



**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK *Phyllanthus Niruri*
TERHADAP STATUS IMUN PADA MENCIT BALB/C
YANG DIINFEKSI *Salmonella Typhimurium* : GAMBARAN
MORFOLOGI LIMFOSIT DAN PRODUKSI NITRIC
OXIDE (NO) MAKROFAG**

ARTIKEL PENELITIAN

Disusun untuk Memenuhi Tugas dan Melengkapi Persyaratan
dalam Menempuh Program Pendidikan Sarjana
Fakultas Kedokteran

Disusun oleh :

Edwin Sanjaya
NIM : G2A 004 056

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2008**

HALAMAN PENGESAHAN
ARTIKEL KARYA TULIS ILMIAH

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK *Phyllanthus Niruri l* TERHADAP
STATUS IMUN PADA MENCIT BALB/C YANG DIINFEKSI *Salmonella*
Typhimurium : GAMBARAN MORFOLOGI LIMFOSIT DAN PRODUKSI
NITRIC OXIDE (NO) MAKROFAG**

Disusun oleh :
Edwin Sanjaya
G2A004056

Telah dipertahankan di hadapan Tim Penguji Karya Tulis Ilmiah Fakultas Kedokteran
Universitas Diponegoro pada tanggal 14 Agustus 2008 dan telah diperbaiki sesuai
saran-saran yang diberikan.

Tim penguji

Dosen Penguji

Pembimbing

dr. Neni Susilaningsih, MSi

dr. Imam Budiwiyono, SpPK(K)

NIP. 131.832.243

NIP. 131.125.893

Ketua Penguji

Dr. Noor Wijayahadi

NIP. 132.148.104

EFFECT OF PHYLLANTHUS NIRURI L TO IMMUNITY STATUS OF BALB/C MICE THAT INFECTED SALMONELLA TYPHIMURIUM: LIMPHOCYTE MORPHOLOGY AND NITIC OXIDE (NO) PRODUCTION OF MACROPHAGE.

Edwin Sanjaya¹⁾, Imam Budiwiyono²⁾

ABSTRACT

Background: *Phyllanthus niruri L* can increase activity and function some of specific and non specific either humoral or cellular immunity component. The aim of this study was emphasized on the effect of *Phyllanthus niruri L* extract to limphocyte morphology and nitric oxide(NO) production of macrophage Balb/C mice that infected *Salmonella typhimurium*.

Method: This study adapts laboratory experimental and The Post Only Control Group Design. The 30 male Balb/C (8-10 weeks old and average weight 20-30 grams) was divided into 5 groups and received standart lab diet daily. Group P1 was given *P. niruri* 125 µg/day and infected with *S. typhimurium*, P2 was given *P. niruri* 250 µg/day and infected with *S. typhimurium*, P3 was given *P. niruri* 500 µg/day and infected with *S. typhimurium*, K1 was infected with *S.typhimurium*, K2 without any treatment. In the 7th day all groups was terminated for examination. Within group difference of data were analized by One Way ANOVA. Difference within groups was analized by Post Hoc Test Bonferroni.

Result: There are no significant difference in lymphocyte prolifiration and nitric oxide production of macrophage between treatment groups and positive control group.

Conclusion: *Phyllanthus niruri L* extract not increase lymphocyte prolifiration and nitric oxide production of macrophage in Balb/C mice.

Keyword: *Phyllanthus niruri L*, lymphocyte prolifiration, Nitric oxide production of macrophage.

¹⁾ Undergraduate student, Medical Faculty, Diponegoro University, Semarang.

²⁾ Lecturer, Clinical Pathology Department, Diponegoro University, Semarang.

