

Efek Serbuk Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) terhadap Jumlah Sel CD4 pada Sukarelawan Sehat

(The Effect of Rosella (*Hibiscuss sabdariffa* L.) Powder on CD4 Counts in Healthy Volunteers)

DINI MARDHIYANI^{1*}, ENDANG DARMAWAN¹, AKROM^{1,2}

¹Pascasarjana Farmasi, Fakultas Farmasi,

²Pusat informasi dan kajian obat Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta
Jl. Prof. Dr Soepomo, S.H. Janturan Yogyakarta 55164

Diterima 15 Maret 2018, Disetujui 22 September 2018

Abstrak: Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) memiliki kandungan antioksidan yang terbukti berkhasiat dan aman melalui uji klinis dan praklinik sebagai imunostimulan. Unsur antioksidan di dalam bunga Rosella yaitu antosianin, kuersetin, L-*ascorbic acid* dan *protocatechuic acid*. Penelitian uji klinik ini bertujuan untuk mengetahui efek pemberian serbuk bunga Rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* L.). Penelitian ini menggunakan desain *pre-post treatment*. Subjek penelitian terdiri dari 21 sukarelawan sehat yang telah memenuhi kriteria inklusi, eksklusi dan bersedia mengisi *informed consent*. Sukarelawan sehat diberikan perlakuan serbuk bunga Rosella dosis 500 mg sekali sehari selama 30 hari. Pemeriksaan jumlah limfosit dan sel CD4 dilakukan menggunakan *hematology analyzer* dan *flowcytometer*. Persentase sel CD4 adalah 30,85% (hari ke-0) dan 34,15% (hari ke-31). Rata-rata untuk jumlah *absolut* sel CD4 adalah 767,04 sel/mm³ (hari 0) dan 696,42 sel/mm³ (hari ke-31). Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak ada pengaruh yang signifikan ($p > 0,05$) pada jumlah *absolut* sel CD4 dan ada pengaruh signifikan persentase CD4 ($P < 0,05$). Kesimpulan dari penelitian ini bahwa pemberian serbuk bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) dosis 500 mg/hari selama 30 hari meningkatkan persentase sel CD4.

Kata kunci: Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.), antosianin, CD4, sukarelawan sehat.

Abstract: Roselle flower (*Hibiscus sabdariffa* L.) have antioxidants which are proven to be beneficial and safe through clinical and preclinical testing as immunostimulants. Antioxidants in Roselle flower are hibiscus anthocyanin, quercetin, L-*ascorbic acid* and *protocatechuic acid*. The purpose of this clinical trial was to determine the effect of ethanol extract of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) to CD4 cell count. This study used pre-post treatment design. A total of 21 healthy volunteer were chosen according to inclusion and exclusion criteria and filled informed consent. Healthy volunteer were given Rosella powder in capsules form with 500 mg dose for 30 days. Analyzed CD4 cell count was conducted using hematology analyzer and flowcytometer. The percentage of CD4 cells was 30.85% (day 0) and 34.15% (day 31st). The average for the absolute number of CD4 cells was 767.04 cells/mm³ (day 0) and 696.42 cells/mm³ (day 31st). Results showed that there was no significant effect ($p > 0,05$) of CD4 cell absolute count and there was a significant effect of CD4 percentage ($p < 0,05$). This study concluded that 500 mg roselle petal ethanol extract powder (*Hibiscus sabdariffa* L.) given everyday for 30 days showed some effect on d increasing CD4 cell percentage.

Keywords: Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.), anthocyanin, CD4, healthy volunteer.

*Penulis korespondensi: Hp :0822422309552/085265480830
Email: dinimardhiyani7@gmail.com

PENDAHULUAN

BUNGA Rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) bermanfaat sebagai imunostimulan karena kandungan senyawa antosianin dan memiliki antioksidan yang tinggi⁽¹⁾. Unsur antioksidan di dalam bunga Rosella yaitu *hibiscus anthocyanin*, *quercetin*, *L-ascorbic acid* dan *protocatechuic acid* (PCA)^(2,3). Ekstrak metanol bunga rosella dengan konsentrasi 16,59 mg/mL memiliki aktivitas antioksidan yang cukup poten melalui 50% penghambatan radikal 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH).

