

Pengaruh Lupene-ol dan Lupene-on dari *Aegle marmelos* Correa terhadap Pelepasan Enzim β -hexoaminidase dari Sel *Mast*

AGUNG ENDRO NUGROHO^{1,4*}, SUGENG RIYANTO²,
MOHAMAD ASPOLLAH SUKARI³, KAZUTAKA MAEYAMA⁴

¹Department of Pharmacology and Clinical Pharmacy, Gadjah Mada University,
Jogjakarta, Indonesia.

²Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Gadjah Mada University,
Jogjakarta, Indonesia.

³Faculty of Science and Environmental Studies, Universiti Putra Malaysia.

⁴Department of Pharmacology, Informational Biomedicine, Ehime University Graduate School
of Medicine, Shitsugawa, Toon-shi, Ehime 791-0295, Japan.

Diterima, 20 Agustus 2008, Disetujui 21 Juli 2009

Abstract: 20(29)-lupene-3 α -ol and 20(29)-lupene-3-on are pentacyclic triterpenes isolated from *Aegle marmelos* Correa collected in Yogyakarta, Indonesia. Their molecular structures were confirmed in Universiti Putra Malaysia. These compounds were obtained from petroleum ether extract of the plant's stem bark. This study investigated the effects of the compounds on the β -hexoaminidase enzyme release from mast cell culture (RBL-2H3 cell line). DNP24-BSA was used as immunologic inducer for the β -hexoaminidase release from the mast cells. The enzyme release was determined by colorimetric methods with a substrate, *p*-nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-gluko-pyranocide, and a microplate reader at 405 nm. It was found that treatment with 20 ng/ml DNP24-BSA could stimulate the release of β -hexoaminidase from RBL-2H3 cells by 30.83 \pm 1.10%. Lupene-ol and lupene-on showed inhibitory effects on the β -hexoaminidase release from RBL-2H3 cells induced by DNP24-BSA in dose-dependent manner. At the dose of 100 μ M, lupene-ol and lupene-on inhibited the β -hexoaminidase release by 35.69 \pm 4.75% and 39.19 \pm 9.56%, respectively. The IC₅₀ values of their effects on DNP24-BSA experiments were 59.40 μ M and 72.51 μ M. The results suggested that the inhibitory effect of lupene-ol and lupene-on on the β -hexoaminidase release involved mechanisms related to the interaction of IgE on the RBL-2H3 cells surface or intracellular signal transductions found in the mast cell degranulation.

Key words: *Aegle marmelos* Correa, lupene-ol, lupene-on, mast cells, β -hexoaminidase enzyme.

PENDAHULUAN

ENZIM β -hexoaminidase merupakan suatu enzim lisosomal, dikenal juga dengan nama β -*N*-asetilhexoaminidase (hex, EC 3.2.1.52). Terdapat dua isoenzim, yaitu hex A yang tersusun oleh subunit α dan β dan hex B yang tersusun hanya oleh subunit β . Kedua isoenzim tersebut berbeda pada sifat keasaman, mobilitas elektroforesis dan termostabilitas. Keduanya mempunyai kesamaan dalam berat molekul, nilai Km, aktivitas penghambatan pada produk tertentu, maupun sifat imunologinya^(1,2). Kedua enzim hexoaminidase tersebut berfungsi sebagai katalis proses hidrolisis *N*-asetilgalaktosamin atau *N*-asetilglukosamin

