

## ACTIVE CUTANEOUS ANAPHYLAXIS-INHIBITORY ACTIVITY OF THE N-HEXANE EXTRACT OF *Morinda citrifolia* L. FRUITS IN HEPATITIS B VACCINE-INDUCED WISTAR RATS

### EFEK PENGHAMBATAN EKSTRAK N-HEKSANA BUAH MENKUDU (*Morinda citrifolia* L.) TERHADAP REAKSI ANAFILAKSIS KUTANEUS AKTIF PADA TIKUS WISTAR YANG DIINDUKSI VAKSIN HEPATITIS B

Ediati Sasmito\*, Agung Endro Nugroho and Yose V. Sagala  
Faculty of Pharmacy Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

#### ABSTRACT

*Noni (Morinda citrifolia L.) is one of medicinal plants that are commonly known for its medical treatment usage. Noni is reported for the pharmacological effects, including analgesic, antihypertensive and immunomodulator. This research aims to prove that the n-hexane extract of noni fruits can inhibit active cutaneous anaphylaxis reaction in male wistar rats induced hepatitis B vaccine. This research used an active cutaneous anaphylaxis method followed by histopathological observation. Active cutaneous anaphylaxis test was done for 2 weeks. Test animals were divided into five groups: untreated control, treatment with n-hexane extract of noni dose of 50mg, 100mg dan 200mg/kgBW rats, and cromolyn treated group with dose of 2. mg/kg BW rats as positive control. Animals were sensitized 2times (once every week) with hepatitis B vaccine (dose of 145µg/kgBW) subcutaneously on the back. In the second week, random four rats of each groups were sacrificed and the skin tissues and livers were taken. Tissues were created as histopathology preparations with hematoxyllin-eosin coloring. The presence of anaphylaxis reactions, shown by inflammatory cell infiltration, were observed from the histopathology preparations. The result of this research showed that the administration of n-hexane extract of noni fruits treatment dose of 50mg, 100mg, and 200mg/kgBW on male Wistar rats induced hepatitis B vaccine can inhibit active cutaneous anaphylaxis reaction.*

*Keywords: Morinda citrifolia L., inflammatory cells, active cutaneous anaphylaxis reaction*

#### ABSTRAK

*Mengkudu (Morinda citrifolia L.) adalah salah satu tanaman berkhasiat obat yang sudah tidak asing lagi penggunaannya dalam pengobatan. Mengkudu telah diketahui memiliki efek farmakologis, antara lain efek analgesik, antihipertensi, dan imunomodulator. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa ekstrak n-heksana buah mengkudu dapat menghambat reaksi anafilaksis kutaneus aktif pada tikus Wistar jantan yang diinduksi vaksin hepatitis B. Penelitian ini menggunakan metode anafilaksis kutaneus aktif, kemudian dilanjutkan dengan pengamatan histopatologinya. Uji anafilaksis kutaneus aktif dilakukan selama dua minggu. Hewan uji dibagi menjadi lima kelompok yaitu kelompok : kontrol tanpa perlakuan, perlakuan dengan ekstrak n-heksana buah mengkudu dosis 50mg, 100mg, dan 200mg/kgBB tikus, dan kelompok yang diberi kromolin dosis 2,16mg/kg BB tikus sebagai kontrol positif. Hewan uji disensitisasi 2 kali (1x setiap minggu) dengan vaksin hepatitis B (dosis 145µg/kgBB tikus) secara subkutan pada bagian punggung. Pada minggu kedua, hewan uji diambil secara acak 4 ekor setiap kelompok untuk dikurbankan dan diambil jaringan kulit beserta jaringan hatinya. Jaringan dibuat sebagai preparat histopatologi dengan pewarnaan hematoxyllin-eosin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak n-heksana buah mengkudu dosis 50mg, 100mg, dan 200mg/kgBB pada tikus jantan Wistar yang diinduksi vaksin hepatitis B dapat menghambat reaksi anafilaksis kutaneus aktif.*

