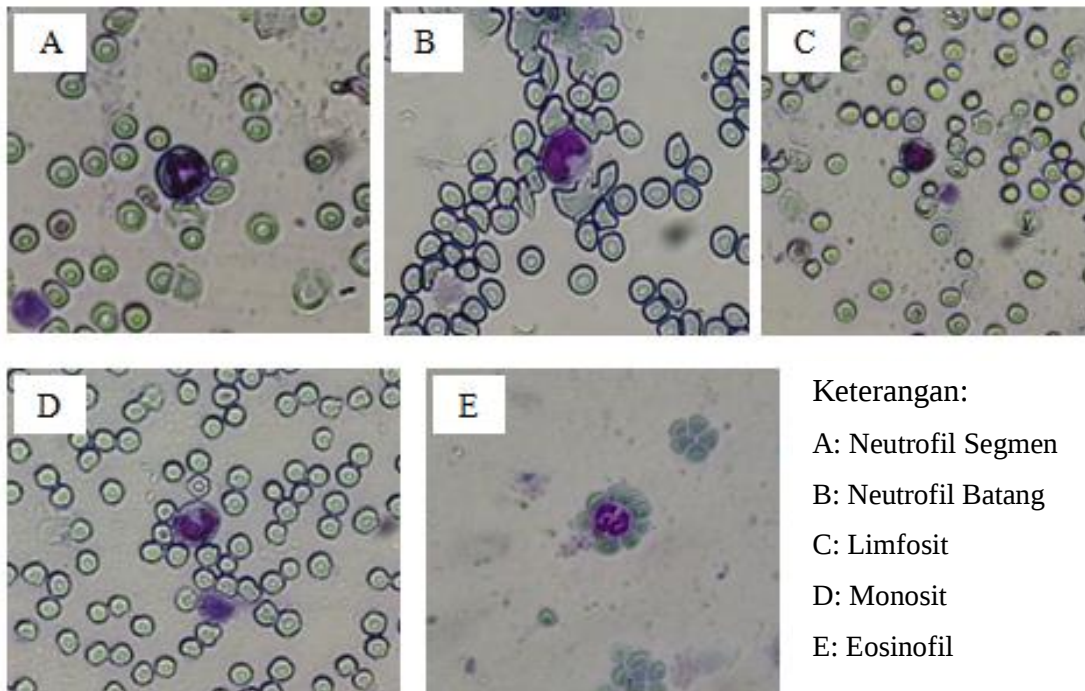


IMUNOMODULATOR

“Kumpulan Jurnal Penelitian mengenai
Imunomodulator”



Authors:

Prof. Dr. apt. Yufri Aldi, M. Si

apt. Dwisari Dillasamola, M. Farm

Efrian Shafardi, S. Farm

IMUNOMODULATOR

Penulis :

Yufri Aldi, Dwisari Dillasamola, Efrian Shafardi

diterbitkan oleh:

LPPM Universitas Andalas

IMUNOMODULATOR

Penulis :

Yufri Aldi, Dwisari Dillasamola, Efrian Shafardi

ISBN : 978-623-6703-01-4

Penerbit :

LPPM – Universitas Andalas

Gedung Rektorat Lantai 2 Kampus Unand Limau Manis Kampus Unand Limau Manis
Kota Padang Sumatera Barat Indonesia

Web: www.lppm.unand.ac.id

Telp. 0751-72645

Email: lppm.unand@gmail.com

Hak Cipta dilindungi Undang Undang.

Dilarang memperbanyak karya tulis ini dalam bentuk apapun dan dengan cara apapun tanpa ijin tertulis dari penerbit

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis ucapkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas berkat dan rahmat-Nya penulis dapat menyelesaikan buku **“Imunomodulator: Kumpulan Jurnal Penelitian mengenai Imunomodulator”**. Buku ini disusun agar dapat membantu para mahasiswa dalam mempelajari konsep-konsep sistem imun dan imunomodulator beserta mempermudah mempelajari materi sistem imun dan imunomodulator terutama bagi kaum awam yang belum mengenal sistem imun dan imunomodulator itu sendiri.

Penulis pun menyadari jika di dalam penyusunan buku ini mempunyai kekurangan, namun penulis meyakini sepenuhnya bahwa sekecil apapun buku ini tetap akan memberikan sebuah manfaat bagi pembaca.

Akhir kata untuk penyempurnaan buku ini, maka kritik dan saran dari pembaca sangatlah berguna untuk penulis kedepannya.

Padang, Desember 2020

Penulis

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI.....	iv
BAB I SISTEM IMUN	
1.1 Sistem imun.....	1
1.2 Komponen sistem imun	2
1.3 Imunomodulator.....	4
BAB II METODE PENELITIAN	
2.1 Metode <i>carbon clearance</i>	6
2.2 Metode induksi bakteri.....	7
2.3 Metode titer antibodi.....	8
2.4 Metode penentuan total dan persentase sel leukosit	8
2.5 Metode bobot limfa relatif	9
2.6 Metode-metode lain	9
BAB III PENELITIAN IMUNOMODULATOR	
3.1 Aktivitas Beberapa Subfraksi Herba Meniran (<i>Phyllanthus niruri</i> Linn.) terhadap Aktivitas dan Kapasitas Fagositosis Makrofag	10
3.2 Aktivitas Imunomodulator dari Ekstrak Etanol Meniran (<i>Phyllanthus niruri</i> Linn.) terhadap Ayam Broiler	12
3.3 Aktivitas Imunomodulator dan Jumlah Sel Leukosit dari Ekstrak Kulit Buah Naga Merah (<i>Hylocereus Lemairei</i> (Hook.) Britton & Rose) pada Mencit Putih Jantan.....	13
3.4 Uji Efek Immunomodulator dari Ekstrak Daun Manggis (<i>Garcinia mangostana</i> L.) dengan Metode <i>Carbon Clearance</i> dan Menghitung Jumlah Sel Leukosit pada Mencit Putih Jantan.....	19
3.5 Uji Efek Immunostimulasi Ekstrak Etanol Herba Ciplukan (<i>Physalis angulata</i> L.) terhadap Aktivitas dan Kapasitas Fagositosis Sel Makrofag pada Mencit Putih Betina	22
3.6 Uji Imunomodulator Beberapa Subfraksi Ekstrak Etil Asetat Meniran (<i>Phyllanthus Niruri</i> L.) pada Mencit Putih Jantan dengan Metoda <i>Carbon Clearance</i>	23
3.7 Uji Imunomodulator dan Jumlah Sel Leukosit dari Ekstrak Daun Kemangi (<i>Ocimum basilicum</i> L.) pada Mencit Putih Jantan	28

3.8	Effect of <i>Elephantopus Scaber</i> Linn. Leaf Extract on Mouse Immune System.....	32
3.9	Test immunomodulatory effects of ethanol extract skin of purple sweet potato (<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam) with carbon clearance method and the number of leukocytes	35
3.10	Immunomodulator Activity of Ethanol Extract of Tapak Liman Leaves (<i>Elephantopus scaber</i> Linn.)	41
3.11	Activity of Kincung Flowers (<i>Etlingera Elatior</i> (Jack) R.M.Sm.) on Total Leukocytes and Percentage of Leukocytes in Allergic Male White Mice	49
3.12	Activity and Capacity Test of Macrophage Peritoneal Cell and Number Leukocyte of Ethanol Extract Purple Sweet Potato Peel <i>Ipomoea Batatas</i> (L.) Lam.	54
3.13	The Effect of Coriander Ethanol Extract (<i>Coriandrum sativum</i> L.) Against Phagocytosis Activity and Capacity of the Macrophage Cells and the Percentage of Leukocyte Cells in White Male Mice	57
3.14	Immunomodulatory Effect Test from Moringa Leaf Extract (<i>Moringa oleifera</i> L.) with Carbon Clearance Method in Male White Mice.....	63
	DAFTAR PUSTAKA.....	68

BAB I

SISTEM IMUN

1.1 Sistem Imun

Sistem imun merupakan kumpulan mekanisme dalam suatu makhluk hidup yang melindunginya terhadap infeksi dengan mengidentifikasi dan membunuh substansi patogen. Sistem ini dapat mendeteksi bahan patogen, mulai dari virus sampai parasit dan cacing serta membedakannya dari sel dan jaringan normal. Deteksi merupakan suatu hal yang rumit karena bahan patogen mampu beradaptasi dan melakukan cara-cara baru untuk menginfeksi tubuh.

Sebagai suatu organ kompleks yang disusun oleh sel-sel spesifik, sistem imun juga merupakan suatu sistem sirkulasi yang terpisah dari pembuluh darah yang kesemuanya bekerja sama untuk menghilangkan infeksi dari tubuh. Organ sistem imun terletak di seluruh tubuh, dan disebut organ limfoid.

Pembuluh limfe dan kelenjar limfe merupakan bagian dari sistem sirkulasi khusus yang membawa cairan limfe, suatu cairan transparan yang berisi sel darah putih terutama limfosit. Cairan limfe membasahi jaringan tubuh, sementara pembuluh limfe mengumpulkan cairan limfe serta membawanya kembali ke sirkulasi darah. Kelenjar limfe berisi jala pembuluh limfe dan menyediakan media bagi sel sistem imun untuk mempertahankan tubuh terhadap agen penyerang. Limfe juga merupakan media dan tempat bagi sel sistem imun memerangi benda asing.

Sel imun dan molekul asing memasuki kelenjar limfe melalui pembuluh darah atau pembuluh limfe. Semua sel imun keluar dari sistem limfatik dan akhirnya kembali ke aliran darah. Begitu berada dalam aliran darah, sel sistem imun, yaitu limfosit dibawa ke jaringan di seluruh tubuh, bekerja sebagai suatu pusat penjagaan terhadap antigen asing.

Pada dasarnya, ada tiga macam strategi pertahanan tubuh: 1) Barrier fisikal (kulit dan mukosa yang utuh) dan kimia (asam lambung); 2) Respons imun alami (*innate/nonspesifik*), misal fagositosis; 3) Respons imun adaptif (spesifik). Apabila bahan patogen tidak dapat dihentikan oleh barrier fisik dan, bahan patogen akan masuk melalui kulit atau membran mukosa dan selanjutnya mengawali terjadinya lini pertama dari mekanisme pertahanan imunologi yang dinamakan respons imun *innate* atau nonspesifik atau alami. Bila bahan patogen tidak dapat dieliminasi oleh respons imun *innate*, penyakit akan menyerang sehingga respons imun adaptif atau spesifik akan diaktivasi, agar tubuh pulih kembali.

Respons imun dikategorikan menjadi respons imun *innate* (alami/ nonspesifik) dan respons imun adaptif (spesifik). Contoh komponen imunitas *innate* adalah sel fagosit (sel monosit, makrofag, neutrofil) yang secara hereditas mempunyai sejumlah peptida antimikrobia dan protein yang mampu membunuh bermacam-macam bahan patogen, bukan hanya satu bahan patogen yang spesifik. Sebaliknya, respons imun adaptif akan meningkat sesudah terpapar oleh suatu bahan patogen. Pada respons imun adaptif spesifik, sel limfosit (sel T dan sel B) merupakan komponen dasar yang berperan penting, mengindikasikan adanya respons imun yang spesifik. Kemampuan sel T dan sel B untuk mengenali struktur spesifik oligomer pada suatu bahan patogen dan membentuk progeni juga merupakan struktur yang dikenali, dan membuat sistem imun mampu merespons lebih cepat dan efektif ketika terpapar kembali dengan bahan patogen tersebut.

1.2 Komponen Sistem Imun

a. Fungsi Leukosit

- Kemotaksis

Begitu leukosit memasuki jaringan ikat, sel ini harus mampu bermigrasi dan menempati jaringan yang terluka. Hal ini terlaksana dengan baik oleh kemotaksis yang bergantung pada kemampuan leukosit untuk merasakan gradien kimia yang melintasi badan sel dan bermigrasi ke arah yang lebih tinggi konsentrasi kimianya. Fagosit hanya merasakan sejumlah kecil bahan kimia yaitu kemotaksin karena mempunyai reseptor kemotaksin. Reseptor untuk kemotaksis adalah protein yang tergolong dalam famili protein-G.

- Fagositosis

Contoh sel fagosit adalah sel neutrofil, monosit, dan makrofag. Seperti tipe lain dari sel darah putih, sel fagosit berasal dari sel punca (stem) pluripoten dalam sumsum merah tulang. Neutrofil dan monosit/makrofag merupakan sel yang efisien dalam fagositosis sehingga dinamakan fagosit profesional. Fagositosis oleh neutrofil lebih bersifat primitif dari pada fagositosis oleh makrofag dalam sistem imun. Sel fagosit tertarik ke tempat infeksi oleh proses kemotaksis.

Fagositosis merupakan proses multistap dengan sel fagosit memakan dan merusak agen infeksius. Fagositosis merupakan proses pencernaan partikel (dalam ukuran yang dapat terlihat oleh mikroskop cahaya) oleh sel. Fagositosis

dilakukan dalam fagosom, suatu vakuola yang struktur membrannya tidak jelas dan berisi bahan patogen.

b. Neutrofil dan Monosit/Makrofag

- Neutrofil

Neutrofil dan monosit merupakan sel fagositik dari leukosit. Perbedaan mendasar dari keduanya adalah neutrofil mengalami diferensiasi hampir lengkap dalam sumsum tulang selama 14 hari, sedangkan monosit keluar dari sumsum tulang sesudah 2 hari dalam keadaan yang relatif tidak dewasa dan berdiferensiasi dalam jaringan. Keduanya berukuran sama (diameter 10 μm) dan berada dalam darah.

Neutrofil berumur pendek (1-5 hari). Neutrofil juga dikenal dengan nama PMN (leukosit polimorfonuklear) dan merupakan sel leukosit terbanyak dalam darah, yaitu sekitar dua per tiga populasi leukosit (4000-8000 sel/ mm^3). Neutrofil memiliki lisosom dalam sitoplasmanya. Oleh karena itu neutrofil tidak perlu mengalami diferensiasi untuk melakukan fungsinya, sel ini cocok untuk respons segera. Jumlah neutrofil tidak berkurang dengan bertambah usia. Ketika neutrofil meninggalkan darah, sel ini selalu mempertahankan ukurannya yang kecil dan karenanya dinamakan mikrofas. Neutrofil hanya memfagosit patogen yang kecil seperti virus atau bakteri.

- Monosit/Makrofag

Makrofag merupakan bagian nonspesifik dari sistem imun yang memusnahkan dan merusak secara tidak selektif atau berusaha untuk merusak organisme asing atau debris. Monosit dianggap sebagai makrofag saat sel ini meninggalkan darah. Monosit menyempurnakan diferensiasinya dalam jaringan lokal dan diameternya menjadi lebih besar dari 22 μm , didesain sebagai makrofag. Kontras dengan neutrofil, makrofag dalam jaringan yang berasal dari darah, merespons rangsang kemotaktik lebih lambat, tetapi lebih efisien dalam memfagosit sisa jaringan patogen yang masih hidup dan yang sudah mati. Makrofag membunuh agen infeksi melalui beberapa mekanisme, seperti sekresi molekul yang sangat banyak, misalnya interferon (antivirus) atau lisosim (antibakteri) dan membentuk radikal oksigen, asam nitrat, serta produk yang mengandung klorin.

Makrofag hidup menetap dalam jaringan tertentu (sel kupffer dalam hati, mikroglia dalam otak) atau bergerak ke seluruh tubuh untuk mencari patogen

(makrofag patroli). Karena makrofag mengalami diferensiasi dan hidup dalam jaringan lokal, sel ini cocok untuk berkomunikasi dengan limfosit dan sel lain di sekitarnya. Makrofag hidup bulanan atau tahunan, cukup panjang untuk menyajikan antigen ke sel T. Sangat penting dalam aktivasi respons imun adaptif melawan patogen.

c. Limfosit

Tiga tipe utama limfosit dibedakan berdasarkan pada reseptor antigennya, menjadi limfosit-T, limfosit-B, dan sel pembunuh alami (NK, *Natural Killer*). Dalam darah, sel B dan sel T bersifat tidak aktif dan berukuran kecil (8-10 μm). Sel NK dapat berdiferensiasi secara luas dalam sumsum tulang dan tampak dalam darah sebagai suatu limfosit besar berganular. Dengan diameter $>15 \mu\text{m}$, sel menjadi lebih besar dari sel leukosit lainnya dalam darah.

d. Sitokin

Sitokin merupakan protein hormon yang kurang spesifik dan lebih terlokalisasi dibanding hormon endokrin serta dapat menstimulasi atau menghambat fungsi normal sel. Baik sistem imun selular maupun humoral dikoordinasi oleh sitokin (60 sitokin).

Sitokin terbagi dalam beberapa famili, termasuk interleukin, interferon, *tumor necrosis factor*, *colony stimulating factor*, dan kemokin yang mengatur migrasi sel di antara dan di dalam jaringan.

1.3 Imunomodulator

Imunomodulator adalah obat yang dapat mengembalikan dan memperbaiki sistem imun yang fungsinya terganggu atau yang fungsinya berlebihan. Ada dua cara mekanisme kerja dari obat imunomodulator yaitu *up regulation* (menguatkan sistem imun tubuh/imunostimulasi dan imunorestorasi) dan *down regulation* (menekan reaksi sistem imun yang berlebihan atau imunosupresi). Obat golongan imunomodulator bekerja menurut tiga cara, yaitu imunorestorasi, imunostimulasi dan imunosupresi.

- a. Imunorestorasi adalah cara untuk mengembalikan fungsi sistem imun yang terganggu dengan memberikan berbagai komponen sistem imun, seperti immunoglobulin dalam bentuk immune serum globulin (ISG), hyperimmune serum globulin (HSG), plasma, jaringan hati, timus dan leukopheresis (penghilangan leukosit).

- b. Imunostimulasi adalah cara memperbaiki fungsi sistem imun dengan menggunakan bahan yang merangsang sistem tersebut. Imunostimulan adalah bahan obat yang dapat menstimulasi sistem imun nonspesifik pada sistem pertahanan tubuh.
- c. Imunosupresi merupakan tindakan untuk menekan respon imun. Kegunaannya di klinik terutama pada transplantasi alat tubuh dalam usaha mencegah reaksi penolakan dan penyakit autoimun untuk menghambat pembentukan antibodi.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Metode *Carbon Clearance*

Metode *Carbon Clearance* merupakan pengujian aktivitas imunomodulator secara spektrofotometri dengan mengukur bersihan karbon dalam darah hewan percobaan pada menit ke 3, 6, 9, 12 dan 15.

Pada metode ini, hewan percobaan akan diinjeksi dengan carbon yang telah disuspensikan ke dalam larutan tertentu. Selanjutnya suspensi karbon tersebut diinjeksikan melalui vena ekor hewan percobaan. Umumnya metode ini menggunakan spektrofotometri sebagai alat yang akan membantu dalam penelitian dan dilakukan pembuatan kurva baku karbon. Parameter imunomodulator yang diamati dalam metode ini adalah konstanta fagositosis dan indeks fagositosis.

Pembuatan kurva baku karbon dimulai dengan mengeringkan tinta cina lalu ditimbang sebanyak 100 mg, didispersikan dalam 100 mL asam asetat sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Masing-masing larutan dipipet sebanyak 2, 3, 4, 5 dan 6 mL lalu dicukupkan dengan asam asetat 1% hingga volume 50 mL, sehingga didapatkan kadar karbon 40, 60, 80, 100, dan 120 ppm. Dari masing-masing kadar tersebut dipipet sebanyak 4 mL, selanjutnya ditambahkan darah hewan percobaan yang diambil dari vena sebanyak 25 μ L. Setelah dihomogenkan, ukur kadar absorbannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 650 nm. Plot absorben yang diperoleh dengan kadar karbon digunakan untuk membuat kurva kalibrasi. Sebagai blanko digunakan darah hewan percobaan dan aquadest saja.

Hewan percobaan dibagi menjadi beberapa kelompok (sesuai dengan rancangan percobaan) yang terdiri atas kelompok kontrol diberi Na CMC 0.5%, tiga kelompok yang diberi sediaan uji. Pemberian sediaan uji dilakukan secara oral 1 kali sehari selama 6 hari berturut-turut pada hewan percobaan sesuai dengan dosis. Pada hari ketujuh setelah pemberian suspensi sediaan, ambil darah hewan percobaan dan darah ditampung pada plat tetes yang ditetesi heparin hingga homogen. Darah diambil sebanyak 25 μ L dan dilisis dalam 4 mL asam asetat 1%. Contoh darah pertama ini dinamakan contoh blanko (menit ke-0). Kemudian suspensi karbon 0,1 mL/10 gram BB disuntikkan secara intravena. Darah hewan percobaan diambil 25 μ L pada menit ke 3, 6, 9, 12, dan 15 setelah penyuntikan karbon. Masing-masing darah ditambahkan 4 mL asam asetat 1%, kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 650 nm.

Penghitungan konstanta fagositosis dilakukan dengan menggunakan rumus sebagai berikut.

$$K = \frac{\log A(n) - \log A(n-1)}{t(n-1) - t(n)}$$

Keterangan:

K: Konstanta fagositosis A: Absorban pada waktu ke -n

t: waktu (3, 6, 9, 12, 15) menit n: periode pengambilan (1, 2, 3, 4, 5)

Penghitungan harga indeks fagositosis menggunakan rumus sebagai berikut.

$$IF = \frac{\text{Konstanta fagositosis hewan percobaan}}{\text{Konstanta fagositosis rata - rata hewan percobaan}}$$

Keterangan

IF: Indeks fagositosis

2.2 Metode Aktivitas dan Kapasitas Makrofag

Pada metode ini, hewan percobaan akan diinduksi dengan bakteri tertentu sebagai antigen yang akan merangsang respons sistem imun hewan percobaan. Induksi bakteri tersebut umumnya dilakukan secara intraperitoneal. Pada metode ini akan diamati aktivitas dan kapasitas fagositosis sel makrofag dengan cara menghitung dengan bantuan mikroskop.

Hewan percobaan (mencit) diberi sediaan uji, sesuai dengan jumlah kelompok dosis setiap hari, selama 7 hari. Pada hari ketujuh, mencit pada masing-masing kelompok disuntik 0,5 mL suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dalam NaCl fisiologis 0,9% secara intraperitoneal, kemudian dibiarkan selama 1 jam. Kemudian, mencit dikorbankan dan dibedah. Cairan peritoneal diambil dengan menggunakan pipet mikro. Cairan peritoneal tersebut dibuat preparat apus pada kaca objek dan difiksasi dengan metanol absolut selama 5 menit, kemudian diwarnai dengan Giemsa yang telah diencerkan dengan air suling 20 kalinya, didiamkan selama 20 menit, dibilas dengan air mengalir dan keringkan. Preparat dilihat dibawah mikroskop cahaya menggunakan minyak emersi pada perbesaran 1000x.

Aktivitas imunostimulan ditentukan dengan menghitung aktivitas fagositosis dan kapasitas fagositosis sel makrofag peritonium mencit. Nilai aktivitas fagositosis (SPA) adalah persentase sel makrofag yang aktif melakukan proses fagositosis di antara 100 sel makrofag.

$$\% \text{Aktivitas Makrofag} = \frac{\text{Jumlah Makrofag Aktif}}{100 \text{ Makrofag}} \times 100\%$$

Penentuan kapasitas makrofag sama dengan cara penentuan aktivitas makrofag, tetapi kapasitas fagositosis ditetapkan berdasarkan jumlah bakteri *Staphylococcus aureus* yang difagosit oleh 50 fagosit aktif.

$$\text{Kapasitas Makrofag} = \frac{\text{Jumlah bakteri yang difagosit oleh 50 sel makrofag aktif}}{50}$$

2.3 Metode Titer Antibodi

Metode ini dilakukan dengan melakukan pengamatan terhadap reaksi aglutinasi. Hewan percobaan (mencit) disensitisasi (diberi antigen) dengan 0,2 ml suspensi eritrosit kambing 5% pada hari 1 secara intra peritoneal, kemudian lakukan pembosteran dengan 0,1 ml suspensi eritrosit kambing 5% secara subkutan pada hari ke-7. Suspensi dari sediaan uji diberikan pada hari ke-8 sampai hari ke-14 secara oral. Pada hari ke-15 hewan percobaan dikorbankan, ambil darah biarkan selama 30 menit, lalu disentrifus dengan kecepatan 2000 rpm selama 15 menit. Ambil bagian serumnya, siapkan 10 tabung reaksi, masukkan larutan NaCl fisiologis 0,2 ml pada semua tabung. Pada tabung pertama ditambahkan 0,2 ml serum, kocok sampai homogen. Pindahkan 0,2 ml larutan tabung pertama ke dalam tabung kedua kemudian kocok dan pipet 0,2 ml larutan tabung kedua, pindahkan ke dalam tabung ketiga. Lakukan ini sampai tabung kesepuluh, pada tabung 10 buang 0,2 ml. sehingga hasil pengenceran dari serum yaitu, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024. Masukkan 0,1 ml suspensi eritrosit kambing 5% ke dalam masing-masing tabung reaksi tersebut. Sentrifus selama 5 menit dengan kecepatan 2000 rpm, amati gumpalan yang terjadi. Angka titer ditentukan dengan pengenceran tertinggi dari serum hewan percobaan yang masih dapat beraglutinasi dengan eritrosit kambing.

