



Pengaruh Ekstrak Daun Ceremai (*Phyllanthus acidus* [L.] Skeels) terhadap Kadar IgE pada Mencit Model Alergi

The Effect of Phyllanthus Acidus [L.] Skeels Leaf Extract on IgE Level in Mice Model of Allergy

AA Subijanto¹ dan Diding HP^{1,2}

¹Sebelas Maret University, School of Medicine, Solo

²Immunology Division of Biomedic Laboratory, Sebelas Maret University, School of Medicine, Solo

KEYWORDS *Phyllanthus Acidus; leaf extract; Ig E; allergic condition*

ABSTRACT *It was reported in previous studies that pharmacological activities were identified in various compounds extracted from Phyllanthus Acidus (PA) such as anti-inflammatory, anti-lipoxygenase, anti-allergic and cyclooxygenase inhibitor. It is also acknowledged that Ig E serum level is normally low and usually increase in allergic conditions. This study was aimed to determine the effect of PA leaf extract on Ig E level in mice model of allergic asthma. Male Balb/C mice were sensitized and challenged intraperitoneally (i.p) with ovalbumin (OVA). Mice were immunized i.p. on days 4 and 20 with 2.5 mg of OVA adsorbed to 7.75 ml of Aluminum hydroxide gel. OVA challenges (10 mg in 10 ml of PBS) were administered aerosolly on days 26, 29, 32, 39 and 46, with mice being sacrificed on day 47. Ig E level in serum was determined using ELISA kits (Alpha Diagnostic, USA) according to the manufacturer's instructions. A one-way analysis of variance (ANOVA) with LSD post hoc analysis was used to determine significant differences. Results were expressed as mean \pm SEM, and values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. The results showed that Ig E level in the negative control group was 50.13 ± 33.40 ng/ml, PA leaf extract was 51.17 ± 26.15 ng/ml, and positive control group was 48.97 ± 33.50 ng/ml while OVA group was 152.89 ± 58.00 ng/ml ($p > 0.05$). It was concluded that PA leaf extract could minimize Ig E level, not significantly different with 3rd generation of antihistamine.*

Salah satu tipe reaksi hipersensitivitas adalah reaksi tipe I yang juga disebut reaksi alergi, yang timbul segera setelah terpapar alergen (Baratawidjaja, 2004). Dalam serum Ig E ditemukan dalam kadar rendah dan akan meningkat pada penyakit alergi seperti asma, rinitis alergi dan dermatitis atopi (Herrick and Bottomly, 2003). Sel CD4⁺ Th2 dan produknya terlihat berperan penting dalam proses ini (Renz, 2001; Elias *et al.*, 2003). Sel CD4⁺ tipe Th2 dipercaya berperan dalam terjadinya perkembangan penyakit asma, mencakup eosinophilia di paru, hipersekresi mukus, hiperplasi sel mast, dan reaksi hiper-responsif dari bronkhus (Blease *et al.*, 2000; Temann, 2002; Abbas and Lichtman, 2003; Greenfeder *et al.*, 2001). Hal ini terlihat pada penderita asma jumlah sel CD4⁺ Th2 lebih tinggi secara signifikan dibandingkan kontrol, sebaliknya jumlah sel CD4⁺ Th1 tidak berbeda. Peran penting dari respon sel CD4⁺ Th2 terhadap antigen adalah dengan diproduksinya Ig E dan berkembangnya eosinofil pada proses alergi (Laouini *et al.*, 2003).

Dengan meningkatnya produksi Ig E maka akan terjadi peningkatan aktivasi, degranulasi dan pelepasan produk oksidatif maupun protein yang terkandung di dalam granula sel mast yang akan mengakibatkan pelepasan lipid mediator dan protein vasoaktif. Pergerakan dari produk sitotoksik ini dapat mengakibatkan perusakan jaringan yang lebih luas dan peningkatan akumulasi sel inflamasi (Blease *et al.*, 2000; Abbas and Lichtman, 2003; Janeway *et al.*, 2005).

