

**Respons Antiinflamasi Serbuk Biji Alpukat (*Persea americana mill*)
terhadap Jumlah PMN Neutrofil Mencit yang Diinduksi
Bakteri *E. coli***

Yani Corvianindya Rahayu

Bagian Oral Biologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
Alamat Korespondensi: Jln. Kalimantan 37 Jember 68121, Indonesia.
E-mail : ryanicorvianindya@yahoo.com

Abstrak: Alpukat (*Persea americana mill*) adalah salah satu tumbuhan berkhasiat yang dapat dimanfaatkan sebagai tanaman obat. Biji alpukat mengandung senyawa polifenol, flavonoid, triterponoid, kuionon, tanin, saponin, monoterpenoid, dan seskuiterpenoid. Penelitian secara *in vivo* maupun *in vitro* menunjukkan bahwa flavonoid memiliki aktivitas biologis maupun farmakologis, antara lain bersifat antiradang, antibakteri, antioksidan, dan melindungi pembuluh darah. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui perbedaan lama pemberian dan konsentrasi yang paling efektif dari serbuk biji alpukat yang mampu memberikan efek antiinflamasi terhadap jumlah PMN neutrofil pada mencit yang telah diinduksi bakteri *E. coli*. Sebanyak 25 ekor mencit jantan dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan dan 2 kelompok kontrol. Pada kelompok perlakuan diberikan serbuk biji alpukat yang sudah dilarutkan hingga konsentrasi 5%, 10% dan 15%. Pada hari ke-1, 3, dan 7 dilakukan pengambilan darah tepi mencit dan dilakukan penghitungan jumlah PMN neutrofil. Berdasarkan hasil analisis Two Way Anova terdapat perbedaan jumlah PMN neutrofil antara perlakuan dan kontrol, dan terdapat perbedaan signifikan jumlah PMN neutrofil antarhari pengamatan ($p < 0.05$). Kesimpulannya adalah pada hari ketiga, serbuk biji alpukat konsentrasi 10% paling efektif dalam menurunkan jumlah PMN neutrofil pada mencit yang diinduksi dengan bakteri *E. Coli*.

Kata Kunci : biji alpukat, respons antiinflamasi, PMN neutrofil, *E.coli*

**Anti-Inflammatory Responsse of Avocado Seed Powder on PMN Neutrophyl
of Wistar Rats Induced with *E.coli* Bacteria**

Yani Corvianindya Rahayu

Bagian Oral Biologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
Alamat Korespondensi: Jln. Kalimantan 37 Jember 68121, Indonesia.
E-mail : ryanicorvianindya@yahoo.com

Abstract: Avocado (*Persea americana mill*) is a plant with efficacy that can be used as a herb medicine. Avocado seed has anti-inflammatory and analgetic effects. The purpose of this study is to know the influence of 5 %, 10 % and 15 % avocado seed powder has anti-inflammatory effect on the number of neutrophyl in wistar rats induced with *E coli* bacteria. Twenty five wistar rats divided into three tretment groups and two control groups. The control groups were administered aquadest orally using gastric sonde. Treatment groups were provided with avocado seed powder dissolved up to concentration of 5%, 10% and 15%. On the first, third and seventh days the peripheral blood of the rats was taken, and PMN neutrophyl were counted. Based on the result of Two Way Anova analysis, it showed some differences between

control and treatment groups, and there were also some significant differences of PMN neutrophil number among the observation days ($p < 0,05$). In conclusion, in third day, 10 % concentration of avocado seed is the most effective in decreasing the number of PMN neutrophil on the wistar rats that induced with *E coli* bacteria.

Keywords: avocado seed, anti-inflammatory response, PMN neutrophil, *E.coli*

Pendahuluan

Sejak zaman dahulu, tumbuhan sudah digunakan sebagai tanaman obat, mengingat biaya pengobatan yang tidak terjangkau oleh semua orang, pengobatan alamiah dengan tanaman obat tradisional dipandang sebagai alternatif yang terjangkau. Salah satu tanaman yang berkhasiat sebagai tanaman obat adalah alpukat (*Persea americana mill*). Selama ini alpukat hanya dimanfaatkan buahnya saja untuk dikonsumsi sedangkan bijinya dibuang. Biji buah alpukat dapat untuk pengobatan sakit gigi, bengkak karena peradangan (sebagai antiradang), menghilangkan sakit (sebagai analgesik), dan kencing manis.^{1,2}