Potensi antioksidan yang dimiliki ekstrak bunga rosella dapat dimanfaatkan sebagai imunostimulator. Penggunaan ekstrak bunga Rosella sebagai imunostimulator dapat dilihat efeknya melalui parameter sistem imun, salah satunya dengan melihat jumlah limfosit. Limfosit terdiri dari tiga jenis sel yaitu limfosit T, limfosit B, dan sel *natural killer* (NK). Limfosit T merupakan sistem imun spesifik, salah satu diantaranya diperankan oleh sel T *Cluster of Differentiation 4* (CD4)⁽⁴⁾. CD4 adalah sebuah *marker* atau penanda yang berada di permukaan sel-sel darah putih manusia maupun hewan, terutama sel-sel limfosit.

Hal yang mendukung potensi serbuk bunga Rosella sebagai imunostimulator dengan adanya beberapa penelitian praklinik. Penelitian yang dilakukan sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak etanol bunga rosella dengan dosis 10, 50, dan 100 mg/kg BB selama 21 hari berpotensi untuk berkembang sebagai agen imunomodulator dengan efek peningkatan sekresi interleukin-10 (IL-10) dan interleukin-14 (IL-14)⁽⁵⁾.

Suatu tanaman yang berpotensi dijadikan fitofarmaka harus terbukti berkhasiat dan aman melalui uji praklinik dan uji klinik. Uji toksisitas akut ekstrak etanol bunga Rosella memiliki nilai *lethal dose* 50 (LD₅₀) sebesar 5000 mg/kgBB. Berdasarkan nilai LD₅₀ yang dimiliki ekstrak etanol bunga Rosella dikategorikan toksisitas ringan (5-15 g/kg)⁽⁶⁾ dan uji toksisitas subkronis dengan nilai *no observed effect level* (NOEL) 1,25g/kgBB⁽⁷⁾. Pada uji praklinik di atas diperlukan untuk melanjutkan ke fase uji klinik⁽⁸⁾ dengan tujuan melihat keamanan dan pengaruh kapsul bunga Rosella dosis 500 mg/hari selama 30 hari terhadap jumlah sel CD4.

