

EFEK PEMBERIAN EKSTRAK DAUN *Carica pubescens* TERHADAP JUMLAH LIMFOSIT TIKUS *Sprague dawley* YANG DIINDUKSI AZOXYMETHANE : STUDI DI LABORATORIUM PENELITIAN DAN PENGUJIAN TERPADU 4 UNIVERSITAS GADJAH MADA

Maharani Shofa Yudina¹, Ainun Rahmasari Gumay², Muflihatul Muniroh²

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

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

ABSTRAK

Latarbelakang: Inflamasi merupakan salah satu faktor yang berperan penting dalam patofisiologi kanker kolorektal. Daun *Carica pubescens* yang mengandung flavonoid berpotensi sebagai agen preventif kanker kolorektal. **Tujuan:** Mengetahui efek pemberian ekstrak daun *Carica pubescens* terhadap jumlah limfosit tikus *Sprague dawley* yang diinduksi azoxymethane. **Metode:** *randomized post test control group design* yang menggunakan 25 ekor tikus *Sprague dawley* jantan. Kontrol normal (K1) diinjeksi NaCl fisiologi. Kontrol sakit (K2) diinjeksi Azoxymethane satu kali seminggu selama dua minggu. Kelompok P1, P2, dan P3 diinjeksi Azoxymethane dan diberi ekstrak daun *Carica pubescens* dosis 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, dan 400 mg/kgBB. Untuk analisis data digunakan *One-Way Anova* dan uji *Post-Hoc*. **Hasil:** Jumlah limfosit kelompok K2 ($3100/\mu\text{l} \pm 200,00$) signifikan lebih tinggi daripada K1 ($5460/\mu\text{l} \pm 1647,1$; $p=0,000$). Jumlah limfosit kelompok P1 ($3260/\mu\text{l} \pm 746,9$) lebih rendah secara signifikan dibandingkan dengan kelompok K2 ($p=0,001$), P2 ($5080/\mu\text{l} \pm 630,0$; $p=0,004$) dan P3 ($4680/\mu\text{l} \pm 476,4$; $p=0,020$). **Kesimpulan:** Pemberian ekstrak daun *Carica pubescens* menyebabkan penurunan jumlah limfosit tikus *Sprague dawley* yang diinduksi azoxymethane.

Kata Kunci: *Carica pubescens*, limfosit, inflamasi, kanker kolorektal

ABSTRACT

EFFECT OF CARICA PUBESCENS'S LEAVES EXTRACT ON THE NUMBER OF LYMPHOCYTE IN SPRAGUE DAWLEY INDUCED AZOXYMETHANE : STUDY IN INTEGRATED RESEARCH AND TESTING LABORATORY UNIVERSITY OF GADJAH MADA

Background: Inflammation is one of the factors that play an important role in the pathophysiology of colorectal cancer. *Carica pubescens* leaves contain flavonoids which has an anti-inflammatory effect is potential as colorectal cancer preventive agent. **Aim:** Knowing the effect of *Carica pubescens* leaf extract on the lymphocyte count of *Sprague dawley* rats induced by Azoxymethane. **Method:** *Randomized post test control group design* that used 25 male *Sprague dawley* rats. Normal control (K1) was injected with NaCl physiology. Kontrol K2 was injected with Azoxymethane once a week for two weeks. The P1, P2, and P3 groups were injected with Azoxymethane and given *Carica pubescens* leaf extract at dose 100 mg/kgBW, 200mg/kgBW, and 400 mg/kgBW. The statistical analysis was done using One-

Way Anova and Post-Hoc test. **Result:** Lymphocyte counts of K2 ($3100/\mu\text{l}\pm 200.00$) were significantly higher than K1 ($5460/\mu\text{l}\pm 1647.1$; $p=0,000$). Lymphocyte counts in P1 ($3260/\mu\text{l}\pm 746.9$) were significantly lower than K2 ($p=0.001$), P2 ($5080/\mu\text{l}\pm 630.0$; $p=0.004$) and P3 ($4680/\mu\text{l}\pm 476,4$; $p = 0.020$). **Conclusion:** The administration of *Carica pubescens* leaf extract caused a decrease in the lymphocyte count of Sprague dawley rats induced by azoxymethane.