Kandungan yang terdapat didalam biji buah alpukat adalah senyawa polifenol, flavonoid, triterponoid, kuionon, tanin, saponin, monoterpenoid, dan seskuiterpenoid. Polifenol berperan sebagai antioksidan, sehingga diduga mampu menghambat aktivasi karsinogen dan mengurangi risiko terjangkitnya penyakit kronis. Penelitian secara *in vivo* maupun *in vitro* menunjukkan bahwa flavonoid memiliki aktivitas biologis maupun farmakologis, antara lain bersifat sebagai antiradang, antibakteri, antialergi, antioksidan, antikarsinogen, dan melindungi pembuluh darah. Penggunaan flavonoid di bidang kedokteran telah banyak dilakukan, misalnya pada pengobatan diabetes mellitus, penyakit inflamasi, penyakit alergi, kanker, infeksi yang disebabkan oleh virus, tukak lambung, kardiovaskuler, dan osteoporosis.^{3,4}

Pada fase seluler awal proses peradangan, sel pertama yang secara kimia tertarik ke daerah radang adalah neutrofil polimorfonuklear (PMN). PMN neutrofil merupakan leukosit yang berukuran pendek dengan nukleus yang berlobus banyak, berbentuk polimorf, sitoplasmanya mengandung granula, dapat menyerang serta menghancurkan bakteri dan virus di dalam sirkulasi darah. PMN neutrofil muncul dalam jumlah yang besar pada hari-hari pertama peradangan. Banyaknya PMN neutrofil tersebut disebabkan karena adpeningkatan

permeabilitas vaskular dan vasodilatasi pada proses peradangan.⁵⁻⁷

Penyebab utama radang antara lain infeksi yang disebabkan oleh bakteri piogenik, virus, reaksi hipersensitivitas karena parasit, dan basil tuberculosis. Adanya agen fisik seperti trauma mekanik, tenaga radiasi, panas, dingin, jejas listrik, dan bahan kimia.⁷

Escherichia coli adalah bakteri gram negatif yang merupakan flora normal gastrointestinal dan dapat menyebabkan penyakit. Di dalam tubuh, bakteri harus menempel pada sel inang biasanya adalah epitel. Endotoksin merupakan salah satu ciri khas bakteri gram negatif yang terletak pada dinding selnya, yaitu adanya Lipopolisakarida (LPS). Endotoksin akan mempengaruhi imunitas nonspesifik terhadap infeksi bakteri, fagositosis, dan sintesis antibodi. Endotoksin yang masuk ke dalam sirkulasi akan memacu makrofag untuk mengeluarkan mediator, misalnya TNF dan interleukin-1. Sitokin proinflamasi ini merangsang terjadinya adhesi neutrofil dan endotel vaskular, aktivasi faktor pembekuan darah, dan terbentuknya mediator-mediator lain seperti *platelet activating factor* (PAF), protease, prostaglandin, leukotrien, juga dibebaskannya sitokin antiradang seperti interleukin-6 dan interleukin-1. Melalui proses ini juga akan dirangsang sistem komplemen dan mengakibatkan neutrofil teraktivasi dan keluarnya radikal bebas yang toksik terhadap sel.⁸

Salah satu cara untuk mengurangi peradangan yang disebabkan infeksi oleh *E. coli* tersebut adalah dengan memberikan obat antiradang untuk mengurangi respon radang dengan menghambat atau membunuh mikroorganisme yang menjadi penyebab infeksi pada jaringan hidup.

Mencit digunakan di dalam penelitian ini karena mempunyai siklus hidup panjang, pemeliharaannya cukup mudah, dan mempunyai sistem neuroendokrin yang mirip dengan manusia. Berdasarkan uraian di atas, peneliti ingin meneliti efek pemberian serbuk biji alpukat terhadap jumlah

PMN neutrofil pada mencit jantan yang diinduksi *E. coli*.

