

**PENGARUH EKSTRAK DAUN BAYAM BRASIL
(*Alternanthera sissoo* hort) TERHADAP JUMLAH
LEUKOSIT INFLAMASI, CRP, INDEKS ORGAN
LIMFOID DAN HEPAR MENCIT TERINDUKSI CFA**

SKRIPSI



Bernike Rose Sipayung

31190333

**Program Studi Biologi
Fakultas Bioteknologi
Universitas Kristen Duta Wacana
Yogyakarta
2023**

**PENGARUH EKSTRAK DAUN BAYAM BRASIL
(*Alternanthera sissoo* hort) TERHADAP JUMLAH
LEUKOSIT INFLAMASI, CRP, INDEKS ORGAN
LIMFOID DAN HEPAR MENCIT TERINDUKSI CFA**

SKRIPSI

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh
Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Pada Program Studi Biologi, Fakultas Bioteknologi
Universitas Kristen Duta Wacana



Bernike Rose Sipayung

31190333

Program Studi Biologi

Fakultas Bioteknologi

Universitas Kristen Duta Wacana

Yogyakarta

2023

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
SKRIPSI/TESIS/DISERTASI UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademika Universitas Kristen Duta Wacana, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Bernike Rose Sipayung
NIM : 31190333
Program studi : Biologi
Fakultas : Bioteknologi
Jenis Karya : Skripsi/Tesis/Disertasi (tulis salah satu)

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Kristen Duta Wacana **Hak Bebas Royalti Noneksklusif** (*None-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

“JUDUL SKRIPSI/TESIS/DISERTASI”

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti/Noneksklusif ini Universitas Kristen Duta Wacana berhak menyimpan, mengalih media/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama kami sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Yogyakarta
Pada Tanggal : 3 Juli 2023

Yang menyatakan



(Bernike Rose Sipayung)

NIM.31190333

LEMBAR PENGESAHAN

Skripsi dengan judul :

Pengaruh Ekstrak Daun Bayam Brasil (*Alternanthera sisso hort*) Terhadap Jumlah Leukosit Inflamasi, CRP, Indeks Organ Limfoid Dan Hepar Mencit Terinduksi CFA

Telah diajukan dan dipertahankan oleh :

BERNIKE ROSE SIPAYUNG

31190333

dalam Ujian Skripsi Program Studi Biologi

Fakultas Bioteknologi

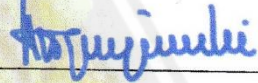
Universitas Kristen Duta Wacana

dan dinyatakan DITERIMA untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Sains pada tanggal 23 Juni 2023

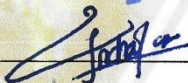
Nama Dosen

Tanda Tangan

1. Dr. biol.hom. Nastiti Wijayanti, S.Si.,M.Si. :
(Ketua Tim Penguji)



2. drh.Vinsa Cantya Prakasita, SKH., M.Sc.
(Dosen Pembimbing I / Tim Penguji)



3. Kukuh Madyaningrana, S.Si, M.Biotech.
(Dosen Pembimbing II / Tim Penguji)



Yogyakarta, 23 Juni 2023

Disahkan Oleh:

Dekan,



Dr. Dhira Satwika, M.Sc.

Ketua Program Studi Biologi,



Dwi Adityarini, S.Si., M. Biotech.

LEMBAR PERSETUJUAN

Judul : Pengaruh Ekstrak Daun Bayam Brasil
(*Alternanthera sissoo* hort) Terhadap Jumlah
Leukosit Inflamasi, CRP, Indeks Organ
Limfoid Dan Hepar Mencit Terinduksi CFA

Nama Mahasiswa : Bernike Rose Sipayung

Nomor Induk Mahasiswa : 31190333

Hari/Tanggal Ujian : 23 Juni 2023

Disetujui Oleh:

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping



(drh. Vinsa Cantya Prakasita, M.Sc)
NIK : 209 E 539



(Kukuh Madyanigrana, S.Si., M.Biotech.)
NIK : 214 E 555

DUTA WACANA

Ketua Program Studi Biologi



(Dwi Adityarini, S.Si., M. Biotech)
NIK : 214 E 556

LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Bernike Rose Sipayung

NIM : 31190333

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi dengan judul:

“Pengaruh Ekstrak Daun Bayam Brasil (*Alternanthera sissoo hort*) Terhadap Jumlah Leukosit Inflamasi, CRP, Indeks Organ Limfoid Dan Hepar Mencit Terinduksi CFA”

adalah hasil karya saya dan bukan merupakan duplikasi sebagian atau seluruhnya dari karya orang lain, yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Pernyataan ini dibuat dengan sebenar-benarnya secara sadar dan bertanggung jawab dan saya bersedia menerima sanksi pembatalan skripsi apabila terbukti melakukan duplikasi terhadap skripsi atau karya ilmiah lain yang sudah ada.

Yogyakarta, 16 Juni 2023



(Bernike Rose Sipayung)

NIM: 31190333

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa karena berkat dan rahmat-Nya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi dengan judul **“Pengaruh Ekstrak Daun Bayam Brasil (*Alternanthera sissoo hort*) Terhadap Jumlah Leukosit Inflamasi, CRP, Indeks Organ Limfoid Dan Hepar Mencit Terinduksi CFA”** sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si) Fakultas Bioteknologi Universitas Kristen Duta Wacana.

Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini tidak dapat terselesaikan dengan baik tanpa adanya dukungan, bimbingan dan nasehat dari berbagai pihak. Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan ucapan terimakasih kepada :

1. Tuhan Yang Maha Esa yang memberikan kekuatan serta kemampuan hingga penulis dapat menyelesaikan penelitian skripsi dengan baik.
2. Orang tua tercinta, papa Beslin Sipayung dan mama Dewana Pandiangan, serta kakak dan adik tersayang Debora Sipayung dan Doan Sipayung yang selalu menjadi *support system* selama proses menempuh kuliah di Fakultas Bioteknologi UKDW.
3. Ibu drh. Vinsa Cantya Prakasita, SKH., M.Sc. selaku dosen pembimbing I yang telah membimbing, memberikan masukan, arahan dan motivasi dari awal penulisan proposal, penelitian hingga naskah akhir.
4. Bapak Kukuh Madyaningrana, S.Si., M. Biotech. selaku dosen pembimbing II yang telah membimbing, memberikan masukan, arahan dan motivasi dari awal penulisan proposal, penelitian hingga naskah akhir. Penelitian ini dibiayai oleh hibah penelitian Fakultas Bioteknologi UKDW tahun 2023 yang diperoleh dosen tersebut.
5. Seluruh dosen, staff dan laboran Fakultas Bioteknologi yang telah memberikan ilmu yang tak terhingga dan dukungan selama proses perkuliahan di Fakultas Bioteknologi UKDW.
6. Teman-teman yang terlibat langsung membantu proses penelitian Nadya Aprina, Ngoro Anjung, Amelia K, Sevien E, Wahyu S. Teman-teman sepermainan #BelleGanteng dan Biotechnology DWCU'19 dalam kebersamaan yang telah terlewati.

7. Pihak – pihak lain yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah dengan tulus ikhlas memberikan dukungan, doa, dan motivasi sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini memiliki banyak kekurangan sehingga memerlukan bantuan saran dan kritik yang membangun untuk menyempurnakan skripsi ini. Penulis berharap skripsi ini dapat berguna dan bermanfaat untuk banyak pihak.

Yogyakarta, 23 Juni 2023



Bernike Rose Sipayung



DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN SAMPUL DALAM	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
LEMBAR PERSETUJUAN	iv
LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
ABSTRAK	xiii
ABSTRACT	xiv
BAB I	1
PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.4. Manfaat Penelitian	5
BAB II	6
2.1. Bayam Brasil (<i>Alternanthera sissoo hort.</i>)	6
2.1.1. Vitamin E Sebagai Imunomodulator	8
2.1.2. Aktivitas Farmakologi Flavonoid	10
2.2. Sistem Imun Tubuh	12
2.2.1. Leukosit	13
2.2.2. Protein C-Reactive	14
2.3. <i>Complete Freund's Adjuvant</i> (CFA)	15
2.4. Mencit (<i>Mus musculus</i>)	15
BAB III	17
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian	17
3.2. Bahan	17
3.3. Alat	18

3.4.	Cara Kerja.....	18
3.4.1.	Pembuatan Serbuk Simplisia.....	18
3.4.2.	Pembuatan Ekstrak Etanol Bayam Brasil (<i>Alternanthera sissoo hort</i>)	18
3.4.3.	Screening Fitokimia.....	19
3.4.4.	Analisa Kadar Vitamin E pada Ekstrak Etanol Bayam Brasil (<i>Alternanthera sissoo hort</i>).....	20
3.4.5.	Analisa Kadar Flavonoid Total pada Ekstrak Etanol Bayam Brasil (<i>Alternanthera sissoo hort</i>).....	20
3.4.6.	Perlakuan Hewan Coba	21
3.4.7.	Uji In Vivo.....	22
3.5.	Analisa Data	23
3.6.	Bagan Alir Penelitian.....	24
BAB IV	25
4.1.	Ekstrak Etanol Daun Bayam Brasil (<i>Alternanthera sissoo hort</i>)	25
4.2.	Skrining Fitokimia.....	26
4.3.	Analisa Flavonoid Total pada Ekstrak Etanol Bayam Brasil (<i>Alternanthera sissoo hort</i>).....	28
4.4.	Analisa Vitamin E pada Ekstrak Etanol Bayam Brasil (<i>Alternanthera sissoo hort</i>).....	30
4.5.	Uji <i>Preliminary</i> Efek induksi <i>Complete Freund's Adjuvant</i> (CFA) pada Mencit	30
4.6.	Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Bayam Brasil (<i>Alternanthera sissoo hort</i>) terhadap Jumlah Leukosit Inflamasi.....	32
4.7.	Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Bayam Brasil (<i>Alternanthera sissoo hort</i>) terhadap Pemeriksaan Protein C-Reactive (CRP) dengan Aglutinasi	40
4.8.	Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Bayam Brasil (<i>Alternanthera sissoo hort</i>) terhadap Perhitungan Nilai Indeks Limpa, Timus dan Hati ...	42
4.9.	Hubungan Antara Indeks Organ dan Nilai Relatif Limfosit.....	43
BAB V	46
5.1.	Kesimpulan.....	46
5.2.	Saran.....	46
DAFTAR PUSTAKA	47
LAMPIRAN	58

DAFTAR TABEL

Nomor Tabel	Judul Tabel	Halaman
Tabel 2.1	Kandungan gizi dalam 100 gr Bayam Brasil	7
Tabel 2.2	Batas toleransi maksimal konsumsi vitamin E	10
Tabel 3.1	Kelompok uji dan dosis	22
Tabel 4.1	Hasil Fitokimia Kualitatif Ekstrak Etanol Bayam Brasil	27
Tabel 4.2	Hasil Pengukuran Absorbansi Larutan Standar <i>Quercetin</i> pada Panjang Gelombang 435 nm	28
Tabel 4.3	Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Bayam Brasil (<i>Alternantera sissoo hort</i>)	29
Tabel 4.4	Hasil pemeriksaan CRP dengan tes RAPID dengan metode aglutinasi	41

DAFTAR GAMBAR

Nomor Gambar	Judul Gambar	Halaman
Gambar 2.1	Habitus bayam brasil	6
Gambar 2.2	Morfologi bunga dan daun bayam brasil	6
Gambar 2.3	Struktur Kimia <i>Quercetin</i>	11
Gambar 4.1	Hasil ekstrak kental daun bayam brasil (<i>Alternanthera sissoo hort</i>)	25
Gambar 4.2	Kurva Standar <i>Quercetin</i> pada Panjang Gelombang 435 nm	29
Gambar 4.3	Nilai relatif limfosit (%) mencit yang terinduksi CFA	32
Gambar 4.4	Morfologi monosit (1000x)	33
Gambar 4.5	Nilai relatif monosit dalam darah mencit dengan metode HDT pada hari ke 0,3 dan 7	33
Gambar 4.6	Morfologi neutrofil (1000x)	35
Gambar 4.7	Nilai relatif neutrofil dalam darah mencit dengan metode HDT pada hari ke 0,3 dan 7	36
Gambar 4.8	Morfologi limfosit (1000x)	38
Gambar 4.9	Nilai relatif limfosit dalam darah mencit dengan metode HDT pada hari ke 0,3 dan 7	39
Gambar 4.10	Nilai indeks organ timus, limpa dan hepar mencit.	42
Gambar 4.11	Grafik hubungan indeks organ timus dan nilai relatif limfosit	44
Gambar 4.12	Grafik hubungan indeks organ limpa dan nilai relat limfosit	45

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Judul Lampiran
1	Pembuatan simplisia
2	Ekstrak etanol bayam brasil (<i>Alternanthera sissoo hort</i>)
3	Perhitungan nilai rendemen
4	<i>Screnning</i> fitokimia
5	Analisa kadar flavonoid total
6	Perhitungan kadar flavonoid total ekstrak bayam <i>Amaranthus tricolor</i> L. variasi giti merah dan hijau dari penelitian Guntarti dan Ruliyani (2020)
7	Perhitungan dengan rumus <i>Freedere</i>
8	Hasil skrinig Vitamin E di Pusat studi pangan dan gizi UGM
9	Perhitungan konsentrasi CFA yang diinjeksikan
10	Perhitungan konversi dosis pada mencit (<i>Mus musculus</i>) jantan
11	<i>Diff. Count</i> Leukosit dengan HDT
12	Tabel data hitung jenis leukosit
13	Hasil uji SPSS terhadap nilai relatif limfosit
14	Hasil uji SPSS terhadap nilai relatif monosit
15	Hasil uji SPSS terhadap nilai relatif neutrofil
16	Pemeriksaan <i>C-Reactive Protein</i> (CRP) dengan Aglutinasi
17	Pembedahan mencit
18	Tabel Data Indeks Organ
19	Hasil Uji <i>One Way</i> ANOVA SPSS terhadap Indeks Organ Timus, Limpa dan Hepar
20	Hasil SPSS Regresi Linear Limfosit dan Indeks Organ Timus
21	Hasil SPSS Regresi Linear Limfosit dan Indeks Organ Limpa
22	Keterangan Kelaikan Etik No. 1530/C.16/FK/2023

ABSTRAK

Pengaruh Ekstrak Daun Bayam Brasil (*Alternanthera sissoo hort*) Terhadap Jumlah Leukosit Inflamasi, CRP, Indeks Organ Limfoid Dan Hepar Mencit Terinduksi CFA

BERNIKE ROSE SIPAYUNG

Sel imun terkadang membutuhkan senyawa imunomodulator untuk optimalisasi kerjanya melawan patogen penyebab infeksi. Beberapa bahan alam dikenal mampu menghasilkan efek modulasi sistem imun untuk melawan patogen. Bayam brasil (*Alternanthera sissoo hort*) adalah tanaman yang berpotensi digunakan sebagai imunomodulator karena kandungan beragam fitokimia dan vitamin yang dimilikinya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi ekstrak daun bayam brasil dalam mereduksi jumlah leukosit inflamasi (monosit, neutrofil, dan limfosit), kadar *C-reactive protein* (CRP), serta nilai indeks organ timus, limpa dan hepar pada mencit jantan. Daun bayam brasil diekstraksi dengan metode maserasi 3 x 24 jam dalam 6L etanol 96%. Parameter yang diukur dari ekstrak daun bayam brasil meliputi *screening* fitokimia, analisa kadar flavonoid total dan vitamin E. Parameter yang diukur dari mencit jantan selaku hewan coba meliputi jumlah leukosit inflamasi (monosit, neutrofil dan limfosit) dengan metode hapusan darah terpi (HDT), kadar *C-reactive protein* (CRP) dari serum darah menggunakan RAPID CRP, serta indeks nilai organ timus, limpa dan hepar. Mencit diaklimatisasi selama 7 hari, kemudian diinduksi *Compele Freund's Adjuvant* (CFA) melalui subkutan, dan diberi perlakuan oral selama 7 hari berdasarkan kelompok uji yaitu dari KS (kontrol sehat), KN (kontrol negatif), KP (vitamin E 200 IU), EEBB (ekstrak bayam brasil sebanyak 209,25 mg/g BB, 418,4 mg/ g BB 627,72 mg/g BB). Hasil penelitian menunjukkan EEBB mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, saponin, steroid, dan tanin, serta mengandung kadar flavonoid total 86,25 mg QE/g dan vitamin E sebanyak 375,5 mg/100. Uji *in vivo* menunjukkan adanya pengaruh modulasi terhadap nilai relatif neutrofil dan limfosit serta indeks organ timus dan hepar. sampel serum darah mencit yang dilihat dari tidak terbentuknya aglutinasi. Hasil negatif terjadi karena RAPID CRP yang dilakukan merupakan uji kualitatif standar yang sederhana yang bergantung pada reaksi antara antibodi dan antigen, sehingga memiliki tingkat sensitivitas yang rendah. Kelompok uji dosis 3 (627,72 mg/g BB) merupakan dosis terbaik dalam memberikan efek imunomodulator namun belum dapat menggantikan fungsional vitamin E 200 IU.

Kata kunci : Imunomodulator, *Alternanthera sissoo hort*, *Mus musculus*, Leukosit

ABSTRACT

Immune cells sometimes require immunomodulatory compounds to optimize their work against infection-causing pathogens. Some natural ingredients are known to produce modulating effects on the immune system to fight pathogens. Brasil amaranth (*Alternanthera sissoo* hort) is a plant that has the potential to be used as an immunomodulator because of its various phytochemicals and vitamins. This study aims to determine the potential of spinach brasil leaf extract in reducing the number of inflammatory leukocytes (monocytes, neutrophils, and lymphocytes), C-reactive protein (CRP) levels, and the index value of thymus, spleen and hepatic organs in male mice. Brasil amaranth leaves were extracted by maceration method for 3 x 24 hours in 6L of 96% ethanol. Parameters measured from spinach brasil leaf extract include phytochemical screening, analysis of total flavonoid levels and vitamin E. Parameters measured from male mice as experimental animals include the number of inflammatory leukocytes (monocytes, neutrophils and lymphocytes) using the blood smear method (HDT), C-reactive protein (CRP) levels from blood serum using RAPID CRP, as well as the index value of thymus, spleen and hepatic organs. Mice were acclimatized for 7 days, then induced Compele Freund's Adjuvant (CFA) through subcutaneous, then induced Compele Freund's Adjuvant (CFA) through subcutaneous, and given oral treatment for 7 days based on the test group, namely from KS (healthy control), KN (negative control), KP (vitamin E 200 IU), EE BB (spinach extract as much as 209.25 mg / g BB, 418.4 mg / g BB 627.72 mg / g BB). The results showed that EE BB contained flavonoid compounds, alkaloids, saponins, steroids, and tannins, and contained total flavonoid levels of 86.25 mg QE/g and vitamin E as much as 375.5 mg/100. In vivo tests showed a modulating effect on the relative values of neutrophils and lymphocytes as well as thymus and hepatic organ indices. mice blood serum samples as seen from the non-formation of agglutination. Negative results occur because RAPID CRP is a simple standard qualitative test that depends on the reaction between antibodies and antigens, so it has a low level of sensitivity. Test group dose 3 (627.72 mg/g BW) is the best dose in providing immunomodulatory effects but cannot replace functional vitamin E 200 IU.

Keywords: Immunomodulator, *Alternanthera sissoo* hort, *Mus musculus*, Leukocyte

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Penyakit infeksi adalah penyakit yang disebabkan oleh mikroorganisme patogen yang masuk dan berkembang biak di tubuh manusia sehingga kualitas kesehatan menurun (Handayani, 2010). Penyakit infeksi menjadi salah satu penyebab masalah kesehatan bahkan kematian di Indonesia. Data yang dimiliki oleh badan kesehatan dunia WHO pada tahun 2020 menunjukkan sebesar 28,1% penyakit infeksi yang meliputi COVID-19, tuberkulosis (TBC), diare, malaria, HIV/AIDS, dan infeksi saluran pernapasan lainnya menyebabkan kematian di Indonesia.

Secara alamiah, keberadaan patogen penyebab infeksi akan menyebabkan respon dari sistem imun terhadap patogen tersebut melalui respon imun yang terjadi melalui reaksi inflamasi terkoordinasi yang melibatkan komponen sel dan non sel imun (Steiman, 2012). Sel imun yang banyak diperankan oleh leukosit inflamasi mampu mengenali patogen melalui reseptornya. Makrofag mengenali antigen asing melalui *Toll-like receptor* (TLR) dan dapat berpindah ke jaringan yang mengalami inflamasi untuk melakukan fagositosis dimana patogen dapat ditelan ketika pseudopodia makrofag mengelilingi patogen yang kemudian bergabung membentuk vesikel internal. Patogen yang telah terkurung dalam vesikel akan terlisiskan. Ketika vesikel tersebut bergabung dengan lisosom membentuk fagolisosom (Abbas *et al.*, 2016).

Respon inflamasi memicu terlepasnya berbagai mediator inflamasi seperti sitokin, kemokin dan protein sederhana yang memicu pergerakan sel leukosit seperti neutrofil, monosit dan makrofag bergerak menuju tempat terjadinya peradangan untuk mengatasi sumber infeksi (Abbas *et al.*, 2016), Protein C-reactive adalah salah satu jenis protein fase akut yang diproduksi oleh hepatosit akibat pengaruh sirkulasi sitokin IL-6 di hepar, (Du & Mold, 2005). Kadar CRP di aliran darah dapat mencapai lebih dari 5 mg/L ketika inflamasi terjadi (Nemeth *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2014).