Keywords: *Carica pubescens*, lymphocytes, inflammation, colorectal cancer.

PENDAHULUAN

Salah satu jenis kanker yang memiliki angka mortalitas dan morbiditas yang tinggi adalah kanker kolorektal. Pada tahun 2012 tercatat 32,6 juta orang mengidap kanker di dunia, di mana dari 14,1 juta kasus baru dan 8,2 juta kasus kematian akibat kanker sebanyak 9,7% kasus baru dan 8,5% kasus kematian tersebut diakibatkan oleh kanker kolorektal.¹ Hal ini menjadikan kanker kolorektal menempati posisi ketiga jenis kanker yang paling sering ditemui di dunia dan penyebab kematian akibat kanker terbanyak keempat.^{1,2} Di Indonesia sendiri, kanker kolorektal merupakan jenis kanker terbanyak setelah kanker payudara dan kanker paru-paru.^{1,3}

Terjadinya kanker kolorektal dipengaruhi oleh banyak faktor risiko, baik yang dapat dimodifikasi dan tidak dapat dimodifikasi.² *Inflammatory bowel disease* (IBD) merupakan salah satu faktor risiko

tinggi terjadinya kanker kolorektal.^{2,4} Pada penderita IBD terjadi proses inflamasi kronik di mana terjadi peningkatan jumlah sel imun seperti sel limfosit, mediator inflamasi, dan stres oksidatif. Proses inflamasi kronik tersebut dapat menginduksi kerusakan genetik yang kemudian dapat menyebabkan aktifnya gen prokarsinogenik serta menekan *tumor suppressor pathway*. Keadaan ini menyebabkan perubahan morfologi dan fungsi sel serta proliferasi sel menjadi tidak terkendali.^{3,5,6}

Pengobatan untuk kanker kolorektal sudah banyak mengalami perkembangan seperti kemoradioterapi untuk kanker kolorektal *stage* I dan II, dan pemberian terapi ajuvan 5-fluorouracil (5-FU) yang terbukti cukup efektif untuk *stage* III.^{7,8} Selain itu juga terdapat pemberian *Non-steroidal anti-inflammation drug* (NSAID) yang berfungsi sebagai kemopreventif dan terapi ajuvan.⁹ Akan

tetapi riset menemukan bahwa ditemukan banyak efek samping yang ditimbulkan oleh terapi untuk penderita kanker kolorektal yang mempengaruhi kualitas hidup pasien seperti neuropati perifer, diare kronik, hingga disfungsi urogenital dan fraktur pelvis.^{8,10} Oleh karena itu, banyak penelitian yang dilakukan untuk mencari agen kemopreventif dan terapi ajuvan untuk kanker yang lebih aman, misal dengan bahan tradisional herbal yang dinilai memiliki efek samping jauh lebih sedikit.

Carica pubescens merupakan salah satu tanaman khas dataran tinggi di Indonesia yang memiliki potensi besar sebagai salah satu obat herbal. Akan tetapi penelitian mengenai khasiat *Carica pubescens* masih sangat jarang dilakukan. Berdasarkan hasil uji fitokimia pada daun *Carica pubescens* didapatkan salah satu kandungannya yaitu flavonoid.¹¹ Flavonoid merupakan senyawa alami yang berguna sebagai anti-inflamasi, imunomodulasi, dan anti-kanker.¹² Kandungan pada daun *Carica pubescens* ini hampir sama dengan kandungan pada spesies dari genus yang sama yaitu *Carica papaya L.*^{13,14} Sehingga ada kemungkinan bahwa khasiat dari daun *Carica pubescens* sama dengan

khasiat daun *Carica papaya*. Pemberian ekstrak daun *Carica papaya L.* pada mencit yang diinduksi oedem kaki, *cotton pellet granuloma*, dan arthritis untuk meneliti efeknya terhadap inflamasi akut, subkronik, dan kronik menunjukkan hasil yang positif.¹⁴ Manfaat lainnya yaitu efek anti-inflamasi, imunomodulasi, dan anti-kanker dari ekstrak daun *Carica papaya L.* yang telah diuji secara *invitro*.^{15,16} Oleh sebab itu, daun *Carica pubescens* memiliki potensi sebagai agen kemopreventif dan terapi ajuvan pada kanker kolorektal dengan cara menekan jumlah sel imun seperti sel limfosit sehingga dapat mengurangi inflamasi yang terjadi.