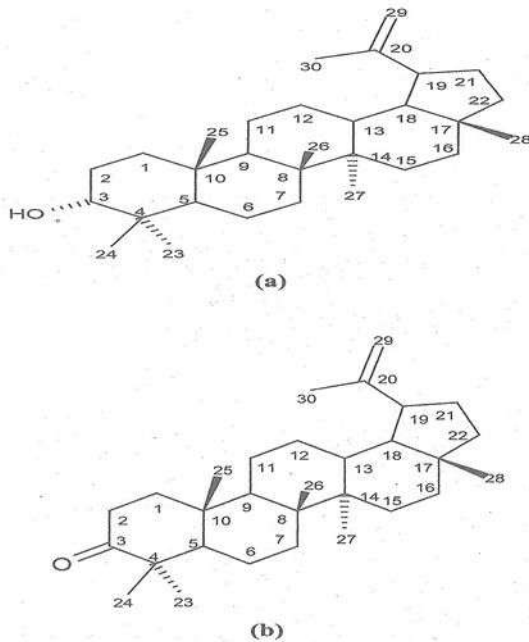
dari jembatan β -glikosidik. Dengan kata lain, hexoaminidase lisosomal mengkatalisis hidrolisis gugus *N*-asetilgalaktosamin dari gangliosida GM2 [Cer-Glc-Gal (AcNeu)-GalNac]. Dalam hal ini, defisiensi enzim hexoaminidase, terutama hex A, akan mengakibatkan akumulasi gangliosida GM2 dalam beberapa jaringan dan, lebih lanjut, bisa menimbulkan penyakit lisosomal (GM2 gangliosidosis), misalnya penyakit *Tay-Sachs* (TSD) dan penyakit *Sandhoff*⁽³⁾. Adanya mutasi gen yang mengkode subunit β menyebabkan defisiensi isoenzim hex A pada penyakit *Tay-Sachs*, dan mutasi gen yang mengkode subunit α menyebabkan defisiensi baik hex A dan B pada *Sandhoff's disease*⁽¹⁾. Enzim hexoaminidase juga dijumpai pada sel *mast* bersamadengan enzim lainnya: asam eksoglikosidase dan β -glukuronidase. Sel *mast* akan mensekresikan enzim-enzim tersebut

* Penulis korespondensi, Hp. 085643929723
e-mail: agungendronugroho@yahoo.com

bila mendapatkan pacuan, baik imunologis maupun non-immunologis^(2,4).

Aegle marmelos Correa (famili Rutaceae) merupakan tanaman asli dan tumbuh secara luas di kawasan Asia Tenggara dan Asia Selatan. Di Asia Selatan, tanaman tersebut disebut dengan nama Maja, Majapahit, Modjo, Bilak; sementara di Asia Selatan disebut dengan nama Bael, Beli, Bergiri, Sirphal.

Digunakan secara luas dalam pengobatan tradisional di Asia Tenggara dan Asia Selatan, *Aegle marmelos* Correa mempunyai beberapa aktivitas farmakologi, antara lain antiproliferatif, antiinflamasi, antipiretik, analgesik, antifungal, dan lain-lain^(5,6,7,8). Sugeng Riyanto (2003) berhasil mengisolasi beberapa senyawa dari tanaman tersebut yang diperoleh dari daerah Yogyakarta, Indonesia. Isolat tersebut antara lain aurepten, epoksiaurepten, marmin, skimmianin, zeorin, dustanin, lupene-ol, lupene-on, aegelin, dan lain-lain⁽⁹⁾.



Gambar 1. Struktur kimia dari lupene-ol (a) dan lupene-on (b)⁽⁹⁾.

20(29)-lupene-3 α -ol dan 20(29)-lupene-3-on merupakan senyawa triterpen pentasiklik^(10,11). Selain diperoleh dari tanaman *Aegle marmelos* Correa, kedua senyawa ini juga dapat diisolasi dari beberapa tanaman lain, termasuk *Bruguiera parviflora*, *Anadenanthera colubrina*, *Diospyros*

maritima, *Gardena saxatilis*^(12,13,14,15). Kedua senyawa tersebut mempunyai beberapa aktivitas farmakologi terutama pada proses inflamasi atau imunologi^(13,16). Bahkan, lupeol mampu menghambat alergi inflamasi saluran pernafasan atas (asma bronkial) pada mencit BALB/c, dengan menghambat produksi sitokin IL-4, IL-5 dan IL-13⁽¹⁷⁾. Penelitian kali ini mempelajari pengaruh lupene-ol and lupene-on yang diisolasi dari *Aegle marmelos* Correa terhadap pelepasan enzim β -hexosaminidase dari kultur sel mast (RBL-2H3 cell line) yang diinduksi secara imunologi. Aktivasi imunologi melibatkan interaksi secara cross-linking antara imunoglobulin E (IgE) dan antigen spesifik. Pada penelitian ini, antigen yang digunakan dalam proses imunologi tersebut adalah dinitrophenylated bovine serum albumin (DNP₂₄-BSA).