Kadar CRP menunjukkan peningkatan kadar serum selama infeksi dan juga menunjukkan kerusakan jaringan sehingga kemudian banyak digunakan sebagai biomarker inflamasi. Kadar CRP selama inflamasi dapat dideteksi dengan tes RAPID CRP sebagai indikator jenis infeksi yang andal, cepat dan murah (Rajab *et al.*, 2020).

Ketidakkampuan sel imun yang terlibat untuk mengeliminasi agen infeksi dapat berdampak pada rekrutmen dan aktivasi limfosit yang menginduksi inflamasi berkelanjutan dan diferensiasi sel inflamasi. Hal ini berkontribusi untuk melanggengkan proses inflamasi dengan meningkatnya produksi kadar sitokin pro-inflamasi yang berakibat adanya respon sel T yang tidak efisien (Steinman, 2012). Respon sel imun yang tidak optimal bisa dibantu dengan konsumsi senyawa imunomodulator yang berfungsi membantu menyeimbangkan kerja sistem imun melalui modulasi kinerja sistem imun tubuh baik dengan cara meningkatkan (imunostimulator) atau menurunkan (imunosupresif) sistem imun (Block & Mead, 2003).

Salah satu pendekatan terkini dalam bidang pengobatan pemanfaatan bahan alam sebagai sumber obat. Potensi bahan alam dalam bidang medis ini didasarkan pada kandungan fitokimia dengan berbagai efek farmakologis. Pemanfaatan obat berbasis tanaman juga menyoroti pada terapi imunomodulasi. Imunomodulator berbasis bahan herbal akan mengubah aktivitas fungsi sistem imun melalui regulasi dinamis yang dapat memodulasi dan menstimulasi komponen sel imun, antibodi dan sitokin (Spelman *et al.*, 2006).

Bayam brasil (*Alternanthera sissoo* hort) merupakan tanaman introduksi dari benua Amerika Selatan yang dapat tumbuh dengan baik di Indonesia. Bayam brasil termasuk dalam kelompok tanaman Angiospermae autotrof berbentuk herba (Ellya *et al.*, 2021). Perbanyakan bayam brasil mudah dilakukan dengan stek batang dan tidak membutuhkan perawatan khusus sehingga memiliki nilai jual yang tinggi sebagai sayuran konsumsi (Teatrawan *et al.*, 2022). Pemanfaatan bayam

brasil mulai banyak dimanfaatkan dalam berbagai olahan makanan seperti sayuran, salad, nuget bayam brasil dan kripik bayam brasil.

Hasil penelitian Limeranto (2022) menunjukan bahwa ekstrak daun bayam brasil dapat meningkatkan jumlah Hb, HCT dan RBC pada mencit yang mengalami anemia. Hasil uji kandungan mineral Fe dalam bayam brasil 12,72 mg/100 g paling banyak dibandingkan bayam konsumsi lainnya. Penelitian Wuni *et al.*, (2022) melaporkan bahwa ekstrak bayam brasil memberikan efek imunostimulan alami yang mampu meningkatkan jumlah leukosit dan indeks organ limpa dan timus pada mencit jantan. Efek farmakologis tersebut tidak terlepas dari fitokimia yang terkandung dalam bayam brasil, yaitu flavonoid, alkaloid, saponin, tanin, steroid. Hasil analisis GC-MS dari penelitian yang sama mendeteksi tiga senyawa dominan yaitu, *neophytadiene*, *phytol* termasuk golongan terpenoid dan *α -Tocopheryl acetate* (isoform vitamin E). Adanya vitamin E dalam bayam brasil dibuktikan dari uji kadar Vitamin E yaitu sebesar 70,92 mg/100 g. Vitamin E berperan sebagai antioksidan yang melindungi sel-sel dari kerusakan akibat stres oksidatif akibat adanya infeksi oleh patogen, sehingga meningkatkan proliferasi sel dan integritas membran sel imun (Traber & Atkinson, 2007). Kurangnya Vitamin E dalam tubuh dapat menyebabkan jumlah limfosit dan proliferasi limpa menurun, aktivasi neutrofil untuk proses fagositosis terhambat, dan fungsi sel (natural killer) NK terhambat (Traber, 2007).

Berbagai penelitian menyebutkan mengonsumsi makanan kaya antioksidan dapat mengurangi kadar CRP. Penelitian Silvia (2021) menunjukkan adanya hubungan antara adanya respon inflamasi, peningkatan CRP, dan perubahan jumlah sel darah putih.

Penelitian Wuni *et al.* (2022) memang menunjukkan bahwa daun bayam brasil memiliki efek farmakologis untuk meningkatkan jumlah limfosit mencit. Kendati demikian, penelitian tersebut tidak disertai dengan pemberian agen infeksi. Pemberian agen infeksi dapat menginduksi respon inflamasi dengan mengaktifkan sistem imun.

Penelitian ini memanfaatkan agen infeksi berupa *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) yang memiliki antigen sehingga diharapkan dapat terlebih dahulu menimbulkan respon inflamasi yang kuat pada hewan coba. Secara garis besar penelitian ini akan mengkaji pengaruh ekstrak daun bayam brasil sebagai pereduksi respon inflamasi pada mencit jantan yang telah diinduksi dengan agen infeksi CFA.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, didapatkan perumusan masalah sebagai berikut

1. Berapakah kandungan kadar flavonoid total dan vitamin E dari ekstrak daun bayam brasil (*Alternanthera sissoo hort*)?
2. Apakah pemberian ekstrak daun bayam brasil (*Alternanthera sissoo hort*) dapat mempengaruhi jumlah leukosit inflamasi, *C-reactive protein* (CRP), indeks organ limpa, timus dan hepar pada mencit (*Mus musculus*) yang diinduksi *Complete Freund's Adjuvant*?
3. Berapa dosis terbaik ekstrak daun bayam brasil (*Alternanthera sissoo hort*) yang dapat mempengaruhi jumlah leukosit inflamasi, *C-reactive protein* (CRP), indeks organ limpa, timus dan hepar pada mencit (*Mus musculus*) yang diinduksi *Complete Freund's Adjuvant*?

1.3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini mempunyai beberapa tujuan sebagai berikut :

1. Mengetahui kandungan kadar flavonoid total dan vitamin E dari ekstrak etanol daun bayam brasil (*Alternanthera sissoo hort*) ?
2. Mempelajari pengaruh pemberian ekstrak daun bayam brasil (*Alternanthera sissoo hort*) terhadap jumlah leukosit inflamasi, *C-reactive protein* (CRP), indeks organ limpa, timus dan hepar pada mencit (*Mus musculus*) yang diinduksi *Complete Freund's Adjuvant*?
3. Menentukan dosis terbaik ekstrak daun bayam brasil (*Alternanthera sissoo hort*) yang dapat mempengaruhi jumlah leukosit inflamasi, *C-reactive protein* (CRP), indeks organ limpa, timus dan hepar pada mencit (*Mus musculus*) yang diinduksi *Complete Freund's Adjuvant*?

1.4. Manfaat Penelitian

Penelitian ini mempunyai beberapa manfaat sebagai berikut :

1. Hasil penelitian dapat memberikan informasi tentang manfaat daun bayam brasil sebagai bahan konsumsi yang bernilai gizi baik.
2. Hasil penelitian dapat memberikan informasi kepada masyarakat tentang efek terapeutik dalam menangani peradangan
3. Hasil penelitian dapat dijadikan rujukan untuk melakukan penelitian lanjutan tentang potensi lain dari bayam brasil.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Bayam Brasil (*Alternanthera sissoo hort.*)

Bayam brasil adalah tanaman yang termasuk dalam famili *Amaranthacea* yang budidayanya mudah, cepat dan dapat mentolerir berbagai kondisi pH tanah. Bayam brasil adalah sayuran yang berasal dari Brazil, Amerika Selatan. Saat ini bayam brasil mulai dipopulerkan di Indonesia sebagai sayuran tinggi vitamin, zat besi, antioksidan dan asam folat (Mardiya, 2021). Organ daun bayam Brasil paling banyak dimanfaatkan sebagai salad dan olahan sayuran, jus bayam brasil, dan olahan keripik (Anonim, 2022). Perbanyak bayam brasil dapat dilakukan dengan mudah melalui stek batang (Teatrawan *et al*, 2022). Oleh karena konsumsi daun bayam brasil banyak dilakukan dalam wujud mentah sebagai salad, direkomendasikan dalam budidayanya untuk menggunakan pupuk organik cair (POC) (Madyaningrana *et al.*, 2022). Pemanfaatan pupuk organik cair berbasis urin domba mampu mendukung pertumbuhan bayam brasil (Madyaningrana & Prihatmo, 2022). Penggunaan pupuk organik padat berbasis ampas kopi Robusta juga berperan dalam mendukung pertumbuhan bayam brasil (Teatrawan *et al.*, 2022).



Gambar 2.1. Habitus bayam brasil (Dokumentasi pribadi, 2023)



Gambar 2.2. Morfologi bunga dan daun bayam brasil (Dokumentasi pribadi, 2023)

Berdasarkan hasil penelitian Wuni *et al.*, (2022), taksonomi bayam brasil (*Alternanthera sissoo hort*) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Divisi : Tracheophyta
Kelas : Magnoliopsida
Ordo : Caryophyllales
Famili : Amaranthaceae
Genus : Alternanthera
Spesies : *Alternanthera sissoo hort*
Nama lokal : Bayam Brasil

Bayam brasil memiliki daun berwarna hijau berbentuk bundar dan berkerut dengan lebar 2 – 3,5 cm. Bunga bayam brasil berukuran kecil dan berwarna putih. Tinggi tanaman bayam brasil berkisar antara 0,3 m – 0,4 m, sehingga berbentuk herba dengan sebaran tanaman 0,5 m – 1 m (Anonim, 2022). Bayam brasil banyak tumbuh pada lahan dengan ketinggian 5 – 200 mdpl. Dalam pertumbuhannya, bayam brasil membutuhkan kelembapan hingga 60% sehingga membutuhkan air yang memadai untuk budidayanya (Rahayu, 2022).

Bayam brasil diketahui banyak mengandung beberapa vitamin dan mineral seperti yang disajikan dalam **Tabel 2.1**.

Tabel 2.1 Kandungan gizi dalam 100 g Bayam Brasil (Limeranto, 2022)

Zat Gizi	Jumlah nutrisi
Vitamin E	70,92 mg
Vitamin A	21,69 mg
Zat besi (Fe)	12,76 mg
Vitamin C	7,68 mg

Bayam brasil mengandung senyawa seperti flavonoid, alkaloid, saponin, tanin, steroid dan (*neophytadiene* dan *phytol*) terpenoid (Limeranto, 2022; Wuni *et al.*, 2022). Bayam brasil memiliki kandungan antioksidan alami yaitu α - *Tocopheryl acetate* yang termasuk dalam isoform Vitamin E. Vitamin E

menjaga integritas membran sel dari radikal bebas dan merangsang proliferasi sel sistem imun. Vitamin E meningkatkan aktivitas sel T dan sel NK, sehingga memodulasi keseimbangan respon imun tubuh. Sistem imun dipengaruhi oleh keseimbangan nutrisi dan zat yang mengandung imunodulator dengan menaikkan ataupun menekan respon imun. Kurangnya Vitamin E dalam tubuh dapat menyebabkan jumlah limfosit dan proliferasi limpa menurun, aktivasi neutrofil untuk proses fagositosis terhambat, dan fungsi sel NK terhambat (Bendich *et al.*, 1986; Traber, 2007; Zing, 2005; O'Brien *et al.*, 2015). Vitamin A mempengaruhi pembentukan Hb karena dapat menjaga integritas jaringan epitel, termasuk endotel pada pembuluh darah (Semba & Bloem, 2002). Selain itu bayam brasil kaya akan mineral Fe yang dapat membantu dalam mencegah penyakit salah satunya anemia. Kandungan Fe dalam bayam brasil berpotensi meningkatkan kadar Hb dalam darah. Vitamin C membantu proses respon imun dalam membunuh mikroba penyebab infeksi, dan mengurangi kerusakan berlebihan jaringan inang yang disebabkan oleh apoptosis sel neutrofil dan aktivitas makrofag (Wshko *et al.*, 1993; Wilgus *et al.*, 2013). Potensi imunodulator alami dapat dikembangkan dari tanaman Bayam brasil, karena memiliki kandungan gizi dan senyawa fitokimia dengan efek farmakologis terhadap kesehatan (Wuni *et al.*, 2022).

2.1.1. Vitamin E Sebagai Imunomodulator

Vitamin E adalah istilah kolektif untuk empat senyawa tokoferol (α -, β -, γ -, dan δ -tokoferol) dan empat senyawa tokotrienol (α -, β -, γ -, dan δ -tokotrienol) yang ditemukan secara alami dalam berbagai makanan seperti kacang-kacangan, biji-bijian dan sayuran berdaun hijau (Bion *et al.*, 2003). Vitamin E berperan penting dalam menjaga kesehatan kulit, mata dan sistem imun. Vitamin E adalah salah satu nutrisi paling efektif dalam memodulasi fungsi imunitas tubuh. Vitamin E dapat larut dalam lemak, untuk melindungi kandungan membran lemak tak jenuh ganda yang tinggi terhadap kerusakan oksidatif yang dihasilkan sebagai hasil dari aktivitas metabolisme yang tinggi dan fungsi pertahanan normal (Herrero, 2013). Sel imunitas sangat bergantung pada komposisi dan struktur membran sel karena membrannya adalah situs

utama di mana sinyal eksternal diterjemahkan melalui mekanisme transduksi sinyal yang berbeda ke plasma dan nukleus untuk memodulasi gen pengatur utama. Adanya pencegahan peroksidasi lipid dan kerusakan membran sel (Traber, 2007), Vitamin E dapat membantu dalam pemeliharaan integritas membran, mempertahankan transduksi sinyal dan produksi protein kunci dan mediator lainnya dan secara langsung memengaruhi fungsi sel imun (Traber & Atkinson, 2007). Vitamin E dapat secara langsung memodulasi sifat-sifat tertentu dari membran sel, termasuk mobilitas rakit lipid, yang dapat mempengaruhi pergerakan dan aktivasi molekul pensinyalan (Lee & Han, 2018). Menurut Mustacich *et al.*, (2007) terlepas dari fungsi antioksidannya, kebutuhan vitamin E pada manusia terbatas hanya pada α - tokoferol karena bentuk lain dari vitamin E kurang dikenali oleh protein transfer α - tokoferol hepatic (TTP).

Defisiensi dan suplementasi vitamin E mempengaruhi sistem kekebalan dan peradangan melalui berbagai peran regulasi termasuk perubahan integritas membrane (Traber, 2007) dan transduksi sinyal (Zing, 2015), modulasi mediator inflamasi dan siklus sel (Han *et al.*, 2000). Suplementasi vitamin E menyebabkan peningkatan dalam imunitas tubuh. Vitamin E sebagai imomodulator dapat meningkatkan fungsi mediasi sel T, proliferasi limfosit, aktivitas sel T helper, aktivitas sel NK, kapasitas leukosit fagositik. Vitamin E dapat memodulasi mediator inflamasi seperti sitokin pro-inflamasi, termasuk IL-1 β , IL-6, dan TNF- α dari monosit khususnya sebagai respon terhadap patogen (Lewis *et al.*, 2018). Menurut Rizvi *et al.* (2014), vitamin E merangsang pertahanan tubuh, meningkatkan respons imun humoral dan sel, serta meningkatkan fungsi fagositik. Ini memiliki efek yang jelas pada penyakit menular di mana fagositosis kekebalan terlibat, tetapi kurang efektif dalam kasus pertahanan kekebalan yang dimediasi sel. Suplementasinya secara signifikan meningkatkan fungsi kekebalan yang dimediasi sel dan humoral pada manusia, terutama pada orang tua (Moris *et al.*, 2002). Asupan harian 200 mg vitamin E meningkatkan respons antibodi terhadap berbagai vaksin pada subjek sehat yang tidak menunjukkan efek samping yang merugikan terhadap

suplementasi vitamin E. Selain dari makanan, suplementasi vitamin E didapatkan dari konsumsi vitamin E dari kapsul dan tablet. Suplementasi vitamin E perlu berkonsultasi dengan ahli kesehatan karena dapat menyebabkan efek samping, sehingga pentingnya mendapatkan vitamin E dari sumber makanan alami dengan mengkonsumsi secukupnya (NIH, 2010). *Food and Nutrition Board* atau FNB (2017) telah menetapkan *upper intake levels* (Uls) untuk vitamin E berdasarkan potensi efek hemoragik yang berlaku untuk semua bentuk α -tokoferol sintentik (Tabel 2.2) dan asupan harian maksimum vitamin E oleh seseorang tidak mungkin menyebabkan efek yang merugikan kesehatan.

Tabel 2.2. Batas toleransi maksimal konsumsi vitamin E (FNB, 2017)

Usia	Laki-laki	Perempuan
1-3 TANUN	200 mg	200 mg
4-8 tahun	300 mg	300 mg
9-13 tahun	600 mg	600 mg
14-18 tahun	800 mg	800 mg
≥19 tahun	1.000 mg	1.000 mg

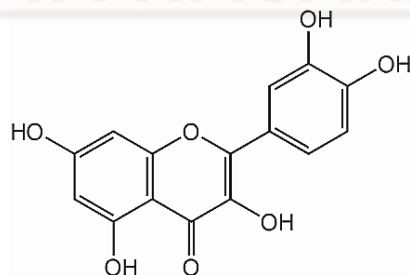
2.1.2. Aktivitas Farmakologi Flavonoid

Flavonoid termasuk dalam golongan senyawa fenolik alami yang ditemukan dalam bentuk glikosida pada buah-buahan, dan sayuran. Flavonoid memiliki struktur kimia 15 karbon yang dibentuk oleh kerangka umum fenil-benzo- γ -pyran (C6–C3–C6), juga dikenal sebagai flava inti, terdiri dari dua cincin fenil (A dan B) dan cincin heterosiklik (pyran) C D'Amelia *et al.*, 2018). Flavonoid mencakup senyawa flavonol, flavon, flavonoid, flavanon, *anthocyanidins*, dan *isoflavone*. Keberadaan senyawa flavonoid pada tumbuhan memberikan perlindungan dari radiasi UV pertahanan dari tekanan abiotik dan dari fitopatogen bakteri dan jamur (Kumar & Pandey, 2013).

Flavonoid berperan penting dalam pencegahan berbagai penyakit yang berkaitan dengan sifat farmakokinetik dan farmakodinamik stres oksidatif (Chen *et al.*, 2004). Aktivitas sebagai penangkal radikal bebas ini disebabkan oleh fakta bahwa flavonoid memiliki struktur stabil yang memungkinkan redaman radikal bebas yang sangat reaktif, menjadi radikal peroksil yang

kurang reaktif. Penekanan oksidan ini terjadi dengan menyumbangkan elektron atau atom hidrogen dari hidroksil bebas, sehingga memainkan peran moderat dalam penyebaran kerusakan akibat radikal dalam sistem biologis, tetapi lebih kuat daripada vitamin dan karotenoid bersama dengan efek sinergis yang telah ditunjukkan (Gantt *et al.*, 2011; Kumar & Pandey, 2013). Aktivitas antioksidan dari flavonoid ini mendukung kontrol radikal yang berlebihan yang disebabkan oleh proses inflamasi yang terkait dengan berbagai gangguan neurodegeneratif, imunologis (Lluis & Moales, 2008; Lan *et al.*, 2013). Aktivitas flavonoid dalam respon inflamasi meliputi penghambatan mediator inflamasi seperti reactive oxygen species (ROS) dan nitric oxide (NO); pengaturan aktivitas enzim inflamasi, seperti siklooksigenase (COXs) dan nitric oxide synthase (iNOS) yang dapat diinduksi; penurunan tingkat produksi dan ekspresi sitokin dan modulasi faktor transkripsi (Ribeiro *et al.*, 2015).

Quercetin adalah jenis flavonoid golongan flavonol dengan gugus keton dan gugus hidroksil. Aktivitas farmakologis yang dimiliki golongan flavonol sebagai antioksidan (Xiao *et al.*, 2011). *Quercetin* dan glikosidanya berada dalam jumlah 60-70% dari flavonoid dan banyak terdapat dalam tanaman sehingga banyak dijadikan sebagai senyawa standar untuk mendeteksi flavonoid total (Kumar & Pandey, 2013). Pada saat adanya penyakit infeksi, sitokin pro-inflamasi sebagai mediator berkontribusi terhadap stres oksidatif sehingga memicu patogenesis. *Quercetin* dapat mengaktifkan jalur antioksidan yang memberikan efek anti-inflamasi dan penanda stres oksidatif. Antioksidan melindungi sel-sel dari kerusakan akibat stres oksidatif (radikal bebas) dalam suatu jaringan yang dapat memicu inflamasi dan penyakit (Jin *et al.*, 2016).



Gambar 2.3. Struktur Kimia *Quercetin* (NCBI, 2023)

2.2.Sistem Imun Tubuh

Sistem imun melindungi tubuh dari serangan bakteri, virus, jamur, zat toksin yang dapat menyebabkan penyakit. Sistem imun terdiri dari berbagai organ, sel dan biomolekul yang saling bersinergi. Berdasarkan mekanisme reaksi dan jenis komponen imunitas yang terlibat, sistem imun terbagi menjadi *innate immunity* (respon imun bawaan) dan *adaptive immunity* (respon imun adaptif) (Delves & Ivan, 2000).

