

Uji Efek Imunomodulator Ekstrak Biji Karika (*Carica pubescens* Lenne K. Koch) terhadap Peningkatan Aktivitas Fagositosis pada Mencit Putih Swiss Webster

Fania Putri Luhurningtyas*, Niken Dyahariesti, Septi Fitri Eka M

Program Studi Farmasi, Universitas Ngudi Waluyo, Ungaran, Indonesia, 50512

*Corresponding author: faniaputriluhurningtyas@gmail.com

Diterima: 29 Januari; Disetujui: 15 Mei 2020

Abstract: Caricaceae family plants have been known to have acted as anthelmintic, anti-hypercholesterolemic, antibacterial, antioxidant, and other pharmacological activities related to the immune system. The karika plant is one of the Caricaceae families that has not been widely studied. The flavonoid content in karika is known to be higher than papaya. The objective of this study is to evaluate the immunomodulatory activity of karika seed extract based on its phagocytosis constant used the carbon cleaning method. Karika seeds were extracted by maceration method with 96% ethanol solvent. The study was conducted by dividing 5 treatment groups in the test animals, namely the positive group *Phyllanthus niruri*, the negative group, and the karika seed extract (EBK) treatment group with doses of 125, 250, and 500 mg / kg BW. The results showed that there was an effect of EBK dosage variations on the elimination rate of carbon ink. Karika seeds at a dose of 500 mg / kg BW had activity comparable to that of *Phyllanthus niruri*'s positive control ($p > 0.05$) as an immunostimulant.

Keywords: seeds, *Carica pubescens* Lenne et Koch, phagocytosis constant

Abstrak: Tumbuhan dari keluarga Caricaceae telah diketahui mempunyai aktivitas sebagai antelmintik, antihiperkolesterol, antibakteri, antioksidan, dan aktivitas farmakologis lain yang berhubungan dengan sistem imun. Tumbuhan karika merupakan salah satu keluarga Caricaceae belum banyak diteliti. Kandungan flavonoidnya diketahui lebih tinggi dibandingkan buah pepaya. Penelitian ini bertujuan untuk menskrining aktivitas imunomodulator ekstrak biji karika berdasarkan konstanta fagositosisnya menggunakan metode bersihan karbon. Maserasi dengan pelarut etanol 96% digunakan untuk menarik metabolit sekunder biji karika. Penelitian dilakukan dengan membagi 5 kelompok perlakuan pada hewan uji yaitu kelompok positif *Phyllanthus niruri*, kelompok negatif, serta kelompok perlakuan ekstrak biji karika (EBK) dosis 125, 250, dan 500 mg/kgBB. Hasil penelitian menunjukkan terdapat pengaruh pemberian variasi dosis EBK terhadap kecepatan eliminasi tinta karbon. Biji karika dosis 500 mg/kgBB mempunyai aktivitas sebanding dengan kontrol positif *Phyllanthus niruri* ($p > 0,05$) sebagai imunostimulan.

Kata kunci: biji, *Carica pubescens* Lenne et Koch, konstanta fagositosis.

1. PENDAHULUAN

Sistem imunitas mempunyai peran penting dalam menjaga daya tahan tubuh, terutama sebagai sistem pertahanan dari penyakit infeksi. Infeksi dapat disebabkan karena bakteri, virus, cacing, jamur parasit, protozoa (Menghini *et al.*, 2016). Salah satu mekanisme non spesifik pertahanan diri karena adanya senyawa asing (mikroorganisme) misalnya bakteri yang masuk ke dalam tubuh akan hancur

karena proses fagositosis. Makrofag adalah sel fagosit *mononuclear* yang berperan sebagai pertahanan seluler non spesifik (El-katcha *et al.*, 2016).

Fungsi imunitas tubuh akan menurun sesuai umur. Peningkatan usia mempengaruhi kecepatan respon melawan infeksi, seperti penyakit infeksi, penyakit kronik, autoimun, dan kanker (Akhtar *et al.*, 2018). Kemampuan memproduksi limfosit untuk mematikan

senyawa asing atau membantu sel lain dalam proses imunitas semakin berkurang. Limfosit (sel darah putih) merupakan sel T yang berperan sebagai penghasil antibodi disaat ada antigen masuk ke dalam tubuh (Torres-Rodriguez *et al.*, 2016).