³⁾

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK *Phyllanthus niruri* TERHADAP STATUS IMUN PADA MENCIT BALB/C YANG DIINFEKSI *Salmonella Typhimurium* : GAMBARAN MORFOLOGI LIMFOSIT DAN PRODUKSI NITRIC OXIDE (NO) MAKROFAG

Edwin Sanjaya¹⁾, Imam Budiwiyono²⁾

ABSTRAK

Latar Belakang: *Phyllanthus niruri L* dapat meningkatkan aktivitas dan fungsi beberapa komponen imunitas non spesifik serta imunitas spesifik baik humoral maupun seluler. Penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri L* terhadap morfologi limfosit serta produksi nitric oxide (NO) makrofag pada mencit Balb/C yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

Metode: Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan pendekatan *The Post Test Only Control Group Design*. 30 ekor mencit jantan Balb/C (umur 8-10 minggu dengan berat badan 20-30 gram) dibagi menjadi 5 kelompok dan masing-masing mendapat pakan standar setiap hari. P1 diberi P. niruri 125 µg/hari dan diinfeksi oleh *S. typhimurium*, P2 diberi P. niruri 250 µg/hari dan diinfeksi oleh *S. typhimurium*, P3 diberi P. niruri 500 µg/hari dan diinfeksi oleh *S. typhimurium*, K1 diinfeksi oleh *S. typhimurium*, K2 tanpa perlakuan. Pada hari ketujuh semua kelompok diterminasi untuk pemeriksaan. Analisa perbedaan antara kelompok diuji dengan *One Way ANOVA* dan besarnya perbedaan masing-masing kelompok dianalisis lebih lanjut dengan *Post Hoc Test Bonferroni*.

Hasil: Penelitian mendapat tidak adanya perbedaan yang bermakna dalam jumlah proliferasi limfosit dan produksi NO antara kelompok perlakuan dan kontrol positive ($p > 0.05$).

Kesimpulan: Pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri L* tidak meningkatkan proliferasi limfosit dan produksi NO makrofag pada mencit Balb/C.

Kata Kunci: *Phyllanthus niruri L*, Proliferasi limfosit, *Nitric Oxide* makrofag.

¹⁾ Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.

²⁾ Staf Pengajar Bagian Patologi Klinik Universitas Diponegoro Semarang.

PENDAHULUAN

Salmonella enterica serovar typhi, termasuk bakteri Gram negative, mempunyai flagel, tidak berspora, anaerob fakultatif yang memfermentasikan glukosa, mereduksi nitrat menjadi nitrit yang menyebabkan infeksi sistemik dan demam typhoid, pathogen terhadap host yang spesifik.¹ Berkembang pada daerah - daerah yang mempunyai sanitasi yang buruk.

Phyllanthus niruri L (Meniran) merupakan salah satu jenis immunostimulator yang teruji dalam meningkatkan sistem imun pada binatang percobaan maupun manusia.² Banyak zat yang terkandung dalam tanaman ini antara lain; alkaloid, flavonoid dan asam repandusinic.³⁻⁵ Alkaloid ekstrak *Phyllanthus niruri L* menghambat *cytophatic effects* yang disebabkan oleh HIV-1/HIV-2.⁶ *Repandusinic acid* mempunyai kemampuan antiviral secara in vitro, menghambat replikasi HIV dan HTLV-1. Penelitian Ogata,et all menunjukkan efek *Phyllanthus* dalam menghambat serangan HIV-1 dan integrasi enzim HIV-1, *reverse transcriptase* dan *protease*. Ketika digunakan untuk penderita HIV positif, dapat mereduksi replikasi HIV.^{6,7}

Pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri L* dapat meningkatkan aktivitas dan fungsi beberapa komponen imunitas nonspesifik serta imunitas spesifik, baik humoral maupun selular. Efek terhadap respon imun nonspesifik berupa peningkatan fagositosis dan kemotaksis makrofag, kemotaksis neutrofil, sitotoksitas sel NK serta aktivitas hemolisis komplemen. Terhadap imunitas seluler, dapat meningkatkan aktivitas limfosit T, limfosit B, meningkatkan sekresi TNF α , IFN γ dan Interleukin.⁷ Terhadap imunitas humoral, pemberian *Phyllanthus* dapat meningkatkan produksi imunoglobulin M (IgM) dan IgG.⁸

