

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN SIRIH MERAH (*PIPER CROCATUM*) TERHADAP GAMBARAN LIMFOSIT DARAH TEPI STUDI PADA MENCIT BALB/C YANG DIINFEKSI *SALMONELLA* TYPHIMURIUM

Levina Ameline Moelyono¹, Akhmad Ismail², Neni Susilaningsih²

¹Mahasiswa Program Studi S-1 Ilmu Kedokteran Umum, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

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

ABSTRAK

Latar Belakang: Flavonoid merupakan senyawa yang terkandung dalam ekstrak daun sirih merah, yang memiliki sifat antikanker, antiseptik, antiinflamasi, dan imunomodulator. Sebagai imunomodulator, flavonoid dapat meningkatkan respon TH1 yang merupakan komponen sistem imun adaptif yang dimediasi limfosit T CD4⁺, yang berperan pada imunitas terhadap bakteri intraseluler, seperti *Salmonella* Typhimurium.

Tujuan: Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun sirih merah terhadap gambaran limfosit darah tepi mencit Balb/c yang diinfeksi *Salmonella* Typhimurium.

Metode: Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan *post test only control group design*. Sampel sebanyak 25 ekor mencit Balb/c yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi, dilakukan randomisasi menjadi 5 kelompok dan kemudian dilakukan adaptasi selama 7 hari. Kelompok K1 diberi ekstrak daun sirih merah dengan dosis 10 mg/hari/mencit selama 14 hari. Kelompok K2 diinfeksi dengan *Salmonella* Typhimurium sebanyak 10⁵ CFU intraperitoneal pada hari ke-10. Kelompok P1, P2, dan P3 diberi ekstrak daun sirih merah per oral dengan dosis masing-masing 10, 30, dan 100 mg/mencit/hari selama 14 hari dan diinfeksi dengan *Salmonella* Typhimurium sebanyak 10⁵ CFU intraperitoneal pada hari ke-10. Pada hari ke-22 dilakukan pengambilan sampel.

Hasil : Rerata presentase limfosit tertinggi didapatkan pada kelompok P3 (mean=59.20±6.535). Pada uji *Post Hoc Tukey* didapatkan adanya perbedaan signifikan gambaran limfosit darah tepi antar kelompok P1 dan P3 (p=0.048).

Simpulan: Terdapat peningkatan presentase limfosit darah tepi yang signifikan pada kelompok P3 dibanding kelompok P1.

Kata Kunci: *Piper crocatum*, limfosit darah tepi, *Salmonella* Typhimurium

ABSTRACT

THE EFFECT OF RED BETEL (*PIPER CROCATUM*) LEAVES EXTRACT ON PERIPHERAL LYMPHOCYTE COUNT IN BALB/C MICE INFECTED BY *SALMONELLA* TYPHIMURIUM

Background: Flavonoid is a compound contained in red betel leaves extract, which has anticancer, antiseptic, antiinflammation, and immunomodulatory effects. As an immunomodulator, flavonoid increases TH1 response as a part of adaptive immunity mediated by CD4⁺ T lymphocyte, which is important in immunity against intracellular bacterias, such as *Salmonella* Typhimurium.

Aim: To determine the effect of red betel leaves extract on peripheral lymphocyte count in Balb/c mice which were infected by *Salmonella* Typhimurium.

Methods: This was an experimental laboratoric research with a post test only control group design. There were 25 Balb/c mice, which had met the inclusion and exclusion criteria, randomized into 5 groups and adapted for 7 days. The K1 group was given 10 mgs/day/mouse red betel leaves extract for 14 days. The K2 group was infected by 10^5 CFU *Salmonella* Typhimurium intraperitoneally on the 10th day. Experimental group 1, 2, and 3 (P1, P2, and P3) were given 10, 30, and 100 mgs/mouse/day red betel leaves extract for 14 days and were infected by 10^5 CFU *Salmonella* Typhimurium intraperitoneally on the 10th day. On the 22nd day samples were taken.