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Bahan uji utama adalah lupene-ol and lupene-on yang diisolasi dari *Aegle marmelos* Correa yang diperoleh dari daerah Yogyakarta, Indonesia. Penetapan struktur molekul kedua senyawa tersebut dilakukan di Faculty of Science and Environmental Studies (Universiti Putra Malaysia). Isolasi dan penetapan struktur tersebut dikerjakan oleh Sugeng Riyanto (Bagian Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi UGM). Sebagai substrat bagi enzim hexoaminidase digunakan p-nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranocide (Wako Pure Chemical Co., Osaka Japan). Sebagai antigen digunakan dinitrophenylated bovine serum albumin (DNP24-BSA) dari Bethesda, MD, dan monoklonal imunoglobulin E diperoleh dari Department of Pharmacology, School of Medicine, Ehime University. Bahan lainnya adalah medium MEM and antibiotika (kombinasi natrium penisilin G dan streptomisin sulfat) (Grand Island, NY), fetal calf serum (JRH Biosciences), PIPES (Dosindo, Kumamoto Japan).

METODE. Preparasi rat basophilic cell line (RBL-2H3). RBL-2H3 cell line dikultur menggunakan medium MEM yang mengandung fetal calf serum dan antibiotika, diinkubasi pada suhu 37°C dan CO₂ 5%. Sel tersebut ditumbuhkan dalam plate 24 sumuran dengan kepadatan sel 5x10⁵ tiap sumuran, dengan volume medium 400 μ l tiap sumuran. Sel tersebut kemudian disensitisasi dengan monoklonal IgE. Sel diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator suhu 37°C dan CO₂ 5%. Setelah itu, sel dicuci dua kali dengan larutan dapar PIPES 500 μ l, kemudian di-prainkubasi dengan PIPES (sebagai kontrol) atau larutan senyawa uji dalam PIPES (konsentrasi 1-100 μ M) sebanyak 180 μ l selama 10 menit pada suhu 37°C. Pada sel kemudian ditambahkan larutan penginduksi enzim

β -hexosaminidase, DNP₂₄-BSA 200 ng/mL, sebanyak 20 μ l tiap sumuran, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. *Plate* disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 3000 rpm, dan supernatan sebanyak 50 μ l dipindah ke tabung 1,5 ml. Ke dalam supernatan ditambahkan asam perklorat 3% sebanyak 250 μ l, dan dikocok. Kemudian, ditambahkan pula larutan KOH 2M/ KH₂PO₄ 1 M sebanyak 30 μ l, dicampur dan disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C. Supernatan siap ditetapkan kadar enzim hexoaminidase-nya. Untuk penetapan total enzim hexoaminidase, sebanyak 350 μ l larutan dapar PIPES ditambahkan pada 6 sumuran, kemudian disonifikasi. Terhadap larutan homogenat sel siap dilakukan penetapan enzim hexoaminidase.

Penetapan enzim β -hexoaminidase. Pada penetapan enzim β -hexoaminidase, supernatan sebanyak 50 μ l diinkubasi dengan 2,5 mM *p*-nitrofenil-2-asetamido-2-deoksi- β -D-glukopiranosida 100 μ l (dalam 50 mM larutan dapar natrium sitrat pH 4,5) selama 1 jam pada suhu 37°C. Setelah itu, sebanyak 20 μ l KOH 2 M / KH₂PO₄ 1 M ditambahkan pada campuran larutan tersebut, kemudian aktivitas enzim β -hexoaminidase ditetapkan menggunakan analisis kolorimetri dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 405 nm.

Analisis data. Data penelitian berupa absorbansi pada panjang gelombang 405 nm diubah menjadi persentase pelepasan enzim β -hexoaminidase dengan rumus: selisih antara absorbansi sel tersensitisasi antigen dan sel yang tidak tersensitisasi antigen (kontrol) dibagi dengan selisih antara absorbansi total kandungan enzim dan absorbansi kontrol, hasilnya dikalikan seratus. Semua data disajikan dalam bentuk *mean* \pm SEM. Untuk analisis statistika digunakan *one-way analysis of variance* (ANOVA), dilanjutkan dengan uji *least significant difference* (LSD). Tingkat kepercayaan yang digunakan adalah 95%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari efek penghambatan enzim β -hexoaminidase oleh 20(29)-lupene-3 α -ol dan 20(29)-lupene-3-on yang diisolasi dari tanaman *Aegle marmelos* Correa pada *rat basophilic cell line* yang diinduksi secara imunologis dengan DNP₂₄-BSA. *Dinitrophenylated bovine serum albumin* (DNP₂₄-BSA) merupakan antigen spesifik terhadap antibodi monoklonal IgE^(18,19,20). DNP₂₄-BSA menstimulasi pelepasan mediator dari sel *mast* dengan melakukan interaksi secara *cross-linking* terhadap bagian karbohidrat molekul IgE yang terhubung pada reseptor Fc ϵ RI. Interaksi ini akan merangsang serangkaian proses *signaling* intraseluler dalam sel *mast* dan akhirnya mampu melepaskan mediator dari sel *mast*