Metode

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian *post test only control group design*. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedik Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, Laboratorium Kesehatan Daerah Kabupaten Jember, dan Laboratorium Pengolahan Hasil Pangan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Bahan yang digunakan adalah serbuk biji alpukat konsentrasi 5%, 10% dan 15%. Sebanyak 250 gram biji alpukat dilakukan pengirisan dan pengeringan. Semakin kecil ukuran bahan maka proses pengeringan akan semakin cepat. Pengeringan menggunakan *oven* dengan suhu 40°C selama 24 jam untuk membuang kandungan air di dalam biji alpukat. Setelah dikeringkan, digiling dengan mesin penggiling dan kemudian diayak dengan ayakan 100 mesh. Hasilnya berupa serbuk biji alpukat 100 mesh sebanyak 100 mg dengan konsentrasi 100%. Untuk konsentrasi 5%, 5mg serbuk biji alpukat dicampur dengan 95ml aquades steril. Konsentrasi 10%, 10mg serbuk biji alpukat dicampur dengan 90ml aquades steril. Konsentrasi 15%, 15mg serbuk biji alpukat dicampur dengan 85ml aquades steril.

Jumlah sampel yang digunakan adalah 25 ekor. Dibagi dalam 5 kelompok perlakuan dengan 5 ulangan. Pada hari perlakuan, bulu yang terdapat pada punggung masing-masing mencit dicukur (diameter \pm 15 mm). Semua mencit (25 ekor) ditimbang dan dibagi menjadi 5 kelompok secara acak seperti pada tabel 1. Kemudian disuntikkan suspensi *E. coli* pada punggung mencit yang sudah

dicukur dengan konsentrasi 10^5 sebanyak 0,01cc. Pada setiap kelompok diberi perlakuan selama 7 hari, masing-masing kelompok diberikan dosis 0,5ml dua kali sehari per oral.⁹ Kemudian diambil sampel darah pada hari ke-1, ke-3, dan ke-7, pengambilan sampel darah tepi dilakukan dengan melukai ujung ekor mencit dengan skalpel. Serbuk biji alpukat diberikan setiap hari dengan prosedur yang sama seperti perlakuan hari ke-1 (sampai hari ke-7).

Setelah pembuatan sediaan hapusan darah, dilakukan pewarnaan *Wright's stain*, kemudian dilanjutkan dengan penghitungan PMN neutrofil. Untuk mendapatkan *counting area*, sediaan hapusan diamati dengan menggunakan mikroskop binokuler dengan pembesaran 400 kali. Kemudian diletakkan satu tetes minyak emersi pada sediaan yang akan diperiksa. Jumlah PMN neutrofil tiap 100 leukosit dapat diamati dan dihitung dengan pembesaran 1000 kali. Jumlah PMN neutrofil didapatkan dengan menjumlahkan *stab* dengan segmen neutrofil.¹⁰

Sebelum dilakukan uji analisis statistik harus dilakukan uji normalitas P-P Plot dan uji homogenitas Levene. Apabila dari kedua uji menunjukkan hasil yang bermakna ($p > 0,05$), maka dilakukan uji statistik parametrik yaitu uji Two Way Anova dan dilanjutkan dengan uji LSD.

Hasil

Jumlah PMN neutrofil didapat dengan menghitung setiap 100 leukosit dengan cara menjumlahkan *stab* dan segmen neutrofil. Dari hasil penelitian yang dilakukan diperoleh data jumlah rata-rata PMN Neutrofil pada masing-masing kelompok seperti tampak tabel 1.

Tabel 1. Jumlah Rata-Rata PMN Neutrofil Darah Tepi Mencit Jantan yang Diinduksi dengan *E. Coli*

Sampel	Nilai	Jumlah PMN Neutrofil Hari ke		
		1	3	7
Kontrol negatif	Rata-rata	56,4	62,0	52,6
	SD	4,39	2,73	5,03
Kontrol positif	Rata-rata	66,6	74,8	66,2
	SD	2,70	3,11	1,4832
Serbuk Biji Alpukat 5%	Rata-rata	65,6	65,4	60,6
	SD	2,41	3,91	1,67

Keterangan:

A1 : Kontrol – hari pertama
B1 : Kontrol + hari pertama
C1 : Serbuk biji alpukat 5% hari pertama
D1 : Serbuk biji alpukat 10% hari pertama

A3 : Kontrol – hari ketiga
B3 : Kontrol + hari ketiga
C3 : Serbuk biji alpukat 5% hari ketiga
D3 : Serbuk biji alpukat 10% hari ketiga