Ceremai termasuk salah satu tanaman obat unggulan Indonesia, hal ini dapat dilihat dari manfaat serta efektivitas tanaman obat tersebut dalam menyembuhkan beberapa penyakit, termasuk penyakit asma alergi (Anonim, 2006; Dalimartha, 1999). Berdasarkan penelitian kimiawi diketahui bahwa ceremai merupakan tumbuhan yang kaya dengan

Correspondence:

DR. dr. AA. Subijanto, MS, Sebelas Maret University School of Medicine, Solo, Jalan Ir. Sutami 36A, Surakarta 57126, Telephone and Facsimile: (0271) 664178

berbagai kandungan kimia, antara lain flavonoid, tanin dan saponin (Dalimartha, 1999). Hasil beberapa penelitian menyatakan bahwa flavonoid dapat berfungsi sebagai hepatoprotektor, antiinflamasi maupun antihistamin (Winaryo, 2003). Disamping itu flavonoid mampu menghambat fosfodiesterase, aldoreduktase, monoamine oksidase, protein kinase, DNA polimerase, lipoksigenase (Paul *et al.*, 2002; Lans *et al.*, 2001). Flavonoid dapat meningkatkan sistem imun, baik sistem imun yang alamiah (*innate*) dan sistem imun spesifik (*adaptive*) (Guntur, 2004), yang dapat digunakan sebagai antiinflamasi, antialergi, anti-diabetes dan menghambat pertumbuhan tumor.

Dalam peristiwa degranulasi mastosit dilepaskan mediator jenis kedua melalui penglepasan asam arakidonat dari molekul-molekul fosfolipid membrannya. Asam arakidonat merupakan substrat untuk enzim siklooksigenase dan lipoksigenase. Aktivasi lipoksigenase akan menghasilkan leukotrien (C, D dan E) yang sebelumnya disebut SRS-A (*Slow Reactive Substance of Anaphylaxis*). Kesemua mediator tersebut berefek mengecilkan trakhea dan saluran pernafasan lain, kontraksi otot polos dan meningkatkan permeabilitas pembuluh darah. Obat yang bisa menghambat prostaglandin maupun leukotrien tentu akan lebih poten menekan proses inflamasi (Funk, 2001).

Berdasarkan hasil penelitian Burgos *et al.* (2000) diketahui bahwa flavonoid mampu menghambat influx Ca^{2+} . Oleh karena itu daun ceremai yang mempunyai kandungan flavonoid tentu akan mampu untuk mencegah terjadinya degranulasi dari sel mast. Dengan dihambatnya degranulasi sel mast maka sekresi amin vasoaktif, seperti histamin, mediator lipid serta sitokin yang berperan dalam proses inflamasi pada peristiwa alergi akan dikurangi pula.

Daun ceremai secara empiris telah digunakan sebagai obat asma dalam bentuk jamu yang belum dibuktikan secara ilmiah (Dalimartha, 1999). Bahan yang bisa digunakan untuk pengobatan adalah buah dan daunnya, sedangkan akar ceremai tidak dianjurkan karena beracun (Dalimartha, 1999; Duke, 2007). Penelitian ini bertujuan untuk menentukan pengaruh Ekstrak Daun Ceremai terhadap kadar Ig E serum model mencit asma alergi.

BAHAN DAN CARA KERJA

1. Hewan uji

Untuk penelitian ini disiapkan hewan coba berupa 20 ekor mencit Balb/C jantan model alergi, dengan berat badan \pm 17-20 gram. Mencit Balb/C diperoleh dari Unit Pengembangan

Hewan Percobaan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Pakan berupa pelet sebanyak 15-20 gr diberikan satu kali sehari dan minuman yang digunakan adalah air PAM sebanyak 15-30 ml satu kali sehari. Dosis pemberian pakan dan minum tidak dibedakan antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

2. Bahan tanaman

Ekstrak daun ceremai diperoleh dari daun ceremai yang dikeringkan, dihaluskan, dan kemudian diekstraksi dengan cairan penyari etanol 70%. Ekstraksi dilakukan dengan metode soxhletasi, ekstrak dibuat di Balai Penelitian Tanaman Obat (BPTO), Tawangmangu.