*Kata kunci : Morinda citrifolia L., sel radang, reaksi anafilaksis kutaneus aktif*

#### PENDAHULUAN

Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) adalah salah satu tanaman berkhasiat obat yang sudah

tidak asing lagi penggunaannya dalam pengobatan berbagai penyakit di Indonesia. Tanaman ini telah diketahui mengandung protein, polisakarida, skopoletin, asam askorbat, β-karoten, l-arginin, prokseronin, dan prokseroninase, khususnya pada bagian buah (Sjabana and Bahalwan 2002). Pada

---

\*Corresponding author: Ediati Sasmito  
Email: ediatisasmito@yahoo.com

daun mengkudu terkandung protein, zat kapur, zat besi, karoten, dan askorbin. Pada kulit akar terkandung senyawa *morindin*, *morindon*, *aligarind-methyleter*, dan *soranjideol*. Pada bunganya terkandung senyawa glikosida, antraknon, asam kapron, dan asam kaprilat (Djauhariya 2003). Banyaknya senyawa yang terkandung dalam tanaman mengkudu ini tentu saja memberikan efek farmakologis yang berbeda-beda tergantung dari cara penyarian serta jenis penyari yang digunakan. Dilaporkan oleh Ediati, dkk (Ediati *et al.*, 2004), bahwa ekstrak *n*-heksana buah mengkudu memiliki efek imunomodulator paling aktif terhadap vaksin hepatitis B yang diinduksikan pada mencit. Pengaruh ekstrak *n*-heksana buah mengkudu terhadap reaksi inflamasi baik pada karsinoma hepatoseluler maupun inflamasi pada jaringan kulit belum pernah diteliti sebelumnya. Hal ini perlu dilakukan untuk mengetahui pengaruhnya terhadap reaksi inflamasi, terutama kemampuan penghambatan, yang dimiliki ekstrak *n*-heksana buah mengkudu sehingga dapat dikembangkan menjadi fitofarmaka terhadap reaksi inflamasi. Beberapa hal yang telah disebutkan, mendorong dilakukannya penelitian mengenai pengaruh pemberian ekstrak *n*-heksana buah mengkudu terhadap reaksi anafilaksis kutaneus aktif pada tikus putih galur Wistar yang diinduksi vaksin hepatitis B.

### Reaksi Anafilaksis Kutaneus Aktif

Reaksi anafilaksis kutaneus aktif adalah metode yang dapat digunakan untuk mengetahui aktivitas antiinflamasi dari suatu senyawa uji. Indikator yang digunakan adalah adanya reaksi reaksi kutaneus lokal dengan terlihatnya warna kebiruan apabila disuntikkan secara intravena larutan *Evans blue* pada daerah yang disensitisasi. Melalui metode ini juga dapat terlihat sel mast yang masih utuh setelah diberi senyawa antiinflamasi.

### Sel mast

Pada pemeriksaan patologi, ditemukan infiltrat inflamasi yang terdiri atas berbagai macam sel, salah satunya adalah sel mast. Sel mast adalah sel yang terdapat dalam beberapa tipe jaringan dan mengandung granula yang kaya akan histamin dan heparin. Sel mast ini berperan penting dalam respon alergi dan anafilaksis. Selain itu, sel mast juga berperan dalam penyembuhan luka dan pertahanan terhadap mikrobia patogen (Prussin and Metcalfe 2003). Pelepasan sitokin dan khemokin, antara lain IL-8, IL-13, eotaksin dan RANTES, berpengaruh pada penarikan sel-sel radang yang dapat menyebabkan inflamasi.