BAHAN DAN METODE

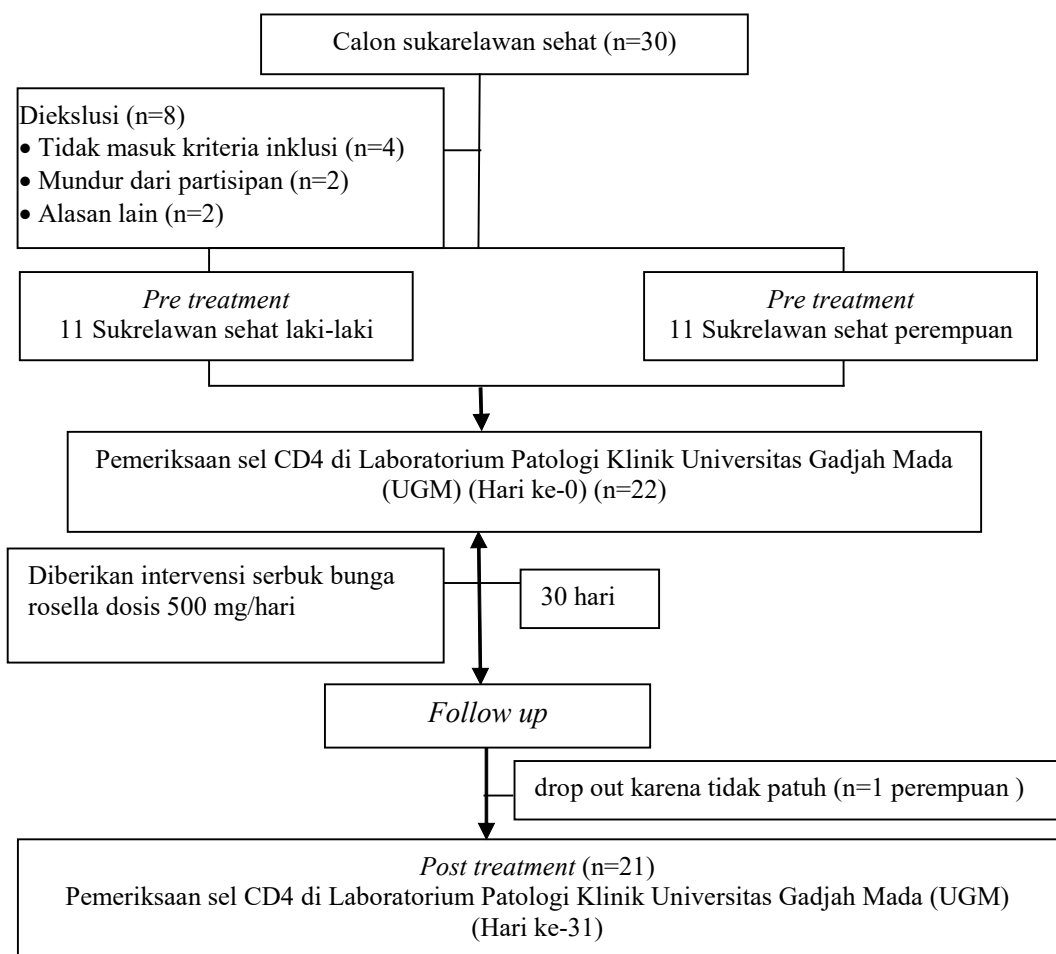
BAHAN. Serbuk bunga Rosella dari PT. Natura (Product code: 5055C, Batch: RH162703), tabung EDTA, reagen antibodi CD4-FITC dan larutan reagen FACS (*Propidium Iodide*:50 µg/mL, RNase : 20 µg/mL, Triton-X 100: 0.1 %), sampel darah sukarelawan sehat.

METODE. Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental *pre-post treatment*. Subyek penelitian sebanyak 21 orang terdiri dari 11 orang laki-laki dan 10 orang perempuan yang sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi. Serbuk bunga Rosella diproduksi dengan standarisasi pabrik PT. Natura dikemas dalam bentuk kapsul diberikan pada sukarelawan dengan dosis 500 mg 1 kali sehari selama 30 hari untuk melihat pengaruh pemberian serbuk bunga Rosella selama 30 hari. Skema penelitian ditampilkan pada Gambar 1.

Sampel darah sukarelawan diambil sebelum (hari ke-0) dan setelah 30 hari mengonsumsi serbuk bunga Rosella (hari ke-31) untuk melihat pengaruh pemberian serbuk ekstrak etanol bunga Rosella selama 30 hari.

Kriteria Inklusi dan Eksklusi. Kriteria inklusi: laki-laki dan perempuan sehat berusia 18-50 tahun, sehat dinyatakan berdasarkan pemeriksaan klinis sukarelawan berupa *vital sign*, meliputi tekanan darah (TD), suhu tubuh, denyut nadi (*heart rate*, HR) dan tingkat pernapasan (*respiration rate*, RR) dan dinyatakan dalam surat keterangan sehat dengan didukung oleh pemeriksaan laboratorium klinis yang meliputi hematologi rutin, fungsi hati, fungsi ginjal, riwayat penyakit, dan pemeriksaan fisik, tidak merokok, indeks massa tubuh (IMT) berkisar antara 18-30 kg/m², tidak mengonsumsi vitamin atau suplemen kesehatan selama penelitian berlangsung. Kriteria eksklusi: wanita hamil, tidak minum obat sesuai interval dan petunjuk penggunaan obat, menggunakan herbal lain selama penelitian berlangsung.

Variabel. Variabel bebas pada penelitian ini adalah pemberian serbuk bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) dengan dosis 500 mg, satu kali sehari selama 30 hari. Variabel terikat pada penelitian ini adalah CD4.



Gambar 1. Skema penelitian.