2.4 Metode Penentuan Total dan Persentase Sel Leukosit

Pada metode ini, penentuan persentase sel leukosit dilakukan dengan menghitung sel leukosit yang terdiri dari sel neutrofil segmen, sel neutrofil batang, sel limfosit, sel monosit dan sel eosinofil hingga ditemukan 100 sel leukosit. Langkah-langkah penentuan persentase sel leukosit dapat dilakukan sebagai berikut.

Hewan percobaan diinduksi dengan suspensi bakteri atau antigen tertentu secara intraperitoneal, kemudian dibiarkan selama 1 jam, kemudian darah hewan percobaan

diambil dan dibuat hapusan darah, lalu dikeringkan. Setelah kering ditetesi dengan metanol, sehingga melapisi seluruh hapusan darah, dibiarkan selama 5 menit. Kemudian diwarnai dengan Giemsa dan biarkan selama 20 menit. Cuci dengan air suling, keringkan dan tambahkan minyak emersi dan amati di bawah mikroskop okuler. Dihitung jumlah sel neutrofil segmen, sel neutrofil batang, sel limfosit, sel monosit dan sel eosinofil pada perbesaran 40 kali.

Selanjutnya, penentuan total sel leukosit dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut.

Darah segar diambil dengan pipet leukosit sampai angka 0,5 kemudian ambil larutan turk sampai tanda 11 selanjutnya dikocok selama 3 menit, dari dalam pipet leukosit 1-2 tetes dibuang dan pada kamar hitung hemasitometer ditetaskan satu tetes. Cairan dibiarkan selama 2 menit agar leukosit mengendap. Jumlah leukosit dihitung pada keempat sudut kamar hitung.

$$\text{Total sel leukosit} = \text{Jumlah sel leukosit} \times \frac{20}{0,4}$$

2.5 Metode Bobot Limfa Relatif

Metode ini didasarkan pada penambahan bobot limfa dari hewan percobaan. Langkah-langkah penentuan bobot limfa relatif dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut.

Hewan percobaan (mencit) diberi sediaan uji, sesuai dengan jumlah kelompok dosis setiap hari, selama 7 hari. Pada hari ke 8 hewan percobaan dianestesi, lalu dibedah dan limfa yang berada di sebelah kiri rongga perut yang berwarna merah kehitaman diambil dan dibersihkan dari lemak yang menempel lalu ditimbang dengan timbangan analitik. Kemudian dilakukan perhitungan bobot limfa relatif dengan rumus:

$$\% \text{Bobot limpa relatif} = \frac{\text{bobot limpa}}{\text{bobot badan}} \times 100\%$$

2.6 Metode-Metode Lain

Beberapa metode lain yang biasa digunakan dalam melakukan penelitian mengenai imunomodulator adalah degranulasi sel mast, pengamatan secara *in vitro* atau *in vivo*.

BAB III

PENELITIAN IMUNOMODULATOR

3.1 Aktivitas Beberapa Subfraksi Herba Meniran (*Phyllanthus niruri* Linn.) terhadap Aktivitas dan Kapasitas Fagositosis Makrofag

Yufri Aldi, Frisky Novelin dan Dian Handayani

SCIENTIA Vol. 5 No. 2, Agustus 2015

Abstract

Study about the activity of some subfraction of ethyl acetate extract of herba meniran have been done. The parameters determined were the phagocytosis activity and capacity of peritoneal macrophages of male mice (*Mus musculus*) in vivo induced by *Staphylococcus aureus*. Subfraction of 1,2,3,4,5,6,7, and 8 were tested at a dose of 100 mg/kg and 1% Tween 80 was used as a control, all were given orally for 7 days. Activity and capacity of phagocytosis were calculated on the 8th day after the number of cells blood leukocytes counted from tail blood and suspension of *Staphylococcus aureus* injected intraperitoneally. Test result showed that subfraction of 1,2,3,4,5,6,7, and 8 at dose 100 mg/kg bb did not affect the number of leukocyte. Whereas phagocytosis activity increased significantly ($P < 0.05$), highest activity showed by subfraction 4, which was 96% compared to 62.58% control, and the capacity of phagocytosis increased significantly ($P < 0.01$), highest capacity was showed by the subfraction 4 which was 109.50% compared to control of 77.83%.

Hasil dan Pembahasan

Subfraksi yang digunakan dibuat sediaan uji dalam bentuk suspensi karena subfraksi sukar larut dalam cairan pembawa, maka larutan uji dibuat dengan menambahkan *suspending agent* tween 80 sehingga dihasilkan campuran yang homogen. *Suspending agent* ini berfungsi menurunkan tegangan permukaan bahan dengan air.

Mencit dikelompokkan menjadi 9 kelompok yang masing-masing diberi perlakuan yang berbeda. Dalam penelitian ini dilihat efek subfraksi meniran terhadap peningkatan aktivitas dan kapasitas fagositosis sel makrofag. Subfraksi meniran diberikan selama 7 hari berturut-turut dan pada hari kedelapan disuntikkan *Staphylococcus aureus* (SA) secara intra peritoneal. Sel makrofag akan menangkap antigen dalam hal ini adalah SA. SA agak sukar dibunuh karena menghasilkan beberapa enzim seperti streptolisin, hemolisin, karetenoid dan katalase yang menetralkan singlet oksigen dan superoksida sehingga pengamatan lebih baik.

Aktivitas dan kapasitas fagositosis dilakukan pada makrofag peritoneal yang bersifat fagosit dan kemotaksis. Hasil pemeriksaan aktivitas fagositosis dapat dilihat Tabel 2.

Tabel 2. Hasil persentase aktivitas fagositosis dari makrofag peritoneal mencit putih jantan

No.	Kelompok Uji	Aktivitas Fagositosis (%); ($\bar{x} \pm SD$)
1	Kontrol (Tween 80)	62,58 $\pm$ 3,21
2	Subfraksi 1	63,5 $\pm$ 2,35
3	Subfraksi 2	72,17 $\pm$ 4,15
4	Subfraksi 3	81,67 $\pm$ 4,04
5	Subfraksi 4	96,00 $\pm$ 0,99
6	Subfraksi 5	84,99 $\pm$ 6,28
7	Subfraksi 6	73,00 $\pm$ 4,77
8	Subfraksi 7	67,75 $\pm$ 8,31
9	Subfraksi 8	69,75 $\pm$ 2,28

Hasil uji statistik analisa varian satu arah dan dilanjutkan uji berjarak Duncan didapatkan hasil aktivitas fagositosis sel makrofag sangat signifikan ($P < 0,05$) terhadap kontrol. Aktivitas fagositosis sel makrofag berbeda nyata antara kontrol dan pemberian beberapa fraksi Aktivitas fagositosis makrofag yang terbesar diberikan oleh fraksi 4. Hasil dari pemeriksaan kapasitas fagositosis sel makrofag setelah pemberian subfraksi dapat dilihat Tabel 3.

Tabel 3. Hasil pemeriksaan kapasitas sel makrofag dari makrofag peritoneal mencit putih jantan.

No.	Kelompok Uji	Kapasitas sel makrofag ($\bar{x} \pm SD$)
1	Kontrol (Tween 80)	77,83 $\pm$ 14,03
2	Subfraksi 1	81,99 $\pm$ 2,05
3	Subfraksi 2	89,92 $\pm$ 5,31
4	Subfraksi 3	96,00 $\pm$ 2,49
5	Subfraksi 4	109 $\pm$ 13,43
6	Subfraksi 5	107,50 $\pm$ 4,82
7	Subfraksi 6	85,42 $\pm$ 3,93
8	Subfraksi 7	81,92 $\pm$ 7,66
9	Subfraksi 8	81,24 $\pm$ 3,61

Setelah dilakukan analisa varian satu arah ternyata kapasitas fagositosis sel makrofag sangat berbeda nyata dan pemberian beberapa subfraksi. Kapasitas fagositosis tertinggi diberikan oleh fraksi 4 yaitu fraksi n-heksan: etil asetat (4:1).

3.2 Aktivitas Imunomodulator dari Ekstrak Etanol Meniran (*Phyllanthus niruri* Linn.) terhadap Ayam Broiler

Yufri Aldi, Yahdian Rasyadi dan Dian Handayani

Jurnal Sains Farmasi & Klinis, 1(1), 20-26

Abstrak

Ayam Broiler sangat rentan terhadap penyakit-penyakit yang disebabkan oleh bakteri dan virus. Oleh karena itu untuk mengatasi masalah ini kita dapat menggunakan pengobatan alternatif dengan pemberian senyawa imunostimulan yang dapat mencegah penyakit pada ayam broiler. Salah satu tanaman yang dapat meningkatkan sistem kekebalan tubuh adalah meniran. Studi efek imunomodulator dari ekstrak etanol meniran (*Phyllanthus niruri* Linn.) telah dilakukan pada ayam broiler dengan metode bersihan karbon. Ekstrak diberikan secara oral dengan dosis 10; 30; 100; 300 mg/kg BB dan larutan 0,5% NaCMC sebagai kontrol serta suspensi Stimuno® forte 13,5 mg/kg BB sebagai pembanding selama 6 hari. Data indeks fagositosis dianalisis secara statistik dengan ANOVA dua arah dilanjutkan dengan uji Duncan. Peningkatan indeks fagositosis menunjukkan bahwa efek dari setiap dosis dengan kontrol negatif berbeda signifikan ($P < 0,05$). Indeks fagositosis tertinggi diperoleh dari dosis 300 mg/kg BB. Data tentang peningkatan berat relatif limpa dan peningkatan sel limfosit darah dianalisis dengan ANOVA satu arah dilanjutkan dengan uji Duncan. Peningkatan berat limpa relatif dan peningkatan sel limfosit darah menunjukkan efek dari masing-masing dosis untuk kontrol negatif berbeda signifikan ($P < 0,05$). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol meniran aktif sebagai imunostimulan untuk ayam broiler.

Hasil dan Pembahasan

Nilai rata-rata indeks fagositosis menunjukkan aktivitas fagositosis sel-sel fagositik terhadap partikel karbon sebagai antigen akibat pengaruh pemberian ekstrak etanol meniran. Jika nilai rata-rata indeks fagositosis lebih besar dari satu berarti menunjukkan zat uji mempunyai kemampuan imunostimulan.

Nilai indeks fagositosis rata-rata pada kontrol negatif adalah 1, pada kontrol positif adalah 1,18406; kelompok uji I yang diberi ekstrak 10 mg/kgBB adalah 1,08464; kelompok uji II yang diberi ekstrak 30 mg/kg BB adalah 1,1965; kelompok uji III yang diberi ekstrak 100 mg/kg BB adalah 1,5574; dan kelompok uji IV yang diberi ekstrak 300 mg/kgBB adalah 1,70294.

Pengaruh ekstrak etanol meniran dilihat dengan meningkatnya aktivitas fagositosis yang ditunjukkan oleh rata-rata indeks fagositosis besar dari satu untuk semua kelompok dosis, sehingga dapat dikatakan ekstrak ini mempunyai kemampuan imunostimulan terhadap aktivitas fagositosis.

Bobot limfa relatif rata-rata pada kontrol negatif adalah 0,153; pada kontrol positif adalah 0,1995; kelompok uji I yang diberi ekstrak 10 mg/kg BB adalah 0,1773; kelompok uji II yang diberi ekstrak 30 mg/kgBB adalah 0,1927; kelompok uji III yang

diberi ekstrak 100 mg/kg BB adalah 0,2084; dan kelompok uji IV yang diberi ekstrak 300 mg/kgBB adalah 0,2219.

Limfa sebagai organ limfoid sekunder mengandung sel limfosit B dan limfosit T yang berperan pada proses respon imun spesifik. Selain itu, pada limfa juga terdapat sel dendritik dan makrofag yang berperan sebagai APC (*Antigen Presenting Cell*) yang berfungsi menyajikan antigen kepada sel limfoid. Peningkatan sel-sel imun tersebut berkorelasi dengan bobot limfa. Kenaikan bobot limfa relatif ini menunjukkan adanya efek ekstrak etanol meniran terhadap aktivitas imunostimulan.

Tabel 1. Jumlah sel limfosit pada darah ayam broiler pada ayam broiler setelah pemberian ekstrak meniran enam hari.

Kelompok Perlakuan	Sel Limfosit					
	Kontrol Negatif	10 mg/kgbb	30 mg/kgbb	100 mg/kgbb	300 mg/kgbb	Kontrol Positif
1	8,50	10,00	16,00	13,50	13,50	18,50
2	8,50	9,50	14,50	20,00	24,50	13,50
3	13,00	14,00	18,00	15,50	25,00	13,00
rata - rata	10,00	11,00	16,17	16,33	21,00	17,83

Jumlah sel limfosit rata-rata pada darah ayam pada kontrol negatif adalah 10,00; pada kontrol positif adalah 17,83; kelompok uji I yang diberi ekstrak 10 mg/kg BB adalah 11,00; kelompok uji II yang diberi ekstrak 30 mg/kg BB adalah 16,17; kelompok uji III yang diberi ekstrak 100 mg/kg BB adalah 16,33; dan kelompok uji IV yang diberi ekstrak 300 mg/kg BB adalah 21,00.

3.3 Aktifitas Imunomodulator dan Jumlah Sel Leukosit dari Ekstrak Kulit Buah Naga Merah (*Hylocereus Lemairei* (Hook.) Britton & Rose) pada Mencit Putih Jantan

Havizur Rahman, Yufri Aldi, Elda Mayanti
Jurnal Farmasi Higea, Vol. 8, No. 1, 2016

Abstrak

Uji aktifitas imunomodulator dan jumlah sel leukosit pada mencit putih jantan telah dilakukan dengan menggunakan ekstrak kulit buah naga merah (*Hylocereus lemairei* (Hook.) Britton & Rose). Hewan dibagi atas 4 kelompok, yang terdiri dari kelompok 1 hanya diberi suspensi NaCMC, kelompok 2,3,4 diberi ekstrak kulit buah naga merah dengan dosis 10 mg/kg BB, 50 mg/kg BB dan 100 mg/kg BB ekstrak diberikan selama 6 hari secara oral. Hasil penelitian menunjukkan pemberian ekstrak kulit buah naga merah secara oral pada mencit putih jantan selama 6 hari dapat meningkatkan konstanta dan indeks fagositosis, dan semakin meningkat pada dosis ke 100 mg/kgBB. Pada aktifitas ekstrak kulit buah naga merah juga meningkatkan jumlah sel dan jumlah total sel leukosit secara signifikan ($P < 0,05$). Dosis 100mg/kgBB adalah dosis terbaik yang meningkatkan aktivitas imunomodulator dan jumlah sel leukosit.

Hasil dan Pembahasan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas dari ekstrak kulit buah naga merah yang dibuat dalam tiga variasi dosis berdasarkan faktor kelipatan (logaritma) yaitu 10 mg/kg BB, 50 mg/kg BB, 100 mg/kg BB terhadap mencit putih jantan. Ekstrak dibuat dalam bentuk suspensi, sebagai pensuspensi digunakan NaCMC 0,5%. NaCMC mempunyai sifat inert, menghasilkan suspensi yang stabil, resistensinya terhadap mikroba baik dan tingkat kejernihannya tinggi. Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan. Alasan pemilihan hewan percobaannya mencit putih jantan karena mencit mempunyai fisiologis yang mirip dengan manusia dan mudah untuk diperlakukan. Hal ini juga disebabkan karena sistem imun mencit jantan tidak dipengaruhi oleh hormon esterogen seperti halnya pada mencit betina.

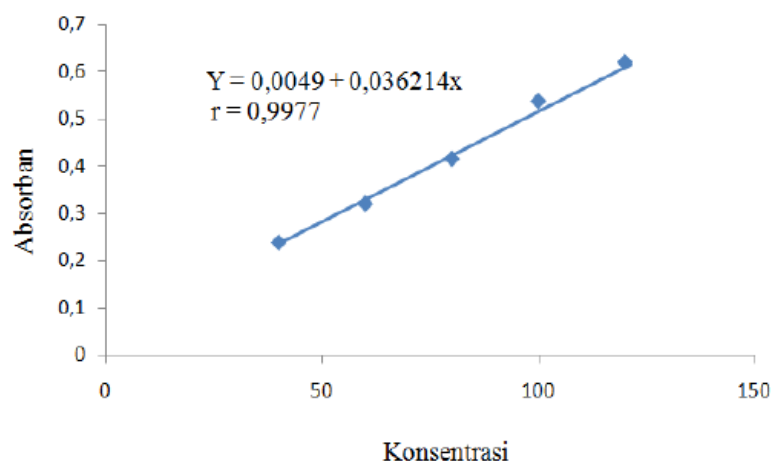
Pada penelitian ini dilakukan pengujian untuk melihat efek imunomodulasi ekstrak kulit buah naga merah terhadap respon imun spesifik dan non spesifik. Respon imun non spesifik dilakukan dengan menggunakan metode "*carbon clearance*" dan menghitung persentase sel leukosit dengan metode hapusan darah dan jumlah total leukosit yang menggunakan alat haemocytometer, sedangkan respon imun spesifik dapat dilihat dengan peningkatan bobot limpa mencit yang digunakan. Metoda bersihan karbon merupakan pengujian kemampuan fagositosis dengan menggunakan karbon sebagai antigen yang diberikan secara intravena. Karbon akan berkurang jumlahnya dalam darah seiring pertambahan waktu, karena adanya peristiwa fagositosis oleh sel-sel leukosit terutama neutrofil, monosit, makrofag dan eosinofil (Baratawidjaya, 2009). Sel yang sangat berperan dalam fagositosis adalah limfosit, neutrofil, dan monosit. Kecepatan bersihan karbon dilihat tiap menit ke-3, 6, 9, 12, dan 15. Karbon yang digunakan adalah tinta cina yang telah dikeringkan (Faber Castell Drawing Ink GmbH & Co D-90546). Hal ini karena ukuran partikelnya lebih kecil dan lebih stabil, sehingga tidak menyebabkan penyumbatan pada pembuluh darah dan paru-paru.

Ekstrak kulit buah naga merah diberikan selama 6 hari berturut-turut, tujuannya untuk memberikan kesempatan bagi zat uji dalam meningkatkan respon imun non spesifik. Kecepatan karbon sebagai *marker* dalam darah mencit adalah sebagai parameter yang diamati. Semakin banyak karbon yang difagosit maka akan sedikit karbon yang tinggal di dalam darah.

Pada uji penetapan kadar dapat diketahui bahwa kadar karbon tinta cina yang digunakan yaitu 24,29%. Pembuatan suspensi carbon dilakukan dengan cara penambahan NaCMC 0,5% dalam 25 mL larutan NaCl fisiologis 0.9% sebagai pelarut.

Penggunaan NaCl fisiologis bertujuan agar kondisi sediaan suspensi karbon sama dengan kondisi tubuh mencit. Karbon sebagai benda asing akan segera difagosit oleh sel leukosit khususnya sel neutrofil dan makrofag.

Untuk melihat efek fagositosis uji bersihan karbon dapat dibuatkan suatu kurva baku antara kadar karbon dalam darah dengan density optik, Pembuatan kurva baku ini gunanya untuk melihat hubungan linier antara kadar karbon dalam darah mencit dengan density optik yang diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 639 nm. Dari kurva baku tersebut diperoleh persamaan regresi serapan dan konsentrasi karbon yaitu $y = 0,0049 + 0,036214x$ dengan $r = 0,9977$. Hasil tersebut menunjukkan adanya hubungan linier antara konsentrasi karbon dalam darah mencit putih jantan dengan nilai absorban. Semakin tinggi konsentrasi karbon dalam darah maka akan semakin tinggi pula nilai absorban yang diperoleh. Data lengkap dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. kurva kalibrasi karbon dalam darah mencit pada panjang gelombang 639 nm.

Berdasarkan hasil penelitian yang didapatkan terhadap nilai density optik terlihat bahwa terjadinya penurunan nilai density optik pada semua kelompok dosis ekstrak kulit buah naga merah dibanding kelompok kontrol negatif. Penurunan nilai absorban yang terbesar adalah terjadi pada dosis 100 mg/kg BB, lalu setelah itu dosis 50 mg/kg BB dan kemudian dosis 10 mg/kg BB. Semakin rendah nilai absorban berarti konsentrasi karbon yang tinggal dalam darah mencit semakin sedikit. Hal ini memperlihatkan bahwa terjadi peningkatan aktivitas fagositosis pada masing-masing kelompok variasi dosis.

Dari hasil nilai density optik yang diperoleh tersebut dapat dihitung nilai konstanta fagositosis dari masing-masing dosis ekstrak. Konstanta fagositosis merupakan salah satu parameter yang menunjukkan kecepatan fagositosis, semakin besar harga konstanta fagositosis maka semakin tinggi kecepatan bersihan karbon. Hal ini menunjukkan adanya

pengaruh ekstrak yang kulit buah naga merah terhadap kecepatan eliminasi karbon dari dalam darah. Dari nilai konstanta fagositosis dapat diperoleh nilai indeks fagositosis, hasil perhitungan nilai indeks fagositosis, hasil selengkapnya dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Harga konstanta fagositosis dari mencit putih jantan setelah pemberian ekstrak kulit buah naga merah selama 6 hari.

Waktu (menit)	Konstanta Fagositosis			
	I	II	III	IV
3	0,024	0,032	0,038	0,082
6	0,013	0,033	0,089	0,058
9	0,024	0,036	0,016	0,024
12	0,021	0,029	0,046	0,029
15	0,016	0,101	0,056	0,113
Rata-rata	0,020	0,046	0,049	0,061

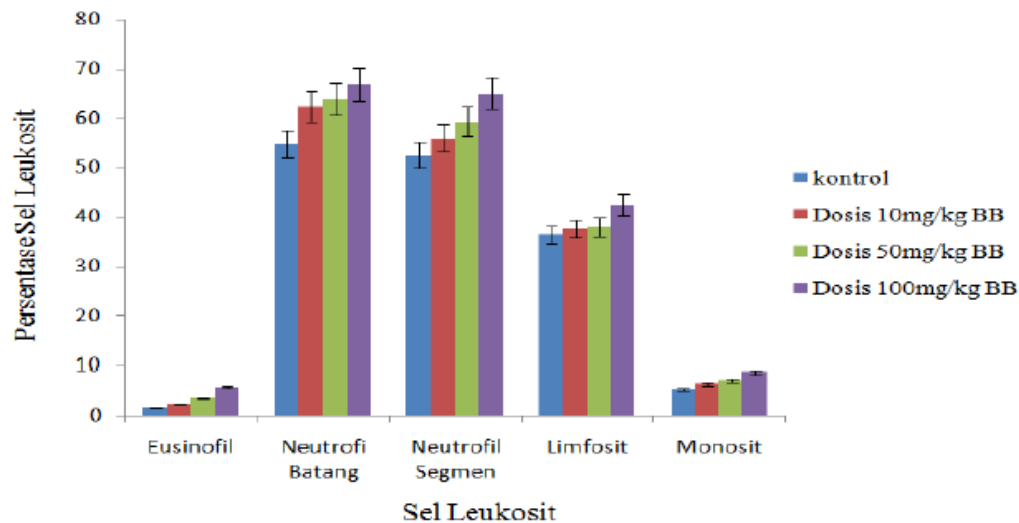
Efek pemberian ekstrak kulit buah naga merah terhadap peningkatan aktifitas fagositosis dapat terlihat pada nilai rata-rata indeks fagositosis > 1 untuk semua kelompok dosis, artinya ekstrak kulit buah naga merah ini memiliki kemampuan sebagai imunostimulan, dimana daya tubuh akan semakin meningkat. Peningkatan indeks bersihan karbon (*carbon clearance*) mencerminkan peningkatan fungsi fagositosis dari makrofag mononuklear dan sistem imun non spesifik. hasil perhitungan nilai indeks fagositosis, hasil selengkapnya dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Nilai indeks fagositosis dari mencit putih jantan setelah pemberian ekstrak kulit buah naga merah selama 6 hari.

Waktu (menit)	Konstanta Fagositosis			
	I	II	III	IV
3	0,024	0,032	0,038	0,082
6	0,013	0,033	0,089	0,058
9	0,024	0,036	0,016	0,024
12	0,021	0,029	0,046	0,029
15	0,016	0,101	0,056	0,113
Rata-rata	0,020	0,046	0,049	0,061

Pada penghitungan sel leukosit dengan metoda hapusan darah menggunakan larutan Giemsa sebagai pewarna, kemudian menggunakan minyak emersi sebagai penjelas bentuk sel leukosit terlihat sel neutrofil batang, sel eosinofil, sel monosit, sel neutrofil segmen, dan sel limfosit. Sedangkan sel basofil yang bersifat basa tidak dapat

diamati karena sel ini larut dalam pewarna Giemsa. Hasil perhitungan jumlah sel leukosit darah mencit putih dapat dilihat pada gambar 4.