3. Perlakuan hewan uji

Semua hewan coba diadaptasikan selama 7 hari di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran UNS, kemudian dikelompokkan menjadi empat kelompok, masing-masing kelompok 5 ekor. Kelompok kedua disensitisasi dan diberikan ekstrak daun ceremai per-oral dengan dosis 10 mg/mencit/hari, kelompok ketiga sebagai kontrol positif (KP) disensitisasi dan diberikan antihistamin generasi III (fexofenadine) per-oral dengan dosis 0.02 mg/mencit/hari, kelompok keempat hanya disensitisasi ovalbumin (OVA). Sedangkan kelompok pertama tanpa diberi perlakuan sebagai kontrol negatif (KN),

4. Sensitisasi hewan coba

Untuk membuat mencit Balb/C model alergi, dilakukan imunisasi mencit secara *i.p* pada hari ke-4 dengan 0,15 cc OVA (grade V; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) dalam aluminium hidroksida (Sigma-Aldrich)/mencit dari 2,5 mg OVA yang dilarutkan pada 7,75 ml aluminium hidroksida. Pada hari ke-20 dipapar lagi dengan 0,15 cc OVA dalam PBS/mencit secara *i.p* dari 2,5 mg yang dilarutkan pada 10 ml PBS. Pemaparan OVA aerosol berupa nebuliser cairan OVA (10 mg OVA dalam 10ml PBS) menggunakan CompMist™ Compressor nebuliser (Mabis Healthcare Inc, USA) yang digerakkan kompresor udara dengan *flow rate* 6 L/min. Pemaparan OVA aerosol diberikan pada hari ke-26, 29, 32, 39 dan 46 (Diding *et al.*, 2007a,b).

5. Penentuan kadar Ig E

Setelah 24 jam akhir pemaparan OVA, mencit diambil darahnya melalui sinus orbitalis untuk kemudian serum diperiksa dengan Kit Elisa Ig E sesuai dengan protokol yang sudah di-

anjurkan dari pabriknya (Pharmingen, San Diego, California, USA). Penelitian dilakukan di Laboratorium Histologi dan Biomedik Fakultas Kedokteran UNS Surakarta.

6. Analisis data

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji Anova dan dilanjutkan dengan *Post hoc test* menggunakan program SPSS for Windows Release 11.5.

HASIL

Setelah dilakukan perlakuan selama 47 hari, kadar Ig E serum mencit Balb/C dari tiap-tiap hewan coba keempat kelompok diukur. Hasilnya dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kadar rerata Ig E serum mencit Balb/C setelah perlakuan (ng/mL)

Kelompok Perlakuan	Rerata ± SD
KN	50.13±33.40
C	51.17±26.15
KP	48.97±33.50
OVA	152.89±58.00

Keterangan: SD= standar deviasi, KN= kontrol negatip, KP= kontrol positif dengan pemberian anti-histamin, OVA= ovalbumin, C= ekstrak daun ceremai

Dari Tabel 1 terlihat bahwa pada kelompok OVA kadar Ig E sangat tinggi. Hal ini memperlihatkan sensitisasi OVA mampu meningkatkan kadar Ig E ($p = 0.006$ atau $p < 0.05$), yang berarti ada perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan pada $\alpha = 0.05$ (Tabel 2).

Tabel 2. Uji Anova satu jalur kadar Ig E serum

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	31711.624	3	10570.541	6.728	.006*
Within Groups	18853.790	12	1571.149		
Total	50565.414	15			

Keterangan: * = $p < 0.05$: ada perbedaan bermakna pada $\alpha = 0.05$, df = *degree of freedom* F = nilai F hitung, Sig. = *significant*

Untuk mengetahui letak perbedaan, maka uji statistik dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Difference*). Dari hasil uji LSD, didapatkan adanya perbedaan kadar Ig E serum mencit Balb/C antar kelompok perlakuan. Perbedaan bermakna terlihat

antara KN dengan OVA ($p = 0.003$), sedangkan antara KN dengan KP dan C diperoleh harga $p = 0.968$ dan $p = 0.971$ yang berarti tidak ada perbedaan yang bermakna (Tabel 3).

Tabel 3. Uji LSD kadar Ig E serum

Jenis Perlakuan		<i>significant</i>
kontrol negatip	kontrol positif	.968
	Ovalbumin	.003
	Ekstrak daun ceremai	.971
kontrol positif	kontrol negatip	.968
	Ovalbumin	.003
	Ekstrak daun ceremai	.939
Ovalbumin	kontrol negatip	.003
	kontrol positif	.003
	Ekstrak daun ceremai	.003
Ekstrak daun ceremai	kontrol negatip	.971
	kontrol positif	.939
	Ovalbumin	.003

*The mean difference is significant at the 0.05 level.