Penelitian ini berusaha menjawab apakah ada pengaruh pemberian *Phyllanthus niruri L* terhadap gambaran morfologi limfosit dan produksi NO makrofag mencit Balb/C yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*. Tujuan penelitian ini untuk mendeskripsikan dan menganalisis pengaruh pemberian ekstrak *Phyllanthus Niruri L* terhadap morfologi limfosit dan produksi nitrit oxide (NO) pada mencit Balb/C yang diinjeksi *Salmonella typhmuriumi*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan pertimbangan bagi dunia kesehatan terhadap penggunaan *Phyllanthus niruri L* dalam pengobatan typhoid.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan pendekatan *The Post Test-Only Control Group Design* yang menggunakan binatang percobaan sebagai objek penelitian. Sampel penelitian ini adalah 30 ekor mencit. Untuk menghindari bias dalam penelitian dilakukan kontrol hal-hal berikut: faktor keturunan mencit (diambil mencit yang secara genetis sifatnya sama, yaitu mencit jenis Balb/C, umur mencit 8-10 minggu, jenis kelamin jantan, berat badan 20-30 gram, sehat sebelum diinfeksi *Salmonella typhimurium* , semua mencit diberi makan standar. Mencit kemudian dibagi menjadi 5 kelompok acak. Pada kelompok perlakuan 1, mencit diinfeksi *Salmonella typhimurium* pada hari 1 dan diberi ekstrak *Phyllanthus niruri L* 3X125 µg perhari pada hari ke-2 sampai hari ke-7, kelompok perlakuan 2, mencit diinfeksi *Salmonella typhimurium* pada hari 1 dan diberi ekstrak *Phyllanthus niruri L* 3X250 µg perhari pada hari ke-2 sampai hari ke-7, sedangkan kelompok perlakuan 3, mencit diinfeksi

Salmonella typhimurium pada hari 1 dan diberi ekstrak *Phyllanthus niruri L* 3X500 µg perhari pada hari ke-2 sampai hari ke-7. Kelompok kontrol 1, mencit diinfeksi *Salmonella typhimurium* pada hari ke -1 tetapi tidak diberi ekstrak *Phyllanthus niruri*, kelompok kontrol 2, mencit tidak diinfeksi *Salmonella typhimurium* dan tidak diberi ekstrak *Phyllanthus niruri L*. Dosis ekstrak *Phyllanthus niruri L* didasarkan pada konversi dosis manusia dewasa ke mencit menurut Laurence & Bacharach (1964) yaitu dosis manusia dikali 0,0026. Dosis ekstrak *Phyllanthus niruri L* pada orang dewasa adalah 3 x 50 mg/hari sehingga didapatkan dosis untuk mencit bertingkat yaitu 3 x 125 µg/hari, 3 x 250 µg/hari, 3 x 500 µg/hari. Pada hari ke-7 diambil darah mencit untuk pemeriksaan gambaran morfologi limfosit kemudian mencit diterminasi dan diambil cairan peritoneal untuk pemeriksaan nitric oxide (NO) makrofag.

Pemeriksaan morfologi limfosit dilakukan dengan membuat sediaan apus darah tepi. Darah mencit ditetaskan pada garis tengah kaca objek kira-kira 1 cm dari ujung. Dengan tangan kanan diletakkan kaca objek lain di sebelah kiri tetesan dan gerakkan ke kanan sampai menyentuh tetes darah. Darah akan menyebar pada sisi penggeser. Menggeser kaca ke kiri dengan memegangnya miring 45 derajat. Preparat dibiarkan kering di udara dan diberi label. Preparat yang telah kering difiksasi dengan methanol 90%, dikeringkan kembali. Preparat diberi pewarnaan dengan larutan Giemsa dan didiamkan selama 20-25 menit. Preparat dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Pemeriksaan morfologi limfosit dilakukan menggunakan mikroskop cahaya dengan cara menghitung jumlah limfosit teraktivasi dari 200 leukosit. Ciri-ciri limfosit yang teraktivasi adalah ukuran lebih besar dan reaktif, sitoplasma lebih lebar,

warna lebih biru atau abu-abu, inti oval, bentuk ginjal atau lobulated, kadang kadang terdapat anak inti dengan kromatin kasar.⁹