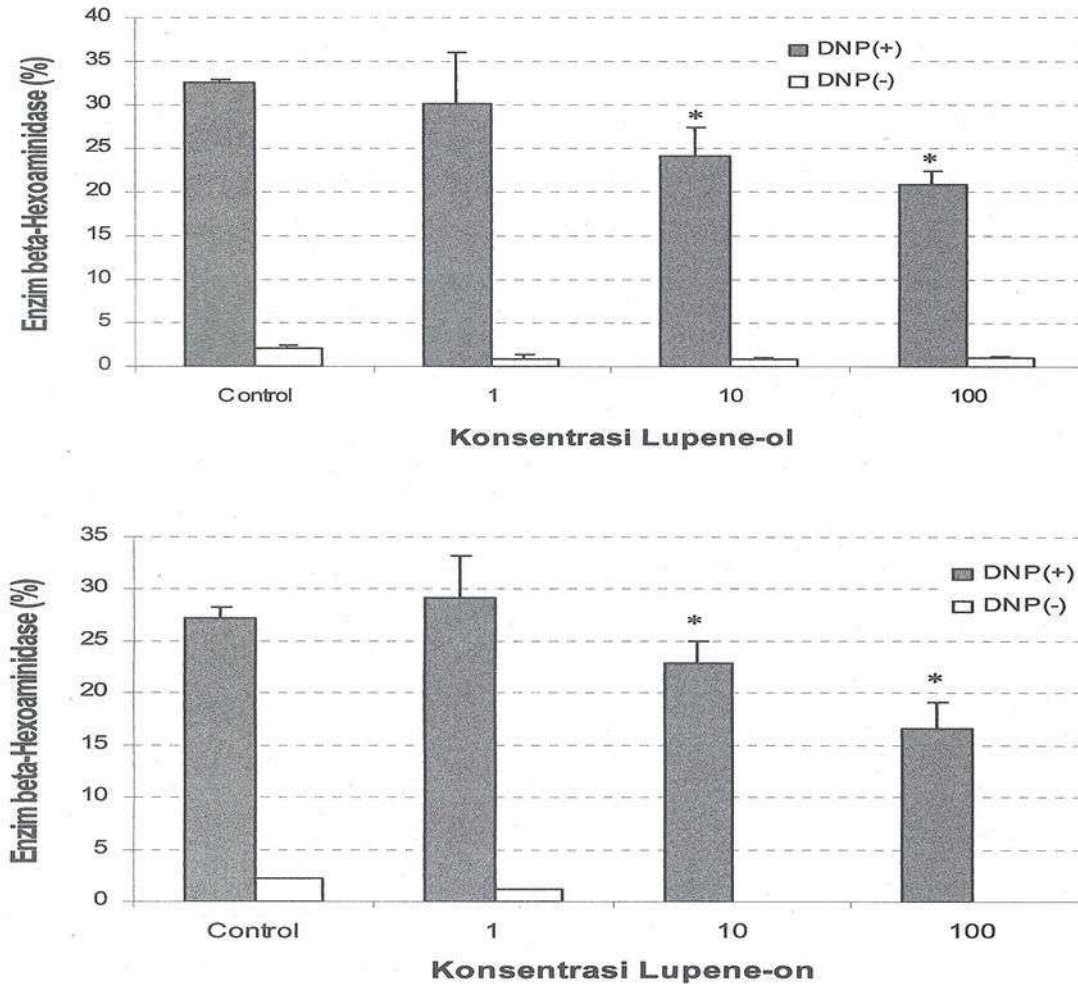
tersebut. Termasuk ke dalam mediator sel *mast* adalah mediator granul (misalnya histamin, proteoglikan, triptase, enzim β -hexoaminidase), mediator lipid atau eikosanoid (prostaglandin D₂, leukotrine C₄, *platelet activating factor*), dan sitokin^(21,22). Masing-masing mediator ini tersebut mempunyai andil dalam reaksi alergi-inflamasi. Hasil penelitian pengaruh lupene-ol dan lupene-on terhadap pelepasan enzim β -hexoaminidase dari kultur sel RBL-2H3 yang diinduksi antigen disajikan pada Gambar 2.

