Lister INE, Vianny RD, Nasution AN, Zein R, Manjang Y, Munaf E. Antimicrobial Activities of Methanol Extract of Sirih Merah (*Piper crocatum* L.) Lleaf. *J Chem Pharm Res.* 2014;6:650–4.
2. Safithri M, Fahma F. Potency of *Piper crocatum* Decoction as an Antihyperglycemia in Rat Strain Sprague dawley. *J Biosci.* 2008;15(1):25–8.
3. Rinanda T, Zulfitri, Alga DM. Antibacterial Activity of Red Betel (*Piper crocatum*) Leaf Methanolic Extracts against Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *Proc 2nd Annu Int Conf Syiah Kuala Univ 2012 8th IMT-GT Uninet Biosci Conf.* 2012;2:270–5.
4. Hesthisara N. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* dan *Shigella dysenteriae* beserta Bioautografinya. Surakarta; 2011.
5. Candrasari A, Romas MA, Hasbi M, Astuti OR. Uji Daya Antimikroba Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper Crocatum* Ruiz & Pav .) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 , *Eschericia coli* ATCC 11229 dan *Candida albicans* ATCC 10231 Secara In Vitro. *Biomedika.* 2012;4(1):9–16.
6. Setyawati I, Safithri M, Bintang M. Effect of *Piper crocatum* Extract Against Weight Loss and Liver Enzyme Levels in High Fat Diet Induced Obese Rats. 2015;5(7):44–7.
7. Bachhav RS, Sambathkumar R. Evaluation of Immunomodulatory Activity of the Alkaloid Fraction of *Trichopus zeylanicus* Gaertn on Experimental Animals. *Indian J Pharm Sci* [Internet]. 2016 Nov 7;78(1):161–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4852567/>
8. Manu KA, Kuttan G. Immunomodulatory activities of Punarnavine, an alkaloid from *Boerhaavia diffusa*. *Immunopharmacol Immunobiol.* 2009;214(4):245–55.
9. Jose J, Sudhakaran S, Sumesh Kumar TM, Jayaraman S, Jayadevi Variyar E. Study of In vitro immunomodulatory effect of flavonoid isolated from *phyllanthus niruri* on human blood lymphocytes and evaluation of its antioxidant potential. *Int J Pharmacogn Phytochem Res.* 2014;6(2):284–9.

10. Wall DM, Srikanth C V, McCormick BA. Targeting Tumors with Salmonella Typhimurium - Potential for Therapy. *Oncotarget* [Internet]. 2010 Dec 3;1(8):721–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3157733/>
11. Fàbrega A, Vila J. Salmonella enterica serovar Typhimurium skills to succeed in the host: Virulence and regulation. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26(2):308–41.
12. Brooks GF, Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology. New York: McGraw Hill Medical; 2010.
13. McHugh ML. Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochem medica* [Internet]. 2012 [cited 2016 Jul 28];22(3):276–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23092060>
14. Lauralee S. Fisiologi Manusia dari Sel ke Sistem. 6th ed. Yesdelita N, editor. Jakarta: EGC; 2014.
15. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Lymphocytes and the Cellular Basis of Adaptive Immunity. 2002;
16. Cesta M. Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen. *Toxicol Pathol* [Internet]. 2006 [cited 2016 Jul 28];34(5):455–65. Available from: <http://tpx.sagepub.com/cgi/doi/10.1080/01926230600867743>
17. Widodo J. Demam Tifoid. In: Setiati S, Alwi I, editors. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. 6th ed. Jakarta Pusat: Interna Publishing; 2014. p. 549–61.
18. Thompson LJ, Dunstan SJ, Dolecek C, Perkins T, House D, Dougan G, et al. Transcriptional response in the peripheral blood of patients infected with Salmonella enterica serovar Typhi. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2009;106(52):22433–8. Available from: <http://www.pnas.org/content/106/52/22433.abstract>
19. Singh A. Herbalism, Phytochemistry and Ethnopharmacology [Internet]. United States of America: CRC Press; 2011. 385-388 p. Available from: <https://books.google.co.id/books?id=CIDRBQAAQBAJ>
20. Bhardwaj J, Chaudhary N, Seo H-J, Kim M-Y, Shin T-S, Kim J-D. Immunomodulatory effect of tea saponin in immune T-cells and T-lymphoma cells via regulation of Th1, Th2 immune response and MAPK/ERK2 signaling pathway. *Immunopharmacol Immunotoxicol* [Internet]. 2014 Jun [cited 2016 Jun 30];36(3):202–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24754510>
21. Konan NA, Lincopan N, Collantes Díaz IE, de Fátima Jacysyn J, Tanae Tiba MM, Pessini Amarante Mendes JG, et al. Cytotoxicity of cashew flavonoids towards malignant cell lines. *Exp Toxicol Pathol*. 2012;64(5):435–40.
22. Kadhem AA. Cytotoxicity and Some Immune Cells Stimulation Effects of Local SUMAC (RHUS CORARIA) on Cancer Cells and Mice. *World J Pharm Res*. 2015;4(1):357–72.
23. Parnham MJ. Immunomodulatory Agents from Plants [Internet]. Wagner H, editor. Dreieich: Springer Basel AG; 2012. (Progress in Inflammation Research). Available from: <https://books.google.co.id/books?id=-j3QBgAAQBAJ>