

**EFEK IMUNOMODULATOR EKSTRAK ETANOL DAUN  
AFRIKA (*Vernonia amygdalina*) TERHADAP JUMLAH SEL  
T CD<sub>4</sub> DAN LEUKOSIT PADA TIKUS PUTIH TERINDUKSI**

*Salmonella thypimurium*

**SKRIPSI**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana  
Farmasi (S.Farm.) di bidang studi Farmasi pada Fakultas MIPA**



**Oleh :**

**YOVIA RIZKI ARRAHMAN**

**08061381320028**

**PROGRAM STUDI FARMASI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS SRIWIJAYA  
2016**

## HALAMAN PENGESAHAN MAKALAH SEMINAR HASIL

Judul Makalah : EFEK IMUNOMODULATOR EKSTRAK ETANOL DAUN AFRIKA (*Vernonia amygdalina*) TERHADAP JUMLAH SEL T CD4 DAN LEUKOSIT PADA TIKUS PUTIH TERINDUKSI *Salmonella thypimurium*  
Nama Mahasiswa : YOVIA RIZKI ARRAHMAN  
NIM : 08061381320028  
Program Studi : FARMASI

Telah dipertahankan di hadapan Pembimbing dan Pembahas pada Seminar Hasil di Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Sriwijaya pada tanggal 22 November 2016 serta telah diperbaiki, diperiksa, dan disetujui sesuai dengan saran yang diberikan.

Inderalaya, 5 Desember 2016

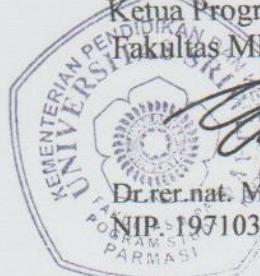
Pembimbing :

1. Fitrya, M.Si., Apt. (.....)  
NIP. 197212101999032001
2. Nikita Surya Dharma, M.Farm., Apt (.....)  
NIPUS. 199004272015107201

Pembahas :

1. Dr. Budi Untari, M.Si., Apt. (.....)  
NIP. 195810261987032002
2. Annisa Amriani S., M.Farm., Apt. (.....)  
NIPUS. 198412292015107201
3. Indah Solihah, M.Sc., Apt. (.....)  
NIPUS. 198803082015107201

Mengetahui  
Ketua Program Studi Farmasi  
Fakultas MIPA, UNSRI



Dr. rer.nat. Mardiyanto, M.Si., Apt.  
NIP. 197103101998021002

## HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI

Judul Makalah : EFEK IMUNOMODULATOR EKSTRAK ETANOL DAUN AFRIKA (*Vernonia amygdalina*) TERHADAP JUMLAH SEL T CD4 DAN LEUKOSIT PADA TIKUS PUTIH TERINDUKSI *Salmonella thypimurium*  
Nama Mahasiswa : YOVIA RIZKI ARRAHMAN  
NIM : 08061381320028  
Program Studi : FARMASI

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Sidang Ujian Skripsi Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Sriwijaya pada tanggal 27 Desember 2016 dan telah diperbaiki, diperiksa, serta disetujui sesuai dengan saran yang diberikan.

Inderalaya, 16 Januari 2017

Ketua :

1. Herlina, M.Kes., Apt. (.....)  
NIP. 197107031998022001

Anggota :

1. Dr. Budi Untari, M.Si., Apt. (.....)  
NIP. 195810261987032002  
2. Dr.rer.nat. Mardiyanto, M.Si., Apt. (.....)  
NIP. 197103101998021002  
3. Indah Solihah, M.Sc., Apt. (.....)  
NIPUS. 198803082015107201  
4. Nikita Surya Dharma, M.Farm., Apt. (.....)  
NIPUS. 199004272015107201

Mengetahui  
Ketua Program Studi Farmasi  
Fakultas MIPA, UNSRI

Dr.rer.nat. Mardiyanto, M.Si., Apt.  
NIP. 197103101998021002



## **PERYATAAN KEASLIAN KARYA ILMIAH**

Yang bertandatangan di bawah ini :

Nama Mahasiswa	:	Yovia Rizki Arrahman
NIM	:	08061381320028
Fakultas/Program Studi	:	MIPA/Farmasi

Menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri dan karya ilmiah ini belum pernah diajukan sebagai pemenuhan persyaratan untuk memperoleh gelar kesarjanaan strata satu (S1) dari Universitas Sriwijaya maupun perguruan tinggi lain.

Semua informasi yang dimuat dalam skripsi ini berasal dari penulis lain baik yang dipublikasikan atau tidak telah diberikan penghargaan dengan mengutip nama sumber penulis secara benar. Semua ini dari skripsi ini sepenuhnya menjadi tanggung jawab saya sebagai penulis.

Demikianlah surat pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Indralaya, Desember 2016  
Penulis,



Yovia Rizki Arrahman  
NIM.08061381320028

## **HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai civitas akademik Universitas Sriwijaya, yang bertanda tangan di bawah ini:

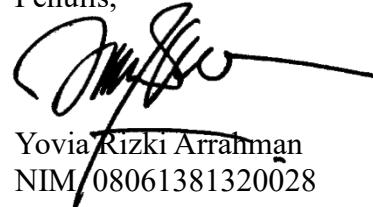
Nama	:	Yovia Rizki Arrahman
NIM	:	08061381320028
Fakultas/Program Studi	:	MIPA/Farmasi
Jenis Karya	:	Skripsi

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, saya menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Sriwijaya “hak bebas royalti non-ekslusif (*non-exclusively royalty-free right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

“Efek Imunomodulator Ekstrak Etanol Daun Afrika (*Vernonia Amygdalina*) Terhadap Jumlah Sel T CD<sub>4</sub> dan Leukosit pada Tikus Putih Terinduksi *Salmonella thypimurium*” beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan hak bebas royalti non-ekslusif ini, Universitas Sriwijaya berhak menyimpan, mengalih media/ memformat, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir atau skripsi saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/ pencipta dan sebagai pemilik hak cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya.

Indralaya, Desember 2016  
Penulis,



Yovia Rizki Arrahman  
NIM 08061381320028

## HALAMAN PERSEMBAHAN

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Segala puji bagi Allah SWT, Tuhan semesta alam  
Dengan rahmat Allah SWT yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang  
Saya persembahkan skripsi ini untuk  
Keluarga yang telah mengajarkan cara untuk berjuang dalam tiap keterbatasan  
Sahabat yang beriringan mengisi lembar demi lembar cerita kehidupan  
dan Para pejuang ilmu pengetahuan

“Wahai orang-orang yang beriman! Apabila dikatakan kepadamu berilah kelapangan di dalam majelis-majelis, maka lapangkanlah, niscaya Allah akan memberi kelapangan untukmu. Dan apabila dikatakan berdirilah kamu, maka berdirilah, niscaya Allah akan mengangkat (derajat) orang-orang yang beriman di antaramu dan orang-orang yang diberi ilmu beberapa derajat. Dan Allah Maha Teliti terhadap apa yang kamu kerjakan”. (QS. Al-Mujadalah: 11)

## MOTTO

*Face it! Enjoy your uncomfortable zone.  
That which doesn't kill us, makes us stronger*  
**-Leiden!-**

*Rasulullah shalallahu ‘alaihi wasalam bersabda, ”Empat hal yang akan menjaga dunia : ilmu orang-orang bijak, keadilan para penguasa, doa orang-orang shalih, dan jiwa ksatria yang pemberani”.*

**-Leiden!-**

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT karena berkat rahmat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul “Efek Imunomodulator Ekstrak Etanol Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*) terhadap Jumlah Sel T CD<sub>4</sub> pada Tikus Putih Terinduksi *Salmonella thypimurium*”. Shalawat beserta salam senantiasa terlimpah curahkan kepada Nabi besar Muhammad SAW. Penyusunan skripsi ini dilakukan untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Farmasi (S.Farm) pada Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sriwijaya.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan, bimbingan, dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu dalam kesempatan ini, penulis menyampaikan ucapan terimakasih kepada:

1. Allah SWT, Berkat izin dan kehendak-Nya penulis dapat menyelesaikan studi.
2. Kedua orang tua penulis, Yunizir, S.P. dan Hopiah, S.P. tersayang, tercinta, dan terkasih, adik-adikku Yovia Rosa Adila, Yovia Sabita Andini, dan Yovia Resti Renata, serta Tiara Destiana A.bee atas seluruh jasa, doa, semangat, kasih sayang, dukungan, serta nasihat yang selalu diberikan kepada penulis.
3. Seluruh anggota keluarga H. Zainal Makmur dan H. Usman atas semua dukungan yang telah diberikan kepada penulis selama menempuh studi hingga selesai.
4. Bapak Prof. Dr. Ir. H. Anis Saggaf, MSCE., selaku Rektor Universitas Sriwijaya, Bapak Drs. Muhammad Irfan, M.T., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, dan Bapak Dr.rer.nat. Mardiyanto, M.Si., Apt., selaku Ketua Program Studi Farmasi atas sarana dan prasarana yang telah diberikan kepada penulis sehingga penulisan skripsi ini berjalan dengan lancar.
5. Ibu Fitrya, M.Si., Apt., selaku dosen pembimbing pertama atas seluruh bantuan, ide, bimbingan, doa, dan nasihat yang telah diberikan kepada penulis selama penelitian dan penyusunan skripsi hingga selesai.
6. Bapak Shaum Shiyan, M.Sc., Apt. dan Ibu Nikita Surya Dharma, M.Farm., Apt., selaku dosen pembimbing kedua atas seluruh bantuan, kepercayaan, dan

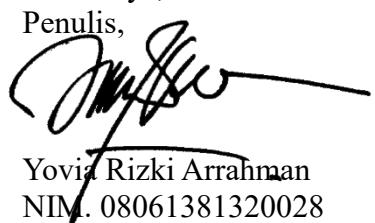
- nasihat yang telah diberikan kepada penulis selama proses penyusunan skripsi.
7. Bapak Shaum Shiyan, M.Sc.,Apt. dan Bapak Yosua Maranatha Shihotang, M.Si., Apt., selaku dosen pembimbing akademik atas semua dukungan dan nasihat yang telah diberikan kepada penulis selama perkuliahan hingga penyusunan skripsi selesai.
  8. Ibu Dr. Budi Untari, M.Si., Apt., Ibu Annisa Amriani S., M.Farm., Apt., dan Ibu Indah Solihah, M.Sc., Apt., selaku dosen pembahas atas saran yang telah diberikan kepada penulis selama penyusunan skripsi.
  9. Seluruh dosen, staf, dan analis laboratorium Program Studi Farmasi dan Laboratorium Dasar Bersama, Universitas Sriwijaya, atas ilmu, bantuan, dan nasihat yang telah diberikan kepada penulis.
  10. Sahabat dan keluarga terhebat KMM, Kurnia Magcia, Elan Aptrio, Abu Malik, Reafy Anjani, Rosmiati Harahap, Nurul Baiti Septianoba, Eka Novianti Sari, Dwi Purnama Sari, Resi Purnama Sari, dan Intan Sri Mustika atas kebersamaan, semua bantuan yang telah diberikan kepada penulis selama perkuliahan, penelitian, dan penyusunan skripsi hingga selesai.
  11. Sahabat senasib seperjuangan Oon Fatihana, Rezky Saputra, Irvanosaka Afren, Oktia Charmila, Nia Septiana Wijaya, Septi Dika Damayanti, Adella Amalia, Meitha Iminiari, Mekadila Kirana dan seluruh mahasiswa Farmasi Universitas Sriwijaya angkatan 2013, atas kebersamaan, semua bantuan yang telah diberikan kepada penulis selama perkuliahan, penelitian, dan penyusunan skripsi hingga selesai.
  12. Kakak-kakak yang telah banyak membantu penulis, Annisa Arifin, S.Farm., Fanny Surviva Ramadhani, S.Farm., Kurniawati, S.Farm., Elvarina Permata Sari, S.Farm., selama proses penelitian dan penyusunan skripsi hingga selesai.
  13. Seluruh mahasiswa farmasi angkatan 2011, 2012, 2014, dan 2015 serta teman seperjuangan pengurus di Himpunan Keluarga Mahasiswa Farmasi (HKMF) Universitas Sriwijaya, atas kebersamaan, solidaritas, dan bantuan kepada penulis selama perkuliahan, kepengurusan himpunan, penelitian, dan penyusunan skripsi hingga selesai.

14. Seluruh pihak yang telah banyak membantu penulis dalam menyelesaikan studi hingga selesai.

Semoga Allah SWT memberikan balasan yang berlipat ganda kepada semua pihak yang telah memberikan bantuan. Penulis sangat berharap kritik dan saran yang membangun dari pembaca untuk perbaikan selanjutnya. Hanya kepada Allah SWT penulis menyerahkan segalanya, semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis dan seluruh pembaca.

Inderalaya, Desember 2016

Penulis,



Yovia Rizki Arrahman

NIM. 08061381320028

**Immunomodulatory Effects Ethanol Extract of Bitter Leaves (*Vernonia amygdalina*) Against the Number of CD4 T Cell and Leukocyte on White Rats Induced *Salmonella thypimurium***

**Yovia Rizki Arrahman  
08061381320028**

**ABSTRACT**

*Vernonia amygdalina* Delile (bitter leaf) is one of the Asteraceae. The results of thin layer chromatography test showed positive reaction to phenolic and flavonoid compounds. Phenolics and flavonoids has ability to stimulate specific and nonspecific immune responses. This study aims to determine the immunomodulatory effects ethanol extract of *Vernonia* leaves against white rats induced *Salmonella thypimurium*. Immunity parameters measured were the number of CD4 T cells, leukocytes, lymphocytes, monocytes, neutrophils, and macroscopic of spleen. White rats were divided into six treatment groups, namely normal (0,5 mL/kgBB tween 80), negative control (0,5 mL/kgBB tween 80), positive control (Stimuno®), and the extract groups with a therapeutic dose 200 mg/kgBW, 400 mg/kgBW, and 800 mg/kgBW. *Salmonella thypimurium* was injected in all treatment groups except the normal. It was injected intraperitoneally on day 8 with a dose  $0.5 \text{ mL} \times 10^5 \text{ CFU/mL}$ . Total phenolics and flavonoids contained in the ethanol extract of *Vernonia* leaves are  $184.23 \pm 2.794 \text{ mgGAE/g extract}$  and  $131.48 \pm 3.207 \text{ mg/g extract}$ . Tested groups showed an increase the number of CD4 T cells, leukocytes, lymphocytes, monocytes, and neutrophils were significantly ( $p<0.05$ ). It is summarized that the higher value ethanol extract of african leaves dose would cause higher value of CD<sub>4</sub> T cell, leukocytes, limphocytes, monocytes, and neutrophils. Ethanol extract of leaves Africa at a dose of 800 mg/kgBW can cause hyperplasia or hypertrophy of the spleen.