Imunitas bawaan memiliki mekanisme respon imun yang cepat dalam beberapa menit atau jam setelah tubuh terinfeksi substansi asing, dan tidak memiliki memori imunologi yaitu mekanisme pertahanan *antigen-independen* (non-spesifik) sehingga tidak dapat mengenali patogen infeksi yang sama. Respon imun bawaan yang mampu melawan substansi asing membuat tubuh tidak mengalami sakit dan nyeri, namun ketika imun bawaan tidak mampu melawan susbtansi asing tersebut akan dilanjutkan ke fase respon imun adaptif. Respon imun adaptif mendeteksi adanya antigen asing, kemudian melawan dengan melepaskan antibodi. Proses fagositosis oleh makrofag, leukosit dan sel NK akan menelan dan mencerna substansi asing. Respon imun bawaan juga bekerja melalui reaksi inflamasi yang diakibatkan terlepasnya mediator seperti histamin, interferon, *vasoactive amine* dan *anafilatoksin* sehingga sel leukosit *polymorfonuklear* (PMN) bergerak menuju tempat terjadinya peradangan untuk mengatasi sumber peradangan (Delves & Ivan, 2000; Steinman, 2012; Abbas *et al.*, 2016).

Imunitas adaptif bergantung pada antigen yang dihantarkan oleh sel penyaji sehingga membutuhkan jeda waktu antara proses paparan antigen dan respon maksimal. Sistem imun adaptif membantu membuat antibodi untuk melindungi tubuh dari patogen (Cooper & Alder, 2006). Respon imun adaptif dilakukan oleh limfosit, yaitu sel B dan sel T. Sel B diaktifkan untuk menghasilkan antibodi, yaitu protein yang disebut imunoglobulin. Antibodi akan bersirkulasi dalam aliran dah dan berikatan secara khusus dengan antigen asing, sehingga sumber infeksi dihancurkan dan mempermudah proses fagositosis. Sel T dapat membunuh sel yang terinfeksi sebelum dapat bereplikasi, serta menghasilkan

molekul sinyal yang mengaktifkan makrofag untuk fagositosis sumber infeksi (Alberts *et al.*, 2002). Respon imunitas bawaan bersifat cepat tetapi terkadang merusak jaringan normal karena kurangnya spesifisitas, sedangkan respon imunitas adaptif bersifat tepat, tetapi membutuhkan beberapa hari atau minggu untuk berkembang (Warrinton *et al.*, 2011).

Komponen sistem imun terdiri dari komponen berupa sel dan komponen yang bukan merupakan sel (non sel). Komponen sel imun pada umumnya terdiri dari sel-sel leukosit seperti neutrofil, monosit atau makrofag, eosinophil, basophil dan limfosit. Pada imunitas bawaan, sel leukosit yang banyak berperan adalah neutrofil dan monosit atau makrofag dengan fitur utama berupa fagositosis. Komponen non sel banyak terdiri dari biomolekul protein fungsional seperti *acute phase reactants* (APR), antibodi dan sitokin (Abbas *et al.*, 2016). APR adalah protein yang disintesis oleh hepar yang mengalami peningkatan konsentrasi dalam serum darah selama inflamasi terjadi (Jain *et al.*, 2011). Sitokin adalah protein yang dihasilkan oleh sel yang berkerja secara spesifik pada interaksi dan komunikasi antar sel (Zhang & An, 2007). Antibodi atau imunoglobulin (Ig) adalah glikoprotein yang diproduksi sel B yang akan berinteraksi dengan antigen spesifik sehingga sumber infeksi dapat dihancurkan dan difagositosis dengan mudah.

2.2.1. Leukosit

Leukosit berperan melawan infeksi dalam tubuh yang disebabkan oleh virus, bakteri ataupun proses metabolik toksin. Nilai rujukan pada leukosit pada manusia yaitu 4.700 – 11.300/cmm (Riley & Rupert, 2015). Umumnya bila terjadi penurunan kadar leukosit dibawah nilai rujukan ditemukan pada penyakit akibat infeksi virus dan sumsum tulang, sedangkan peningkatan kadar leukosit terjadi pada infeksi bakteri, inflamasi kronis, leukimia, gagal ginjal dan lain sebagainya (Abbas *et al.*, 2018; Firani, 2018). Ada tiga jenis leukosit inflamasi yaitu monosit, neutrofil dan limfosit.

a. Monosit

Monosit merupakan jenis leukosit yang menemukan, menghancurkan sumber infeksi, menghilangkan sel yang terinfeksi melalui proses

fagositosis (Abbas *et al.*, 20. Makrofag adalah bentuk dewasa dari monosit yang menetap di jaringan. Makrofag dapat menghancurkan antigen melalui proses fagositosis, melepaskan persinyalan inflamasi ke sel imun lain untuk membantu menghancurkan antigen, serta sebagai APC yang menyajikan antigen kepada sel T (Fujiwara & Kobayashi, 2005; Gonzalez & Cordoba, 2012).

b. Neutrofil

Neutrofil merupakan jenis leukosit yang membantu tubuh melawan infeksi dengan mendatangi sumber infeksi, kemudian menelap dan melepaskan enzim yang membunuh sumber infeksi. Komposisi neutrofil dalam darah sebesar 50-80%. Neutrofil dapat meningkatkan respon sel imun lainnya. Neutrofil termasuk dalam jenis granulosit, bersama dengan eosinofil dan basofil. Neutrofil diproduksi di sumsum tulang dan bermigrasi melalui sistem sirkulasi ke dalam darah dan jaringan (Peters, 1998; Ward, 1999)

c. Limfosit

Limfosit merupakan jenis leukosit yang membantu dalam melawan penyakit dan infeksi. Limfosit diproduksi di sumsum tulang dan ditemukan di dalam darah dan jaringan getah bening. Komposisi limfosit dalam darah sebesar 20-40%. Dua jenis limfosit yang dimiliki oleh tubuh mamalia adalah limfosit B dan limfosit T. Limfosit B membuat antibodi. Antibodi adalah protein yang menargetkan sumber infeksi seperti virus, bakteri dan lainnya. Limfosit T mengontrol respon imun, serta menyerang dan membunuh sel yang terinfeksi dan sel tumor (Gonzalez & Cordoba, 2012).

2.2.2. Protein C-Reactive (CRP)

Protein C-*Reactive* (CRP) adalah protein fase akut yang disintesis oleh hati. Saat agen infeksius mengancam kesehatan tubuh, respon inflamasi terjadi, hati akan lebih banyak melepaskan CRP ke dalam sistem sirkulasi darah untuk membantu mengatur pertahanan tubuh. Kadar CRP akan meningkat sebagai respon terhadap inflamasi CRP diinduksi oleh aksi IL-6 yang termasuk dalam sitokin pro-inflamasi. Terdeteksinya CRP dalam jumlah tinggi memperlihatkan ada dan keparahan

inflamasi, sehingga tes CRP menjadi *marker* inflamasi yang mendeteksi atau memantau kondisi kesehatan yang berhubungan dengan respon inflamasi (Nemeth *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2014).

2.3. Complete Freund's Adjuvant (CFA)

Complete Freund's Adjuvant adalah suspensi mycobacterium kering dalam minyak parafin dan mannide monooleate yang menginduksi peradangan, nekrosis jaringan, dan ulserasi. Ini dapat digunakan secara subkutan di kaki, atau intraperitoneal pada mencit. Oleh karena dampaknya terhadap tingginya nekrosis jaringan. Injeksi CFA intraperitoneal pada mencit maksimal 0,25 mL, secara subkutan sebanyak 0,1 mL (Hanlon *et al.*, 2010). Gunakan jarum 30-gauge 0,5 in. pada semprit 1 mL. Induksi CFA akan memediasi respon imun berupa reaksi inflamasi terhadap antigen asing. CFA dapat menyebabkan peradangan di tempat injeksi, sehingga berpotensi menyebabkan komplikasi penyakit. Apabila injeksi secara intramaskular, emulsi dapat menyebar ke otot atau organ pada hewan laboratorium (Fox *et al.*, 2010). Induksi sel darah merah domba (SDMD) paling umum digunakan untuk melihat modulasi imun SDMD mudah diperoleh, suspensi seragam, serta termasuk antigen polivalen (Wang *et al.*, 2000). Namun induksi SDMD kurang dalam memberikan efek inflamasi (Djama, 2022) dibandingkan penggunaan bakteri seperti CFA. Semakin asing antigen yang diinjeksikan maka semakin efektif menimbulkan respon imun (Suhirman & Winarti, 2010).

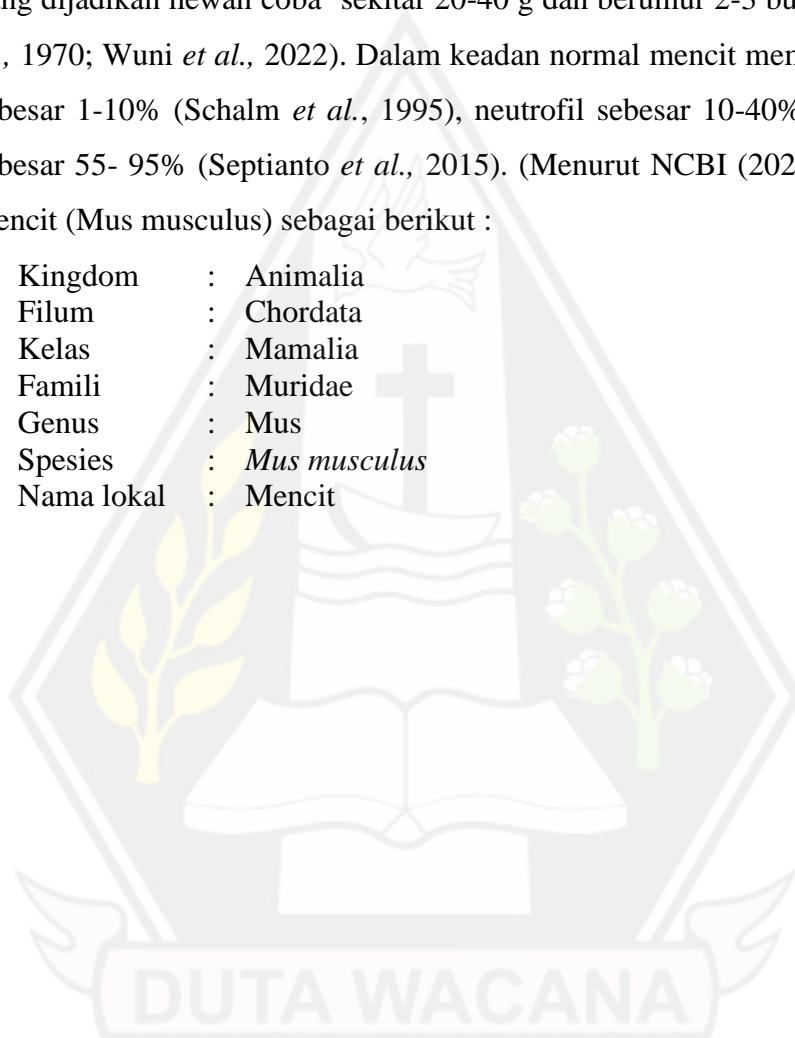
2.4. Mencit (*Mus musculus*)

Mencit (Mus musculus L.) adalah organisme model eksperimental yang memungkinkan strategi paling beragam untuk menilai peran gen spesifik dan manifestasi fenotipik dari variasi genetik pada mamalia. Mencit memiliki banyak kesamaan anatomi dan fisiologis dengan manusia. Kemiripan ini meliputi embriologi, metabolisme, dan fisiologi sistem organ utama termasuk otak. Kelebihan mencit sebagai hewan laboratorium lainnya yaitu siklus hidup relatif pendek, tingkat natalitas tinggi, diversitas sifat tinggi, mudah di *handling*. Mencit jantan umumnya dijadikan hewan coba, hal ini dikarenakan

tidak mengalami siklus estrus yang menyebabkan variabilitas data, sehingga sampel menjadi lebih homogen, mudah dikendalikan dan hasilnya diharapkan lebih akurat (Planza *et al.*, 2001; Robinson *et al.*, 2002).

Mencit termasuk dalam famili Murideae dan termasuk dalam hewan crepuscular yaitu aktif saat sore dan malam hari. Berat mencit jantan dewasa yang dijadikan hewan coba` sekitar 20-40 g dan berumur 2-3 bulan (Dubey *et al.*, 1970; Wuni *et al.*, 2022). Dalam keadaan normal mencit memiliki monosit sebesar 1-10% (Schalm *et al.*, 1995), neutrofil sebesar 10-40% dan limfosit sebesar 55- 95% (Septianto *et al.*, 2015). (Menurut NCBI (2023), klasifikasi mencit (*Mus musculus*) sebagai berikut :

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Famili	: Muridae
Genus	: Mus
Spesies	: <i>Mus musculus</i>
Nama lokal	: Mencit



BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Waktu pelaksanaan penelitian berlangsung selama 4 bulan yaitu Maret – Juni 2023. Penelitian dilakukan di Laboratorium Fakultas Bioteknologi Universitas Kristen Duta Wacana, Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi UGM.

3.2. Bahan

Daun bayam brasil (*Alternanthera sissoo hort*) sebagai bahan penelitian yang diambil dari Omah Paseduluran di Jl. Niron, Padowoharjo, Kec. Sleman, Yogyakarta dan KTD Gemah Ripah di Jln. Margo Mulyo No. 94, Kec. Gondokusuman, Yogyakarta. Daun bayam brasil tersebut berasal dari bibit yang sama, walaupun dari dua tempat berbeda. Air bersih untuk sortasi basah, etanol 96% (Merck, Jerman) sebagai pelarut dalam maserasi dan skrining fitokimia, aquades steril (Otsuka, Indonesia) sebagai pelarut dalam *treatment* oral, kertas saring dan kain mori (Indonesia) sebagai filter larutan. Senyawa skrining kualitatif fitokimia (HCl pekat, Mg bubuk, HCl 2N, NaCl, reagen mayer, reagen wagner, NaCl 10%, FeCl₃ 1%, gelatin 1%, H₂SO₄ pekat. Senyawa skrining flavonoid total (larutan standar *quercetin*, AlCl₃ 2%, CH₃CO₂K 0,12 M), minyak imersi (Merck, Jerman), aquadest (General labora, Indonesia), pakan mecit, serbuk kayu, *complete freund's adjuvant* (CFA) (Sigma, Amerika), Metanol (Merck, Jerman) untuk fiksasi sampel HDT, Giemsa (Merck, Jerman) untuk pewarnaan sampel HDT, *C-reactive protein (CRP) latex kit 100T (Glory® Diagnostics, Spanyol)*, eter, kloroform, vitamin E 200 IU (IPI, Indonesia), formalin 10%. Hewan coba yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) BALB/c jantan dengan BB 20-30 g dan berumur 2-3 bulan yang diperoleh dari Peternakan Hewan Uji Abadi Jaya.

3.3. Alat

Timbangan analitik, oven (Cosmos, Indonesia), blender (Miyako, Indonesia), pengaduk, corong, toples kaca ukuran 15 x 25 cm sebagai wadah maserasi, gelas ukur (Pyrex, Indonesia), gelas beaker, tabung reaksi (IWAKI, Jepang), propipet, pipet ukur 10 mL, mikropipet ukuran 10 μ l - 1000 μ l, mikropipet tip, mikrotube 1,5 ml PCR tube eppendorf (Onemed, Indonesia), *vacum rotar evaporator* (Cina), kamera mikroskop (Optilab, Indonesia), *vortex mixer* (Gemmy, Taiwan), mikroskop (Olympus, Jepang), pipet tetes, kaca preparat (OneMed, Indonesia), botol vial (General labora, Indonesia), sonde menceit, *needle 26G* (OneMed, Indoneisa), *Micro haematocrit* (Vitrex, Indonesia) alat *centrifuge, chamber*, kandang menceit, *terumo syringe* ukuran 1 ml, tempat pakan dan minum menceit, parafin, gunting bedah, *scalpel*, spektrofotometer (Thermo Scientific, US).

3.4. Cara Kerja

3.4.1. Pembuatan Serbuk Simplisia

Daun bayam brasil (*Alternanthera sissoo*) diambil dan dilakukan sortasi basah untuk menghilangkan kotoran yang melekat dengan air mengalir. Proses sortasi basah dilakukan secukupnya dan tanpa perendaman terlalu lama agar senyawa yang terdapat dalam daun bayam brasil tidak larut dalam air yang dapat menyebabkan penurunan mutu simplisia. Daun bayam brasil yang telah bersih dirajang dan dikeringkan dengan oven pada suhu 60°C hingga kadar air $\leq 10\%$ (Laksana, 2010). Pengeringan dilakukan untuk mengurangi kadar air sehingga dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme yang tidak diinginkan pada simplisia. Pengeringan dengan suhu lebih dari $>60^\circ\text{C}$, dapat menurunkan mutu fitokimia dari simplisia, salah satunya flavonoid (Warnis *et al.*, 2000). Serbuk simplisia bayam brasil diperoleh dengan menghaluskan daun bayam brasil menggunakan blender.

3.4.2. Pembuatan Ekstrak Etanol Bayam Brasil (*Alternanthera sissoo hort*)

Sebanyak 600 g simplisia daun bayam brasil ditimbang menggunakan

timbangan analitik dan dilarutkan dalam wadah maserasi dengan ditambahkan solvent etanol 96% sebanyak 2L dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah 24 jam, disaring untuk memisahkan filtrat dan ampas menggunakan kain mori. Ampas simplisia diremaserasi dengan solvent etanol 96% selama 2 x 24 jam. Ekstrak kental diuapkan dengan *rotary evaporator* dan dioven pada suhu 40°C sehingga didapatkan ekstrak berbentuk pasta (Depkes, 2000). Hasil ekstrak kental dihitung nilai rendemen (Whika *et al.*, 2017) :

$$\text{Rendemen} : \frac{\text{Bobot ekstrak (Akhir)}}{\text{Bobot ekstrak (Awal)}} \times 100\%$$

3.4.3. *Screening* Fitokimia

Metode *screening* fitokimia yang dilakukan berdasarkan Harborne (1987) yaitu :

1. Uji Flavonoid

Sebanyak 0,2 g EEBB dilarutkan dalam 4 mL akuades kemudian disaring. Larutan filtrat dibagi 2 pada tabung reaksi berbeda, yaitu A dan B. Larutan A ditambahkan 3 tetes HCL pekat dan 0,1 g Mg bubuk, kemudian digojog pelan. Hasil positif mengandung flavonoid ditandai terbentuknya warna kuning, jingga hingga merah. Larutan B dijadikan sebagai blanko (Harborne, 1987).

2. Uji Alkaloid

Sebanyak 0,2 g EEBB dilarutkan dalam 6 ml akudes. Larutan disaring dan dibagi kedalam 3 tabung reaksi (A,B,C). Tabung reaksi A berisi ditambahkan reagen weagner, B sebagai blanko, dan C ditambahkan reagen Mayer. Hasil positif alkaloid ditandai dengan adanya endapan (Harbone, 1987).

3. Uji Tanin

Sebanyak 0,2 g EEBB ditambahkan 10 mL akuades panas, kemudian didinginkan. Larutan ditambahkan 5 tetes NaCl 10% dan dihomogenkan kemudian disaring. Hasil filtrat dibagi menjadi 2 yaitu A dan B. Larutan A ditambahkan 3 tetes FeCl₃ 1%, sedangkan larutan B dijadikan sebagai blanko. Hasil positif berwarna biru kehitaman atau hijau kehitaman yang

menandakan adanya senyawa tanin (Harborne, 1987).

4. Uji Saponin

Sebanyak 0,2 g EEBC ditambahkan 5 ml akuades panas, kemudian dikocok kuat hingga muncul buih setinggi 1-10 cm yang menandakan adanya saponin (Harborne, 1987).

5. Uji Steroid dan Terpenoid

Sebanyak 0,2 g EEBC dilarutkan dalam 15 mL etanol 96% kemudian dibagi menjadi 3 yaitu A, dan B. Larutan A ditambahkan 3 tetes asetat anhidrat dan 1 tetes H₂SO₄ pekat, kemudian digojog pelan. Hasil positif terbentuknya warna hijau biru yang menunjukkan adanya senyawa steroid, sedangkan warna merah keunguan adanya senyawa terpenoid. Larutan B dijadikan sebagai blanko (Harborne, 1987).

3.4.4. Analisa Kadar Vitamin E pada Ekstrak Etanol Bayam Brasil (*Alternanthera sissoo hort*)

Ekstrak etanol daun bayam brasil (*Alternanthera sissoo hort*) diuji vitamin E di Pusat Studi Pangan dan Gizi UGM, Jl. Teknika Utara, Caturtunggal, Yogyakarta. Sampel dimasukkan kedalam botol sampel kemudian di tutup rapat, bagian luar tutup botol sampel di lapisi *plastic wrap*, kemudian dilapisi menggunakan alumunium foil hal ini dilakukan agar sampel tetap terjaga mutunya. Sampel diberi label dengan kode EEBC (Ekstrak Etanol Bayam Brasil). Analisa kadar vitamin E dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis di Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi UGM, Yogyakarta.