Dalam penelitian ini, peneliti ingin menguji efek pemberian ekstrak daun *Carica pubescens* terhadap inflamasi kronik pada tikus *Sprague dawley* yang diinduksi kanker kolorektal menggunakan *azoxymethane* dengan jumlah limfosit sebagai parameternya.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental* dengan rancangan penelitian *post test only control group design* yang telah dilaksanakan pada bulan Agustus-September 2018 di Laboratorium

Pengujian dan Penelitian Terpadu (LPPT) 2 dan 4 UGM. Penelitian ini menggunakan sampel tikus *Sprague dawley* jantan berusia 5-7 minggu dengan berat 120-150 gram yang sehat, aktif, dan tidak memiliki kelainan anatomis sebanyak 25 ekor tikus. Penelitian ini dilakukan selama 2 minggu, di mana sebelumnya dilakukan aklimatisasi terlebih dahulu selama seminggu. Kriteria eksklusi penelitian ini adalah tikus yang mati atau sakit selama aklimatisasi.

Sampel penelitian kemudian dibagi kedalam 5 kelompok dengan metode randomisasi sederhana. Pada kelompok K1 diberi suntikan 1 ml NaCl fisiologis secara intraperitoneal 1 kali seminggu selama 2 minggu. Kelompok K2 diberi suntikan *azoxymethane* 10mg/kgBB intraperitoneal sebanyak sekali seminggu selama dua minggu. Kelompok P1, P2, dan P3 diberi suntikan *azoxymethane* 10 mg/kgBB intraperitoneal sebanyak satu kali seminggu selama dua minggu dan ekstrak daun *Carica pubescens* dosis 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, dan 400 mg/kgBB peroral setiap hari selama 2 minggu. Pada akhir minggu kedua dilakukan pengambilan sampel darah secara retroorbita dengan sebelumnya

dilakukan sedasi terlebih dahulu dengan 0,2cc ketamin secara injeksi intraperitoneal. Sampel darah kemudian diperiksa dengan alat *hematology analyzer* untuk menghitung jumlah limfosit.

Data jumlah limfosit yang didapat selanjutnya diuji distribusi datanya dengan uji normalitas *ShapiroWilk*. Hasil uji normalitas mendapatkan data terdistribusi normal sehingga dilanjutkan dengan uji *One Way Anova* dan uji *Post Hoc*.

HASIL

Penelitian menggunakan sampel darah dari 25 ekor tikus *Sprague dawley* yang telah memenuhi kriteria inklusi-eksklusi dan selanjutnya dihitung jumlah limfositnya dengan alat *hematology analyzer*. Data jumlah limfosit yang didapat kemudian diuji dengan uji normalitas *ShapiroWilk* dan didapatkan bahwa data terdistribusi secara normal sehingga digunakan nilai rerata sebagai ukuran pemusatan dan SD sebagai ukuran penyebaran.

Tabel 1. Data Jumlah Limfosit pada Semua Kelompok Penelitian

Kelompok	Rerata(sel/ μ l) \pm SD
K1	3100 \pm 200,0
K2	5460 \pm 1647,1

P1	3260± 746,9
P2	5080± 630,0
P3	4680± 476,4

Dari data rerata, didapatkan bahwa jumlah limfosit terbanyak didapatkan pada kelompok K2 dengan 5460/ μl ±1647,1 dan jumlah paling sedikit pada kelompok P1 dengan 3260/ μl ±746,9. Selanjutnya

dilakukan uji beda dengan uji *One way Anova* dan didapatkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antar kelompok. Untuk mengetahui antar kelompok mana saja yang memiliki perbedaan bermakna, maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc*.