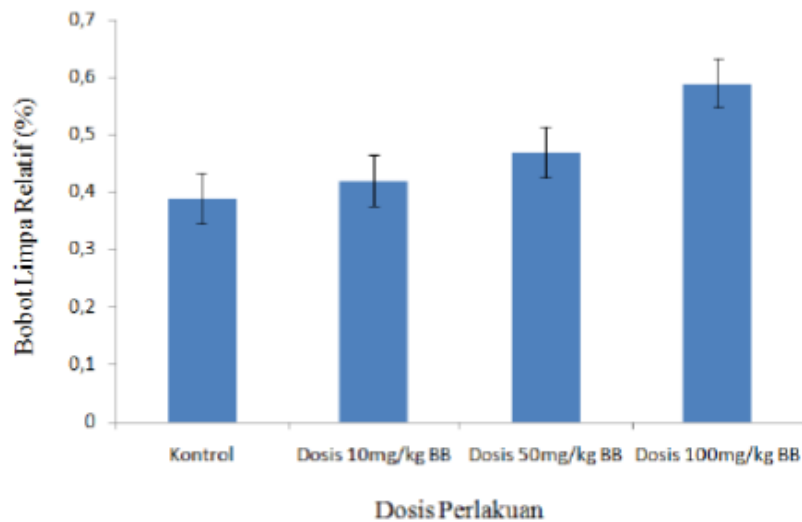


Gambar 4. Grafik jumlah sel leukosit dari hapusan darah mencit putih jantan setelah pemberian ekstrak kulit buah naga merah selama 6 hari.

Dari hasil uji statistik menggunakan analisis variansi satu arah, terlihat bahwa efek dosis 100 mg/kg BB dan beberapa kelompok dosis perlakuan terhadap kontrol berbeda secara nyata ($P < 0,05$) pada setiap kelompok dosis untuk sel neutrofil batang, eusinofil, neutrofil segmen, limfosit, dan monosit. Setelah dilakukan uji lanjut duncan terlihat bahwa pada sel eusinofil, sel neutrofil batang, limfosit, neutrofil segmen dan monosit terdapat perbedaan yang bermakna antara masing-masing kelompok dosis dengan kelompok kontrol.

Selain itu juga dilakukan uji leukosit total menggunakan alat haemocytometer. Pada tabel anova satu arah menunjukkan pengaruh yang sangat signifikan yaitu dengan nilai ($\text{sig. } 0,000 < 0,05$). Analisis selanjutnya dilakukan dengan uji duncan, dimana kontrol berbeda nyata dengan dosis kelompok ekstrak.

Kemudian dilakukan dengan pengujian uji respon imun spesifik dilakukan dengan menimbang bobot limpa dan penghitungan jumlah sel limfosit pada limpa mencit. Limpa merupakan tempat pembentukan limfosit yang diaktifkan untuk masuk ke dalam darah. Limpa bereaksi terhadap antigen yang terbawa darah dan merupakan organ pembentukan antibodi. Hasil penimbangan bobot limpa dan bobot limpa relatif beberapa variasi dosis ekstrak kulit buah naga merah dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 5. Grafik bobot limpa relatif setelah pemberian ekstrak kulit buah naga merah selama 6 hari.

Dapat dilihat dari kenaikan nilai bobot limpa relatif dari tiap perlakuan dengan dosis yang berbeda. Ini berarti semakin tinggi bobot limpa maka semakin tinggi sel fagositik yang dihasilkan dalam pembentukan antibodi. Berdasarkan data bobot limpa didapatkan peningkatan bobot limpa yang optimal terjadi pada kelompok dosis 100 mg/kg BB. Pada tabel anova satu arah menunjukkan pengaruh yang sangat signifikan dengan nilai ($\text{sig. } 0,001 < 0,05$). Analisis selanjutnya dilakukan dengan uji duncan, dimana kontrol tidak berbeda nyata dengan dosis 10 mg/kg BB dan dosis 50 mg/kg BB, tetapi kontrol sangat berbeda nyata dengan dosis 100 mg/kg BB, dari hasil perhitungan bobot limpa relatif setiap dosis menunjukkan adanya efek ekstrak kulit buah naga terhadap aktivitas imunostimulan. Dalam limpa, sel B menjadi aktif dan menghasilkan sejumlah besar antibodi yang terdiri dari sel-sel B, sel T, makrofag, dendritik sel, sel-sel pembunuh alami dan sel darah merah, yang menangkap benda asing (antigen) dari darah yang melewati limpa.

Berdasarkan penelitian yang telah dilaksanakan dan ditinjau dari beberapa parameter uji yang telah dilakukan ekstrak kulit buah naga merah (*Hylocereus lemairei* (Hook.) Britton & Rose) dapat meningkatkan kemampuan fagositosis dan dapat meningkatkan aktifitas sistem imun tubuh serta dapat dikembangkan sebagai obat imunostimulan.

3.4 Uji Efek Immunomodulator dari Ekstrak Daun Manggis (*Garcinia mangostana* L.) dengan Metode *Carbon Clearance* dan Menghitung Jumlah Sel Leukosit pada Mencit Putih Jantan

Yufri Aldi, Sri Oktavia, Sirda Yenni.B

Jurnal Farmasi Higea, Vol. 8, No. 1, 2016

Abstrak

Telah dilakukan penelitian uji efek imunomodulator dari ekstrak etanol daun manggis dengan metoda *carbon clearance* dan menghitung jumlah sel leukosit pada mencit putih jantan. Ekstrak etanol daun manggis diberikan peroral selama 6 hari dengan dosis 100 mg/kg BB, 300 mg/kg BB dan 900 mg/kg BB, pada hari ke 7 ditentukan indeks fagositosis dan jumlah persentase sel neutrofil, eosinofil, basofil, monosit dan limfosit. Hasil penelitian ini menunjukkan pemberian ekstrak etanol daun manggis pada dosis 100 mg/kg BB, 300 mg/kg BB dan 900 mg/kg BB, dapat meningkatkan nilai indeks fagositosis >1 dan juga meningkatkan jumlah sel leukosit sehingga ekstrak ini bersifat immunostimulansia.

Hasil dan Pembahasan

Pada penelitian ini dilakukan penentuan harga konstanta fagositosis dari darah mencit setelah pemberian ekstrak daun manggis.

Tabel II. Kostanta Fagositosis

Waktu (menit)	Konstanta Fagositosis		
	Dosis 100 mg/kgbb	Dosis 300 mg/kgbb	Dosis 900 mg/kgbb
3	2,117	2,000	1,941
6	8,167	0,333	1,833
9	2,181	0,909	3,455
12	0,481	0,192	0,554
15	1,687	0,625	0,218
Rata-rata	2,923	0,812	1,600

Setelah menentukan harga konstanta fagositosis kita dapat menentukan nilai dari harga indeks fagositosis dari darah mencit setelah pemberian ekstrak daun manggis. Setelah dilakukan pengujian konstanta fagositosis dan indeks fagositosis maka dilakukan pengujian terhadap jumlah sel leukosit dari darah mencit setelah pemberian ekstrak daun manggis dan hasil perhitungan jumlah sel leukosit dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

Tabel III. Jumlah sel leukosit rata-rata mencit putih jantan yang diberikan karbon koloid secara intravena setelah pemberian ekstrak etanol daun manggis selama 6 hari.

Kelompok	Sel Leukosit				
	Neutrofil segmen	Neutrofil batang	Limfosit	Monosit	Eusinofil
Kontrol	14,8	4,0	28,0	13,0	10,8
Dosis 100 mg/kgbb	24,6	3,4	11,6	19,6	16,4
Dosis 300 mg/kgbb	19,0	2,6	20,2	5,4	18,0
Dosis 900 mg/kgbb	22,4	2,8	16,0	40,0	24,4

Pada penelitian ini dilakukan pengujian untuk melihat efek imunomodulasi ekstrak etanol daun manggis terhadap respon imun non spesifik dengan menggunakan metoda *carbon clearance* dan partikel karbon sebagai *marker* yang diinjeksikan secara intravena pada hewan percobaan, kecepatan bersihan karbon dihitung tiap selang waktu tertentu, karbon sebagai benda asing akan difagosit ole sel-sel fagosit khususnya sel neutrofil dan monosit. Karbon yang digunakan adalah tinta cina dimana mempunyai ukuran partikel yang kecil sehingga tidak terjadi penyumbatan pada pembuluh darah. Tinta cina dikeringkan dulu sebelum digunakan untuk mendapatkan karbon untuk pembuatan larutan koloid terukur secara kuantitatif. Karbon sebagai benda asing akan segera difagosit oleh sel leukosit khususnya sel neutrofil dan monosit.

Ekstrak kental daun manggis dibuat dengan sediaan uji dalam bentuk suspensi karena tidak larut secara sempurna didalam air. Pensuspensi yang digunakan adalah Natrium Carboxy Metil Cellulose 0,5 %, karena bersifat inert sehingga tidak mempengaruhi khasiat zat aktif, menghasilkan suspensi yang stabil, resistensi yang baik terhadap mikroba, kejernihan tinggi dan pada konsentrasi ini telah terbentuk suspensi yang baik. Ekstrak yang telah dilarutkan dengan Natrium Carboxy Metil Cellulose 0,5 % diberikan secara oral, karena bentuk pemberian oral merupakan bentuk pemberian obat secara umum yang dilakukan, pemberian mudah, aman dan tidak menyakitkan.

Ekstrak etanol daun manggis diberikan selama 6 hari berturut-turut, tujuannya untuk memberikan kesempatan bagi zat uji untuk membantu meningkatkan jumlah sel fagosit. Keberadaan karbon sebagai *marker* dalam darah mencit adalah sebagai parameter yang diamati. Semakin banyak karbon yang difagosit maka akan sedikit karbon yang tinggal di dalam darah.

Untuk melihat efek fagositosis uji bersihan karbon dapat dibuatkan suatu kurva baku antara karbon dalam darah dengan absorban, dari kurva tersebut maka diperoleh

persamaan $Y = a + bx$. Pembuatan kurva baku ini gunanya untuk melihat hubungan linier antara kadar karbon dalam darah mencit dengan absorbannya. Pada pengukuran nilai absorban darah mencit yang mengandung karbon dengan panjang gelombang maksimum 650 nm memperlihatkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun manggis mempengaruhi jumlah atau kadar karbon. Perubahan kadar karbon tersebut mengindikasikan bahwa adanya respon imun dari tubuh terhadap masuknya zat asing kedalam tubuh. Perubahan kadar karbon ini dapat dilihat dari adanya penurunan nilai absorban. Dari nilai absorban ini dapat ditentukan nilai konstanta fagositosis, dimana nilai konstanta fagositosis merupakan parameter yang menunjukkan kecepatan fagositosis oleh sel-sel fagositik.

Dari hasil penelitian konstanta fagositosis Dari nilai konstanta fagositosis dapat diperoleh nilai indeks fagositosis, seiring dengan meningkatnya konstanta fagositosis maka nilai indeks fagositosis juga akan meningkat, hasil. Hasil penelitian menunjukan konstanta dan indeks fagositosis kelompok yang diberi ekstrak etanol daun manggis lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol. Dari nilai indeks fagositosis dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun manggis dapat meningkatkan fagositosis terhadap karbon, artinya ekstrak etanol daun manggis ini memiliki kemampuan sebagai imunostimulan.

Hasil uji homogenitas variansi dengan levene statistik dari eusinofil, neutrofil batang, neutrofil segmen, limfosit dan monosit sama ($P > 0,05$) sehingga uji Anova dengan menggunakan uji F dapat dilanjutkan. Uji anova terhadap neutrofil segmen menunjukan pemberian ekstrak etanol daun manggis pada mencit mempengaruhi rata-rata neutrofil segmen dengan signifikan ($P < 0,05$). Hasil uji lanjut Duncan menunjukan kelompok rata-rata jumlah neutrofil segmen terdapat dua subset yang artinya terdapat perbedaan yang nyata.

Uji anova terhadap neutrofil batang menunjukan pemberian ekstrak etanol daun manggis pada mencit mempengaruhi rata-rata neutrofil batang dengan signifikan ($P < 0,05$). Uji lanjut Duncan menunjukan kelompok perlakuan mempunyai rata-rata neutrofil batang terdapat satu subset yang artinya tidak ada perbedaan yang nyata antara kelompok dengan meningkatnya dosis. Uji anova terhadap monosit menunjukan pemberian ekstrak etanol daun manggis pada mencit mempengaruhi rata-rata monosit dengan signifikan ($P < 0,05$). Uji lanjut Duncan menunjukan kelompok perlakuan mempunyai rata-rata monosit terdapat empat subset yang artinya terdapat perbedaan yang nyata berdasarkan peningkatan dosisnya. Ekstrak etanol daun manggis dapat meningkatkan jumlah monosit pada mencit putih jantan.

3.5 Uji Efek Immunostimulasi Ekstrak Etanol Herba Ciplukan (*Physalis angulata* L.) terhadap Aktivitas dan Kapasitas Fagositosis Sel Makrofag pada Mencit Putih Betina

Yufri Aldi, Mimi Aria, Lusia Erman

SCIENTIA Vol. 4 No. 1, Februari 2014

Abstract

This research investigated the immune stimulation affect of ethanol extract of ciplukan (*Physalis angulata* L.) based on its affect on macrophages activities and capacities, leukocytes count, and relative weights of lymph. Twenty female mice were divided into 4 equal groups, the first control group (I) received Na CMC 0,5%, group II, III, IV received 100, 300, 500 mg ethanol extract/Kg BW which were administered orally for 7 days. On 8th day, the leukocyte cells were counted, suspension of *Staphylococcus aureus* (SA) were injected intraperitoneally and then macrophages activities and capacities were counted, the weight of lymph was also measured. Result: at dose 100, 300, 500 mg ethanol extract of ciplukan/Kg BW was significantly affected the total of leukocytes ($P < 0,05$), the macrophages activities and capacities and the relative weights of lymph was significantly affected ($P < 0,05$).

Hasil dan Pembahasan

Pemeriksaan efek imunostimulasi ekstrak herba ciplukan dapat dilihat pada Tabel 1:

Tabel 1. Hasil uji efek imunostimulasi ekstrak etanol herba ciplukan

Parameter Pengujian	Kelompok Kontrol	Kelompok I	Kelompok II	Kelompok III
% sel leukosit darah				
Eosinofil	1,2	1,8	2	2,8
Neutrofil batang	6	2,8	3,4	4,6
Neutrofil segmen	43,2	42	40,8	37,8
Limfosit	42,8	46,8	49,2	52
Monosit	7	5,6	4,6	2,8
Indeks Fagositosis (%)	61,6	70,2	77,6	86,6
Kapasitas Fagositosis	60,4	67,2	71,2	77,8
Bobot limpa relatif (%)	0,53	0,57	0,6	0,69

Pada pemeriksaan hapusan darah, dilakukan perhitungan persentase jenis sel leukosit yaitu sel eosinofil, sel neutrofil batang, sel neutrofil segmen, limfosit dan monosit setelah dilakukan pewarnaan dengan Giemsa. Berdasarkan hasil uji statistik analisa varian satu arah terlihat hasil dari sel eosinofil, sel neutrofil batang, sel neutrofil segmen dan sel limfosit, sel monosit berbeda nyata ($P < 0,05$).

Dari hasil pengamatan dapat diketahui bahwa sel neutrofil batang dan neutrofil segmen mengalami penurunan, ini diduga pada proses fagositosis yang lebih berperan adalah makrofag, atau karena meningkatnya faktor kemotaksis sehingga terjadi

peningkatan kemampuan fagositosis. Sel monosit juga mengalami penurunan hal ini diduga karena sel monosit berdiferensiasi menjadi sel makrofag dan menetap di jaringan. Untuk sel limfosit terdapat peningkatan jumlah sel limfosit yang berbanding lurus dengan peningkatan dosis, terutama pada dosis 500 mg/Kg BB terdapat peningkatan yang signifikan. Dari uji statistik dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol herba ciplukan (*Physalis angulata* L.) dapat meningkatkan jumlah sel limfosit yang juga dapat merangsang respon imun spesifik.

Data uji aktivitas dan kapasitas fagositosis makrofag ekstrak etanol herba ciplukan (*Physalis angulata* L.) pada mencit putih betina diolah secara statistik dengan uji hipotesis anova satu arah program SPSS17. Hasil analisa statistik menunjukkan bahwa ada perbedaan aktivitas dan kapasitas fagositosis makrofag yang signifikan antara kelompok kontrol, dosis 100 mg/Kg BB, dosis 300 mg/Kg BB, dosis 500 mg/Kg BB ($P < 0,05$).

Hasil perhitungan bobot limfa relatif dilanjutkan dengan analisa varian satu arah, didapat hasil perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$) dimana bobot limfa relatif berbeda jika dibandingkan dengan kelompok kontrol. Dari hasil tersebut menunjukkan kenaikan bobot limfa relatif disetiap dosis, kenaikan bobot limfa relatif ini menunjukkan adanya efek ekstrak herba ciplukan terhadap aktivitas imunostimulan. Peningkatan sel respon imun berhubungan dengan bobot limfa maka limfa dijadikan sebagai sistem limforetikular yang berperan dalam fagositosis antigen serta dapat dijadikan parameter dalam uji respon imun spesifik.

3.6 Uji Imunomodulator Beberapa Subfraksi Ekstrak Etil Asetat Meniran (*Phyllanthus Niruri* L.) pada Mencit Putih Jantan dengan Metoda Carbon Clearance

Yufri Aldi, Nisya Ogiana, Dian Handayani

Jurnal B-Dent, Vol 1, No. 1, Juni 2014 : 70 - 82

Abstrak

Meniran has scientific name *Phyllanthus niruri* L.. It uses to increase imun system of human body. Nonspecific of Imun system is first defendent to protect human body from microorganism, because it gives direct respon to antigen then it will destroy bacteria with phagocytosis process. Meniran extract is known can obstruct *xanthin oksidase* invitro, protect hepatocyte cell of liver from carbon tetrachloride and cytotoxicity that induction with galaktosamin. To determined imunomodulator activity of some ethyl acetat extract subfraction of meniran (*Phyllanthus niruri* L.). Some ethyl acetat extract subfraction of meniran (*Phyllanthus niruri* L.) administered orally with single dose 100 mg/kg BB for eight group of subfraction and Tween 80 1% as control for 6 days. After 6 days subfractions have been conducted in white male mice with carbon clearance method. A value of Index Phagocytosis (IF) < 1 has imunosupressant activity and IF > 1

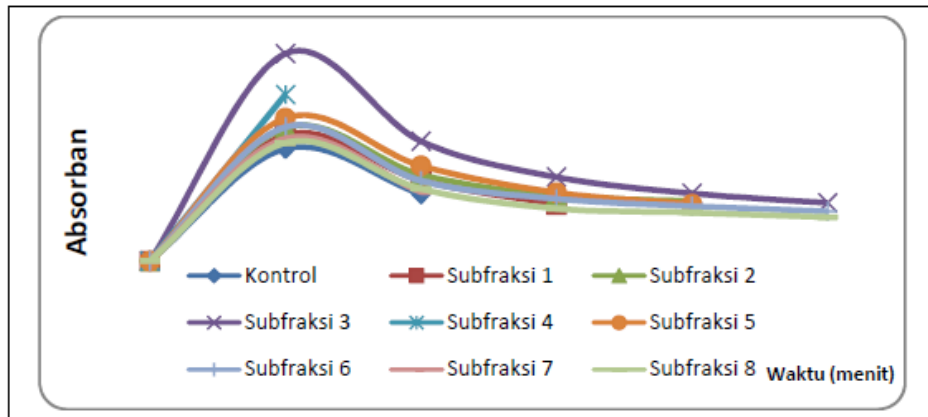
has imunostimulant activity. The increasing of phagocytosis index with carbon clearance method showed the effect from each group of subfraction with control was insignificant ($P>0,05$). The increasing of leucocyte cell component especially for limfosit cell, eosinofil, and segmen neutrofil was significant for each group of subfraction ($P<0,05$). The increasing of relative spleen weight showed optimal effect in subfraction number three ($P>0,05$). The increasing of spleen limfosit cell showed optimal effect in subfraction number three ($P<0,05$). The third ethyl acetate extract subfraction of meniran was the best of immunostimulant than other subfractions.

Hasil dan Pembahasan

1. Hasil penghitungan kadar karbon tinta cina didapatkan tinta cina dengan kadar karbon 22,46%.
2. Hasil penghitungan kurva kalibrasi karbon diperoleh persamaan linear $y = 0,0058x - 0,0084$ dengan $r = 0,9940$.
3. Pengukuran nilai adsorban darah mencit putih yang mengandung karbon setelah pemberian beberapa subfraksi meniran selama enam hari dengan dosis tunggal 100 mg/kg BB diperoleh penurunan berturut-turut setiap selang waktu uji pada masing-masing dosis. Harga indeks fagositosis pada subfraksi 1, subfraksi 2, subfraksi 3, subfraksi 4, subfraksi 5, subfraksi 6, subfraksi 7, dan subfraksi 8 hasilnya lebih besar dari satu ($IF>1$). Nilai IF terendah diperoleh pada subfraksi 8 yaitu 1,02654 sedangkan nilai IF tertinggi pada subfraksi 3 yaitu 1,64622.
4. Penghitungan jumlah komponen sel leukosit darah mencit setelah pemberian beberapa subfraksi meniran selama enam hari, menunjukkan peningkatan jumlah komponen sel leukosit tertinggi pada kelompok subfraksi 3 dengan dosis tunggal 100 mg/kgBB.
5. Penimbangan bobot limpa dan bobot limpa relatif mencit setelah pemberian beberapa subfraksi meniran selama enam hari, menunjukkan peningkatan bobot tertinggi pada subfraksi 3 dengan dosis tunggal 100 mg/kgBB.
6. Penghitungan jumlah sel limfosit pada limpa mencit setelah pemberian beberapa subfraksi meniran dengan dosis tunggal 100 mg/kgBB selama enam hari, menunjukkan peningkatan jumlah sel pada setiap kelompok subfraksi.

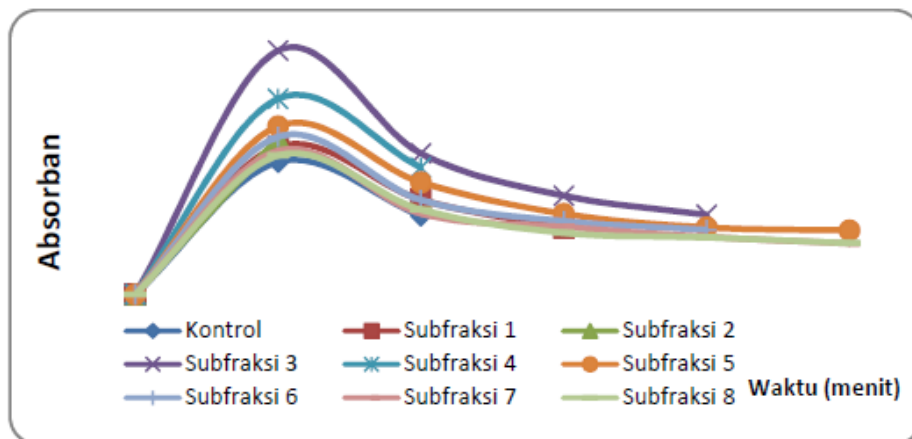
Pada penelitian yang dilakukan, terjadi penurunan nilai absorban pada semua kelompok subfraksi dibandingkan dengan kelompok kontrol. Penurunan nilai absorban terbesar pada dosis tunggal 100 mg/kgBB diperoleh pada subfraksi 3, lalu setelah itu subfraksi 4, subfraksi 5, subfraksi 2, subfraksi 6, subfraksi 1, subfraksi 7, dan subfraksi 8. Semakin menurunnya nilai absorban berarti konsentrasi karbon yang tinggal dalam darah mencit semakin sedikit. Hal ini memperlihatkan bahwa terjadi peningkatan aktivitas fagositosis pada masing-masing kelompok subfraksi.

Data absorban digunakan untuk menghitung nilai konstanta fagositosis. Konstanta fagositosis merupakan salah satu parameter yang digunakan untuk menentukan kecepatan fagositosis. Semakin besar harga konstanta fagositosis maka semakin tinggi kecepatan bersihan karbon, yang berarti semakin cepat sel fagositik melakukan proses fagositosis seperti terlihat pada Gambar 3. Hal ini menunjukkan adanya pengaruh subfraksi meniran terhadap kecepatan eliminasi karbon di dalam darah mencit.



Gambar 3. Grafik konstanta fagositosis dari darah mencit setelah pemberian subfraksi meniran (*Phylanthus niruri* Linn.) selama 6 hari.

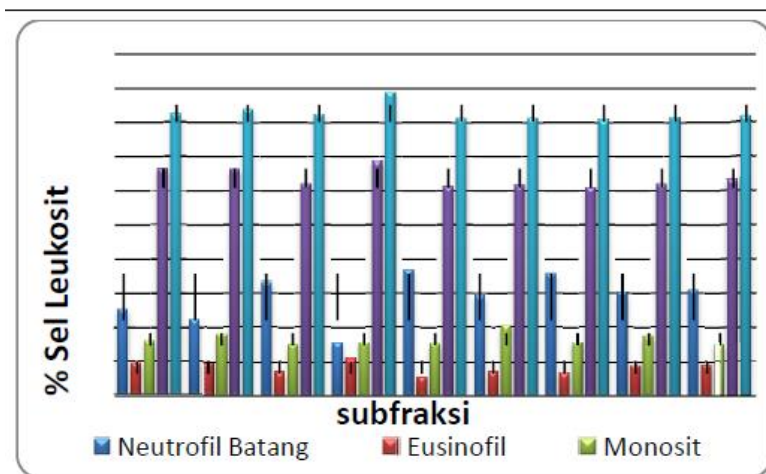
Berdasarkan harga konstanta fagositosis diperoleh nilai indeks fagositosis yang digunakan sebagai parameter pengujian aktivitas imunomodulator. Nilai rata-rata indeks fagositosis menunjukkan aktivitas fagositosis sel-sel fagositik terhadap partikel karbon sebagai antigen akibat pengaruh pemberian subfraksi meniran. Apabila nilai rata-rata indeks fagositosis lebih besar dari satu ($IF > 1$) menunjukkan zat uji tersebut mempunyai kemampuan imunostimulan dan nilai indeks fagositosis dapat dilihat Gambar 4.