3.4.5. Analisa Kadar Flavonoid Total pada Ekstrak Etanol Bayam Brasil (*Alternanthera sissoo hort*)

1. Pembuatan Larutan Standar *Quercetin*

Sebanyak 20 mg *quercetin* ditimbang untuk larutan stok dan dilarutkan dalam 20 mL etanol 96%. Larutan stok diambil sebanyak 5 mL dan ditambahkan etanol 96% hingga mencapai volume 50 mL pada labu ukur untuk konsentrasi 100 ppm. Dari 100 ppm larutan standar *quercetin*, dibuat

konsentrasi 2 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, 12 ppm, dan 14 ppm. Masing-masing konsentrasi larutan standar *quercetin* diambil sebanyak 1 ml, kemudian ditambahkan AlCl₃ 2% sebanyak 1 ml, dan CH₃CO₂K 0,12 M sebanyak 1 ml. Larutan diinkubasi kemudian 60 menit dan dihitung nilai absorbansi di spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 435 nm (Aminah *et al.*, 2017).

2. Pembuatan Larutan Sampel

Ekstrak etanol bayam brasil (EEBB) ditimbang sebanyak 1 mg dan dilarutkan dalam 10 mL etanol 96%. Sebanyak 1 ml sampel EEBB ditambahkan AlCl₃ 2% sebanyak 1 ml, dan CH₃CO₂K 0,12 M sebanyak 1 ml, kemudian selama 60 menit diinkubasi dan dihitung nilai absorbansi di spektro UV-Vis pada panjang gelombang 435 nm. Sampel dibuat dalam tiga pengulangan dan dianalisis sehingga diperoleh rata-rata nilai absorbansi (Aminah *et al.*, 2017). Konsentrasi flavonoid (mg/L) didapatkan dari substitusi persamaan kurva larutan *quercetin*. Rumus perhitungan kadar flavonoid total sebagai berikut (Chotimah, 2019) :

$$F = \frac{c \times v}{m}$$

Keterangan :

F = kadar flavonoid total (mg QE/g)

c = konsentrasi flavonoid (mg/L)

v = volume (L)

m = massa EEBB (ekstrak etanol bayam brasil)

3.4.6. Perlakuan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) BALB/c jantan dengan BB 20-30 g dan berumur 2-3 bulan yang diperoleh dari Peternakan Hewan Uji Abadi Jaya, Yogyakarta. Mencit yang digunakan diaklimatisasi selama 7 hari untuk mencegah adanya stres pada hewan coba terhadap lingkungan baru, yaitu Laboratorium Kesehatan Universitas Kristen Duta Wacana. Penelitian dilakukan berdasarkan izin *Ethical Clearance* (EC) dengan Etik Nomor : 1530/C.16/FK/2023 dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Duta Wacana (**Lampiran 20**). Mencit diberikan pakan dan minum secara *ad libitum*

(Djama, 2021; Wuni *et al.*, 2022). Menurut Mutirahmi *et al.* (2021), penggunaan mencit dengan memperhatikan prinsip dari *animal welfare*. Mencit yang digunakan sebanyak 24 ekor yang ditentukan rumus *Freedere* (**Lampiran 7.**) sehingga hewan coba yang digunakan untuk 6 kelompok yaitu 4 ekor per kelompok uji. *Treatment* dilakukan secara peroral 1 x 1 hari selama 7 hari, dengan rumus perhitungan konversi dosis Liu dan Fan (2017) sebagai berikut :

$$\frac{A \text{ (hewan)}}{B \text{ (manusia)}} = \frac{KmB}{Km A}$$

Tabel 3.1. Kelompok uji dan dosis

Kelompok Uji	Keterangan
Kontrol sehat (KS)	Tanpa perlakuan
Kontrol negatif (KN)	Induksi 0,1 mL CFA ; diberi akuades steril secara oral (0,5 ml)
Kontrol Positif (KP)	Induksi 0,1 mL CFA; diberi vitamin E 200 IU (1,67 mg/g BB) secara oral.
EEBB1	Induksi 0,1 mL CFA; diberi ekstrak etanol bayam brasil (209,25 mg/g BB) secara oral
EEBB2	Induksi 0,1 mL CFA; diberi ekstrak etanol bayam brasil (418,5 mg/g BB) secara oral
EEBB3	Induksi 0,1 mL CFA; diberi ekstrak etanol bayam brasil (627,75 mg/g BB) secara oral

3.4.7. Uji In Vivo

3.4.7.1. Jumlah Leukosit Inflamasi dengan Hapusan Darah Tepi (HDT)

Mencit dianestesi inhalasi menggunakan eter. Sampel darah mencit diambil dari sinus orbitalis dengan tabung hematokrit hingga darah keluar. Darah yang keluar dimasukkan kedalam mikrotube. Sampel darah yang diambil sebanyak 0,2 ml. Sebelum sampel darah membeku, segera dipipet sebanyak 5 μ L dan diteteskan pada kaca preparat, kemudian dilakukan hapusan darah. Sampel hapusan darah te dikeringkan, kemudian difiksasi dengan metanol selama 5 menit. Sampel HDT diwarnai dengan larutan giemsa

hingga seluruh bagian sampel tertutupi giemsa selama 30 menit. Setelah 30 menit, sampel dibilas dengan akuades dan dikeringkan. Jenis leukosit yang dihitung adalah monosit, limfosit dan neutrofil untuk melihat respon imun berupa inflamasi. Sampel HDT diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000x. Sampel HDT yang dibuat yaitu pada hari ke-0, hari ke-3 dan hari ke-7. Perhitungan nilai relatif sel didasarkan pada formulai sebagai berikut (Aldi *et al.*, 2016) :

$$\text{Jumlah Sel} : \frac{\text{Jumlah Jenis Sel}}{100 \text{ sel leukosit}} \times 100\%$$

3.4.7.2. Pemeriksaan C-Reactive Protein (CRP) dengan Aglutinasi

Sampel darah diambil melalui sinus orbitalis dan dimasukkan ke dalam *microtube*, kemudian disentrifuge dengan kecepatan 4000 rpm selama 15 menit untuk mendapatkan serum darah. Serum darah (50 μ L), kontrol positif, kontrol negatif masing- masing dipipet ke atas lingkaran *slide* CRP. Reagen CRP ditetaskan ke atas lingkaran *slide* CRP, kemudian dihomogenkan dengan memutar kertas uji CRP tersebut. Hasil dibaca dan dilihat aglutinasi yang terjadi. Hasil positif ditanyai ada terbentuknya aglutinasi, sedangkan hasil negatif tidak tebentuk aglutinasi. Serum darah yang tidak langsung dianalisa dapat disimpan pada suhu 20°C (Kalma, 2018; Silvia, 2021).

3.4.7.3. Perhitungan Nilai Indeks Timus, Limpa dan Hepar

Pada hari ke 7, hewan coba diinhalasi dengan kloroform hingga pingsan, kemudian dibedah untuk diambil organ limpa yang berada disebelah kiri rongga perut dan kelenjar timus yang berada di mediastinum menggunakan pinset, dan dibersihkan dari pengotor berupa lemak dan lainnya. Organ limpa dan kelenjar timus ditimbang dengan timbangan analitik. Penghtiungan nilai indeks organ didasarkan pada formula sebagai berikut (Aldi *et al.*, 2016):

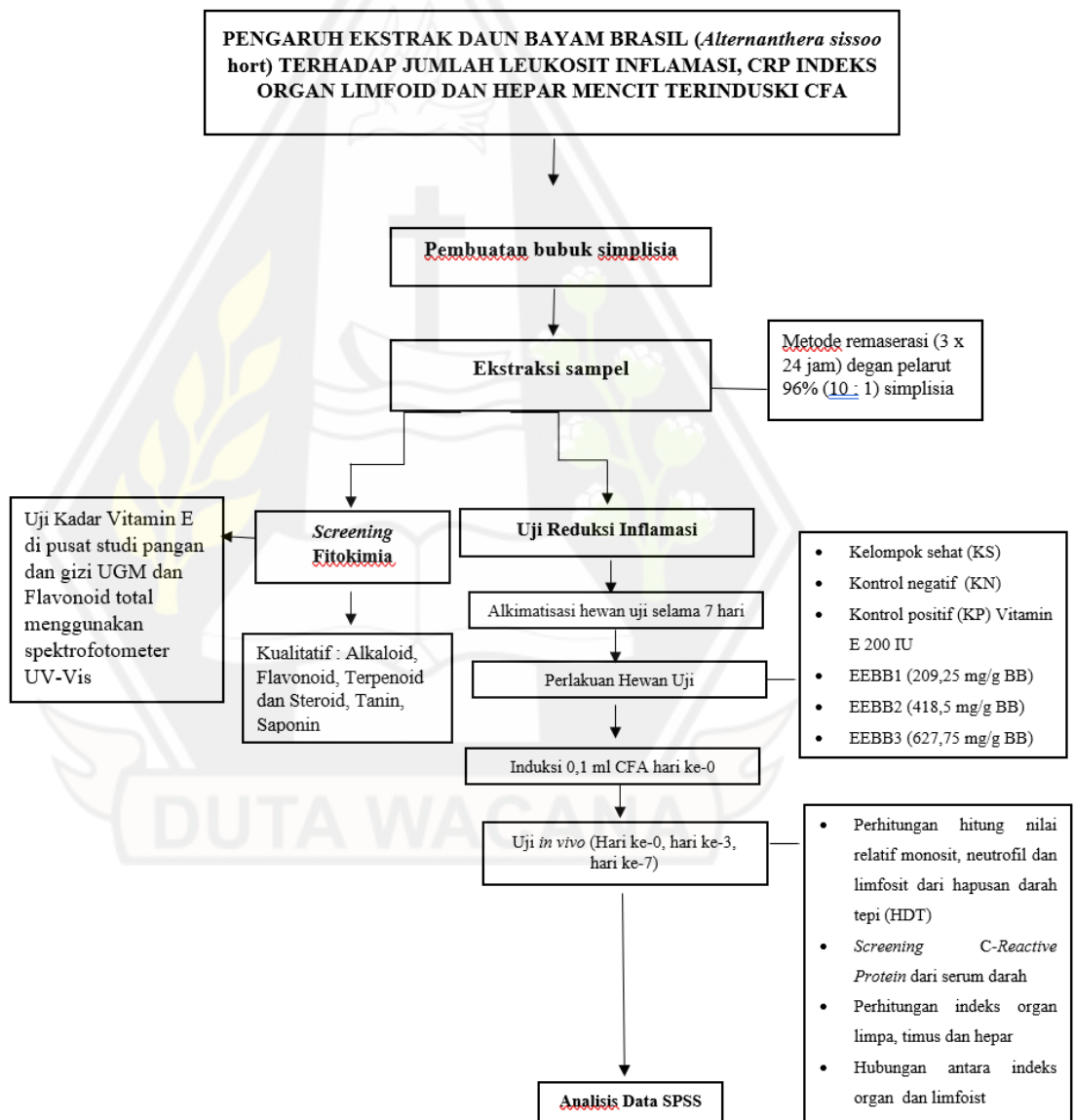
$$\text{Indeks organ} : \frac{\text{berat organ (g)}}{\text{berat badan akhir (g)}} \times 100\%$$

3.5. Analisa Data

Data hasil penelitian diolah dengan uji statistik Analysis of Variance

(ANOVA) menggunakan piranti lunak SPSS 25 dan memiliki taraf kepercayaan 95%, untuk mengetahui perbedaan signifikan yang ditunjukkan dengan nilai $P < 0,05$. Uji ANOVA diperlukan pemenuhan syarat yaitu data sudah berdistribusi normal dan homogen. Jika didapatkan perbedaan signifikan antar kelompok uji, maka dilanjutkan uji Post Hoc Duncan's. Uji korelasi hubungan antara nilai relatif limfosit indeks organ limpa dan timus menggunakan analisis regresi di piranti lunak MS. Excel 2010.

3.6. Bagan Alir Penelitian



BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Ekstrak Etanol Daun Bayam Brasil (*Alternanthera sissoo hort*)

Ekstraksi daun bayam brasil dilakukan dengan metode maserasi melalui perendaman bubuk simplisia dengan pelarut organik pada suhu ruang. Penggunaan maserasi dalam ekstraksi bayam brasil karena metode ekstraksi sederhana, proses maserasi dilakukan tidak pada suhu tinggi sehingga dapat mencegah terurainya fitokimia yang terkandung dalam bayam brasil, dan selama proses perendam terjadi ketidakseimbangan tekanan osmosis didalam dan diluar sel sehingga dinding sel bayam brasil mengalami lisis dan fitokimia dari sitoplasma terlarut (Wendersteyt *et al.*, 2021).



Gambar 4.1 Ekstrak daun bayam brasil (*Alternanthera sissoo hort*)

Maserasi dilakukan dengan merendam bubuk simplisia bayam brasil sebanyak 600 g dan dilarutkan dengan 96%. Perbandingan antara pelarut dan simplisia yaitu 10 : 1. Pemilihan etanol 96% yang bersifat polar dan *universal* sehingga lebih mudah larut dan masuk ke dalam dinding sel bayam brasil dan dapat melarutkan fitokimia yang terkandung dalam bayam brasil, pelarut yang selektif yang dapat menghambat mikroba, dan tidak toksik. Ekstrak etanol bayam brasil (EEBB) dengan pelarut 96% yang dihasilkan

lebih kental dibandingkan dengan pelarut etanol dengan konsentrasi dibawahnya, karena kandungan air di etanol 96% lebih sedikit (Husna *et al.*, 2018). Maserasi dilakukan selama 3 x 24 jam dengan remaserasi sebanyak dua kali sehingga fitokimia yang masih tersisa dari maserasi pertama dapat seluruhnya terekstraksi. Etanol 96% yang terdapat dalam hasil ekstrak diuapkan dengan *rotary evaporator*, kemudian ekstrak dikentalkan di oven dengan suhu 40°C. Hasil EEBB yang didapatkan bertekstur pasta dan berwarna hijau tua pekat (**Gambar 4.1**).

Penelitian ini mendapatkan ekstrak etanol daun bayam brasil sebanyak 84 g dengan nilai rendemen 14% (**Lampiran 3**). Wuni *et al.* (2022) dalam penelitiannya mengukur nilai rendemen daun bayam brasil yang menggunakan metode maserasi untuk 1 kg bubuk simplisia selama 5 hari dengan pengadukan dan pelarut etanol 96%. Nilai rendemen yang diperoleh dalam penelitian tersebut sebesar 12,3%. Nilai rendemen EEBB yang diperoleh dari hasil remaserasi lebih tinggi dibandingkan rendemen EEBB hasil maserasi. Hal ini dikarenakan dalam proses remaserasi terdapat penggantian pelarut etanol 96% yang menyebabkan tingginya ketidakseimbangan tekanan osmosis sehingga sel lisis terjadi secara berkala dan meningkatkan akumulasi fitokimia terlarut dari sitoplasma daun bayam brasil. Perbedaan durasi ekstraksi tidak memberikan pengaruh terhadap jumlah rendemen yang dihasilkan.

4.2. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia ekstrak etanol bayam brasil (EEBB) dilakukan untuk mengidentifikasi kandungan flavonoid, alkaloid, tanin, fenolik, saponin, terpenoid dan steroid. Deteksi ini dilakukan secara kualitatif menggunakan reagen berdasarkan metode Harbone (1987). Hasil skrining kualitatif fitokimia EEBB (**Tabel 4.1**) menunjukkan keberadaan senyawa flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, steroid. Hasil skrining fitokimia sesuai dengan penelitian Wuni *et al.* (2022) yang menunjukkan dalam EEBB terdapat flavonoid, alkaloid, saponin, tanin dan steroid karena menggunakan pelarut yang sama yaitu etanol 96% sehingga fitokimia yang terlarut sama. Hasil ini

juga menunjukkan bahwa perbedaan metode ekstraksi tidak mempengaruhi kandungan fitokimia EEBB. Hasil skring fitokimia kualitatif dari EEBB dalam penelitian ini disajikan dalam Tabel 4.1 :

Tabel 4.1 Hasil fitokimia kualitatif ekstrak etanol bayam brasil

Jenis Fitokimia	Hasil (+/-)	Keterangan
Flavonoid	+	Perubahan warna merah
Alkaloid Weagner	+	Terbentuk edapan coklat
Alkaloid Meyer	+	Terbentuk endapan
Saponin	+	Terdapat busa stabil
Tanin	+	Perubahan warna biru kehitaman
Steroid	+	Perubahan warna biru kehijauan
Terpenoid	-	Tidak ada perubahan warna merah keunguan

Penelitian Mauliandani *et al.* (2017) yang melakukan skringing fitokimia pada ekstrak etanol bayam merah (*Amaranthus tricolor* L.) mendapatkan fitokimia berupa flavonoid, saponin, fenol, steroid dan terpenoid. Hasil skringing fitokimia dari ekstrak etanol bayam merah (*Alternanthera amoena* Voss) dalam penelitian Arif *et al.* (2021) megidentifikasi keberadaan senyawa alkaloid, tanin, flavonoid, saponin. Hal ini menunjukkan kesamaan kandungan fitokimia suatu tanaman dapat dipengaruhi hubungan kekerabatan suatu tanaman (Polihito *et al.*, 2022).

Ragam kelompok fitokimia mempunyai manfaat biomedis yang beragam pula. Senyawa flavonoid memiliki aktivitas biologis sebagai anti tumor, antibakteri, antioksidan, antiinflamasi dan imunomodulator (Lluis & Moales, 2008; Lan *et al.*, 2013). Alkaloid sebagai imunomodulator yang mengatur proliferasi limfosit di timus dan limpa serta sekresi sitokin (Jiang *et al.*, 2021). Saponin berperan sebagai antioksidan, antimikroba, anti karsiogenik. Saponin melalui efek imunostimulatori berinteraksi dengan *Antigen Presenting Cell* (APC) yang mengaktifkan pensinyalan intraseluler dan meningkatkan pelepasan sitokin. Steroid berperan sebagai antiinflamasi dengan sifat

imunosupresif yang merusak aktivasi limfosit T, dengan menghalangi sel TH₁ dan mengaktivasi sel TH₂ dan TH₃, dengan perekrutan sel T regulator dan polarisasi makrofag M2 yang mempengaruhi inflamasi. Akan tetapi, pemberian steroid jangka panjang dapat menimbulkan berbagai efek samping karena keseimbangan sistem imun terganggu akibat imunosupresan (Sigh & O'Hagan, 2003; Della & Morgillo, 2019).

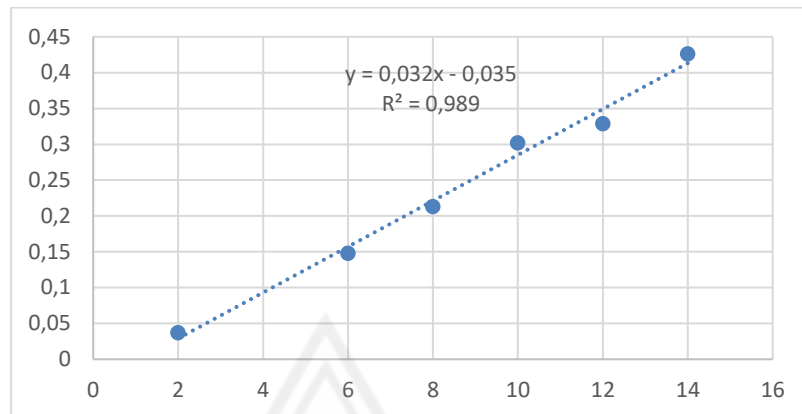
4.3. Analisa Flavonoid Total pada Ekstrak Etanol Bayam Brasil (*Alternanthera sissoo hort*)

Penelitian ini menggunakan larutan standar *quercetin* dalam menentukan kadar flavonoid total EEBB dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. *Quercetin* dan glikosidanya berada dalam jumlah 60-70% dari flavonoid dan banyak terdapat dalam tanaman sehingga banyak dijadikan sebagai senyawa standar untuk mendeteksi flavonoid total (Kumar & Pandey, 2013). *Quercetin* adalah flavonoid golongan flavonol sehingga mempunyai gugus keto pada C-4 dan gugus hidroksi pada C-3 atau C-5 yang dapat bereaksi dengan AlCl₃ membentuk kompleks warna (Aminah *et al.*, 2017). Penentuan kurva standar *quercetin* dengan membuat konsentrasi seri *quercetin* yaitu 2 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, 12 ppm, dan 14 ppm yang dihitung absorbansinya pada panjang gelombang 435 nm. Hasil kurva standar *quercetin* sebagai berikut :

Tabel 4.2 Hasil Pengukuran absorbansi larutan standar *quercetin* pada panjang gelombang 435 nm

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi (A) λ 435 nm
2	0,037
6	0,148
8	0,213
10	0,302
12	0,329
14	0,426

Kurva standar yang digunakan untuk menghitung kadar flavonoid total yang terkandung dalam EEBB :



Gambar 4.2 Kurva Standar *Quercetin* pada Panjang Gelombang 435 nm

Hasil kurva standar *quercetin* diperoleh regresi linear yaitu $y = 0,032x - 0,036$ dengan nilai $R^2 = 0,989$. Penetapan kadar flavonoid total EBB dilakukan dengan persamaan kurva standar *quercetin*.