**Key Words :** *Vernonia amygdalina* Del, *Salmonella thypimurium*, CD<sub>4</sub> T Cell, Leukocyte, Monocyte, Lymphocyte, Neutrophil

**Efek Imunomodulator Ekstrak Etanol Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*) terhadap Jumlah Sel T CD4 dan Leukosit pada Tikus Putih Terinduksi *Salmonella thypimurium***

**Yovia Rizki Arrahman  
08061381320028**

**ABSTRAK**

*Vernonia amygdalina* Delile (daun afrika) termasuk famili Asteraceae. Analisa dengan kromatografi lapis tipis menunjukkan reaksi positif terhadap senyawa fenolik dan flavonoid. Senyawa ini memiliki kemampuan menstimulasi respon imunitas spesifik dan nonspesifik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek imunomodulator ekstrak etanol daun afrika pada tikus putih yang diinduksi *Salmonella thypimurium*. Parameter imunitas yang diamati adalah jumlah sel T CD<sub>4</sub>, leukosit, limfosit, monosit, neutrofil, dan makroskopik organ limpa. Hewan uji dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan yaitu kelompok normal (0,5 mL/kgBB tween 80), kontrol negatif (0,5 mL/kgBB tween 80),, kontrol positif (Stimuno®), dan kelompok pemberian ekstrak dengan dosis terapi 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB, dan 800 mg/kgBB. Penginjeksian *S. thypimurium* dilakukan terhadap semua perlakuan kecuali kelompok normal. Penginjeksian dilakukan secara intraperitoneal pada hari ke-8 dengan dosis 0,5 mL x 10<sup>5</sup> CFU/mL. Total fenolik dan flavonoid yang terkandung dalam ekstrak etanol daun afrika secara berturut-turut sebesar 184,23 ± 2,794 mgGAE/g ekstrak dan 131,48 ± 3,207 mg/g ekstrak. Hasil pengujian menunjukkan adanya peningkatan jumlah sel T CD<sub>4</sub>, leukosit, limfosit, monosit, dan neutrofil secara signifikan ( $p<0,05$ ) pada kelompok pengujian. Semakin tinggi dosis pemberian ekstrak etanol daun afrika maka akan semakin tinggi peningkatan jumlah sel T CD<sub>4</sub>, leukosit, limfosit, monosit, dan neutrofil. Pemberian ekstrak etanol daun afrika pada dosis 800 mg/kgBB dapat menyebabkan hiperplasi atau hipertrofi pada organ limpa.

**Kata Kunci :** *Vernonia amygdalina* Del, *Salmonella thypimurium*, Sel T CD<sub>4</sub>, Leukosit, Monosit, Limfosit, Neutrofil

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PENGESAHAN MAKALAH SEMINAR HASIL .....	ii
HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN KARYA ILMIAH.....	iv
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIK .....	v
HALAMAN PERSEMBAHAN DAN MOTTO.....	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
<i>ABSTRACT</i> .....	x
ABSTRAK .....	xi
DAFTAR ISI .....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR GAMBAR .....	xv
DAFTAR LAMPIRAN .....	xvi
BAB I PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	3
1.4 Manfaat Penelitian .....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....	6
2.1 Uraian Tanaman Daun Afrika ( <i>Vernonia amygdalina</i> ) .....	5
2.2 Kandungan Kimia Daun Afrika ( <i>Vernonia amygdalina</i> ) .....	6
2.3 Sistem Imun .....	9
2.3.1 Respon Imun Nonspesifik.....	10
2.3.1.1 Pertahanan Fisik.....	10
2.3.1.2 Pertahanan Biokimia .....	10
2.3.1.3 Pertahanan Humoral.....	10
2.3.1.4 Pertahanan Selular.....	11
2.3.2 Respon Imun Spesifik .....	13
2.3.2.1 Humoral .....	13
2.3.2.2 Selular .....	13
2.4 Imunomodulator.....	15
2.4.1 Metode Pengujian Efek Imunomodulator .....	16
2.4.1.1 Metode Uji Sel T CD4 .....	16
2.4.1.2 Metode Uji Leukosit, Monosit, Limfosit, dan Neutrofil.....	16
2.5 Metode Maserasi dalam Ekstraksi .....	18
2.6 Bakteri <i>Salmonella thypimurium</i> ( <i>S. Thypimurium</i> ) .....	19
BAB III METODOLOGI PENELITIAN.....	21
3.1 Waktu dan Tempat.....	21
3.2 Alat dan Bahan .....	21
3.2.1 Alat.....	21
3.2.2 Bahan .....	21

3.2.2 Hewan Uji dan Bakteri Penginduksi.....	22
3.3 Prosedur Penelitian .....	22
3.3.1 Preparasi Ekstrak Etanol Daun Afrika .....	22
3.3.2 Karakterisasi Ekstrak Etanol Daun Afrika.....	22
3.3.2.1 Kadar Sari Larut Air.....	22
3.3.2.2 Kadar Sari Larut Etanol .....	23
3.3.2.3 Penetapan Kadar Air .....	23
3.3.2.4 Identifikasi Fenolik dan Flavonoid Menggunakan KLT .....	23
3.3.2.5 Penetapan Total Fenolik .....	24
3.3.2.6 Penetapan Total Flavonoid.....	25
3.3.3 Pengkondisionan dan Rancangan Hewan Uji .....	26
3.3.4 Preparasi Sediaan Uji Suspensi Ekstrak Etanol Daun Afrika.....	27
3.3.5 Preparasi Agen Penginduksi .....	27
3.3.6 Perlakuan Sediaan Uji dan Penginduksian .....	28
3.3.7 Evaluasi Total Leukosit.....	28
3.3.8 Persentase Monosit, Limfosit, dan Neutrofil .....	28
3.3.9 Evaluasi Jumlah Sel T CD4 ( <i>Cluster of Differentiation</i> )....	29
3.3.10 Euthanasia dan Pembedahan Hewan Uji .....	29
3.3.11 Evaluasi Makroskopis Limpa .....	30
3.3.12 Analisis Data .....	30
 BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	32
4.1 Determinasi Daun Afrika ( <i>Vernonia amygdalina</i> ) .....	32
4.2 Preparasi Ekstrak .....	33
4.3 Karakterisasi Ekstrak .....	35
4.3.1 Kadar Air.....	36
4.3.2 Kadar Sari Larut Air dan Etanol .....	36
4.3.3 Identifikasi Fenolik dan Flavonoid menggunakan KLT .....	37
4.3.4 Penetapan Total Fenolik.....	39
4.3.5 Penetapan Total Flavonoid.....	43
4.4 Pemberian Sediaan dan Penginduksian Hewan Uji .....	44
4.5 Pengukuran Suhu Tubuh Tikus sebagai Parameter Demam Tifoid .....	48
4.6 Euthanasia dan Pemeriksaan Parameter Imunitas Tubuh .....	49
4.6.1 Evaluasi Jumlah Sel T CD4.....	50
4.6.2 Evaluasi Jumlah Leukosit .....	54
4.6.3 Evaluasi Persentase Limfosit, Monosit, dan Neutrofil .....	58
4.7 Patologi Anatomi Organ Limpa .....	69
 BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	75
5.1 Kesimpulan .....	76
5.2 Saran .....	76
 DAFTAR PUSTAKA .....	77
LAMPIRAN .....	86
DAFTAR RIWAYAT HIDUP .....	129

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Kelompok Hewan Uji.....	26
Tabel 2. Karakteristik Ekstrak Etanol Daun Afrika .....	35
Tabel 3. Hasil Karakterisasi Kromatografi Lapis Tipis.....	38
Tabel 4. Hasil Pengukuran Absorbansi Asam Galat.....	40
Tabel 5. Hasil Pengukuran Absorbansi Kuersetin.....	43
Tabel 6. Hasil Pengukuran Bobot Tikus Sebelum Perlakuan.....	45
Tabel 7. Hasil Pengukuran Suhu Tubuh Tikus 24 Jam Sebelum dan Setelah Penginduksian .....	48
Tabel 8. Hasil Pengukuran Jumlah Sel T CD4 .....	51
Tabel 9. Hasil Pengukuran Jumlah Sel Leukosit.....	55
Tabel 10. Rata-Rata Persentase Limfosit .....	63
Tabel 11. Rata-Rata Persentase Monosit.....	64
Tabel 12. Rata-Rata Persentase Neutrofil .....	64
Tabel 13. Persentase Peningkatan Jumlah Sel Limfosit, Monosit, dan Neutrofil terhadap Kelompok Normal .....	65
Tabel 14. Hasil Pengamatan Patologi Anatomi Organ Limpa .....	70