Results : Highest mean of lymphocyte count is found in experimental group 3 (mean= 59.20 ± 6.535). Post Hoc Tukey Test shows significant difference between experimental group 1 and experimental group 3 ($p=0.048$).

Conclusion: There is significant higher lymphocyte count in experimental group 3 compared to experimental group 1.

Keywords : Piper crocatum, peripheral lymphocyte count, *Salmonella* Typhimurium

PENDAHULUAN

Salmonellosis merupakan penyakit yang ditularkan melalui makanan dengan angka kejadian terbanyak, serta memiliki distribusi yang luas. Diperkirakan setiap tahunnya terdapat 10 juta kasus salmonellosis. Dari 2500 serotipe bakteri penyebab penyakit ini, *Salmonella* Enteritidis dan *Salmonella* Typhimurium merupakan dua serotipe yang paling sering dilaporkan. *Salmonella* Typhimurium merupakan kuman batang gram negatif yang bersifat anaerob fakultatif. Bakteri ini seringkali bersifat patogen terhadap manusia dan merupakan bakteri intraseluler.^{1, 2} Infeksi *Salmonella* dewasa ini semakin memperoleh perhatian dari dunia luas dikarenakan peningkatan resistensi bakteri ini terhadap antibiotik yang biasa digunakan, sehingga menyebabkan pilihan terapi menjadi semakin terbatas.³

Mikroorganisme fakultatif intraseluler seperti *Salmonella* Typhimurium memiliki kemampuan untuk bertahan hidup dan bahkan bereplikasi di dalam sel fagosit yang merupakan salah satu bagian dari sistem imun bawaan, sehingga sel T CD4⁺ dan sel T CD8⁺, terutama sel T CD 4⁺ yang merupakan bagian dari sistem imun adaptif terkhusus imunitas seluler, memiliki peran penting dalam respon primer dan sekunder terhadap infeksi bakteri ini.^{4, 5} Pada imunitas terhadap bakteri intraseluler, sel T CD4⁺ akan berdeferensiasi menjadi sel efektor TH1 oleh pengaruh IL-2 yang merupakan sitokin proinflamatori dan IL-12 yang diproduksi makrofag dan sel dendritik yang terinfeksi. Sel T kemudian akan mengekspresikan CD40 dan mensekresikan IFN- γ , TNF- α , serta IL-2 yang akan mengaktifkan makrofag untuk memproduksi substansi mikrobisidal, termasuk ROS, NO, dan enzim lisosomal.^{5, 6}

Dua puluh persen dari total jumlah leukosit manusia merupakan limfosit. Bertanggung jawab terhadap kontrol sistem imun adaptif, limfosit berdasarkan fungsi dan penanda permukaannya dibedakan menjadi dua kelas, yaitu limfosit B yang berperan dalam imunitas humoral, dan limfosit T yang berperan dalam imunitas selular.⁷ Adapun kedua kelas limfosit ini tidak dapat dibedakan secara morfologis.¹ Hanya sebesar 5% dari jumlah limfosit total beredar dalam pembuluh darah dan limfe sedangkan sisanya tersimpan di organ limfoid, baik primer maupun sekunder.⁸ Limfosit darah tepi yang bersirkulasi merupakan campuran dari limfosit B dan Limfosit T yang berasal dari sumsum tulang dan timus yang sedang menuju ke organ limfoid, limfosit yang keluar dari limfonodi melalui sistem limfatik yang terkumpul pada duktus thorasikus dan menuju ke vena cava superior, serta limfosit yang dikeluarkan langsung melalui sinus vaskular dari organ limpa.⁹