PEMBAHASAN

Percobaan ini menggunakan mencit jantan untuk mengurangi variasi biologis. Antihistamin generasi III (fexofenadine) digunakan sebagai pembandingan dengan pertimbangan bahwa antihistamin generasi III mempunyai efek sebagai antialergi dan antiinflamasi.

Alergi adalah suatu keadaan hipersensitivitas yang diinduksi oleh paparan terhadap suatu antigen tertentu yang menimbulkan reaksi imunologi yang berbahaya pada paparan berikutnya (Dorland, 2002; Abbas and Lichtman, 2003). Asma merupakan salah satu model penyakit alergi inflamasi, yang ditandai dengan adanya respon yang berlebihan dan inflamasi kronik dari saluran nafas (Abbas and Lichtman, 2003). Seperti diketahui bahwa Ig E teridentifikasi sebagai molekul kunci yang bertindak sebagai mediator reaksi hipersensitivitas tipe-1 (asma alergi, rhinitis alergi, alergi makanan, dermatitis atopi, berbagai bentuk alergi obat dan alergi terhadap serangga), dimana Ig E ini sangat berhubungan dengan alergen dan asma. Asma selalu berhubungan dengan reaksi yang berkenaan dengan Ig E, karena merupakan dasar dari reaksi alergi (Platts-Mills, 2001). IgE mempunyai waktu paruh sangat pendek (< 1 hari) dan konsentrasinya pada sirkulasi sangat rendah, kebanyakan lebih rendah dibandingkan Ig lainnya (Pauwels *et al.*, 1997). Hal ini disebabkan adanya perusakan di endosom (di endosom IgG di lindungi oleh Fc γ Rn). Meskipun dalam sirkulasi konsentrasinya rendah, tetapi IgE mempunyai aktivitas biologis yang ekstrem. Hal ini disebabkan karena antibodi IgE terikat pada reseptor yang memiliki afinitas tinggi pada permukaan sel mast / basofil (Platts-Mills, 2001).

Pemaparan OVA akan memicu *antigen presenting Cells* (APCs). OVA oleh APCs akan didegradasi menjadi peptida-peptida untuk selanjutnya dipresentasikan ke sel CD4+. OVA inhalasi akan meningkatkan sel limfosit CD4+ untuk mensekresikan interleukin yang akan meningkatkan derajat inflamasi pada saluran nafas (Kawakami and Kitaura, 2005). Sel CD4+ mengatur respon imun terhadap protein asing dengan mensekresikan sitokin seperti interleukin dan IFN. Sel CD4+ dapat dikategorikan menjadi Th0, Th1, Th2 berdasarkan produk yang dihasilkannya. Sel Th2 mengawali terjadinya proses respon alergi tipe cepat dengan melepaskan sitokin-sitokin, terutama IL-4 dan IL-5, yang akan menginduksi produksi Ig E, menstimulasi eosinofilopoiesis, mengatur fungsi eosinofil dan meningkatkan pertumbuhan sel mast tipe-mukosa.

Sebaliknya sel Th1 utamanya dilibatkan pada hipersensitivitas tipe lambat dan menghambat proses yang dikendalikan oleh sel Th2 (Platts-Mills, 2001). Penyakit asma ditandai oleh adanya peningkatan jumlah sel Th2 dan sitokin Th2 serta terjadinya penurunan jumlah sel Th1 dan sitokin dari Th1. Histamin memainkan peran yang sangat penting pada patogenesis asma atopi melalui pengaturan diferensiasi limfosit sel Th. Histamin meningkatkan sekresi sitokin Th2, seperti IL-4, IL-5, IL-10 dan IL-13 dan sebaliknya menghambat produksi sitokin Th1 IL-2, IL-12 dan interferon- γ (IFN- γ). Histamin juga dapat memodulasi jaringan sitokin melalui peningkatan pengaturan prostaglandin E2 (PGE2) dan nitrik oksid (NO) (Packard & Khan, 2003). Ekspresi IL-4 seringkali memberikan petunjuk adanya produksi Ig E dan inflamasi alergi yang diakibatkan oleh adanya sitokin-sitokin yang diproduksi sel Th2, termasuk asma yang diinduksi alergen, *rhinitis* dan *anaphylaxis*. Sitokin Th2 akan meningkatkan terjadinya penyakit alergi melalui berbagai mekanisme. IL-4 dan juga IL-13 akan menginduksi sel B untuk berdiferensiasi menjadi sel mast dan memproduksi Ig E. Ig E sangat berperan dalam perkembangan terjadinya reaksi alergi (Li-Weber & Krammer, 2003; Cookson, 2004). Dari hasil penelitian terlihat pemberian OVA mampu meningkatkan kadar Ig E serum (Tabel 1). Hasil ini sesuai dengan penelitian Pauwels *et al.*, 1997, bahwa pemberian OVA mampu meningkatkan produksi Ig E. Jika dibandingkan dengan kelompok kontrol perbedaannya sangat bermakna ($p=0.003$) (Tabel 3).