Pembuatan Pemeriksaan CD4. Darah sukarelawan sehat diambil pada bagian vena *median cubiti* atau *cephalica* dan dimasukkan kedalam tabung EDTA dan dikumpulkan untuk dilakukan pemeriksaan jumlah sel CD4 dengan alat *flow cytometer*. Sampel darah dipipet ke dalam tabung *falcon* sebanyak 50 μL . Ditambahkan 5 μL reagen antibodi CD4 FITC ke masing-masing tabung *falcon*. Campuran tersebut dicampur sampai homogen dengan *vortex mixer* selama 1 menit, kemudian diinkubasi 15 menit dengan suhu 20-25 $^{\circ}\text{C}$ pada ruang gelap. Setelah masa inkubasi selesai, pada sampel ditambahkan 450 μL larutan reagen FACS (1x) yang sudah diencerkan. Diinkubasi lagi 15 menit dengan suhu 20-25 $^{\circ}\text{C}$ pada ruang gelap. Setelah masa inkubasi selesai, dilakukan analisis dengan menggunakan alat FACS *flow cytometer*⁽⁹⁾.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemeriksaan jumlah sel CD4 pada sampel darah sukarelawan sehat untuk melihat pengaruh serbuk bunga Rosella pada sistem imun spesifik selular dengan menggunakan metode *flowcytometry*. Dari hasil pemeriksaan sel CD4 pada 21 sukarelawan

sehat (Tabel 1) rata-rata hasil pemeriksaan jumlah persentase sel CD4 adalah 30,85% (hari ke-0), dan 34,15% (hari ke-31). Rata-rata untuk jumlah absolut sel CD4 (Tabel 1) adalah 767,04 sel/ mm^3 (hari ke-0) dan 696,42 sel/ mm^3 (hari ke-31).

Dari hasil pemeriksaan jumlah sel CD4, sebanyak 21 sukarelawan sehat yang mengikuti penelitian masih dalam rentang normal rata-rata jumlah CD4 manusia sehat populasi orang Indonesia, yaitu 482,7-1023,3 sel/ mm^3 (753,3 \pm 270,3 sel/ mm^3) untuk absolut CD4 dan 24,9-40,3% (32,6 \pm 7,7%) untuk persentase CD4⁽¹⁰⁾.

Dari analisis statistik data, diketahui bahwa jumlah absolut sel CD4 dengan uji Wilcoxon (Tabel 1) tidak memperlihatkan perbedaan signifikan ($p > 0,05$) pada hari ke-31. Nilai $p = 0,230$. Sementara, hasil analisis terhadap jumlah persentase sel CD4 dengan uji *t* (Tabel 1) memperlihatkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) pada hari ke-31. Hal itu ditunjukkan dengan nilai $p = 0,003$. Perbedaan signifikan pada jumlah persentase sel CD4 secara statistik mengindikasikan adanya peningkatan jumlah rata-rata persentase sel CD4 pada hari ke-31. Adanya peningkatan jumlah rata-rata persentase sel CD4 pada hari ke-31 itu disebabkan oleh adanya senyawa flavonoid yang terdapat dalam ekstrak yang dianggap bertanggung

Tabel 1. Hasil analisis rata-rata jumlah absolut dan persentase sel CD4 hari ke-0 dan hari ke-31 pada sukarelawan sehat (n=21).

Parameter	Rata-rata±Simpangan Baku		Nilai P	Nilai normal	Uji statistik
	Hari ke-0	Hari ke-31			
Absolut CD4 (sel/mm ³)	767,04±304,06	696,42±232,71	0,230	482,7-1023,3	<i>Wilcoxon</i>
Persentase CD4 (%)	30,85±5,90	34,15±5,59	0,003*	24,9-40,3	<i>Paired T test</i>

Keterangan : * = terdapat pengaruh signifikan

jawab.

Jadi, sebagaimana dilaporkan bahwa senyawa glikosida flavonoid dapat meningkatkan jumlah sel CD4 pada mencit yang tertekan sistem imunnya⁽¹¹⁾. Namun, perubahan jumlah persentase sel CD4 pada penelitian ini masih dalam rentang normal rata-rata jumlah sel CD4 manusia sehat populasi orang Indonesia. Secara klinis tidak terdapat perbedaan yang signifikan berdasarkan nilai selisih rata-rata jumlah persentase sel CD4.