Sirih merah merupakan salah satu tanaman obat tradisional yang sejak lama digunakan di Indonesia.¹⁰ Sirih merah terbukti mengandung senyawa fitokimia meliputi alkaloid, flavonoid, karvakol, eugenol, saponin, tanin, dan minyak atsiri. Berbagai senyawa yang terkandung di dalam ekstrak sirih merah, terutama di bagian daun tumbuhan terbukti memiliki banyak manfaat, salah satunya senyawa flavonoid. Flavonoid terbukti memiliki sifat antioksidan, antidiabetik, antikanker, antiseptik, dan anti-inflamasi.¹¹ Beberapa penelitian terdahulu juga menyebutkan bahwa ekstrak sirih merah juga memiliki manfaat sebagai imunomodulator.^{12, 13} Sebagai imunomodulator senyawa flavonoid akan meningkatkan respon TH1, menstimulasi proliferasi limfosit T serta meningkatkan proporsi limosit T CD4⁺/ Limfosit T CD8⁺, dan meningkatkan hitung limfosit T pada usus.^{14, 15}

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain *post test only control group design*. Sebelum mencit diberi perlakuan dilakukan randomisasi untuk membagi mencit menjadi 5 kelompok, yaitu kelompok kontrol yang terdiri dari kontrol 1 (K1) dan kontrol 2 (K2), serta kelompok perlakuan yang terdiri dari perlakuan 1 (P1), perlakuan 2 (P2), dan perlakuan 3 (P3). Besar sampel ditentukan berdasarkan pedoman WHO mengenai penggunaan hewan coba untuk penelitian eksperimental, yakni jumlah sampel minimal 5 ekor tiap kelompok.¹⁶ Sehingga penelitian ini menggunakan jumlah sampel 5 ekor tiap kelompok. Mencit kemudian dilakukan adaptasi selama 7 hari sebelum diberi perlakuan. Pada kelompok kontrol 1 mencit diberi ekstrak daun sirih merah per oral dengan dosis 10 mg/mencit/hari

selama 14 hari. Pada kelompok kontrol 2 mencit diinfeksi dengan *Salmonella* Typhimurium intraperitoneal sebanyak 10^5 CFU pada hari ke-10. Pada kelompok perlakuan 1, 2, dan 3, mencit diberi ekstrak daun sirih merah per oral dengan dosis masing-masing 10, 30, dan 100 mg/mencit/hari selama 14 hari dan pada hari ke-10 diinfeksi dengan *Salmonella* Typhimurium sebanyak 10^5 CFU intraperitoneal. Pada hari ke-22 dilakukan pengambilan sampel darah tepi dengan cara mencit terlebih dahulu dianestesi dengan eter, setelah itu dilakukan pemotongan ekor mencit, dan kemudian dilakukan hapusan darah tepi menggunakan *object glass* dan *deck glass*. Mencit kemudian diterminasi dengan cara disklokasi servikal.

Gambaran limfosit darah tepi merupakan presentase limfosit darah tepi yang didapatkan dari hitung jenis leukosit darah tepi yang dilakukan pada preparat hapus darah tepi yang dilakukan pengecatan Giemsa pada zona ke 4, 5, dan 6 menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Kriteria inklusi penelitian ini adalah mencit Balb/c jantan, berusia 8-12 minggu, memiliki berat badan 20-25 gram, sehat, tidak memiliki kecacatan anatomis, dan tidak sakit selama adaptasi. Kriteria eksklusi dari penelitian ini adalah selama diberi perlakuan mencit tampak sakit yang ditunjukkan dengan gerakan mencit yang tidak aktif dan mencit yang mati selama adaptasi dan perlakuan.