Pemberian ekstrak daun ceremai dosis 10mg/mencit/hari secara per-oral mampu menurunkan kadar Ig E (Tabel 1), secara bermakna mendekati harga normal (Tabel 3). Kemampuan ekstrak daun ceremai dalam menurunkan kadar Ig E tidak berbeda secara bermakna dibandingkan antihistamin generasi III (Tabel 3). Hasil ini sesuai dengan Lans *et al.* (2001) bahwa *Phyllanthus* mempunyai efek farmakologis sebagai antiinflamasi, antialergi, *phosphorilase* dan *tyrosine kinase inhibitor* dan *cyclooxygenase inhibitor*.

Dengan kemampuannya sebagai penghambat *phosphorilase* dan *tyrosine kinase*, ekstrak daun ceremai akan mampu menekan produksi sitokin-sitokin proinflamasi sehingga akan menurunkan kadar Ig E. Disamping itu kemampuannya sebagai *cyclooxygenase inhibitor* akan mengurangi produksi mediator-mediator proinflamasi, yang pada akhirnya akan memberikan umpan balik ke jalur HPA-axis sehingga produksi Ig E mampu ditekan (Kawakami and Galli, 2002; Lans *et al.*, 2001). Hal ini diperkuat dari hasil penelitian bahwa asam askorbat mempunyai kemampuan sebagai antiasma, antihistamin dan

antiinflamasi, *niacin* yang terkandung dalam ceremai mempunyai kemampuan sebagai antihistamin dan *beta-carotene* mempunyai kemampuan sebagai asma (Duke, 2007). Sementara itu kalsium mampu menghambat influx Ca^{2+} (Burgos *et al.*, 2001; Duke, 2007), sehingga ekstrak daun ceremai memiliki kemampuan untuk mencegah terjadinya degranulasi sel mast. Dengan dihambatnya degranulasi sel mast maka sekresi amin vasoaktif, seperti histamin, mediator lipid serta sitokin yang berperan dalam proses inflamasi pada peristiwa asma alergi akan dikurangi pula. Histamin memainkan peran yang sangat penting pada patogenesis asma atopi melalui pengaturan diferensiasi limfosit sel $CD4^+$ Th (Blease *et al.*, 2001; Abbas and Lichtman, 2003; Janeway *et al.*, 2005).

Mekanisme kemampuan ekstrak daun ceremai dalam reaksi alergi, masih memerlukan penelitian-penelitian lebih lanjut sehingga diharapkan ekstrak daun ceremai ini bisa digunakan sebagai obat herbal terstandar dan bahkan bisa dikembangkan menjadi obat golongan imunofitofarmaka. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak daun ceremai mampu menurunkan kadar Ig E serum. Jika dibandingkan dengan Antihistamin Generasi III kemampuan ekstrak daun ceremai dalam menurunkan kadar Ig E serum tidak berbeda bermakna.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dirjen Dikti, Depdiknas yang telah mendanai penelitian ini dengan kontrak no. 017/SP3/PP/DP2M/II/2006 tanggal 1 Februari 2006.

KEPUSTAKAAN

Abbas AK and Lichtman AH 2003. *Cellular and Molecular Immunology*. Elsevier Science, USA, pp : 264, 443 - 8.
 Anonim 2006. Ceremai. <http://www.roemahherba.net>.
 Baratawidjaja KG 2004. *Imunologi dasar*. ed-6. FKUI. Jakarta.
 Blease K, Lukacs NW, Hogaboam CM and Kunkel SL 2000. Chemokines and their role in airway hyper-reactivity. *Respir Res.*; 1(1): 54-61.
 Burgos RA, Imilan M, Sanchez NS, Hancke JL 2000. Andrographis paniculata (Nees) selectively blocks voltage-operated calcium channels in rat vas deferens. *J Ethnopharmacol*. 71(1-2):115-121
 Cookson W 2004. The Immunogenetics Of Asma And Eczema: A New Focus On The Epithelium. *Nature Reviews Immunology Vol 4 No 12*: 978-988.
 Dalimartha S 1999. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia Jilid 1*. Trubus Agriwidya, Anggota Ikapi, Jakarta.