Pada penelitian ini, picuan imunologis dengan DNP₂₄-BSA dapat merangsang pelepasan enzim β -hexoaminidase dari RBL-2H3 sebesar 30,83 \pm 1,10% (n=5). Pada Gambar 2, 20(29)-lupene-3 α -ol dan 20(29)-lupene-3-on mampu menghambat pelepasan enzim β -hexoaminidase dari RBL-2H3 yang diinduksi secara imunologis dengan DNP₂₄-BSA. Konsentrasi senyawa uji yang digunakan dalam percobaan ini adalah 1, 10 dan 100 μ M. Pemberian kedua senyawa tersebut pada dosis terendah (1 μ M) belum mampu menunjukkan efek penghambatan secara bermakna (P>0,05). Pemberian lupene-ol dosis 10 dan 100 μ M pada kultur sel RBL-2H3 secara bermakna (P<0,05) menghambat enzim β -hexoaminidase berturut-turut sebesar 25,88 \pm 9,87% dan 35,69 \pm 4,75% (Tabel 1). Di lain pihak, lupene-on pada dosis 10 dan 100 μ M menghambat enzim β -hexoaminidase secara bermakna (P<0,05) berturut-turut sebesar 15,79 \pm 7,80% dan 39,19 \pm 9,56% (Tabel 1). Dalam hal tersebut, semakin tinggi konsentrasi lupene-ol dan lupene-on, semakin besar pula efek penghambatannya (*dose-dependent manner*).

Pada penelitian ini, baik lupene-ol dan lupene-on belum dapat menghambat pelepasan enzim β -hexoaminidase hingga 50%. Karena itu, IC₃₀ (konsentrasi yang digunakan untuk menimbulkan efek sebesar 30%) digunakan sebagai parameter potensi dari efek penghambatan kedua senyawa tersebut terhadap enzim β -hexoaminidase. Pada Tabel 1, IC₃₀ dari lupene-ol dan lupene-on berturut-turut adalah sebesar 59,40 dan 72,51 μ M.

Tabel 1. Persentase penghambatan enzim β -hexoaminidase dari kultur sel RBL-2H3 oleh lupene-ol dan lupene-on, beserta nilai IC₃₀-nya.

Konsentrasi (μ M)	Persentase penghambatan enzim β -hexoaminidase	
	20(29)-lupene-3 α -ol	20(29)-lupene-3-on
1	7,62 \pm 18,27	-7,25 \pm 26,40
10	25,88 \pm 9,87	15,79 \pm 7,80
100	35,69 \pm 4,75	39,19 \pm 9,56
IC ₃₀	59,40 μ M	72,51 μ M



Gambar 2. Histogram pengaruh lupene-ol dan lupene-on terhadap pelepasan enzim β -hexosaminidase dari kultur sel RBL-2H3 yang diinduksi DNP24-BSA 20 ng/mL. * $P < 0.05$ berbeda bermakna dibandingkan kontrol. □=tanpa antigen, ■= dengan antigen.

Pelepasan enzim β -hexoaminidase tanpa sensitisasi imunologis juga diamati pada percobaan ini. Fenomena tersebut dinamakan sebagai pelepasan enzim secara spontan (*spontaneous enzyme release*), mengacu pada penelitian Ikawati *et al.*⁽²³⁾ yang menggunakan histamin sebagai paramater mediator sel *mast*. Efek induksi spontan akan dipertimbangkan bermakna jika melebihi nilai 10%. Persentase pelepasan enzim β -hexoaminidase secara spontan oleh lupene-ol dan lupene-on disajikan pada Tabel 2. Pemberian lupene-ol dan lupene-on dengan konsentrasi 1, 10 dan 100 μ M tidak menunjukkan efek

pelepasan enzim secara spontan secara bermakna pada sel kultur RBL-2H3. Pada penelitian ini, 20(29)-lupene-3 α -ol merangsang pelepasan enzim β -hexoaminidase secara spontan hingga $1,63 \pm 0,19$ % (dosis 100 μ M). Di lain pihak, senyawa 20(29)-lupene-3-on hanya merangsang pelepasan enzim tersebut pada dosis rendah saja (Tabel 2).