Variabel bebas penelitian ini adalah ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) dosis bertingkat peroral. Variabel tergantung penelitian ini adalah gambaran limfosit darah tepi. Pada kelima kelompok penelitian dilakukan pengolahan dan analisis data secara studi komparatif mengenai pengaruh pemberian ekstrak daun sirih merah terhadap gambaran limfosit darah tepi pada mencit Balb/c yang diinfeksi *Salmonella* Typhimurium dengan kelompok kontrol.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis sampel

Penelitian ini menggunakan sampel penelitian 25 ekor mencit Balb/c berusia 8-12 minggu, dengan berat badan 20-25 gram, sehat, dan tidak memiliki kelainan anatomis, yang dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu kelompok kontrol 1 (K1), kontrol 2 (K2), perlakuan 1 (P1), perlakuan 2 (P2), dan perlakuan 3 (P3). Jumlah sampel masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor mencit. Sampel diperoleh dari Unit Hewan Coba Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Penelitian ini dilakukan selama 21 hari. Pada hari ke-22 semua mencit diambil sampel darah tepi dengan cara pemotongan ekor, kemudian dilakukan terminasi dengan cara dislokasi servikal.

Analisis diskriptif**Tabel 1** Hasil analisis deskriptif presentase limfosit darah tepi

Kelompok	Presentase Limfosit Darah Tepi	
	Mean	Standar deviasi
Kontrol 1	57.40	10.761
Kontrol 2	53.20	17.598
Perlakuan 1	33.20	14.412
Perlakuan 2	40.20	15.959
Perlakuan 3	59.20	6.535

Tabel 1 menunjukkan rerata presentase limfosit terkecil adalah pada perlakuan 1 (33.20 ± 14.412), sedangkan rerata presentase limfosit terbesar adalah pada perlakuan 3 (59.20 ± 6.535).

Analisis inferensial

Hasil analisis uji *One Way Anova* didapatkan $p < 0.05$ ($p=0.026$), yang berarti terdapat perbedaan gambaran limfosit darah tepi yang bermakna antar kelompok. Untuk mengetahui perbedaan antar kelompok penelitian dilakukan uji *Post Hoc Tukey*. Hasil uji analisis pada data rerata presentase limfosit yang didapatkan dari hitung jenis leukosit darah tepi dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Nilai P pada uji *Post Hoc Tukey*

Kelompok	K1	K2	P1	P2	P3
K1	-	0.988	0.073	0.305	1.000
K2	0.988	-	0.180	0.570	0.955
P1	0.073	0.180	-	0.924	0.048
P2	0.305	0.570	0.924	-	0.219
P3	1.000	0.955	0.048	0.219	-

Tabel 2 menunjukkan adanya perbedaan bermakna pada rerata presentase limfosit yang didapatkan dari hitung jenis leukosit darah tepi antar kelompok perlakuan 1 dan kelompok perlakuan 3 dengan nilai $p=0.048$. Sedangkan antar kelompok – kelompok lain tidak didapatkan perbedaan bermakna.

Imunitas seluler yang dimediasi oleh limfosit, merupakan salah satu mekanisme respon imun *host* terhadap patogen intraseluler yang menginfeksi tubuh manusia.¹⁷ Sel T CD4⁺ dan sel T CD8⁺, terutama sel T CD 4⁺, memiliki peran penting dalam respon primer dan sekunder terhadap bakteri intraseluler salah satunya contohnya adalah *Salmonella Typhimurium* yang digunakan dalam penelitian ini.¹⁸

Sirih merah (*Piper crocatum*) berdasarkan berbagai sumber dikatakan memberikan pengaruh terhadap respon imun tubuh terutama respon imun adaptif yang dimediasi oleh limfosit T oleh karena kandungan beberapa senyawanya, salah satunya flavonoid. Senyawa *epicatechin*, *catechin*, dan *procyanidins* yang merupakan beberapa kelas dari flavonoid dapat meningkatkan respon TH1 dan meningkatkan hitung limfosit T.¹⁴ Sel TH1 merupakan hasil diferensiasi dari sel T CD4⁺ yang dipengaruhi oleh salah satunya IL-2 yang merupakan salah satu sitokin proinflamatori. Adapun sel TH1 dapat meningkatkan respon imun terhadap bakteri intraseluler melalui peningkatan produksi IFN- γ , TNF- α , dan IL-2 yang akan mengaktivasi sel dendritik dan makrofag untuk melakukan fungsi bakterisidal.⁶ Lebih lanjut flavonoid juga dikatakan dapat meningkatkan ekspresi IL-2.¹⁹ Sehingga hal ini mendukung hipotesis pemberian ekstrak daun sirih merah dapat meningkatkan presentase limfosit yang didapatkan dari hitung jenis leukosit darah tepi melalui jalur peningkatan ekspresi IL-2.