E1 : Serbuk biji alpukat 15% hari pertama
A7 : Kontrol – hari ketujuh
B7 : Kontrol + hari ketujuh
C7 : Serbuk biji alpukat 5% hari ketujuh

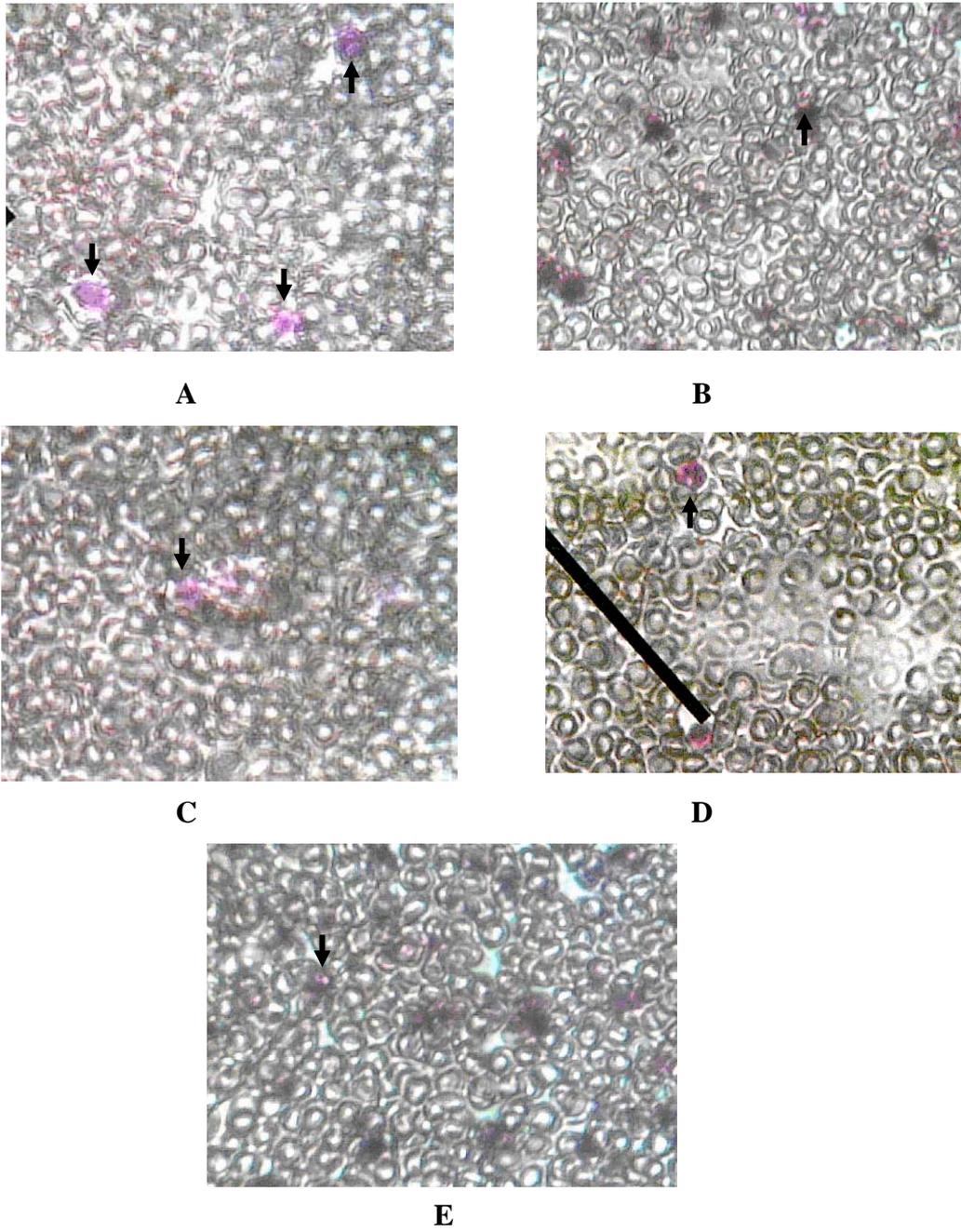
E3 : Serbuk biji alpukat 15% hari ketiga
D7 : Serbuk biji alpukat 10% hari ketujuh
E7 : Serbuk biji alpukat 15% hari ketujuh
Per:Perlakuan

Kelompok perlakuan serbuk biji alpukat 5% hari pertama dibandingkan dengan kelompok perlakuan serbuk biji alpukat 5% hari ketiga tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p>0.05$), dimana jumlah PMN neutrofil kelompok perlakuan serbuk biji alpukat 5% hari ketiga lebih kecil, berarti bahwa terjadi penurunan jumlah PMN neutrofil pada kelompok perlakuan serbuk biji alpukat 5% hari ketiga. Kelompok perlakuan serbuk biji alpukat 5% hari pertama dibandingkan dengan kelompok kontrol positif hari ketujuh tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p>0.05$).