Tabel 4.3 Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Bayam Brasil (*Alternantera sissoo hort*)

Berat ekstrak (g)	Absorbansi (A)	Absorbansi rata-rata (A)	Konsentrasi EBB (mg/L)	Kadar Flavonoid Total (mg QE/g EBB)
0,01	0,214	0,240	8,625	86,25
	0,249			
	0,258			

Pada pengukuran kadar flavonoid total, EBB ditambahkan $AlCl_3$ untuk membentuk kompleks warna lebih kuning yang mengakibatkan terjadi pergeseran panjang gelombang ke arah *visible*, kemudian ditambahkan CH_3CO_2K untuk menstabilkan kompleks warna *visible* sehingga tidak terjadi lagi pergeseran panjang gelombang. Inkubasi dilakukan selama 1 jam untuk mengoptimalkan reaksi (Aminah *et al*, 2017). Penelitian ini mendapatkan kadar flavonoid total sebesar 86,25 mg QE/g EBB. Kadar flavonoid yang diperoleh dalam satuan mg QE/g EBB, yang berarti tiap gram EBB mengandung sebanyak mg flavonoid yang ekuivalen dengan *quercetin*

(Stankovic, 2011). Berdasarkan penelitian Guntarti dan Rulyani (2020), flavonoid total pada ekstrak etanol bayam *Amaranthus tricolor* L. varian giti hijau dan merah (**Lampiran 6.**) dengan pelarut etanol 70% secara berturut-turut yaitu 44,43 mg QE/g dan 55,95 mg QE/g. Tingginya kadar flavonoid total pada EBB karena menggunakan pelarut 96% yang lebih polar dibandingkan etanol 70% sehingga lebih banyak flavonoid yang terlarut dalam EEBB.

4.4. Analisa Vitamin E pada Ekstrak Etanol Bayam Brasil (*Alternanthera sissoo hort*)

Hasil analisa vitamin E yang dilakukan di Pusat Studi Pangan dan Gizi UGM menunjukkan bahwa didalam ekstrak etanol bayam brasil (EEBB) terdapat vitamin E sebanyak 375,5 mg/100g (**Lampiran 7.**). Hasil ini sangat tinggi jika dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan Limeranto (2022) yang menemukan kadar vitamin E sebanyak 70,92 mg/100 g. Penelitian tersebut menggunakan daun bayam brasil segar yang dilarutkan dalam air. Vitamin E memiliki sifat sukar larut dalam air, namun larut dalam senyawa organik seperti alkohol, lemak, dan minyak (Casas, 2007). Penelitian ini menggunakan etanol 96% sebagai pelarut kelompok alkohol sehingga kandungan vitamin E lebih banyak terdeteksi dalam EEBB.

Vitamin E sebagai imunomodulator memberikan efek regulasi tidak langsung pada sel T melalui modulasi mediator inflamasi seperti sitokin pro-inflamasi dan prostaglandin E₂ (PGE₂). Vitamin E dapat langsung berikatan dengan enzim yang terlibat dalam pembentukan mediator lipid atau protein transpor yang terlibat dalam transduksi sinyal intraseluler. Vitamin E dapat mempengaruhi interaksi protein membran dan translokasi enzim ke membran plasma sehingga mengubah aktivitas enzim transduksi sinyal pada sel imun seluler (Bendich *et al.*, 1986; Traber, 2007; Zing, 2005; O'Brien *et al.*, 2015).

4.5. Uji Preliminary Efek induksi Complete Freund's Adjuvant (CFA) pada Mencit

Penelitian ini melakukan uji *preliminary* untuk dapat merancang waktu pemberian perlakuan (kontrol sehat, kontrol negatif, kontrol positif, dan

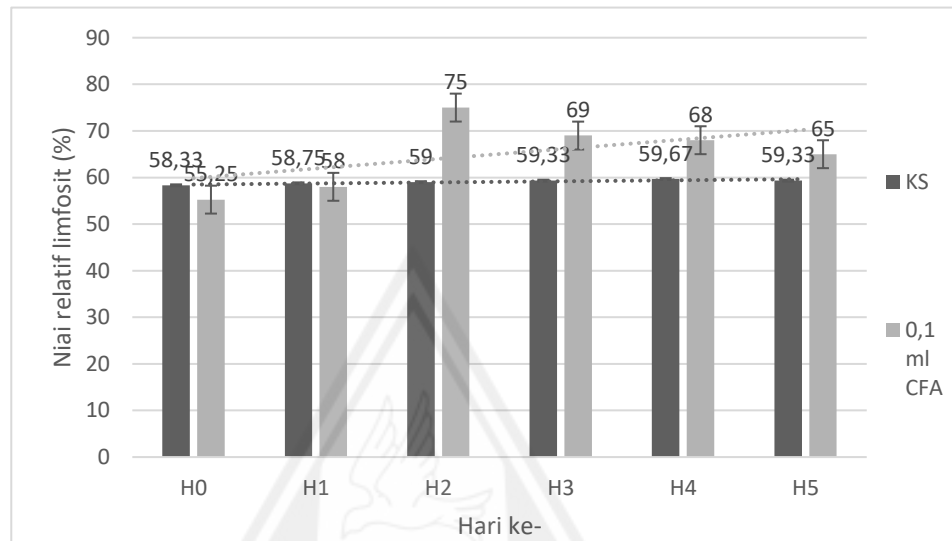
ekstrak etanol bayam brasil) dengan melihat hari yang terdapat jumlah limfosit tertinggi.

Sistem imun berfungsi untuk melindungi tubuh dari kemungkinan zat toksik dengan mengenali dan menanggapi antigen berupa zat asing yang mengancam kesehatan tubuh. Antigen eksogen biasanya berupa protein atau polisakarida yang ditemukan di permukaan sel bakteri, alergen, virus dan lainnya yang mampu menginduksi respon imun (Kovacovics Rock, 1995; Wang *et al.*, 2000).

Penelitian ini yang menggunakan antigen eksogen yaitu *Complete Freund's Adjuvant* (CFA). Pemilihan CFA karena berupa suspensi *Mycobacterium tuberculosis* yang dilemahkan sehingga lebih cepat menginduksi respon inflamasi yang ditandai terbentuknya edema disekitar tempat injeksi. Hal ini juga disebabkan karena patogen dari CFA bersifat sangat asing bagi tubuh mencit, sehingga sesuai penelitian Suhirman & Winarti (2010) yang mengatakan bahwa semakin asing antigen yang menyerang tubuh maka akan semakin efektif menstimulasi respon sistem imun. Injeksi CFA konsentrasi 1% (**Lampiran 9**) dilakukan sekali dengan jumlah sebanyak 0,1 ml secara subkutan (VanCott & Jackson, 2020). Hasil pada Gambar 4.3 menunjukkan bahwa nilai relatif (NR) limfosit mencit kelompok kontrol sehat (KS) yang tidak diinduksi CFA memiliki NR limfosit yang lebih rendah dan tidak mengalami perubahan signifikan dari hari ke-0 sampai hari ke-5, sedangkan kelompok mencit lain yang diinduksi 0,1 ml CFA mengalami perubahan jumlah limfosit yang lebih tinggi. Hal ini menunjukkan CFA yang mengandung suspensi bakteri merangsang limfosit untuk berkembang biak dan memulai respon imun berupa aktivasi sel sitotoksik, karena terjadi pengikatan reseptor limfosit ke permukaan antigen.

Abbas *et al.*(2016) menyatakan bahwa limfosit dari sistem imun adaptif memiliki mekanisme spesifik terhadap antigen. Saat sel *Antigen Presenting Cell* (APC) akan memberikan sinyal adanya infeksi, limfosit *Thelper* teraktivasi limfosit untuk melawan sumber infeksi, sehingga terjadinya peningkatan limfosit yang dapat menjadi *marker* inflamasi bagi tubuh ketika

terinfeksi bakteri.



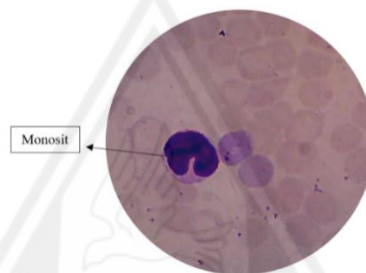
Gambar 4.3. Nilai relatif limfosit (%) mencit yang terinduksi CFA

Peningkatan NR limfosit pada mencit yang diinduksi 0,1 ml CFA terdapat pada hari ke-2, yaitu sebesar 25% dibandingkan pada hari ke-0 sebelum diinduksi 0,1 ml CFA yaitu 55,25%. Jika dibandingkan dengan KS, NR limfosit pada hari ke-2 juga berbeda jauh yaitu sebesar 59%. Peningkatan NR limfosit pada hari ke-2 ini dijadikan sebagai acuan untuk dimulainya pemberian perlakuan (kontrol sehat, kontrol negatif, kontrol positif, dan EEBB). Jika dibandingkan dengan penggunaan induksi antigen SDMD dalam penelitian Djama (2021) didapatkan pada hari ke-9 setelah diinduksi SDMD adanya peningkatan jumlah limfosit >40 sel/sel. Hasil berbeda tersebut didapatkan karena tubuh mencit juga memproduksi sel darah merah, walaupun diinduksi SDMD respon imun yang diberikan lebih lambat dibandingkan induksi antigen yang mengandung suspensi bakteri dalam memberikan efek inflamasi (Gavin *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2000)

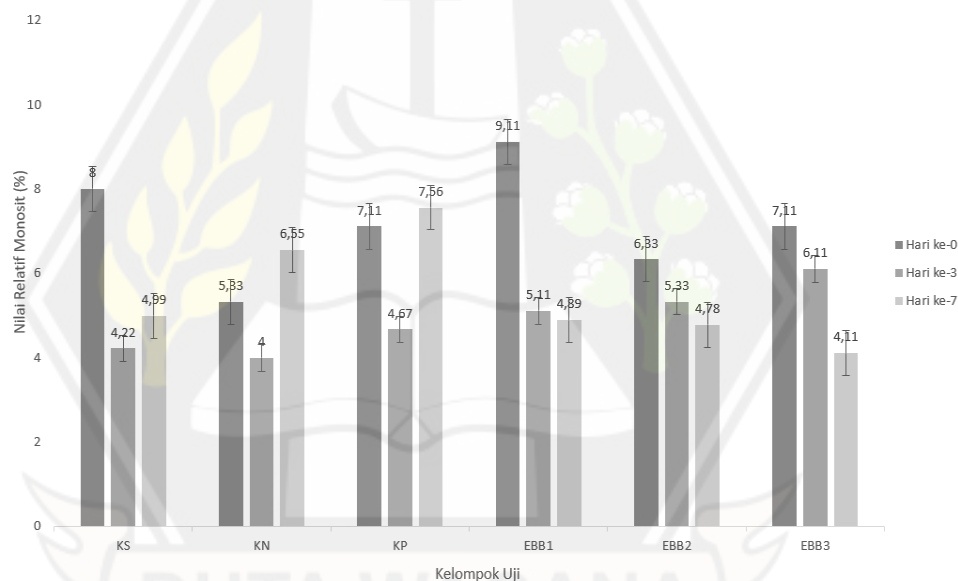
4.6. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Bayam Brasil (*Alternanthera sissoo hort*) terhadap Jumlah Leukosit Inflamasi

Ciri monosit pada mamalia secara umum yaitu berdiameter 5–18 μm , memiliki nukleus relatif besar dan menjorok atau berbentuk lekukan, sitoplasma seringkali tampak lebih banyak di dekat membran sel. Monosit secara aktif motil dan fagositik sehingga mampu menelan agen infeksi serta

sel darah merah dan partikel besar lainnya, tetapi mereka tidak dapat menggantikan fungsi neutrofil dalam menghilangkan dan menghancurkan bakteri. Monosit biasanya memasuki area jaringan yang meradang lebih lambat dari granulosit. Seringkali mereka ditemukan di tempat infeksi kronis, sehingga kadar monosit yang tinggi mengindikasikan tubuh mengalami inflamasi dan infeksi (Soltan *et al.*, 2012).



Gambar 4.4 Morfologi Monosit (1000x)



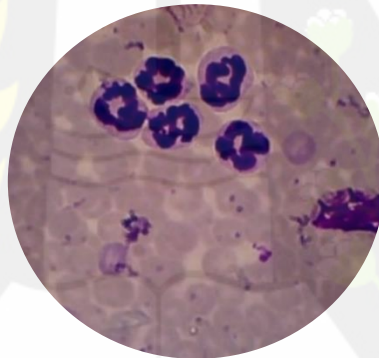
Gambar 4.5. Nilai relatif monosit dalam darah mencit dengan metode HDT pada hari ke 0,3 dan 7. Keterangan : KS (kontrol sehat), KN (perlakuan kontrol negatif), KP (perlakuan kontrol positif), EEBB1 (perlakuan EEBB dosis 1 = 209,25 mg/g BB), EEBB2 (perlakuan EEBB dosis 2 = 418,5 mg/g BB), EEBB3 (perlakuan EEBB dosis 3 = 627,72 mg/g BB)

Pengaruh perlakuan terhadap nilai relatif monosit yaitu (**Gambar 4.5**) antara kelompok perlakuan KS (kontrol sehat), KN (perlakuan kontrol negatif), KP (perlakuan kontrol positif), EEBB1 (perlakuan EEBB dosis 1 =

209,25 mg/g BB), EEBB2 (perlakuan EEBB dosis 2 = 418,5 mg/g BB), EEBB3 (perlakuan EEBB dosis 3 = 627,72 mg/g BB) mengalami peningkatan dan penurunan yang berbeda, namun masih dalam persentase monosit normal. Schalm *et al.* (1995) mengatakan persentase normal monosit mencit sebesar 1-10%. Hal ini didukung dengan hasil uji *one way* ANOVA terhadap monosit didapatkan nilai probabilitas sebesar $0,306 > 0,05$. Hal ini menunjukkan perlakuan yang diberikan tidak memiliki pengaruh signifikan terhadap monosit. Berdasarkan uji *post hoc test* menunjukkan semua kelompok perlakuan KS (kontrol sehat), KN (perlakuan kontrol negatif), KP (perlakuan kontrol positif), EEBB1 (perlakuan EEBB dosis 1 = 209,25 mg/g BB), EEBB2 (perlakuan EEBB dosis 2 = 418,5 mg/g BB), EEBB3 (perlakuan EEBB dosis 3 = 627,72 mg/g BB) tergolong dalam subset 1, sehingga perlakuan antar kelompok tidak memiliki perbedaan mean yang signifikan sehingga pemberian EEBB tidak memiliki pengaruh terhadap NR monosit. Saat terjadi inflamasi monosit akan masuk ke dalam jaringan dan menjadi makrofag untuk melakukan fagositosis terhadap sumber infeksi. Makrofag menjalankan peran penting dalam imunitas bawaan melalui fagositosis yang kuat untuk menghilangkan antigen asing melalui dan kemudian mengeluarkan berbagai sitokin (IL-4, IL-6, IL-12) untuk memfasilitasi pematangan dan proliferasi sel T. Flavonoid dalam mempengaruhi produksi CD4⁺ sehingga menyebabkan sel Th1 teraktivasi yang akan mempengaruhi teraktivasinya makrofag sehingga makrofag mengalami peningkatan aktivitas fagositosis yang membuat makrofag dapat membunuh sumber infeksi lebih cepat (Fristiohady *et al.*, 2019).

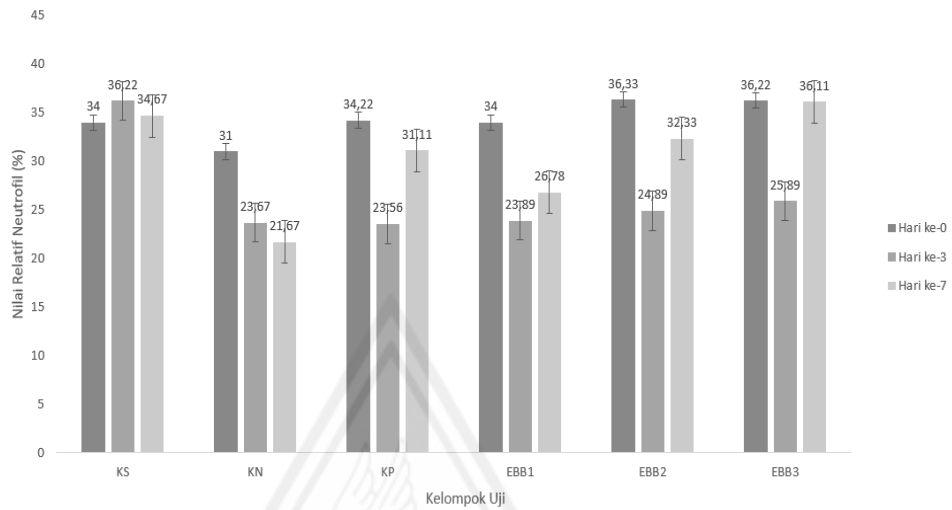
Flavonoid dapat menjadi imunomodulator dengan sifat immunosupresif alami yang dapat menghambat aktivitas sel imun dan efekturnya (kemokin, TNF, dan sitokin pro-inflamasi) dan immunostimulan yang dapat meningkatkan proliferasi sel limfosit yang akan mengaktivasi sel T *helper* yang mempengaruhi *Specific Makrofag Activating Factor* sehingga terjadi perekrutan makrofag dan sel efektor lainnya (sel fagosit dan sitokin anti-inflamasi) yang menyebabkan peningkatan aktivitas fagositosis dalam

mengancurkan sel yang terinfeksi (Sulistiani dan Rahayuningsih, 2015). Alkaloid mengandung nitrogen yang menunjukkan adanya aktivitas antimikroba, anti tumor, analgesik, anti-inflamasi dan imunomodulator. Alkaloid akan mengurangi sekresi sitokin pro-inflamasi IL-1 oleh monosit (Astuti, 2022). Saponin mendorong masuknya antigen melalui APC dan meningkatkan respon imun yang dimediasi limfosit T sitotoksik (Sharma *et al.*, 2020). Steroid dapat menekan polarisasi makrofag M2 yang mempengaruhi inflamasi, namun pemberian steroid jangka panjang dapat menimbulkan berbagai efek samping akibat immunosupresan (Della & Morgillo, 2019). Vitamin E berperan dalam menurunkan produksi radikal bebas NO (lipopolisakarida) oleh makrofag yang dapat menyebabkan stres oksidatif, sehingga dapat mempertahankan integritas sel monosit dalam transduksi sinyal inflamasi dan melakukan fagositosis (Beharka *et al.*, 2000).



Gambar 4.6. Morfologi neutrofil (1000x)

Neutrofil, bersama dengan eosinofil dan basofil, merupakan kelompok sel darah putih yang dikenal sebagai granulosit. Neutrofil memiliki inti yang terdiri dari 2-5 lobus yang disatukan oleh filamen. Neutrofil bergerak dengan gerakan amoeboid. Neutrofil memperpanjang proyeksi panjang yang disebut pseudopodium di mana butirannya mengalir dan tindakan ini diikuti oleh kontraksi filamen yang berbasis di sitoplasma yang menarik nukleus dan bagian belakang sel ke depan (Khasanah *et al.*, 2016).



Gambar 4.7. Nilai relatif neutrofil dalam darah mencit dengan metode HDT pada hari ke 0,3 dan 7. Keterangan : KS (kontrol sehat), KN (perlakuan kontrol negatif), KP (perlakuan kontrol positif), EEBB1 (perlakuan EEBB dosis 1 = 209,25 mg/g BB), EEBB2 (perlakuan EEBB dosis 2 = 418,5 mg/g BB), EEBB3 (perlakuan EEBB dosis 3 = 627,72 mg/g BB)

Neutrofil berkontribusi pada garis pertahanan pertama selama infeksi patogen melalui pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS) dan pembentukan perangkat ekstraseluler neutrofil (NET) untuk menjalankan fungsi antimikroba. Produksi ROS yang berlebihan oleh neutrofil dapat mengintensifkan kerusakan pada tempat inflamasi yang mengakibatkan efek merugikan pada neutrofil (Abbas *et al.*, 2016).