Tabel 2. Nilai p Hasil Uji *Post-Hoc* LSD Perbandingan Jumlah Limfosit Antar Kelompok

	K2	P1	P2	P3
K1	$p=0,000^*$	$p=0,778$	$p=0,002^*$	$p=0,011^*$
K2	-	$p=0,001^*$	$p=0,506$	$p=0,180$
P1		-	$p=0,004^*$	$p=0,020^*$
P2			-	$p=0,484$
P3				-

Dari uji *Post-Hoc* dapat diketahui bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol normal (K1) dan kontrol yang diinduksi *Azoxymethane* (K2) dengan $p<0,001$. Perbedaan bermakna juga ditemukan antara kelompok K2 dan P1 ($p=0,001$), antara kelompok K1 dan P2 ($p=0,002$), antara kelompok K1 dan P3 ($p=0,011$), antara kelompok P1 dan P2 ($p=0,004$), serta antara kelompok P1 dan P3 ($p=0,020$).

PEMBAHASAN

Berdasarkan data hasil penelitian yang didapatkan, terjadi peningkatan jumlah limfosit yang signifikan pada kelompok kontrol positif yang diberi injeksi *azoxymethane* (K2) dibanding dengan kelompok kontrol normal (K1). Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian *azoxymethane* mampu menginduksi terjadinya proses inflamasi yang berisiko menjadi kanker, di mana jumlah limfosit yang digunakan sebagai parameternya.

Inflamasi yang terjadi pada kolorektal apabila terjadi terus menerus dapat menyebabkan terbentuknya neoplasma. Aktivitas sel imun pada proses tersebut dapat meningkatkan jumlah radikal bebas yang dapat merusak DNA dan menyebabkan mutasi gen seperti pada onkogen dan *tumor suppressor genes*.^{2,3,5,17,18} Pada proses inflamasi yang berisiko menjadi kanker kolorektal, terjadi peningkatan jumlah sel limfosit yang disebabkan karena defek pada sel Treg atau perubahan pada sifat supresinya.¹⁹ Sel Treg dan subset sel T helper atau sel Th17 merupakan sel yang memodulasi peradangan di dalam usus besar dan berkontribusi pada kanker kolorektal terkait inflamasi.⁵

Penelitian ini menggunakan ekstrak daun *Carica pubescens* yang memiliki kandungan flavonoid untuk menekan proses inflamasi tersebut. Berdasarkan penelitian yang dilakukan sebelumnya, flavonoid terbukti memiliki efek antiinflamasi.²⁰⁻²² Flavonoid dapat bertindak sebagai antioksidan serta meregulasi aktivitas sel-sel inflamasi. Selain itu flavonoid juga dapat memodulasi produksi mediator proinflamasi dan ekspresi gen proinflamasi.²³ Setelah

dilakukan uji fitokimia pada ekstrak daun *Carica pubescens* didapatkan kandungan flavonoid total sebesar 16,33% pada penelitian ini.

Pada seluruh kelompok perlakuan didapatkan penurunan jumlah limfosit apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol sakit yang diinduksi *azoxymethane* (K2). Hasil tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun *Carica pubescens* dapat menekan proses inflamasi yang terjadi, yang mana dapat dilihat dari penurunan jumlah limfosit. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh utama (2014), di mana flavonoid yang terkandung dalam ekstrak daun *Carica papaya* terbukti mampu menurunkan jumlah limfosit pada tikus *Wistar sp.* yang mengalami periodontitis.²⁰ Penelitian yang dilakukan oleh Aria (2015) membuktikan flavonoid pada ekstrak daun piladang (*Solenostemon scutellarioides*) dapat menurunkan jumlah sel neutrofil segmen, neutrofil batang, monosit, dan limfosit pada tikus putih betina yang diinduksi edem.²⁴ Penelitian lainnya seperti yang dilakukan oleh Ramos-Romero (2012) juga menunjukkan bahwa terjadi penurunan subset sel limfosit T setelah pemberian

kokoa yang telah diperkaya dengan flavonoid pada tikus arthritis.²⁵

Di antara ketiga kelompok perlakuan, pemberian ekstrak dengan dosis 100 mg/kgBB mampu menurunkan jumlah limfosit secara signifikan dan cenderung kurang lebih sama dengan kelompok yang tidak diinduksi dengan AOM atau kelompok kontrol normal. Sedangkan pemberian dosis 200 mg/kgBB dan dosis 400 mg/kgBB menunjukkan penurunan jumlah limfosit tetapi tidak signifikan secara statistik.