Kelompok perlakuan serbuk biji alpukat 10% hari pertama dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif hari ketiga, kelompok perlakuan serbuk biji alpukat 10% ketiga, kelompok perlakuan serbuk biji alpukat 5% hari ketujuh, dan kelompok perlakuan serbuk biji alpukat 10% hari ketujuh tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p>0.05$). Kelompok perlakuan serbuk biji alpukat 15% hari pertama dibandingkan dengan kelompok kontrol positif hari ketiga dan kelompok perlakuan serbuk biji alpukat 15% hari ketujuh

tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p>0.05$),

Kelompok kontrol negatif hari ketiga dibandingkan dengan kelompok perlakuan serbuk biji alpukat 10% hari ketiga dan kelompok perlakuan serbuk biji alpukat 5% hari ketujuh tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p>0.05$). Kelompok kontrol positif hari ketiga dibandingkan dengan kelompok perlakuan serbuk biji alpukat 15% hari ketujuh tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p>0.05$). Kelompok perlakuan serbuk biji alpukat 5% hari ketiga dibandingkan dengan kelompok kontrol positif hari ketujuh tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p>0.05$). Kelompok perlakuan serbuk biji alpukat 10% hari ketiga dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif hari ketujuh, kelompok perlakuan serbuk biji alpukat 10% hari ketujuh tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p>0.05$). Kelompok kontrol negatif hari ketujuh dibandingkan dengan kelompok perlakuan serbuk biji alpukat 10% hari ketujuh tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p>0.05$).



Gambar 1. Gambaran PNM neutrofil secara mikroskopik (1000x)

Keterangan:

A = Kontrol negatif hari ke-3

D = Serbuk biji alpukat 10% hari ke-3

B = Kontrol positif hari ke-3

E = Serbuk biji alpukat 15% hari ke-3

C = Serbuk biji alpukat 5% hari ke-3

Pembahasan

Dalam sistem pertahanan tubuh, PMN neutrofil merupakan fagosit utama terhadap bakteri ekstraseluler. Pada hari pertama mulai terjadi peradangan akut yang merupakan respons dini terhadap agen jejas, hanya berlangsung beberapa jam sampai beberapa hari. Pada jam pertama atau jam-jam berikutnya setelah peradangan dimulai, sejumlah besar neutrofil dari darah mulai menginvasi area yang meradang. Pada hari ketiga ini merupakan fase radang akut. Radang akut merupakan respons yang pertama kali terhadap agen peradangan dengan mengeluarkan mediator-mediator pertahanan *host* (leukosit dan protein plasma) pada daerah peradangan, sehingga karena ingin melihat apakah terjadi penurunan atau peningkatan mediator-mediator pertahanan *host* seperti PMN neutrofil maka diambil sampel darah mencit pada hari ketiga ini. Sedangkan pada hari ketujuh memasuki peradangan kronis.. Gambaran mikroskopis radang kronis antara lain banyak ditemukan infiltrasi seluler (limfosit, sel plasma, makrofag), beberapa eosinofil polimorfonuklear, neutrofil polimorfonuklear dalam jumlah sedikit. Dengan pemberian serbuk biji alpukat dengan konsentrasi 5%, 10% dan 15% yang diduga memiliki efek antiradang, diharapkan dapat menurunkan jumlah PMN neutrofil pada peradangan.¹¹⁻¹³