Pemeriksaan kadar NO dilakukan dengan mengisolasi makrofag peritoneal. *Peritoneum Exudate Cells* (PEC) hewan coba dengan kepadatan 10^6 sel/ml diinkubasi pada 37°C dengan kadar CO_2 5% selama 2 jam dalam plate 24 wells. Setelah diganti medium, makrofag dikultur dalam inkubator pada suhu 37°C , dengan kadar CO_2 5% selama 24 jam. Kemudian pemeriksaan konsentrasi NO makrofag dilakukan dengan metode Griess dengan menggunakan 96 wells microplate ELISA dasar rata. 100 μl supernatan yang diperiksa dan standar NaNO_2 dipipet ke dalam plate.¹⁰ Kemudian dicampurkan dengan 100 μl reagen chromogenic. Ditunggu selama 5 menit pada suhu ruang untuk pembentukan chromophore dan stabilisasi. Absorbansi diukur pada 550nm menggunakan *automated mikroplate reader*. Dibuat kurva standar menggunakan analisis regresi linier sederhana / simple dari pembacaan NaNO_2 , kemudian dihitung konsentrasi nitrit dalam sample berdasar kurva standar atau rumus regresi. Konsentrasi NO dihitung dalam satuan mol/ml.

Data hasil penelitian diolah dan disajikan dalam bentuk tabel dan grafik. Data dari kelima kelompok perlakuan tersebut dianalisis normalitasnya dengan uji normalitas Shapiro-Wilk. Karena distribusi datanya normal maka dilakukan uji One Way ANOVA untuk melihat perbedaan pada kelima kelompok perlakuan. Besarnya perbedaan masing-masing kelompok dianalisis lebih lanjut dengan Post Hoc Test Bonferroni. Semua analisis data tersebut dilakukan dengan menggunakan program SPSS 15.0 for

windows. Nilai bermakna pada penelitian ini apabila variable yang dianalisis memiliki nilai $p < 0.05$.

HASIL PENELITIAN

Hasil pemeriksaan morfologi limfosit dan konsentrasi produksi NO makrofag yang dihasilkan kelima kelompok perlakuan disajikan dalam tabel analisis data seperti berikut:

Tabel 1. Hasil perhitungan proliferasi limfosit

Kelompok	N	Rerata	SB	Minimal	Maksimal
P1	6	7.50	0.55	7	8
P2	6	9.00	2.19	6	12
P3	6	8.50	1.38	7	11
K1	6	6.83	2.79	4	12
K2	6	4.26	1.37	3	7

Tabel 2. Konsentrasi NO makrofag

Kelompok	N	Rerata	SB	Minimal	Maksimal
P1	6	4.31	1.68	2.48	7.46
P2	6	4.69	1.69	2.10	6.81
P3	6	4.62	0.92	3.6	6.3
K1	6	5.96	1.76	3.79	8.99
K2	6	1.17	1.16	0.02	3.39

Proliferasi Limfosit

Jumlah proliferasi limfosit paling rendah pada kelompok mencit yang tidak diinfeksi *Salmonella typhimurium* dan tidak diberi ekstrak *Phyllanthus niruri* dan yang paling tinggi pada kelompok mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* dan diberi ekstrak *Phyllanthus niruri* L 3X250 µg perhari. Analisis statistik dengan menggunakan One Way ANOVA, ternyata terdapat perbedaan yang bermakna ($p=0.003$) pada jumlah proliferasi limfosit antara 5 kelompok percobaan. Karena varian – varian proliferasi

limfosit pada kelompok ini homogen maka dilakukan analisis lebih lanjut dengan Post Hoc Test Bonferroni untuk melihat perbedaan antara kelompok.

Tabel 3. Hasil uji bonferoni untuk masing-masing kelompok percobaan.

Post Hoc Test	Rerata	P1	P2	P3	K1	K2
P1	7.50	-	P=1.000	P=1.000	P=1.000	P=0.125
P2	9.00	P=1.000	-	P=1.000	P=0.502	P=0.004*
P3	8.50	P=1.000	P=1.000	-	P=1.000	P=0.012*
K1	6.83	P=1.000	P=0.502	P=1.000	-	P=0.502
K2	4.26	P=0.125	P=0.004*	P=0.012*	P=0.502	-

*Perbedaan rerata bermakna pada $p < 0.05$

Tidak didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok P1, P2, P3 dengan kelompok K1 dan kelompok K1 dibandingkan dengan kelompok K2 ($p > 0.005$ Kadar NO

Jumlah kadar NO paling rendah pada kelompok mencit yang tidak diinfeksi *Salmonella typhimurium* dan tidak diberi ekstrak *Phyllanthus niruri L* dan yang paling tinggi pada kelompok mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* tetapi tidak diberi ekstrak *Phyllanthus niruri L*. Analisis statistik dengan menggunakan One Way ANOVA, ternyata terdapat perbedaan yang bermakna ($p = 0.000$) pada jumlah kadar NO antara 5 kelompok percobaan. Karena varian – varian kadar NO makrofag pada kelompok ini homogen maka dilakukan analisis lebih lanjut dengan Post Hoc Test Bonferroni untuk melihat perbedaan antara kelompok.