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. (a) <i>Vernonia amygdalina</i> (b) Daun <i>Vernonia amygdalina</i> .....	6
Gambar 2. Struktur yang Diisolasi dari Daun Afrika.....	8
Gambar 3. Diagram Respon Imunitas Tubuh.....	9
Gambar 4. (a) Ukuran Daun Segar <i>Vernonia amygdalina</i> Delile (b) Ukuran Daun Kering <i>Vernonia amygdalina</i> Delile.....	32
Gambar 5. Kromatogram Ekstrak Etanol Daun Afrika [n- Heksan: EtOAc (2:8)] (a) Setelah diberikan penampak noda Serium Sulfat dan (b) Setelah diberikan penampak noda FeCl <sub>3</sub> .....	38
Gambar 6. Reaksi Reagen Folin dengan Senyawa Fenolik .....	40
Gambar 7. Kurva Kalibrasi Asam Galat .....	41
Gambar 8. Reaksi Pembentukan Kompleks Kuersetin dengan AlCl <sub>3</sub> .....	43
Gambar 9. Kurva Kalibrasi Kuersetin.....	44
Gambar 10. Diagram Perbandingan Jumlah Sel T CD4.....	51
Gambar 11. Diagram Perbandingan Jumlah Sel Leukosit .....	55
Gambar 12. Diagram Selisih Jumlah Sel T CD4 dan Leukosit terhadap Kelompok Normal .....	57
Gambar 13. Hasil Pengamatan dengan Mikroskop Binokuler Olympus CX21 Perbesaran 40x (a) Preparat Apus Tebal dan (b) Preparat Apus Tipis .....	59
Gambar 14. Hasil Pengamatan dengan Mikroskop Binokuler Olympus CX21 Perbesaran 40x (a) Neutrofil, (b) Monosit, (c) Eosinofil, dan (d) Limfosit .....	60
Gambar 15. (a) Hasil Pengamatan Limfosit dengan Mikroskop Binokuler Olympus CX21 Perbesaran 40x dan (b) Ukuran Sel Limfosit .....	61
Gambar 16. (a) Hasil Pengamatan Monosit dengan Mikroskop Binokuler Olympus CX21 Perbesaran 40x dan (b) Ukuran Sel Monosit.....	62
Gambar 17. (a) Hasil Pengamatan Neutrofil dengan Mikroskop Binokuler Olympus CX21 Perbesaran 40x dan (b) Ukuran Sel Neutrofil .....	63
Gambar 18. Diagram Perbandingan Jumlah Sel Limfosit, Monosit, dan Neutrofil.....	64
Gambar 19. Makroskopis Limpa (a) Normal, (b) Kontrol Negatif, (c) Kontrol Positif, (d) Kelompok 1 (200 mg/KgBB), (e) Kelompok 2 (400 mg/KgBB), dan (f) Kelompok 3 (800 mg/KgBB).....	72

## **DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
Lampiran 1. Skema Kerja Umum .....	86
Lampiran 2. Preparasi Ekstrak Etanol Daun Afrika.....	87
Lampiran 3. Karakterisasi Ekstrak (Penentuan Kadar Sari Larut Air).....	88
Lampiran 4. Karakterisasi Ekstrak (Penentuan Kadar Air).....	89
Lampiran 5. Karakterisasi Ekstrak (Penentuan Total Fenolik) .....	90
Lampiran 6. Karakterisasi Ekstrak (Penentuan Total Flavonoid) .....	91
Lampiran 7. Persiapan Hewan Uji dan Desain Penelitian .....	92
Lampiran 8. Evaluasi Total Leukosit .....	93
Lampiran 9. Penentuan Persentase Monosit, Limfosit, dan Neutrofil .....	94
Lampiran 10. Evaluasi Jumlah Sel T CD4.....	95
Lampiran 11. Evaluasi Makroskopis Limpa .....	96
Lampiran 12. Hasil Determinasi Daun Afrika .....	97
Lampiran 13. Data Hasil Pengamatan.....	98
Lampiran 14. Perhitungan Nilai Rendemen Ekstrak Etanol Daun Afrika .....	101
Lampiran 15. Perhitungan Kadar Sari Larut Air .....	102
Lampiran 16. Perhitungan Kadar Sari Larut Etanol.....	103
Lampiran 17. Perhitungan Kadar Air .....	104
Lampiran 18. Perhitungan Total Fenolik.....	105
Lampiran 19. Perhitungan Total Flavonoid.....	107
Lampiran 20. Konversi Dosis dan Perhitungan Dosis Sediaan.....	109
Lampiran 21. Perhitungan Jumlah Hewan Uji pada Tiap Kelompok .....	110
Lampiran 22. Perhitungan Dosis Fenobarbital.....	111
Lampiran 23. Uji Statistik Jumlah Sel T CD4 .....	113
Lampiran 24. Uji Statistik Jumlah Sel Leukosit .....	115
Lampiran 25. Uji Statistik Jumlah Sel Limfosit.....	117
Lampiran 26. Uji Statistik Jumlah Sel Monosit.....	119
Lampiran 27. Uji Statistik Jumlah Sel Neutrofil.....	121
Lampiran 28. Uji Statistik Bobot Limpa.....	123
Lampiran 29. Gambar Penelitian .....	125
Lampiran 30. Sertifikat Persetujuan Etik .....	128

## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

#### **1.1 Latar Belakang**

Saat ini penyakit infeksi masih merupakan masalah kesehatan utama di dunia, terutama di negara tropis seperti Indonesia. Iklim tropis di Indonesia sangat cocok bagi pertumbuhan dan perkembangbiakan bakteri dan agen pembawa penyakit lainnya. Adanya agen pembawa ini menyebabkan sistem imun melemah sehingga menimbulkan berbagai penyakit (Sardjono, 2009; Sukowati, 2010). Sistem imun diperlukan untuk mempertahankan keutuhan tubuh sebagai perlindungan terhadap bahaya yang ditimbulkan berbagai benda asing atau antigen. Sistem imun adalah gabungan sel, molekul dan jaringan yang berperan dalam resistensi terhadap infeksi. Senyawa yang berperan terhadap peningkatan sistem imun tubuh disebut imunomodulator (Baratawidjaja, 2014).

Agen imunomodulator digunakan untuk menekan atau merangsang respon kekebalan tubuh dari suatu organisme terhadap antigen. Senyawa yang dapat memodulasi sistem imun salah satunya dapat diperoleh dari tanaman (Wagner *et al.*, 1999). Tanaman yang bersifat imunomodulator pada umumnya memiliki aktivitas memacu imunitas spesifik dan non spesifik (Eze *et al.*, 2014). Beberapa diantara tanaman tersebut memicu imunitas humorai seperti proliferasi leukosit dan seluler seperti sel T CD4 (Bafna *and* Misrha, 2004). Sediaan fitofarmaka yang digunakan sebagai agen imunomodulator adalah Stimuno®. Fitofarmaka Stimuno® mengandung ekstrak tunggal tanaman meniran (*Phylanthus niruri*). Salah satu tanaman lain yang diduga mampu mempengaruhi imunitas adalah daun afrika (*Vernonia amygdalina*).

Daun afrika mengandung senyawa golongan saponin, flavonoid, sesquiterpen lakton, fenolik, dan glikosida steroid (Ijeh *and* Chukwunonso, 2010). Selain itu juga terdapat sesquiterpen lakton seperti vernodalin dan vernoamygdalin dan glikosida steroid seperti vernonioside B1 dan vernoniol B1 (Ojiako *and* Nwanjo, 2006). Kandungan dari daun afrika ini mampu memberikan aktivitas yang baik terhadap peningkatan imunitas dari tubuh.

