

**TESTING EFFECT OF IMMUNOMODULATOR ETHANOL EXTRACT OF
MENGKUDU LEAVES (MORINDA CITRIFOLIA) ON MACROFAG CELL
ACTIVITIES IN MENCIT BALB / C INFECTED PLASMODIUM BERGHEI**

Jon Farizal¹⁾, Leni Marlina¹⁾, Susiwati¹⁾ dan Zamharira Muslim¹⁾

¹Jurusan Analis Kesehatan, Poltekkes Kemenkes Bengkulu, Jl. Indragiri Pd. Harapan No.3,
Bengkulu, 38225

E-mail: jonfarizal77@gmail.com

Submitted: 4th July 2020; Accepted: 16th September 2020

<https://doi.org/10.36525/sanitas.2020.23>

ABSTRACT

Background malaria fever is a disease that is still a problem in developing countries. Plasmodium berghei is a facultative intracellular parasite, so the immune system that plays a role is the cellular system. Morinda citrifolia is a traditional medicinal plant that contains many active compounds that can reduce the number of malaria parasitemia. Proving the immunomodulatory effect of ethanol extract of morinda citrifolia on phagocytosis activity of Balb / c mice infected with Plasmodium berghei. The data were obtained from calculating the number of phagocytosis activity of macrophage cells in each field of view. A different test for macrophage phagocytosis using One Way ANOVA followed by Post Hoc Test. Method this type of research is experimental with the design of the post-test only control group design in experimental animals balb / c mice consisting of 24 male mice, divided into 4 groups. (K) is the control group given Aquabidest, and the treatment group (P1, P2, P3) which was given extract morinda citrifolia with stratified doses (0.64 mg / kgBb / day, 1.28 mg / kgBb / day, 2.56 mg / kgBb / day). The treatment process was given for 13 days and on the 6th day was infected with Plasmodium berghei as much as 0.1 ml x 10⁶ intraperitoneally. On the 14th day, peritoneal fluid isolation was carried out followed by an examination of macrophage cell phagocytosis activity. Result ethanol extract Morinda citrifolia can increase macrophage phagocytosis, between control and treatment P1, P2, and P3 have significant differences, but between treatments, there is no significant difference. Conclusion. Ethanol extract of Morinda citrifolia in various doses can increase the phagocytosis of macrophages in Balb / c mice infected with Plasmodium berghei..

Keywords: *Phagocytosis of macrophages, Morinda citrifolia, Plasmodium berghei*

This is an open access journal, and articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial-Share Alike 4.0 License, which allows others to remix, tweak, and build upon the work non-commercially, as long as appropriate credit is given and the new creations are licensed under the identical terms. ©2020 Sanitas

**UJI EFEK IMUNOMODULATOR EKSTRAK ETANOL DAUN MENGGUDU
(*MORINDA CITRIFOLIA*) TERHADAP AKTIVITAS SEL MAKROFAG PADA
MENCIT BALB/C YANG DIINFEKSI *PLASMODIUM BERGHEI***

ABSTRAK

Latar Belakang Demam malaria merupakan penyakit yang masih menjadi masalah di negara berkembang. *Plasmodium berghei* adalah Parasit intraseluler fakultatif, maka sistem imunitas yang berperan yaitu sistem seluler. *Morinda citrifolia* merupakan tanaman obat tradisional yang mengandung banyak senyawa aktif yang dapat menurunkan jumlah Parasitemia malaria. Membuktikan efek imunomodulator ekstrak etanol *morinda citrifolia* terhadap Aktivitas fagositosis sel makrofag mencit Balb/c yang diinfeksi *Plasmodium berghei*. Data diperoleh dari penghitungan jumlah aktivitas fagositosis sel makrofag setiap lapang pandang. Uji beda untuk fagositosis makrofag menggunakan *One Way ANOVA* yang diteruskan dengan *Post Hoc Test*. Metode jenis penelitian ini adalah eksperimental dengan rancangan *the post test only control group design* pada hewan coba mencit balb/c yang terdiri dari 24 ekor mencit jantan, dibagi menjadi 4 kelompok. (K) merupakan kelompok kontrol di beri Aquabidest, dan kelompok perlakuan (P1,P2,P3) yang diberi ekstrak *morinda citrifolia* dengan dosis bertingkat (0,64 mg/kgBb/hari, 1,28 mg/kgBb/hari, 2,56 mg/kgBb/hari). Proses perlakuan diberikan selama 13 hari dan pada hari ke-6 diinfeksi dengan *Plasmodium berghei* sebanyak 0,1 ml x 10⁶ secara intraperitoneal. Hari ke-14 dilakukan isolasi cairan peritoneum dilanjutkan pemeriksaan Aktivitas fagositosis sel makrofag. Hasil ekstrak etanol *Morinda citrifolia* dapat meningkatkan fagositosis makrofag, antara kontrol dengan perlakuan P1,P2 dan P3 mempunyai perbedaan yang signifikan, akan tetapi antar perlakuan tidak ada perbedaan yang signifikan. Kesimpulan. Ekstrak etanol *Morinda citrifolia* berbagai dosis dapat meningkatkan fagositosis makrofag pada mencit Balb/c yang diinfeksi *Plasmodium berghei*.