Dalam penelitian ini, ekstrak daun *Carica pubescens* dosis 100 mg/kgBB merupakan dosis efektif dalam menurunkan jumlah sel limfosit. Pemberian dosis yang lebih besar dari dosis tersebut seperti dosis 200 mg/kgBB dan dosis 400 mg/kgBB, diduga akan menyebabkan penurunan efektivitas. Oleh sebab itu jumlah limfosit pada dosis 200 mg/kgBB dan dosis 400 mg/kgBB lebih tinggi secara signifikan dibanding jumlah limfosit pada pemberian dosis 100 mg/kgBB. Hal ini masih perlu dibuktikan dengan melihat gambaran histopatologis kolon pada seluruh kelompok perlakuan.

Namun, berdasarkan beberapa penelitian yang dilakukan sebelumnya

menyatakan bahwa flavonoid juga memiliki efek imunomodulator.

Imunomodulator merupakan senyawa yang dapat meningkatkan fungsi sistem imun. Flavonoid terbukti mampu menginduksi proliferasi dan aktivasi sel T melalui peningkatan produksi IL-2.²⁶ Penelitian yang dilakukan oleh Sukmayadi (2014), menunjukkan bahwa flavonoid yang terkandung pada ekstrak daun *Sonchus arvensis* mampu meningkatkan jumlah sel leukosit dan komponennya serta IL-2.²⁷ Penelitian yang dilakukan oleh Dewi (2013) menunjukkan bahwa flavonoid yang terkandung pada *Annona muricata* dapat meningkatkan jumlah sel T CD4+ dan CD8+ pada timus mencit (*Mus musculus*).²⁸ Peningkatan jumlah limfosit pada dosis 200 mg/kgBB dan 400 mg/kgBB diduga dapat juga disebabkan karena munculnya efek imunomodulator dari flavonoid yang terkandung dalam ekstrak daun *Carica pubescens* yang tujuannya adalah untuk memerangi bakteri yang berperan selama proses inflamasi yang terjadi.

Sedasi yang dilakukan dengan injeksi ketamin 0,2cc secara intraperitoneal mungkin juga dapat mempengaruhi jumlah limfosit. Menurut Li (2017), pemberian

ketamin *single dose* dapat meningkatkan jumlah sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α , IL-6 dan IL-1 β .²⁹ Injeksi intraperitoneal sendiri dapat berisiko menginduksi rasa sakit, reaksi inflamasi di peritoneum atau peritonitis akibat zat iritan dan atau Ph larutan yang tidak fisiologis, terjadinya adhesi pada rongga perut akibat terbentuknya jaringan fibrosa, dan pendarahan.³⁰

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak daun *Carica pubescens* memiliki potensi mencegah terjadinya kanker kolorektal yang terjadi melalui *inflammatory pathway*.

Kelemahan dari penelitian ini hanya diperiksa parameter hematologi jumlah limfosit sehingga belum dapat dijelaskan secara rinci kejadian yang sebenarnya. Selain itu, induksi *azoxymethane* pada penelitian ini hanya dilakukan selama 2 minggu. Induksi yang dilakukan dalam jangka waktu lebih lama mungkin dapat menunjukkan efek pemberian ekstrak daun *Carica pubescens* terhadap jumlah limfosit pada inflamasi kronik yang berisiko tinggi menjadi kanker kolorektal.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Terdapat efek pemberian ekstrak daun *Carica pubescens* terhadap jumlah limfosit tikus *Sprague dawley* yang diinduksi dengan *azoxymethane*.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut yang lebih mendalam agar penelitian ini dapat menjadi lebih baik dan bermanfaat, di antaranya

1. Perlu dilakukan pemeriksaan histopatologi kolorektal dan pemeriksaan *stress oxydative* serta enzim antioksidan untuk membuktikan efek antiinflamasi pada ekstrak daun *Carica pubescens* sebagai agen preventif kanker kolorektal.
2. Perlu juga dilakukan penelitian lanjut mengenai efektivitas dosis ekstrak daun *Carica pubescens* 0-100 mg/kgBB.