Menurut Igile *et al.* (1994) ekstrak daun afrika dapat memperkuat sistem kekebalan tubuh melalui stimulasi sitokin. Hal ini memungkinkan daun afrika juga dapat meningkatkan respon imun nonspesifik seperti kadar leukosit, serta akan berpengaruh terhadap respon imun spesifik seperti sel T CD4. Momoh *et al.* (2010) menjelaskan daun afrika yang tidak terinduksi antigen dapat meningkatkan secara signifikan sel T CD<sub>4</sub> yaitu  $79,8 \pm 6,0$  sel/ $\mu\text{L}$  pada dosis 800 mg/kg BB,  $63,6 \pm 4,6$  sel/ $\mu\text{L}$  dosis 400 mg/kg BB, dan  $55,2 \pm 8,1$  sel/ $\mu\text{L}$  dosis 200 mg/kg BB.

Komponen flavonoid dan fenolik yang diisolasi dari ekstrak etanol daun afrika menunjukkan aktivitas sitotoksitas terhadap sel kanker (Izevbogie, 2003; Erasto *et al.*, 2006; Opata *and* Izevbogie, 2006). Salawu *et al.* (2011) menunjukkan bahwa senyawa vernodalin daun afrika menunjukkan aktivitas antioksidan dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 1,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Georgewill (2009) menunjukkan ekstrak air daun afrika dapat menurunkan 69,10% respon inflamasi pada tikus dengan dosis 400 mg/kg BB.

Obat-obatan maupun ekstrak yang bersifat imunomodulator dapat menunjukkan aktivitas yang berbeda ketika diinduksi dengan antigen tertentu. Berdasarkan hal tersebut, maka perlu dilakukan penelitian terhadap aktivitas imunomodulator dari ekstrak etanol daun afrika. Pada penelitian ini akan digunakan

bakteri *Salmonella thypimurium* sebagai antigen penginduksi. Pemilihan jenis bakteri ini berdasarkan kemampuannya mempengaruhi sistem imun tubuh, berupa sistem imunitas spesifik (sel T CD4) dan nonspesifik (leukosit) (Diepen, 2005). Pemberian ekstrak etanol daun afrika pada tikus yang terinduksi *Salmonella thypimurium* diharapkan mampu meningkatkan kadar leukosit dan sel T CD4 pada hewan uji. Etanol 96% dipilih sebagai pelarut karena mempunyai *extractive power* (daya ekstraksi) yang terbaik untuk hampir semua senyawa yang mempunyai berat molekul rendah seperti alkohol, saponin, flavonoid, termasuk juga alkaloid.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, dapat dirumuskan masalah sebagai berikut:

1. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak etanol daun afrika terhadap jumlah sel T CD<sub>4</sub> pada tikus putih yang diinduksi bakteri *S. thypimurium*?
2. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak etanol daun afrika terhadap jumlah leukosit, limfosit, monosit, dan neutrofil total pada tikus putih jantan diinduksi bakteri *S. thypimurium*?
3. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak etanol daun afrika terhadap parameter makroskopik organ limpa tikus putih jantan diinduksi bakteri *S. thypimurium*?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini sebagai berikut:

1. Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol daun afrika terhadap jumlah sel T CD<sub>4</sub> pada tikus putih jantan yang diinduksi *S. thypimurium*.
2. Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol daun afrika terhadap

jumlah leukosit, limfosit, monosit, dan neutrofil total pada tikus putih jantan yang diinduksi *S. thypimurium*.

3. Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol daun afrika terhadap parameter makroskopik organ limpa tikus putih jantan.

#### **1.4 Manfaat Penelitian**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat sebagai berikut :

1. Sebagai informasi mengenai aktivitas daun afrika (*Vernonia amygdalina*) sebagai bahan imunomodulator alami.
2. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memperkuat nilai ilmiah dari khasiat daun afrika (*Vernonia amygdalina*) dan menjadi dasar untuk penelitian selanjutnya.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K. & Lichmant, A.H. 2012, *Cellular and Molecular Immunology*, 4<sup>th</sup> Edition, WB and Saunders, London, UK.
- Aboderin, F.I. & V.O. Oyetayo. 2006, Haematological Studies of Rats Fed Different Doses of Probiotic, *Lactobacillus plantarum*, isolated from fermenting corn slurry, *Pakistan J. Nutr.*, **5**:102-105.
- Adetutu, A., MorganW, A. & Corcoran, O. 2011, Ethnopharmacological survey and in vitro evaluation of wound-healing plants used in South-western Nigeria, *Journal of Ethnopharmacology*, **137**:50–56.
- Adewole, S.O. & Ezekiel, A.C.M. 2006, Morphological Changes and Hypoglycemic Effects of *Annona Muricata* Linn. (Annonaceae) Leaf Aqueous Extract on Pancreatic B-Cells of Streptozotocin-Treated Diabetic Rats, *African Journal of Biomed Research*, **9**: 173–187.
- Adrianus, W., Velden, M., Copass, M.K. & Starnbach, M.N. 2005, *Salmonella* inhibit T cell proliferation by a direct, contact-dependent immunosuppressive effect, *Proc Natl Acad Sci USA*, **102(49)**: 17769-17774.
- Ahmad, H., Mishra, A., Gupta, R. & Shubhini, A.S. 2011, Determination of Quercetin in *Michelia champaca* L. (Champa) Leaves and Stem Bark by HPTLC, *IJPBS*, **2(4)**:388-397.
- Alabi, D.A, Onibudo, M.Z. & Amusa, N.A. 2005, Chemicals and nutritional composition of four botanicals with fungitoxic properties, *World J Agric Sci*, **1(1)**:84–88.
- Alfian, B. & Susanti, R. 2012, *Analisis Senyawa Fenolik*, Universitas Diponegoro Press, Semarang, Indonesia.
- Anggraini, D.P., Pratiwi, T. & Sri, M. 2012, Efek Imunomodulator Ekstrak Etanol Kayu Manis (*Cinnamomum burmanii*) terhadap Jumlah CD4 dan Interferon Gamma pada Mencit BALB/c yang Diinfeksi Bakteri *Salmonella Enteridis*, *Skripsi*, drh, Jurusan Kedokteran Hewan, FKH, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia.
- Arrington, L. R. 1972, Introductory Laboratory Animal Science, the Breeding, Care and Management of Experimental Animal, *The Interstate Printers and Publishers*, Inc. Denville.
- Asante, D., Emmanuel, E.Y., Precious, B., Heckel, A.A., Elvis, O.A., Johnson, N.B., Eric, G.O. & Joseph, B.D. 2016, Antidiabetic Effect of Young and Old Ethanolic Leaf Extracts of *Vernonia amygdalina*: A Comparative Study, *Journal of Diabetes Research*, pp. 1-13.