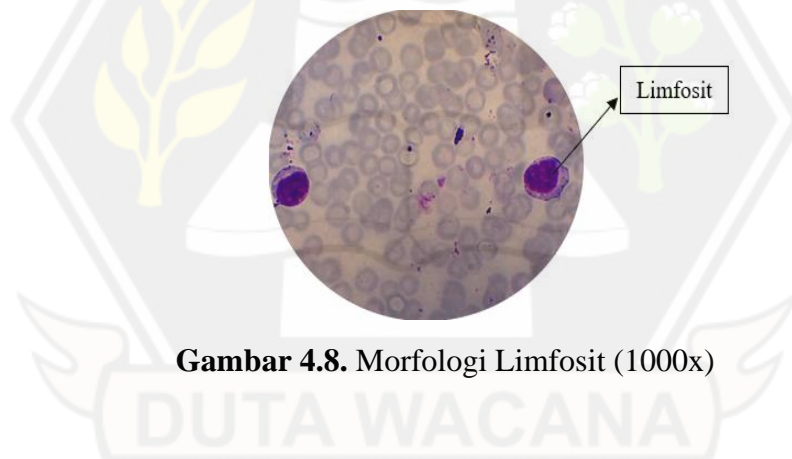
Pengaruh perlakuan terhadap nilai relatif (NR) neutrofil (**Gambar 4.7**) yaitu antara kelompok perlakuan KS (kontrol sehat), KN (perlakuan kontrol negatif), KP (perlakuan kontrol positif), EEBB1 (perlakuan EEBB dosis 1 = 209,25 mg/g BB), EEBB2 (perlakuan EEBB dosis 2 = 418,5 mg/g BB), EEBB3 (perlakuan EEBB dosis 3 = 627,72 mg/g BB) mengalami peningkatan dan penurunan yang berbeda. NR neutrofil pada semua kelompok perlakuan di hari ke 0 memiliki *range* 34-36,22%. Persentase jumlah limfosit normal pada mencit yaitu 10-40% (Septianto *et al.*, 2015). Pemberian CFA sebagai antigen memberikan efek penurunan neutrofil yang dapat dilihat pada hari ke 3,

kecuali kelompok KS yang tidak diberikan induksi CFA dan perlakuan memiliki NR neutrofil yang lebih stabil, yaitu selisih tidak jauh antar hari ke 0, 3 dan 7. Pada kelompok KN (perlakuan kontrol negatif), KP (perlakuan kontrol positif), EEBB1 (perlakuan EEBB dosis 1 = 209,25 mg/g BB), EEBB2 (perlakuan EEBB dosis 2 = 418,5 mg/g BB), EEBB3 (perlakuan EEBB dosis 3 = 627,72 mg/g BB) mengalami penurunan signifikan. Hal ini berbeda dengan penelitian Tamelan *et al.* (2022) yang mengatakan terjadinya penurunan persentase jumlah neutrofil berbanding lurus dengan persentase jumlah limfosit. Pada saat respon inflamasi terjadi membuat neutrofil memiliki kapasitas mikrobiosida yang sangat tinggi sebagai hasil dari produksi molekul granula neutrofil antimikroba yang melimpah dan kuat serta oksida, sehingga neutrofil berpotensi sitotoksik terutama saat neutrofil lisis. Hal ini dapat memicu apoptosis neutrofil untuk mencegah pelepasan kandungan histotoksik neutrofil sehingga dilakukan fagositosis oleh makrofag yang menyebabkan neutrofil menurun setelah diinduksi antigen CFA (Fox *et al.*, 2010). Pentingnya apoptosis neutrofil untuk mencegah terjadinya neutrofilia. Pada kelompok perlakuan KN yang diinduksi CFA dan hanya ditreatment akudes steril didapatkan NR neutrofil yang terus mengalami penurunan. Pada kelompok perlakuan KP dan EEBB di hari ke-7 rata-rata mengalami peningkatan dengan selisih yang tidak jauh berbeda dengan hari ke-0. Berdasarkan uji *one way* ANOVA terhadap neutrofil didapatkan nilai $p < 0,05$. Hal ini menunjukkan perlakuan yang diberikan memiliki pengaruh yang signifikan terhadap neutrofil. Berdasarkan uji *post hoc test* didapatkan bahwa EEBB2 dan EEBB3 tergolong pada subset 3, bersamaan dengan kelompok KS dan KP, hal ini menunjukkan EEBB2 dan EEBB3 memiliki efek yang tidak jauh berbeda KP berupa vitamin E (200 IU) dalam memodulasi neutrofil. Peningkatan NR neutrofil terjadi karena adanya kemampuan modulasi neutrofil dari EEBB sehingga dapat meningkatkan proses fagositosis neutrofil (Wuni *et al.*, 2022).

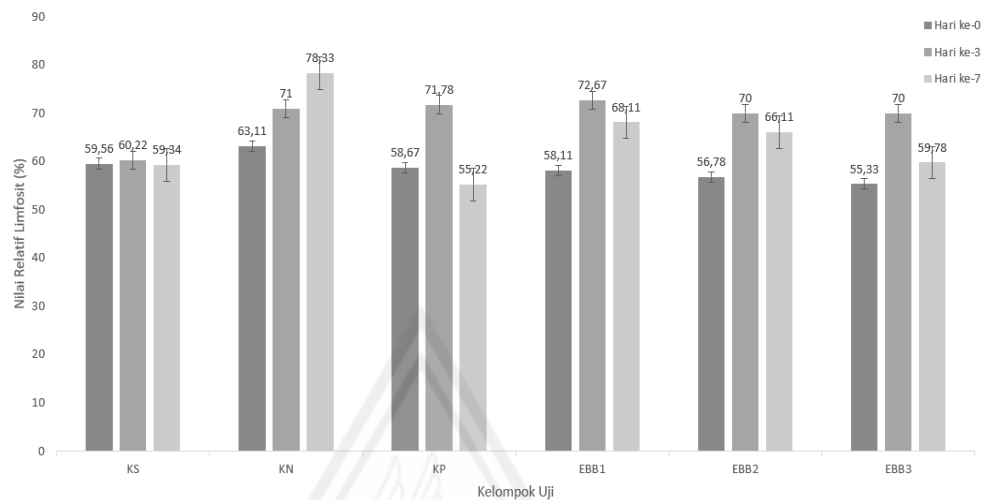
Flavonoid dapat memanipulasi fungsi neutrofil, dianggap sebagai strategi baru untuk terapi antiinflamasi. Flavonoid juga dapat mengatur ledakan

oksidatif neutrofil berupa menekan produksi ROS yang berlebih dan mendorong apoptosis neutrofil, sehingga flavonoid memainkan peran imunomodulator dalam melawan kerusakan yang disebabkan oleh neutrofil terkait dengan proses inflamasi yang terus menerus atau tidak terkendali (Han *et al.*, 2022). Vitamin E mampu memodulasi fungsi sel neutrofil dalam ledakan oksidatif oleh kelebihan produksi ROS melalui yang mengakibatkan efek merugikan sel inang (Freitas *et al.*, 2009).

Limfosit adalah salah satu jenis sel leukosit yang diproduksi di sumsum tulang dan berperan untuk mengidentifikasi dan melawan sel asing yang menyerang tubuh termasuk virus, bakteri, jamur dan sel kanker. Limfosit berukuran lebih kecil dari eritrosit, dengan nukleus yang menempati sebagian besar sel. Dua jenis utama limfosit adalah limfosit B dan limfosit T. Limfosit B memproduksi antibodi terhadap antigen asing, sedangkan limfosit T menghancurkan sel yang terinfeksi dan sel yang telah menjadi kanker. Limfosit berbentuk bulat atau oval dengan diameter 7-8 mm (Septianto *et al.*, 2015).



Gambar 4.8. Morfologi Limfosit (1000x)



Gambar 4.9. Nilai relatif limfosit dalam darah mencit dengan metode HDT pada hari ke 0,3 dan 7. Keterangan : KS (kontrol sehat), KN (perlakuan kontrol negatif), KP (perlakuan kontrol positif), EEBB1 (perlakuan EEBB dosis 1 = 209,25 mg/g BB), EEBB2 (perlakuan EEBB dosis 2 = 418,5 mg/g BB), EEBB3 (perlakuan EEBB dosis 3 = 627,72 mg/g BB).

Pengaruh perlakuan terhadap nilai relatif limfosit (**Gambar 4.9**) yaitu antara kelompok perlakuan KS (kontrol sehat), KN (perlakuan kontrol negatif), KP (perlakuan kontrol positif), EEBB1 (perlakuan EEBB dosis 1 = 209,25 mg/g BB), EEBB2 (perlakuan EEBB dosis 2 = 418,5 mg/g BB), EEBB3 (perlakuan EEBB dosis 3 = 627,72 mg/g BB) mengalami peningkatan dan penurunan yang berbeda. NR limfosit pada semua kelompok perlakuan di hari ke 0 memiliki *range* 55,33 – 59,56. Persentase jumlah limfosit normal pada mencit yaitu 55-95% (Septianto *et al.*, 2015). Pemberian CFA sebagai antigen memberikan efek peningkatan limfosit yang dapat dilihat pada hari ke 3, kecuali kelompok KS yang tidak diberikan induksi CFA dan perlakuan memiliki nilai relatif limfosit yang lebih stabil, yaitu selisih tidak jauh antar hari ke 0, 3 dan 7. Peningkatan limfosit terjadi karena limfosit akan berinteraksi dengan reseptor antiten sehingga berproliferasi dan mengaktifkan sel efektor lainnya untuk menghancurkan sumber infeksi. NR limfosit tertinggi terdapat pada hari ke-7 pada kelompok kontrol negatif yaitu sebesar 78,33%, sedangkan yang terendah pada kelompok KP sebesar 55,22%. Berdasarkan uji *one way* ANOVA terhadap limfosit didapatkan nilai $P < 0,05$.

Hal ini menunjukkan perlakuan yang diberikan memiliki pengaruh yang signifikan terhadap limfosit. Berdasarkan post hoc test, kelompok EE3B3 tergolong dalam subset 1 dengan KP dan KS. Hal ini menunjukkan bahwa EE3B3 memiliki potensi imunomodulator yang tidak jauh berbeda dengan Vitamin E (200 IU) yang digunakan.

Vitamin E memiliki efek imunomodulator pada sel imunitas bawaan dan adaptif. Vitamin E sebagai antioksidan eksogen yang larut dalam lemak akan melindungi sel dari kerusakan akibat radikal bebas dan mendukung integritas penghalang epitel. Vitamin E mampu meningkatkan produksi sel T, meningkatkan aktivasi sel NK, meningkatkan sekresi sitokin IL-2 dan meningkatkan respon limfosit sehingga memfasilitasi respon imun terhadap antigen dan menurunkan risiko infeksi (Shakoor *et al.*, 2021). Polak *et al.* (2021) serupa menyatakan efek pemberian vitamin E pada hewan pengerat menyebabkan penurunan konsentrasi IL-1 β , dan peningkatan kadar IL-2 dengan efek imunomodulator. Pada kelompok EE1B1, EE2B2, EE3B3 mengalami penurunan mean NR limfosit akibat pemberian ekstrak etanol bayam brasil. Hal ini terjadi karena EE3B3 terdapat berbagai fitokimia yang memiliki efek farmakologis, terutama flavonoid sebagai imunomodulator. Flavonoid dapat menghambat ekspresi sel Th dan meningkatkan keseimbangan Th1/Th2/Th17 (Han *et al.*, 2022).

4.7. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Bayam Brasil (*Alternanthera sissoo hort*) terhadap Pemeriksaan Protein C-Reactive (CRP) dengan Aglutinasi

Pada saat inflamasi terjadi yang disebabkan oleh antigen asing, IL-6 yang merupakan sitokin pro-inflamasi akan teraktivasi dan bersirkulasi melalui aliran darah menuju hati, sehingga menginduksi peningkatan CRP tersebut (Gulhar *et al.*, 2018). CRP adalah protein yang dibuat di hati dan dilepaskan ke aliran darah. Normalnya tingkat CRP dalam darah rendah, namun CRP mulai meningkat segera setelah inflamasi atau infeksi mempengaruhi tubuh. Selain itu, kadar CRP yang tinggi dapat mengindikasikan adanya inflamasi di arteri jantung yang menunjukkan adanya peningkatan risiko serangan jantung. Salah satu cara untuk mengetahui tingkat CRP dalam darah dilakukan dengan

tes RAPID CRP. Pemeriksaan CRP menggunakan prinsip aglutinasi lateks dimana antibodi yang disaltukan pada partikel sehingga terdeteksi adanya antigen pada sampel serum (Kalma, 2018).

Tabel 4.4. Hasil pemeriksaan CRP dengan tes RAPID dengan metode aglutinasi.

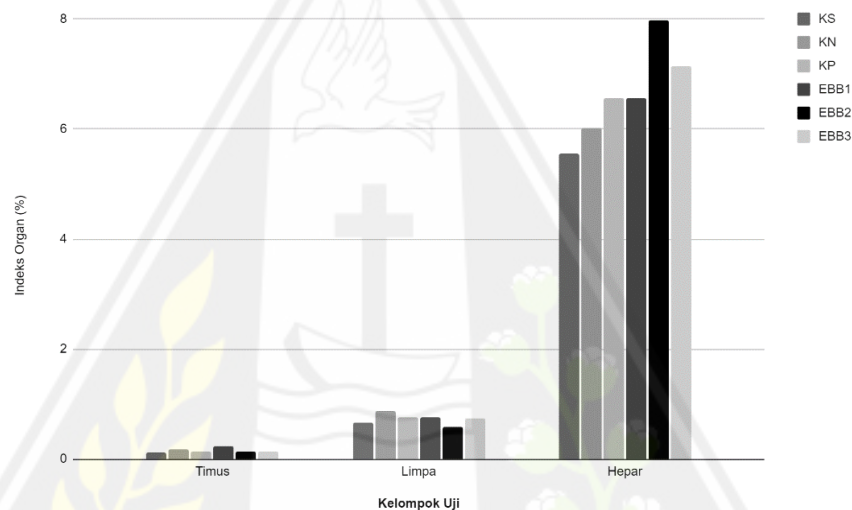
Kelompok Uji	Hasil (+/-)			Keterangan
	H ₀	H ₃	H ₇	
KS	-	-	-	+ = Adanya aglutinasi - = Tidak ada aglutinasi
KN	-	-	-	
KP	-	-	-	
EEBB1	-	-	-	
EEBB2	-	-	-	
EEBB3	-	-	-	

Keterangan : KS (kontrol sehat), KN (perlakuan kontrol negatif), KP (perlakuan kontrol positif), EEBB1 (perlakuan EEBB dosis 1 = 209,25 mg/g BB), EEBB2 (perlakuan EEBB dosis 2 = 418,5 mg/g BB), EEBB3 (perlakuan EEBB dosis 3 = 627,72 mg/g BB).

Hasil Tes Aglutinasi CRP sampel serum darah mencit yang dilakukan pada kelompok KS (kontrol sehat), KN (perlakuan kontrol negatif), KP (perlakuan kontrol positif), EEBB1 (perlakuan EEBB dosis 1 = 209,25 mg/g BB), EEBB2 (perlakuan EEBB dosis 2 = 418,5 mg/g BB), EEBB3 (perlakuan EEBB dosis 3 = 627,72 mg/g BB) yang dilakukan pemeriksaan CRP pada di hari ke-0 sebelum induksi, hari ke-3 dan hari ke-7, menunjukkan tidak adanya CRP pada sampel serum darah mencit. Hasil negatif terjadi karena RAPID CRP yang dilakukan merupakan uji kualitatif standar yang sederhana yang bergantung pada reaksi antara antibodi dan antigen, sehingga memiliki tingkat sensitivitas yang rendah dibandingkan menggunakan pemeriksaan CRP kuantitatif dengan teknik ELISA (*Double Antibody Sandwich*) yang menggunakan reagen antibodi spesifik untuk mencit sehingga didapatkan jumlah konsentrasi CRP dari setiap perlakuan kelompok uji (Novenda & Nuroini, 2019).

4.8. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Bayam Brasil (*Alternanthera sissoo hort*) terhadap Perhitungan Nilai Indeks Limpa, Timus dan Hati

Perhitungan nilai indeks organ merupakan salah satu parameter untuk mengetahui perlakuan dosis yang diberikan dapat menyebabkan efek yang merugikan terhadap mencit yaitu melalui pembesaran atau penyusutan organ (Khalishah et al., 2021). Nilai indeks organ belum dijadikan standar dalam penentuan kerusakan atau perbaikan terhadap fungsi organ karena masih membutuhkan uji lanjutan histopatologi (Whidyastuti, 2019).



Gambar 4.10. Grafik indeks organ timus, limpa dan hepar mencit.

Nilai indeks organ limpa sebesar 0,59% - 0,87%. Persentase indeks organ limpa tertinggi ditunjukkan pada kelompok KN. Tingginya persentase indeks organ limpa pada kelompok KN sejalan dengan Makiyah (2014) yang mengatakan adanya kenaikan berat limpa akibat peningkatan sel eritrosit, sel T, sel B, sel makrofag yang berperan dalam mempertahankan keseimbangan imunitas. Kelompok KN yang diberikan akudes steril memiliki limfosit yang tidak mengalami modulasi. Hal ini sejalan dengan penelitian Djama (2022) yang mengatakan induksi SDMD yang merupakan antigen asing bagi tubuh mencit memberikan pengaruh penambahan berat limpa. *Complete freund's adjuvant* (CFA) yang merupakan antigen asing bagi tubuh mencit merangsang respon imun sehingga terjadi peningkatan produksi sel T dan sel

B di limpa. Analisa uji ANOVA didapatkan EEBB yang diberikan ($p > 0,05$) tidak berpengaruh signifikan. Hal ini dapat terjadi karena limpa berfungsi dalam mencegah infeksi dengan filtrasi fagositik aliran darah dan produksi antibodi opsonisasi (Kapila *et al.*, 2021). Antigen infeksius yang ditularkan melalui darah disajikan oleh sel APC. Proses ini memulai aktivasi sel T dan sel B, sehingga terproduksi antibodi opsonisasi. Leukosit fagositik akan memfagositosis antigen infeksius (Deng *et al.*, 2012; Bronte & Pittet, 2013).

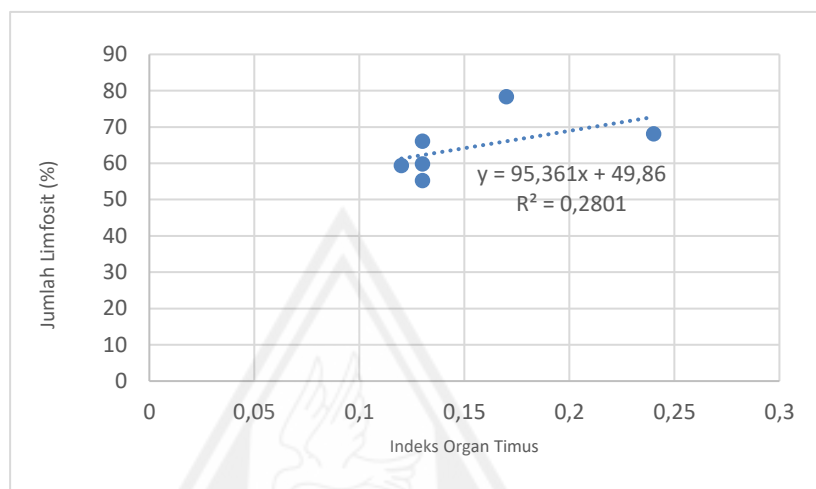
Nilai indeks organ timus sebesar 0,12% - 0,24% (**Gambar 4.10**). Berdasarkan uji ANOVA, ($p < 0,05$) didapatkan EBB berpengaruh terhadap berat organ. Hal ini dapat dilihat pada grafik (**Gambar 4.10**) persentase indeks organ tertinggi untuk organ timus ditunjukkan pada kelompok EEBB1. Berdasarkan uji *post hoc* pada subset 1 terdapat kelompok KS, KN, KP, EEBB2, EEBB3 sedangkan pada subset 2 terdapat kelompok EEBB1 sehingga antar kelompok uji tidak berbeda signifikan.

Nilai indeks organ hepar (**Gambar 4.10**) sebesar 5,55%-7,97%. Persentase indeks organ hepar tertinggi pada pemberian EEBB2. Berdasarkan uji ANOVA, EEBB ($p < 0,05$) memiliki pengaruh terhadap indeks organ hepar. Terjadinya inflamasi pada vena porta, perubahan lipid, koleostasis, sel kupffer mengalami hiperplastik, melekatnya sel darah yang terinfeksi patogen pada bagian endotel pembuluh darah mikrovaskular dapat dikaitkan dengan peningkatan indeks organ hepar (Hermanto *et al.*, 2022). Analisa uji *post hoc* pada subset 1 terdapat kelompok KS dan KP, sedangkan pada subset 2 terdapat kelompok KN, EEBB1 kemudian pada subset 3 terdapat EEBB2 dan EEBB3 sehingga antar kelompok perlakuan tidak memiliki perbedaan signifikan.

4.9. Hubungan Antara Indeks Organ dan Nilai Relatif Limfosit

Sistem limfatik terdiri dari organ limfoid primer dan limfoid sekunder. Organ limfoid primer terdiri dari sumsum tulang dan timus yang berperan dalam membuat sel limfosit, sedangkan organ limfoid sekunder terdiri dari limpa, kelenjar getah bening, amandel, dan jaringan tertentu di berbagai lapisan selaput lendir di tubuh yang menyimpan limfosit untuk melawan

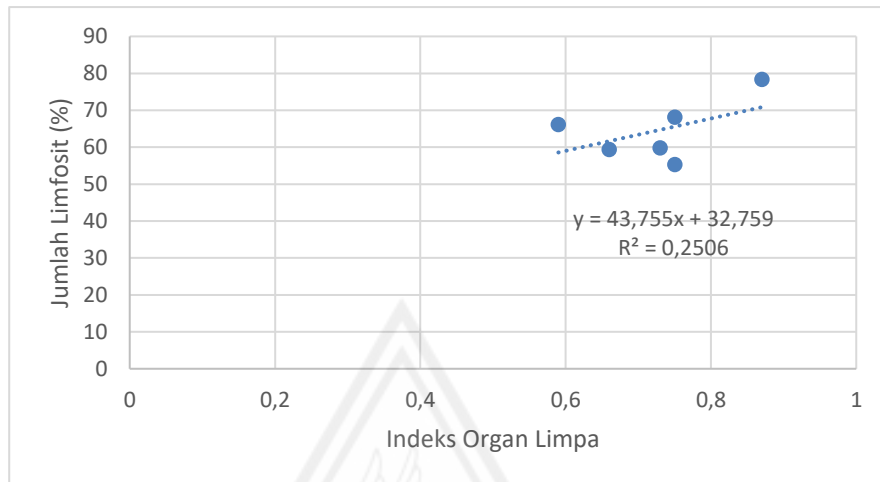
sumber infeksi (Boehm & Bleul, 2007).