Kata Kunci: *Fagositosis Makrofag, Morinda citrifolia, Plasmodium berghei*

PENDAHULUAN

Data *World Health Organization* pada tahun 2015 terjadi 214 juta kasus malaria dan 438.000 kematian. Sebanyak 88% kasus dan 90% kematian terjadi di Afrika, mengambil kehidupan seorang anak di bawah usia 5 tahun setiap 2 menit¹. Indonesia memiliki resiko tinggi penyakit malaria dari tahun 2005-2015 sebanyak 82% kasus yang berasal dari Papua, Papua Barat, Maluku dan Maluku Utara². Kasus malaria di Provinsi Bengkulu pada tahun 2015 berdasarkan pada pemeriksaan laboratorium sebanyak 33.814 tanpa sediaan darah dan 28.333 pemeriksaan dengan sediaan darah, didapatkan 2.631 dinyatakan positif malaria, sebanyak 1.874.944 penduduk di

Provinsi Bengkulu beresiko terhadap penyakit malaria dengan jenis kelamin perempuan dan laki-laki³. *Anopheles* ditemukan diseluruh dunia kecuali di antartika, dan dari 430 spesies hanya 30-40 spesies yang mengirimkan malaria di alam⁴. Infeksi malaria pada manusia dan hewan disebabkan oleh parasit *Plasmodium* yang ditularkan oleh nyamuk *Anopheles* (mentransmisikan malaria juga pada manusia) dan menginfeksi hati setelah disuntikkan ke

dalam aliran darah dengan gigitan nyamuk betina yang terinfeksi. Plasmodium memiliki kemampuan untuk menyebabkan malaria pada hewan, termasuk tikus (tikus). Infeksi Plasmodium berghei juga mempengaruhi otak dan bisa menyebabkan komplikasi serebral pada tikus laboratorium (5). Banyak pendekatan telah dikembangkan untuk mengendalikan ancaman nyamuk. salah satu seperti pendekatan untuk mencegah nyamuk ditanggung penyakit adalah dengan membunuh nyamuk pada tahap larva. Larvasida adalah cara sukses mengurangi populasi nyamuk di tempat-tempat mereka berkembang biak sebelum mereka muncul menjadi dewasa. Pencegahan perkembangbiakan nyamuk melalui penggunaan larvasida adalah cara yang paling efektif untuk melawan dengan *importation* nyamuk ini⁶.

Morinda citrifolia (Noni) adalah satu di antara banyak obat herbal yang digunakan secara luas selama 2000 tahun terakhir⁷. Daun mengkudu merupakan tanaman yang banyak terdapat di Indonesia yang memiliki khasiat mampu menyembuhkan penyakit, dengan senyawa kimia yang terdapat pada daun mengkudu yaitu *Pyro-phorbide a*, *Pheophorbide a*, *Purpin 7*, dan *Pheophorbide phyrolesper*⁸. Mekanisme *Morinda citrifolia* sebagai imunomodulator dikarenakan kandungan yang terdapat didalamnya antara lain adalah alkaloid, flavonoid, tanin, dan lain-lain. Akan tetapi, yang berperan dalam peningkatan sistem imun adalah *Pyro-phorbide a* dan *Pheophorbide Phyrolesper*.

Mekanisme *Pyro-phorbide a* dan *Pheophorbide Phyrolesper* sebagai imunomodulator pada *Morinda citrifolia* kurang lebih sama seperti mekanisme pada tanaman yang mengandung senyawa ini, yaitu dengan meningkatkan aktivitas IL-2 dan proliferasi limfosit. Sel CD4⁺ akan mempengaruhi proliferasi limfosit kemudian menyebabkan sel Th1 teraktivasi. Sel Th1 yang teraktivasi akan mempengaruhi SMAF, yaitu molekul-molekul termasuk IFN γ yang dapat mengaktifkan makrofag. Aktivasi makrofag dapat dilihat salah satunya dengan meningkatnya proses fagositosis makrofag dan meningkatnya produksi nitrit oksida⁹.