Gambar 4. Grafik indeks fagositosis dari darah mencit putih setelah pemberian Subfraksi meniran (*Phylanthus niruri* Linn.) selama 6 hari

Data pada gambar 4 memperlihatkan peningkatan nilai indeks fagositosis rata-rata untuk dosis tunggal 100 mg/kgBB pada masing-masing kelompok subfraksi 1, subfraksi 2, subfraksi 3, subfraksi 4, subfraksi 5, subfraksi 6, subfraksi 7 dan subfraksi 8 yaitu lebih besar dari satu ($IF > 1$).

Hal ini berarti pada setiap kelompok subfraksi meniran mempunyai meningkatkan sistem pertahanan tubuh terhadap aktivitas fagositosis sel fagositik. Dari hasil uji statistik menggunakan analisis variansi satu arah terlihat bahwa dosis tunggal 100 mg/kg BB dari masing-masing kelompok subfraksi perlakuan terhadap kontrol tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) berarti kemampuan fagositosis kedelapan kelompok subfraksi tersebut tidak berbeda jauh. Berdasarkan nilai rata fagositosis tiap subfraksi yang diberikan pada dosis tunggal 100 mg/kgBB yang diberikan, terlihat bahwa efek imunostimulan yang paling optimal diberikan oleh kelompok subfraksi 3 dosis 100 mg/kgBB. Pada penghitungan sel leukosit dengan metoda hapusan darah menggunakan larutan Giemsa sebagai pewarna, menggunakan minyak emersi sebagai penjelas bentuk sel leukosit terlihat sel neutrofil batang, sel eusinofil, sel monosit, sel neutrofil segmen, dan sel limfosit. Sedangkan sel basofil yang bersifat basa tidak dapat diamati karena sel ini larut dalam pewarna Giemsa. Hasil perhitungan jumlah sel leukosit darah mencit putih dapat dilihat Gambar 5.



Gambar 5. Grafik persentase komponen sel leukosit darah mencit putih jantan terhadap subfraksi meniran (*Phylanthus niruri* Linn) selama 6 hari secara oral dengan metoda hapusan darah.

Dari hasil uji statistik menggunakan analisis variansi satu arah, terlihat bahwa efek dosis tunggal 100 mg/kgBB beberapa kelompok subfraksi perlakuan terhadap kontrol berbeda secara nyata ($P < 0,05$) pada setiap kelompok subfraksi untuk sel neutrofil batang, eusinofil, neutrofil segmen, dan limfosit, sedangkan tidak berbeda nyata untuk sel monosit. Setelah dilakukan uji lanjut dengan uji berjarak duncan terlihat bahwa pada sel

eusinofil, sel neutrofil batang, limfosit dan sel neutrofil segmen terdapat perbedaan yang bermakna antara masing-masing kelompok subfraksi.

Pengujian uji respon imun spesifik dilakukan dengan menimbang bobot limpa dan penghitungan jumlah sel limfosit pada limpa mencit. Limpa merupakan tempat pembentukan limfosit yang diaktifkan untuk masuk ke dalam darah. Limpa bereaksi terhadap antigen yang terbawa darah dan merupakan organ pembentukan antibodi.

Setelah dilakukan analisis statistik menggunakan anova satu arah, terlihat peningkatan tersebut tidak mempengaruhi bila dibandingkan dengan kontrol ($P > 0,05$). Hasil tersebut menunjukkan kenaikan bobot limpa relatif pada dosis tunggal 100 mg/kg dengan beberapa kelompok subfraksi perlakuan. Peningkatan terjadi berturut-turut pada dosis tunggal 100 mg/kgBB kelompok subfraksi 8, subfraksi 7, subfraksi 1, subfraksi 6, subfraksi 2, subfraksi 5, subfraksi 4, dan subfraksi 3. Dari hasil uji duncan dapat dilihat bahwa bobot limpa pada kelompok kontrol, dosis tunggal 100 mg/kgBB subfraksi 3, subfraksi 4, subfraksi 5, subfraksi 2, subfraksi 6, subfraksi 1, subfraksi 7, dan subfraksi 8 tidak berbeda nyata satu sama lain. Hal ini berarti semakin meningkatnya bobot limpa maka semakin tinggi sel fagositik yang dihasilkan dalam pembentukan antibodi. Peningkatan optimal didapat pada dosis 100 mg/kgBB kelompok subfraksi 3.

Pada penghitungan jumlah sel limfosit limpa terjadi peningkatan jumlah sel yang ditunjukkan oleh persentase kenaikan jumlah sel limfosit pada setiap kelompok subfraksi. Berdasarkan analisis statistik terlihat bahwa efek dosis perlakuan terhadap kontrol berbedasecara nyata ($P < 0,05$). Peningkatan sel limfosit limpa diperoleh berturut-turut pada dosis tunggal 100 mg/kg BB pada kelompok subfraksi 8, subfraksi 7, subfraksi 1, subfraksi 6, subfraksi 2, subfraksi 5, subfraksi 4, dan subfraksi 3. Dari hasil uji lanjutan menggunakan uji berjarak duncan dapat diketahui bahwa dosis tunggal 100 mg/kg BB subfraksi 3 berbeda nyata dengan subfraksi 4, subfraksi 5.

Dari data didapatkan dosis tunggal 100 mg/kgBB subfraksi optimal yang dapat meningkatkan jumlah sel limfosit limpa yaitu kelompok subfraksi 3 dosis 100 mg/kgBB. Peningkatan jumlah sel limfosit pada limpa juga berarti peningkatan pula pada respon imun spesifik. Ditinjau dari keempat parameter uji, yaitu kecepatan fagositosis, peningkatan jumlah sel leukosit darah, peningkatan bobot limpa dan bobot limpa relatif, serta peningkatan jumlah sel limfosit limpa, diketahui bahwa subfraksi 3 dinilai yaitu dengan perbandingan subfraksi *n*-heksan:etil asetat (9:1) dosis 100 mg/kgBB memiliki aktivitas imunostimulant paling tinggi.

3.7 Uji Imunomodulator dan Jumlah Sel Leukosit dari Ekstrak Daun Kemangi (*Ocimum basilicum* L.) pada Mencit Putih Jantan

Yufri Aldi, Onesis Novita Dewi, Rahimatul Uthia

SCIENTIA Vol. 6 No. 2, Agustus 2016

Abstrak

Telah dilakukan penelitian untuk menguji aktivitas imunomodulator dari ekstrak daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.). Parameter yang diamati adalah densitas optik zat karbon yang disuntikkan secara intravena, jumlah leukosit dan berat limpa relatif dari mencit putih jantan. Hewan percobaan dibagi atas 4 kelompok yang masing-masingnya terdiri dari 5 mencit. Kelompok pertama adalah hewan yang hanya diberi NaCl fisiologis. Kelompok 2, 3 and 4 diberikan ekstrak daun kemangi dengan dosis 10 mg/kgBB, 50 mg/kgBB dan 100 mg/kgBB secara oral selama 6 hari. Pada hari ke-7 ditentukan persentase dan jumlah total leukosit dan sete padalah itu semua tikus disuntikkan secara intravena 0,2 ml larutan koloid karbon 6,4%. Nilai densitas optik karbon dalam darah mencit diukur di menit ke-0, 3, 6, 9, 12, dan 15 pada panjang gelombang 637, 5 nm dan hasilnya digunakan untuk mengukur indeks fagositosis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun kemangi dapat berefek imunostimulan yang ditunjukkan dengan data indeks fagositosis lebih besar dari 1, peningkatan angka total leukosit, peningkatan persentase sel neutrofil, eosinofil dan limfosit serta adanya pertambahan berat relatif limpa mencit putih jantan.

Hasil dan Pembahasan

Pada penelitian ini dilakukan pengujian untuk melihat efek imunomodulasi ekstrak daun kemangi terhadap respon imun spesifik dan non spesifik. Respon imun non spesifik dilakukan dengan menggunakan metode *carbon clearance* dan menghitung persentase sel leukosit dengan metode hapusan darah dan jumlah total leukosit yang menggunakan alat hemasitometer, sedangkan respon imun spesifik dapat dilihat dengan peningkatan bobot limpa mencit yang digunakan. Metoda bersihan karbon merupakan pengujian kemampuan fagositosis dengan menggunakan karbon sebagai antigen yang diberikan secara intravena. Karbon akan berkurang jumlahnya dalam darah seiring pertambahan waktu, karena adanya peristiwa fagositosis oleh sel-sel leukosit terutama neutrofil, monosit, makrofag dan eosinofil.

Untuk melihat efek fagositosis uji bersihan karbon dapat dibuatkan suatu kurva baku antara kadar karbon dalam darah dengan density optik, Pembuatan kurva baku ini gunanya untuk melihat hubungan linier antara kadar karbon dalam darah mencit dengan densiti optik yang diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 639 nm. Dari kurva baku tersebut diperoleh persamaan regresi serapan dan konsentrasi karbon yaitu $y = 0,0049 + 0,036214x$ dengan $r = 0,9977$. Hasil tersebut menunjukkan adanya hubungan linier antara konsentrasi karbon dalam darah mencit

putih jantan dengan nilai absorban. Semakin tinggi konsentrasi karbon dalam darah maka akan semakin tinggi pula nilai absorban yang diperoleh.

Berdasarkan hasil penelitian yang didapatkan terhadap nilai *density optik* terlihat bahwa terjadinya penurunan nilai *density optik* pada semua kelompok dosis ekstrak daun kemangi dibanding kelompok kontrol negatif. Penurunan nilai absorban yang terbesar adalah terjadi pada dosis 100 mg/kg BB, lalu setelah itu dosis 50 mg/kg BB dan kemudian dosis 10 mg/kg BB. Semakin rendah nilai absorban berarti konsentrasi karbon yang tinggal dalam darah mencit semakin sedikit. Hal ini memperlihatkan bahwa terjadi peningkatan aktivitas fagositosis pada masing-masing kelompok variasi dosis. Dari hasil nilai *density optic* yang diperoleh tersebut dapat dihitung nilai konstanta fagositosis (Tabel 1) dan selanjutnya ditentukan indeks fagositosis (Tabel 2).

Tabel I. Harga Perhitungan Fagositosis dari Mencit Putih Jantan setelah Pemberian Ekstrak Daun Kemangi selama 6 hari

Waktu (menit)	Konstanta Fagositosis			
	I	II	III	IV
3	0,042	0,035	0,124	0,360
6	0,013	0,033	0,089	0,058
9	0,024	0,036	0,016	0,024
12	0,021	0,029	0,046	0,029
15	0,016	0,101	0,056	0,113
Rata-rata	0,061	0,047	0,066	0,116

Efek pemberian ekstrak daun kemangi terhadap peningkatan aktifitas fagositosis dapat terlihat pada nilai rata-rata indeks fagositosis > 1 untuk semua kelompok dosis, artinya ekstrak daun kemangi ini memiliki kemampuan sebagai imunostimulan, dimana daya tubuh akan semakin meningkat. Peningkatan indeks bersihan karbon (*carbon clearence*) mencerminkan peningkatan fungsi fagositosis dari makrofag mononuklear dan sistem imun non spesifik.

Tabel II. Hasil Perhitungan Indeks Fagositosis dari Mencit Putih Jantan setelah Pemberian Ekstrak Daun Kemangi selama 6 hari

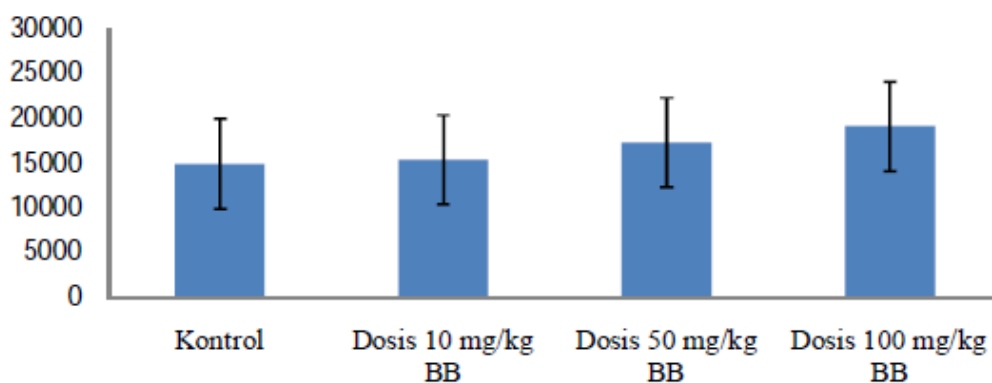
Waktu (menit)	Indeks Fagositosis		
	I	II	III
3	0,841	2,945	8,492
6	2,538	6,846	4,462
9	1,500	0,667	1,000
12	1,381	2,190	1,381
15	6,313	3,500	7,063

Rata-rata	2,514	3,229	4,479
-----------	-------	-------	-------

Pada penghitungan sel leukosit dengan metoda hapusan darah menggunakan larutan Giemsa sebagai pewarna, kemudian menggunakan minyak emersi sebagai penjelas bentuk sel leukosit terlihat sel neutrofil batang, sel eusinofil, sel monosit, sel neutrofil segmen, dan sel limfosit. Sedangkan sel basofil yang bersifat basa tidak dapat diamati karena sel ini larut dalam pewarna Giemsa.

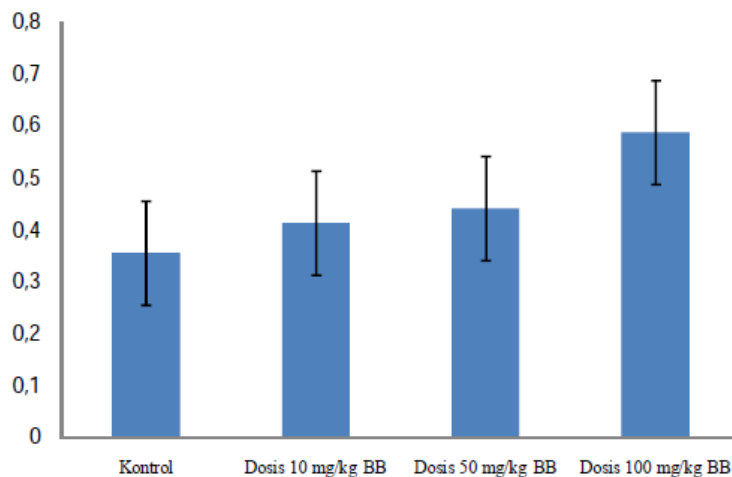
Dari hasil uji statistik menggunakan analisis variansi satu arah, terlihat bahwa efek dari perlakuan terhadap kontrol berbeda secara nyata pada peningkatan jumlah eusinofi ($P>0,05$), netrofil batang ($P>0,05$), netrofil segmen ($P>0,05$) dan jumlah limfosit ($P>0,05$). Setelah di lanjutkan dengan uji Duncan ternyata semakin tinggi dosis yang diberikan maka jumlah tersebut semakin tinggi dan masing masing dosis memberikan efek yang berbeda beda.

Selain itu juga dilakukan uji leukosit total. Dengan uji anova satu arah menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun kemangi dapat meningkatkan jumlah total sel leukosit ($P<0,05$). Hubungan dosis dan jumlah total leukosit dapat dilihat Gambar 2. Analisis selanjutnya dilakukan dengan uji Duncan, terlihat masing masing dosis memberikan efek yang berbeda beda.



Gambar 2. Grafik jumlah total sel leukosit pada mencit putih jantan setelah pemberian ekstrak daun kemangi

Kemudian dilakukan dengan pengujian uji respon imun spesifik dilakukan dengan menimbang bobot limpa dan penghitungan jumlah sel limfosit pada limpa mencit. Limpa merupakan tempat pembentukan limfosit yang digiatkan untuk masuk ke dalam darah. Limpa bereaksi terhadap antigen yang terbawa darah dan merupakan organ pembentukan antibodi. Hasil penimbangan bobot limpa dan bobot limpa relatif beberapa variasi dosis ekstrak daun kemangi dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Grafik bobot limpa relatif setelah pemberian ekstrak daun kemangi selama 6 hari.

Dapat dilihat dari kenaikan nilai bobot limpa relatif dari tiap perlakuan dengan dosis yang berbeda. Ini berarti semakin tinggi bobot limpa maka semakin tinggi sel limfosit yang dihasilkan dalam pembentukan antibodi. Berdasarkan data bobot limpa didapatkan peningkatan bobot limpa yang optimal terjadi pada kelompok dosis 100 mg/kg BB. Pada uji anova satu arah menunjukkan pengaruh yang sangat signifikan dengan nilai ($P < 0,05$). Analisis selanjutnya dilakukan dengan uji Duncan, dimana kontrol tidak berbeda nyata dengan dosis 10 mg/kg BB dan dosis 50 mg/kg BB, tetapi kontrol sangat berbeda nyata dengan dosis 100 mg/kg BB, dari hasil perhitungan bobot limpa relatif setiap dosis menunjukkan adanya efek ekstrak daun kemangi terhadap aktivitas imunostimulan. Dalam limpa, sel B menjadi aktif dan menghasilkan sejumlah besar antibodi yang terdiri dari sel-sel B, sel T, makrofag, dendritik sel, sel-sel pembunuh alami dan sel darah merah, yang menangkap benda asing (antigen) dari darah yang melewati limpa.

3.8 Effect of *Elephantopus Scaber* Linn. Leaf Extract on Mouse Immune System

Yufri Aldi*, Megaraswita, Dwisari Dillasamola

Tropical Journal of Pharmaceutical Research October 2019; 18 (10): 2045-2050

Abstract

Purpose: To investigate the effect of *Elephantopus Scaber* Linn. ethanol extract on mouse immune system based on macrophage phagocytic activity and capacity, total leukocyte count, and distribution of each type of leukocyte.

Methods: Twenty male mice were randomly assigned to four groups. Group I (control) received sodium carboxy methyl cellulose (Na-CMC), 0.5 %. Groups II, III, and IV were dosed orally with 10, 30, and 100 mg/kg ethanol *E. scaber* leaf extract, respectively, for 7 consecutive days. On the 8th day, a suspension of *Staphylococcus aureus* was injected intraperitoneally, and macrophage activity and capacity as well as leukocyte count were then measured using a counting chamber device (hemocytometer) and a 400 x microscope.

Results: The effect of the leaf extract at doses of 10, 30, and 100 mg/kg was increase in macrophage activity by 46.25, 54, and 65 %, and macrophage capacity by 95.8, 105.4 and 125.8 cell/100 macrophage, respectively; total leukocyte count was 10790, 12360, and 15230 cells/ μ l, respectively, and lymphocyte was 34.4, 34.6, and 36 %. Thus, the leaf extract significantly increased macrophage activity and capacity, as well as segmented neutrophils, and mice total leukocyte counts ($p < 0.05$).

Conclusion: Ethanol extract of *E. scaber* leaf extract increases macrophage activity and capacity, as well as total leukocyte count in mouse; therefore, this extract may provide a highly effective approach for boosting immunity.

Results and Discussion

The phagocytic activity and capacity of the mouse macrophages increased in proportion to the extract dose (Figures 2 and 3). A one-way ANOVA demonstrated a significant increase in both peritoneal macrophage activity and capacity with *E. scaber* L. extract dosage ($p < 0.05$).

The leukocyte cells counted were eosinophils, segmented neutrophil cells, lymphocytes, and monocyte neutrophil cells. The forms of these leukocytes in the mice can be seen in Figure 5.

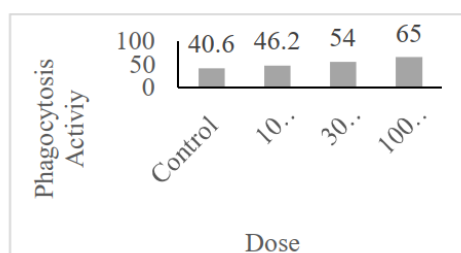


Figure 2: Relationship between phagocytosis activity of macrophage cells and *E. scaber* L. ethanol extract dose

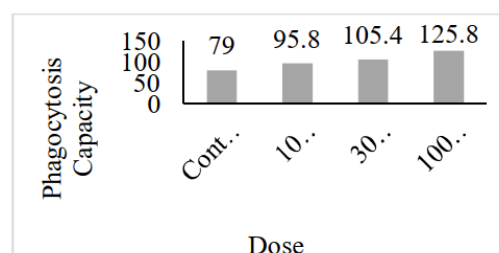


Figure 3: Relationship between macrophage phagocytosis capacity and *E. scaber* L. ethanol extract dose

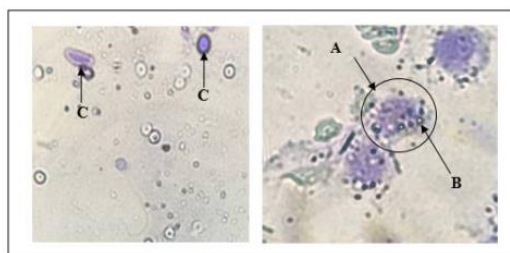


Figure 4: Phagocytosis of SA bacteria by macrophages. A = Active macrophage, B = *Staphylococcus aureus* (SA), C = Macrophage

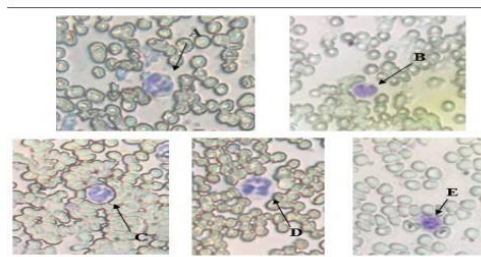


Figure 5: Types of leucocytes in the mice. A = Segmented neutrophil cells; B = Monocytes; C = Banded neutrophil cells; D = Eosinophils; E = Lymphocytes

Most leucocytes observed were neutrophil and lymphocytes, with eosinophils being the least observed (Figure 6). Because monocytes had differentiated into macrophages, the number of monocytes was small. Basophils could not be observed because they were dissolved in Giemsa. One-way ANOVA testing indicated that the proportion of segmented neutrophil and monocyte cells were significantly different for each dosage level ($p < 0.05$).

The total leukocyte count increased significantly with an increase in extract dose ($p < 0.05$), as seen in Figure 8, indicating immune response strengthening.

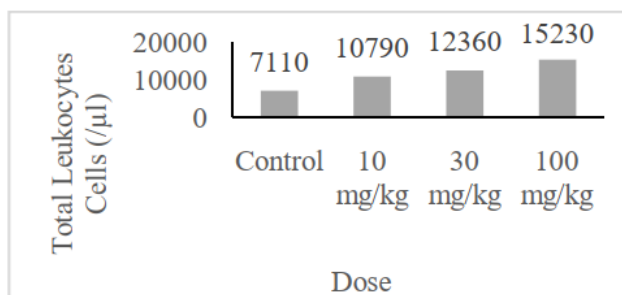


Figure 7: Relationship between total leukocyte count in mice and *E. scaber* L. ethanol extract dose

One content of *E. scaber* L. leaf extract is flavonoids, with <6.2% in quercetin form. The flavonoids of *E. scaber* L. may have antibacterial properties that improve the phagocytosis activity and capacity of macrophage cells. Phagocytic macrophage cells can be seen in Figure 4.

The increase in macrophage activity and phagocytic capacity is most likely due to release of cytokines by phagocytic cells that is induced by bioactive compounds in the extract of *E. scaber* L. The cytokine compounds that can increase the activity and capacity of macrophage cells are IL-1 (Interleukin-1), IL-3 (Interleukin-3), and IL-10 (Interleukin-10). These cytokines are produced by mononuclear phagocytes such as monocyte and macrophage cells. When bacteria are present in the blood circulation, the first cellular immune response is from phagocytic cells such as macrophages,

neutrophils, eosinophils, and monocytes in the blood. Macrophage cells are effective phagocytic cells that ingest foreign substances and transfer them into endosomes where they can be destroyed by lysozymes and other peroxide-generating compounds. Protein fragments derived from antigens are bounded by the major histocompatibility complex (MHC) that is carried to the surface of macrophage cells. Furthermore, these fragments are also presented to T lymphocytes cells so that these cells become active. These activated T lymphocyte cells then release other cytokines, such as IL-1, IL-6, IL-8m IL12, and TNF-alpha.

The IL-1 receptor is found in macrophage cells and endothelial surfaces. If this receptor is occupied by IL-1, the cell will then produce IL-6. These IL-6 cells have receptors in B cells so that the production of antibodies increases. With the increase in antibodies, the body's protection against infection subsequently increases.

