

**AKTIVITAS IMUNOMODULATOR NANOPARTIKEL
KOMBINASI EKSTRAK *Allium sativum*, *Curcuma mangga* DAN
Acorus calamus TERHADAP PROFIL LEUKOSIT DAN SEL
CD4+ *Mus musculus***

SKRIPSI

Oleh:
NUR IZZAH ANALISA
NIM. 16620055



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2020**

**AKTIVITAS IMUNOMODULATOR NANOPARTIKEL KOMBINASI
EKSTRAK *Allium sativum*, *Curcuma mangga* DAN *Acorus calamus*
TERHADAP PROFIL LEUKOSIT DAN SEL CD4+ *Mus musculus***

SKRIPSI

**Oleh:
NUR IZZAH ANALISA
NIM. 16620055**

Diajukan Kepada:

**Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan Dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S. Si)**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2020**

**AKTIVITAS IMUNOMODULATOR NANOPARTIKEL KOMBINASI
EKSTRAK *Allium sativum*, *Curcuma mangga* DAN *Acorus calamus*
TERHADAP PROFIL LEUKOSIT DAN SEL CD4+ *Mus musculus***

SKRIPSI

Oleh:
NUR IZZAH ANALISA
NIM. 16620055

Telah diperiksa dan disetujui untuk diuji
Tanggal 19 November 2020

Pembimbing I



Prof. Dr. drh. Hj. Bayyinatul M., M. Si.
NIP. 19710919 200003 2 001

Pembimbing II



Mujahidin Ahmad, M. Sc.
NIP. 19860512 201903 1 002

Mengetahui,

Ketua Program Studi Biologi



Dr. Evika Sandi Savitri, M. P.
NIP. 19741018 200312 2 002

**AKTIVITAS IMUNOMODULATOR NANOPARTIKEL KOMBINASI
EKSTRAK *Allium sativum*, *Curcuma mangga* DAN *Acorus calamus*
TERHADAP PROFIL LEUKOSIT DAN SEL CD4+ *Mus musculus***

SKRIPSI

Oleh:
NUR IZZAH ANALISA
NIM. 16620055

Telah dipertahankan
di depan Dewan Penguji Skripsi dan dinyatakan diterima sebagai salah satu
persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S. Si)
Tanggal 27 November 2020

Penguji Utama	Dr. Retno Susilowati, M. Si NIP. 19671113 199402 2 001	 (.....)
Ketua Penguji	Dr. Kiptiyah, M. Si NIP. 19731005 200212 2 003	 (.....)
Sekretaris Penguji	Prof. Dr. drh. Hj. Bayyinatul M., M. Si NIP. 19710919 200003 2 001	 (.....)
Anggota Penguji	Mujahidin Ahmad, M. Sc NIP. 19860512 201903 1 002	 (.....)

Mengetahui dan Mengesahkan,

Ketua Program Studi Biologi



Dr. Evika Sandi Savitri, M. P.
NIP. 19741018 200312 2 002

HALAMAN PERSEMBAHAN

Karya yang penuh perjuangan ini saya persembahkan untuk:

- ❖ Allah SWT, yang Maha Segalanya, tak mampu saya mengungkap begitu Rahman dan RahimNya dengan segala keajaiban dan keagunganNya, serta RidhoNya yang menyertai saya sehingga dapat menyelesaikan karya ini
- ❖ Rosululloh SAW, Sang Suri Tauladan ummatnya, dengan sholawatnya, syafaatnya terus mengalir
- ❖ Umi Hj. Artifah Hammar, my support system, sebab doanya yang ajaib dan hebat sehingga anaknya ini mampu melalui semuanya
- ❖ Abah H. M. Arkanuddin Hammar (Alm), yang selalu hadir dalam mimpi untuk mendoakan anaknya, serta saya yakin beliau juga turut mendoakan saya di surgaNya
- ❖ Kakak - kakak saya, H. M. Nurul Fattah dan istri, Hj. Lu'luin Khoiroh dan suami, H. M. Firdaus Analis dan istri, ponakan – ponakan, saudara sepupu, jiddah, ammi, ammah, Atik, Oli dan seluruh keluarga yang tak bisa saya sebutkan namanya satu per satu
- ❖ Ibu Prof. Dr. drh. Hj Bayyinatul Muchtaromah, M. Si, selaku pembimbing biologi yang senantiasa mendengarkan curhatan saya. Semoga ilmu beliau bisa tertularkan ke saya, aamiin
- ❖ Bapak Mujahidin Ahmad, M. Sc, selaku pembimbing agama yang begitu baik, humble dan cerdas sekali, semoga kecerdasan beliau tertularkan ke saya
- ❖ Ibu Fitriyah, M. Si, ibu dosen yang baik hati sekali, dermawan yang senantiasa meluangkan waktu beliau untuk saya curhati dan saya konsuli. Beliau sudah seperti saudara saya sendiri, I never forget your kindness and goodness mom
- ❖ Ibu Dr. Kiptiyah, M. Si dan Ibu Dr. Retno Susilowati, M.Si, selaku penguji skripsi saya yang baik hati, sabar dan selalu memberikan arahan
- ❖ Ibu Nyai Hj. Anis Khoiriyah sekeluarga, Gus H. Zain Muhammad Hakim sekeluarga dan keluarga ndalem lainnya PP. Islamiyah Tanggulangin yang selalu mensupport dzahir dan batin saya
- ❖ Seluruh dosen Biologi UIN Malang yang telah mengajarkan saya dalam berbagai disiplin keilmuan.
- ❖ Teman – teman tim “Subur Kandungan” yang selalu bersama dan kompak dalam keadaan susah maupun sedih dalam menjalani penelitian ini
- ❖ Seluruh teman – teman Biologi angkatan 2016, terutama KB3 Samawa 2016 yang telah kebersamai saya dalam suka maupun duka selama 4 tahun, good luck yaa gengs
- ❖ Teman – teman BIOTABA yang selalu ada saja suprisenya, good luck ya gengss
- ❖ Dan teman – temanku lainnya yang belum sempat aku tulis dalam lembaran ini

Terima Kasih

MOTTO

*“The Winner of Life Is Someone Who
Remains Calm In The Heat And Remains
Sweet On The Bitter”*

إِنِّي وَإِنْ نَزَعَ الْفَوَادُ لِقَائِي # متفأول متفأول متفأول # فإلعرُ قَال
اللَّهُ يَأْتِي بَعْدَهُ # يُسِرُّ وَقَوْلُ اللَّهِ لَا يَتَّحَوَّلُ #

SURAT PERNYATAAN ORISINALITAS PENELITIAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Nur Izzah Analisa
NIM : 16620055
Fakultas/Program Studi : Sains dan Teknologi/ Biologi
Judul Penelitian : Aktivitas Imunomodulator Nanopartikel Kombinasi Ekstrak *Allium sativum*, *Curcuma mangga* dan *Acorus calamus* terhadap Profil Leukosit dan Sel CD4+ *Mus musculus*

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis adalah benar-benar hasil karya sendiri, bukan merupakan hasil pengambil-alihan data dari karya orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah skripsi ini dan telah disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka. Apabila di kemudian hari terbukti atau ditemukan bahwa skripsi ini hasil plagiasi karya orang lain, maka saya bersedia bertanggung jawab dan menerima sanksi sesuai peraturan yang berlaku

Malang, 1 November 2020

Yang Membuat Pernyataan



Nur Izzah Analisa

NIM. 16620055

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan dengan seizing penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

**Aktivitas Imunomodulator Nanopartikel Kombinasi Ekstrak *Allium sativum*,
Curcuma mangga dan *Acorus calamus* terhadap Profil Leukosit dan Sel CD4+
*Mus musculus***

Nur Izzah Analisa, Bayyinatul Muchtaromah dan Mujahidin Ahmad

ABSTRAK

Imunomodulator adalah bahan yang tepat yang digunakan untuk memberikan pengaruh terhadap sistem imun. Imunomodulator dapat bertindak sebagai imunostimulasi atau immunosupresi terhadap aktivitas sistem imun, baik aktivitas yang terkait respon imun non spesifik atau respon imun spesifik. Respon imun non spesifik adalah respon pertama terhadap antigen yang menyerang, yaitu leukosit. Sedangkan respon imun adaptif memiliki kemampuan secara khusus mengenali antigen dan mengingatnya apabila terserang kembali, yaitu sel CD4+. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas imunomodulator nanopartikel kombinasi ekstrak *Allium sativum*, *Curcuma mangga* dan *Acorus calamus* terhadap profil leukosit dan sel CD4+ *Mus musculus*. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium menggunakan rancangan acak kelompok (RAK) dengan 5 perlakuan dan 6 ulangan. Kelompok perlakuan yaitu K- (Kelompok tanpa perlakuan), P1 (Nanopartikel kombinasi ekstrak dosis 25 mg/kgBB), P2 (Nanopartikel kombinasi ekstrak dosis 50 mg/kgBB), P3 (Jamu subur kandungan dosis 75 mg/kgBB) dan P4 (Klomifen sitrat dosis 0,9 mg/kgBB). Parameter dalam penelitian ini meliputi jumlah total leukosit, jenis leukosit dan jumlah relatif sel CD4+. Data yang memenuhi asumsi parametrik seperti data terdistribusi normal dan homogen akan dianalisis menggunakan uji *One Way ANOVA* dan jika terdapat perbedaan yang signifikan, maka dilanjutkan dengan uji *Duncan*. Sedangkan untuk data yang tidak memenuhi asumsi parametrik, maka dilakukan analisis non parametrik. Hasil uji statistik menunjukkan bahwa pemberian nanopartikel kombinasi ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* dosis 25 mg/kgBB dan 50 mg/kgBB mampu menekan reaksi inflamasi dengan menurunkan jumlah total leukosit. Namun, pada hitung jenis leukosit mampu mempertahankan persentase jenis leukosit neutrofil, basofil dan eosinofil dalam kondisi normal. Pada dosis 50 mg/kgBB menurunkan persentase limfosit. Sedangkan pada monosit, semua rentang dosis mampu meningkatkan jumlahnya. Hasil statistik jumlah relatif sel CD4+ pada dosis 25 mg/kgBB menunjukkan efek imunostimulan dengan meningkatkan kadar sel CD4+.