Dosis daun mengkudu yang digunakan pada penelitian ini di bagi menjadi tiga dosis bertingkat yaitu 0,64 mg/kgBB/hari peroral, 1,28 mg/kgBB/hari peroral dan 2,56 mg/kgBB/hari peroral mencit. Pemilihan dosis bertingkat ini didasarkan pada dosis

penggunaan daun mengkudu di Masyarakat yang digunakan untuk pengobatan malaria. Dosis yang digunakan di Masyarakat untuk mengoabati malaria adalah 10-100 gram, kemudian dihitung dan dikonversikan kepada mencit sehingga diperoleh dosis diatas ¹⁰

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan desain The Post Test-Only Control Group yang menggunakan hewan coba mencit Balb/c sebagai objek penelitian. Perlakuan adalah pemberian ekstrak etanol *Morinda citrifolia* dengan keluaran adalah Aktivitas fagositosis sel makrofag pada cairan peritoneum mencit Balb/c diinfeksi *Plasmodium berghei*

Populasi dan Sampel penelitian ini meliputi mencit jantan strain Balb/c yang diperoleh dari Laboratorium Farmasi Unand Padang. Populasi adalah mencit Balb/c berusia 8-10 minggu beratnya 20-30 mg. Sampel penelitian diperoleh dari populasi dengan cara pengambilan sampel secara simple random sampling, kriteria inklusi dan eksklusi untuk menghindari bias dalam pelakuan diambil sebagai berikut. Kriteria Inklusi : Faktor keturunan mencit diambil dari populasi mencit yang secara genetik adalah homogen Strain Balb/c, tidak ada kelainan anatomis, sehat dan aktif selama adaptasi, dan penempatan kandang ditempatkan pada tempat yang sama di Laboratorium Imunologi Fakultas Farmasi Universitas Andalas Padang.

Bahan dan Reagen Daun *Morinda citrifolia* yang diperoleh dari Rejang Lebong, Bengkulu. *Morinda citrifolia* yang digunakan adalah daun yang masih segar, *Plasmodium berghei* diambil dari Laboratorium Mitokondria dan Penyakit Infeksi Institut Riset Eijkman Jakarta, Peritoneal Exudate Cell (PEC) mencit jantan strain Balb/c berumur 8-10 minggu, sehat, aktivitas dan tingkah laku normal, diperoleh dari Laboratorium Imunologi Fakultas Farmasi Universitas Andalas, dan Larutan Roswell Park Memorial Institute (RPMI) komplet, Bovine Serum (FBS) 10 %, alkohol 70%, asam asetat 3 %, Latex beads, methanol absolute, Giemsa 20%, Phosphate Buffered Saline (PBS). Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: mikroskop, spuit disposable 1 ml, 10 ml, timbangan elektrik, objek glass, tabung reaksi, kandang hewan coba, yellow dan blue tip, incubator CO2 5%, alat-alat bedah steril,

laminar air flow, Elisa reader, pipet Pasteur, pipet Eppendorf, bilik hitung Neubeauer improve, sentrifugasi sigma 310 AK yang dilengkapi pengatur suhu, microplate 24 well dasar rata, thermanox plastic coverslip diameter 13 mm, falcon blue max 15 ml poplpropylene conical tube.

Pengambilan Sampel daun mengkudu (*Morinda citrifolia*) yang telah dibersihkan dengan cara pencucian dengan air mengalir, kemudian dikeringkan dan diserbuk hingga siap untuk di ekstraksi dengan metode maserasi. Pengolahan sampel diambil serbuk daun mengkudu sebanyak 400 gram, kemudian di maserasi dengan pelarut etanol 96% selama 2 x24 jam. Simplisia yang telah dimaserasi dengan larutan etanol disaring hingga di peroleh filtrate. Filtrat pelarut tersebut diuapkan dengan menggunakan alat rotary evaporator sehingga dihasilkan ekstrak kering daun mengkudu.