Pada sel *mast*, reaksi imunologis melibatkan reaksi antara antigen dan antibodi. Immunoglobulin E (IgE) yang ditambahkan pada kultur sel RBL-2H3 sebelum penelitian akan menempel pada permukaan membran

Tabel 2. Prosentase pelepasan enzim β -hexoaminidase secara spontan (spontaneous release) oleh lupene-ol dan lupene-ol.

Konsentrasi (μ M)	Pelepasan enzim β -hexoaminidase secara spontan (%)	
	20(29)-lupene-3 α -ol	20(29)-lupene-3-on
1	0,82 \pm 0,52	1,15 \pm 0,60
10	0,89 \pm 0,009	-0,18 \pm 0,32
100	1,63 \pm 0,19	-0,32 \pm 0,38

sel *mast* pada reseptor Fc ϵ RI pada sel *mast*. Setelah inkubasi kultur sel tersebut dengan DNP₂₄-BSA yang berfungsi sebagai antigen, DNP₂₄-BSA tersebut segera berikatan dan membentuk jembatan antara dua molekul IgE yang menempel pada sel *mast* (*cross-linking*) yang kemudian akan mengaktifasi tirosin kinase dan mengaktifkan fosfolipase C. Selanjutnya, fosfolipase C menghidrolisis fosfatidil inositol (PI) menjadi inositol trifosfat (IP3) dan 1,2-diasilgliserol (DAG). Inositol trifosfat akan menghasilkan peningkatan kadar ion kalsium intraseluler, baik dari *intracellular Ca²⁺ pool* maupun influks Ca^{2+} sehingga mengakibatkan degranulasi sel *mast*. Sementara itu, 1,2-diasilgliserol mengaktifkan protein kinase C (PKC) kemudian secara sinergis juga merangsang degranulasi sel *mast*. Degranulasi terjadi melalui proses eksositosis yang akhirnya melepaskan beberapa mediator, di antaranya adalah β -hexoaminidase^(21,22,24).

20(29)-lupene-3 α -ol dan 20(29)-lupene-3-on merupakan senyawa triterpen pentasiklik^(10,11). Pada percobaan ini kedua senyawa tersebut diisolasi oleh Sugeng Riyanto dari tanaman *Aegle marmelos* Correa yang diperoleh dari daerah Yogyakarta, Indonesia. Penetapan struktur molekul dari zeorin dilakukan di *Faculty of Science and Environmental Studies*, Universiti Putra Malaysia⁽⁹⁾. Kedua senyawa tersebut dilaporkan mempunyai pengaruh pada reaksi imunologi dan inflamasi^(13,16). Pada penelitian ini, baik lupene-ol maupun lupene-on mampu menghambat pelepasan enzim β -hexoaminidase dari kultur sel RBL-2H3 yang diinduksi secara imunologis. Di samping itu, kedua senyawa itu tidak mempengaruhi sel *mast* saat tidak diinduksi oleh antigen. Artinya, kedua senyawa tersebut tidak merangsang pelepasan enzim β -hexoaminidase secara spontan (*spontaneous enzyme release*). Berdasarkan fakta ini dapat dikatakan bahwa 20(29)-lupene-3 α -ol dan 20(29)-lupene-3-on menghambat enzim β -hexoaminidase dengan melibatkan penghambatan pada proses interaksi antigen-antibodi (imunologi) atau proses transduksi sinyal intraseluler pada sel *mast* akibat reaksi imunologis.

Pada penelitian antialergi lainnya, 20(29)-lupene-3 α -ol yang sudah dikenal mempunyai efek anti-arthritis mampu menghambat beberapa faktor sistem imun,

yaitu aktivitas fagositik (*cell-killing*) dari makrofag, dan aktivitas T-limfosit, termasuk perangsangan sitokin yang diperantarai sel T CD4⁺⁽²⁵⁾. Di samping itu, senyawa tersebut juga menghambat alergi inflamasi pada saluran pernafasan atas pada mencit BALB/c yang diinduksi ovalbumin. Dalam hal ini, ovalbumin berfungsi sebagai antigen. Pada percobaan tersebut, lupene-ol menyebabkan penurunan jumlah sel dan eosinofil pada sampel BALF (*bronchoalveolar lavage fluid*). Lupene-ol juga menurunkan produksi mukus dan inflamasi pada paru-paru⁽¹⁷⁾.