Gambar 4.11. Grafik hubungan indeks organ timus dan nilai relatif limfosit

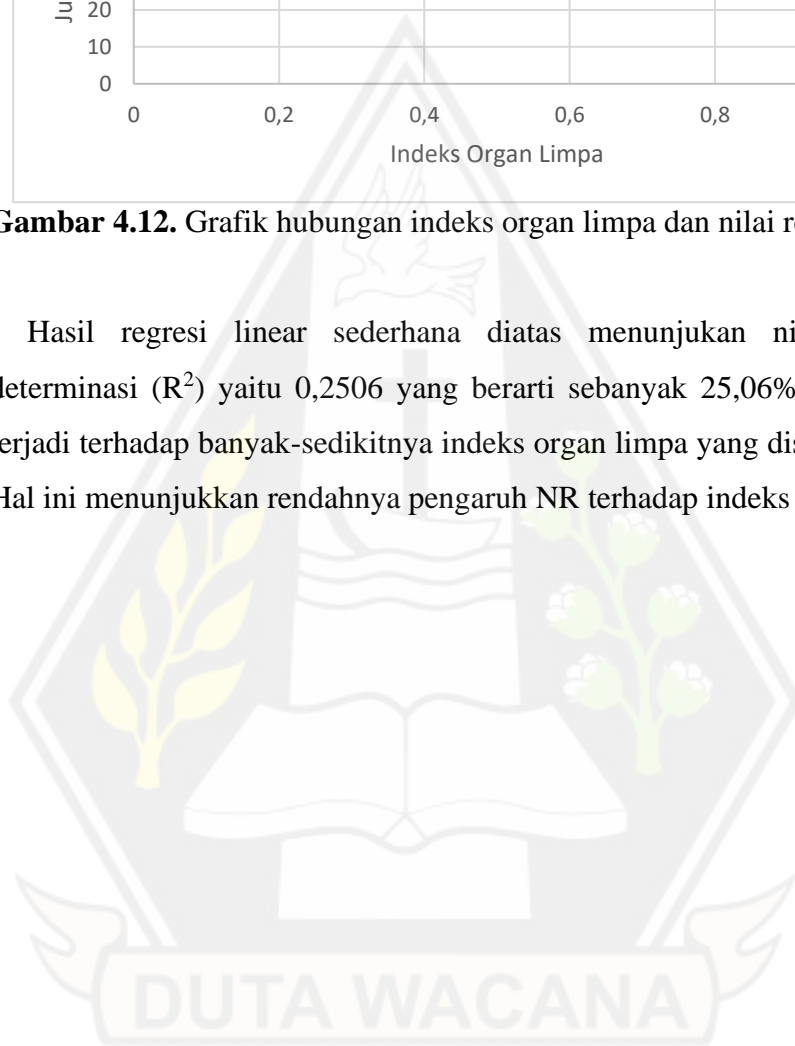
Hasil regresi linear sederhana diatas menunjukkan nilai koefisien determinasi (R^2) yaitu 0,2801 yang berarti sebanyak 28,01% variasi yang terjadi terhadap banyak-sedikitnya indeks organ timus yang disebabkan NR. Hal ini menunjukkan rendahnya pengaruh NR terhadap indeks organ timus. Hal ini dapat terjadi dari semua EEBB yang berbeda dosis diberikan menunjukkan penurunan limfosit yang masih dalam nilai normal relatif limfosit, sehingga tidak menimbulkan efek toksik dan penambahan berat pada organ timus.

Sel T akan bergerak dari sumsum tulang ke organ timus adalah bagian penting dari sistem limfatik yang bertanggung jawab atas produksi, pematangan dan diferensiasi CD4+ dan CD8+ yang akan mengalir melalui peredaran darah dan memiliki reseptor untuk dapat mengenali antigen asing yang masuk ketubuh. Dalam organ timus juga terdapat seleksi positif sel T. Adanya proses seleksi positif dan negatif sel T yang berkaitan dengan apoptosis sel T dan berdiferensiasi menjadi sel T *helper*, T sitotoksik dan T regulator yang terjadi di timus (Abbas *et al.*, 2016; Khalishah *et al.*, 2021; Metcalf, 1966; Nishino *et al.*, 2006).



Gambar 4.12. Grafik hubungan indeks organ limpa dan nilai relatif limfosit

Hasil regresi linear sederhana diatas menunjukkan nilai koefisien determinasi (R^2) yaitu 0,2506 yang berarti sebanyak 25,06% variasi yang terjadi terhadap banyak-sedikitnya indeks organ limpa yang disebabkan NR. Hal ini menunjukkan rendahnya pengaruh NR terhadap indeks organ limpa.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, maka kesimpulan yang diambil sebagai berikut :

1. Ekstrak etanol 96% bayam brasil mengandung vitamin E sebesar 375,5 mg/100g dan kadar flavonoid total sebesar 86,25 mg QE/g.
2. Pemberian ekstrak daun bayam brasil berpengaruh dalam mereduksi nilai relatif neutrofil dan limfosit hingga mencapai *range* normal, serta dapat meningkatkan nilai indeks organ timus dan hepar pada mencit jantan (*Mus musculus*) yang diinduksi *Complete Freund's Adjuvant*
3. Dosis terbaik ekstrak daun bayam brasil yang dapat mereduksi leukosit inflamasi pada mencit (*Mus musculus*) yang diinduksi *Complete Freund's Adjuvant* dengan efektif yaitu dosis 3 (627,72 mg/g BB), namun belum dapat menggantikan fungsional vitamin E 200 IU.

5.2. Saran

1. Perlu menggunakan uji spesifik untuk menguji kadar *C-reactive protein* yang memiliki tingkat sensitivitas dapat berupa ELISA dan Hs-CRP.
2. Perlu adanya penelitian histopatologi lebih lanjut mengenai efek toksisitas dari ekstrak etanol bayam brasil.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. (2020). Perlunya Peningkatan Sistem Imun pada Pandemi COVID- 19. (<https://farmasi.ugm.ac.id/id/perlunya-peningkatan-sistem-imun-pada-pandemi-covid-19/#:~:text=Respon%20imun%20terbagi%20menjadi%202,terpaparnya%20imunogen%20ke%20tubuh%20kita>). Diakses 28 Desember 2022.
- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., & Pillai, S. (2016), Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System. Elsevier
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Lymphocytes and the cellular basis of adaptive immunity. In *Molecular Biology of the Cell. 4th edition*. Garland Science.
- Aldi, Y., Dewi, O. N., & Uthia, R. (2016). Uji Imunomodulator dan Jumlah Sel Leukosit Dari Ekstrak Daun Kemangi (*Ocimum basilicum L.*) Pada Mencit Putih Jantan. *Scientia. Jurnal Farmasi dan Kesehatan* 6(2):139
- Aminah, A., Tomayahu, N., & Abidin, Z. (2017). Penetapan kadar flavonoid total ekstrak etanol kulit buah alpukat (*Persea americana Mill.*) dengan metode spektrofotometri UV-Vis. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 4(2), 226-230.
- Andarwati, D. 2010. Uji Aktivitas Immunostimulan Sediaan Teh Kombinasi Kaliks Rosella (*Hibiscus sabdariffa*) dan Herba Pegagan (*Centella asiatica*) dengan Metode Uji Hipersensitivitas Tipe Lambat dan Hitung Jumlah Sel Limfosit pada Mencit. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Program Studi Farmasi. Universitas Indonesia: Depok. P: 4.
- Arif, M. 2009. Penuntun Praktikum Hematologi. Universitas Hasanudin .
- Arif, M. R., Ernawati, E. E., & Rudiana, T. (2021). Aktivitas Antibakteri I (*Propionibacterium acne*) dan Antidiabetes dari Ekstrak Etanol Daun Bayam (*Alternanthera amoena*, Voss). *Jurnal Medika & Sains [J-MedSains]*, 1(1), 19-37.
- Bastian, B., Sari, I., & Pratama, F. P. (2022). Analysis of C-Reactive Protein (CRP) Levels in Venous and Capillary Blood Samples with Immunoturbidimetric Methods. *Medicra (Journal of Medical Laboratory Science/Technology)*, 5(1), 1-5.
- Bendich, A., Gabriel, E., & Machlin, L. J. (1986). Dietary vitamin E requirement for optimum immune responses in the rat. *The Journal of nutrition*, 116(4), 675-681.
- Block, K. I., & Mead, M. N. (2003). Immune system effects of echinacea, ginseng, and astragalus: a review. *Integrative cancer therapies*, 2(3), 247-267.
- Boddeke, H. W. G. M. (2001). Expression of interleukin-1 beta in rat dorsal root ganglia. *Journal of neuroimmunology*, 118(2), 203-211.
- Boehm, T., & Bleul, C. C. (2007). The evolutionary history of lymphoid organs. *Nature immunology*, 8(2), 131-135.
- Brion, L. P., Bell, E. F., Raghuvver, T. S., & Cochrane Neonatal Group. (1996). Vitamin E supplementation for prevention of morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2010(1).
- Cesta, M. C., Zippoli, M., Marsiglia, C., Gavioli, E. M., Mantelli, F., Allegretti, M.,

- & Balk, R. A. (2022). The role of interleukin-8 in lung inflammation and injury: Implications for the management of COVID-19 and hyperinflammatory acute respiratory distress syndrome. *Frontiers in pharmacology*, *12*, 3931.
- Chairunnisa, S., Wartini, N. M., & Suhendra, L. (2019). Pengaruh suhu dan waktu maserasi terhadap karakteristik ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana* L.) sebagai sumber saponin. *Jurnal Rekayasa Dan Manajemen Agroindustri ISSN*, *2503*, 488X.
- Chotimah, C. (2019). *Uji total flavonoid dan aktivitas antioksidan ekstrak daun dan kulit batang Dadap Serep (Erythrina subumbrans (Hassk.) Merr.) menggunakan pelarut yang berbeda* (Doctoral dissertation, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim).
- Ellya, H., Nurlaila, N., Sari, N. N., Apriani, R. R., Mulyawan, R., Purba, F., & Fithria, S. (2021). Pendampingan Introduksi Bayam Brazil Sebagai Sayur. Pekarangan di Kota Banjarbaru. *LOGISTA-Jurnal Ilmiah Pengabdian kepada Masyarakat*, *5*(1), 253-258.
- Cooper, M. D., & Alder, M. N. (2006). The evolution of adaptive immune systems. *Cell*, *124*(4), 815-822.
- Cooper, N., & Arnold, D. M. (2010). The effect of rituximab on humoral and cell mediated immunity and infection in the treatment of autoimmune diseases. *British journal of haematology*, *149*(1), 3-13.
- Coperchini, F., Chiovato, L., Croce, L., Magri, F., & Rotondi, M. (2020). The cytokine storm in COVID-19: An overview of the involvement of the chemokine/chemokine-receptor system. *Cytokine & growth factor reviews*, *53*, 25-32.
- D'Amelia, V., Aversano, R., Chiaiese, P., & Carputo, D. (2018). The antioxidant properties of plant flavonoids: their exploitation by molecular plant breeding. *Phytochemistry Reviews*, *17*, 611-625.
- Dahlia, A. A., & Ahmad, A. R. (2014). Penetapan kadar flavonoid total dari ekstrak etanolik daun benalu mangga (*dendrophthoe pentandra* l. miq). *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, *1*(1).
- Della Corte, C. M., & Morgillo, F. (2019). Early use of steroids affects immune cells and impairs immunotherapy efficacy. *Esmo Open*, *4*(1).
- Delves, P. J., & Roitt, I. M. (2000). The immune system. *New England journal of medicine*, *343*(1), 37- 49.
- Deng, H. K., Le Rhun, D., Lecuelle, B., Le Naour, E., & Vayssier-Taussat, M. (2012). Role of the spleen in Bartonella spp. infection. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *64*(1), 143-145.
- Depkes, R. I. (2000). Parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat. *Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia*, 3-30.
- Djama, Lawrence Billy Vasco. (2021). Potensi Ekstrak Kedelai (*Glycine max*) sebagai Imunosupresan sel Limfosit pada Mencit (*Mus musculus* L.). Bachelor thesis. Universitas Kristen Duta Wacana.
- Drexler M. (2010). What You Need to Know About Infectious Disease. Washington (DC): National Academies Press (US).
- Du Clos, T. W., & Mold, C. (2004). C-reactive protein: an activator of innate

- immunity and a modulator of adaptive immunity. *Immunologic research*, 30, 261-277.
- Dubey, J.P., Miller, N.L. & Frenkel, J.K. (1970). Characterization on the new fecal from of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Parasitology*, pp. 447-456.
- Dwisari, F., & Harlia, A. H. A. (2016). Isolasi Dan Karakterisasi Senyawa Terpenoid Ekstrak Metanol Akar Pohon Kayu Buta-buta (*Excoecaria agallocha* L.). *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, 5(3).
- Erniati, E., & Ezraneti, R. (2020). Aktivitas imunomodulator ekstrak rumput laut. *Acta Aquatica: Aquatic Sciences Journal*, 7(2), 79-86.
- Elisma, E., Rahman, H., & Lestari, U. (2020). Ppm Pemberdayaan Masyarakat Dalam Pengolahan Tanaman Obat Sebagai Obat Tradisional Di Desa Mendalo Indah Jambi Luar Kota. *SELAPARANG Jurnal Pengabdian Masyarakat Berkemajuan*, 4(1), 274-277.
- El Ayadi, A., Herndon, D. N., & Finnerty, C. C. (2018). Biomarkers in burn patient care. In *Total burn care* (pp. 232-235). Elsevier.
- Emelda, A., Rahman, S., & Hardianti, H. (2015). Efek imunostimulan infus buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) asal Kab. Sidrab Sulawesi Selatan terhadap sekresi antibodi tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dengan teknik hemaglutinasi. *Journal of Tropical Pharmacy and Chemistry*, 3(1), 37-41.
- Fahrimal, Y., Eliawardani, E., Rafina, A., Azhar, A. & Asmilia, N. (2014). Profil Darah Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinfeksi Trypanosoma evansi dan Diberikan Ekstrak Kulit Batang Jaloh (*Saliz tetrasoerma* Roxb). *Jurnal Kedokteran Hewan-Indonesian of Journal Veterinary Sciences*, 8(2).
- Firani, N. K. (2018). *Mengenal Sel-Sel Darah dan Kelainan Darah*. Universitas Brawijaya Press.
- Fox, S., Leitch, A., Duffin, R., Haslett, C., & Rossi, A. (2010). Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *ournal of innate immunity*, 2(3), 216-227.
- Freitas, M., Lima, J. L., & Fernandes, E. (2009). Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review. *Analytica chimica acta*, 649(1), 8-23.
- Fristiohady, A., Wahyuni, W., Malik, F., Leorita, M., Yusuf, M., Febriansyah, H., & Sahidin, S. (2019). fek Imunomodulator Ekstrak Etanol Spons *Xestospongia* Sp. Terhadap Aktivitas Fagositosis Makrofag Pada Mencit Jantan Galur Balb/C. *Jurnal Mandala Pharmacon Indonesia*, 5(01), 15-30.
- Fujiwara, N., & Kobayashi, K. (2005). Macrophages in inflammation. *Current Drug Targets-Inflammation & Allergy*, 4(3), 281-286.
- Gantt, R. W., Peltier-Pain, P., & Thorson, J. S. (2011). Enzymatic methods for glyco (diversification/randomization) of drugs and small molecules. *Natural product reports*, 28(11), 1811-1853.
- Germic, N., Frangez, Z., Yousefi, S., & Simon, H. U. (2019). Regulation of the innate immune system by autophagy: neutrophils, eosinophils, mast cells, NK cells. *Cell Death & Differentiation*, 26(4), 703-714.
- Guntarti, A., & Rulyani, A. (2020). Penetapan Flavonoid Total Dan Uji Aktivitas Antioksidan Bayam (*Amaranthus tricolor* L.) Varietas Giti Merah Dan Giti

- Hijau. *Jurnal Farmasi Sains Dan Praktis*, 6(1), 51-59.
- Hanafi, N. A., Sutjiatmo, A. B., & Vikasari, S. N. (2014). Uji Efek Antitukak Lambung Ekstrak Air Herba Bayam Merah (*Amaranthus tricolor* L.) terhadap Tikus Wistar Betina. *Kartika: Jurnal Ilmiah Farmasi*, 2(1), 44-49.
- Handayani GN. (2010). Imunomodulator. *Jurnal Al-Fikr*. vol 14(1): 150-166.
- Hanlon, K. E., & Vanderah, T. W. (2010). *Constitutive Activity at the Cannabinoid CB1 Receptor and Behavioral Responses. Constitutive Activity in Receptors and Other Proteins, Part A*, 3–30. doi:10.1016/b978-0-12-381298-8.00001-0
- Haeria, H. (2013). Penetapan Kadar Flavonoid Total dan Uji Daya Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Ungu (*Graptophyllum Pictum* L.) Griff. *Jurnal farmasi UIN Alauddin Makassar*, 1(1), 1-9.
- Han, L., Xiang, T., & Zhao, H. (2022). Immunomodulatory potential of flavonoids for the treatment of autoimmune diseases and tumour. *Scandinavian Journal of Immunology*, 95(1), e13106.
- Harborne JB. 1987. Metode Fitokimia. Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan. Terjemahan Padmawinata K dan Soediro. I. Bandung: Penerbit ITB
- Hermanto, F. A. (2022). Aktivitas Antiplasmodium dan Pengaruh Resveratrol terhadap Indeks Organ Mencit yang Terinfeksi Plasmodium berghei ANKA. *PHARMACY: Jurnal Farmasi Indonesia (Pharmaceutical Journal of Indonesia)*, 19(1), 28-39.
- Herrero, M. (2013). *Liquid Chromatography / Food Applications. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. doi:10.1016/b978-0-12-409547-2.00290-0
- Hillion, S., Arleevskaya, M. I., Blanco, P., Bordron, A., Brooks, W. H., Cesbron, J. Y., Renaudineau, Y. (2019). *The Innate Part of the Adaptive Immune System. Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. doi:10.1007/s12016-019-08740-1
- Hughes, S. F., Moyes, A. J., Lamb, R. M., Ella-tongwiis, P., Snyder, N. Y. F., & Shergill, I. (2020). *The role of phagocytic leukocytes following flexible ureteroscopy, for the treatment of kidney stones: an observational, clinical pilots-study. European Journal of Medical Research*, 25(1). doi:10.1186/s40001-020-00466-7
- Husna, R. S. N., Effendi, E. M., & Maheshwari, H. (2018). Efek Samping Ekstrak Etanol 96% dan 70% Herba Kemangi (*Ocimum Americanum* L.) Yang Bersifat Estrogenik Terhadap Kadar Asam Urat Pada Tikus Putih. *Ekologia: Jurnal Ilmiah Ilmu Dasar dan Lingkungan Hidup*, 16(2), 32-38.
- Hrdý, J., Súkeníková, L., Petrásková, P., Novotná, O., Kahoun, D., Petříček, M., ... & Petříčková, K. (2020). Inhibition of Pro-Inflammatory Cytokines by Metabolites of Streptomycetes—A Potential Alternative to Current Anti-Inflammatory Drugs?. *Microorganisms*, 8(5), 621.
- Ikalinus, R., Widyastuti, S. K., & Setiasih, N. L. E. (2015). Skrining fitokimia ekstrak etanol kulit batang kelor (*Moringa oleifera*). *Indonesia Medicus Veterinus*, 4(1), 71-79.
- Institute of Medicine. Food and Nutrition Board. (2000). Dietary Reference Intakes: Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. Washington, DC:

National Academy Press.