Kelompok perlakuan hewan uji hewan coba dikelompokkan menjadi 4 kelompok dan masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor mencit jantan. Kelompok I sebagai kontrol mencit hanya di beri aquades. Kelompok II di berikan ekstrak daun mengkudu dengan dosis 0,64 mg/kgbb. Kelompok III diberikan dengan dosis 1,28 mg/kgbb dan Kelompok IV diberikan dengan dosis 2,56 mg/kgbb. Pada hari ke-1 sampai ke 13 mencit diberi zat uji dan kontrol secara peroral dan hari ke-6 mencit diinfeksi *Plasmodium berghei*.

Uji Fagositosis Makrofag pada hari ke-14 diambil cairan eksudat peritoneal Mencit dibunuh dengan cara dislokasi servikal. Mencit diletakkan dalam posisi telentang, kulit bagian perut dibuka dan dibersihkan dari selubung peritoneum dengan alkohol 70% dan disuntikkan \pm 10 ml RPMI dingin ke rongga peritoneum. Kemudian didiamkan selama \pm 3 menit sambil digoyang-goyang secara perlahan (agar makrofag yang menempel di rongga peritoneum dan di sekitar usus dapat terlepas dan tersuspensi dalam medium RPMI). Cairan peritoneal dikeluarkan dari rongga peritoneum dengan dilakukan penekanan organ dalam dengan 2 jari, kemudian cairan diaspirasi dengan tabung injeksi . Aspirat dipusingkan pada 1.200 rpm, 400C selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang dan kemudian ditambahkan 3 ml medium RPMI komplet (mengandung FBS 10%). Jumlah sel dihitung dengan hemositometer, kemudian di resuspensi-kan dengan medium komplet sehingga didapat suspensi sel dengan kepadatan $2,5 \times 10^6$ /ml. Suspensi sel yang telah dihitung

ditumbuhkan dalam plate 24 sumuran yang telah diberi coverslips bulat, setiap sumuran berisi 200 μ l (5x10⁵sel).

Sel diinkubasikan dalam inkubator CO₂ 5%, 370C selama 30 menit, kemudian ditambahkan medium komplit 1 ml/sumuran dan inkubasi dilanjutkan selama 2 jam. Sel dicuci dengan RPMI 2x kemudian ditambahkan medium komplit 1 ml/sumuran dan inkubasi dilanjutkan sampai 24 jam. Pemeriksaan Fagositosis Makrofag dengan Latex Beads, Suspensi makrofag yang telah dikultur pada microplate 24 wells yang telah diberi coverslips, setiap sumuran 200 μ l (5x10⁵), diinkubasi dalam CO₂ 5% 370C selama 30 menit. Tambahkan medium komplit 1 ml setiap sumuran, inkubasikan selama 24 jam. Makrofag yang telah dikultur sehari sebelumnya dicuci dengan RPMI 2 kali. Latex beads diresuspensikan sehingga didapatkan konsentrasi 10 kali lipat. Cuci 3 kali dengan PBS untuk menghilangkan partikel yang tidak difagosit. Keringkan pada suhu ruangan, fiksasi dengan methanol absolut. Setelah kering, coverslips dipulas dengan Giemsa 20% selama 30 menit. Cuci dengan aquadest, angkat dari sumuran kultur dan keringkan pada suhu kamar. Setelah kering di-mounting pada kaca objek. Kemampuan fagosit dihitung dari persentase sel yang memfagosit partikel latex yang kemudian dihitung pada 200 sel dikali jumlah rata-rata partikel pada sel yang positif dan dinyatakan dalam indeks fagositosis. Data hasil penelitian diolah secara statistik menggunakan Analisisn varian (ANOVA) dilanjutkan dengan uji Tukey HSD.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 1. Hasil Analisis rerata Aktivitas Fagositosis Makrofag masing-masing Kelompok perlakuan

Group	n	Mean \pm SD	P
K	5	0.1423 \pm 0.08742	
P1	6	0.6876 \pm 0.19663	0.0001
P2	6	0.9528 \pm 0.49311	
P3	3	1.2510 \pm 0.66561	

Tabel 1 diketahui rerata fagositosis makrofag pada keempat kelompok menunjukkan kadar fagositosis makrofag yang meningkat seiring dengan peningkatan dosis.