- Bafna, A.R. & Mishra, S.H. 2004, Immunomodulatory Activity of Methanol Extract of Flower Heads of *Sphaeranthus Indicus* Linn, *Ars Pharmaceutica*, **45**:281–91.
- Baratawidjaja, K.G. & Rengganis, I. 2014, *Imunologi Dasar Edisi Sebelas*. Balai Penerbit FKUI, Jakarta, Indonesia.
- Bloom, F. 1994, *A Textbook of Histology*, Terjemahan Jan Tambayong, Penerbit Buku Kedokteran (EGC), Jakarta, Indonesia.
- Brands, D. 2006, *Salmonella*, Chelsea House Publishers, London, UK.
- Brooks, G.F., Carroll, K.C., Butel, J.S., Morse, S.A., Mietzner, T.A., Jawetz, et al. 2010, *Medical Microbiology*, 25<sup>th</sup> Edition, Mc Graw Hill, USA.
- Burnside, J.W. & McGlynn, T.J. 1987, *Physical Diagnostic*, 17<sup>th</sup> edition, Terjemahkan Lukmanto, H. 1990, EGC, Jakarta, Indonesia.
- Campbell, N.A., Reece, J.B. & Mitchell, L.G. 2004, *Biologi Edisi ke-5, Jilid 3*, Erlangga, Jakarta, Indonesia.
- Chaturvedi, D. 2011, Sesquiterpene Lactones: Structural Diversity and Their Biological Activities. In: Tiwari, V.K., Mishra, B.B. (Eds.), Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry. *Research Signpost*, Trivandrum, pp. 313–434.
- Chen, A., Liu, S. & Park, D. 2007, Depleting Intratumoral CD4+CD25+ Regulatory T Cells via FasL Protein Transfer Enhances the Therapeutic Efficacy of Adaptive T Cells Transfer, *Cancer Res*, **67**:713-719.
- Cos, P., Hermans, N., De Bruyne, T., Apers, S., Sindambiwe, J.B., Vanden Berghe, D., Pieters, L. & Vlietinck, A.J. 2002, Further Evaluation of Rwandan Medicinal Plant Extracts for Their Antimicrobial and Antiviral Activities, *Journal of Ethnopharmacology*, **79**:155–163.
- Darmowandowo, W. 2006, *Demam Tifoid, Buku Ajar Ilmu Kesehatan Anak: Infeksi dan Penyakit Tropis Edisi I*, BP FK UI, Jakarta.
- DeFranco, A., Locksley, R.M. & Robertson, M. 2007, Immunity The Immun Response in Infectious and Inflammatory Disease, *New Sciece London*, 302-07.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1986, *Sediaan Galenik*, Direktorat Jendral POM, Jakarta, Indonesia.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2000, *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, Direktorat jendral POM, Jakarta, Indonesia.
- Diepen, A.V. 2005, *Salmonella typhimurium* and its host : host-pathogen cross-talk, immune evasion, and persistence, *Thesis*, Leiden University, Neherland.

- Direktur Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. 2008, *Pengujian Mikrobiologi Pangan*. Pusat Pengujian Obat dan Makanan BPOM RI, Jakarta, Indonesia.
- Effendi, Z. 2003, *Peranan Leukosit sebagai Anti Inflamasi Alergik dalam Tubuh*. Fakultas Kedokteran, Universitas Sumatera Utara, Medan, Indonesia.
- Ejoh, R.A., Nkonga, D.V., Gouado, I. & Mbofung, C.M. 2007, Nutritional Components of Some Non-conventional Leafy Vegetables Consumed in Cameroon. *Pakistan Journal of Nutrition*, **6**:712–717.
- Ekaluo, U.B., Ikpeme, E.V., Ekerette, E.E. & Chukwu, C.I. 2015, In vitro Antioxidant and Free Radical Activity of Some Nigerian Medicinal Plants: Bitter Leaf (*Vernonia amygdalina* L.) and Guava (*Psidium guajava* Del.), *Res. J. of Med. Plant*, **9**: 1-12.
- Endah, S. 2010, Ekstraksi Cair-cair Pemurnian Eugenol dari Minyak Daun Cengkeh, *Tesis*, Pasca Sarjana Pendidikan Sains, Universitas Sebelas Maret, Sukoharjo, Indonesia.
- Erasto, P., Grierson, D.S. & Afolayan, A.J. 2006, Bioactive Sesquiterpene Lactones from The Leaves of *Vernonia Amygdalina*, *Journal of Ethnopharmacology*, **106**:117–120.
- Eze, C.P., Vincent, S.O., Shoyinka, J.O.A., Okoye, W.s., Ezema, I.O., Ogbonna, D.C. & Okwor, O.K.I. 2014, Comparison of the Serum Proteins and Immune Responses of Velogenic Newcastle Disease Virus Infected Chickens and Ducks, *Open Journal of Veterinary Medicine*, **4**:122-128.
- Feldman, B.F. 2000, *Veterinary Hematology Fifth Edition*, Lippincot William and Wilkins, California, USA.
- Fessenden, R.J. & Fessenden, J.S. 1994, *Kimia Organik Jilid I Edisi Ketiga*, Erlangga, Jakarta, Indonesia.
- Firmansyah, A.H., Muwarni, S. & Indrati, R. 2012, Efek Imunostimulator Ekstrak Etanol Kayu Manis (*Cinnamomum burmannii*) Terhadap Penigkatan Jumlah Sel T CD4 dan T CD8 pada Mencit BALB/C, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia.
- Franca, E.L., Maynie, J.C., Correa, V.C., Pereira, U.C.R., Batalini, C., Ferrari, C.K.B. & Honorio, A.C. 2010, Immunomodulatory Effects of Herbal Plants Plus Melatonin on Human Blood Phagocytes. *International Journal of Phytomedicine*, **2**:354–362.
- Frandsen, R.D., Wilke, W.L. & Fails, A.D. 2009, *Anatomy and Physiology of Farm Animal 7th Edition*, Willey-Blackwell, Iowa, US.
- Gandjar, G.H., & Rohman, A. 2007, *Kimia Farmasi Analisis*. Pustaka Pelajar, Yogyakarta, Indonesia.
- Georgewill, U.O. & Georgewill, O.A. 2009, Evaluation of Anti-Inflammatory Activity of *Vernonia amygdalina*, *Eastern Journal of Medicine*, **14**:20–22.

- Gershenson, J. & Dudareva, N. 2007, The Function of Terpene Natural Products in The Natural World, *Nat Chem Bio*, **3**:408-414.
- Germplasm Resources Information Network Taxonomy for Plants. 2013, Taxonomy of *Vernonia amygdalina Delile*, diakses tanggal 20 Mei 2016, <<https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomydetail>>.
- Gunawan, A. 2009, Perbandingan Efek Analgesik antara Parasetamol dengan Kombinasi Parasetamol dan Kafein pada Mencit, *Jurnal Biomedika*, **1(1)**: 37-43.
- Halliwell, B. 2006, Reactive Spesies and Antioxidants: Redox Biology Is A Fudamental Theme Of Aerobic Life, *Plant Physiol*, **141**:312-322.
- Handayani, Wiwik. 2008, *Asuhan Keperawatan pada Klien dengan Gangguan Sistem Hematologi*, Salemba Medika, Jakarta, Indonesia.
- Harbourne, J.B. 1987, *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, Terjemahan Kosasih dan Iwang S.J., ITB, Bandung, Indonesia.
- Hasdianah, H.R., Prima, D., Peristinowati, & Sentot, I. 2014, *Imunologi Diagnosis dan Teknik Biologi Molekuler*, Nuha Medika, Yogyakarta, Indonesia.
- Hermayanti. 2013, Uji Efek Tonikum Ekstrak Daun Ceguk (*Quisqualis Indica L.*) terhadap Hewan Uji Mencit (*Mus Musculus*), Universitas Indonesia Timur, 95-99.
- Ibrahim, A.M., Yunianta, & Feronika, H.S. 2015, Pengaruh suhu dan lama waktu ekstraksi terhadap sifat kimia dan fisik pada pembuatan minuman sari jahe merah (*Zingiber officinale var. Rubrum*) dengan kombinasi penambahan madu sebagai pemanis, *J Pangan dan Agroindustri*, **3(2)**: 530-541.
- Ibrahim, N.D.G., Abdurahman, E.M. & Ibrahim, G. 2001, Elemental Analysis of The Leaves of *Vernonia amygdalina* and Its Biological Evaluation in Rats, *Nigerian Journal of Natural Products and Medicine*, **5**:13–16.
- Ichshanti, S. 2013, Uji Aktivitas Antimutagenik Ekstrak Metanol Rimpang Temu Giring (*Curcuma Heyneana*) terhadap Sel Eritrosit Mencit Secara In Vivo, *Skripsi*, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Yogyakarta, Indonesia.
- Igile, G.O., Oleszek, W., Jurzysta, M., Burda, S., Fafunso, M. & Fasanmade, A.A. 1994, Flavonoids from *Vernonia amygdalina* and Their Antioxidant Activities. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **42**:2445–2449.
- Ijeh, I.I. & Chukwunonso, E.C.C.E. 2010, Current Perspectives on The Medicinal Potentials of *Vernonia amygdalina Del.*, *Journal of Medicinal Plant Research*, **5(7)**:1051 – 1061.
- Inverness Medical, 2009, *Alere Pima CD4 Hematology Analyser*, diakses pada tanggal 16 Juni 2016, <<http://www.alere.com/en/home/product-details>>