Kata kunci: Imunomodulator, Nanopartikel, *Allium sativum*, *Curcuma mangga*, *Acorus calamus*, Leukosit, Sel CD4+.

Immunomodulatory Activity of Extracts Combination Nanoparticle of *Allium sativum*, *Curcuma mangga* and *Acorus calamus* on Leukocyte Profile and CD4 + Cell of *Mus musculus*

Nur Izzah Analisa, Bayyinatul Muchtaromah dan Mujahidin Ahmad

ABSTRACT

An immunomodulator is a substance used to influence on the immune system. Immunomodulator can act as immunostimulant or immunosuppressant against immune system activity, either activity that is related to non-specific immune responses or specific immune responses. The non-specific immune response is the first response against attacking antigen, namely leukocytes. The specific immune response has the special ability to recognize antigens, particularly when they are attacked again, namely CD4+ cell. This research aims to determine the immunomodulatory activity of the extracts combination nanoparticle of *Allium sativum*, *Curcuma mangga* and *Acorus calamus* on the leukocytes profile and CD4+ cell of *Mus musculus*. This research is experimental laboratory research using a randomized block design (RBD) with 5 treatments and 6 repetitions. The treatment groups were K- (untreated group), P1 (extracts combination nanoparticle dose 25 mg/kgBW), P2 (extracts combination nanoparticle dose 50 mg/kgBW), P3 (subur kandungan herbal medicine dose 75 mg/kgBW) and P4 (Clomiphene citrate dose 0.9 mg/kgBW). The parameters of this research included the total number of leukocytes, types of leukocytes and the relative number of CD4+ cells. Data that fulfills the parametric assumptions, such as normally distributed data and homogeneous data will be examined using the *One Way Anova* test, and, if there is a significant difference, it will be processed with the *Duncan* test. The data that does not fulfill the parametric assumptions, a non-parametric analysis will be performed. The statistic test results showed that administration of the extracts combination nanoparticle of *Allium sativum sativum*, *Curcuma mangga* and *Acorus calamus* at doses of 25 mg/kgBW and 50 mg/kgBW could suppress the inflammatory reaction by decreasing the total number of leukocytes. However, the types of leukocytes count can maintain the percentage of neutrophil, basophil and eosinophil types in normal conditions. At a dose of 50 mg/kgBW could decreases the percentage of lymphocytes. Whereas for monocytes, all dosage ranges can increase its percentage. The statistic test results of the relative number of CD4+ cell at a dose of 25 mg/kgBW showed an immunostimulant effect by increasing the levels of CD4+ cell.

Keywords: Immunomodulator, Nanoparticles, *Allium sativum*, *Curcuma mangga*, *Acorus calamus*, Leukocytes, CD4 + Cells.

أنشطة المعدلات المناعية الجسيمات نانوية إضافية أليوم ساتفوم (*Allium sativum*)
والكركم المانجو (*Curcuma mangga*) ووالأكروس الكلاموس (*Acorus calamus*)
نحو الملف الكريات البيض والخلية ج د ٤ (CD4) + في الفئران

نور عزة أناليسا و بينة المحترمة و مجاهدين أحمد

الملخص

المعدلات المناعية هي المادة المناسبة المستخدمة ليؤثر نظام المناعة. يمكن من المعدلات كالتحفيز المناعة نحو أنشطة نظام المناعة، إما الأنشطة التي تتعلق بالإجابة المناعة المخصصة وغير مخصصة. استجابة المناعة غير المخصصة هي الاستجابة الأولى نحو عجوم مولد المضاد هي الكريات البيض. وأما استجابة الحصانة التكيفية لها القدرة الخاصة لمعرفة مولد المضاد وذكرها متى جاء الهجوم للمرة الأخرى، هي ج د ٤ (CD4) +. الأهداف من هذا البحث لمعرفة أنشطة المعدلات المناعية الجسيمات المزيج والإضافية أليوم ساتفوم والكركم المانجو ووالأكروس الكلاموس نحو الملف الكريات البيض والخلية ج د ٤ (CD4) + في الفئران. النوع من هذا البحث هي البحث التجريبي المعملية باستخدام المشروع الفرقة العشوائي بخمس المعاملة وست الاختبار. الفرقة المعاملة هي ك- (الفرقة بلا المعاملة)، ف ١ (مستخلص مزيج الجسيمات النانوية بالجرعة خمس وعشرين ملغ\كيلوغرام)، ف ٢ (مستخلص مزيج الجسيمات النانوية بالجرعة خمسين ملغ\كيلوغرام)، ف ٣ (الأعشاب لخصوبة الرحم بالجرعة خمس وسبعين ملغ\كيلوغرام) وف ٤ (السترات الكلوميدين بالجرعة سقر فصل تسعة ملغ\كيلوغرام). المعامل أو المقياس في هذا البحث تحتوي من مجموعة الكريات البيض ونوع الكريات البيض ومجموعة ج د ٤ (CD4) + نسبيا. البيانات التي توافي الافتراضات البارامترية، مثل البيانات الموزعت الطبيعي المتجانس وتحليلها باختبار اتجاه واحد أنوفا وإن تختلف بشكل كبير فتستمرها باختبار دنكان . ولليانات التي لم تتم شروط الافتراضات فله عمل التحليل غير معلمية. تظهر نتائج الاختبار الإحصائي بأن اعطاء مستخلص مزيج الجسيمات النانوية أليوم ساتفوم والكركم المانجو ووالأكروس الكلاموس الجرعة خمس وعشرين ملغ\كيلوغرام وخمسين ملغ\كيلوغرام يمكن دفع رد فعل التهابي بإنقاص مجموعة الكريات البيض. بل لحساب نوع الكريات البيض يمكن الحفاظ على النسبة المؤوية نوع الكريات البيض العدلات والخلايا القاعدية والحمضات بشكل طبيعي. بالجرعة خمسين ملغ\كيلوغرام تنحط النسبة للمفاوية. وللحيدات كلها في نطاق الجرعة والقدرة لترقية مجموعتها. تبين نتائج الإحصائي المجموعة النسبي للمناعة ج د ٤ (CD4) + في الجرعة خمس وعشرين ملغ\كيلوغرام وتظهر أثر المنبهات بترقية مقدار المناعة ج د ٤ (CD4) +.

الكلمة الرئيسية : المعدلات و نانوية و أليوم ساتفوم والكركم المانجو ووالأكروس الكلاموس نحو الملف الكريات البيض والخلية ج د ٤ (CD4) +.

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim, Alhamdulillah puji syukur kehadirat Ilahi Rabbi yang telah memberikan nikmat, rahmat dan ridhoNya. Sholawat bermutiarakan salam senantiasa tercurahkan kepada baginda suri tauladan, Nabi Muhammad SAW, karena berkat syafaat sholawatnya-lah naskah skripsi yang berjudul “Aktivitas Imunomodulator Nanopartikel Kombinasi Ekstrak *Allium sativum*, *Curcuma mangga* dan *Acorus calamus* terhadap Profil Leukosit dan Sel CD4+ *Mus musculus*” dapat terselesaikan dengan baik.

Menuntut ilmu tidaklah hanya sampai di sini, melainkan akan berlanjut hingga ke liang lahat. Namun, setetes ilmu yang dimiliki penulis ini semoga dapat memberikan manfaat yang luar biasa dan pahala yang terus mengalir. Penulis juga menyadari bahwa mustahil skripsi ini selesai tanpa bantuan baik moriil, materiil bahkan spiritual dari pihak lain. Oleh karena itu penulis mengucapkan berjuta terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. H. Mudjia Raharjo, M.Si dan Prof. Dr. H. Abd. Haris, M.Ag, selaku rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang menjabat selama penulis mengenyam pendidikan di kampus ini.
2. Dr. Sri Harini, M.Si, selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Dr. Evika Sandi Savitri, M.P. selaku Ketua Program Studi Biologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Prof. Dr. drh. Hj. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si, selaku dosen pembimbing skripsi, sekaligus orang tua yang penuh dengan kasih sayang, kesabaran dan kepeduliannya dalam memberikan waktu luang, bimbingan, arahan, doa, motivasi dan materi untuk penulis sehingga skripsi ini terselesaikan dengan sempurna.
5. Mujahidin Ahmad, M.Sc, selaku dosen pembimbing agama yang penuh dengan kesabaran memberikan bimbingan dan arahan tentang integrasi sains dan Al-Quran yang berkaitan dengan skripsi ini.