Penggunaan obat immunosupresan dan immunostimulan jangka panjang dapat menyebabkan efek samping pada sistem imun. Penggunaan obat glukokortikoid, seperti kortikosteroid dapat menyebabkan penumpukan kadar gula, osteoporosis, atropi otot. Penggunaan obat antihistamin generasi pertama menyebabkan efek sedatif. Pengembangan obat herbal terus menerus dilakukan karena terjadi peningkatan penggunaannya sebagai terapi komplementer. Keuntungan lainnya adalah obat herbal mempunyai berbagai macam zat aktif, yang diduga mempunyai peran sinergis untuk menghasilkan efek terapi (Kumari & Kotecha, 2016).

Herba yang dapat dimanfaatkan sebagai peningkat aktivitas sistem imun adalah karika. Tumbuhan karika (*Carica pubescens* L) adalah flora khas di Dataran Tinggi Dieng. Karika termasuk keluarga Caricaceae, sehingga mirip seperti pepaya. Buahnya berukuran lebih kecil dibandingkan pepaya, dan jarang dikonsumsi secara mentah. Karika mengandung getah, yang menyebabkan gatal bagi yang mengkonsumsinya. Di daerah Dieng, karika lebih dikenal sebagai olahan manisan. Bijinya yang menggerombol dan padat kurang mempunyai nilai guna bagi masyarakat setempat (Laily *et al.*, 2012, Minarno *et al.*, 2015). Kandungan flavonoid karika diketahui lebih tinggi dibandingkan pepaya, hal ini sebanding dengan aktivitas antioksidannya (Mu'awwanah & Ulfah. 2017). Biji pepaya telah

diteliti mempunyai aktivitas sebagai anti bakteri dan larvasida (Supono *et al.*, 2015, Novalina *et al.*, 2013). Efek imunomodulator ekstrak biji pepaya dapat memberikan pengaruh terhadap mediator inflamasi (Pandey *et al.*, 2016). Tidak seperti buah pepaya yang telah banyak dikaji aktivitas farmakologisnya, penelitian terhadap karika masih terbatas. Berdasarkan uraian tersebut, peneliti tertarik untuk mengkaji aktivitas imunomodulator biji karika berdasarkan nilai konstanta fagosistosisnya, menggunakan metode *clearance carbon*.

2. BAHAN DAN METODE PENELITIAN

2.1. Bahan

Biji karika yang diperoleh di daerah Wonosobo di Toko Gemilang, 25 ekor mencit jantan galur Swiss Webster diperoleh di Salatiga, fitofarmaka immunostimulan *Phyllanthus niruri* L (Apotek Ngudiwaluyo), CMC Na 0,1%, tinta cina Pelikan 4001, NaCl, asam asetat, NaEDTA (Indrasari), etanol 96%, n-heksan : etil asetat, dragondroff, H₂SO₄, amoniak (Brataco).

2.2. Alat

Seperangkat alat maserasi, oven, timbangan hewan, timbangan analitik, beker glass (Pyrex 50ml), gelas ukur (Pyrex 10ml), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu), pipa kapiler, pipet tetes, erlemeyer (Pyrex), tabung sentrifuge, kandang mencit, tempat makanan dan minuman mencit, jarum sonde oral, spuit intravena (Onemed).

2.3. Ekstraksi dan pengujian metabolit sekunder

a. Pembuatan Ekstrak

Ekstrak biji karika dibuat dengan metode maserasi. Langkah pertama yaitu 250g serbuk simplisia dalam 1750 ml etanol 96% selama 3 hari dan remaserasi dengan 750 ml pelarut selama 2 hari. Maserat dikumpulkan dan dipetakan menggunakan *rotary evaporator*, kemudian dikentalkan menggunakan *waterbath*.

b. Pengujian Metabolit Sekunder

Fase gerak yang digunakan untuk identifikasi senyawa flavonoid adalah butanol : asam asetat glasial : air (4:1:5), dan fase gerak untuk identifikasi senyawa alkaloid adalah etil asetat : n-heksan (9:1) yang telah dijenuhkan. Fase diam yang digunakan adalah silika gel GF 254. Baku yang digunakan untuk flavonoid adalah quercetin dan alkaloid dengan piperin. Pengamatan noda menggunakan lampu UV 254 dan 366 nm.