/PimaAnalyserOUS.html>

- Isbagio, D.W. 1992, Euthanasia pada hewan percobaan, *Artikel*, **2(1)**: 18-24.
- Izevbogie, E.B. 2003, Discovery of Water-Soluble Anticancer Agents (Edotides) froma Vegetable Found in Benin City, Nigeria, *Experimental Biology and Medicine*, **228**:293–298.
- Jawetz, M. & Adelberg, S. 2005, *Mikrobiologi Kedokteran*, Edisi 23. Terjemahan Huriwati Hartanto dkk., Penerbit Buku Kedokteran ECG, Jakarta, Indonesia.
- Kaur, K., Jain, M., Kaur, T., & Jain, R. 2009, Antimalarials from Nature, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **17**:3229–3256.
- Keeley, S.C. & Jones, S.B. 1979, Distribution of Pollen Types in *Vernonia* (*Vernonieae:Compositae*). *Systematic Botany*, **4**:195–202.
- Koeswardani, Boentoro, & Budiman. 2002, *Flow Cytometri dan Aplikasi Alat Hitung Sel Darah Otomatis Technicon H-1 dan H-3*, Horison, Jakarta, Indonesia.
- Krifa, M., Bouhlel, I., Ghedira-Chekir, L. & Ghedira, K. 2013, Immunomodulatory and cellular anti-oxidant activities of an aqueous extract of *Limoniastrum guyonianum* gall, *Journal of Ethnopharmacology*, **146(1)**: 243-249.
- Kristanti, & Alfinda, N. 2008, *Buku Ajar Fitokimia*, Airlangga University Press. Surabaya, Indonesia.
- Kshirsagar, A. & Purnima, A. 2008, Evaluation of *Calotropis gigantea* R.Br. Flower Extract of Alcohol Induced Hepatotoxicity, *J. Cell Tissue Research*, **4(19)**: 1551 – 1556.
- Mahmoudi, S., Khali, M., Benkhaled, A., Benamirouche, K & Baiti, I. 2016, Phenolic and Flavonoid Contents, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Leaf Extracts from Ten Algerian *Ficus carica* L. varieties, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, **6(3)**: 239–245.
- Maryanto, S. 2013, Effect of Red Guava (*Psidum guajava* L.) Fruits on Lipid Peroxidation in Hypercholesterolemic Rats. *Basic Res. J. Med. Clin.Sci.*, **2(11)**: 116-12 cit. Federer, W. 1991, *Statistics and Society: Data Collection and Interpretation*. 2<sup>th</sup> Edn., CRC Press, New York.
- Mescher, Anthony L. 2012, *Histologi Dasar*, Buku Kedokteran EGC, Jakarta, Indonesia.
- Meyer, D.J. & John, W.H. 1998, *Veterinary Laboratory Medicine Interpretation and Diagnosis*, Third Edition, Saunder An Imprint of Elsevier, USA.
- Middleton, E.J.R., Kandaswami, C. & Theoharides, T.C. 2000, The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer, *Pharmacol Rev*, **52(4)**: 673-751.

- Momoh, M.A., Adikwu, M.U. & Oyi, A.R. 2010, *Vernonia amygdalina* Extract and CD4 Cell Counts: An Immune Study, *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry*, **5**:92–96.
- Muller, J and Heindl. 2006. Drying Of Medical Plants In R.J. Bogers, L.E.Cracer, and D. Lange (eds), *Medical and Aromatic Plant*, Springer, The Netherland, p.237-252.
- Nelwan. 2007, *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*, FKUI, Jakarta, Indonesia.
- Nwakoby, I.E., Reddy, K., Patel, P., Shah, N., Sharma, S., Bhaskaran, M., Gibbons, N., Kapasi, A.A. & Singhal, P.C. 2001, Fas-Mediated Apoptosis of Neutrophils in Sera of Patients with Infection, *American Society for Microbiology*, **69(5)**: 3343-3349.
- Nwanjo, H.U. 2005, Efficacy of Aqueous Leaf Extract of *Vernonia amygdalina* on Plasma Lipoprotein and Oxidative Status in Diabetic Rat Models, *Nigerian Journal of Physiological Science*, **20**:39–42.
- Ogundare, A.O., Adetuyi, F.C. & Akinyosoye, F.A. 2006, Antimicrobial Activities of *Vernonia tenoreana*. *African Journal of Biotechnology*, **5**:1663–1668.
- Ohashi, K., Winarno, H., Mukai, M., Inoue, M. & Prana, M.S. 2003. Cancer Cell Invasion Inhibitory Effects of Chemical Constituents In The Parasitic Plant *Scurrula atropurpurea* (Loranthaceae), *Chem. Pharm. Bull.*, **51**: 343-345.
- Ojiako, O.A. & Nwanjo, H.U. 2006, Is *Vernonia amygdalina* Hepatotoxic or Hepatoprotective? Response from Biochemical and Toxicity Studies in Rats, *African Journal of Biotechnol*, **5(18)**:1648-1651.
- Oliveira, A.C., Valentim, I.B., Marília, O.F. 2009, Fontes Vegetais Naturais de Antioxidantes, *Quim. Nova.*, **32 (3)**: 689-702.
- Olajire A.A. & Azeez, L. 2011, Total Antioxidant Activity, Phenolic, Flavonoid and Ascorbic Acid Contents of Nigerian Vegetables, *African Journal of Food Science and Technology*, **2(2)**: 22-29.
- omoregie, E.S., Pal, A., Darokar, M.P., Chanda, D. & Sisodia, B. 2010, In vitro and in vivo antiplasmodial activity and cytotoxicity of extracts from *Vernonia amygdalina Del.* Leaves, *Malaria Journal*, **9**:30.
- Opata, M.M. & Izvebigie, E.B. 2006, Aqueous *Vernonia amygdalina* Extracts Alter MCF-7 Cell Membrane Permeability and Efflux. *Int J Environ Res*, **3**: 174-179.
- Oriakhi, K., Ehigbai, I.O., Nkeiruka, E., Ogechukwu, A., Omoredede, A. & Ehimwenma, S.O. 2014, Comparative Antioxidant Activities of Extracts of *Vernonia amygdalina* and *Ocimum gratissimum* Leaves. *Journal of Agricultural Science*, **6(1)**: 13-20.
- Pietta, P.G. 2000, Flavonoids as Antioxidants, *J. Nat. Prod.*, **63**:1035-1042.