Aktivasi dan diferensiasi bermacam-macam tipe sel termasuk: eosinofil, sel TCD4<sup>+</sup>, sel mast, dan sel epitel oleh adanya alergen menginduksi sel Th-2, sehingga terjadi peningkatan ekspresi sitokin termasuk IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 yang merangsang IgE dan sel mast. Selanjutnya sel mast akan menghasilkan IL-4, IL-5, IL-6, dan triptase pada epitel. Mediator dan sitokin akan mengadakan *up-regulation* ICAM-1. Khemoatraktan IL-5 dan RANTES memacu infiltrasi eosinofil, basofil, sel Th-2, dan sel mast. Perpanjangan masa hidup sel terutama dipengaruhi oleh IL-5<sup>(5)</sup>. Sel mast mempunyai reseptor dengan afinitas yang tinggi terhadap IgE. Ketika sel mast aktif, akan terjadi degranulasi dan dilepas beberapa senyawa mediator inflamasi. Dalam berbagai penelitian untuk mengetahui efek penghambatan suatu senyawa pada reaksi anafilaksis kutaneus aktif terhadap suspensi ovalbumin dan aluminium hidroksida, sel mast sering kali digunakan dalam pengamatan preparat histopatologinya (Harsono and Endaryanto 2006).

## METODOLOGI

### Bahan dan alat

Bahan utama: buah mengkudu tua, tetapi belum masak, didapatkan dari daerah Sekip Utara, Yogyakarta, yang diambil pada Juli 2008. Bahan pembanding: natrium Kromolin (Sigma). Bahan maserasi: *n*-heksan (Sigma). Pelarut ekstrak uji: tween 80 (Brataco Chemika Indonesia) 0,4% dalam akuades. Hewan uji: tikus galur Wistar jantan, umur  $\pm$  2 bulan, berat badan  $\pm$  200g, diperoleh dari Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada. Bahan penginduksi: vaksin hepatitis B (Engerix B, Glaxo-Indonesia). Bahan anestesi: kloroform (Sigma). Bahan untuk uji hambatan reaksi inflamasi: pewarna *nuclear fast red*, *alcian blue* pH 2,5. Alat-alat gelas yang lazim digunakan dalam laboratorium, spuit injeksi 1 mL (Terumo), jarum berujung tumpul, *inverted microscope* (Olympus), gunting steril, pinset steril, pisau steril, almari pendingin atau *freezer*, mikrotom.

### Pembuatan ekstrak *n*-heksana buah mengkudu

Buah mengkudu dicuci sampai bersih, ditiriskan untuk menghilangkan sisa-sisa air cucian. Selanjutnya dilakukan perajangan, diangin-anginkan di tempat terbuka terlindung sinar matahari langsung. Pengeringan dilanjutkan dalam oven temperatur 50 °C. Setelah kering, diserbuk dengan blender, sehingga didapat serbuk simplisia yang siap dibuat ekstrak. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan cara maserasi. Maserasi dilakukan dengan cara

merendam serbuk simplisia dalam cairan. Sebanyak 300 g serbuk simplisia dimasukkan ke dalam labu 5 L, ditambahkan larutan *n*-heksana sebanyak 3 L (1:10 antara bobot serbuk dengan pelarutnya) lalu didiamkan selama 72 jam. Dilakukan pengadukan setiap hari secara berulang-ulang. Setelah 3 hari, hasil rendaman disaring. Selanjutnya dilakukan pemekatan hasil penyaringan dengan *vaccum evaporator* dan dilanjutkan dengan penguapan di atas penangas air dengan penurunan tekanan menggunakan bantuan kipas angin sambil diaduk-aduk sampai diperoleh ekstrak dengan konsistensi kental. Ekstrak kental yang diperoleh kemudian dilarutkan dalam larutan 0,4% tween 80 dan dibuat 3 seri dosis yaitu 50 mg, 100mg, dan 200mg/kg BB tikus, dan diberikan p.o sekali sehari selama penelitian berlangsung.