2.4. Uji imunomodulator dan analisa statistik

a. Hewan uji

Hewan uji yang digunakan mencit putih jantan galur *Swiss-Webster*, umur 2-3 bulan, bobot 20-30 gram. Hewan uji dibagi menjadi 5 kelompok yaitu 1. Kelompok negatif, 2. Kelompok positif, 3. Kelompok perlakuan I, 4. Kelompok perlakuan II, 5. Kelompok perlakuan III.

b. Uji bersihan karbon

Metode uji aktivitas imunomodulator telah lolos pengujian Komisi Bioetika Penelitian Kedokteran

UNISSULA Semarang, dengan nomor sertifikat: No. 380/VII/2019 / Komisi Bioetik. Hewan uji yang telah dialimatisasi selama 1 minggu, dibagi menjadi 5 kelompok.

Berdasarkan rumus Federer, tiap kelompok terdiri dari 6 ekor yang dipilih secara acak. Pengelompokan hewan uji sebagai berikut :

- 1) Kelompok 1 (Kontrol Negatif) : hewan uji diberikan sediaan suspensi CMC Na 0,1% pada hari 1-6
- 2) Kelompok 2 (Kontrol Positif) : Hewan uji diberikan fitofarmaka imunostimulan *Phyllanthus niruri* L 9,1 mg/20 gram mencit pada hari 1-6
- 3) Kelompok 3 (Dosis ekstrak 125 mg/kgBB) : Hewan uji diberikan ekstrak 125 mg.kgbb pada hari 1-6
- 4) Kelompok 4 (Dosis ekstrak 250 mg/kgBB) : Hewan uji diberikan ekstrak 250 mg/kgBB pada hari 1-6
- 5) Kelompok 5 (Dosis ekstrak 500 mg/kgBB) : Hewan uji diberikan ekstrak 500 mg/kgBB pada hari 1-6.

Pemilihan metode uji aktivitas imunomodulator menggunakan bersihan karbon, berdasarkan penelitian Muthia & Astuti (2019). Penentuan variasi ketiga dosis ekstrak berdasarkan hasil penelitian Tasminatun *et al.*, 2017 tentang efektifitas imunomodulator ekstrak daun pepaya. Masing-masing kelompok diberikan perlakuan 1 kali sehari selama 6 hari, melalui pemberian per oral. Selain perlakuan, hewan uji tetap diberikan pakan dan air ad libitum selama pengujian. Pada hari ke-7, semua

mencit diinjeksi dengan karbon melalui vena ekor secara intravena sebanyak 1 ml. Darah mencit diambil sebanyak 0,5 ml pada menit ke 0 dan 15 melalui vena mata. Masing-masing darah dilisis dengan 4 mL asam asetat 1% dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 634 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

c. Analisa data

Hasil absorbansi tiap sampel digunakan untuk menghitung nilai konstanta fagositosis (K), menggunakan rumus :

$$K = \frac{\ln OD1 - \ln OD2}{t2 - t1}$$

Dimana ;

K : Konstanta fagositosis

OD 1 : Absorbansi pada menit ke 0

OD 2 : Absorbansi pada menit ke 15

t : Waktu (menit ke 0 dan 15)

Data hasil penelitian berupa konstanta fagositosis seluruh kelompok perlakuan dianalisis secara statistik menggunakan metode One Way Anova. Perbedaan yang signifikan ditunjukkan dengan nilai $p < 0,05$, Untuk mengetahui nilai signifikan dari perbandingan masing-masing kelompok perlakuan. Data dikatakan signifikan jika nilai $p < 0,05$ dan data dikatakan tidak signifikan jika nilai $p > 0,05$. Adanya perbedaan yang signifikan ini mampu menjelaskan adanya aktivitas fagositosis yang dilakukan oleh makrofag yang meningkatkan setelah pemberian ekstrak biji carica pada mencit jantan.

3. HASIL DAN DISKUSI

Bahan utama penelitian ini adalah ekstrak biji karika. Biji karika didapatkan dari limbah usaha manisan

karika 'Carica Gemilang' Wonosobo. Bagian tumbuhan yang akan diuji yaitu karika dideterminasi di Laboratorium Ekologi Biosistematik Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang. Kunci identifikasi tumbuhan karika yaitu 1b, 2b, 3b, 4b, 6b, 7b, 9b, 10b, 11b, 12b, 13b, 14a, 15a. Hasil identifikasi menunjukkan sampel yang digunakan adalah benar tumbuhan karika (*Carica pubescen*).