Tabel 3. Hasil uji bonferoni untuk masing-masing kelompok percobaan.

Kadar NO

Post Hoc Test	Rerata	P1	P2	P3	K1	K2
P1	4.31	-	P=1.000	P=1.000	P=0.656	P=0.012*
P2	4.69	P=1.000	-	P=1.000	P=1.000	P=0.004*
P3	4.62	P=1.000	P=1.000	-	P=1.000	P=0.005*
K1	5.96	P=0.656	P=1.000	P=1.000	-	P=0.000*
K2	1.17	P=0.012*	P=0.004*	P=0.005*	P=0.000*	-

*Perbedaan rerata bermakna pada $p < 0.05$

Tidak didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok P1, P2, P3 dengan kelompok K1 ($p > 0.005$) tetapi didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok K1 dengan kelompok K2 ($p = 0.000$).

PEMBAHASAN

Gambaran Morfologi Limfosit

Faktor yang berperan dalam perubahan sel Th adalah limfokin yang mengaktifkannya. Jika berupa IL-2 dan $IFN\gamma$, yang berkembang adalah Th1 dan akan menekan Th2.¹¹ Diferensiasi sel Th juga dipengaruhi oleh jenis APC. Jika APC-nya makrofag (sumber IL-12), yang akan berkembang adalah Th1, tetapi jika APC-nya sel B, yang berkembang Th2.^{12,13} Limfosit mengalami resirkulasi dari darah ke limfe (melalui High Endotelial Venule poskapiler), dari limfe ke darah (duktus torasikus dan limfatikus) serta organ limfoid satu ke lainnya, sehingga saat terjadi infeksi akan banyak limfosit yang terpajan antigen yang menyebabkan limfosit teraktivasi.¹⁴

Pada penelitian ini didapatkan gambaran morfologi limfosit yang teraktivasi pada sediaan apus darah tepi, pada kelompok perlakuan lebih tinggi dibanding dengan kelompok kontrol dan terdapat perbedaan bermakna antara 5 kelompok percobaan dengan $p = 0,003$ ($p < 0,05$). Setelah dilanjutkan dengan uji Bonfferoni, tidak terdapat perbedaan bermakna pada kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol positif dan pada kelompok kontrol positif dengan kelompok kontrol negatif ($p > 0.05$) serta tidak terdapat perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan dan peningkatan dosis.

Menurut sifat patologik dinding sel, mikroorganisme dapat dibagi menjadi negatif Gram, positif Gram, Mikobakterium dan spirochaet. Protein dan polisakarida yang ada dalam dinding sel dapat merangsang sistem imun humoral tubuh untuk membentuk antibodi. Di luar membran plasma, bakteri memiliki dinding sel yang terdiri atas mukopeptide yang disebut peptidoglikan. Bakteri negatif Gram memiliki membran kedua yang mengandung protein dan lipopolisakarida/LPS atau endotoksin. LPS pada dinding sel *Salmonella typhimurium* menghambat aktivasi limfosit masuk pada fase G1 siklus sel.¹⁵

Produksi nitric oxide makrofag

Hasil penelitian produksi NO makrofag menunjukkan terdapat perbedaan bermakna pada semua kelompok perlakuan dan kontrol dengan $p = 0,000$, namun demikian setelah dilakukan uji hipotesis dengan Bonfferoni, tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok perlakuan dengan kontrol positif (dengan nilai p secara berurutan 0,656; 1,000; 1,000) dan terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol positif dengan kontrol negatif ($p=0.000$).

Phyllanthus diduga kuat mempunyai efek antiinflamasi. *Phyllanthus* menunjukkan kemampuan menghambat produksi NO, prostaglandin E-2 (PGE-2) dan *cyclooxygenase (COX-2)*.⁵ Dari hal tersebut, dapat disimpulkan bahwa *Phyllanthus niruri L* dapat meregulasi sistem imun agar terjadi keseimbangan dalam respons imun.