#### **Perlakuan hewan uji dan reaksi anafilaksis kutaneus aktif dengan vaksin hepatitis B.**

Sejumlah 30 ekor tikus jantan galur Wistar, dibagi secara acak menjadi 5 kelompok (@6 ekor) untuk diberi perlakuan yang berbeda. Kelompok I : diinduksi vaksin dan diberi larutan 0,4% tween 80; kelompok II-IV: diinduksi vaksin dan diberi ekstrak *n*-heksana, berturut-turut dengan dosis 50 mg, 100mg, dan 200mg/kgBB; kelompok V: diinduksi vaksin dan diberi natrium kromolin dosis 2,16mg/kgBB. Sebelum diberi perlakuan, semua hewan uji ditimbang dan dipuasakan selama 1 malam, kemudian dikondisikan selama 7 hari untuk penyesuaian terhadap lingkungan baru dengan cara penyeragaman makanan dan diberikan ekstrak *n*-heksana p.o. sekali sehari. Setelah 7 hari pengkondisian, semua hewan uji disensitisasi 2kali (setiap minggu selama 2 minggu) dengan vaksin hepatitis B (dosis 145 µg/kg BB) secara subkutan pada bagian punggung. Pada minggu kedua (sensitisasi terakhir), bulu bagian punggung hewan uji tersebut dicukur seluas ± 2,5 cm x 4 cm, kemudian diberi larutan *Evans blue* secara i.v. sebagai indikator warna untuk menunjukkan adanya reaksi anafilaksis kutaneus lokal, setelah itu diberi lagi vaksin hepatitis B secara subkutan untuk menginduksi anafilaksis yang berikutnya. Pada minggu terakhir ini, hewan uji diambil secara acak masing-masing 4 ekor tiap kelompok untuk dikurbankan, lalu diambil jaringan kulit dan hati yang disensitisasi untuk dibuat preparat histopatologinya. Preparat tersebut, kemudian diamati di bawah mikroskop cahaya untuk mengetahui ada tidaknya jaringan yang mengalami inflamasi dan diambil foto masing-masing preparat.

#### **Pembuatan preparat histopatologi kulit dan hati**

Pembuatan preparat diawali dengan pengorbanan hewan uji. Hewan uji dari masing-masing kelompok diambil secara acak kemudian dikurbankan dan dibedah untuk diambil jaringan kulit dan hati. Jaringan kulit dan hati tersebut lalu direndam selama 2x24 jam di dalam pot-pot plastik yang berisi larutan 10% formalin dalam keadaan terendam sepenuhnya (fiksasi jaringan kulit dan hati). Jaringan kulit dan hati yang telah difiksasi tersebut, kemudian dipotong secara melintang setebal 3-5 mm dan diwarnai dengan *Alcian Blue* pH 2,5 dan ditetesi dengan *nuclear fast red*.

#### **Analisis Hasil**

Preparat histopatologi yang dibuat kemudian diamati dan diambil datanya. Data yang diperoleh berupa foto preparat histopatologi jaringan kulit dan hati, baik yang mengalami inflamasi ataupun tidak, kemudian dievaluasi secara kualitatif.

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **Pembuatan ekstrak *n*-heksana buah mengkudu**

Metode yang digunakan dalam penyarian adalah maserasi karena metode maserasi sesuai dengan pelarut yang dikehendaki yaitu *n*-heksana dan metode ini mudah dilakukan dan peralatan yang digunakan sederhana. Selama proses maserasi, campuran diaduk setiap waktu tertentu untuk meratakan pelarut yang sudah jenuh oleh komponen terlarut sehingga akan terjadi gradien konsentrasi. Jika gradien konsentrasi tetap terjaga, proses difusi akan tetap berjalan selama penyarian belum seluruhnya jenuh. Akibatnya terjadi difusi kandungan kimia dari sel-sel bahan uji menuju pelarut. Ekstrak buah mengkudu yang diperoleh berwarna kuning kecoklatan dengan berat 7,7 g.(2,57% b/b).