6. Dr. Hj. Retno Susilowati, M.Si dan Dr. Kiptiyah, M.Si, selaku dosen penguji sekaligus sebagai orang tua yang telah memberikan ilmu, arahan, dan saran dalam skripsi ini.
7. Dr. Hj. Ulfah Utami, selaku dosen wali selama mengenyam pendidikan S1 Biologi UIN Malang dan telah mendukung akademik penulis.
8. Kedua Orang Tua, H. M. Arkanuddin Hammar dan Hj. Artifah Hammar, ucapan terima kasih tertinggi untuk mereka berdua yang telah melahirkan penulis dan berkat doa hebatnya sehingga skripsi ini terselesaikan.
9. Saudara kandung, H. M. Nurul Fattah, Hj. Lu'luin Khoiroh, H. M. Firdaus Analis, semua kakak ipar, keponakan, nenek dan anggota keluarga lainnya.
10. Fitriyah, M.Si, selaku dosen Biologi yang telah berbagi ilmunya dan selalu perhatian dalam segala hal dengan penulis
11. M. Basyarudin, M.Si, selaku Laboran Fisiologi Hewan Program Studi Biologi yang selalu membantu peneliti selama penelitian ini.
12. Seluruh dosen Biologi, laboran dan staff Program Studi Biologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
13. Rekan-rekan penelitian “Nanopartikel Subur Kandungan“ yang sama-sama berjuang untuk menyelesaikan penelitian ini di tengah pandemi COVID-19.
14. Teman-teman Biologi Gading Putih 2016, khususnya Biologi B (KB3 Samawa'16) yang telah kebersamai, saling bertukar pikiran, canda dan tawa selama kurang lebih 4 tahun.
15. Seluruh pihak yang turut membantu dalam penyelesaian penelitian dan skripsi ini.

Dengan demikian, penulis berharap semoga yang ditulis dalam skripsi ini menjadikan kemanfaatan dan keberkahan untuk semua pihak, baik pembaca maupun penulis. *Aamiin Ya Rabbal Alamiin.*

Malang, 1 November 2020

Penulis

DAFTAR ISI

COVER	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN	v
MOTTO	vi
SURAT PERNYATAAN	vii
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	viii
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
المخلص	xi
KATA PENGANTAR	xii
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR GAMBAR	xviii
DAFTAR LAMPIRAN	xx
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.3 Tujuan Penelitian.....	9
1.4 Hipotesis Penelitian.....	10
1.5 Manfaat Penelitian.....	10
1.6 Batasan Masalah.....	10
BAB II KAJIAN PUSTAKA	11
2.1 <i>Allium sativum</i> (Bawang Putih).....	11
2.1.1 Tinjauan Umum Tentang <i>Allium sativum</i>	11
2.1.2 Klasifikasi <i>A. sativum</i>	13
2.1.3 Kandungan Senyawa Kimia <i>A. sativum</i>	13
2.1.4 Khasiat <i>A. sativum</i>	16
2.2 <i>Curcuma mangga</i> (Temu Mangga)	18
2.2.1 Tinjauan Umum <i>Curcuma mangga</i>	18
2.2.2 Klasifikasi <i>C. mangga</i>	20
2.2.3 Kandungan Senyawa Kimia <i>C. mangga</i>	21
2.2.4 Khasiat <i>C. mangga</i>	21
2.3 <i>Acorus calamus</i> (Jeringau)	23
2.3.1 Tinjauan umum <i>Acorus calamus</i>	23
2.3.2 Klasifikasi <i>A. calamus</i>	28
2.3.3 Kandungan Senyawa Kimia <i>A. calamus</i>	28
2.3.4 Khasiat <i>A. calamus</i>	30
2.4 Jamu subur kandugan	31
2.5 Klomifen sitrat.....	33

2.6 Ekstraksi	36
2.6.1 Metode Ekstraksi	38
2.6.2 Pelarut Etanol.....	43
2.7 Nanopartikel	44
2.8 Kitosan.....	48
2.8.1 Nanopartikel Tersalut Kitosan	51
2.9 Mencit (<i>Mus musculus</i>)	52
2.9.1 Klasifikasi Mencit (<i>Mus musculus</i>)	52
2.9.2 Deskripsi Umum Mencit (<i>M. musculus</i>).....	52
2.9.3 Reproduksi <i>M. musculus</i> Betina	55
2.9.4 Siklus Estrus	56
2.10 Siklus Hormonal	60
2.11 Sistem Imun.....	62
2.12 Respon Imun.....	65
2.12.1 Respon Imun Non Spesifik	65
2.12.2 Respon Imun Spesifik.....	66
2.13 Leukosit	69
2.13.1 Neutrofil.....	70
2.13.2 Eosinofil.....	71
2.13.3 Basofil	71
2.13.4 Monosit	72
2.13.5 Limfosit.....	73
2.14 Sel CD4+	75
2.15 Imunomodulator	76
2.15.1 Imunostimulasi.....	77
2.15.2 Imunosupresi.....	78
2.15.3 Imunorestorasi	78
2.16 Mekanisme Imunomodulator <i>A. sativum</i> , <i>C. mangga</i> dan <i>A. calamus</i>	78
2.17 Flowsitometri.....	84
BAB III METODE PENELITIAN	87
3.1 Rancangan Penelitian	87
3.2 Variabel Penelitian	87
3.3 Tempat dan Waktu penelitian.....	87
3.4 Populasi dan Sampel.....	88
3.5 Alat dan Bahan	88
3.5.1 Alat.....	88
3.5.2 Bahan	89
3.6 Prosedur Penelitian.....	89
3.6.1 Persiapan Hewan Coba	89
3.6.2 Pemberian Nanopartikel Kombinasi Ekstrak <i>A. sativum</i> , <i>C. mangga</i> dan <i>A. calamus</i>	90
3.6.3 Penentuan Siklus Estrus.....	92

3.6.4 Perhitungan Jumlah dan Jenis Leukosit.....	92
3.6.5 Analisis Flowsitometri Kadar CD4+	94
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	97
4.1 Aktivitas Imunomodulator Nanopartikel Ekstrak <i>Allium sativum</i> , <i>Curcuma mangga</i> dan <i>Acorus calamus</i> terhadap Profil Leukosit pada Mencit (<i>Mus musculus</i>).....	97
4.2 Aktivitas Imunomodulator Nanopartikel Ekstrak <i>Allium sativum</i> , <i>Curcuma mangga</i> dan <i>Acorus calamus</i> terhadap Sel CD4+ pada Mencit (<i>Mus musculus</i>).....	113
4.3 Kajian Al-Qur'an dan Hadits Mengenai Hasil Penelitian	118
BAB V PENUTUP	122
5.1 Simpulan.....	122
5.2 Saran.....	122
DAFTAR PUSTAKA	124
LAMPIRAN.....	155

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Perubahan sel epitel vagina <i>M. musculus</i> pada saat siklus estrus	59
Tabel 3.1 Gambar dan ciri-ciri leukosit	93
Tabel 4.1 Aktivitas imunomodulator nanopartikel kombinasi ekstrak <i>A. sativum</i> , <i>C. mangga</i> dan <i>A. calamus</i> tersalut kitosan terhadap jumlah total leukosit <i>M. musculus</i>	99
Tabel 4.2 Aktivitas imunomodulator nanopartikel kombinasi ekstrak <i>A. sativum</i> , <i>C. mangga</i> dan <i>A. calamus</i> tersalut kitosan terhadap hitung jenis leukosit <i>M. musculus</i>	102
Tabel 4.3 Aktivitas imunomodulator nanopartikel kombinasi ekstrak <i>A. sativum</i> , <i>C. mangga</i> dan <i>A. calamus</i> tersalut kitosan terhadap jumlah relatif sel CD4+ <i>M. musculus</i>	114

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Umbi <i>A. sativum</i>	13
Gambar 2.2 Biosintesis allicin dari <i>A. sativum</i>	15
Gambar 2.3 Morfologi <i>C. manga</i>	20
Gambar 2.4 Morfologi <i>A. calamus</i>	27
Gambar 2.5 Fitokonstituen <i>A. calamus</i>	29
Gambar 2.6 Jamu subur kandungan Ribkah Jokotole	33
Gambar 2.7 Mekanisme kerja klomifen sitrat	35
Gambar 2.8 Komponen obat klomifen sitrat	36
Gambar 2.9 Percolator	39
Gambar 2.10 Ekstraktor soklet tradisional	40
Gambar 2.11 Mesin UAE.....	42
Gambar 2.12 Metode pembuatan nanopartikel	45
Gambar 2.13 Distribusi obat konvensional vs obat nanopartikel setelah pemberian oral pada manusia.....	48
Gambar 2.14 Struktur kimia kitin dan kitosan	49
Gambar 2.15 Formasi nanopartikel kitosan metode gelasi ionik.....	52
Gambar 2.16 Morfologi mencit	56
Gambar 2.17 Tahap proestrus	57
Gambar 2.18 Tahap estrus	57
Gambar 2.19 Tahap metestrus	58
Gambar 2.20 Tahap diestrus	59
Gambar 2.21 Mekanisme respon imun bawaan dan adaptif	66
Gambar 2.22 Interaksi antigen presenting cell dengan sel T	67
Gambar 2.23 Respon imun seluler dan humoral.....	68
Gambar 2.24 Neutrofil	70
Gambar 2.25 Eosinofil	71
Gambar 2.26 Basofil	72
Gambar 2.27 Monosit.....	72
Gambar 2.28 Limfosit	73
Gambar 2.29 Kluster sel CD4+ dan sitokinnya	76