Tabel 2. Uji Post Hoc Test Perbedaan Indeks Fagositosis Makrofag masing-masing Kelompok perlakuan

Group	K	P1	P2	P3
K		0,006*	0,001*	0,001*
P1	0,006*		0,678	0,244
P2	0,001*	0,678		0,731
P3	0,001*	0,244	0,731	

Tabel 2 diketahui indeks fagositosis makrofag tampak antara kelompok kontrol (K) dengan masing-masing kelompok perlakuan P1,P2,P3 terdapat perbedaan yang signifikan dengan nilai $P < 0,05$, sedangkan antara masing-masing kelompok perlakuan tidak terdapat perbedaan yang signifikan.

Mencit yang digunakan dalam penelitian diperoleh dari Laboratorium Imunologi Fakultas Farmasi Universitas Andalas Padang. Banyaknya mencit yang digunakan adalah 24 ekor, di mana tiap kelompok dibagi menjadi 6 ekor. Mencit kemudian diadaptasikan selama tujuh hari di Laboratorium Imunologi Fakultas Farmasi Universitas Andalas Padang. Mencit selama diadaptasi diberi pakan standar dan minum. Mencit yang telah diadaptasi selama tujuh hari kemudian diberi perlakuan yang terlebih dahulu ditimbang berat badannya. Pemberian ekstrak etanol *Morinda Citrifolia* dengan dosis P1: 0,64 mg/hari, P2: 1,28 mg/hari, P3: 2,56 mg/hari diberikan selama 13 hari sebanyak dosis ekstrak dibagi dosis lazim kali berat badan sama dengan ml/hari, begitupula dengan kelompok kontrol diberi aquadest ml/hari, di mana pada hari ke 6 mencit diinfeksi *Plasmodium Berghei*. Pengamatan fisik terhadap mencit dilakukan pada hari pertama sampai hari ke 6 sebelum diinfeksi *Plasmodium Berghei* yang akan dibandingkan dengan kondisi mencit pasca diinfeksi *Plasmodium Berghei*.

Mencit pada kelompok kontrol pada penelitian hari ke 5 mati sebelum diinfeksi *Plasmodium Berghei*, ada beberapa kemungkinan mencit tersebut mati dalam penelitian.

Pertama bisa disebabkan oleh stress yang dapat menurunkan sistem imun, dimana stress ini mempengaruhi sistem imun tubuh melalui stimulasi sekresi kortisol dan adrenalin serta berpengaruh terhadap pelepasan noradrenalin dan postganglion simpatik terminal saraf di pembuluh darah dan organ limfoid. Efek sistemik dari glukokortikoid dan katekolamin ini mempengaruhi sitokin sehingga terjadi penurunan produksi sitokin yang dibutuhkan dalam menanggapi infeksi bakterial melalui respon imun seluler.

Mencit pada kelompok P3 mati selama masa penelitian pada hari ke 6 pascainfeksi. Jumlah kematian 3 ekor. Kematian mencit pada perlakuan P3 ini seharusnya dilakukan penelitian terhadap organ-organnya, misalnya hepar dan ginjal untuk menentukan mekanisme kematian yang tepat. Akan tetapi, dugaan penyebab kematian saat ini diduga kandungan resin yang terkandung dalam ekstrak etanol *Morinda Citrifolia*. Kandungan resin ini, apabila dikonsumsi terus menerus dalam dosis yang tinggi maka akan terjadi terakumulasi zat toksin resin dalam tubuh yang akan menyebabkan efek samping pada sistem saraf yang bisa menyebabkan kematian.

Hasil penelitian ini adalah antara kelompok kontrol dengan perlakuan P1, perlakuan P2 dan perlakuan P3 didapatkan perbedaan yang signifikan. Selain itu pada kelompok K, P1, P2 dan P3 menunjukkan peningkatan aktivitas fagositosis makrofag sesuai dengan peningkatan dosis yaitu $K < P1 < P2 < P3$.

Infeksi *Plasmodium Berghei* ini mengaktifkan sistem imun seluler. Makrofag sebagai fagosit profesional, melakukan fungsi sebagai efektor, setelah sel diaktivasi oleh mikroba, sitokin dan stimulus lainnya. Pemberian ekstrak etanol *Morinda Citrifolia* mampu mengaktivasi makrofag¹³. Peran makrofag yang teraktivasi dalam respon imun seluler ada 3 (1) memfagosit dan membunuh mikroba intrasel melalui produksi molekul mikrobisidal (2) menstimulasi inflamasi akut lokal (3) membersihkan jaringan mati akibat proses infeksi bakteri dan reparasi jaringan¹¹.