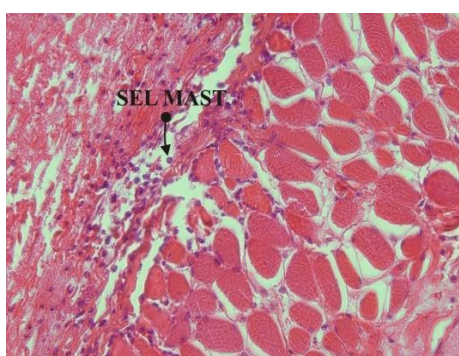
#### **Perlakuan Hewan Uji**

Pemilihan hewan uji, didasarkan pertimbangan bahwa tikus galur Wistar yang lebih besar dari pada mencit juga akan memudahkan dalam pembuatan preparat histopatologinya karena organ yang dimiliki tikus relatif lebih besar dari pada mencit. Pemilihan tikus berkelamin jantan disebabkan hormon tikus jantan sedikit mempengaruhi hewan uji sehingga memberikan variasi yang lebih kecil dibandingkan tikus betina. Sebelum diberi perlakuan, semua hewan uji

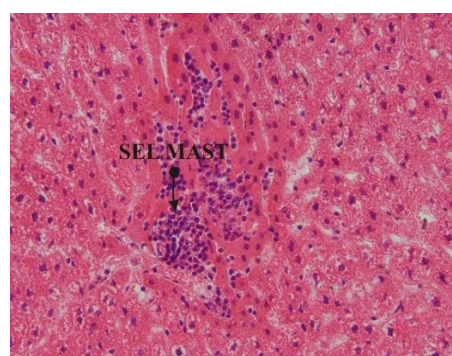
Tabel I. Data Pengamatan Preparat

No.	Preparat	Twen 80	n-heksana 10mg	n-heksana 20mg	n-heksana 40 mg	kromolin
1	Hati	N & P	-	-	-	-
	Kulit	R	-	-	-	-
2	Hati	N&P	-	-	-	N & P
	Kulit	-	-	-	R	-
3	Hati	-	-	-	P	-
	Kulit	R	R	-	-	-
4	Hati	-	-	-	-	-
	Kulit	R	-	-	-	-

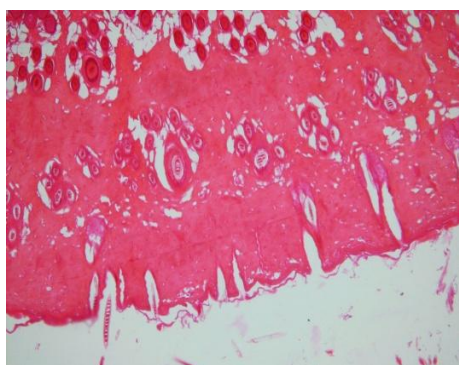
Keterangan : N : Nekrosis; P : Sel radang di sekitar pembuluh darah; R : Infiltrasi sel radang



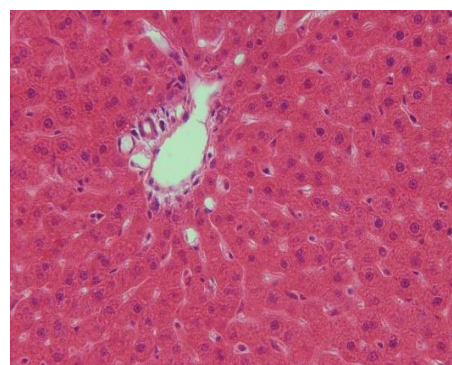
Gambar 1. Jaringan kulit yang mengalami peradangan dengan perlakuan tween 80 terinduksi vaksin hepatitis B (perbesaran 400x, pengecatan HE)



Gambar 2. Jaringan hati yang mengalami peradangan dengan perlakuan tween 80 terinduksi vaksin hepatitis B (perbesaran 400x, pengecatan HE)