- Prasetyo, A., Yazid, N. & Mardhiyah. 2005, Gambaran Histopatologik Limpa Wistar pada Pemberian Diet Selulosa, Lignin, dan Amorphophallus oncophyllus dan Induksi Karsinogenesis Kolon, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro, Semarang, Indonesia.
- Price, S.A. & Wilson, L.M. 1994, *Pathophysiology Clinical Concepts of Disease Processes*, EGC, Jakarta, Indonesia.
- Puspitasari, D.A., Pratiwi, T. & Murwani, S. 2012, Efek Imunostimulator Ekstrak Etanol Kayu Manis (*Cinnamomum Burmanii*) Terhadap Jumlah CD4, dan Interferon Gamma Pada Mencit BALB/c yang Diinfeksi Bakteri *Salmonella enteritidis*, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia.
- Qing, F.R., Manogaran, E. & Gabriel, A.A. 2014, Antimicrobial and Antioxidant Studies of *Vernonia amygdalina*, *J App Pharm*, **6(4)**: 360-371.
- Rasyid, R., Yanwirasti, & Ellyza, N. 2008, Pengaruh esterogen terhadap aktivitas sel makrofag dalam memfagosit *Candida albicans* secara *in vitro*, *Majalah Kedokteran Andalas*, **32**: 1.
- Roberts, S.C. 2007, Production and Engineering of Terpenoids in Plant Cell Culture, *Nature Chemical Biology*, **3**:387–394.
- Robinovitch, M. 1995, Profesional and Non Profesional Phagocytes, Journal Introduction Trends In All Biology, **5**:85-87.
- Robinson, T. 1995, *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*, Terjemahan Kosasih, ITB, Bandung, Indonesia.
- Rowe, C.R., Sheskey, J.P. & Weller, J.P. 2009, *Handbook of Pharmaceutical Excipient*, 6<sup>th</sup> edition, American Pharmaceutical Association, London, UK.
- Runnells, R.A., Monlux, W.S. & Monlux, W.A. 1960, *Principles of Veterinary Pathology*, The Iowa State University Press, Ames, USA.
- Salawu, S.O., Akindahunsi, A.A., Sanni, D.M., Decorti, G., Cvorovic, J., Tramer, F., Passamonti, S. & Mulinacci, N. 2011, Cellular Antioxidant Activities and Cytotoxic Properties of Ethanolic Extracts of Four Tropical Green Leafy Vegetables, *African Journal of Food Science*, **5**:267–275.
- Sardjono, W. 2009, *Strategi Penanggulangan dan Pencegahan Penyakit Parasitik di Masyarakat*, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia.
- Sembiring, B.B., Ma'mun, & E.I.Ginting. 2006. Pengaruh kehalusan bahan dan lama ekstraksi terhadap mutu ekstrak temulawak (*Curcuma xanthorrhiza Roxb*), *Bul. Littro*, **17**:53-58.
- Sharma, A., Fish, B.L., Moulder, J.E., Medhora, M., Baker, J.E., Mader, M. & Cohen, E.P. 2014, Safety and Blood Sample Volume and Quality of a Refined Retro-Orbital Bleeding Technique In Rats Using a Lateral Approach, *Lab Animal*, **43(2)**:63-66.

- Simbala, H.E.I. 2009, Analisis senyawa alkaloid beberapa jenis tumbuhan obat sebagai bahan aktif fitofarmaka, *Pasific Journal*, **1(4)**: 489-494.
- Sloane, E. 1995, *Anatomi dan Fisiologi*, EGC Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta, Indonesia.
- Sukmayadi, A.E., Sumiwi, S.A., Barliana, M.I. & Aryanti, A.D. 2014, Aktivitas Imunomodulator Ekstrak Etanol Daun Tempuyung (*Sonchus arvensis* Linn.), *IJPST*, **1(2)**: 65-72.
- Sukowati, S. 2010, Masalah Vektor Demam Berdarah Dengue (DBD) dan Pengedaliannya di Indonesia. *Buletin Jendela Epidemiologi*, Jakarta Indonesia.
- Susanti, R., Yuniastuti, A. & Iswar, R.S. 2012, Aktivitas Reactive Oxygen Species Makrofag Akibat Stimulasi Gel Lidah Buaya pada Infeksi *Salmonella typhimurium*, *Jurnal MIPA*, Universitas Negeri Semarang, Indonesia.
- Sutjipto, W.J.P. & Widayastuti, Y. 2009, Pengaruh cara pengeringan terhadap perubahan fisikokimia daun kumis kucing (*Orthosiphon stamineus* Benth), *J Tumbuhan Obat Ind*, **2**: 1.
- Sysmex Corporation, 2012, *Sysmex KX-21N Automated Hematology Analyser*, diakses pada tanggal 26 September 2016, <http://www.sysmex.com/us/en/brochures/>.
- Thomson, A.D. & Cotton, R.E. 1997, *Catatan Kuliah Patologi (Lectur Notes on Pathology)*, Terjemahkan Maulany, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta, Indonesia.
- Tjay, T.H. & Rahardja, K. 2007, *Obat-obat Penting Khasiat, Penggunaan dan Efek-efek Sampingnya Edisi Keenam*, Elex Media Komputindo, Jakarta, Indonesia.
- Tjokronegoro, A. & Utama, H. 1996, *Pemeriksaan Hematologi Sederhana*, FKUI, Jakarta, Indonesia.
- Toyang, N. J. & Rob, V. 2013, A Review of The Medicinal Potentials of Plants of Genus *Vernonia* (Asteraceae). *Virgin Botanical Biotech Inc.*, Columbia, MD, USA.
- Underwood, J.C.E. 1996, *General and Systematic Pathology Second Edition*. Terjemahan Sarjadi, Penerbit Buku Kedokteran (EGC), Jakarta, Indonesia.
- Viranda, P.M., 2009. Pengujian Kandungan Fenol Total Tomat (*Lycopersicum esculentum*) secara In Vitro, *Skripsi*, Sarjana Kedokteran, UI, Jakarta, Indonesia.
- Voight, R. 2005, *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*, Edisi V, UGM Press, Yogyakarta, Indonesia.
- Wagner, W.L., Herbst, D.R. & Sohmer, S.H. 1999, *Manual of the Flowering Plants of Hawaii*, University of Hawaii Press, Honolulu, Hawaii.

- Watson, L.J. 2013, Immune Response, diakses tanggal 31 Mei 2016, <<http://geekymedics.com/immune-response>>.
- Widianto, M.B. 1987, *Imunomodulator*, ITB, Bandung, Indonesia.
- Widiyanti, R. 2009. Analisis Kandungan Fenol Total Jahe (*Zingiber officinale Roscoe*), Skripsi, Fakultas Kedokteran, UI, Jakarta, Indonesia.
- Widmann, F.K. 1989, Tinjauan Klinis atas Hasil Pemeriksaan Laboratorium, Edisi ke-9, EGC, Jakarta, Indonesia.
- Widyastuti, D.A. 2013, Profil Darah Tikus Putih Wistar pada Kondisi Subkronis Pemberian Natrium Nitrit, *JSV*, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia.
- Winangsih, Erma, P. & Sarjana, P. 2013, Pengaruh Metode Pengeringan terhadap Kualitas Simplisia Lempuyang Wangi (*Zingiber Aromaticum L.*), *Buletin Anatomi dan Fisiologi*, **21(1)**:19-25.
- Wilkinson, J.M, Halley, S. & Towers, P.A. 2000, Comparison of male reproductive parameters in three rat strains: Darl Agouti, Sprague-Dawley, and Wistar, *Lab Animals Australia*, **34**: 70-75.
- Wirawan, Riadi, & Erwin, S. 1996, *Pemeriksaan Laboratorium Sederhana*, Fakultas Kedokteran UI, Jakarta, Indonesia.
- Zhang, L., Yang, M., Gao, J., Jin, S., Wu, Z., Wu, L., Zhang, X. 2015, Seasonal Variation and Gender Pattern of Phenolic and Flavonoid Contents In *Pistacia Chinensis* Bunge Inflorescences and Leaves. *Journal of Plant Physiology*, **171(1)**: 2054.
- Zhang, S., Won, Y.K., Ong, C.N. & Shen, H.M., 2005. Anti-Cancer Potential of Sesquiterpene Lactones ; Bioactivity and Molecular Mechanisms. *Current Medicinal Chemistry Anticancer Agents*, **5**:239–249.
- Zou,Y., Lu,Y. & Wei, D. 2004, Antioxidant Activity of Flavonoid Rich Extract of *Hypericum perforatum* L. in Vitro, *J.Agric.Foo Chem.*, **52**:5032-5039.