Gambar 2.30 Skema interaksi flavonid melalui jalur pensinyalan sel	80
Gambar 2.31 Molekul yang terlibat dalam fungsi sel CD4+	81
Gambar 2.32 Proliferasi dan diferensiasi sel T	82
Gambar 2.33 Perkembangan subset Th1, Th2 dan Th17	83
Gambar 2.34 Regulasi sel Th1 dan Th2.....	84
Gambar 2.35 Skema sederhana flowsitometri	86
Gambar 4.1 Grafik rerata jumlah total leukosit <i>M. musculus</i>	99
Gambar 4.2 Grafik rerata hitung jenis leukosit <i>M. musculus</i>	103
Gambar 4.3 Bentuk morfologi jenis leukosit	112
Gambar 4.4 Grafik rerata jumlah relatif sel CD4+ <i>M. musculus</i>	115
Gambar 4.5 Hasil analisis flowsitometri jumlah relatif sel CD4+	115

DAFTAR LAMPIRAN

1. Alur penelitian.....	155
2. Data jumlah total leukosit.....	156
3. Data jumlah hitung jenis neutrofil	156
4. Data jumlah hitung jenis basofil	156
5. Data jumlah hitung jenis eosinofil	157
6. Data jumlah hitung jenis limfosit	157
7. Data jumlah hitung jenis monosit	157
8. Data jumlah relatif sel CD4+.....	158
9. Perhitungan statistik jumlah total leukosit	158
10. Perhitungan statistik jumlah hitung jenis leukosit	160
11. Perhitungan statistik jumlah relatif sel CD4+	164
12. Perhitungan dosis	166
13. Dokumentasi penelitian	168

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Masyarakat di dunia mulai menyadari akan pentingnya menjaga kesehatan (Susanti & Kholisoh, 2018), meskipun menjaga kesehatan adalah pekerjaan yang tidak mudah (Suharjana, 2012). Kesehatan merupakan bagian penting dalam kehidupan. Kesehatan dapat diartikan sebagai keadaan fisik, mental dan sosial yang terhindar dari berbagai penyakit, sehingga aktivitas yang ada di dalamnya dapat berjalan dengan optimal. Kesehatan yang optimal ini dapat dicapai dengan pola hidup yang sehat (Susanti & Kholisoh, 2018).

Pola hidup sehat adalah pola hidup masyarakat yang menerapkan berbagai aspek kesehatan, seperti menjaga kebugaran fisik, mengkonsumsi nutrisi yang cukup, mengelola kebersihan dan kesehatan lingkungan. Pola hidup dapat menentukan kesehatan tubuh dan kualitas hidup seseorang. Masyarakat yang memiliki pola hidup sehat akan melakukan berbagai macam aktivitas (Susanti & Kholisoh, 2018), dengan memperhatikan faktor-faktor yang mempengaruhi kesehatan tubuhnya, seperti lingkungan, perilaku atau pola hidup, pelayanan kesehatan dan genetik. Faktor lingkungan meliputi lingkungan fisik, biologi, sosial, budaya, ekonomi dan lain sebagainya. Faktor perilaku atau gaya hidup meliputi sikap dan perilaku pentingnya menjaga kesehatan, sedangkan faktor genetik meliputi imunitas tubuh dan faktor pelayanan kesehatan meliputi pencegahan, pengobatan serta perawatan (Hapsari, dkk., 2009). Masyarakat yang memperhatikan faktor-faktor tersebut, maka mereka tidak akan mudah terserang penyakit (Susanti & Kholisoh, 2018).

Tubuh yang sehat tidak akan terlepas dari sistem imun yang seimbang. Sistem imun merupakan sistem pertahanan tubuh yang terdiri atas sel-sel imun yang melakukan berbagai interaksi kompleks di dalamnya. Sel-sel imun mampu membedakan antigen yang perlu dimusnahkan dan yang tidak perlu dimusnahkan (Abood, 2017). Sel-sel imun ini tersebar di seluruh tubuh, baik dalam darah,

jaringan epitel, jaringan ikat, sumsum tulang, limpa, timus dan nodus limfe (Mescher, 2012).

Sel-sel imun tersebut memiliki respon terhadap rangsangan sesuai dengan peran dan sifatnya masing-masing (Yasirin, dkk., 2014). Secara umum, sistem imun dibagi menjadi dua, yaitu sistem imun non spesifik dan sistem imun spesifik (Dillasamola, dkk., 2019). Sistem imun non spesifik akan merespon antigen dengan cepat namun tidak terspesialisasi, sehingga kurang efektif dibandingkan dengan sistem imun spesifik. Sistem imun spesifik memiliki kemampuan secara khusus mengenali antigen dan mengingatnya apabila terserang kembali (Romagnani, 2000).

Salah satu sel yang termasuk dalam sistem imun non spesifik adalah leukosit (sel darah putih) (Romagnani, 2000). Leukosit merupakan komponen darah yang memiliki peran penting dalam sistem imun, seperti menjaga keseimbangan sistem imun dan menjadi pelindung pertama tubuh dalam memerangi antigen (Al-Dulaimi, dkk., 2018). Oleh karena itu, analisis struktur leukosit menjadi penting dalam menentukan kondisi suatu individu (Putzu & Ruberto, 2013). Jumlah leukosit dan persentase dari masing-masing jenis leukosit dianggap sebagai komponen kunci dari sistem imun karena sebagai pembangun utama respon imun (Shabbir, dkk., 2016). Leukosit ini terdiri atas dua tipe yaitu granulosit dan agranulosit. Leukosit granulosit meliputi neutrofil, basofil dan eosinofil, sedangkan leukosit agranulosit terdiri atas limfosit dan monosit (Putzu & Ruberto, 2013).

Limfosit merupakan bagian dari sistem imun spesifik. Limfosit terdiri atas dua jenis yaitu sel T dan B (Romagnani, 2000). Limfosit dapat ditemukan di limpa. Limpa memiliki fungsi memfiltrasi darah dan menangkap antigen yang masuk dalam sirkulasi darah, sehingga dengan cepat direspon secara sistemik. (Lydyard, dkk., 2004; Makiyah & Wardhani, 2017; Mitasari, dkk., 2017). Sel T sangat penting dalam pengenalan antigen dan koordinasi respon imun. Sel T memiliki beberapa subtype yang mengkoordinasikan berbagai jenis respons imun, antara lain sel T sitotoksik yang mengandung reseptor CD8+ (*Cluster of Differentiation 8*), yang terlibat dalam pembunuhan secara langsung terhadap sel

yang rusak atau sel yang terinfeksi dan sel T *helper* (Th) yang mengandung reseptor CD4+ (*Cluster of Differentiation 4*) (Romagnani, 2000).

Sel CD4+ merupakan pemeran penting dalam sistem imun spesifik, karena sel ini sebagai perantara untuk subset limfosit lainnya serta berfungsi sebagai efektor secara langsung melalui kontak sel ke sel melalui produksi sitokin dan kemokin (Swain, dkk., 2006). Kemampuan *multi-tasking* tersebut merupakan fakta bahwa populasi sel CD4+ secara fungsional dapat muncul sebagai respon imun, tergantung pada kondisi yang dihadapi (Van Leeuwen, dkk., 2009). Sel CD4+ terbagi menjadi beberapa subtype berdasarkan sitokin yang disekresikannya, umumnya yaitu Th1 (*T helper type 1*) dan Th2 (*T helper type 2*). Th1 merupakan sel CD4+ yang mensekresikan sitokin sebagai respon imun akibat inflamasi, sitokin ini antara lain IL-1, IL-2, IFN γ , TNF α dan lain sebagainya, sedangkan sel CD4+ Th2 lebih mempresentasikan sitokin anti-inflamasi yang meliputi IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 dan lain sebagainya (Chang, 2011).

Respon imun ini dibutuhkan untuk tetap mempertahankan keseimbangan dalam tubuh (Kumala, dkk., 2004) dan menjaga tubuh yang sehat dari faktor-faktor yang memicu penyakit (Ibrahim & El-Sayed, 2016). Manusia setiap hari di kelilingi oleh berjuta-juta mikroba patogen yang dapat memasuki tubuhnya dengan berbagai cara dan hampir semua mikroba tersebut dapat dimusnahkan oleh sistem imun tubuh. Namun, terkadang ada patogen yang mampu lolos dari serangan sistem imun tersebut. Hal ini terjadi akibat ketidakseimbangan sistem imun tubuh dalam merespon benda asing (Sudiono, 2014).

Ketidakseimbangan sistem imun dapat menyebabkan kegagalan sel-sel imun dalam menyerang patogen atau ketidakmampuan sel-sel imun mengenali sel diri, sehingga dapat menyebabkan berbagai penyakit (Calder, 2013). Oleh karena itu, agar terhindar dari berbagai macam penyakit yang terkait sistem imun, maka perlu dilakukan pencegahan dini atau pengobatan yang tepat. Hal ini sesuai dengan Hadits Rasulullah Saw yang diriwayatkan oleh Imam Muslim berikut ini:

لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءٌ، فَإِذَا أُصِيبَ دَوَاءُ الدَّاءِ بَرَأَ بِإِذْنِ اللَّهِ.