Dari hasil penelitian antiinflamasi, 20(29)-lupene-3 α -ol dan 20(29)-lupene-3-on dilaporkan poten dalam menghambat aktivitas 15-sLO (*soybean lipoxigenase-1*)⁽¹³⁾. SLO merupakan 15-LOX (*lipoxigenase*) yang diperoleh dari tanaman, berperan sebagai katalisator pada reaksi oksidasi perubahan asam linoleat menjadi 13-hidroperoksida-asam oktadekadienoat (13-HPODE). 15-LOX sendiri merupakan tipe lipoksigenase utama yang berfungsi memasukkan gugus dioksigen pada rantai C-15 dari asam arakidonat. Efek oksidatif dari 15-LOX berperan dalam reaksi inflamasi atau patogenesis aterosklerosis⁽²⁶⁾. Lupene-ol juga mampu menghambat produksi prostaglandin E₂ (PGE₂) pada makrofag yang distimulasi oleh A23187, namun tidak mempengaruhi pelepasan leukotrien C₄. Dari hasil tersebut, lupene-ol kemungkinan besar mempengaruhi aktivitas enzim siklooksigenase (COX). Lupene-ol menghambat produksi sitokin (*tumor necrosis factor-alpha* dan interleukin-1 beta) pada makrofag yang distimulasi dengan lipopolisakarida⁽²⁷⁾. Pada penelitian *in vivo*, lupene-ol menunjukkan aktivitas anti-inflamasi pada hewan percobaan terinduksi karagenin, dan efek tersebut melibatkan penghambatan pada enzim siklooksigenase atau produksi prostanoid^(28,29,30).

SIMPULAN

Senyawa 20(29)-lupene-3 α -ol dan 20(29)-lupene-3-on yang diisolasi dari *Aegle marmelos* Correa mampu menunjukkan efek penghambatan terhadap pelepasan mediator sel *mast*, yaitu enzim β -hexoaminidase, dengan melibatkan penghambatan pada proses interaksi antara antigen-antibodi (imunologi) atau proses sinyal transduksi intraseluler pada sel *mast* akibat reaksi imunologis tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

1. Casal JA, Cano E, Tutor JC. Beta-hexosaminidase isoenzyme profiles in serum, plasma, platelets and mononuclear, polymorphonuclear and unfractionated total leukocytes. *Clin Biochem*. 2005;38(10):938-42.