The bioactive compounds contained in the extract appear to be able to increase IL-1 production. Hence, they trigger an increase in phagocytic activity, allowing a higher percentage of macrophage cells to engulf the SA bacteria. This increase in IL-1 also increases phagocytic capacity, increasing the number of SA cells that can be engulfed by each macrophage cells, as shown in Figure 4. The release of IL-1, IL-6, and IL-8 produced by activated T lymphocyte cells increase the hematopoiesis process, resulting in an increased leukocyte count (as shown in Figure 7). The compounds contained in *E. Scaber* L. can also increase leukocyte cell total counts, as shown in Figure 7. This increase is a result of higher production of IL-1, which binds to myeloblast cells that then proliferate and differentiate into neutrophil cells, eosinophils, and cell basophils. Normally in mice, the number of neutrophil segments = 16.4%; rod neutrophils = 22.8%; eosinophils = 8.4%; 32% lymphocytes; and monocytes 20.4%. Figure 6 shows that only lymphocyte cells increased in number. These cells are responsible for the humoral and cellular immune responses.

Lymphocyte cells differentiate to form B cells, T cells, and Natural Killer cells (NK cells). Natural killer cells are the main component responsible for preventing infections from viruses and bacteria. The compounds contained in *E. scaber* L. leaves not only increased the activity and phagocytosis of macrophage cells, but also increased the total number of leukocyte cells, particularly lymphocytes. Thus, Tapak Liman leaves may improve the body's resistance to viruses and bacteria.

3.9 Test immunomodulatory effects of ethanol extract skin of purple sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) with carbon clearance method and the number of leukocytes.

Yufri Aldi, Ratih Purnamasari, Dillasamola D, and Friardi

Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences

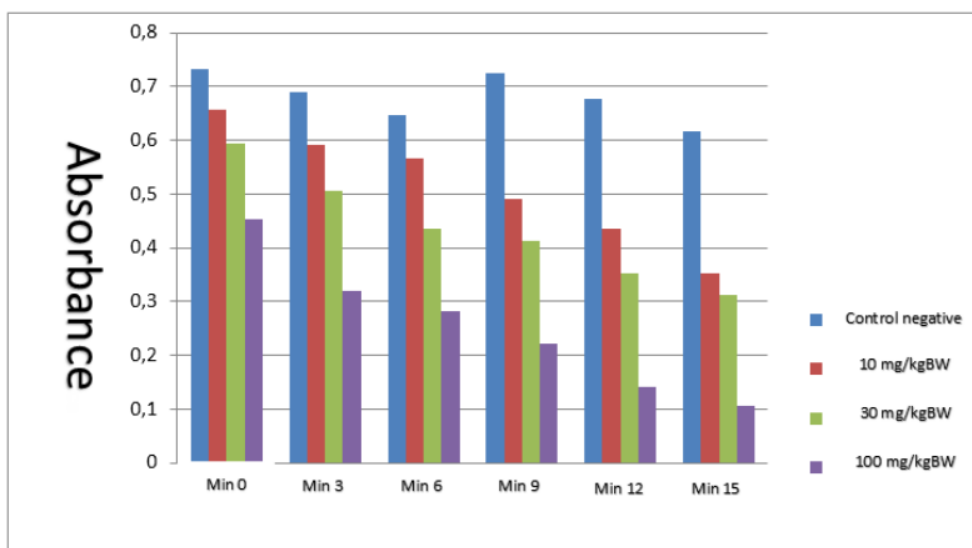
Abstract

The purple sweet potato skin (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) has a bioactive component is anthocyanin. Anthocyanins are categorized as antioxidants, which improves the immune system of the human. This study aims to determine the immunomodulatory activity of the ethanol extract of purple sweet potato skin with carbon clearance method. Animals used in this study were female white mice. Extract dose used is 10 mg / kg BW, 30 mg / kg BW, 100 mg / kg BW administered orally for 6 days on 3 group of treatment and normal saline as a control. On day seven mice were injected intravenously with colloidal carbon of 0.1 ml / 10 g BW. Blood was taken at minute 3, 6, 9, 12 and 15 from the tail as much as 25 μ l and calculated the absorbance. Then determined the absorbance obtained phagocytic index. Blood sampling time 0 is to determine the percentage of leukocytes. After taking blood samples for 15 minutes, the mice were killed and calculated the relative weights of the spleen. The results of the study showed the ethanol extract of purple sweet potato skin dose of 10 mg / kg BW, 30 mg / kg BW and 100 mg / kg BW have immunostimulatory activity. Phagocytic index increase significantly at a dose of 100 mg / kg BW ($p < 0.05$). The increase in the number of leukocytes showed a significant difference in the control group ($p < 0.05$). The increase in the number of lymphocytes and neutrophils segment relative spleen weights showed significant differences in the dosage of 30mg / kg bw and a dose of 100 mg / kg BW.

Results and Discussion

Based on the results of a study of the absorbance decrease at all dose groups skin ethanol extract of purple sweet potato compared to the negative control group. The biggest decrease in absorbance at a dose of 100 mg / kg BW, and the dose of 30 mg / kg BW and then a dose of 10 mg / kg BW. Decrease of absorbance means the carbon concentration in the blood of mice slightly. This shows that an increase in phagocytic activity in each dose group.

Fig 2. Suspension of carbon absorbance against time on female white mice after administration of ethanol extract of the skin Purple Sweet Potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) For six days



From the results obtained absorbance can be calculated constant phagocytosis of each dose of the extract. Phagocytosis constant is one parameter which indicates the rapidity of phagocytosis, the greater the constant speed the higher the carbon clearance phagocytic. Means there are effects of extracts tested are ethanol extract of purple sweet potato skin on the rate of elimination of carbon from the blood. The mean of the phagocytosis constant obtained based on the calculation that the negative control absorbance 0.025814, at a dose of 10 mg / kgBW 0.04228, at a dose of 30 mg / kgBW 0.054546, at a dose of 100 mg / kgBW 0, 09304.

Phagocytosis Constant				
Time (min)	Negative Control	Dose 10 mg/kgBW	Dose 30 mg/kgBW	Dose 100 mg/kgBW
3	0,0539	0,0758	0,0986	0,1657
6	0,0315	0,0410	0,0599	0,0915
9	0,0156	0,0344	0,0428	0,0726
12	0,0141	0,0301	0,0378	0,0707
15	0,0140	0,0301	0,0337	0,0647
Mean	0,0258	0,0422	0,0545	0,0930
±SD	1,404333	0,019261	0,026581	0,041838

Table 1. Phagocytosis constant of female white mice blood after administration of ethanol extract Skin Purple Sweet Potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) For 6 days.

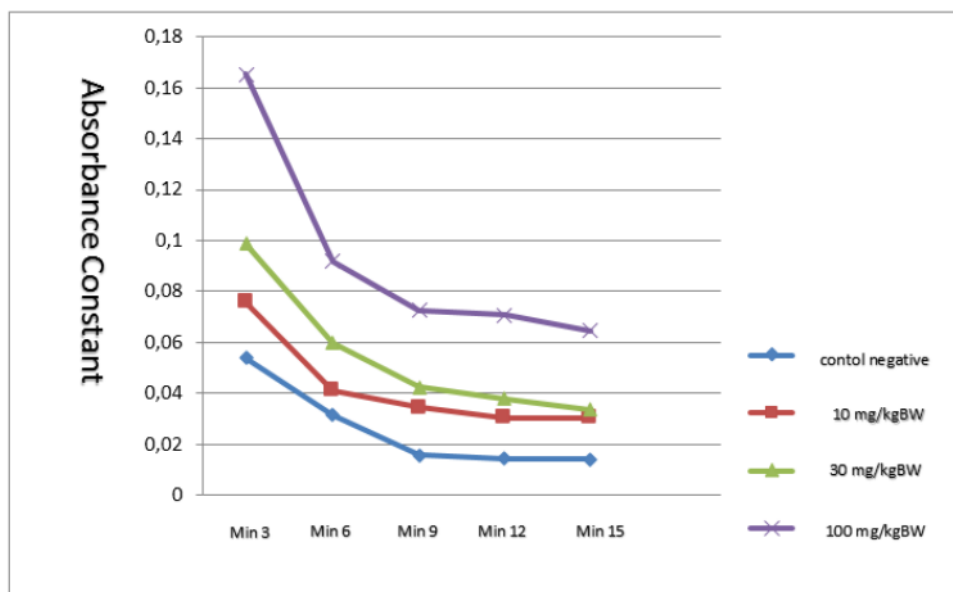


Figure 3. Constant phagocytosis compared to the time of the blood of female white mice after administration of ethanol extract Skin Purple Sweet Potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) For six days.

Phagocytosis Index			
Time (min)	Dose 10 mg/kgBW	Dose 30 mg/kgBW	Dose 100 mg/kgBW
3	1,4063	1,8293	3,0742
6	1,3015	1,9015	2,9047
9	2,2051	2,7423	4,6538
12	2,1347	2,6773	5,0141
15	2,1654	2,4123	4,6313
Mean	1,8426	2,3125	4,0556
±SD	0,4483	0,4272	0,9871

Phagocytic index can be calculated once known constants phagocytosis. The larger the constant and phagocytic index means faster phagocytic cells that make the process of phagocytosis. Based on the calculations have been done, obtained an average index of phagocytosis showed phagocytic activity of phagocytic cells to carbon particles that serve as a markers due to the influence of sweet potato peel extract. If the mean index of phagocytosis more than one ($IF > 1$) indicates that the test substance has the ability immunostimulatory. The mean index of phagocytosis obtained by calculating the value of the constant is at the dose of 10 mg / kg 1.8426, at a dose of 30 mg / kg 2.31254, at dose of 100 mg / kg 4.05562.

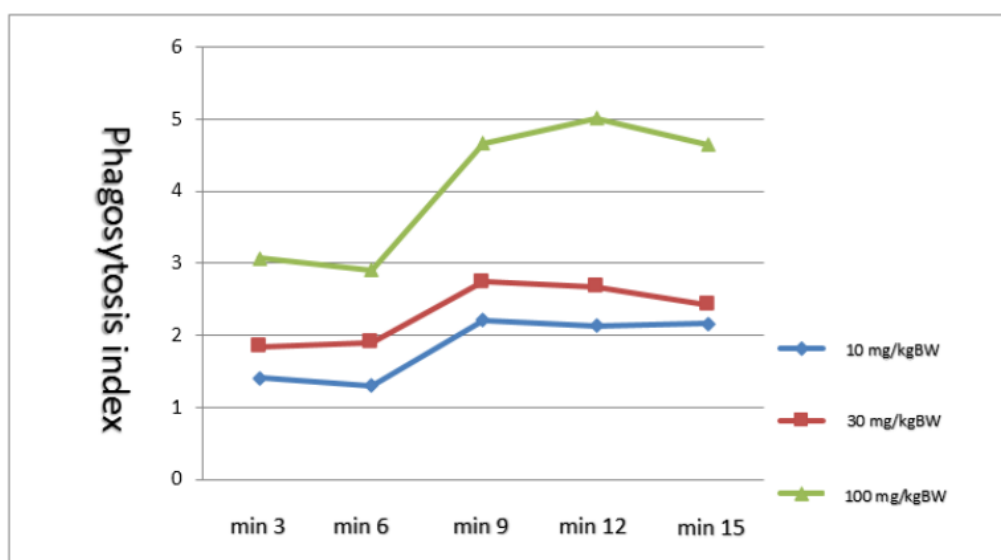


Figure 4. Comparison of phagocytosis index against time on female white mice after administration of skin extract Purple Sweet Potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) For six days.

The results of the mean fagocytosis index that indicates the test substance is as immunostimulatory seen at doses of 10 mg / kgBW, 30 mg / kgBW and 100 mg / kgBW. In statistical test phagocytic index by using one-way ANOVA test dose showed significant differences in the dose of 100mg / kgBW ($P < 0.05$).

Then test specific immune response. It can be seen from the increase in relative spleen weights of each treatment with different doses. The results showed that the negative control relative spleen weights 0,37686 g, at the dose of 10 mg / kg BW 0,38396 g, at doses 30 mg / kg BW 0,54258g, at dose of 100 mg / kg BW 0,60302 g. The meaning is the higher the weight of spleen more phagocytic cells resulting in the formation of antibodies. Based on the weight of spleen, lymph optimal weight increase was in the group of 100 mg / kgBW. After statistical analysis, the increased weight of spleen showed significant differences in the dosage of 30mg / kgBW and 100mg / kgBW compared with controls ($P < 0.05$). Lymph is known that the secondary lymphoid organs containing B lymphocytes and T lymphocytes that contribute in the process of a specific immune response. In addition, the spleen also contained dendritic cells and macrophages act as APCs (Antigen Presenting Cell) that serves present antigens to lymphoid cells. Increased immune cells is correlated with spleen weight. The increase in relative spleen weights showed that the effect of the ethanol extract of purple sweet potato skin on immunostimulatory activity.

Dose	Animals	BW (g)	LW(g)	Relative weigh spleen (%)
Control negative	1	26,5	0,1399	0,5279
	2	26	0,1200	0,4615
	3	25,5	0,1133	0,4443
	4	24	0,0998	0,4158
	5	23	0,0800	0,0348
			Mean	0,37686
10 mg/kg BW	1	25	0,0889	0,3556
	2	25	0,0889	0,3556
	3	25,5	0,1033	0,4051
	4	24,5	0,0850	0,3469
	5	27	0,1233	0,4566
			Mean	0,38396
30 mg/kg BW	1	26,5	0,1427	0,5385
	2	28	0,1430	0,5128
	3	25,5	0,1355	0,5314
	4	24,5	0,1400	0,5714
	5	25,5	0,1425	0,5588
			Mean	0,54258
100 mg/kg BW	1	27	0,1793	0,6641
	2	27,5	0,1795	0,6527
	3	28	0,1799	0,6425
	4	28,5	0,1800	0,6316
	5	29,5	0,1893	0,6417
			Mean	0,60302

Table 4. The weight of the spleen relative female white mice after administration of ethanol extract Skin Purple Sweet Potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) For six days.

In the calculation of lymphocyte cells by a method using blood smear Giemsa solution as a dye, then emersi oil as explanatory form of lymphocytes. Total lymphocyte cells in the negative control mean 23.2, 10 mg / kg BW, 24 and 30 mg / kg BW of 30.8, at a dose of 100 mg / kg BW 40.8. Lymphocyte cells can also be used as the test parameters to see the activity of the ethanol extract of purple sweet potato skin on female white mice. The increase in the number of lymphocytes in the lymph cells means also an increase in the specific immune response. Cell lymphocytes consist of B lymphocytes and T lymphocytes. B lymphocytes will proliferate and differentiate to form plasma cells and memory cells. This plasma cells that produce antibodies formed after contact with the antigen. To form antibodies, plasma cells need to be cooperation with T lymphocytes (T-helper cells).

In the calculation of the total number of leukocytes by using a haemocytometer found the number of leukocytes mean the negative control 6389 / mL of blood, a dose of 10 mg/kgBW 11 690 / uL of blood, a dose of 30 mg/kgBW 13,450 / uL of blood, a dose of 100 mg/kgBW 15.350 BB / mL of blood. In statistical test total number of leukocytes using one-way ANOVA test dose showed significant differences in each group to the control ($P < 0.05$).

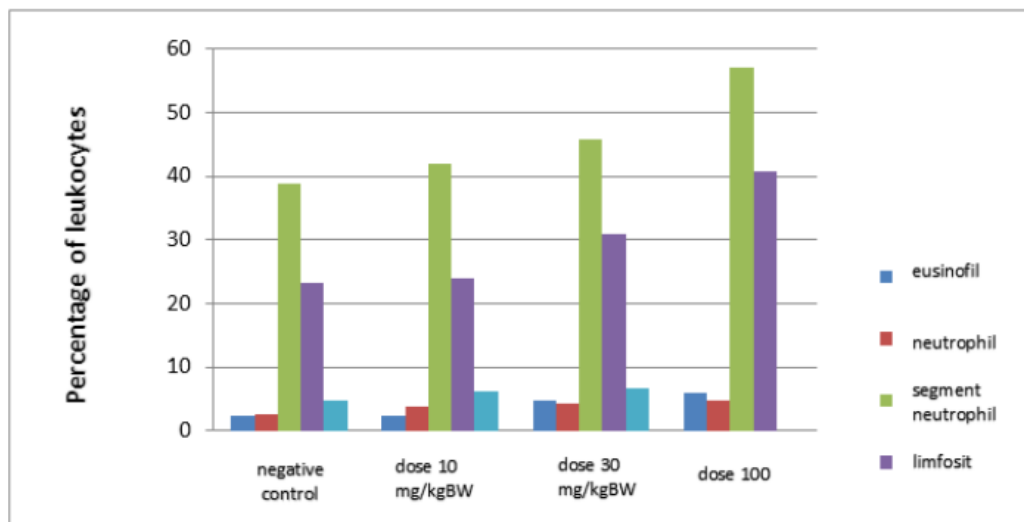


Figure 5. Percentage of leukocytes

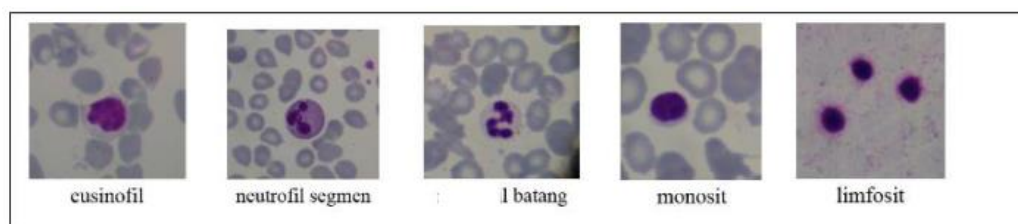


Figure 6. leukocyte cells in mice with Giemsa.

The total of leukocytes				
Negative control		10mg/kgBW	30mg/kgBW	100mg/kgBW
6700/ μ L		11.000/ μ L	13.900/ μ L	15.700/ μ L
6000/ μ L		11.700/ μ L	13.500/ μ L	15.000/ μ L
6500/ μ L		12.000/ μ L	12.900/ μ L	14.900/ μ L
6400/ μ L		12.500/ μ L	13.950/ μ L	15.500/ μ L
6345/ μ L		11.250/ μ L	13.000/ μ L	15.650/ μ L
mean	6389/ μ L darah	11.690/ μ L	13.450/ μ L	15.350/ μ L

Table 5. Total Number of leukocytes in the blood of female white mice after administration of ethanol extract Skin Purple Sweet Potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) For six days with Hemocytometer.

3.10 Immunomodulator Activity of Ethanol Extract of Tapak Liman Leaves (*Elephantopus scaber* Linn.)

Yufri Aldi*, Dwisari Dillasamola, Gita Rahma Yanti

Pharmacognosy Journal, Vol 11, Issue 6(Suppl), Nov-Dec, 2019

Abstract

Introduction: Tapak Liman (*Elephantopus scaber* Linn) is a medicinal plant in Indonesia which traditionally used as a treatment for fever, gout, dysentery, hepatitis, and infections. **Aim:** This study aims to determine the immunostimulants activity of tapak liman extract with carbon clearance method and to determine the percentage and total leukocytes and relative lymph weights. **Materials and Methods:** Twenty white male mice divide assigned to 1 control group and 3 experimental groups. It treated by oral administration of tapak liman extract; 10, 30, and 100 mg/kgBW. After six days of administration, mice intravenously injected with 0.1 ml/10gBW colloidal carbon. Blood obtained from the mice tail at; 3rd, 6th, 9th, 12th and 15th minutes. The determined absorbance then calculated to obtain the phagocytotic index, the percentage and the total of leukocyte cells and lymph weights. **Results:** Phagocytosis index increased significantly at 1, 12, 1.24 and 1.47. The percentages of neutrophil segment are 57%, 60% and 60%, for lymphocytes are 3, 80%, 32.80% and 34.20%, monocyte cells are 4.60%, 3.00% and 2.60%, neutrophil are 3.40%, 3.20%, 2.20%, and for the eosinophil cells are 3.20%, 1.8% and 1.20%. Total leukocyte cells are 10,760, 11,630 and 15,880 cells/microliter. The relative lymph weight of each dose in the sequence is 0.36, 0.49 and 0.66. **Conclusion:** Ethanol extract of tapak liman leaves (*Elephantopus scaber* Linn) can increase the immunity of mice.

Results and Discussion

Carbon Clearance method is a test of immunomodulatory activity by spectrophotometry by measuring carbon clearance in the blood of experimental animals at 3, 6, 9, 12 and 15 minutes. Carbon clearance method was chosen because it's accurate, fast, easy and economical.

Immunomodulatory activity was test used experimental animal male white mice (*Mus musculus* L.). It was chosen because they were easy to obtain, easy to handle, physiologically similar to humans. The experimental animals that used have fulfilled the ethical approval by the Research Ethics Committee of Faculty of Medicine of Universitas Andalas with the approval number 032/KEP/FK/2018. Experimental animals are acclimated in a research room for a week to make that animal comforts with the experimental environment and to avoid stress during the treatment. Experimental animals that have different behavior must be separated so as not to affect the conditions of another experimental animal.

Carbon clearance method is a spectrophotometric examination of nonspecific immunomodulatory activities by measuring carbon clearance in the blood of experimental animals at the time of testing at 3, 6, 9, 12 and 15 minutes. Chinese ink

used to stable in the blood and does not inhibit in blood vessels and lungs. In addition, carbon also has the characteristics of an antigen because it is normally not present in the body. Carbon suspension was made using tween 80 with a 1% concentration and added physiological NaCl 0.9% to obtain a concentration of 64 mg/ml (6.4%). The use of physiological NaCl in the manufacture of suspensions same as the body condition (isotonic). To see the phagocytic effect of ethanol extract of tapak liman leaves, a standard curve was made between the carbon content in the blood and the absorbance value measured using a UV-Vis spectrophotometer at a wavelength of 650 nm. 650 nm wavelength is an area of carbon uptake.²¹ From the results of determining the standard carbon curve obtained could be seen in Figure 3 with the regression equation $y = 0.0064x + 0.0376$ and $R^2 = 0.9901$. The value of the regression equation showed a linear relationship between carbon concentrations in the blood of mice and absorbance.

Based on the average value of carbon absorbance in the blood in 650 nm spectrophotometer, there was a decrease in absorbance value in all groups given the tapak liman extract comparison with the control group. The decreasing value of carbon indicates the decreasing concentration of carbon that lives in the blood of mice. The carbon in the body will stimulate the formation of a non-specific immune system in the form of phagocyte cells. Phagocytic cells will be activated due to the stimulation of a non-specific immune response and quickly recognize the type of foreign antigen that enters the body then destroys and cleanses the antigen (carbon) from the bloodstream.

Phagocytic constants are one of the phagocytic parameters, where the greater value of phagocytic constants, the higher the speed of carbon clearance so that faster phagocytic cells carry out phagocytic processes. The phagocytosis index value can be calculated after obtaining the phagocytic constant value. If the mean value phagocytosis index more than 1 ($IF > 1$) means that the substance has immunostimulatory activity. Conversely, if the mean value of the phagocytosis index is smaller than 1 ($IF < 1$) means that the substance has immunosuppressant activity. In this experiment, the average phagocytosis index experimental group is more than 1 ($IF > 1$) and could be seen in Figure 4. Based on the value of the phagocytosis index is a dose of 10, 30 and a dose of 100 mg/kg is immunostimulant. The highest phagocytosis index value was shown by group dose of 100 mg/kg BB. Increased phagocytosis means destruction process of antigens is greater.

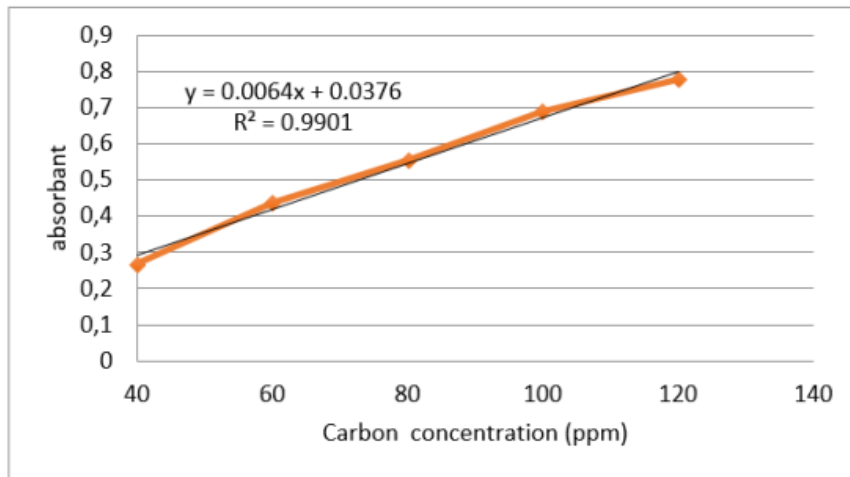


Figure 4: Calibration curve of carbon content in the blood of mice.

The treatment showed the more doses that given the higher leukocyte could be produced. It present in Figure 5. The ANOVA Test result (Table 1) describe the effect of ethanol extract of tapak liman leaves (*Elephantopus scaber* Linn) was significantly increase the total of leukocyte ($p < 0.01$).