Artinya: “*Semua penyakit pasti ada obatnya, jika sesuai antara obat dan penyakitnya, maka dengan izin Allah akan sembuh.*” (H.R. Imam Muslim).

Hadits di atas menunjukkan bahwa apabila Allah menurunkan suatu penyakit pada seseorang, maka Allah juga memberikannya obat yang dapat menyembuhkannya. Obat tersebut tentunya diperoleh dengan berusaha, seperti berobat ke dokter atau usaha lainnya, serta penggunaan obat tersebut harus sesuai dengan penyakit yang diderita dengan dosis tertentu pula (Al-Jauziyah, 2000). Sebagaimana ditegaskan pula oleh Nabi Ibrahim As. dalam Al-Qur’an surah Asy-Syu’ara ayat 80 terkait penyembuhan, yang bukan berarti upaya manusia tidak dibutuhkan lagi. Banyak hadits dari Nabi Muhammad Saw. yang telah memerintahkan ummatnya untuk berobat (Shihab, 2002). Pencegahan dan pengobatan terhadap penyakit dapat diupayakan dengan menjaga keseimbangan aktivitas sistem imun. Menjaga keseimbangan aktivitas sistem imun dapat dilakukan dengan mengkonsumsi berbagai macam ramuan herbal yang berkhasiat sebagai imunomodulator (Kumala, dkk., 2004).

Imunomodulator adalah bahan yang tepat yang digunakan untuk memulihkan ketidakseimbangan sistem imun baik non spesifik maupun spesifik (Wahyuni, dkk., 2019). Ada dua jenis imunomodulator tergantung pada pengaruhnya, yaitu imunostimulator dan immunosupresor. Imunostimulator merupakan bahan yang dapat memberikan efek meningkatkan sistem imun baik dalam kondisi sehat maupun defisiensi imun, sedangkan immunosupresor bertindak untuk menekan aktivitas sistem imun yang berlebihan (Saroj, dkk., 2012). Di berbagai belahan dunia, ekstrak tumbuhan telah diselidiki secara luas sebagai imunomodulator, karena di dalamnya terdapat berbagai macam senyawa aktif (Abood, 2017). Adapun imunomodulator yang digunakan pada penelitian ini yaitu jamu subur kandungan yang di dalamnya terdapat berbagai macam komponen tumbuhan obat. Komponen tumbuhan obat yang terdapat pada jamu subur kandungan ini tidak hanya memiliki satu efek biologis sebagai jamu fertilitas, namun juga memiliki efek lain sebagai imunomodulator pada sistem imun tubuh.

Obat tradisional di Indonesia dikenal dengan sebutan jamu (Beers, 2012). Jamu adalah obat herbal tradisional Indonesia yang telah digunakan selama berabad-abad untuk mengobati berbagai penyakit dan menjaga kesehatan agar

tetap baik (Amalia & Aprianingsih, 2017). Berdasarkan perkembangan industri farmasi, jamu terbagi menjadi tiga kelas, yaitu kelas jamu tradisional, kelas jamu berstandar dan kelas jamu fitofarmaka. Jamu tradisional merupakan obat herbal tradisional asli Indonesia yang pembuatannya berdasarkan pengalaman empiris. Jamu berstandar merupakan sediaan obat alami yang telah terbukti aman dari efek farmakologisnya pada studi praklinis dan telah terstandarisasi, sedangkan jamu fitofarmaka merupakan sediaan obat yang terbukti aman dari efek farmakologisnya pada studi praklinis dan klinis serta terstandarisasi (Sholikhah, 2016; Torri, 2013). Jamu mempunyai berbagai macam bentuk dengan berbagai fungsi dan berasal dari berbagai daerah di Indonesia (Satriyati, 2017).

Indonesia adalah negara yang memiliki spesies tumbuhan beragam sekitar 2.500 spesies berpotensi sebagai tumbuhan obat (Elfahmi, dkk., 2014). Sehingga, tumbuhan di Indonesia menjadi peluang besar untuk pengembangan industri farmasi (Sholikhah, 2016). Pemanfaatan tumbuhan sebagai obat ini mendorong kesadaran masyarakat untuk kembali ke alam dan keinginan untuk meninggalkan obat-obatan kimia yang memiliki efek samping (Amrul, dkk., 2019). Sebagaimana firman Allah Swt dalam surah Thaaha (20) ayat 53 sebagai berikut:

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَسَوَّلَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ
مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ أَزْوَاجًا مِّن نَّبَاتٍ شَتَّى ۝٥٣

Artinya: “Yang telah menjadikan bagimu bumi sebagai hamparan dan yang telah menjadikan bagimu itu jalan - jalan, dan menurunkan dari langit air hujan. Maka Kami tumbuhkan dengan air hujan itu berjenis - jenis dari tumbuh - tumbuhan yang bermacam - macam” (Q.S. Thaaha (20): 53).

Kalimat وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ أَزْوَاجًا مِّن نَّبَاتٍ شَتَّى pada ayat di atas mendeskripsikan tentang kekuasaan Allah Swt yang telah menciptakan berbagai macam makhluk hidup seperti tumbuh-tumbuhan. Kata شَتَّى menurut tafsir jalalain memiliki arti beraneka ragam, kata tersebut menjadi kata sifat dari kata sebelumnya (Al-Mahalli & As-Suyuthi, 2008). Sedangkan arti lain menurut tafsir Al-Aisaar adalah kata شَتَّى memiliki arti kekuasaan dan kesempurnaan Allah Swt.

Kekuasaan dan kesempurnaan Allah Swt salah satunya dibuktikan dengan turunnya hujan dari langit dan bukti penciptaan tumbuh-tumbuhan yang ada di muka bumi dengan air hujan (Al-Jazairi, 2008). Berdasarkan pendapat para mufassir tersebut dapat disimpulkan bahwa penciptaan tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam merupakan bagian dari bukti kekuasaan Allah Swt, karena di dalam tumbuh-tumbuhan tersebut terdapat berbagai macam pula manfaat yang diberikan oleh Allah Swt, sehingga membuat hambaNya semakin bertafakkur dan bersyukur. Manfaat tersebut salah satunya sebagai bahan obat tradisional.

Saat ini, terdapat sekitar 70% populasi masyarakat dari Negara berkembang bergantung secara langsung terhadap penggunaan obat tradisional untuk perawatan kesehatan primer mereka (Astutik, dkk., 2019). Di Indonesia, pemanfaatan tumbuhan obat menjadi budaya pengobatan tradisional yang melekat secara turun temurun (Sholikhah, 2016). Salah satu daerah di Indonesia yang masih menanamkan budaya pengobatan tradisional adalah Madura. Jamu dari Madura yang cukup terkenal dari jamu lainnya adalah jamu subur kandungan (Satriyati, 2017).

Berdasarkan pandangan peramu, jamu subur kandungan memiliki banyak khasiat dan efektif untuk mengatasi infertilitas wanita (Susanti, 2016). Pengonsumsi jamu subur kandungan pada umumnya didominasi oleh wanita dengan persentase 61,87 % (Savitri, 2015), karena wanita lebih rentan terserang penyakit yang terkait imunitas akibat faktor hormonalnya yang lebih kompleks daripada pria (Ruggieri, dkk., 2016; Whitacre, dkk., 1999) dan jumlah komponen leukositnya yang lebih rendah (Weiss & Wardrop, 2010). Sebagian besar dengan persentase 95,60% pengonsumsi jamu menyatakan bahwa jamu mampu meningkatkan daya tahan tubuh (Savitri, 2015). Menurut Whitacre, dkk (1999), tingkat fertilitas wanita ini tidak terlepas dari status imunitas yang juga melibatkan hormon reproduksi seperti esterogen dan progesteron. Hormon-hormon tersebut dalam siklus reproduksi memainkan peran penting dalam menstimulus sel-sel imun. Apabila hormon-hormon tersebut dalam kadar yang rendah, dapat meningkatkan sistem imun yang terkait respon inflamasi, sedangkan dalam kadar yang tinggi dapat menekan sistem imun yang terkait inflamasi.

Jamu subur kandungan yang digunakan dalam penelitian ini merupakan jamu yang diproduksi oleh PT. Ribkah Maryam Jokotole Bangkalan, Madura yang terdiri atas tiga komponen utama yaitu *Allium sativum* (bawang putih), *Curcuma mangga* (temu mangga) dan *Acorus calamus* (jeringau) (Muchtaromah, dkk, 2017). *A. sativum* adalah salah satu sayuran dan tumbuhan obat yang sudah berumur lebih dari 5.000 tahun (Butt, dkk., 2009). *A. sativum* memiliki sifat farmakologis yang jelas, seperti antimikroba (Goncagul & Ayaz, 2010), antioksidan (Feng, dkk., 2012; Ramoutar & Brumaghim, 2010; Sharma, dkk., 2017; Sun & Ku, 2006), antikanker, antiinflamasi dan hipokolesterolemia (Sharma, dkk., 2017).