DAFTAR PUSTAKA

1. WHO IAFRIC. Globocan 2012 : Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. GLOBOCAN. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx. Published 2012.

- Accessed February 21, 2018.
2. Haggard FA, Boushey RP, Ph D. Colorectal Cancer Epidemiology: Incidence, Mortality, Survival, and Risk Factors. *Clin Colon Rectal Surg.* 2009;6(212):191-197. doi:10.1055/s-0029-1242458.
 3. Abdullah M, Sudoyo AW, Utomo AR, Fauzi A, Rani AA. Molecular Profile of Colorectal Cancer in Indonesia: Is There Another Pathway? *Gastroenterol Hepatol from Bed to Bench.* 2012;5(2):71-78.
 4. Triantafyllidis JK, Nasaoulas G, Kosmidis PA. Colorectal Cancer and Inflammatory Bowel Disease: Epidemiology, Risk Factors, Mechanisms of Carcinogenesis and Prevention Strategies. *Anticancer Res.* 2009;29(7):2727-2737. <http://ar.iiarjournals.org/content/29/7/2727.long>.
 5. Yang G, Sau C, Lai W, Cichon J, Li W. Gut Microbiota, Inflammation, and Colorectal Cancer. *Annu Rev Microbiol* Author manuscript; available PMC 2017 Sept 08. 2015;344(6188):1173-1178. doi:10.1126/science.1249098.Sleep
 6. Beaugerie L, Itzkowitz SH. Cancers Complicating Inflammatory Bowel Disease. *N Engl J Med.* 2015;372(15):1441-1452. doi:10.1056/NEJMra1403718
 7. Carethers JM. Review: Systemic Treatment of Advanced Colorectal Cancer: Tailoring Therapy to the Tumor. *Therap Adv Gastroenterol.* 2008;1(1):33-42. doi:10.1177/1756283X08093607
 8. Mayer RJ, Wolpin Brian M. Systemic Treatment of Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 2009;134(5):1296-1310. doi:10.1053/j.gastro.2008.02.098.Systemic
 9. Cappell MS. Pathophysiology, Clinical Presentation, and Management of Colon Cancer. *Gastroenterol Clin North Am.* 2008;37(1):1-24. doi:10.1016/j.gtc.2007.12.002
 10. Gilmore JH. The Challenges of Colorectal Cancer Survivorship. *J Natl Compr Canc Netw* Author manuscript; available PMC 2011 June 8. 2008;29(10):1883-1889. doi:10.3174/ajnr.A1256.Functional
 11. Minarno EB. Skrining Fitokimia dan

- Kandungan Total Flavanoid pada Buah *Carica pubescens* Lenne & K. Koch di Kawasan Bromo, Cangar, dan Dataran Tinggi Dieng. *El-Hayah*. 2015;5(2):73-82. doi:<http://dx.doi.org/10.18860/elha.v5i2.3022>
12. Pérez-Cano FJ, Castell M. Flavonoids, Inflammation and Immune System. *Nutrients*. 2016;8(10):8-11. doi:10.3390/nu8100659
13. Qurrota A, Laily AN. Analisis Fitokimia Daun Pepaya (*Carica Papaya* L) Di Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi, Kendalpayak, Malang. *Univ Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang*. 2011:134-137.
14. Owoyele B V., Adebukola OM, Funmilayo AA, Soladoye AO. Anti-inflammatory Activities of Ethanolic Extract of *Carica papaya* Leaves. *Inflammopharmacology*. 2008;16(4):168-173. doi:10.1007/s10787-008-7008-0
15. Pandey S, Cabot PJ, Shaw PN, Hewavitharana AK. Anti-inflammatory and Immunomodulatory Properties of *Carica papaya*. *J Immunotoxicol*. 2016;13(4):590-602. doi:10.3109/1547691X.2016.1149528
16. Otsuki N, Dang NH, Kumagai E, Kondo A, Iwata S, Morimoto C. Aqueous Extract of *Carica papaya* Leaves Exhibits Anti-tumor Activity and Immunomodulatory Effects. *J Ethnopharmacol*. 2010;127(3):760-767. doi:10.1016/j.jep.2009.11.024
17. M. Ponz de Leon AP. Pathogenesis of Colorectal Cancer. *Dig Liver Dis*. 2000:807-821. doi:10.1001/jama.2009.1112
18. Shawki S, Ashburn J, Signs SA, Huang E. Colon Cancer. Inflammation-Associated Cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2017. doi:10.1016/j.soc.2017.11.003
19. Larmonier CB, Shehab KW, Ghishan FK, Kiela PR. T Lymphocyte Dynamics in Inflammatory Bowel Diseases: Role of the Microbiome. *Biomed Res Int*. 2015;2015:504638. doi:10.1155/2015/504638
20. Dimas Bramanto Satrya Utama, Yuliana Mahdiyah Da'at Arina MNA. Pengaruh Ekstrak Daun