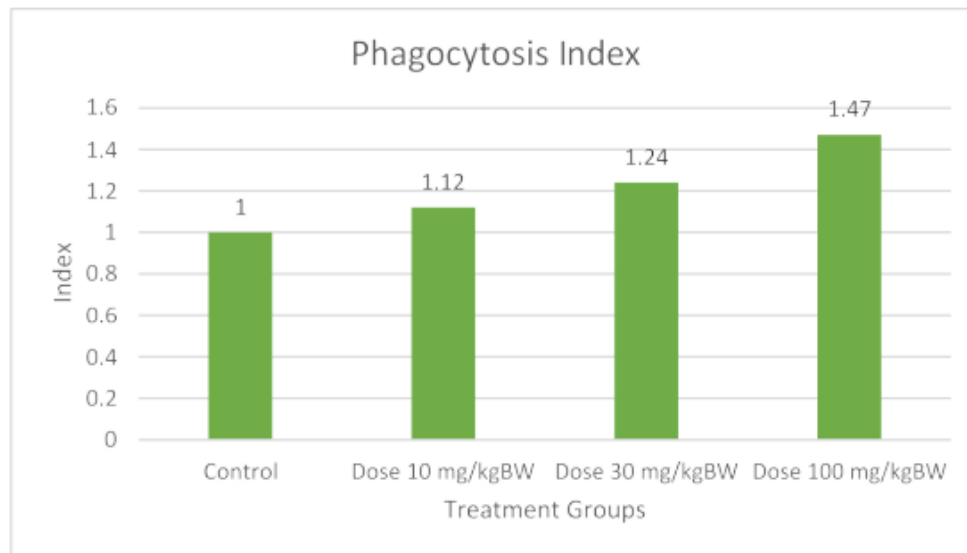


Figure 5. Graphic correlation between doses with phagocytic index values from male white mouse blood after administration of ethanol extract of tapak liman leaves (*Elephantopus scaber* Linn)

The DMRT result showed the effect of each dose of extract of tapak liman leaves was significantly increasing the total leukocyte despite the effect of 10 mg/kg dose and 30 mg/kg dose was not significantly different. It could be seen in Table 2.

Table 1: The results of one-way ANOVA of total leukocyte cells in the after administration of ethanol extract of tapak liman leaves (*Elephantopus scaber* Linn).

	Number of squares	df	Average squared	F	Sig.
Between Groups	159249000.0	3	53083,000,000	19.49	0,000
Within Groups	43573000.00	16	2723312,500		
Total	202822000.0	19			

Table 2: The results of DMRT of the treatment factor (dose) of total leukocyte cells after administration of ethanol extract of tapak liman leaves (*Elephantopus scaber* L.).

Group	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Carrier control	5	7400,0000		
Dosage of 10 mg / kg	5		10760,0000	
Dosage of 30 mg / kg	5		11630,0000	
Dosage of 100 mg / kg	5			15330,0000
Sig.		1,000	0,417	1,000

Administration of tapak liman leaves ethanol extract with increasing dosage could increase the number of segment neutrophil cells, lymphocytes, and monocyte cells. The complete results could be seen in Table 1. The increasing the value of neutrophil segment cells, monocytes and lymphocyte cells are one of the immunomodulatory activity parameters. Based on previous research the plants that potential as immunomodulator could activate immunocompetent cells to increase the body's immune system. Neutrophil cells and monocytes are firstline body defence cells in a nonspecific immune response because they function as phagocytic specialist cells which are very slow to move, eat and destroy immunogenic substances. Increasing lymphocyte cells show increased activity of specific immune responses. Lymphocyte cells consist of B lymphocytes and T lymphocytes. B lymphocyte cells will proliferate and differentiate to form plasma cells and memory cells. Plasma cells will form antibodies after contact with antigens. To establish antibodies, plasma cells cooperate with T lymphocytes. The comparison of effect extract tapak liman leaves could be seen in Figure 5.

According to the result of one-way ANOVA, the administration of tapak liman leaves extract on the percentage of leukocyte cells in each group had shown significantly different effect ($p < 0.05$) for eosinophils cells, lymphocytes, monocytes, and neutrophils stem meanwhile neutrophil segment cells showed a nonsignificant effect ($p > 0.05$).

The percentage of neutrophils was increased after the administration of ethanol extract tapak liman leaves. It could be seen in Table 4 that showed the dose 100mg/kg could decrease the percentage while in another dose still the same.

Table 3: ANOVA analysis results on the percentage of leukocyte cell types after administration of ethanol extract of tapak liman leaves (*Elephantopus scaber* Linn).

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Eusinophyl	Between Groups	14.800	3	4.933	8.580	0.001
	Within groups	9.200	16	0.575		
	Total	24.000	19			
Lymphocytes	Between Groups	154.80	3	51.600	3.679	0.035
	Within Groups	224.400	16	14.025		
	Total	379.200	19			
Monocytes	Between Groups	56,950	3	18,983	22,33	0,000
	Within Groups	13,600	16	0,850		
	Total	70,550	19			
Neutrophils Stem	Between Groups	33,000	3	11,000	8,000	0,002
	Within Groups	22,000	16	1,375		
	Total	55,000	19			
Neutrophil Segment	Between Groups	19,350	3	6,450	0,343	0,795
	Within Groups	301,200	16	18,825		
	Total	320,550	19			

Table 4: The result of DMRT of the treatment factor (dose) of Eosinophil cells after administration of ethanol extract of tapak liman leaves (*Elephantopus scaber* Linn).

	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Dose 100 mg/kg	5	0,8000		
Dose 30 mg/kg	5	1,6000	1,6000	
Dose 10 mg/kg	5		2,6000	2,6000
Control	5			3,0000
Sig.		0,115	0,053	0,417

Table 5: The result of DMRT of the treatment factor (dose) of Lymphocyte cells after administration of ethanol extract, tapak liman leaves (*Elephantopus scaber* Linn).

	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Control	5	29,4000	
Dose 10 mg/kg	5	32,6000	32,6000
Dose 30 mg/kg	5	33,6000	33,6000
Dose100 mg/kg	5		37,2000
Sig.		0,111	0,083

The percentage of total lymphocyte and eosinophil were increased while other cells were decreased. It means the effect of extract tapak liman leaves was better on the specific immune system. The increasing of lymphocyte and eosinophil would protect the body from infection attack. Lymphocyte T in thymus gland would differentiate and proliferate be Natural Killer cell (NK Cell) and this cell. Lymphocyte T at thymus gland will differentiate and proliferate be Natural Killer Cell (NK Cell) that responsibility

directly in the process to destroy intracellular infection (virus and bacteria) and neoplasm through apoptosis, perforin, and granzymes. Specifically, lymphocyte would differentiate and proliferate be T CD⁺ 8 cell then differentiate and proliferate again be cytotoxic t cells (Tc) that has a role that responsibility directly in the process to destroy intracellular infection (virus and bacteria) and neoplasm.

The activity of tapak liman leaves extract on the percentage of monocyte cells from ANOVA analysis showed a very significant difference ($p < 0.05$). Duncan's test (Table 6), was seen as very significant ($p < 0.05$).

Monocyte cells circulating in the blood usually for 12 hours and then will settle into macrophages. Macrophage cells which are already on the network is a professional phagocytic cell and to a very large phagocytosis capability in destroying foreign particles when compared with the other phagocytic cells. The occurrence of a decrease in monocytes in the blood indicates the process of macrophage cell formation increases and this is evidenced by the high value of the phagocytosis index (>1).

Based on the DMRT result, the effect of reducing the number of stem neutrophil cell percentages was significantly different. Meanwhile, the neutrophil segment was not affected by the treatment. The greater the dose is given, the fewer neutrophil stem cells, while the effect of 10 mg/kg and 30 mg/kgBB doses were nonsignificant. The results of Duncan's test analysis could be seen in Table 4. Stem neutrophil cells are neutrophil cells that are young and will proliferate and differentiate into segment neutrophil cells. The faster the ripening process, then the bushes in many neutrophil cells are formed and of course, the phagocytosis process will increase.

Segmented neutrophil cells are the type of neutrophil cells that act to destroy antigens. Increased and high activity of neutrophil cells tends to be detrimental to the body's physiological system because the phagocytic activity of neutrophil cells tends to cause inflammatory reactions.

The Lymph was grouped in secondary lymphoid. In this organ, antigen and lymphocyte will interact with each other so that lymphocyte will differentiate and proliferate be plasma cell and produce antibody. The more active of proliferate process of lymphocyte that would increase lymph relative weigh. It could be seen in Figure 6.

The result of ANOVA analysis showed a significant difference ($p < 0.05$) relative lymph weights in each group. It could be seen in Table 9 and the DMRT results are as shown in Table 10. The DMRT result showed all groups in different subsets. That means increasing of the activity of lymphocyte B to produce antibodies in lymph due to the

administration of ethanol extract of tapak liman leaves has an effect on increasing lymph weight and immunomodulatory activity. The increasing of lymph weight in this study was also followed by an increase in lymphocyte cells because the lymphatic organ occurs differentiation and proliferation of lymphocytes resulting in lymphatic enlargement.

Table 6: The result of DMRT of the treatment factor (dose) on monocytes after administration of ethanol extract of tapak liman leaves (*Elephantopus scaber* Linn).

Group	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Dosage of 100 mg / kg	5	1,6000		
Dosage of 30 mg / kg	5	2,6000		
Dosage of 10 mg / kg	5		4,4000	
Control	5			6,0000
Sig.		0 , 106	1,000	1,000

Table 7: The result of DMRT of the treatment factor (dose) of neutrophil stem cells after administration of ethanol extract, tapak liman leaves (*Elephantopus scaber* Linn).

Group	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Dosage of 100 mg/kg	5	1,6000		
Dosage of 10 mg/kg	5		3,4000	
Dosage of 30 mg/kg	5		3,8000	3,8000
Control	5			5.2000
Sig.		1,000	0,597	0,077

Table 8: The result of DMRT of treatment factors (dose) on segmented neutrophil cell after administration of ethanol extract, tapak liman leaves (*Elephantopus scaber* Linn)

Group	N	Subset for alpha = 0.05
		1
Control	5	56.4000
Dosage of 10 mg / kg	5	57.0000
Dosage of 30 mg / kg	5	58.4000
Dosage of 100 mg / kg	5	58.8000
Sig.		0.433

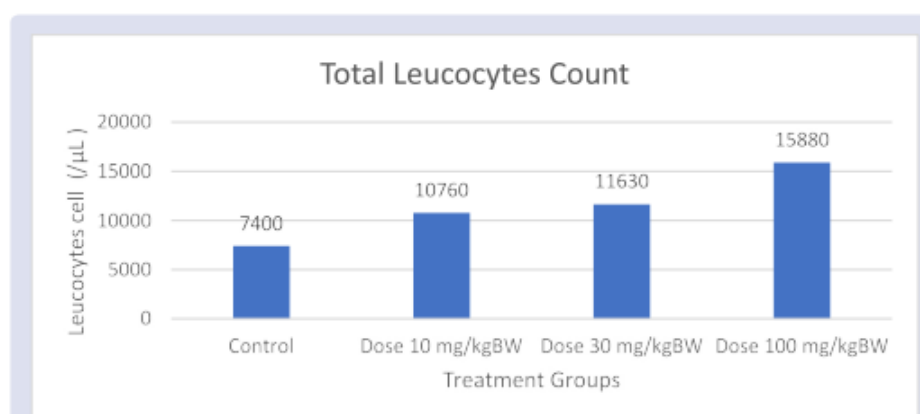
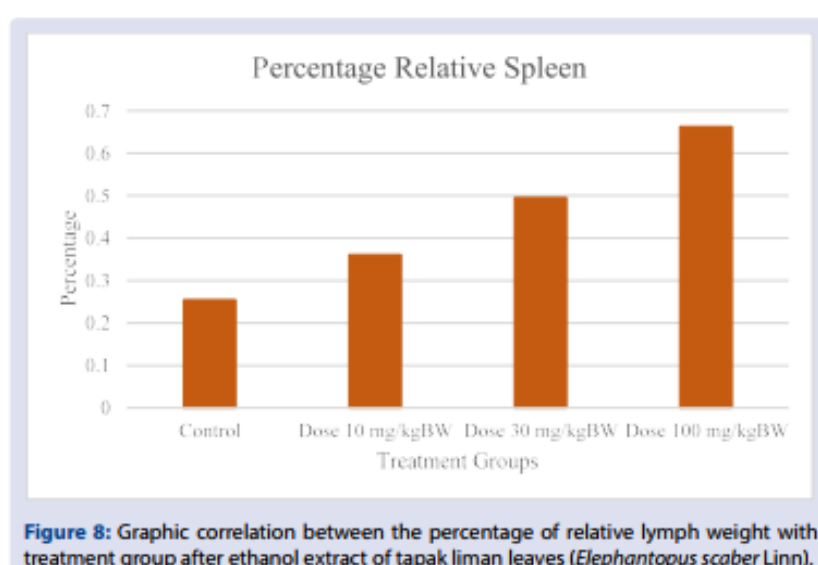
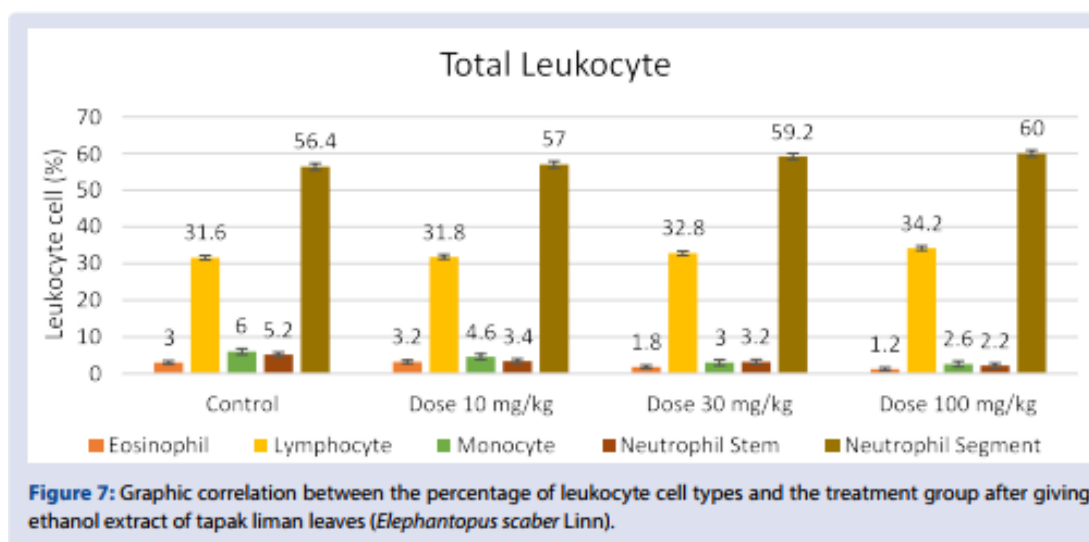


Figure 6: Graphic correlation between total leukocyte cells with treatment group after administration of the extracted ethanol leaves liman leaves (*Elephantopus scaber* Linn).



Tapak Liman leaves has been reported to contain sesquiterpene lactone compounds such as deoxyelephantopin, isodeoxyelephantopin, and scabertopin. In addition, research results have also been reported that antioxidant compounds found in a plant can increase the body's immune system by increasing the number of leukocyte cells. Based on the research, it can be concluded that the ethanol extract of tapak liman leaves has immunostimulatory activity. This study should be continued to determine the effect of an extract of tapak liman leaves on activity and capacity of macrophage cell, especially professional phagocyte, also cytokine that influence in it.

3.11 Activity of Kincung Flowers (*Etlingera Elatior* (Jack) R.M.Sm.) on Total Leukocytes and Percentage of Leukocytes in Allergic Male White Mice

Yufri Aldi, Elidahanum Husni, Relin Yesika

Pharmacognosy Journal, Vol 12, Issue 1, Jan-Feb, 2020

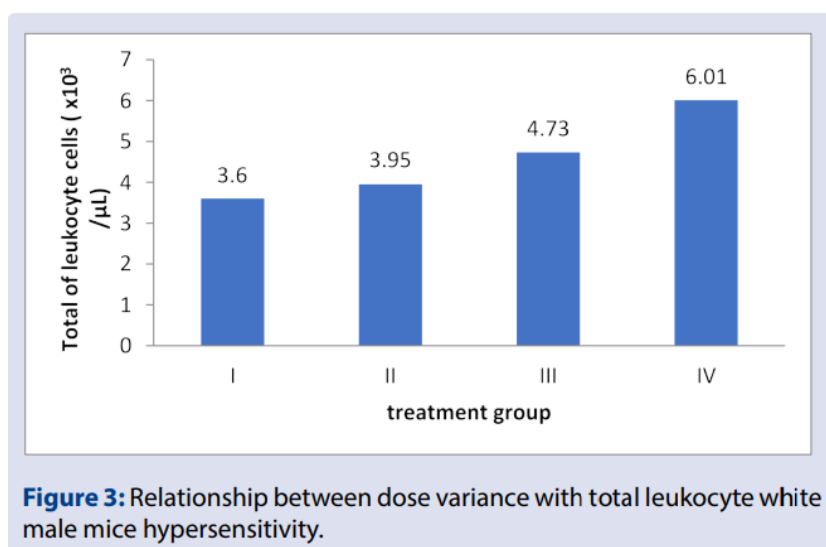
Abstract

Introduction: Kincung Flower (*Etlingera elatior* (Jack) R.M.Sm.) is a native herbal plant in Southeast Asia that traditionally used to many diseases, especially in Indonesia. **Aim:** This study was conducted to determine the activity of kincung (*Etlingera elatior* (Jack) R.M.Sm.) on the total number of leukocytes and differential leukocyte cells in allergic mice. **Material and Methods:** The semi-solid extract of Kincung flower (*Etlingera elatior* (Jack) R.M.Sm.) was made by the maceration method using 70% ethanol solvent. The animals used were 20 male white mice that have allergies of skin that treated with 20% albumen antigens given on the first day 0.2 mL/20 g intraperitoneally, then on the seventh day are given antigens with the same dose subcutaneously. Allergic mice indicated by redness at the injection site. It divided into four groups: the negative control group and three dose groups (100; 300; and 1000 mg/kg). On the seventh day after administration of the extract, observed the value of total leukocytes and differential leukocyte cells in mice. **Results:** The results after administration of extracts in 3 dose groups (100; 300; and 1000 mg / kg) and the negative control group showed sequentially the total number of leukocytes was: 3.95; 4.73; 6.01; and 3.6 x10³/μL and the percentage of leukocytes consisting of lymphocytes: 67.6%; 62.0%; 56.8% and 70.0%, neutrophils: 22.4%; 29.2%; 36.8% and 20.0%, eosinophils: 6.4%; 5.8%, 4.2% and 6.6%, monocytes: 3.6%; 3.0%, 2.2% and 3.4%, and basophils: 1.8%; 1.4; 0.8% and 2.0%. It concluded that kincung flowers could increase total leukocytes significantly (p<0.05), decrease lymphocytes, eosinophils, basophils significantly (p<0.05), increase neutrophils significantly (p<0.05), and reduce monocytes insignificantly (p>0.05). **Conclusion:** Kincung flowers (*Etlingera Elatior* (Jack) R.M.Sm.) can be used as an immunomodulator and decreasing the percentage of basophil cells, and eosinophils can used as an anti-allergic drug.

Results and Discussion

This study was conducted with the sensitisation of experimental animals with 20% albumen as much as 0.2 mL/20 g bw intraperitoneally. Purebred albumen are used as antigens because these albumen immunogenic properties are quite high, the protein content is around 12. The *in vitro* test in this study used sensitised mast cell. The purpose of this sensitisation is to generate a primary immune response where the first antigen injection is performed intraperitoneally so that the process of antigen recognition is faster by lymphocyte cells. This recognition process is carried out by macrophages, where macrophages are one of the presenting cell antigens and widely found in the abdominal cavity. On the seventh day, a subcutaneous second injection of antigens was carried out to increase the formation of IgE antibodies, so that allergic reactions get worse. In a preliminary study of *Etlingera elatior* (Jack) R.M.Sm.) was tested *in vitro* to inhibit desensitised mast cell in white male mice. Desensitised mast cell-induced with albumen

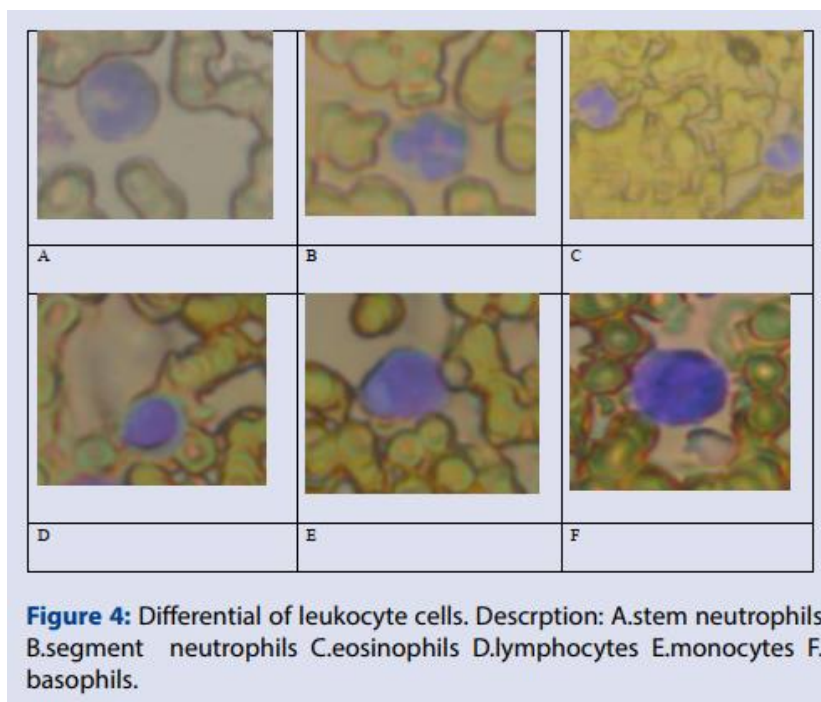
and allergic mice will be shown redness to red spots or bumps around the body and injection site. This reaction occurs when antigens bind to IgE antibodies that are on the surface of mast cells and basophils. This bond in a matter of minutes can cause mastocyte degranulation which results in the release of mediators, especially histamine. Allergy mice will then used for further treatment, except for the negative control group used normal mice. The formula for calculating the number of leukocytes per μm is: cells counted $\times 20$ (1:20) $\times 10$ (0.1mm): 4 (number of boxes in μm^2) or number of cells counted in boxes multiplied by 5.



Total leukocyte counts of male mice type 1 hypersensitivity mice showed in Table 1, and the relationship between total leukocyte counts by givin dosage variations showed in Figure 3. One-way Anova analysis of total leukocyte cells after ethanol extract of kincung flowers at doses of 100, 300, and 1000 mg/kg in type I hypersensitivity mice showed a significant increase in the number of mouse leukocyte cells ($p < 0.05$). However, this increase is still in the normal range where normal mice cell leukocytes range from 2000-10000 cell/ μL .²⁹⁻³¹ The result of an increase in the total number of leukocyte cells showed in Table 2. An increase in the total number of leukocytes represents a humoral and cellular response against pathogenic agents or indicates an increase in the body's defence capability,³² where the function of leukocytes is to protect the body from pathogens by producing antibodies and phagocytic processes. Increased leukocytes are thought to contain flavonoids in kincung flowers. Flavonoids can enhance the immunomodulatory system by increasing the effectiveness of lymphokine proliferation produced by T cells so that it will stimulate phagocytic cells to respond to phagocytosis. Higher doses of flavonoids make leukocyte cells (phagocytes) more active

against phagocytic bacterial cells, and more bacteria can be damaged and digested with leukocyte cells.

The percentage of leukocytes, performed by Romanowsky staining method because this staining can give satisfactory results on peripheral blood smears. Giemsa and wright colouring is included in Romanowsky colouring wright-stain to see basophil cells and neutrophil, lymphocytes, monocytes, eosinophils using Giemsa. Leukocyte count done by cross-sectioned or leukocyte count, which starts from the edge of the blood sample by snaking until 100 leukocyte cells are obtained then expressed in percentage. The types of leukocytes that can be seen using Giemsa colouring showed in Figure 4. For the percentage of leukocytes, it showed in Table 2, and the relationship of percentage leukocytes with administering dose variations showed in Figure 5.



After one-way Anova analysis on the percentage of leukocytes after administration of kincung flower ethanol extract at doses of 100, 300, and 1000 mg/kg bw in type I hypersensitivity mice (Figure 4) showed that there is a significant decrease in lymphocytes ($p < 0.05$). The percentage of normal lymphocytes in mice is 70-80% of the total differential leukocytes. Decreased lymphocytes can be triggered by several things such as stress during the treatment process or with increasing age and when the number of neutrophils increases.

The results of the One-way ANOVA analysis showed a significant increase in neutrophils ($p < 0.05$). The standard percentage of neutrophils in mice is 20-30% of the total differential leukocytes. An increase in neutrophils or so-called neutrophilia is

associated with responses to stress or excitement and usually increases in cases of bacterial infection and acute inflammation.