A. sativum dianggap sebagai tumbuhan obat yang memiliki khasiat mampu mempertahankan homeostasis sistem imun. *A. sativum* juga mampu meningkatkan sel-sel imun dan meningkatkan jumlah sel dalam sumsum tulang tikus (Kuttan, 2000; Moutia, dkk., 2018). Allicin merupakan komponen utama yang bertanggung jawab dalam aktivitas biologis *A. sativum* (Amagase, 2006; Feng, dkk., 2012). Sebuah penelitian telah melaporkan bahwa allicin memiliki aktivitas imunomodulator (Londhe, dkk., 2011). Namun, dalam keadaan tertentu, allicin atau ekstrak *A. sativum* dapat bekerja sebagai immunosupresor dengan menurunkan respon inflamasi, menghambat interaksi sel T dengan sel endotel dan menghambat sitokin proinflamasi Th1 (Hodge, dkk., 2002). Penelitian *in vivo* lainnya menunjukkan bahwa pemberian minyak *A. sativum* pada tikus memiliki efek ganda pada keseimbangan T helper (Th1 / Th2). Pada dosis rendah, respon sel T ditingkatkan ke arah tipe Th1, sementara pada dosis tinggi dapat memicu tipe Th2 (Liu, dkk., 2009).

Bahan utama lainnya dari jamu subur kandungan adalah *C. mangga* dan *A. calamus*. *C. mangga* merupakan tumbuhan dari famili Zingiberaceae yang telah digunakan juga untuk mengobati berbagai macam penyakit (Malek, dkk., 2011). Kandungan bioaktif dari *C. mangga* telah dilaporkan dapat meningkatkan proliferasi limfosit. Berdasarkan penelitian *in vivo* sebelumnya, *C. mangga* diketahui dapat meningkatkan kemampuan fagositosis leukosit pada tikus (Yuandani, dkk., 2018), sedangkan pada studi *in vitro* menunjukkan bahwa

ekstrak metanol *C. mangga* memiliki efek imunomodulator yang kuat pada neutrofil polimorfonuklear dan sel makrofag (Yuandani & Suwarso, 2017).

A. calamus merupakan tumbuhan herba yang kaya akan fitokonstituen, salah satunya senyawa polifenol (Muthuraman & Singh, 2012; Singh, dkk., 2011) dan dua bioaktif aromatik utama yang diisolasi dari rimpang *A. calamus* yaitu alpha (α)-asarone dan beta (β)-asarone (Das, dkk, 2019; Hanson, dkk., 2005; Pandit, dkk, 2011; Singh, dkk., 2011). Studi sebelumnya telah menunjukkan bahwa banyak dari ekstrak kasar *A. calamus* memiliki aktivitas imunomodulator. Kandungan fitosterol dalam tumbuhan ini memiliki efek modulator terhadap sel Th tikus yang menyebabkan peningkatan sekresi IL-2 dan IFN- γ (Abood, 2017).

Kombinasi dari ketiga bahan utama jamu subur kandungan tersebut memiliki berbagai macam aktivitas selain menyuburkan kandungan, seperti aktivitas imunomodulator, antioksidan, antimikroba dan lain sebagainya. Berdasarkan penelitian *in vitro* sebelumnya, kombinasi ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* dengan rasio 36%: 36%: 28% diketahui dapat menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans* dan adanya antioksidan yang tinggi (Mughtaromah, dkk., 2017), sedangkan penelitian secara *in vivo* pada kombinasi ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* (50-75 mg/kgBB) diketahui dapat meningkatkan fertilitas pada mencit betina. Meningkatnya fertilitas ini tak lepas dari aktivitas yang kompleks antara hormon reproduksi dengan sistem imun tubuh (Mughtaromah, dkk., 2020).

Penelitian-penelitian tersebut memiliki kelemahan yaitu membutuhkan ekstrak dengan dosis yang tinggi. Hal tersebut disebabkan oleh ekstrak tumbuhan yang memiliki kelarutan rendah, sehingga mengakibatkan penyerapan yang rendah dalam plasma darah (Zhang, dkk., 2013). Maka dari itu, salah satu alternatif yang dapat dilakukan untuk meningkatkan penyerapan dalam plasma darah adalah membuat kombinasi ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* menjadi nanopartikel yang tersalut kitosan berbasis nanoteknologi (Devi, dkk, 2015). Penyalutan ini dapat memudahkan ekstrak terserap dalam plasma darah dan akan lebih efektif untuk menuju sel target (Armendariz-Barragan, dkk., 2016).

Nanopartikel adalah koloid padat yang berukuran 1-1000 nm. Nanopartikel diformulasikan menggunakan polimer sehingga bahan obat tersebut

dapat disalut dan diabsorpsi. Nanopartikel yang tersalut kitosan saat ini banyak dikembangkan sebagai penghantar obat, karena memiliki banyak kelebihan diantaranya partikel tersebut akan lebih mudah menyebar dalam peredaran darah, pencapaian pada target lebih akurat dan dapat meningkatkan luas permukaan sehingga kelarutan partikel tersebut meningkat (Purbowatiningrum, dkk., 2016).

Berdasarkan penelitian sebelumnya, aplikasi nanopartikel ekstrak *A. sativum* tersalut kitosan menunjukkan aktivitas antioksidan dan antibakteri yang kuat dibandingkan dengan ekstrak *A. sativum* murni (Otunola, dkk., 2017; Wahyudi, dkk., 2018). Kitosan sebagai penyalut ini selain memiliki aktivitas antioksidan, juga mempengaruhi ukuran partikel menjadi lebih kecil (Wahyudi, dkk., 2018). Menurut Wardani dkk (2018), selain memiliki aktivitas antioksidan tersebut, kitosan juga memiliki potensi terapeutik, antibakteri, antidiabetes dan sebagai kandidat imunostimulator yang efektif. Sedangkan menurut Nakkala dkk (2014), aplikasi nanopartikel pada *A. calamus* juga menunjukkan aktivitas antioksidan, antibakteri dan antikanker yang kuat.

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, maka perlu dilakukan penelitian tentang “Aktivitas Imunomodulator Nanopartikel Kombinasi Ekstrak *Allium sativum*, *Curcuma mangga* dan *Acorus calamus* terhadap Profil Leukosit dan Sel CD4+ *Mus musculus*” dengan harapan dapat menjadi solusi alternatif dalam menjaga keseimbangan sistem imun tubuh yang lebih efektif dengan dosis yang tepat.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka didapatkan rumusan masalah sebagai berikut:

1. Apakah pemberian nanopartikel ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* dapat memodulasi profil leukosit pada mencit (*M. musculus*)?
2. Apakah pemberian nanopartikel ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* dapat memodulasi sel CD4+ pada mencit (*M. musculus*)?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui aktivitas imunomodulator nanopartikel ekstrak *A. sativum*,

- C. mangga* dan *A. calamus* terhadap profil leukosit pada mencit (*M. musculus*).
2. Untuk mengetahui aktivitas imunomodulator nanopartikel ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* terhadap sel CD4+ pada mencit (*M. musculus*).

1.4 Hipotesis Penelitian

Hipotesis dari penelitian ini adalah:

1. Terdapat aktivitas imunomodulator nanopartikel ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* terhadap profil leukosit pada mencit (*M. musculus*).
2. Terdapat aktivitas imunomodulator nanopartikel ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* terhadap sel CD4+ pada mencit (*M. musculus*).

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah:

1. Bagi peneliti yaitu mengetahui aktivitas imunomodulator nanopartikel ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* dalam memodulasi profil leukosit serta sel CD4+ pada mencit (*M. musculus*)
2. Bagi masyarakat yaitu memberikan informasi terkait potensi tanaman *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* yang disajikan dalam bentuk nanopartikel.

1.6 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Penelitian ini menggunakan sampel umbi *A. sativum*, rimpang *C. mangga* dan rimpang *A. calamus* yang diperoleh dari UPT. Materia Medika Batu.
2. Komponen sampel berdasarkan komposisi Jamu Subur Kandungan produksi PT. Ribkah Maryam Jokotole Bangkalan Madura.
3. Ekstrak yang digunakan merupakan ekstrak kombinasi dari umbi *A. sativum*, rimpang *C. mangga* dan rimpang *A. calamus*
4. Hewan coba yang digunakan adalah mencit (*M. musculus*) betina galur Balb-C, usia 2-3 bulan dan berat badan 20-25 gram.
5. Sinkronisasi estrus menggunakan PMSG (*Pregnant Mare's Serum Gonadotropin*) dan HCG (*Human Chorionic Gonadotropin*).
6. Parameter yang digunakan pada penelitian ini adalah profil leukosit yang meliputi jumlah dan jenis leukosit serta sel CD4+.

BAB II

KAJIAN PUSTAKA

2.1 *Allium sativum* (Bawang Putih)

2.1.1 Tinjauan Umum Tentang *Allium sativum*

A. sativum memiliki sebutan yang berbeda-beda di setiap daerahnya, antara lain bawang putih, lasuna, rasonam, lasan, vellulli, vallai-pundu, seer, ullippoondur dan maharu (Divya, dkk., 2017). Menurut Londhe dkk (2011), nama *A. Sativum* berasal dari kata Celtic “*All*” yang berarti pedas. *A. Sativum* merupakan spesies dari keluarga bawang, Alliaceae. Tumbuhan ini adalah salah satu tumbuhan yang paling banyak digunakan, baik secara medis atau sebagai bahan masakan. Segi historis, *A. Sativum* berasal dari Asia Tengah yang telah ditemukan sejak 6000 tahun yang lalu (Moutia, dkk., 2018; Suleria, dkk., 2015). Famili Alliaceae memiliki lebih dari 500 spesies dalam 30 genera. Tumbuhan ini tersebar secara luas dengan kawasan-kawasan utamanya yaitu Eropa, Asia, Amerika Utara dan Amerika Selatan (Divya, dkk., 2017).