Diding HP, Sarsono dan Sri Hartati H 2007a. *Aerosolized Ovalbumin Exposure Facilitates Changes in the Airway Histologic Pattern in Mouse*. Dipresentasikan pada Simposium Reuni Akbar Fakultas Kedokteran: 18 Maret 2007, Surakarta.
 Diding HP, Sarsono dan Martini 2007b. *Aerosolized Ovalbumin Exposure Facilitates Changes Serum Ig E Level in Mouse*. Dipresentasikan pada Simposium Reuni Akbar Fakultas Kedokteran: 18 Maret 2007, Surakarta.
 Dorland WA 2002. *Kamus Kedokteran Dorland*. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta, hal : 60
 Duke JA 2007. List of Chemicals of Phyllanthus acidus (L.) Skeels. In: Phyto-chemical and Ethnobotanical Databases. http://www.natrindex.com/duke_plant-G.html
 Elias JA, Lee CG, Zheng T, Ma B, Homer RJ and Zhu Z 2003. New insights into the pathogenesis of asthma. *J Clin Invest*. 111(3): 291-297.
 Funk CD 2001. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294: 1871-1875.
 Greenfeder S, Umland SP, Cuss FM, Chapman RW and Egan RW 2001. Th2 cytokines and asthma – The role of interleukin-5 in allergic eosinophilic disease. *Respir Res.* ; 2(2): 71-79.
 Guntur H 2004. *Phyllanthi Niruri dan Penggunaannya pada Sistem Imun*. Simposium Peralmuni Cab. Surakarta 15 Agustus 2004.
 Herrick CA and Bottomly K 2003. To Respond Or Not To Respond: T Cells In Allergic Asthma. *Nature Reviews Immunology* 3: 405-412.
 Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M, Shlomchik MJ 2005. *Immunobiology*. Edisi VI. Garland Science Publishing, USA.
 Kawakami T and Kitauro J 2005. Mast Cell Survival and Activation by IgE in the Absence of Antigen: A Consideration of the Biologic Mechanisms and Relevance. *The Journal of Immunology*, 175: 4167-4173.
 Kawakami T, Galli SJ 2002. Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nature Reviews Immunology*. 2(10):773-86.
 Lans C, Harper T, Georges H and Bridgewater E 2001. Medicinal and ethno-veterinary remedies of hunters in Trinidad. *BMC Complement Altern Med*. 1: 10.
 Laouini D, Alenius H, Bryce P, Oettgen H, Tsitsikov E and Geha RS 2003. IL-10 is critical for Th2 responses in a murine model of allergic dermatitis. *J. Clin. Invest*. 112:1058-1066.
 Li-Weber M and Krammer PH 2003. Regulation Of Il4 Gene Expression By T Cells And Therapeutic Perspectives. *Nature Reviews Immunology* 3: 534-543.
 Packard KA and Khan MM 2003. Effects of histamine on Th1/Th2 cytokine balance. *Int Immunopharmacol. Jul*: 3(7): 909-920.
 Paul KT, et al. 2002. Flavonoids from *Tephrosia aequilata*. *Phytochemistry* 60(4) : 375-379.
 Pauwels RA, Brusselle GJ and Kips JC 1997. Cytokine Manipulation in Animal Models of Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, Volume 156, Number 4, October: S78-S81
 Platts-Mills TAE 2001. The Role of Immunoglobulin E in Allergy and Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, Volume 164, Number 8, October: S1-S5
 Renz H 2001. Neurotrophins in bronchial asthma. *Respir Res.* ; 2(5): 265-268.
 Temann UA, Ray P and Flavell RA 2002. Pulmonary overexpression of IL-9 induces Th2 cytokine expression, leading to immune pathology. *J Clin Invest*. 109 (1): 29-39
 Winaryo WP 2003. *Sambiloto: Budi Daya dan Pemanfaatan untuk Obat*. Penebar Swadaya. Jakarta.