Pheophorbide Phypolesper dalam suatu tanaman dapat memodulasi berbagai sistem imun, Pheophorbide Phypolesper juga bersifat lipofilik yang dapat merusak membran mikroba. Pheophorbide Phypolesper ini bisa meningkatkan aktivitas IL-2 dan proliferasi

limfosit. Sel CD4⁺, akan mempengaruhi proliferasi limfosit kemudian menyebabkan sel Th1 teraktivasi. Sel Th1 yang teraktivasi akan mempengaruhi SMAF, yaitu molekul-molekul termasuk IFN γ yang dapat mengaktifkan makrofag, sehingga makrofag mengalami peningkatan metabolik, motilitas dan aktivitas fagositosis secara cepat dan lebih efisien dalam membunuh, bakteri atau mikroorganisme patogen^{12,14}.

SIMPULAN

Rerata fagositosis makrofag pada keempat kelompok menunjukkan aktivitas fagositosis makrofag yang meningkat seiring dengan peningkatan dosis. Pemberian ekstrak etanol *Morinda Citrifolia* berbagai dosis yang paling kuat efeknya 2,56 mg/kgBB/hari/mencit dapat meningkatkan fagositosis makrofag pada mencit Balb/c yang diinfeksi *Plasmodium Berghei* dibandingkan dengan yang tidak diberi ekstrak etanol *Morinda Citrifolia*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Darwis,S.Kp.,M.Kes selaku Direktur Poltekkes Kemenkes Bengkulu, Syafriman, M.Si selaku Kepala Laboratorium Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Andalas Padang dan Kapusdiknakes Kemenkes yang telah memberikan Dana Penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. World Malaria Report 2015. Avenue Appia; 2015.
2. Kemenkes RI. profil Kesehatan Indonesia. Vol. 70, Kesehatan. 2016. 1780-1790 p.Available from: <http://www.depkes.go.id>
3. R. F. The incidence of environment related illnesses in North Bengkulu, Indonesia. J Environ Health [Internet]. 1994;57(1):16–8. Available from: <http://ovidsp.ovid.com>
4. Prevention C for DC and. Anopheles Mosquitoes. 2015;24(7):1–14.
5. Innocent O, Oke O, Anthony O. Plasmodium berghei Malarial Infection Reduces Blood And Brain Glucose Levels In Experimental Mice . 2013;1(1):1–7.
6. Soe UTM, Mya D, Chaw N, Naw D, Myint H. Larvicidal efficacy of *Morinda citrifolia* L. leaf extract against three important mosquitoes. 2015;(5).
7. Rethinam P, Pratap UP. Pharmacological properties and clinical applications of *Morinda citrifolia* L . 2015;10:1–18.
8. Weekly LS. Patents ; Patent Application Titled " Method and Composition for Administering Bioactive Compounds Derived from *Morinda Citrifolia* ". 2013;1–3.

9. Puti I, Sabirin R, Maskoen AM, Hernowo BS. Peran Ekstrak Etanol Topikal Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia* L .) pada Penyembuhan Luka Ditinjau dari Imunoekspresi CD34 dan Kolagen pada Tikus Galur Wistar Role of Noni (*Morinda citrifolia* L .) Leaf Ethanolic Extract Topical Application on Wound Heal. 2011;45(4):226–33.
10. Harmita, Radji M. Buku Ajar Analisis Hayati. 3rd ed. Manurung J, editor. Jakarta: Buku Kedokteran EGC; 2010. 63-68 p.
11. Zhang L TI. Activation of a mouse macrophage cell line by acemannan: the major carbohydrate fraction from Aloe vera gel. *Immunopharmacol.*1996;35(2):119–28.
12. Ramamoorthy L, Tizard IANR. Induction of Apoptosis in a Macrophage Cell Line RAW 264 . 7 By Acemannan , (1 , 4) -Acetylated Mannan. 1998;421:415–21.
13. Yildiz K, Ince AT, Gangarapu V, Bugdaci MS, Baysal B, Kayar Y, et al. Evaluation of concentrations of pro/anti-inflammatory cytokines after complication-free ECRP in cholangiocarcinoma. *Turkish J Gastroenterol.* 2015; 251):133–7. Available from: <http://www.turkjgastroenterol.org>
14. Kaur K, Chang HH, Topchyan P, Cook JM, Barkhordarian A, Eibl G, et al. Deficiencies in natural killer cell numbers, expansion, and function at the pre-neoplastic stage of pancreatic cancer by KRAS mutation in the pancreas of obese mice. *Front Immunol.* 2018;9 (Jun):1–12.