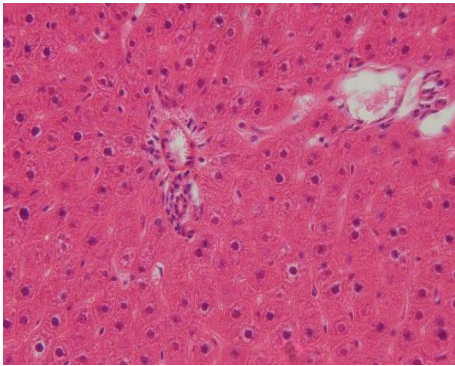
Gambar 3. Jaringan kulit dengan perlakuan kromolin (kontrol positif) terinduksi vaksin hepatitis B (perbesaran 400x, pengecatan HE)



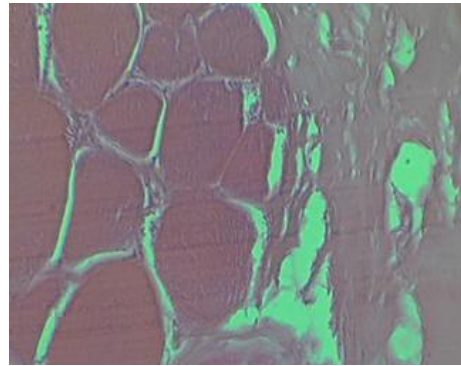
Gambar 4. Jaringan hati dengan perlakuan kromolin (kontrol positif) terinduksi vaksin hepatitis B (perbesaran 400x, pengecatan HE)

dikondisikan terlebih dahulu agar tidak stres dan dapat bertahan hidup selama masa perlakuan. Pengondisian dilakukan dengan menyeragamkan makanan yang diberikan dan perlakuan p.o. air suling setelah dipuaskan selama 1 malam (12 jam). Pemberian ekstrak uji secara p.o., untuk menyesuaikan rute pemberian pada manusia,

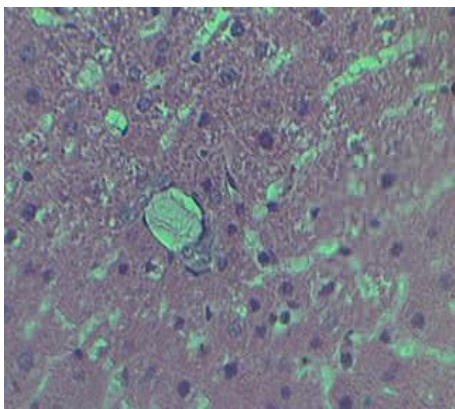
karena pada umumnya pemberian obat yang berasal dari ekstrak tanaman adalah melalui rute oral. Untuk pemeliharaan hewan uji, perlu diperhatikan keadaan lingkungan hidup hewan uji, seperti penggantian sekam padi secara teratur, letak kandang dijauhkan dari kebisingan, dan hal-hal lain yang dapat memicu terjadinya stres, serta



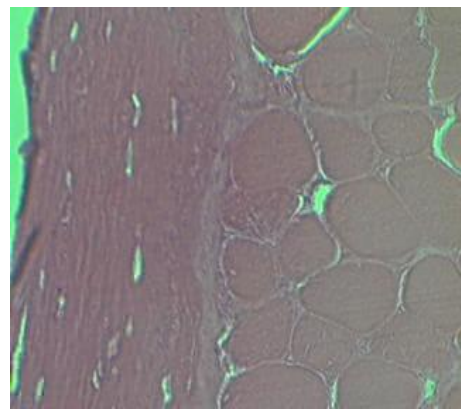
Gambar 5. Jaringan hati dengan pemberian ekstrak *n*-heksana dosis 10 mg (perbesaran 400x, pengecatan HE)



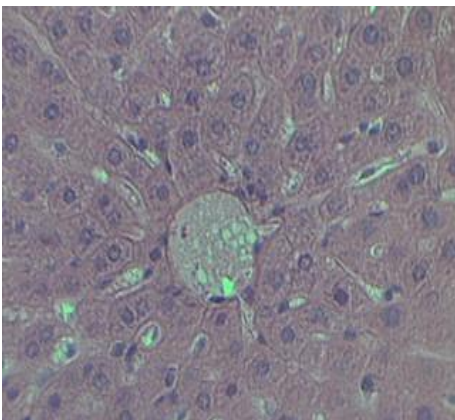
Gambar 6. Jaringan kulit dengan pemberian ekstrak *n*-heksana dosis 10 mg (perbesaran 400x, pengecatan HE)