Sel CD4 memiliki peran dalam regulasi pemeliharaan sistem imun dan mengontrol berbagai respons imun dengan mencegah atau membatasi respons imun yang disebut *regulatory T cells* (TR)⁽¹²⁾. Suatu imunostimulator dapat mengaktifasi sistem imun dengan berbagai cara, seperti meningkatkan jumlah aktivitas sel T, NK-cell, dan makrofag serta melepaskan interferon dan interleukin⁽¹³⁾. Sel CD4 yang dirangsang oleh antigen untuk mengeluarkan faktor supresi antigen spesifik akan merangsang sel sel T supresor (Ts) untuk menekan sel efektor. Antigen yang mengadakan bridging antara sel Ts dengan sel limfosit lain (sel B dan sel Th) akan menekan aktivasi sel B dan sel Th melalui Ts. Oleh sebab itu, sel CD4 yang terdapat di dalam tubuh dapat memberikan efek terhadap kontrol sistem imun pada sukarelawan sehat⁽¹⁴⁾.

Pada penelitian sebelumnya dijelaskan bahwa pemberian ekstrak etanol bunga Rosella dosis 150 µg/mL dapat meningkatkan aktivitas makrofag⁽¹⁵⁾. Makrofag berperan penting dalam imunitas spesifik dan nonspesifik. Aktivasi makrofag akan mensekresi sitokin (IL-1, IL-6, IL-12, dan TNF-α) dan mengaktifasi sel T untuk mensekresi IFN-γ⁽¹⁶⁾. Sekresi IFN-γ dapat meningkatkan ekspresi MHC kelas II. MHC II yang mempersentasikan antigen memicu respons subset sel T CD4⁽¹⁷⁾.

Peningkatan jumlah persentase sel CD4 diawali adanya antigen yang memicu sistem kekebalan tubuh. Pemicuan sistem dimulai dari pertahanan tubuh nonspesifik dengan cara memusnahkan antigen

serta pertahanan tubuh spesifik dengan membentuk pertahanan yang lebih kompleks melalui produksi antibodi ataupun dengan memproduksi berbagai sitokin⁽¹⁸⁾.

Peningkatan persentase sel CD4 pada penelitian ini dapat dipicu oleh adanya kandungan senyawa fenol dan flavonoid pada serbuk bunga Rosella yang berperan sebagai antigen atau mitogen. Dalam hubungan itu, makrofag mengubah antigen yang ditangkap menjadi peptida antigen kemudian diikat oleh molekul *major histocompatibility komplek* (MHC) dan dipresentasikan oleh antigen *presenting cell* (APC) yang selanjutnya dikenal oleh reseptor sel B maupun sel T melalui reseptor. Pengikatan peptida antigen oleh reseptor mengaktifasi G-protein yang kemudian memproduksi fosfolipase C. Enzim ini menghidrolisis *Phosphatidil Inositol Biphosphat* (PIP2) menjadi produk reaktif *Diasylglyserol* (DAG) dan *Inositol Triphosphat* (IP3). IP3 menstimulasi pelepasan Ca²⁺ ke dalam sitoplasma sehingga konsentrasi Ca²⁺ meningkat. Peningkatan Ca²⁺ berperan untuk menstimulasi kerja enzim protein kinase C dan 5-lipoxigenase. Protein kinase C menstimulasi produksi interleukin-2 (IL-2)⁽¹⁹⁾. IL-2 merangsang sistem kekebalan tubuh dan meningkatkan jumlah sel CD4⁽²⁰⁾.