Induksi *E. coli* pada kelompok kontrol positif, kelompok perlakuan serbuk biji alpukat 5%, 10%, dan 15% dapat menimbulkan radang. *E. coli* merupakan bakteri gram negatif, dimana salah satu komponen penyusun dinding selnya adalah Lipopolisakarida (LPS), yang dikenal sebagai endotoksin. Endotoksin memiliki sifat toksik dan antigenik, sehingga *E. coli* dapat menimbulkan radang, dengan mengeluarkan mediator-mediator kimiawi seperti histamin, serotonin, prostaglandin, dan bradikinin. Mediator-mediator ini akan merangsang emigrasi leukosit seperti PMN neutrofil untuk diapedesis dan merangsang regenerasi atau pergantian sel-sel yang rusak atau terdapat juga proliferasi leukosit. Pemberian *E. coli* inilah yang dapat meningkatkan jumlah PMN neutrofil pada kelompok yang diinduksi *E. Coli*.⁸

Adanya perlakuan pada ekor mencit pada saat pembuatan sediaan hapusan darah dapat memicu peningkatan jumlah PMN neutrofil pada semua kelompok. Hal ini juga dapat terjadi pada

kelompok kontrol negatif, yang meskipun tidak diberi *E. coli* tetap meningkat di hari ketiga. Pada hari ketiga ini merupakan fase radang akut, yang merupakan respons yang pertama kali terhadap agen peradangan dengan mengeluarkan mediator-mediator pertahanan *host* (leukosit dan protein plasma) pada daerah peradangan.¹¹

Zat-zat yang terkandung didalam ekstrak etanol biji alpukat adalah senyawa polifenol, flavonoid, triterpenoid, kuinon, saponin, tanin, monoterpenoid, dan seskuiterpenoid. Sifat antiradang dari flavonoid telah terbukti baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Mekanisme flavonoid dalam menghambat terjadinya radang melalui dua cara, yang pertama menghambat pelepasan asam arakidonat dan sekresi enzim lisosom dari sel neutrofil dan sel endotelial, dan yang kedua menghambat fase proliferasi dan fase eksudasi dari proses radang. Terhambatnya pelepasan asam arakidonat dari sel radang akan menyebabkan kurang tersedianya substrat arakidonat bagi jalur siklooksigenase dan jalur lipooksigenase, yang pada akhirnya akan menekan jumlah prostaglandin, prostasiklin, endoperoksida, tromboksan di satu sisi dan asam hidroperoksida, asam hidroksieikosatetraenoat, leukotrien di sisi lainnya.^{3,4}

Berbagai teori menyebutkan bahwa tanin mempunyai efek antiseptik, memiliki sifat sebagai pengikat ion logam seperti Fe. Pada infeksi, tanin mampu menghambat perkembangbiakan mikroorganisme dengan mengikat Fe. Mikroorganisme yang menginvasi dapat memanfaatkan Fe dalam tubuh *host* untuk proses multiplikasi mereka. Sedangkan tanin, yang memiliki sifat sebagai pengikat ion logam (*metal ion chelator*), mengikat Fe, sehingga bakteri tidak dapat bermultiplikasi. Tanin mampu mempengaruhi respons peradangan dengan aktivitasnya yang menghilangkan radikal bebas. Sebagai contoh, *nitric oxide* (NO), radikal bebas yang diproduksi oleh *nitric oxide synthase* berperan sebagai *second messenger* selama proses peradangan. *Inducible nitric oxide synthase* (iNOS), diproduksi sebagai respons pada berbagai sitokin peradangan begitu juga dengan *lipopolysaccharide* (LPS). iNOS merangsang produksi dari NO yang kemudian merangsang peradangan selanjutnya. Diperkirakan bahwa mekanisme tanin menghambat *inflammatory maker* mungkin dengan oksidasi dari tanin dan reduksi dari *radical oxidation species* yang termasuk radikal bebas.

Selain itu, *Pentagalloyl Glucose* (PGG), salah satu dari *gallotannin* (*Hydrolyzable tannin*), juga dapat menghambat Prostaglandine 2 (PGE2) yang berperan sebagai mediator radang.^{14, 15}