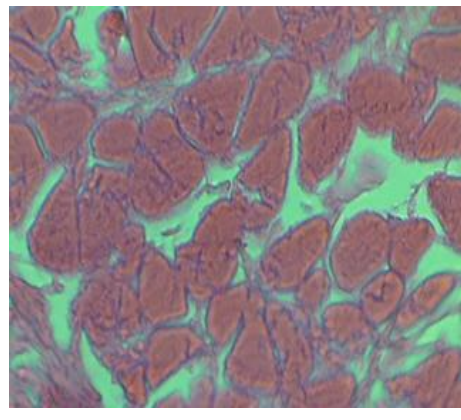
Gambar 7. Jaringan hati dengan pemberian ekstrak *n*-heksana dosis 20 mg (perbesaran 400x, pengecatan HE)



Gambar 8. Jaringan kulit dengan pemberian ekstrak *n*-heksana dosis 20 mg (perbesaran 400x, pengecatan HE)



Gambar 9. Jaringan hati dengan pemberian ekstrak *n*-heksana dosis 40 mg (perbesaran 400x, pengecatan HE)



Gambar 10. Jaringan kulit dengan pemberian ekstrak *n*-heksana dosis 40 mg (perbesaran 400x, pengecatan HE)

timbulnya penyakit pada hewan uji. Kondisi stres pada hewan uji akan mengakibatkan tidak mau makan, yang akan mempengaruhi kondisi hewan uji tersebut, bahkan dapat menyebabkan kematian hewan uji. Kondisi hewan uji yang kurang baik, misal sakit atau stres, dapat mempengaruhi hasil penelitian.

### Hasil Uji Kutaneus Aktif

Hewan uji yang telah diberi perlakuan, pada minggu terakhir diambil 4 ekor secara acak untuk masing-masing kelompok, kemudian dikorbankan dan diambil jaringan kulit pada bagian yang telah disensitisasi dan dibuat preparat histopatologinya. Hasil pengamatan preparat histopatologi dengan mikroskop cahaya, dapat dilihat pada Tabel 1 dan Gambar 1-10. Tabel 1, menunjukkan bahwa kelompok hewan uji yang diinduksi dengan vaksin dan diberi pelarut 0,4% tween 80, terjadi peradangan pada jaringan kulit dengan jumlah yang lebih banyak dibandingkan pada kelompok lainnya. Namun demikian, terjadinya inflamasi pada jaringan kulit ini belum dapat menggambarkan secara pasti adanya korelasi antara tingkat dosis pemberian vaksin yang tinggi (145 µg/kg BB tikus) dengan inflamasi yang terjadi. Inflamasi ini dapat terjadi akibat sensitisasi yang dilakukan berulang sehingga menaikkan risiko terjadinya inflamasi. Hal ini senada dengan Mast, dkk. <sup>(6)</sup> yang menyebutkan bahwa pasca pemberian vaksin hepatitis B pada dosis normal memiliki risiko terjadi inflamasi pada daerah sekitar penyuntikan yang bergantung pada tingkat respon imun subyek uji. Dalam penelitian ini, juga diamati adanya reaksi inflamasi pada jaringan hati, karena vaksin yang digunakan adalah vaksin hepatitis B dosis tinggi yang dapat mempengaruhi jaringan hati <sup>(7)</sup>.

Pada kelompok larutan 0,4% tween 80 (Gambar 1 dan 2) dengan kelompok natrium kromolin (Gambar 3 dan 4) memperlihatkan, inflamasi kelompok natrium kromolin yang terjadi lebih sedikit dari pada kelompok larutan tween 80. Hal ini ditunjukkan dengan tidak adanya preparat kulit yang mengalami inflamasi meskipun ada satu preparat hati yang menunjukkan adanya inflamasi.