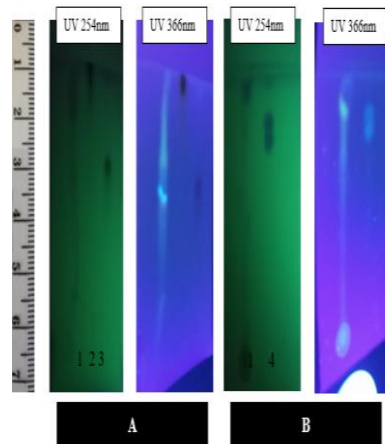
Gambar 1. Buah dan biji tumbuhan karika

Identifikasi kandungan metabolit sekunder ekstrak biji karika menunjukkan positif mengandung glikosida rutin dan kuersetin, berdasarkan Rf spot sampel yang mendekati atau sama dengan Rf spot pembanding. Terdapat kandungan alkaloid pada biji karika, pada literature dijelaskan alkaloid khas pada Caricae adalah alkaloid carpain (Julianti *et al.*, 2014).

Uji imunomodulator menggunakan metode bersihan karbon (*clearance carbon*) dilakukan untuk mengukur aktivitas sel imun non spesifik (sel fagosit) mengeliminasi sel pathogen yang masuk tubuh. Pengujian ini berdasarkan kecepatan sel fagosit menelan zat asing setelah diberikan zat imunomodulator (EBK). Zat atau partikel asing yang digunakan dalam percobaan ini adalah tinta karbon (Ding *et al.*, 2016). Parameter yang digunakan untuk

menilai aktifitas imunomodulator yaitu nilai konstanta fagositosis. Nilai konstanta fagositosis yang tinggi menunjukkan aktivitas senyawa

imunostimulan, yang berarti semakin cepat sel fagositik melakukan proses fagositosis. Nilai konstanta fagositosis dapat dilihat pada tabel 3.



Gambar 2. Pola kromatogram ekstrak etanol biji karika(EEBK).

A. Identifikasi flavonoid. Fase diam silika GF 254 nm. Fase gerak BAA (4 :1 :5)

B. Identifikasi Alkaloid. Fase gerak n heksan: etil asetat (1 :9)

Keterangan : 1. Sampel, 2. Kuersetin, 3. Rutin, dan 4. Piperin

Tabel 3. Hasil rata-rata nilai indeks fagositosis kelompok perlakuan

Perlakuan	Rata-rata konstanta fagositosis
Kontrol negatif ^a	0.0019 ± 0.001 ^{b,c,d,e}
Kontrol positif ^b	0.0256 ± 0.0014 ^{a,c,d}
EBK 125 ^c	0.0152 ± 0.0023 ^{a,b,d,e}
EBK 250 ^d	0.0200 ± 0.0001 ^{a,b,c,e}
EBK 500 ^e	0.0251 ± 0.0003 ^{a,c,d}

Keterangan : Hasil signifikansi berdasarkan hasil uji statistik *One Way Anova* dilanjutkan *Post Hoc Test*. Indeks menunjukkan perbedaan signifikan antar kelompok ($p < 0.05$)

Pada tabel 3 menunjukkan nilai konstanta variasi dosis EBK dan kontrol positif imunostimulan *Phyllanthus niruri* lebih besar dibandingkan kontrol negative. Semakin besar nilai konstanta fagositosis maka semakin tinggi kecepatan bersihan karbon. Peningkatan nilai konstanta fagositosis variasi dosis ekstrak biji karika menunjukkan aktivitas imunostimulan. Semakin tinggi dosis ekstrak biji karika yang diberikan ke hewan uji, semakin besar efek imunostimulan.

Peningkatan konstanta fagositosis hewan uji yang telah diberikan EBK selama 7 hari dapat mempercepat eliminasi tinta karbon sebagai antigen. Respon sel fagosit juga menginisiasi pengaktifan respon sel imun adaptif pada hewan uji. Sistem imun yang berperan sebagai *natural first barrier* saat terdapat invasi senyawa asing/organisme adalah makrofag dan sel NK (*natural killer cell*). Kedua sel imun tersebut dinamakan sel fagosit karena mekanisme kerja mempertahankan tubuh melawan infeksi dengan cara fagositosis (menelan senyawa

asing/antigen). Proses fagositosis antigen oleh APC (*antigen presenting cells*) yaitu makrofag, akan mempengaruhi pengaktifan sel T. Sel T merupakan sistem imun adaptif yang berperan sebagai pertama mengaktifkan sel B sebagai precursor pembentukan antibody. Kedua, sel T akan memproduksi sel T sitotoksik yang melawan langsung sel yang terinfeksi (Magrone *et al.*, 2018).