Potensi peningkatan imun melalui jalur *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK) oleh bunga Rosella⁽²¹⁾ termasuk salah satu mekanisme bunga Rosella dalam meningkatkan jumlah sel CD4. Senyawa flavonoid memiliki kemampuan untuk memicu aktivitas MAPK yang dapat merangsang peningkatan IL-2⁽²²⁾. MAPK berperan dalam aktivasi imunokompeten sel dan menginduksi peningkatan sitokin IL-2. IL-2 menginduksi *proliferasi* sel T, khususnya sel T *helper*^(23,24). Terjadinya peningkatan IL-2 dibuktikan dengan peningkatan ekspresi FOXp3 karena adanya aktivasi interleukin-2 reseptor (IL-2R) yang kemudian meningkatkan jumlah CD4CD25 Treg. Peningkatan itu diperlukan untuk menjaga homeostasis sistem imun^(25,26).

Terdapat peningkatan jumlah persentase sel CD4 pada pemberian serbuk bunga rosella pada sukarelawan sehat selama 30 hari. Oleh karena itu, pemberian dosis dan lama waktu penggunaannya sebagai suatu obat herbal untuk imunostimulan menjadi faktor penting⁽²⁷⁾. Penggunaan suatu imunostimulan dalam jangka waktu yang lama tidak memberikan keuntungan tambahan⁽²⁸⁾, bahkan dapat mengganggu sistem imunitas alami yang terjadi pada tubuh.

Sel CD4 yang dirangsang oleh antigen untuk mengeluarkan faktor supresi antigen spesifik akan merangsang sel Ts untuk menekan sel efektor. Antigen yang mengadakan *bridging* antara sel Ts dengan sel limfosit lain (sel B dan sel Th) akan menekan aktivasi sel B dan sel Th melalui Ts⁽¹⁴⁾. Oleh sebab itu, sel CD4 yang terdapat di dalam tubuh dapat memberikan efek terhadap kontrol sistem imun pada sukarelawan sehat.

SIMPULAN

Pemberian serbuk bunga Rosella selama 30 hari memiliki efek meningkatkan jumlah persentase sel CD4 pada sukarelawan sehat.