Hasil uji hipotesis *One Way Anova* penelitian ini menyebutkan bahwa pemberian ekstrak daun sirih merah memberikan perbedaan gambaran limfosit darah tepi mencit. Namun bertolak belakang dengan hipotesis penelitian, pada analisis perbedaan antar kelompok yang dilakukan dengan uji *Post Hoc Tukey* didapatkan hasil perbedaan signifikan hanya didapatkan pada uji terhadap kelompok perlakuan 1 yang diberi ekstrak daun sirih merah per oral dengan dosis 10 mg/mencit/hari selama 14 hari, dan kemudian pada hari ke-10 diinfeksi dengan *Salmonella Typhimurium* sebanyak 10⁵ CFU intraperitoneal dibanding kelompok perlakuan 3 yang diberi ekstrak daun sirih merah per oral dengan dosis 100 mg/mencit/hari selama 14 hari, dan pada hari ke-10 diinfeksi dengan *Salmonella Typhimurium* sebanyak 10⁵ CFU intraperitoneal.

Hasil ini sejalan dengan penelitian Hartini, dkk (2014) yang menyatakan bahwa pemberian ekstrak daun sirih merah dengan dosis 2,5 mg, 5mg, dan 10 mg/ kg BB mencit tidak menyebabkan perubahan proliferasi limfosit signifikan antara kelompok perlakuan dengan kontrol.¹² Sebagai tambahan penelitian Wahjuni, dkk (2016) menyatakan pemberian ekstrak daun sirih merah dengan dosis 150 mg/kg BB mencit memiliki signifikansi terbesar

bila dibandingkan dengan pemberian ekstrak dauh sirih merah dengan dosis 50 maupun 100 mg terhadap aktivitas anti inflamasi yang diukur berdasarkan penurunan sitokin proinflamasi.²⁰ Penelitian Wahjuni, dkk (2016) memberikan gambaran bahwa efektifitas pemberian ekstrak daun sirih merah bergantung pada peningkatan dosis yang diberikan. Apabila dibandingkan, hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian ini, yaitu pada presentase limfosit dari hitung jenis leukosit darah tepi tertinggi didapatkan pada P3 apabila dibandingkan dengan P2 dan P1 (mean $p_3=59,20\pm 6.535$, $p_2=40.20\pm 15.959$, dan $p_1=33.20\pm 14.412$), yang masing-masing memiliki dosis ekstrak sirih merah yang lebih rendah dibandingkan dengan P3. Sedangkan peningkatan presentase limfosit darah tepi sebagai parameter aktivitas sistem imun adaptif pada infeksi *Salmonella* Typhimurium terhadap K2 yang tidak diberi ekstrak daun sirih merah dan diinfeksi *Salmonella* Typhimurium hanya terjadi pada kelompok P3, walaupun secara statistik peningkatan ini tidak berbeda secara signifikan. Secara statistik perbedaan signifikan presentase limfosit darah tepi hanya didapatkan antar kelompok P1 dan P3 yang ditunjukkan pada tabel 2 diatas.