Karika merupakan tumbuhan satu genus dengan pepaya, perbedaan kedua tumbuhan yang menonjol adalah ukuran buahnya. Buah karika berukuran lebih kecil, sebesar genggam tangan orang dewasa. Kandungan metabolit sekunder pada kedua tumbuhan hampir sama, sehingga aktivitas farmakologisnya juga sama, hanya kekuatan potensinya yang berbeda. Penggunaan daun pepaya yang diekstraksi menggunakan pelarut air (dosis 250 mg/kgBB) dapat menaikkan aktivitas IgM dan IgGD pada hewan uji tikus. Biji pepaya diketahui mampu meningkatkan respon *phytohemagglutinin* dari limfosit. Daun karika menyebabkan penurunan jumlah limfosit pada hewan uji tikus *Sprague dawley* yang diberikan paparan azoxymethane. Zat azoxymethane merupakan agen karsinogenik, menginduksi terjadinya kanker kolorektal (Kharisma *et al.*, 2011). Penelitian tentang aktivitas imunomodulator dengan metode bersihan karbon pada ekstrak etanol kulit buah nanas (EKBN), diperoleh hasil bahwa dosis EKBN 250 mg/kgBB memiliki efek imunomodulator yang paling baik (Azizah *et al.*, 2017).

Analisa statistik dengan ANOVA menunjukkan nilai konstanta fagositosis dosis EBK 500 mg/kgBB memiliki efektifitas sebanding dengan kontrol positif

Phyllanthus niruri 19.1 mg/kgBB ($p > 0.05$). Variasi dosis EBK memiliki perbedaan bermakna dengan kontrol negatif ($p < 0.05$). Aktivitas imunomodulator dengan efek imunostimulan pada EBK diduga karena pengaruh metabolit sekunder alkaloid, flavonoid golongan quersetin dan glikosida rutin.

Menurut Perez and Castell (2016) dalam studi *in vitro*nya, quersetin (100 $\mu\text{mol/L}$) dapat menghambat LPS (lipopolisakarida) yang menginduksi mRNA dari TNF α sehingga terjadi proses apoptosis sel mikrogial. Quersetin (3 $\mu\text{mol/L}$) menghambat enzim yang dapat menghasilkan mediator inflamasi yaitu siklooksigenase (COX) dan lipooksigenase (LOX) terhadap sel epitel babi. Efek pemberian rutin pada mencit galur Swiss albino dapat sebagai agen proteksi terhadap hewan uji yang diinduksi CCl $_4$, sehingga menurunkan konsentrasi lipid peroksidase (Hosseinzadeh *et al.*, 2014). Alkaloid dari bahan alam menunjukkan dapat berperan sebagai agen antiproliferasi dan sitotoksik. Alkaloid mampu melakukan *down regulasi* dengan menghambat aktifitas protein pembentuk sel, yaitu VEGF, TNF- α , dan HIF-1 α . Alkaloid jenis *berberine*, *noscopine*, *brucine*, *matrine*, *homoharringtonine* diketahui dapat memblok aliran aktivasi proses angiogenesis (Alasvand *et al.*, 2019).

4 KESIMPULAN

Ekstrak biji karika dosis 500 mg/kgBB mampu meningkatkan aktifitas respon fagositosis dan sebanding dengan kontrol imunostimulan *Phyllanthus niruri*. Biji karika dapat ditingkatkan pemanfaatannya sebagai obat tradisional yang mempunyai aktivitas imunostimulan. Perlu dilakukan penelitian aktivitas imunomodulator lanjutan pada

biji karika, yaitu untuk mengetahui aktivitas fagositosis makrofag dan proliferasi sel limfosit pada hewan uji.

5. UCAPAN TERIMAKASIH

Rekan sejawat Prodi S1 Farmasi Universitas Ngudi Waluyo dan rekan mahasiswa tim penelitian karika.