DAFTAR PUSTAKA

1. Widyanto, Poppy and A. Nelistya. Rosella aneka olahan, khasiat dan ramuan. Depok : Penebar Swadaya. 2009. Hal 1-14.
2. Hirunpanich V, Utaipat A, Morales NP, Bunyaphatsara N, Sato H, Herunsalee A, et al. Antioxidant effects of aqueous extracts from dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* Linn. (Roselle) in vitro using rat low-density lipoprotein (LDL). *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2005. 28(3): 481-84.
3. Juniarka, I. Gede Agus dan Endang Lukitaningsih. Analisis aktivitas antioksidan dan kandungan antosianin total ekstrak dan liposom kelopak bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.). Diss. Universitas Gadjah Mada, 2012. *Majalah Obat Tradisional*, 16(3).
4. Dharmana E, Susilainingsih N, Widjayahadi N. Pengaruh pemberian tolak angin cair terhadap jumlah sel T, kadar IFN- γ , dan IL-4. 2007. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang. Diambi dari URL:<http://eprints.undip.ac.id/23621/1/Narottama.pdf>. diakses tanggal 23 Juli 2017.
5. Nurkhasanah. The effect of Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) treatment on Il-10 And Il-14 secretion on dimethylbenz (A) anthracene (Dmba) induced rat. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* Vol 7, Issue 4, 2015 P.402-4.
6. Lu FC Kacew. S. Lu's. *Basic Toxicology : Fundamental, target organs*, 5th Ed. Informa Healthcare USA Inc., New York; 2009: 48-9.
7. Suwandi T. Pengembangan potensi antibakteri kelopak bunga *Hibiscus sabdariffa* L. (rosela) terhadap *Streptococcus sanguinis* penginduksi gingivitis menuju obat herbal terstandar, [Disertasi], Universitas Indonesia, Jakarta. 2012. Hal 199.
8. Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia (BPOM RI). Peraturan kepala badan pengawas obat dan makanan. Pedoman Pelaksanaan Uji Klinik Obat Herbal Nomor 13. Jakarta: BPOM. 2014. Hal 6.
9. Akrom, Nurani LN dan Hidayati T. Kajian aktivitas imunomodulator agen kemopreventif isolate aktif ekstrak *N. sativa* pada kanker payudara akibat paparan DMBA pada tikus putih, [Research report], LPP UAD, 2008. Yogyakarta.
10. Prasetyo AA and Khilyat UNZ. Establishing mean CD4+ t cell values among healthy javanese adults in indonesia, *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2008. 46(4):662-8.
11. Chauhan PS, Satti NK, Suri KA, Amina M. Bani S. Stimulatory effect of *Cuminum cyminum* and flavonoid glycoside on cyclosporine-A and restraint stress induced immune-suppression in Swiss albino mice, *Chemico-Biological- Interaction*. 2010. 185(1):66-72.
12. Bluestone JA, Abbas AK. Opinion-regulatory lymphocytes: natural versus adaptive regulatory T cells. *Nature Reviews Immunology*. 2003. 3(3): 253.
13. Kusmardi, Shirly Kumala, Enif ET. 2007. Efek imunomodulator ekstrak daun Ketepeng Cina (*Cassia alata* L.) terhadap aktivitas dan kapasitas fagositosis makrofag. *Makara Kesehatan*. 2007. 11(2): 50-3.
14. Asano Y and Hodes RJ. T cell regulation of B cell activation. An antigen-mediated tripartite interaction of Ts cells, Th cells, and B cells is required for suppression. *J. Immunol*. 1984. 133:2864-7.
15. Wulandari D, Puri PR. Efek imunostimulan ekstrak etanol kelopak bunga Rosella. *JFIONline| Print ISSN 1412-1107| e-ISSN 2355-696X*. 2014. 7(1).
16. Puspitasari, Rr.DA, Pratiwi T, Sri M. Efek imunostimulator ekstrak etanol Kayu Manis (*Cinnamomum Burmanii*) terhadap jumlah CD4, dan interferon gamma pada mencit BALB/c yang diinfeksi bakteri *Salmonella enteritidis*. Program Studi Kedokteran Hewan, Program Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya. 2012. Hal 6.
17. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologi dasar*, Edisi ke 5, Elsevier, Saunders, Philadelphia. 2016.
18. Lehner MD. Immunomodulation by endotoxin tolerance in murine models of inflammation and bacterial infection, [Disertasi]. University of Konstanz. 2001. hal 3-53.
19. Roitt IM and PJ Delves. *Essential immunology*. 10th ed. Blackwell Science Ltd. London. 2001. 17-25, 75-81.
20. Rosidah. Analisis numerik untuk immunotherapy pada infeksi HIV-1 [Tesis]. Bogor: Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor. 2010. hal 6-18.
21. Shen CY, Wen-Li Zhang, Jian-Guo, Jiang. Immune-enhancing activity of polysaccharides from *Hibiscus sabdariffa* Linn. via MAPK and NF-kB signaling

- pathways in RAW264.7 cells, *Journal of Functional Foods*. 2017. 34: 118–129.
22. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer, *pharmacology, the American society for pharmacology and experimental therapeutics*. 2000. 52:673-751.
 23. Kurniasih. Perilaku dinamik model matematika atas peran IL-2 (Interleukin-2), sel *helper* CD4+ dan sel T regulatori. Skripsi. Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang. 2012. Hal 22-4.
 24. Dwijayanti DR, Muhaimin Rifa'I. *Gynura procumbens* ethanolic extract promotes lymphocyte activation and regulatory T cell generation in vitro, *The Journal Of Tropical Life Scienc*. 2015. 5(1):14-9.
 25. Zom E, Nelson EA, Mohseni M, Porcheray F, Kim H. IL-2 regulates FOXP3 expressions in human CD4CD25 regularity T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo, *Blood*. 2006. 108:1571-8.
 26. Lu L and Rudensky A. Molecular orchestration of differentiation and function of regulatory T cells, *Genes Dev*. 2009. 23:1270-82.
 27. Sakai M. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*. 1999.172: 63-92.
 28. Galeotti M. Some aspects of the application of immunostimulants and a critical review of methods for their evaluation, *J. Appl. Ichthyol*. 1998. 14: 189-99.