Gambaran terjadinya penurunan presentase limfosit pada P1 dan P2 yang didapatkan dari penghitungan mean dibandingkan dengan K1 dan K2 agaknya kurang sesuai dengan sumber dari literatur yang menyatakan bahwa selama infeksi bakteri intraseluler terjadi peningkatan respon limfosit terutama sel T CD4⁺.²¹ Selain itu pemberian ekstrak daun sirih merah yang juga dikatakan dapat meningkatkan presentase limfosit darah tepi khususnya limfosit T nampaknya tidak sesuai dengan presentase limfosit darah tepi yang terukur pada P1, P2, dan P3 dimana terjadi penurunan pada P1 dan P2 yang mendapatkan dosis yang sama bahkan lebih tinggi kelompok K1, dan pada P3 yang mengalami peningkatan namun tidak bermakna secara statistik.¹⁴ Terjadinya penurunan presentase limfosit pada mencit menurut sumber dapat disebabkan oleh beberapa hal seperti, manipulasi genetik yang mengubah imunomodulasi mencit maupun keadaan stres pada mencit yang berlangsung selama beberapa hari sampai beberapa minggu. Adapun parameter terjadinya stress yang dapat diamati adalah penurunan berat badan mencit dan penurunan volume kelenjar timus.²² Namun kedua parameter ini tidak diamati pada penelitian ini sehingga faktor stress sebagai penyebab penurunan limfosit mencit tidak dapat digunakan sebagai alasan pasti dan hanya sebatas asumsi semata mengingat pada kelompok P1, P2, dan P3 dilakukan 2 prosedur intervensi pada mencit yaitu penyutikan *Salmonella* Typhimurium secara intraperitoneal dan sondase ekstrak sirih merah selama 14 hari.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Pemberian ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) dosis 10, 30, dan 100 mg/hari/mencit tidak memberikan pengaruh terhadap gambaran limfosit darah tepi mencit Balb/c yang diinfeksi *Salmonella* Typhimurium.

Pemberian ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) dosis 100 mg/hari/ mencit meningkatkan presentase limfosit darah tepi dibanding pemberian dosis 10 mg/ hari/mencit pada mencit Balb/c yang diinfeksi *Salmonella* Typhimurium.

Saran

Perlu diadakan penelitian lebih lanjut dengan durasi pemberian perlakuan yang lebih panjang. Perlu dilakukan penambahan kelompok kontrol 0 yang tidak diberikan ekstrak daun sirih merah dan tidak diinfeksi *Salmonella* Typhimurium. Perlu dipertimbangkan untuk melakukan *differential count* preparat hapus darah tepi dengan metode yang lebih objektif, yaitu menggunakan *auto analyzer*. Perlu dilakukan isolasi senyawa flavonoid dengan kelas yang lebih spesifik untuk mengetahui pengaruh yang lebih terfokus pada peningkatan atau penurunan presentase limfosit darah tepi sesuai dengan kelas yang diteliti.

DAFTAR PUSTAKA

1. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2013.
2. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC; 2014.
3. Rhen M. Salmonella: Molecular Biology and Pathogenesis [Internet]. Norfolk: Horizon Scientific Press; 2007 [cited 2016 June 27]. Available from: https://books.google.co.id/books?id=Etk8P1up_q4C&printsec=frontcover&dq=salmonella+molecular+biology+and+pathogenesis&hl=en&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=salmonella%20molecular%20biology%20and%20pathogenesis&f=false.
4. Male D, Brostoff J, Roth DB, Roitt I. Immunology. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2013.
5. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012.