2. Mahuran DJ. β -hexosaminidase: biosynthesis and processing of the normal enzyme, and identification of mutations causing Jewish Tay-Sachs disease. *Clin Biochem.* 1995.28(2): 101-6.
3. Marinkovic DV and Marinkovic JN. Purification of two hexosaminidases from human kidney. *Biochem J.* 1977.163:133-40.
4. Schwartz LB, Austen KF, Wasserman SI. Immunologic release of beta-hexosaminidase and beta-glucuronidase from purified rat serosal mast cells. *J Immunol.* 1979.123(4):1445-50.
5. Lampronti I, Martello D, Bianchi N, Borgatti M, Lambertini E, Piva R, Jabbar S, Choudhuri MS, Khan MT, Gambari R. In vitro antiproliferative effects on human tumor cell lines of extracts from the Bangladeshi medicinal plant *Aegle marmelos* Correa. *Phytomedicine.* 2003.10(4): 300-8.
6. Arul V, Miyazaki S, Dhananjayan R. Studies on the antiinflammatory, antipyretic, and analgesic properties of the leaves of *Aegle marmelos* Corr. *J Ethnopharmacol.* 2005.96(1-2):159-63.
7. Upadhya S, Shanbhag KK, Suneetha G, Balachandra NM, Upadhya S. A study of hypoglycemic and antioxidant activity of *Aegle marmelos* in alloxan induced diabetic rats. *Indian J Physiol Pharmacol.* 2004.48(4):476-80.
8. Rana BK, Singh UP, Taneja V. Antifungal activity and kinetics of inhibition by essential oil isolated from leaves of *Aegle marmelos*. *J Ethnopharmacol.* 1997.57(1):29-34.
9. Riyanto S. Phytochemical studies and bioactivity tests of *Murraya paniculata* Jack, *Aegle marmelos* Correa, and *Zingiber amaricans* Blume [dissertation]. Selangor: Universiti Putra Malaysia; 2003.
10. Sunitha S, Nagaraj M, Varalakshmi P. Hepatoprotective effect of lupeol and lupeol linoleate on tissue antioxidant defence system in cadmium-induced hepatotoxicity in rats. *Fitoterapia.* 2001.72(5):516-23.
11. Lima EM, Medeiros JM, Davin LB. Pentacyclic triterpenes from *Euphorbia stygiana*. *Phytochemistry.* 2003.63(4):421-5.
12. Chumkaew P, Kato S, Chantrapromma K. A new triterpenoid ester from the fruits of *Bruguiera parviflora*. *Chem Pharm Bull.* 2005.53(1):95-6.
13. Gutierrez-Lugo MT, Deschamps JD, Holman TR, Suarez E, Timmermann BN. Lipoxygenase inhibition by anadanthoflavone, a new flavonoid from the aerial parts of *Anadenanthera colubrina*. *Planta Med.* 2004.70(3):263-5.
14. Kuo YH, Chang CI, Li SY, Chou CJ, Chen CF, Kuo YH, Lee KH. Cytotoxic constituents from the stems of *Diospyros maritima*. *Planta Med.* 1997.63(4):363-5.
15. Suksamran A, Tanachatchairatana T, Kanokmedhakul S. Antiplasmodial triterpenes from twigs of *Gardenia saxatilis*. *J Ethnopharmacol.* 2003.88(2-3):275-57.
16. Geetha T, Varalakshmi P. Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats. *J Ethnopharmacol.* 2001.76(1):77-80.
17. Vasconcelos JF, Teixeira MM, Barbosa-Filho JM, Lúcio AS, Almeida JR, de Queiroz LP, Ribeiro-Dos-Santos R, Soares MB. The triterpenoid lupeol attenuates allergic airway inflammation in a murine model. *Int Immunopharmacol.* 2008. 8(9):1216-21.
18. Botcher I, Ulrich M, Hirayama N, Ovary Z. Production of monoclonal mouse IgE antibodies with DNP specificity by hybrid cell lines. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1980.61(2):248-50.
19. Liu FT, Bohn JW, Ferry EL, Yamamoto H, Molinaro CA, Sherman LA, Klinman NR, Katz DH. Monoclonal dinitrophenyl-specific murine IgE antibody: preparation, isolation, and characterization. *J Immunol.* 1980.124(6): 2728-37.
20. Orida N, Feldman JD, Katz DH, Liu FT. IgE-mediated chemotaxis of rat basophilic leukemia cells towards specific antigen. *J Exp Med.* 1983. 157(6):2166-71.
21. Dale MM, Foreman JC, Fan TD. *Textbook of Immunopharmacology.* 3rd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publication; p.21-34.
22. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiol Rev.* 1997.77:1033-64.
23. Ikawati Z, Wahyuono S, Maeyama K. Screening of several Indonesian medicinal plants for their inhibitory effect on histamine release from RBL-2H3 cells. *J Ethnopharmacol.* 2001.75(2-3): 249-56.
24. Subowo. *Imunologi klinik.* Bandung: Angkasa; 1993. hal.9-35.
25. Bani S, Kaul A, Khan B, Ahmad SF, Suri KA, Gupta BD, Satti NK, Qazi GN. Suppression of T lymphocyte activity by lupeol isolated from *Crataeva religiosa*. *Phytother Res.* 2006.20(4):279-87.
26. Lapenna D, Ciofani G, Pierdomenico SD, Giamberardino MA, Cuccurullo F. Dihydrolyipoic acid inhibits 15-lipoxygenase-dependent lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med.* 2003.35(10):1203-9.
27. Fernandez MA, de las Heras B, García MD, Saenz MT, Villar A. New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. *J Pharm Pharmacol.* 2001.53(11):1533-9.
28. Ramirez Apan AA, Perez-Castorena AL, de Vivar AR. Anti-inflammatory constituents of *Mortonia greggii* Gray. *Z Naturforsch.* 2004. 59(3-4):237-43.
29. Lima LM, Perazzo FF, Tavares CJC, Bastos JK. Anti-inflammatory and analgesic activities of the ethanolic extracts from *Zanthoxylum riedelianum* (Rutaceae) leaves and stem bark. *J Pharm Pharmacol.* 2007.59(8):1151-8.
30. Nguemfo EL, Dimo T, Dongmo AB, Azebaze AG, Alaoui K, Asongalem AE, Cherrah Y, Kamtchouing P. Anti-oxidative and anti-inflammatory activities of some isolated constituents from the stem bark of *Allanblackia monticola* Staner L.C (Guttiferae). *Inflammopharmacology.* 2009.17(1):37-41.