Perlakuan hewan uji dengan pemberian ekstrak *n*-heksana buah mengkudu dengan 3 seri dosis memberikan hasil adanya penghambatan terjadinya inflamasi, yang ditunjukkan dengan tidak adanya preparat kulit maupun preparat hati yang mengalami inflamasi, meskipun belum dapat disimpulkan apakah reaksi penghambatan yang terjadi ini berbeda nyata dengan kelompok kontrol positif. Pada pemberian ekstrak *n*-heksana buah mengkudu dosis 50 mg/kgBB, terdapat 1

tikus yang mengalami peradangan yaitu pada preparat kulit tikus 3, pada pemberian ekstrak *n*-heksana dosis 100 mg/kgBB tidak ada tikus yang mengalami peradangan baik pada jaringan hati maupun jaringan kulit, dan pada pemberian ekstrak *n*-heksana dosis 200 mg/kgBB terdapat 2 tikus yang mengalami peradangan yaitu pada preparat hati tikus no.3 dan preparat kulit tikus no.2 (Tabel 1). Data hasil pengamatan menunjukkan bahwa mempunyai kemampuan untuk menghambat reaksi inflamasi bila dibandingkan dengan kelompok larutan 0,4% tween 80. Hasil pengamatan jaringan tersebut dapat dilihat pada Gambar 5-10.

### KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak *n*-heksana buah mengkudu dosis 50 mg, 100 mg dan 200 mg/kgBB mampu menghambat reaksi anafilaksis pada tikus jantan galur Wistar yang diinduksi vaksin hepatitis B dosis 145 µg/kgBB.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada staf laboratorium Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, atas pembuatan dan analisis preparat histopatologi jaringan kulit dan hati. Sebagian dari penelitian ini, telah ipresentasikan pada Kongres Ilmiah XVIII dan Rapat Kerja Ikatan Apoteker Indonesia. Makassar, 10-12 Desember 2010

### DAFTAR PUSTAKA

- Sjabana D., Bahalwan R.R., 2002, *Seri Referensi Herbal: Mengkudu*, 2-21, 35-46, Salemba Medika, Jakarta.
- Djauhariya E., 2003, *Perkembangan Teknologi Tanaman Rempah dan Obat*, Volume XV, Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat Indonesia.
- Ediati S., Mulyaningsih S. & Novianharti F., 2004, Uji Aktivitas Imunostimulator Jus Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) terhadap Vaksin Hepatitis A secara *in vitro*, *Prosiding Seminar Nasional dan Pra kongres PBBMI*, ISBN 979-96008-12.
- Prussin C. and Metcalfe D.D., 2003, IgE, Mast Cells, Basophils, and Eosinophils, *J. Allergy Clin Immunol* 111 (2 Suppl) : S486-94.
- Harsono A. & Endaryanto A., 2006, *Rinitis Alergika*, <http://www.pediatrik.com>, Januari 2009.
- Mast E.E., Weinbaum C.M., Fiore A.E., Alter M.J. & Bell B.P. *et al*, 2006, *A Comprehensive Immunization Strategy to Eliminate Transmission of Hepatitis B Virus Infection*

- in the United States,  
<http://www.cdc.gov/mmwr/preview>,  
Januari 2009
- Ediati S., Nunung Yuniarti & Djoko S., 2009,  
The Molecular Mechanism Anti  
Inflammatory *n*-Hexane Extract of  
*Morinda citrifolia* L. Fruit on Wistar Rat  
Induced by Hepatitis B vaccine,  
presented in *AASP-MPSPS Conference*, 10-  
13 June 2009, Penang, Malaysia
- Shimada T., Ohashi K. & Yamamoto T., 2004,  
Effect of Lysed *Enterococcus Faecalis* FK-23  
on Allergen-induced Serum Antibody  
Responses and Active Cutaneous  
Anaphylaxis in Mice. *Clin Exp Allergy*,34  
(11): 1784-1788