A. sativum tumbuh luas di seluruh dunia. Tetapi, Cina adalah produsen *A. sativum* terbesar sekitar 75% dari produksi dunia. India berada di posisi kedua setelah Cina. Di India, rata-rata *A. sativum* dibudidayakan pada lahan 2,01 hektar dan menghasilkan 10,58 juta ton *A. sativum* (Raheel, dkk., 2019). Menurut Fratianni dkk (2016), di Italia, *A. Sativum* dibudidayakan terutama di Campania, Sisilia, Emilia-Romagna dan Veneto. Di wilayah Campania hadir varietas yang berbeda, seperti “*Bianco locale*”, “*Salomone*”, “*Caposele*”, “*Tondo di Torella*”, “*Schiacciato*” dan “*Rosato locale*”.

Kultivar *A. sativum* baik lokal maupun asing akan beragam dalam pengembangan dan potensi hasilnya (Walters, 2008). Ketika kultivar *A. sativum* tumbuh di bawah kondisi lingkungan yang berbeda atau seragam, maka akan bervariasi sifatnya termasuk morfologinya seperti jumlah daun, musim mekar bunga, panjang batang dan rasio berbunganya. Sedangkan komponen kimia dasar umbi *A. sativum* dibedakan menurut jenisnya (El-Zemaity, dkk., 2009). *A. sativum* sebagai tumbuhan yang dibudidayakan secara aseksual mengekspresikan variasi

struktural yang tinggi (Bradley, dkk., 1996; Pooler & Simon, 1993) dan setidaknya tumbuh sejak 5.000 tahun yang lalu dan diperkirakan dimulai dari Asia Tengah sebagai budidaya liar *A. sativum* (Fritsch & Friesen, 2009; Raheel, dkk., 2019).

A. sativum merupakan salah satu sayuran paling penting yang ada dunia dengan total area panen 1.437.690 ha dan produksi tahunan 24.255.303 ton umbi kering (FAO, 2013). Pentingnya *A. sativum* adalah karena penggunaannya tidak hanya untuk kuliner tetapi juga untuk tujuan terapeutik dan pengobatan, baik pengobatan tradisional maupun modern. Tumbuhan ini dikonsumsi baik sebagai sayuran mentah (daun segar atau siung kering), atau setelah diproses dalam bentuk minyak, ekstrak dan bubuk *A. sativum* dengan hasil komposisi kimia dan kandungan senyawa bioaktif yang berbeda (Lanzotti, dkk., 2014; Martins, dkk., 2016). Pada umumnya, bagian dari *A. sativum* yang digunakan untuk khasiat obat adalah umbinya, yang tersusun dari beberapa siung, yang dibungkus oleh membran tipis (Bayan, dkk., 2014; Thomson & Ali, 2005; Trifunski, dkk., 2015).

A. sativum adalah jenis umbi yang terkenal kuat dengan bau menyengatnya terutama ketika digerus. Morfologi *A. sativum* antara lain pembungaannya seperti bunga cawan (*umbellata*), bulbil *A. sativum* berukuran kecil yang muncul dari perbungaan. Bunganya bervariasi jumlahnya dan kadang-kadang tidak ada, jarang mekar dan dapat layu sebelum mekar. Masa pembungaan *A. sativum* adalah dari Februari hingga Maret. Biji jarang ditemukan, hal ini terjadi karena seluruh umbi atau siung-siung terisolasi (bulblet), umbi *A. sativum* berbentuk sub-globular, berdiameter 4-6 cm, terdiri dari 8-20 siung, dikelilingi oleh 3-5 sisik selaput tipis berwarna putih (Gambar 2.1). Selaput tipis tersebut melekat pada cakram di bawahnya, bertekstur keras seperti kayu dan memiliki banyak akar halus di sisi bawah. *A. sativum* memiliki rasa yang tajam serta memberi rasa hangat pada lidah (Divya, dkk., 2017). *A. sativum* memiliki daun berwarna hijau keabu-abuan, ujungnya lancip, panjangnya 30,8-31,5 cm dan lebarnya 0,2-0,5 cm. tanaman ini juga memiliki akar dengan tipe serabut ramping dan panjang (Zin, 2017).



Gambar 2.1. Umbi *A. sativum* (Fratianni, dkk., 2016)

2.1.2 Klasifikasi *A. sativum*

Klasifikasi dari *A. sativum* adalah (Dasuki, 1991):

- Kindom : Plantae
- Sub Kingdom : Tracheobionta
- Super Divisi : Spermatophyta
- Divisi : Magnoliophyta
- Sub Divisi : Angiospermae
- Kelas : Monocotyledonae
- Bangsa : Liliales
- Suku : Liliaceae
- Marga : Allium
- Spesies : *Allium sativum* Linn.

Bawang putih (*A. sativum*) berasal dari kata Celtic “*All*” yang berarti pedas (Londhe, dkk., 2011). *A. sativum* di setiap daerah memiliki sebutan yang berbeda-beda, antara lain bawang putih, lasuna, rasonam, lasan, vellulli, vallai-pundu, seer, ullippoondu, maharu, garlic, kasuna, bawang handak, bawang bodudo, bhabang pote, bawang bodas dan kalfeo folen (Divya, dkk., 2017).

2.1.3 Kandungan Senyawa Kimia *A. sativum*

A. sativum telah digunakan sebagai rempah-rempah dan tumbuhan obat sejak zaman kuno. *A. sativum* diketahui sebagai obat telah tertulis dalam Codex Ebers Mesir dari abad ke-16 SM (Londhe, dkk., 2011). Bahan-bahan tertentu dari *A. sativum*, khususnya tiosulfinat memiliki sifat antimikroba yang kuat terhadap berbagai bakteri dan jamur (Weber, dkk., 1992). Senyawa yang paling penting yang dihasilkan oleh *A. sativum* adalah allicin (diallylthiosulfinate), yang

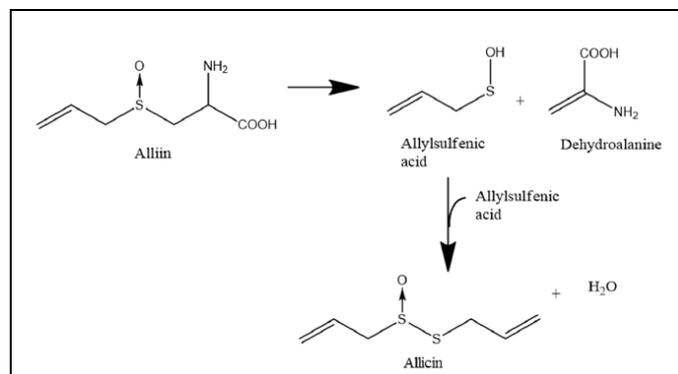
terbentuk dari alliin yang merupakan asam amino non-proteinogenik (S-allyl cysteine sulfoxide). Allicin terbentuk dari alliin melalui reaksi dua cara. Cara pertama enzim alliinase (Cystein Sulfoxide lyase, E.C. 4.4.1.4) mengubah alliin menjadi asam allylsulfenic dan dehydroalanine, sedangkan cara kedua, dua molekul asam allylsulfenic terkondensasi secara spontan dalam satu molekul allicin (Gambar 2.2) (Borlinghaus, dkk., 2014; Gruhlke, dkk., 2017; Rahman, dkk., 2012).

Allicin (dialil tiosulfinat atau dialil disulfida) merupakan senyawa paling aktif secara biologis. Allicin, pertama kali diisolasi secara kimia pada tahun 1940-an, memiliki efek antimikroba terhadap banyak virus, bakteri, jamur, dan parasit. Minyak *A. sativum*, *A. sativum* tua dan *A. sativum* suling tidak mengandung alliin atau allicin dalam jumlah yang signifikan, tetapi mengandung berbagai produk transformasi allicin, yang tampaknya tidak memiliki aktivitas fisiologis sebanyak *A. sativum* segar atau bubuk *A. sativum*. *A. sativum* kering dan bubuk mengandung sekitar 1% alliin (S-allyl cysteine sulfoxide) (Fратиanni, dkk., 2016; Londhe, dkk., 2011).

Struktur dan sifat biologis Allicin pertama kali dijelaskan oleh Cavallito dan Bailey pada tahun 1944 (Gruhlke, dkk., 2017). Allicin sangat reaktif dengan gugus tiol tetapi dalam kondisi tertentu, allicin juga bereaksi dengan dirinya sendiri membentuk senyawa lebih lanjut yang dapat menjadi bioaktif, seperti vinil-dithiins, ajoene dan polysulfanes (Gruhlke, dkk., 2017; Jacob & Anwar, 2008). Allicin mampu mengoksidasi biomolekul seperti residu glutation atau protein sistein secara fisiologis, sehingga allicin disebut sebagai spesies sulfur reaktif (RSS) (Gruhlke, dkk., 2017; Gruhlke & Slusarenko, 2012). Allicin merupakan biosida yang tergantung pada dosis tertentu dan memiliki kemampuan untuk membunuh sel eukariotik. Tahun 1960, pertama kali dilaporkan bahwa sel-sel tumor terbunuh ketika diinkubasi dalam larutan allicin (DiPaolo & Carruthers, 1960; Gruhlke, dkk., 2017). Allicin mampu menembus membran permeabel (Gruhlke, dkk., 2017; Miron, dkk., 2000) dan mudah memasuki sel serta bereaksi dengan tiol seluler seperti glutation (Gruhlke, dkk., 2017; Rabinkov, dkk., 2000) atau residu sistein dalam protein (Gruhlke, dkk., 2017; Wallock-Richards, dkk., 2014).