- Jain, S., Gautam, V., & Naseem, S. (2011). Acute-phase proteins: As diagnostic tool. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 3(1), 118.
- Janeway, C., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. (2001). *In Immunobiology: The Immune System in Health and Disease 5th edition*. New York: Garland Science.
- Jiang, L., Zhang, G., Li, Y., Shi, G., & Li, M. (2021). Potential application of plant-based functional foods in the development of immune boosters. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 637782.
- Jimoh, M. O., Afolayan, A. J., & Lewu, F. B. (2019). Therapeutic uses of *Amaranthus caudatus* L. *Trop. Biomed*, 36, 1038-1053.
- Jin, X., Su, R., Li, R., Song, L., Chen, M., Cheng, L., & Li, Z. (2016). Amelioration of particulate matter-induced oxidative damage by vitamin c and quercetin in human bronchial epithelial cells. *Chemosphere*, 144, 459-466.
- Kalma, K. (2018). Studi Kadar C-Reactive Protein (Crp) Pada Penderita Diabetes Melitus Tipe 2. *Jurnal Media Analis Kesehatan*, 1(1), 63-64.
- Kamtchoung, P. (2022). *Amaranthus hybridus* (Amaranthaceae) prevents the detrimental effects of cyclophosphamide on ovarian function in Wistar rats: An experimental study. *International Journal of Reproductive BioMedicine (IJRM)*, 651-662.
- Khalishah, H., Kurniawan, H., Nugraha, F., Nurbaeti, S., & Fajriaty, I. (2021). Pengaruh pemberian serbuk cangkang telur terhadap bobot badan dan indeks organ tikus putih (*Rattus norvegicus* L.) galur wistar dalam 28 hari. *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN*, 5(1).
- Khasanah, M., Harjoko, A., & Candradewi, I. (2016). Klasifikasi Sel Darah Putih Berdasarkan Ciri Warna dan Bentuk dengan Metode K-Nearest Neighbor (K-NN). *IJEIS (Indonesian J. Electron. Instrum, Syst)*, 6(2), 151.
- Kinsey, G. R., & Okusa, M. D. (2012). Role of leukocytes in the pathogenesis of acute kidney injury. *Critical care*, 16(2), 1-5.
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The scientific world journal*, 2013.
- Kusmana, C., & Hikmat, A. (2015). Keanekaragaman hayati flora di Indonesia. *Jurnal Pengelolaan Sumberdaya Alam dan Lingkungan (Journal of Natural Resources and Environmental Management)*, 5(2), 187-187.
- Kovacssovics-Bankowski, M. & Rock, K.L. (1995). A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presentes on MHC class I molecules. *Science*, 267(5195), pp.243-246.
- Lakhanpal, P., & Rai, D. K. (2007). Quercetin: a versatile flavonoid. *Internet Journal of Medical Update*, 2(2), 22-37.
- Laksana, T. (2010). Pembuatan Simplisia dan Standarisasi Simplisia. *Yogyakarta: UGM*.
- Larrotta, H. R., Hernández-Rodríguez, P., Baquero, L. P.(2019). Flavonoids: Potential therapeutic agents by their antioxidant capacity. In *Bioactive compounds* (pp. 265-288). Woodhead Publishing.
- Lee, G., & Han, S. (2018). *The Role of Vitamin E in Immunity. Nutrients*, 10(11), 1614.

- Lestari, I. C. (2020). Potensi Herbal sebagai Imunodulator. *Jurnal Kedokteran Ibnu Nafis*, 9(2), 33-44
- Leyva-López, Nayely; Gutierrez-Grijalva, Erick; Ambriz-Perez, Dulce; Heredia, J. (2016). *Flavonoids as Cytokine Modulators: A Possible Therapy for Inflammation-Related Diseases*. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 921–. doi:10.3390/ijms17060921.
- Lewis, E. D., Meydani, S. N., & Wu, D. (2019). Regulatory role of vitamin E in the immune system and inflammation. *IUBMB life*, 71(4), 487-494.
- Listiani, N., & Susilawati, Y. (2019). Review Artikel: Potensi Tumbuhan Sebagai Imunostimulan. *Farmaka*, 17(2), 222-230.
- Limeranto, D.M., Madyaningrana, K., dan Prakasita, V. C. (2022). *Pengaruh Ekstrak Bayam Brasil (Alternanthera sissoo hort) Pada Profil Hemoglobin, Hematokrit, dan Eritrosit Mencit (Mus musculus) yang Diinduksi Dengan Sodium Nitrit (NaNO₂) Skrining Fitokimia dan Aktivitas Ekstrak Etanol Bayam Brazil*. Skripsi. Fakultas Bioteknologi. Universitas Kristen Duta Wacana: Yogyakarta.
- Liu, E., & Fan, J. (Eds.). (2017). *Fundamentals of laboratory animal science*. CRC Press.
- Lubbers, R., Van Essen, M. F., Van Kooten, C., & Trouw, L. A. (2017). Production of complement components by cells of the immune system. *Clinical & Experimental Immunology*, 188(2), 183-194.
- Madyaningrana, K., Budiarso, T. Y., Ariestanti, C. A., Pandapotan, D. D., & Sinaga, W. S. (2022). Pembuatan Pupuk Organik Cair untuk Mendukung Pertumbuhan Bayam Brasil di Komunitas Omah Paseduluran Sleman dan Gemah Ripah Yogyakarta. *Jurnal Abditani*, 5(2), 119-123.
- Marshall, J. S., Warrington, R., Watson, W., & Kim, H. L. (2018). *An introduction to immunology and immunopathology. Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 14(S2). doi:10.1186/s13223-018-0278-1 .
- Mardiya. (2021). *Bayam Brazil dan Gizi Keluarga*. <http://bitly.ws/yfXp>. Diakses tanggal 26 Desember 2022.
- Mauliandani, D., Lukmayani, Y., & Sadiyah, E. R. (2017). Isolasi dan identifikasi senyawa flavonoid yang berpotensi sebagai antioksidan dari herba bayam merah (*Amaranthus tricolor L.*). *Prosiding Farmasi*, 294-302.
- MBascones-Martinez, A., Mattila, R., Gomez-Font, R., & Meurman, J. (2014). *Immunomodulatory drugs Oral and systemic adverse effects*. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*, e24–e31. doi:10.4317/medoral.19087
- Middleton Jr, E. (1998). Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Flavonoids in the living system*, 175-182.
- Moalem, G., & Tracey, D. J. (2006). Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain research reviews*, 51(2), 240-264.
- Morris, M. C., Evans, D. A., Bienias, J. L., Tangney, C. C., & Wilson, R. S. (2002). Vitamin E and cognitive decline in older persons. *Archives of neurology*, 59(7), 1125-1132.
- Moro-García, M. A., Mayo, J. C., Sainz, R. M., & Alonso-Arias, R. (2018). Influence of inflammation in the process of T lymphocyte differentiation: proliferative, metabolic, and oxidative changes. *Frontiers in immunology*, 9,

339.

- Mroczek, A. (2015). Phytochemistry and bioactivity of triterpene saponins from Amaranthaceae family. *Phytochemistry Reviews*, 14(4), 577-605.
- Mutiarahmi, C. N., Hartady, T., & Lesmana, R. (2021). Kajian Pustaka: Penggunaan Mencit Sebagai Hewan Coba di Laboratorium yang Mengacu pada Prinsip Kesejahteraan Hewan. *Jurnal Indonesia Medicus Veterinus*, 10.
- Nazir, E. (2020). Efek Immunostimulan Ekstrak Etanol Daun Seledri terhadap Mencit Putih Jantan. *Jurnal Penelitian Farmasi Indonesia*, 9(1), 1-7.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information). (2023). PubChem Taxonomy Summary for Taxonomy 10090, *Mus musculus* (house mouse). (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/Mus-musculus>). Diakses pada Sabtu, 1 April 2023.
- NIH (National Institutes of Health). 2010. Dietary Supplement Fact Sheet : Vitamin E. (<https://ods.od.nih.gov/factsheets/Vitamine-HealthProfessional/>). Diakses tanggal 2 Maret 2023.
- Nishino, M., Ashiku, S. K., Kocher, O. N., Thurer, R. L., Boiselle, P. M., & Hatabu, H. (2006). The thymus: a comprehensive review. *Radiographics*, 26(2), 335-348.
- Novenda, O., & Nuroini, F. (2019). Uji Efektifitas Anti Inflamasi Ekstrak Akuosa Sarang Walet (*Collocalia fuciphaga* Thunberg) Terhadap Kadar C-Reaktif Protein Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). In *Prosiding Seminar Nasional Mahasiswa Unimus (Vol. 2)*.
- O'Brien, T., Thomas, D. G., Morel, P. C., & Rutherford-Markwick, K. J. (2015). Moderate dietary supplementation with vitamin E enhances lymphocyte functionality in the adult cat. *Research in veterinary science*, 99, 63-69.
- Oktiansyah, R. (2019). Daily Activity of Male Mice (*Mus musculus*) in Laboratory. *Jurnal Biota*, 5(2), 80-88.
- Ozaktay AC, Kallakuri S, Takebayashi T, *et al.* Efek interleukin-1 beta, interleukin-6, dan faktor nekrosis tumor pada sensitivitas
- Palanza, P., Gioiosa, L., & Parmigiani, S. (2001). Social stress in mice: gender differences and effects of estrous cycle and social dominance. *Physiology & behavior*, 73(3), 411-420
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5.
- Patel, B., & Chourasiya, A. (2019). Evaluation of Immunomodulatory Potential of *Amaranthus Dubius* Leaf on Rodent Models. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 9(3-s), 510-514.
- Peters, A. M. (1998). *Just How Big is the Pulmonary Granulocyte Pool? Clinical Science*, 94(1), 7–19. doi:10.1042/cs0940007
- Perdana, P. R. (2022). Aktivitas Immunodulator Ekstrak Herba Menira (*Phyllanthus niruri* L.). *Jurnal Farmagazine*, 9(1), 50-54.
- Polak, E., Stępień, A., Gol, O., & Tabarkiewicz, J. (2021). Potential immunomodulatory effects from consumption of nutrients in whole foods and supplements on the frequency and course of infection: preliminary results. *Nutrients*, 13(4), 1157.

- Priatna, M. (2015). Uji Aktivitas Hipoglikemik Ekstrak Etanol Bayam (*Amaranthus cruentus* L.) Pada Mencit Putih Jantan Galur Swiss-Webster. *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada: Jurnal Ilmu-ilmu Keperawatan, Analisis Kesehatan dan Farmasi*, 9(1), 49.
- Puspitadewi, I. N., Margawati, A., & Wijayanti, H. S. (2018). Pengaruh Pemberian Sari Ubi Ungu (*Ipomea batatas* L.) Terhadap Kadar High Sensitivity C-Reactive Protein (hs-CRP) Pada Tikus
- Rahayu, N. K. S. I. (2022). *Skrining Fitokimia dan Aktivitas Ekstrak Etanol Bayam Brazil*. (Doctoral dissertation, Poltekkes Kemenkes Denpasar Jurusan Teknologi Laboratorium Medis 2022).
- Rajab, I. M., Hart, P. C., & Potempa, L. A. (2020). How C-reactive protein structural isoforms with distinctive bioactivities affect disease progression. *Frontiers in immunology*, 11, 2126.
- Retnaningsih, P., & Susanto, A. J. (2022). Peran Jinten Hitam (*Nigella Sativa*) sebagai Imunomodulator Menurunkan Sitokin Il-6 pada Penderita Covid 19: Review Artikel. *Syntax Literate; Jurnal Ilmiah Indonesia*, 7(4), 4632-4642.
- Ribeiro, Daniela; Freitas, Marisa; Lima, José L. F. C.; Fernandes, Eduarda (2015). *Proinflammatory Pathways: The Modulation by Flavonoids. Medicinal Research Reviews*.
- Riley, L. K., & Rupert, J. (2015). Evaluation of patients with leukocytosis. *American family physician*, 92(11), 1004-1011.
- Rizvi, S., Raza, S. T., Ahmed, F., Ahmad, A., Abbas, S., & Mahdi, F. (2014). The role of vitamin E in human health and some diseases. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 14(2), e157.
- Robinson, D. L., Brunner, L. J., & Gonzales, R. A. (2002). Effect of gender and estrous cycle on the pharmacokinetics of ethanol in the rat brain. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 26(2), 165-172.
- Ruff, K. J., & DeVore, D. P. (2014). *Reduction of pro-inflammatory cytokines in rats following 7-day oral supplementation with a proprietary eggshell membrane-derived product. Modern Research in Inflammation*, 03(01), 19–25. doi:10.4236/mri.2014.31003
- Schalm OW, Jain NC, Carrol EJ. (1995). *Veterinary Hematology*. 3rd ed. Lea and Febiger, Philadelphia.
- Semba, R. D., & Bloem, M. W. (2002). The anemia of vitamin A deficiency: epidemiology and pathogenesis. *European journal of clinical nutrition*, 56(4), 271-281.
- Shakoor, H. e. (2021). Immune-boosting role of vitamins D, C, E, zinc, selenium and omega-3 fatty acids: Could they help against COVID-19? *Maturitas*, 143, pp. 1–9.
- Sharma, R., Palanisamy, A., Dhama, K., Mal, G., Singh, B., & Singh, K. P. (2020). Exploring the possible use of saponin adjuvants in COVID-19 vaccine. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 16(12), 2944-2953.
- Siga, Theresia A.D., Madyaningrana, K., dan Prihatmo, G. (2022). *Pengaruh Pemberian Pupuk Organik Cair Berbasis Urin Domba dan Slurry Reaktor Biogas Terhadap Pertumbuhan Bayam Brasil (Alternanthera sissou hort)*. Skripsi. Tidak Diterbitkan. Fakultas Bioteknologi. Universitas Kristen Duta

Wacana : Yogyakarta.

- Singh, S., Tank, N. K., Dwiwedi, P., Charan, J., Kaur, R., Sidhu, P., & Chugh, V. K. (2018). Monoclonal antibodies: a review. *Current clinical pharmacology*, 13(2), 85-99.
- Singla RK, Dhir V, Madaan R, Kumar D, Singh Bola S, Bansal M, Kumar S, Dubey AK, Singla S, Shen B. The Genus *Alternanthera*: Phytochemical and Ethnopharmacological Perspectives. *Front Pharmacol*. 2022 Apr 11;13:769111. doi: 10.3389/fphar.2022.769111. PMID: 35479320; PMCID: PMC9036189.
- Silvia, D. (2021). *Analisis Marker Inflamasi Terhadap Status Nutrisi pada Pasien Kanker Kepala dan Leher (Kajian terhadap Ratio Neutrofil/Limfosit (NLR) dan Prognostic Nutritional Index (PNI))*. (Doctoral dissertation, Universitas Hasanuddin).
- Septianto, R., Ardana, I., Sudira, I., & Dharmayudha, A. (2015). Profil Hematologi Mencit Pasca Pemberian Jamu Temulawak Secara Oral. *Buletin Veteriner Udayana*, 34-40.
- Soltan, M., Rohrer, M., & Prasad, H. (2012). Monocytes: super cells for bone regeneration. *Implant dentistry*, 21(1), 13-20.
- Spelman K., Burns J., Nichols D., Winters N., Ottersberg S., dan Tenborg M. 2006. Modulation of Cytokine Expression by Traditional Medicines : A Review of Herbal Immunomodulator, *Alternative Medicine Review*, 11 (2): 128-50.
- Steinman, R. M. (2012). *Decisions About Dendritic Cells: Past, Present, and Future. Annual Review of Immunology*, 30(1), 1–22. doi:10.1146/annurev-immunol-100311-102839.
- Stankovic, M. (2011). Total Phenolic Content, Flavonoid Concentration and Antioxidant Activity of *Marrubium peregrinum* L. Extract. *Krajuevac Journal Science*, 63-72
- Suardana, I. (2017). *Diktat imunologi dasar sistem imun*. Denpasar: Fakultas Kedokteran Hewan.
- Suhirman, S., & Winarti, C. (2010). Prospek dan fungsi tanaman obat sebagai imunomodulator. *Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik*, hal, 121-131.
- Sulasmis, E. S., Wuriana, Z. F., Sari, M. S., & Suhadi, S. (2018, September). Analisis Kualitatif Kandungan Senyawa Aktif (Flavonoid, Alkaloid, Polifenol, Saponin, Terpenoid dan Tanin) pada Ekstrak Metanol Daun dan Rhizoma *Phymatodes scolopendria* (Burm.) Ching di Taman Nasional Baluran. In *Prosiding Seminar Nasional Hayati* (Vol. 6, pp. 121-128).
- Sulistiani, R. P., & Rahayuningsih, H. M. (2015). Pengaruh Ekstrak Lompong Mentah (*Colocasia esculenta* L Schoot) terhadap Aktivitas Fagositosis dan Kadar NO (Nitrit Oksida) Mencit Balb/C Sebelum dan Sesudah Terinfeksi *Listeria monocytogenes*. *Journal of Nutrition College*, 4(4), 409-415.
- Suparman, A., & Saptarini, N. M. (2019). Review Artikel: Formulasi Tablet Imunostimulan Ekstrak Daun Pepaya, Herba Meniran, dan Rimpang Kunyit. *J Farmaka*, 17(2), 111 -117.
- Tamelan, C., Madyaningrana, K., & Prakasita, V. (2022). The Effect of Kesambi Bark Extract on Mice Lymphocyte Count and Spleen Index. *BIOLINK*

- (*Jurnal Biologi Lingkungan Industri Kesehatan*), 8(2), 195-206.
- Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2014). IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(10), a016295.
- Teatrawan, I. A., Madyaningrana, K., Ariestanti, C. A., & Prihatmo, G. (2022). Pemanfaatan Limbah Ampas Coffea Canephora sebagai Pupuk Pendukung Pertumbuhan Altenanthera Sissoo. *Bioma: Jurnal Biologi dan Pembelajaran Biologi*, 7(1), 90-104.
- Tong, Z., He, W., Fan, X., & Guo, A. (2022). Biological function of plant tannin and its application in animal health. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 1597.
- Traber, M. G. (2007). Vitamin E regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Nutr.*, 27, 347-362.
- Traber, M. G., & Atkinson, J. (2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free radical biology and medicine*, 43(1), 4-15.
- VanCott, T., & Jackson, H. (2020). Vaccine adjuvants: preparation methods and research protocols edited by Derek O'Hagan, humana press. *Trends in Biotechnology*, 18(12), 511.
- Wang, Y., Huang, G., Wang, J., Molina, H., Chaplin, D.D. & Fu, Y.X. (2000). Antigen persistence is required for somatic mutation and affinity maturation of immunoglobulin. *European journal of immunology*, 30(8). pp.2226-2234.
- Ward, P. A., & Lentsch, A. B. (1999). The acute inflammatory response and its regulation. *Archives of surgery*, 134(6), 666-669.
- Warnis, M., Aprilina, L. A., & Maryanti, L. (2020, December). Pengaruh suhu pengeringan simplisia terhadap kadar flavonoid total ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* L.). In *Seminar Nasional Kahuripan*. (pp. 264-268).
- Warrington, R., Watson, W., Kim, H. L., & Antonetti, F. R. (2011). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 7(1), 1-8.
- Watcho, P., Ngueyong, P. C. N., Deeh, P. B. D., Fozin, G. R. B., Ngadju, E., Wankeu-Nya, M., &
- Watkins, L. R., Milligan, E. D., & Maier, S. F. (2003). Glial proinflammatory cytokines mediate exaggerated pain states: implications for clinical pain. *Advances in experimental medicine and biology*, 521, 1-21.
- Wiedosari, E. (2007). Peranan Imunomodulator alami (*Aloe vera*) dalam sistem imunitas seluler dan humoral. *Wartazoa*, 17(4), 165-171.
- Washko, P. W., Wang, Y. A. O. H. U. I., & Levine, M. (1993). Ascorbic acid recycling in human neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*, 268(21), 15531-15535.
- Wendersteyt, N. V., Wewengkang, D. S., & Abdullah, S. S. (2021). Uji Aktivitas Antimikroba Dari Ekstrak Dan Fraksi Ascidian *Herdmania momus* Dari Perairan Pulau Bangka Likupang Terhadap Pertumbuhan Mikroba *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* dan *Candida albicans*. *PHARMACON*, 10(1), 706-712.
- Wieseler-Frank, J., Maier, S. F., & Watkins, L. R. (2004). Glial activation and pathological pain. *Neurochemistry international*, 45(2-3), 389-395.
- Whidyastuti, D. (2019). Pengaruh Pemberian Minyak Cincalok Terhadap Bobot Badan dan Indeks Organ Hati, Jantung, Ginjal, Paru-Paru, dan Limpa Tikus

- Putih Galur Wistar. *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN*, 4(1).
- Whika, F. D., Leni, R., & Ismi, R. (2017). Rendemen dan Skrining Fitokimia pada Ekstrak Daun Sansevieria sp. *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan*, 17(3), 197-202.
- WHO (World Health Organization). 2020. The top 10 causes of death (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>). Diakses 7 Maret 2023.
- Wuni, P. M., Madyaningrana, K., dan Prakasita, V. C. (2022). Efek Ekstrak Daun Bayam Brasil (*Alternanthera sissoo* hort) Terhadap Jumlah Limfosit dan Indeks Organ Timus dan Limpa Mencit Jantan. *Metamorfosa: Journal of Biological Sciences* 9(2): 397-406.
- Xiao, X., Shi, D., Liu, L., Wang, J., Xie, X., Kang, T., & Deng, W. (2011). Quercetin suppresses cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis through inactivation of P300 signaling. *PloS one*, 6(8), e22934.
- Xie, W. R., Deng, H., Li, H., Bowen, T. L., Strong, J. A., & Zhang, J. M. (2006). Robust increase of cutaneous sensitivity, cytokine production and sympathetic sprouting in rats with localized inflammatory irritation of the spinal ganglia. *Neuroscience*, 142(3), 809-822.
- Yan, H. Q., Banos, M. A., Herregodts, P., Hooghe, R., & Hooghe-Peters, E. L. (1992). Expression of interleukin (IL)-1 β , IL-6 and their respective receptors in the normal rat brain and after injury. *European journal of immunology*, 22(11), 2963-2971.
- Zainal, T. H., Nisa, M. N., Saldi, S. H., & Sarrin, A. S. (2022). Formulasi Emulgel Ekstrak Etanol Daun Senggani (*Melastoma Malabathricum* L) Sebagai Luka Bakar. *Jurnal Inovasi Penelitian*, 3(2), 5029-5036.
- Ziberna, L., Fornasaro, S., Čvorović, J., Tramer, F., & Passamonti, S. (2014). Bioavailability of flavonoids: The role of cell membrane transporters. In *Polyphenols in human health and disease* (pp. 489-511). Academic Press.
- Zhang, J. M., & An, J. (2007). Cytokines, inflammation and pain. *International anesthesiology clinics*, 45(2), 27.