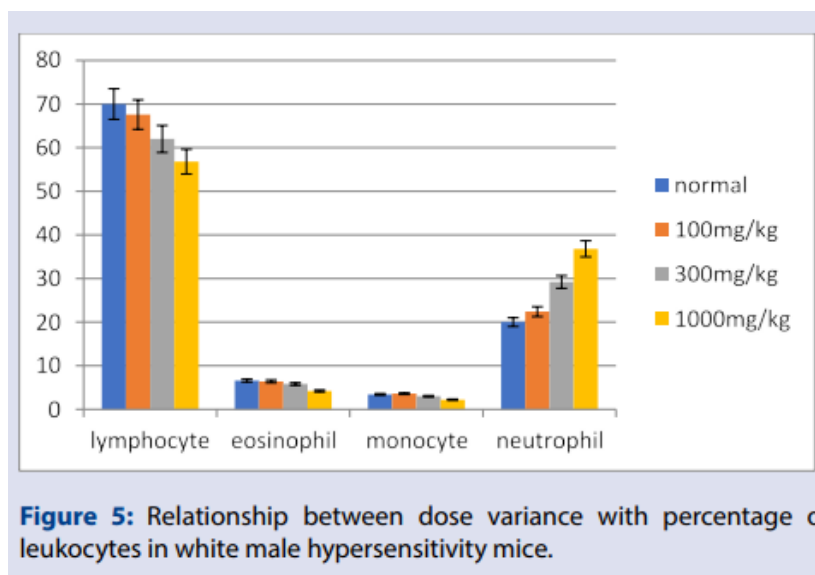


Table 1. Total of leukocyte cells in white male mice's blood after kincung flower (*Etlintera elatior* (Jack) R.M.Sm.) extract given for six days.

Group	Total of leukocytes ($\times 10^3/\mu\text{L}$)					Mean $\pm$ SD
	I	II	III	IV	V	
I. Control group	4.05	3.15	3.8	3.4	3.6	3.6 $\pm$ 0.35
II. 100 mg/kg	3.65	4.3	3.95	4.1	3.75	3.95 $\pm$ 0.26
III. 300 mg/kg	4.3	4.9	4.55	5.3	4.6	4.73 $\pm$ 0.38
IV. 1000 mg/kg	6.05	5.9	5.75	5.25	7.1	6.01 $\pm$ 0.68

*Note: total leukocytes showed a significant increase ($p < 0.05$)

The results of the one-way ANOVA analysis showed that monocytes were not significantly increased or decreased ($p > 0.05$). Monocytes are the largest leukocytes, and the standard percentage of monocytes in mice ranges between 2-6% of the circulating cell population and their numbers increase in response to infection. Decrease in the number of monocytes at doses of 300 and 1000 mg/kg is estimated because monocytes migrate to tissue or to the location of damage or infection where they then mature into macrophages. Monocytes, along with macrophages and tissue neutrophils are the primary cells involved in first-line defence against pathogenic organisms or foreign cells.

Percentage of basophils in male white hypersensitivity mice showed in Table 3, and the relationship of the percentage of leukocytes administering dose variations showed in Figure 6.

The results of the one-way ANOVA analysis showed a significant decrease in eosinophils and basophils ($p < 0.05$). The number of basophil cells in the blood is deficient, the percentage of healthy basophil cells $< 2\%$ and eosinophil 0-7% of the total differential leukocytes. Decreasing basophils and eosinophils can be used as an

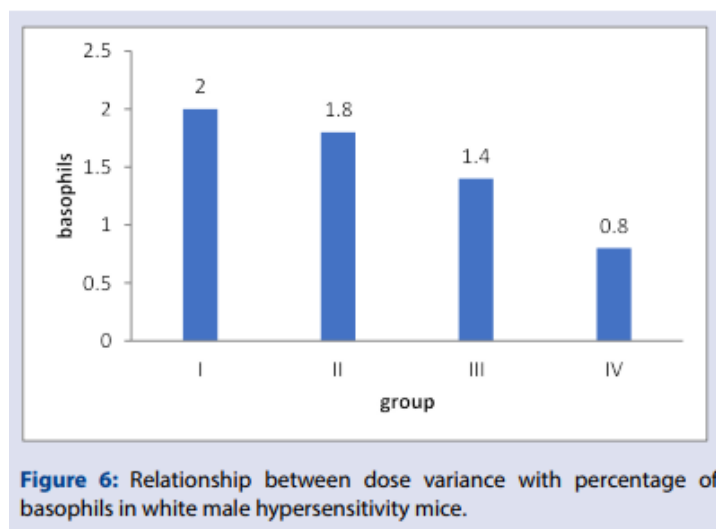
indicator of antihypersensitivity. Basophils or eosinophils will increase during the response to antigens, parasites, and allergies. Basophils are one of the granulocytes involved in the thought process where the antigen enters a second time, and then the antigen is immediately bound by the IgE pair that is on the surface of the basophil cell. Cells will change the degranulation process and release mediators such as histamine, serotonin, prostaglandins, et cetera. The mediator is responsible for the onset of reactions such as itching, redness, oedema, and tissue dysfunction.

Table 2. Percentage of leukocyte cells in white male mice's blood after kincung flower (*Etlingera elatior* (Jack) R.M.Sm.) extract given for six days.

Group	No	Percentage of Leukocyte Cells (%)			
		Lymphocytes	eosinophils	monocytes	neutrophils
Control group	1	70	7	4	19
	2	71	5	2	22
	3	69	7	3	21
	4	67	9	4	20
	5	73	5	4	18
Mean ± SD		70.0±2.23	6.6±1.67	3.4±0.89	20.0±1.58
Doses 100 mg/kg bw	1	71	6	4	19
	2	65	8	5	22
	3	69	7	3	21
	4	68	6	3	23
	5	65	5	3	27
Mean ± SD		67.6 ±2.60	6.4± 1.14	3.6±1.07	22.4±3.39
Doses 300 mg/kg bw	1	63	5	2	30
	2	64	6	3	27
	3	62	5	4	29
	4	60	6	3	31
	5	61	7	3	29
Mean ± SD		62.0 ±1.58	5.8±0.83	3.0±1.03	29.2±1.48
Doses 1000 mg/kg bw	1	51	4	3	42
	2	58	3	2	37
	3	68	4	2	26
	4	51	4	3	42
	5	56	6	1	37
Mean ± SD		56.8±6.97	4.2±1.09	2.2±1.07	36.8±6.53

Table 3. Percentage of basophils in white male mice's blood after kincung flower (*Etlingera elatior* (Jack) R.M.Sm.) extract given for six days.

Group treatment	Mice					%Mean±SD
	I	II	III	IV	V	
I .Control group	2	1	2	3	2	2.0± 0.70
II. 100 mg/kg bw	1	3	2	1	2	1.8±0.83
III. 300 mg/kg bw	1	2	2	1	1	1.4±0.57
IV. 1000 mg/kg bw	1	0	1	1	1	0.8±0.44



In previous studies, it stated that flavonoids could inhibit IL-4 and IL-13 by activation of basophil cells. Routine also stated have an antiallergic activity that affect to mast cell activity mediated by IgE.

3.12 Activity and Capacity Test of Macrophage Peritoneal Cell and Number Leukocyte of Ethanol Extract Purple Sweet Potato Peel *Ipomoea Batatas* (L.) Lam.

Yufri Aldi, Dillasamola D, Triwike Florina, and Friardi

Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences

Abstract

Purple sweet potato peel *Ipomoea batatas* (L.) Lam have high levels of anthocyanins. Anthocyanins are a powerful antioxidants. This study aims to determine immunostimulatory effect of purple sweet potato peel, the observed parameter is the activity and capacity of peritoneal macrophages, the total number of leukocytes, the percentage of leukocytes and spleen weights relative. This study uses the female white mice which age about 3 month and divided into 4 groups; the control group was given 0.9% NaCl and dose group 10 mg/kgBW, 30 mg/kgBW, and 100 mg/kgBW. Each group was given the test preparation orally for 7 days. On day 8th, calculated the total number of leukocytes and leukocyte percentage, then the mice were injected intra peritoneal *Staphylococcus aureus*. After 1 hour, the liquid of peritoneal was taken, then made preparations smear. The results showed the ethanol extract of purple sweet potato peel have the immunostimulatory effect by increasing the activity and capacity of peritoneal macrophage cells, increasing the total number of leukocytes, and increase the number of neutrophil segment ($P < 0.05$).

Results and Discussion

Test the immune response in terms of activities and capacity of peritoneal macrophages from female white mice that were given the preparation the ethanol extract of purple sweet potato skin orally for 7 days. The dose used is a dose of 10 mg / kgBW, 30 mg / kgBW, and 100 mg / kgBW. Physiological saline was used as control. Then on day 8 of each group in infection with the bacterium *Staphylococcus aureus*. The activity

of macrophage cells and macrophage cell capacity was observed by making a smear preparation peritoneal fluid. Macrophage activity is the ability of macrophage cells were active phagocytosis in phagocytic cells 100, while the capacity is the number of macrophages in the phagocytosis of bacteria within 50 phagocytic cells active. Macrophages are doing phagocytosis can be seen in figure 2.

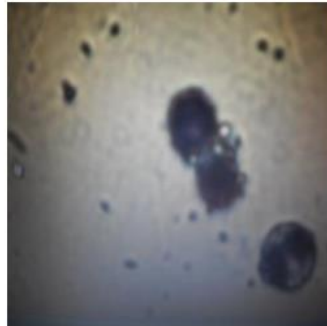


Figure 2. Phagocytosis by macrophage

From the research, the percentage of macrophage activity and the capacity of macrophages dose groups, higher compared to the control. Statistical test results seen significant differences between the dose groups with control groups. The percentage of each dose group of the Duncan post hoc test results are significantly different. The higher the dose, higher the percentage of of activity and capacity. That can mean the ethanol extract of purple sweet potato peel dose of 100 mg/kgBW is the most effective dose in increasing capacities and activities of macrophages.

In the calculation of leukocytes by blood smear method using Giemsa solution as a dye, seemed cell neutrophils, eosinophils, monocytes, neutrophils cells and lymphocytes segment. While basophils alkaline cells can not be observed because these cells soluble in dye Giemsa. The percentage of blood leukocyte cell component female white mice after ethanol extract of purple sweet potato peel can be seen in Figure 4.

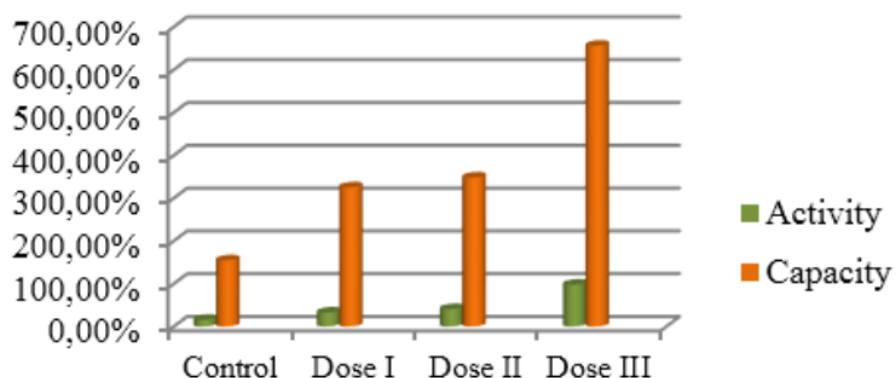


Figure 4. Graphic of activity and capacity of macrophage

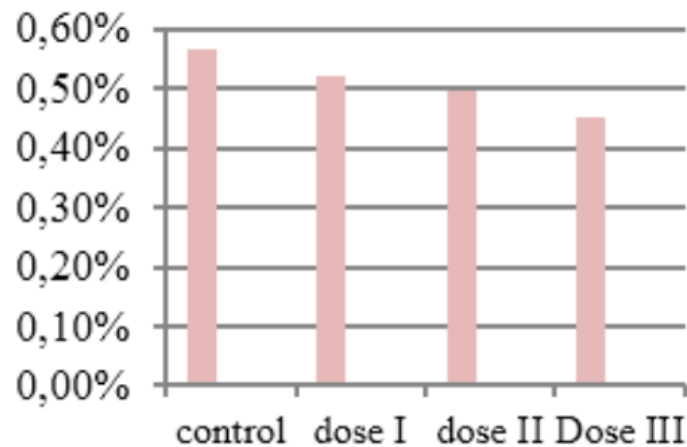


Figure 5. Graphic of relative spleen weight

From the results the statistics by using one-way analysis of variance, it appears that the effects of different doses and the control ($P > 0.05$) for neutrophil segments. As for monocytes, neutrophils rod, and eosinophils although was not significant different, but see an increase with increasing the dose. For lymphocyte cell numbers the high dosage level, the smaller the percentage.

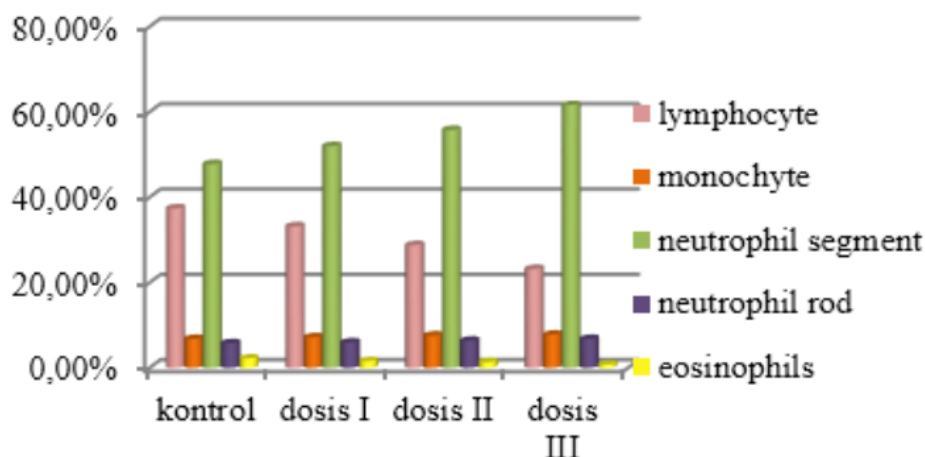


Figure 6. Graphic of leukocyte cell persentage

In the calculation of total leukocytes, the higher the dose given the increasing number of female white mice leukocytes cells. This increase is still in the normal range (Figure 5). The total number of leukocytes in the upper limit of normal showed the immune system produces sufficient total number of leukocytes in the blood circulation to fight the infection. Increasing the number of total leukocytes showed the ability of the immune system to fight infection or foreign substances. Leukocytes is in natural immune system protects the body from the invasion of microorganisms.

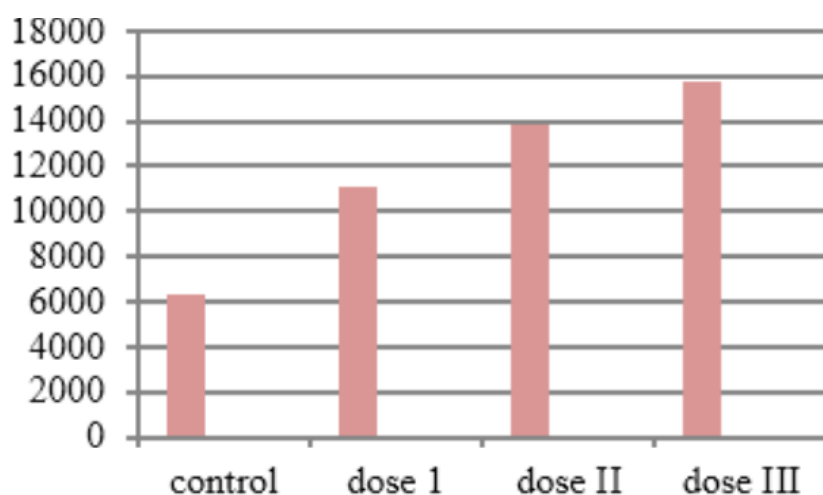


Figure 7. Graphic of Total number of leukocytes

Tests on the relatively spleen weight, because the spleen is the organ that produces lymphocytes, it is estimated that more work in producing spleen lymphocyte cells can enlarge the size of the spleen. The results of the study illustrate that dose group had an average weight of the spleen relatively small compared to the control group. The higher the dose the smaller the relatively spleen weight. Accordingly, the use of the ethanol extract of purple sweet potato peel does not give effect to the relative weights of spleen and can be associated with the average number of lymphocytes. Statistical testing, the relative weights of spleen-dose group 10 mg / kgBW and 30 mg / kgBW and controls did not differ significantly. But a dose of 100 mg / kgBW differ significantly.

3.13 The Effect of Coriander Ethanol Extract (*Coriandrum sativum* L.) Against Phagocytosis Activity and Capacity of the Macrophage Cells and the Percentage of Leukocyte Cells in White Male Mice

Dwisari Dillasamola*, Yufri Aldi, Marselani Kolobinti

Pharmacognosy Journal, Vol 11, Issue 6, Nov-Dec, 2019

Abstract

Coriander has long been used by humans as a traditional drug and to enhances the taste of foods. This study aims to know the effects of coriander ethanol extract against phagocytosis activity and capacity of the macrophage cells and the percentage of leukocytes. The test animals used were white male mice which divided into 4 groups and each group consists of 5 mice. The first group (control) was given with 0.5% Na CMC suspension. The second, the third, and the fourth groups were given with coriander extract each with doses of 100 mg/kg, 140 mg/kg and 200 mg/kg orally for 7 days long. On the 8th day, the mice were induced by *Staphylococcus aureus* to help their immune system. The results showed that the administration of coriander extract at doses of 100, 140 and 200 mg/kg can increase the phagocytic activity of macrophages by 44.6%; 54.2%; and 60.2% each, while the phagocytic capacity replaces the results of 95.8; 104.4; and 126 cells. The total number of leukocytes showed were 5210, 6190, and 7310

/μL blood. In the number of leukocyte cells, the amount of coriander extract can reduce the number of neutrophil and monocyte cell segments. The conclusion of this study regarding coriander ethanol extract at doses of 100, 140 and 200 mg/kg can increase phagocytosis activity and capacity of the macrophage cells and the total leukocyte cell counts in male white mice.

Results and Discussion

The phagocytosis process of macrophage cells can be seen in Figures 1 and 2. The results that were obtained from the calculation of phagocytic activity of macrophage cells after the administration of coriander ethanol extract was each 41.20% (group I, control); 44.60% (group II, dose of 100 mg/kg); 54.20% (group III, dose of 140 mg/kg); and 60.20% (group IV, dose of 200 mg/kg) in average, which can be seen in Tables 5 and 6. The relationship between 4 groups of doses in white male mice with the percentage of phagocytic activity of macrophage cells can be seen in Figure 3. The results show an increase in the average phagocytic activity of macrophage cells. Based on the statistical analysis of oneway ANOVA, there were significant differences from the four groups ($p < 0.05$). Furthermore, Duncan's continued test analysis was carried out to find out the significant differences between the four groups. Duncan's continued test showed that group I and II had no significant differences, but there were significant differences in groups III and IV.

Calculation results of the phagocytosis capacity of macrophage cells after coriander ethanol extract administration also experienced an increase; group I with 81.40 cells; group II with 91.80 cells; group III 104.40 with cells; and group IV with 126.00 cells which can be seen in Table VI. The relationship between 4 groups of doses of white male mice with the percentage of phagocytic activity of macrophage cells can be seen in Figure 4. The test of ANOVA statistical analysis showed a significant increase ($p < 0.05$). Duncan's continued test showed that between groups II and III there were no significant differences, but there were significant differences between group I and IV. According to previous studies, secondary metabolites contained in extracts such as flavonoids, tannins, triterpenoids, and saponins are effective as immunomodulators and increase phagocytosis activity and capacity of macrophage cells. Flavonoid compounds have the ability to be antiinflammatory and improve the immune system.

Table 1: Organoleptic observation of coriander ethanol extract.

Organoleptic Components	Herbal Pharmacopeia Indonesia	Observation Result
Shape	Thick extract	Thick extract
Color	Brown	Brown
Odor	Specific odor	Specific odor
Taste	Slightly spicy	Slightly spicy

Table 2: Calculation results of the phagocytic activity percentage of macrophage cells in white male mice after given with coriander ethanol extract.

Mice	Phagocytic activity percentage of macrophage cells (%)			
	Control Group	Groups that were given with coriander (<i>Coriandrum sativum</i> L.) ethanol extract suspension		
	Na CMC 0.5%	100 mg/kg	140 mg/kg	200 mg/kg
1	41	43	55	61
2	45	42	54	60
3	41	45	57	56
4	40	43	55	56
5	39	50	50	68
Average	41,200	44,600	54,200	60,200
SD	2,280	3,209	2,588	4,919

Table 3: One-way ANOVA test results on phagocytosis activity of macrophage cells in white male mice after the administration of coriander ethanol extract.

	sig
Between Groups	0,000
In Groups	
Total	

Table 4: Duncan's continued test results on phagocytic activity of macrophage cells in white male mice after given by coriander ethanol extract.

Group	N	Subset		
		1	2	3
I	5	41,200		
II	5	44,600		
III	5		54,200	
IV	5			60,200
Sig		0,134	1,000	1,000

Table 5: Calculation results of phagocytosis capacity of macrophage cells in white male mice after given with coriander fruit ethanol extract.

Mice	Phagocytosis capacity of macrophage cells			
	Control Group	Groups that were given with coriander (<i>Coriandrum sativum</i> L.) ethanol extract suspension		
	Na CMC 0.5%	100 mg/kg	140 mg/kg	200 mg/kg
1	87	90	102	127
2	79	97	89	125
3	86	94	116	121
4	90	96	107	127
5	65	102	108	130
Average	81,400	95,800	104,400	126,000
SD	10,015	4,382	9,965	3,317

Table 6: One-way ANOVA test results on phagocytosis capacity of white male mice macrophage cells after the administration of coriander ethanol extract.

	sig
Between Groups	0,000
In Groups	
Total	

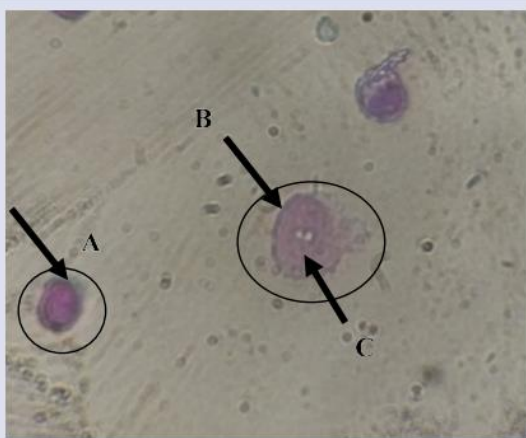


Figure 2: Peritoneal macrophage cells of white male mice observation under a microscope with 1000x magnification.
Notes: A = Macrophage; B = Active macrophage; C = *Staphylococcus aureus* bacteria

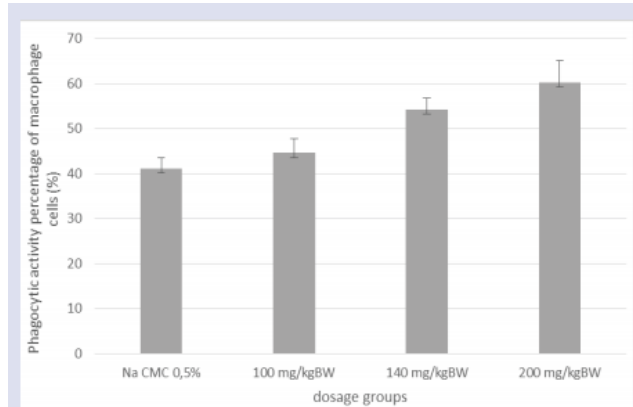


Figure 3: A graphic of relationship between phagocytic activity of macrophage cells with the group of mice after given with coriander ethanol extract. From the graph, an increase in each dosage groups was obtained with with an optimum dosage of 200 mg/kgBW.

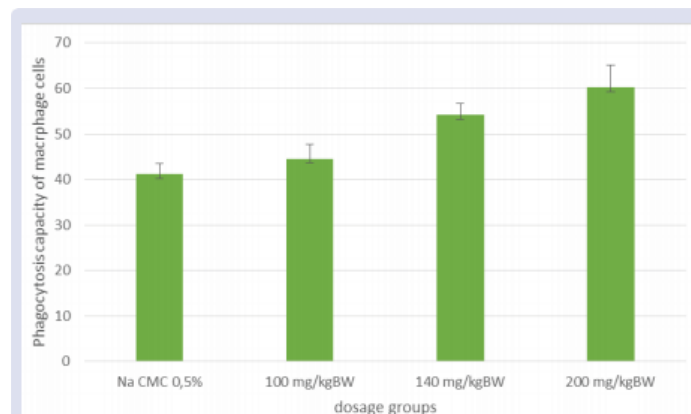


Figure 4: A graphic of relationship between phagocytosis capacity of macrophage cells and mice group after the administration of coriander ethanol extract. From the graph, an increase in each dosage groups was obtained with with an optimum dosage of 200 mg/kgBW.



Figure 5: White male mice's leukocyte cells observed with hemocytometer at 400x magnification.