6. Boyman O, Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2012; 12:180-90.
7. Rodak BF, Fritsma GA, Doig K. *Hematology: Clinical Principles and Applications* [Internet]. Missouri: Elsevier Health Sciences; 2007 [cited 2016 June 27]. Available from: https://books.google.co.id/books?id=-tHsAwAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=Hematology+clinical+principle+application&hl=en&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=lymphocyte&f=false.
8. Turgeon ML. *Clinical Hematology: Theory and Procedures* [Internet]. Blatimore: Lippincott Williams & Wilkins 2005 [cited 2016 28 Juni 2016]. Available from: https://books.google.co.id/books?id=cHAjsUgegpQC&pg=PA219&dq=mary+louise+turgeon+recirculation&hl=en&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=mary%20louise%20turgeon%20recirculation&f=false.
9. Cruse JM, Lewis RE. *Atlas of Immunology, Third Edition* [Internet] Florida: CRC Press; 2010 [cited: 2016 June 28]. Available from: <https://www.crcpress.com/Atlas-of-Immunology-Third-Edition/Cruse-MD-PhD-Lewis/p/book/9781439802687>
10. Mardiana L. *Daun Ajaib Tumpas Penyakit* [Internet]. Jakarta: Penebar Swadaya; 2012 [cited 2016 June 27]. Available from: https://books.google.co.id/books?id=G2YUCgAAQBAJ&pg=PP5&lpg=PP5&dq=Daun+Ajaib+Tumpas+Penyakit.+Jakarta:+Penebar+Swadaya%3B+2012.&source=bl&ots=m2626u75X0&sig=fSdRvBYUZGuwt-CLuM0dS6r0my8&hl=en&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=sirih%20merah&f=false.
11. Utami P, Puspaningtyas DE. *The Miracle of Herbs*. Jakarta: Agro Media; 2013 [cited 2016 June 28]. Available from: https://books.google.co.id/books?id=7T1XAQAAQBAJ&printsec=frontcover&source=gs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q=sirih%20merah&f=false.
12. Hartini YS, Wahyono S, Widyarini S, Yuswanto A. In Vivo Immunomodulatory Effect and Histopathological Features of Mouse Liver and Kidney Treated with Neolignans Isolated from Red Betel (*Piper corcatum* Ruiz & Pav) Leaf. *Trop J Pharm Res.* 2014; 13:1609-14.
13. Kustiawan PM. *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Immunostimultan Spesifik In Vitro dari Daun Sirih Merah (Piper crocatum Ruiz & Pav.)* [Skripsi]. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada; 2012.

14. Watson RR, Preedy VR, Zibadi S. Inflammation and Polyphenols [Internet]. London: Academic Press; 2013 [cited 2016 June 28]. Available from: <https://books.google.co.id/books?id=9T4TAAAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=Polyp henols+in+Human+Health+and+Disease+polifenol+CD4&hl=en&sa=X&ved=0ahUKew imh7PFg4POAhVEOo8KHan9A28Q6AEILjAB#v=snippet&q=IFN&f=false>.
15. Harput US, Saracoglu I, Ogihara Y. Stimulation of Lymphocyte Proliferation and Inhibition of Nitric Oxide Production by Aqueous *Urtica dioica* Extract. *Phyther Res.* 2005; 19:346-8.
16. WHO. Research Guidelines for Evaluating the Safety and Efficacy of Herbal Medicines [Internet]. Manila: WHO; 1993 [cited 2016 June 29]. Available from: <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Jh2946e/>.
17. Vaishnavi C. Infections of Gastrointestinal System [Internet]. New Delhi: JP Medical; 2013 [cited 2016 July 23]. Available from: https://books.google.co.id/books?id=IcN-3S-tcvkC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
18. Mittrucker HW, Kaufmann SH. Immune response to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. *J Leukoc Biol.* 2000; 67:457-63.
19. Parslow TG, Stities DP, Terr AI, Imboden JB. *Medical Immunology*. Singapore: Mc Graw Hill 2003.
20. Wahjuni S, W WI, N MAI. Anti- Inflammatory Effect of Red Piper Crocatum Leaves Extract Decrease TNF- α . *Bali Medical Journal* 2016; 5:51-6.
21. Mittrucker HW, Kohler A, Kaufmann SH. Characterization of the murine T-lymphocyte response to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infection and immunity.* 2002; 70:199-203.
22. Hedrich H. *The Laboratory Mouse* [Internet]: Academic Pres; 2012 [cited 2016 July 23]. Available from: https://books.google.co.id/books?id=c0ef5fNKbL8C&dq=biology+of+laboratory+mouse &source=gbs_navlinks_s.