- Pepaya Terhadap Jumlah Sel Limfosit Pada Gingiva Tikus Wistar Jantan Yang Mengalami Periodontitis (The effect of papaya leaves extract to the number of that undergo periodontitis). *e-Jurnal Pustaka Kesehat.* 2014;2(1):50-57. <http://jurnal.unej.ac.id/index.php/JPK/article/view/596>.
21. Aldelina NL, Sari DS, Amin MN. Efek Pemberian Ekstrak Daun Pepaya Muda (*Carica papaya*) Terhadap Jumlah Sel Makrofag Pada Gingiva Tikus Wistar Yang Diinduksi *Porphyromonas*. *Artik Ilm Has Penelit Mhs 2013.* 2013:1-5. <http://repository.unej.ac.id/bitstream/handle/123456789/59373/NindyaLaksmiAldelina.pdf?sequence=1>.
22. Sudarko RJ, Amin MN, Praharani D. Efek Pemberian Ekstrak Daun Pepaya Terhadap Jumlah Sel Neutrofil Pada Model Tikus Periodontitis (Effect Of Papaya Leaf Extract Against The Amount of Neutrophils on Rat Model with Periodontitis). *Artik Ilm Has Penelit Mhs 2013 Univ Jember.* 2013.
23. García-Lafuente A, Guillamón E, Villares A, Rostagno MA, Martínez JA. Flavonoids as anti-inflammatory agents: Implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflamm Res.* 2009;58(9):537-552. doi:10.1007/s00011-009-0037-3
24. Aria M, Arel A, Monica, Verawati. Uji Efek Antiinflamasi Daun Piladang (*Solenostemonscutellarioides* (L .) Codd) terhadap Mencit Putih Betina. *Scientia.* 2015;5(2):84-91.
25. Ramos-Romero S, Pe ´rez-Cano FJ, Pe ´rez-Berezo T, Cristina Castellote C, Franch A, Castell M. Effect of a cocoa flavonoid-enriched diet on experimental autoimmune arthritis *British Journal of Nutrition.* *Br J Nutr.* 2012;107:523-532. doi:10.1017/S000711451100328X
26. Hashi KO, Inarno HW, Ukai MM, et al. Cancer Cell Invasion Inhibitory Effects of Chemical Constituents in the Parasitic Plant *Scurrula atropurpurea* (*Loranthaceae*). *Chem Pharm Bull.* 2003;51(March):343-345.
27. Sukmayadi AE, Sumiwi SA, Barliana MI, et al. Aktivitas Imunomodulator Ekstrak Etanol Daun Tempuyung (*Sonchus* The

- Immunomodulatory Activity of Ethanol Extract of Tempuyung Leaves (*Sonchus arvensis* Linn .). *Univ Padjadjaran*. 2014;1.
28. Dewi LK, Widyarti S, Rifa'i M. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn .) terhadap Peningkatan. *Univ Brawijaya*. 2013:24-26.
29. Li Y, Shen R, Wen G, Ding R, Du A, Zhou J. Effects of Ketamine on Levels of Inflammatory Cytokines IL-6 , IL-1 β , and TNF- α in the Hippocampus of Mice Following Acute or Chronic Administration. 2017;8(March):1-14. doi:10.3389/fphar.2017.00139
30. Levin-arama M, Abraham L, Waner T, Harmelin A, Steinberg DM, Lahav T. Subcutaneous Compared with Intraperitoneal Ketamine – Xylazine for Anesthesia of Mice. 2016;55(6).