Adanya kandungan flavonoid, senyawa monoterpenoid, polifenol dan tanin dalam serbuk biji alpukat inilah yang mungkin dapat menurunkan jumlah PMN neutrofil pada kelompok perlakuan serbuk biji alpukat 5% dan kelompok perlakuan serbuk biji alpukat 10%. Mungkin juga karena konsentrasi serbuk biji alpukat 10% memiliki kandungan zat aktif lebih banyak daripada 5%, sehingga konsentrasi 10% lebih efektif daripada 5%. Namun setiap pemberian obat dalam dosis yang tinggi dapat menunjukkan efek toksik, mungkin hal inilah penyebab konsentrasi 15% jumlah PMN neutrofil sangat meningkat dibandingkan dengan kontrol negatif. Konsentrasi yang diberikan terlalu besar dapat menyebabkan efek toksisitas dalam tubuh mencit, dimana diketahui bahwa tanin dalam jumlah besar mampu menyebabkan iritasi pada jaringan. Selain itu bisa juga disebabkan pada saat pemberian serbuk biji alpukat 15% dengan menggunakan sonde lambung, larutan serbuk biji alpukat 15% tidak semuanya masuk ke dalam tubuh mencit. Hal ini mungkin terjadi karena semakin tinggi konsentrasi serbuk biji alpukat maka semakin kental, jadi semakin sulit pemberiannya yang mengakibatkan banyak serbuk biji alpukat yang tertinggal di dalam sonde lambung; sehingga dapat mengurangi dosis yang diberikan pada mencit dan efek yang ditimbulkan tidak maksimal.

Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa serbuk biji alpukat konsentrasi 5% dan 10% mampu menurunkan jumlah PMN neutrofil pada mencit yang diinduksi bakteri *E. coli*. Lama pemberian serbuk biji alpukat 5% dan 10% pada hari ketiga mempengaruhi jumlah PMN neutrofil pada mencit jantan yang diinduksi *E. coli*. Konsentrasi serbuk biji alpukat 10% yang paling efektif menurunkan jumlah PMN neutrofil terutama hari ketiga pada mencit jantan yang diinduksi *E. coli*.

Daftar Pustaka

1. Farm, A. 2005. Durian, Jeruk, Jambu Biji, Jambu Air, Duku, Blimbing, Apel, Anggur, Alpukat. <http://arisman.co.id> [16 November 2005].
2. Yuniarti, T. 2008. Ensiklopedia Tanaman Obat Tradisional. Yogyakarta: MedPress. Hal: 3–25.
3. Zuhrotun, A. 2007. *Aktivitas Antidiabetes Ekstrak Etanol Biji Buah Alpukat (Persea americana mill) Bentuk Bulat*. Tesis. Bandung : Program Pascasarjana Universitas Padjadjaran. Hal: 12.
4. Sabir, A. 2003. Pemanfaatan Flavonoid di Bidang Kedokteran Gigi. *Majalah Kedokteran Gigi (Dental Journal)*, Edisi Khusus Temu Ilmiah Nasional III: 81-87.
5. Yuwono, B., Syafriadi, M., dan Novita, M. 2001. *Buku Ajar Bedah Mulut II*. Jember : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Hal : 90-178.
6. Prince, S. A. dan Wilson, L. M. 1995. *Patofisiologi Konsep Klinik Proses-Proses Penyakit Edisi 2 bagian 1*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC. Hal : 34-44.
7. Robbins dan Kumar. 1995. *Buku Ajar Patologi I, Edisi 4*. Jakarta : EGC. Hal: 28-52.
8. Jawetz, Melnick, dan Adelberg's. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran (Medical Microbiology) Buku 1*. Jakarta : Salemba Medika. Hal : 352.
9. Indahyani, D. E., dkk. 2008. *Buku Petunjuk Praktikum Biologi Mulut II*. Jember : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Hal: 4, 14-15.
10. Wirawan, R., dkk. 1996. *Pemeriksaan Laboratorium Hematologi Sederhana, Edisi I*. Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Hal : 29-36.
11. Guyton, A. C. dan Hall, J. E. 1997. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran, Edisi 9*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC. Hal : 249.
12. Lawler, W., Ahmed, A., dan William, J., H. 2002. *Buku Pintar Patologi Untuk Kedokteran Gigi*. Jakarta : EGC. Hal : 9-11.
13. Robbins, S. dan Kumar, V. 2004. *Buku Ajar Patologi, Edisi 7, Volume 2*. Jakarta : EGC. Hal : 638.
14. Robinson T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Edisi keenam. Bandung : Penerbit ITB. Hal : 71-72.
15. Brock, J.H. dan Tryfonia M. Fowler. 1986. *Iron and Immunity*. Glasgow : University department of bacteriology and immunology. Hal : 305-306.