6. DAFTAR PUSTAKA

- Akhtar-Schäfer, I., Wang, L., Krohne, T. U., Xu, H., & Langmann, T. (2018). Modulation of three key innate immune pathways for the most common retinal degenerative diseases. *EMBO molecular medicine*, 10(10).
- Alasvand, M., Assadollahi, V., Ambra, R., Hedayati, E., Kooti, W., & Peluso, I. (2019). Antiangiogenic effect of alkaloids. *Oxidative medicine and cellular longevity*.
- Azizah, M., Wiraningsih, W., & Sari, E. R. (2017). Efek imunomodulator ekstrak etanol kulit buah nanas (*Ananas comosus* L. Merr) terhadap mencit putih jantan dengan metode bersihan karbon (carbon clearance). *Indonesian Journal of Applied Sciences*, 7(2).
- Ding, X. Y., Ji, L., Cheng, X., Su, L. L., Li, L., & Lu, T. L. (2016). Effect of Astragali Radix with different sulfur fumigation technologies on immune function in mice. *China journal of Chinese materia medica*, 41(15), 2819-2823.
- El-katcha, M. I., Soltan, M. A., Sharaf, M. M., & Hasen, A. (2016). Growth performance, immune response, blood serum parameters, nutrient digestibility and carcass traits of broiler chicken as affected by dietary supplementation of garlic extract (Allicin). *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, 49(2), 50-64
- Hosseinzadeh, H., & Nassiri-Asl, M. (2014). Review of the protective effects of rutin on the metabolic function as an important dietary flavonoid. *Journal of endocrinological investigation*, 37(9), 783-788.
- Julianti, T., Oufir, M., & Hamburger, M. (2014). Quantification of the antiplasmodial alkaloid carpaine in papaya (*Carica papaya*) leaves. *Planta medica*, 80(13), 1138-1142.
- Kharisma, Y., Ariyoga, A., & Sastramihardja, H. S. (2011). Efek ekstrak air buah pepaya (*Carica papaya* L.) muda terhadap gambaran histologi kelenjar mamma mencit laktasi. *Majalah Kedokteran Bandung*, 43(4), 160-165.
- Kumari, R., & Kotecha, M. (2016). A review on the standardization of herbal medicines. *Int J Pharm Sci Res*, 7(2), 97-106.
- Laily, A. N., Suranto, S., & Sugiyarto, S. (2012). Characterization of *Carica pubescens* in Dieng Plateau, Central Java based on morphological characters, antioxidant capacity, and protein banding pattern. *Nusantara Bioscience*, 4(1).
- Magrone, T., Spagnoletta, A., Salvatore, R., Magrone, M., Dentamaro, F., Russo, M. A., & Jirillo, E. (2018). Olive leaf extracts act as modulators of the human immune response. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)*, 18(1), 85-93.
- Minarno, E. B. (2015). Skrining fitokimia dan kandungan total flavanoid pada buah *Carica pubescens* Lenne & K. Koch di kawasan bromo, cangar, dan dataran tinggi dieng. *el-Hayah*, 5(2), 73-82.
- Mu'awwanah, A., & Ulfah, M. (2017). Uji aktivitas antioksidan fraksi n-heksan ekstrak etanol daun karika (*Carica pubescens*) dan identifikasi senyawa alkaloid dan flavonoidnya. *e-Publikasi Fakultas Farmasi*, 118-124.
- Muthia, R., & Astuti, K. I. (2018). Efek Imunomodulator Infusa Umbi Bawang Dayak (*Eleutherina palmifolia* L. Merr) Dengan Metode Bersihan Karbon. *Jurnal Pharmascience*, 5(1).
- Novalina, D., Sugiyarto, S., & Susilowati, A. (2018). Aktivitas antibakteri kulit buah karika dieng terhadap *Shigella flexneri* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Teknologi Laboratorium*, 7(2), 53-60.
- Pandey, S., Cabot, P. J., Shaw, P. N., & Hewavitharana, A. K. (2016). Anti-inflammatory and immunomodulatory properties of *Carica papaya*. *Journal of immunotoxicology*, 13(4), 590-602.
- Pérez-Cano, F., & Castell, M. (2016). Flavonoids, inflammation and immune system.
- Supono, S., Susilowati, A., Purwantisari, S. U. S. I. A. N. A., & Kurniawati, F. N. (2015). Biokontrol Larva nyamuk aedes aegypti menggunakan limbah biji karika (*Vasconcellea pubescens*). *Pros Sem Nas Biodiv Indon*, 1(5), 27-31.
- Tasminatun, S., Pravitasari, R., & Makiyah, S. N. (2017). Potential ethanol of *Carica papaya* L. extract

as immunomodulatory through histology observation at mice balb/C spleen. *Berkala Kedokteran*, 13(2), 205-210.

Torres-Rodríguez, M. L., García-Chávez, E., Berhow, M., & de Mejia, E. G. (2016). Anti-

inflammatory and anti-oxidant effect of *Calea urticifolia* lyophilized aqueous extract on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Journal of ethnopharmacology*, 188, 266-274.