KESIMPULAN

Pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri* L dengan dosis bervariasi tidak menunjukkan perbedaan bermakna pada gambaran morfologi limfosit dan produksi Nitric Oxide (NO) makrofag antara kelompok perlakuan dan kelompok control ($p > 0.05$).

Peningkatan limfosit teraktivasi tidak sejalan dengan peningkatan dosis ekstrak *Phyllanthus niruri* L.

SARAN

Perlu dilakukan pemeriksaan parameter-parameter status imunologi yang lain untuk mengetahui efek dari ekstrak *Phyllanthus niruri* L (misalnya: jumlah leukosit dan IF- γ) serta perlu pemeriksaan terhadap pengaruh dari pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri* L dibandingkan dengan antibiotika (misalnya: klorampenikol), dengan harapan lebih mengetahui manfaat ekstrak *Phyllanthus niruri* L sebagai terapi pendamping untuk meningkatkan imunitas seluler.

UCAPAN TERIMA KASIH

Syukur kepada Tuhan YME sehingga terselesainya artikel ini. Terima kasih kepada dr. Imam Budiwiyono, SpPK(K) sebagai dosen pembimbing, dr. Noor Wijyahadi, MKes PhD dan dr. Neni Susilaningsih, MSi sebagai dosen penguji, dr. Ima Arum Lestarini, konsultan, LPPT UGM dan semua pihak yang terlibat dalam proses penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Pang T, Bhutta ZA, Finlay BB, Altwegg M. *Typhoid fever and other salmonellosis: a continuing challenge*. Trends Microbiol 1995; 3: 253-5.
2. Simanjuntak CH. *Demam typhoid, epidemiologi dan perkembangan penelitiannya*. Cermin Dunia Kedokteran 1993; 83: 52-4.
3. Anonim. *Phyllanthus*. Journal of Hepatology 2003; 38: 289-97.
4. Williams JE. *Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of peruvian rainforest with a particular emphasis on Una de Gato and Sangre de Grado*. Alternative Medicine Review 2001; 6:567-79.
5. Suharmi S dan Ustariana W. *Pengaruh senyawa antihepatotoksik dalam infusa herba (Phyllanthus niruri L.) terhadap efek toksik aflatoksin B1 (20 µg/ml) pada hepatosit tikus (Rattus norvegicus) terisolasi*. Berkala Ilmu Kedokteran 2000; 32:91-5.
6. Naik AD and Juvekar AR. *Effects of alkaloidal extract of Phyllanthus niruri on HIV replication*. Indian J Med Sci 2003; 57: 387-93.
7. Ogata T, Kato A, Endo T, Kaji A, Higuchi H, et al. *HIV-1 reverse transcriptase inhibitor from Phyllanthus niruri*. AIDS Res Hum Retrovirus 1992; 8(11): 1937-44.
8. Baratawidjaja KG. *Imunology dasar*. Ed-6. Jakarta: FK UI, 2004. p. 309-11
9. Brown, Barbara A. *Hematology : Principles and Procedures*. Ed-4. Philadelphia. Lea & Febiger, 1984. p. 107
10. Titheeradge, Micahel A. *The Enzymatic Measurement of Nitrate and Nitrite*. New Jersey. Humana Press Inc. 1998. p. 83-91
11. Male D. *Immunology*. 2nd Ed. London: Gower Medical Publication, 1993. p. 49-54
12. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*. London-New York: Gower Medical Publication, 1998. p. 180-87
13. Kresno SB. *Immunologi : Diagnosis dan prosedur laboratorium*. Edisi Keempat. Jakarta: Balai Penerbit FK.UI, 2001. p. 30
14. Abbas AK, litchman AH, Pober JS. *Celluler and Molecular immunology*. Fourth edition. Philadelphia: WB Saunders Co, 2002. p. 153-60
15. Sultzer BM, JR Bandekar, R Castagna, K Abu-Lawi, M Sadeghian, AJ Norin. *Suppression of C3H/HeJ cell activation by lipopolysaccharide endotoxin*. PubMed Central 1992 ; 60(9): 3533–3538.