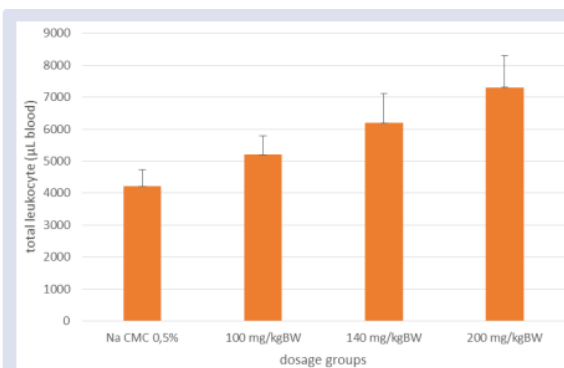
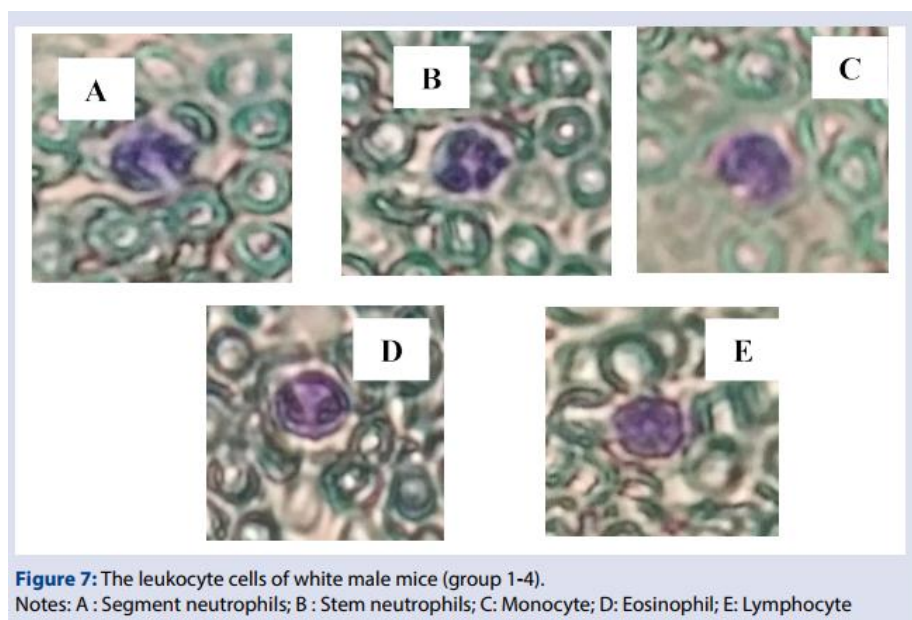


Figure 6: A graphic of relationship between total leukocyte cells and the groups of mice after given with coriander ethanol extract. From the graph, an increase in each dosage groups was obtained with with an optimum dosage of 200 mg/kgBW.

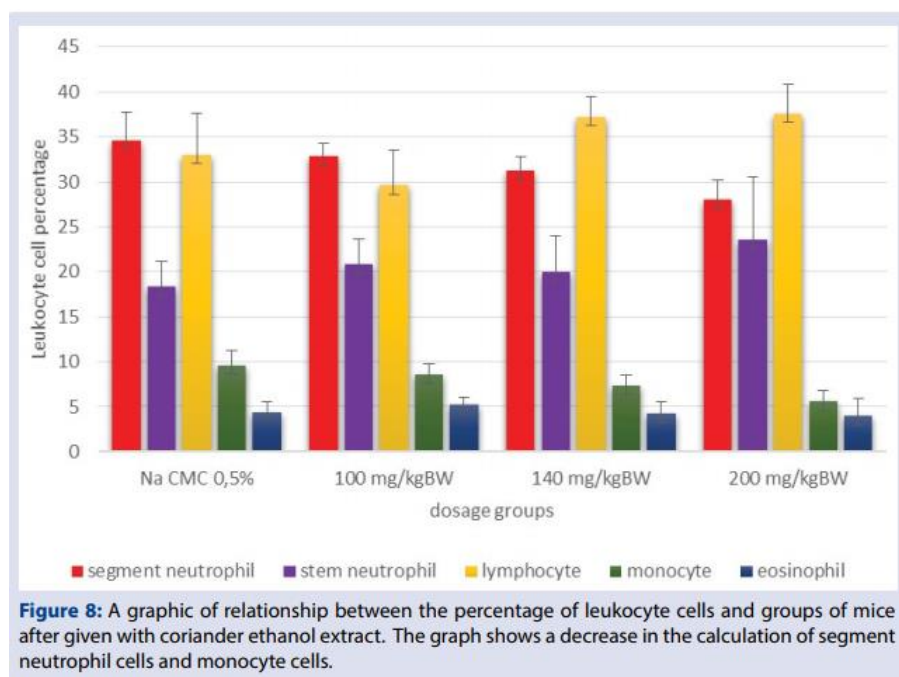
Based on the calculation results that were obtained, an increase was found in total leukocyte cells from the four groups. The highest leukocyte cells increase was found at a dose of 200 mg/kg, namely 7,310 /µL of blood which can be seen in Table VII. The relationship between the 4 groups doses of white male mice with the total number of

leukocyte cells can be seen in Figures 5 and 6. The one-way ANOVA statistical test showed that there were significant differences between the four groups ($p < 0.05$). Duncan's continued test analysis shows that there are subset 1 in group I and II which means there are no significant differences between the two groups, but there are significant differences in groups III and IV. According to previous studies, certain chemical compounds in plant extracts can stimulate leukocyte production and function as an immune booster in the body.



The calculation results of leukocyte cells observation can be seen in Table V. The relationship between 4 groups of doses in white male mice and leukocyte cells can be seen in Figures 7 and 8. One-way ANOVA test results and Duncan's continued test showed that in eosinophil cells, lymphocytes, and stem neutrophils were not present a significant difference ($p > 0.05$). In one-way ANOVA analysis, segment neutrophils showed significant differences ($p < 0.05$). Duncan's continued test results showed that there were no significant differences as well in the group I and II as well as in group II and III. Significant differences exist between the first three groups with group IV. The calculation results show that segment neutrophils has decreased. The decrease is suspected because the phagocytosis process which has more role is macrophages or because of the increase in chemotaxis factors resulting in an increase in phagocytosis. The results of the one-way ANOVA test for monocyte cells showed a significant difference ($p < 0.05$). Duncan's continued test showed that there were no significant differences in the group I and II as well as in group II and III. Significant differences exist between the first three groups with group IV. The calculation result of monocyte

cells showed a decrease. This is presumably because of monocyte cells differentiated into macrophages and settled on the tissue.



The results of the research that have been carried out show that the ethanol extract of coriander can increase the phagocytosis activity and capacity of macrophage cells and the percentage of leukocyte cells in white male mice with an optimum dose of 200 mg/kg. This happens in accordance with the chemical compounds contained in coriander fruit, flavonoids, which play a role as immunomodulators. The content of flavonoids, according to existing research, has the potential as an antioxidant for tumour growth. It can increase the immune response and work against lymphokines produced by T cells so that it will stimulate phagocytic cells to respond for phagocytosis. Previous studies have also shown that *Coriandrum sativum* not only acts as an additive in food but also can enhance immune responses (immunomodulators) so it's a good use for inducing various levels of disease resistance.

Table 7: Duncan's continued test results on phagocytosis capacity of macrophage cells in white male mice after given with coriander ethanol extract.

Group	N	Subset		
		1	2	3
I	5	81,400		
II	5		95,800	
III	5		104,400	
IV	5			126,00
Sig		0,100	0,092	1,000

Table 8: The calculation results of the total number of leukocyte cells in white male mice after the administration of coriander ethanol extract.

Mice	Total Leukocytes (/μL blood)			
	Control Group	Groups that were given with coriander (<i>Coriandrum sativum</i> L.) ethanol extract suspension		
	Na CMC 0.5%	100 mg/kg	140 mg/kg	200 mg/kg
1	4.850	4.750	5.250	8.400
2	4.600	4.500	7.300	7.400
3	3.550	5.700	7.050	6.350
4	3.850	5.250	5.700	6.250
5	4.200	5.850	5.650	8.150
Average	4.210	5.210	6.190	7.310
SD	530,801	584,594	920,190	993,353

Table 9: One-way ANOVA test results of total leukocyte cells in white male mice after given with coriander ethanol extract.

	sig
Between Groups	0,000
In Groups	
Total	

Table 10: Duncan's continued test results on total leukocyte cells after the white male mice given by coriander fruit ethanol extract.

Group	N	Subset		
		1	2	3
I	5	4210,000		
II	5	5210,000		
III	5		6190,000	
IV	5			7310,000
Sig		0,061	0,066	1,000

3.14 Immunomodulatory Effect Test from Moringa Leaf Extract (*Moringa oleifera* L.) with Carbon Clearance Method in Male White Mice

Dwisari Dillasamola, Yufri Aldi, Mutia Fakhri, Skunda Diliarosta, Biomechy Oktomalia P, Noverial

Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research

Abstract

Objective: *Moringa oleifera* leaf has chemical compounds that have been utilized by the community to cure health problems. One of its activities is an immunomodulator. The aim of this study is to determine the immunomodulatory effect from *M. oleifera* leaf using a carbon clearance method to measure the activity of phagocytic cells in exterminating pathogens that enter the body then followed by calculating the total leukocyte cells. The parameters of this test are phagocytosis index and total leukocyte cells. **Methods:** Twenty white male mice were divided into four groups. Group I (vehicle control) was treated with sodium-carboxymethyl cellulose (NaCMC) 0.5%, Group II-IV were treated by *M. oleifera* leaf extract given to the mice for six consecutive days orally

in doses of 10, 30, 100 mg/kg. On the seventh day, white male mice were given with intravenous carbon suspension through their tails. The value of phagocytosis index ($PI > 1$) indicated immunostimulant activity. The data were analyzed by using one-way analysis of variance and Duncan test. **Results:** The analysis of variance results showed that the groups treated with *Moringa* leaf extract are significantly different with the vehicle groups (NaCMC 0.5%) ($p < 0.05$). Increased doses of *Moringa* leaf extract are effective to improve the immunomodulator effect. It was included that *Moringa* leaf extract had the immunomodulatory capabilities as an immunostimulant. **Conclusion:** Immunomodulatory effect test of *M. oleifera* Lam. Based on the result of the research about immunomodulatory effect test from *Moringa* leaf extract (*Moringa Oleifera* L.) with carbon clearance method in male white mice, it can be concluded that *Moringa* leaf extract (*Moringa Oleifera* L.) has effect as an Immunomodulator.

Results and Discussion

Immunomodulatory effect test of *M. oleifera* L extract was done using carbon clearance method. This method is testing the ability of phagocytosis using carbon as an intravenously administered marker. Carbon clearance was seen every 3rd, 6th, 9th, 12th, and 15th min. Carbon levels in the blood will decreased in time, due to phagocytic events by leukocyte cells mainly by monocyte cells, neutrophils, eosinophils, and macrophages. The use of carbon as a marker has an advantage where the particle size is smaller and more stable, so the carbon does not cause blockage of blood vessels and lungs. Carbon also has a characteristic as an antigen that is alienation, and under normal circumstances, carbon is not present in the body. The carbon used is Chinese ink that had been dried. The result of the determination of Chinese ink carbon content used is 13.31%.

The carbon suspension was prepared by weighing 1.6 g of dried Chinese ink, then suspended with tween 80.1% (w/v) and physiologically added with NaCl 0.9% to obtain 64 mg/mL concentration (6.4%). The use of physiological NaCl in carbon determination aims to make the condition of the carbon suspension dosage (Chinese ink) is as the same as the animal body condition, because the carbon as the foreign matter will be phagocytosed by leucocyte cells, especially neutrophils and macrophages, which present in the body of test animals. Immunomodulatory effect test by Carbon Clearance method was seen through standard curve between carbon content in blood and absorbance value. The absorbance value was measured using a UV-visible spectrophotometer (Shimadzu®) at a wavelength of 650 nm. Wavelength 650 nm is an area of carbon uptake. The result of the determination of carbon standard curve was obtained by linear regression equation between absorption and carbon concentration that is $y = 0.0049x + 0.0818$ with $R^2 = 0.9936$.

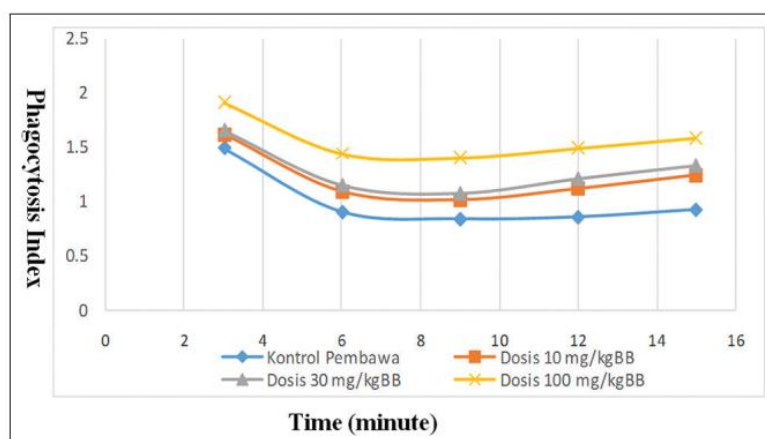


Fig. 1: Graphic of time against phagocytosis index value from mice's blood with variant of doses with Kelor leaf (*Moringa oleifera* L.) extract given for 6 days

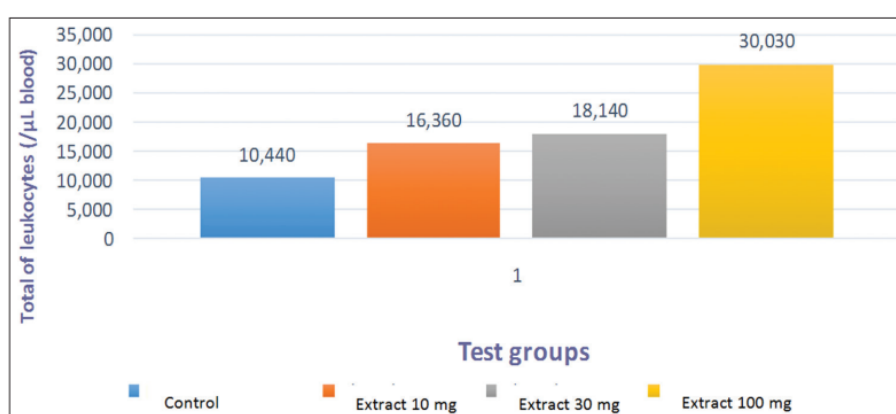


Fig. 2: Comparison graphic of the total leukocytes in white male mice's blood after kelor leaf (*Moringa oleifera* L.) extract given for 6 days with the doses of 10 mg, 30 mg, 100 mg

Table 1: Preparation of test animals

Preparation of animal			
Group of animal test	Dose	Route of administration	Duration
Vehicle control	Na CMC 0,5%	Orally	6 days
Extract Group 1	10 mg/kg	Orally	6 days
Extract Group II	Extract of kelor's leaf 30 mg/kg	Orally	6 days
Extract Group III	Extract of kelor's leaf 100 mg/kg	Orally	6 days

NaCMC: Sodium-carboxymethyl cellulose

Table 2: Phagocytosis index value from mice's blood after *M. oleifera* L. extract given for 6 days

Phagocytic index				
Time (min)	Vehicle control	Extract group		
	Na-CMC 0.5%	Dose 10 mg/kg	Dose 30 mg/kg	Dose 100 mg/kg
3	1.486	1.615	1.657	1.907
6	0.901	1.088	1.150	1.434
9	0.836	1.011	1.074	1.396
12	0.854	1.114	1.209	1.483
15	0.921	1.238	1.332	1.580
Avg.	1	1.213	1.284	1.560
SD	0.274	0.238	0.228	0.205

NaCMC: Sodium-carboxymethyl cellulose, *M. oleifera*: *Moringa oleifera*

Immunomodulatory results of *M. oleifera* leaf extract (*M. oleifera* L.) were seen at the decreasing carbon absorbance in every minute in male white mouse blood which been given with the test preparation for six consecutive days. Reduced levels of carbon in the blood of test animals in every minute of testing indicated that the carbon

concentration in the blood of mice is getting lower. This also indicated an increased phagocytic activity of carbon in each group of extracts.

The result of absorbance value which had been obtained can be calculated as a value of phagocytosis constant from each group of the animal test. The phagocytic constant is one of the parameters that indicate the rate of phagocytosis in immunomodulatory testing by carbon clearance method, the greater the value of the phagocytic constant, the greater the rate of carbon clearance.

The mean value of phagocytic constants obtained based on the calculation result of the absorbance value in the control group of the carrier is 0.027. Meanwhile, the extract group with a dose of 10 mg/kg is 0.033, the group with a dose of 30 mg/kg is 0.0357, and the group with a dose of 100 mg/kg is 0.043.

Table 3: Total of leukocyte cells in white male mice's blood after Kelor leaf (*M. oleifera* L.) extract given for 6 days

No.	Total of leukocytes (µL blood)			
	Control	Extract group of Kelor leaf (<i>M. oleifera</i> L.)		
	Na-CMC 0.5%	10 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg
1	6.900	13.550	13.400	24.450
2	7.100	15.050	15.000	25.550
3	12.300	17.300	22.150	34.200
4	13.500	17.550	17.900	33.050
5	12.400	18.350	22.250	32.900
Mean	10.440	16.360	18.140	30.030
SD	3176,16	2043,13	4042,18	4635,54

NaCMC: Sodium-carboxymethyl cellulose, *M. oleifera*: *Moringa oleifera*

Table 4: Statistic analysis of total leukocytes in white male mice after Kelor leaf (*M. oleifera* L.) extract given for 6 days

Source of variation	Sum of squares	df	Mean square	F	Sig.
Between groups	1008367375,00	3	336122458,333	25,674	0.000
Within groups	209470000,000	16	13091875,000		
Total	1217837375,000	19			

One way ANOVA statistic analysis result to total white male mouse leucocytes after giving Kelor leaf extract for 6 days. Duncan continued test*, *M. oleifera*: *Moringa oleifera*

The value of the phagocytic index is calculated after the phagocytosis constant value was known. There was an experiment states that if the average index phagocytosis greater than 1 (IF <1), it indicates that the test substance has an immunomodulatory activity which is immunostimulant.

Table 5: Duncan continued test analysis of total leukocytes in white male mice after *Kelor* leaf (*M. oleifera* L.) extract given for 6 days

Groups	N	Subset for alpha=0.05		
		1	2	3
Control	5	10440,00	16360,00	30020,00
Dose of 10 mg/kg	5	1,000	18970,00	1,000
Dose of 30 mg/kg	5		0.271	
Dose of 100 mg/kg	5			
Sig.				

The results of Duncan's advanced test analysis of the total leukocytes of male white mice after giving *kelor* leaf extract for 6 days. *M. oleifera*: *Moringa oleifera*

Based on calculations that had been done and shown in Table 2 and Fig. 1. The average value of phagocytosis index in the control group of the carrier is 1. Meanwhile, the extract group with a dose of 10 mg/kg is 1,213, the group with a dose of 30 mg/kg is 1,284, and the group with a dose of 100 mg/kg is 1,560. The results of phagocytosis index calculation showed that *Moringa* leaf extract has an immunomodulatory activity that is as an immunostimulant.

The calculation of total leukocyte value was found after leaf was extracted for 6 days and shown in Table 3 and Fig. 2. The average total leukocyte in the blood group of mice was 10,440/ μ L of blood, meanwhile the extract group with a given dose of 10 mg/kg was 16,360/ μ L of blood, dose of 30 mg/kg was 18.140/ μ L of blood, and dose of 100 mg/kg was 30,030/ μ L. The increasing total number of leukocytes showed that the immune system improved. To test the real effect of increasing total leukocyte count after giving *Moringa* leaf extract (*M. oleifera* L.), Statistical analysis of variance analysis (ANOVA) one way in Table 4 showed that the total number of leukocytes in each test group were significantly different ($p < 0.05$).

From the results of the analysis using Duncan's advanced test, shown in Table 5, the carrier group has given Na-CMC 0.5% was in subset 1, the dose group of 10 mg/kg and the dose of 30 mg/kg was in subset 2, and the dose group of 100 mg/kg is in a subset of 3. This indicates that *Kelor* leaf's extract given could increase the total number of leukocyte cells in the blood of test animals. Based on the research that had been done and reviewed from several test parameters namely, phagocytosis constant, phagocytosis index, and calculation of total leukocyte count, it can be concluded that *M. oleifera* L. Leaf extract has an immunomodulatory activity that is immunostimulant.

DAFTAR PUSTAKA

- Sudiono J. Sistem Kekebalan Tubuh. Jakarta: EGC; 2014.
- Baratawidjaja KG, Rengganis I. Imunologi Dasar. Edisi 10. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2012.
- Aldi Y, Novelin F, Handayani D. Aktivitas Beberapa Subfraksi Herba Meniran (*Phyllanthus niruri* Linn.) terhadap Aktivitas dan Kapasitas Fagositosis Makrofag. Scientia. 2015;5(2)
- Aldi Y, Rasyadi Y, Handayani D. Aktivitas Imunomodulator dari Ekstrak Etanol Meniran (*Phyllanthus niruri* Linn.) terhadap Ayam Broiler. Jurnal Farmasi Sains dan Klinis. 2014;1(1)
- Rahman H, Aldi Y, Mayanti E. Aktifitas Imunomodulator dan Jumlah Sel Leukosit dari Ekstrak Kulit Buah Naga Merah (*Hylocereus lemairei* (Hook.) Britton & Rose) pada Mencit Putih Jantan. Jurnal Farmasi Higea. 2016;8(1)
- Aldi Y, Oktavia S, Yenni Bs. Uji Efek Immunomodulator dari Ekstrak Daun Manggis (*Garcinia mangostana* L.) dengan Metode *Carbon Clearance* dan Menghitung Jumlah Sel Leukosit pada Mencit Putih Jantan. Jurnal Farmasi Higea. 2016;8(1)
- Aldi Y, Aria M, Erman L. Uji Efek Immunostimulasi Ekstrak Etanol Herba Ciplukan (*Physalis angulata* L.) terhadap Aktivitas dan Kapasitas Fagositosis Sel Makrofag pada Mencit Putih Betina. Scientia. 2014;4(1)
- Aldi Y, Ogiana N, Handayani D. Uji Immunomodulator Beberapa Subfraksi Ekstrak Etil Asetat Meniran (*Phyllanthus niruri* [L]) pada Mencit Putih Jantan dengan Metoda *Carbon Clearance*. Jurnal B-Dent. 2014;1(1)
- Aldi Y, Dewi ON, Uthia R. Uji Immunomodulator dan Jumlah Sel Leukosit dari Ekstrak Daun Kemangi (*Ocimum basilicum* L.) pada Mencit Putih Jantan. Scientia. 2016;6(2)
- Aldi Y, Megaraswita, Dillasamola D. Effect of *Elephantopus Scaber* Linn. Leaf Extract on Mouse Immune System. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 2019;18(10): 2045-2050
- Aldi Y, Purnamasari R, Dillasamola D, Friardi. Test immunomodulatory effects of ethanol extract skin of purple sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) with carbon clearance method and the number of leukocytes. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2016;7(3)
- Aldi Y, Dillasamola S, Yanti GR. Immunomodulator Activity of Ethanol Extract of Tapak Liman Leaves (*Elephantopus scaber* Linn.). Pharmacog J. 2019;11(6)Suppl:1419-27
- Aldi Y, Husni E, Yesika R. Activity of Kincung Flowers (*Etlingera Elatior* (Jack) R.M.Sm.) on Total Leukocytes and Percentage of Leukocytes in Allergic Male White Mice. Pharmacog J. 2020;12(1):44-51

- Aldi Y, Dillasamola D, Florina T, Friardi. Activity and Capacity Test of Macrophage Peritoneal Cell and Number Leukocyte of Ethanol Extract Purple Sweet Potato Peel *Ipomoea Batatas* (L.) Lam. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2016;7(5)
- Dillasamola D, Aldi Y, Kolobinti M. The Effect of Coriander Ethanol Extract (*Coriandrum sativum* L.) Against Phagocytosis Activity and Capacity of the Macrophage Cells and the Percentage of Leukocyte Cells in White Male Mice. Pharmacog J. 2019;11(6):1290-8.
- Dillasamola D, Aldi Y, Fakhri M, Diliarosta S, Oktomalio PB, Noverial. Immunomodulatory Effect Test from Moringa Leaf Extract (*Moringa oleifera* L.) with Carbon Clearance Method in Male White Mice. Asian J Pharm Clin Res. 2018;11(9)

About Authors



Prof. Dr. apt. Yufri Aldi, M. Si

Currently as a lecturer functional positions at the Faculty of Pharmacy, Andalas University. Graduated from Faculty of Pharmacy Andalas University in 1989, then Master Program at Faculty of Pharmacy Andalas University in 1994 and Doctoral Program in Departement Biomedical, Faculty of Medicine, Andalas University in 2013. The research and expertise are in Farmaco-Immunology. Currently working as head of the Department Pharmacy Doctoral Program, Faculty of Pharmacy, Andalas University.



apt. Dwisari Dillasamola, M. Farm

Currently as a lecturer functional positions at the Faculty of Pharmacy, Andalas University. Graduated from Faculty of Pharmacy Andalas University in 2004, then Master Program at Faculty of Pharmacy Andalas University in 2011. The research and expertise are in Farmaco Immunology. Currently working as lecturer of Farmaco-Immunology and Clinical-pharmacy of Faculty of Pharmacy, Andalas University.



Efrian Shafardi, S. Farm

He was a student at the Faculty of Pharmacy, Andalas University and graduated in 2020. He has been involved in research on The Effect of The Kersen Leaf (*Muntingia calabura* L.) Ethanol Extract on The Activity and Capacity of Macrophage Cell Phagocytosis and The Percentage of Leukocyte Cells of Male White Mice.

ISBN 978-623-6703-01-4