A. sativum memiliki zat lain selain Allicin, seperti protein, kalium, fosfor, magnesium, kalsium, dan karbohidrat. *A. sativum* muda yang dikupas terdiri dari sekitar 0,8% serat, 63% air, 7% protein, 28% karbohidrat, 0,2% lemak, sejumlah besar senyawa sulfur yang mensubsidi rasa pedas *A. sativum* (Moutia, dkk., 2018; Rabinowitch & Currah, 2002; Raheel, dkk., 2019), setidaknya berjumlah 33 senyawa sulfur dan mineral seperti germanium, kalsium, tembaga, besi, kalium, magnesium, selenium, seng; serta vitamin A, B1 dan C (Divya, dkk., 2017; Gebreyohannes & Gebreyohannes, 2013; Londhe, dkk., 2011). γ -glutamyl-S-alk(en)-il-L-sistein adalah senyawa organosulfur utama dalam *A. sativum* utuh, yang dapat dihidrolisis dan dioksidasi untuk menghasilkan S-alkil-(en)-il-L-sistein sulfoksida (alliin) (Divya, dkk., 2017; Londhe, dkk., 2011; Moutia, dkk., 2018).

Lebih dari dua ratus senyawa kimia dalam umbi *A. sativum* yang terkandung, di antaranya mengandung minyak atsiri dengan senyawa lain yang mengandung belerang seperti ajoene (4,5,9-trithiadodeca-1,6,11-triene-9-oksida), alliin dan allicin, enzim seperti peroxidase, allinase, myrosinase dan senyawa lain seperti α -phellandrene, β -phellandrene, linalool, citral dan geraniol. Senyawa-senyawa tersebut bertanggung jawab terhadap bau tajam *A. sativum* dan banyak efek obatnya (Divya, dkk., 2017; Londhe, dkk., 2011). Selain itu, *A. sativum* juga mengandung 17 asam amino seperti lisin, histidin, arginin, asam aspartat, treonin, glutamin, prolin, glisin, alanin, sistein, valin, metionin, isoleusin, leusin, triptofan dan fenilalanin (Divya, dkk., 2017; Josling, 2005; Londhe, dkk., 2011).



Gambar 2.2 Biosintesis Allicin dari *A. sativum* (Gruhlke, dkk., 2017)

2.1.4 Khasiat *A. sativum*

A. sativum telah digunakan selama ribuan tahun untuk tujuan pengobatan. Catatan Sansekerta menunjukkan penggunaan *A. sativum* sebagai obat sekitar 5.000 tahun yang lalu, dan telah digunakan setidaknya 3.000 tahun dalam pengobatan Tiongkok. Begitu pula Orang Mesir, Babilonia, Yunani, dan Romawi menggunakan *A. sativum* untuk tujuan penyembuhan. Pada 1858, Pasteur mencatat aktivitas antibakteri *A. sativum*, dan itu digunakan sebagai antiseptik untuk mencegah ganggren selama Perang Dunia I dan Perang Dunia II. Kegunaan lainnya *A. sativum* adalah untuk mencegah dan mengobati penyakit kardiovaskular dengan menurunkan tekanan darah dan kolesterol, sebagai antimikroba dan sebagai agen pencegah kanker (Divya, dkk., 2017; Fratianni, dkk., 2016; Londhe, dkk., 2011; Moutia, dkk., 2018). *A. sativum* juga menghambat agregasi trombosit dan meningkatkan aktivitas fibrinolitik, mengurangi gumpalan pada endotelium yang rusak (Londhe, dkk., 2011; Mathialagan, dkk., 2017).

Allah berfirman dalam surah Al Baqoroh (2) ayat 61 yang termaktub dalam Al-Qur'an:

وَإِذْ قُلْتُمْ يَا مُوسَىٰ لَنْ نَصْبِرَ عَلَىٰ طَعَامٍ وَاحِدٍ فَادْعُ لَنَا رَبَّكَ يُخْرِجْ لَنَا مِمَّا تُنْبِتُ الْأَرْضُ مِنْ بَقْلِهَا وَقِثَّائِهَا وَفُومِهَا وَعَدَسِهَا وَبَصِلِهَا ۗ قَالَ أَتَسْتَبِدُّونَ الَّذِي هُوَ أَدْنَىٰ بِالَّذِي هُوَ خَيْرٌ أَهْبِطُوا مِصْرًا فَإِنَّ لَكُمْ مِمَّا سَأَلْتُمْ ۗ وَضُرِبَتْ عَلَيْهِمُ الذِّلَّةُ وَالْمَسْكَنَةُ وَبَاءُوا بِغَضَبٍ مِّنَ اللَّهِ ۗ ذَٰلِكَ بِأَنَّهُمْ كَانُوا يَكْفُرُونَ بِآيَاتِ اللَّهِ وَيَقْتُلُونَ النَّبِيِّنَ بِغَيْرِ الْحَقِّ ۗ ذَٰلِكَ بِمَا عَصَوْا وَكَانُوا يَعْتَدُونَ ٦١

Artinya: “Dan (ingatlah), ketika kamu berkata, “Wahai Musa! kami tidak tahan hanya makan dengan satu macam makanan saja, maka mohonkanlah kepada Tuhanmu untuk kami, agar Dia memberi kami apa yang ditumbuhkan di bumi, seperti: sayur - sayuran, mentimun, bawang putih, kacang adas dan bawang merah.” Dia (Musa) menjawab, “Apakah kamu meminta sesuatu yang buruk sebagai ganti dari sesuatu yang baik?. Pergilah ke suatu kota, pasti kamu akan memperoleh apa yang kamu minta.” Kemudian mereka ditimpa kenistaan dan kemiskinan, dan mereka kembali mendapat kemurkaan dari Allah. Hal itu terjadi karena

mereka mengingkari ayat-ayat Allah dan membunuh para nabi tanpa alasan yang benar. Yang demikian itu karena mereka durhaka dan melampaui batas.”(Q.S Al Baqoroh (2): 61).

Ayat di atas menunjukkan bahwa kaum Nabi Musa As. enggan bersyukur dan merasa bosan dengan satu macam makanan yang telah diberikan oleh Allah Swt. Padahal makanan tersebut merupakan makanan yang berasal dari tumbuhan yang sulit didapatkan di kawasan lainnya dan kaya akan manfaat, namun mereka memilih tumbuhan yang memiliki derajat di bawahnya, akan tetapi mudah didapatkan, seperti mentimun, kacang adas, bawang putih dan lain sebagainya. Dengan demikian, kaum tersebut meninggalkan tempat tinggalnya untuk mendapatkan makanan yang mereka inginkan dan mereka memilih untuk mengingkari nikmat Allah (Shalih, 2000). Berdasarkan tafsiran di atas dapat dipahami bahwasannya *A. sativum* merupakan salah satu tumbuhan yang memiliki kelebihan seperti mudah didapatkan di sekitar, sehingga mudah pula diaplikasikan sebagai pengobatan alternatif herbal yang ekonomis.

Selain di atas, ayat tersebut menerangkan bahwasannya Allah SWT telah menumbuhkan berbagai macam tumbuhan seperti yang telah disebutkan yaitu sayur-sayuran, mentimun, bawang putih, kacang adas dan bawang merah. Tumbuhan-tumbuhan tersebut memiliki banyak manfaat. Sedangkan pada kalimat setelahnya yang memiliki arti “*Apakah kamu meminta sesuatu yang buruk sebagai ganti dari sesuatu yang baik?*” memiliki makna secara tersirat yaitu tumbuhan yang telah disebutkan memiliki manfaat yang begitu besar yang setidaknya memiliki kandungan-kandungan bahan aktif di dalamnya yang mendukung keberadaannya untuk dimanfaatkan menjadi berbagai macam olahan (Musa, 2016a). Ibnu Qayyim menuturkan sabda dari Nabi Muhammad SAW, “*Makanlah bawang putih yang mentah. Jikalau aku tidak berbicara dengan malaikat, maka aku pun memakannya.*” (Al-Jauziyah, 2000). Terdapat riwayat lain yang menuturkan bahwa Nabi Muhammad Saw pernah diberi hadiah berupa makanan yang mengandung bawang putih, namun makanan tersebut kemudian beliau kirimkan ke Abu Ayyub Al-Anshari. Hadits tersebut sebenarnya mendeskripsikan bahwa Nabi Muhammad Saw membolehkan untuk memakan bawang putih. Namun tidak disarankan untuk memakan bawang putih ketika

hendak pergi ke masjid, karena bau mulut yang disebabkan oleh bawang putih tersebut menyengat dan kurang sedap (Thayyarah, 2013).

Hadits lain juga menyebutkan dari Sayyidina Ali bin Abi Thalib yang diriwayatkan oleh Ad-Dailami, “*Makanlah bawang putih dan manfaatkanlah sebagai obat, karena di dalamnya terdapat obat dari tujuh puluh macam penyakit. Kalaulah malaikat tidak datang dan berbicara denganku, pasti aku pun memakannya.*” (Thayyarah, 2013). Bau menyengat dari *A. sativum* disebabkan oleh kandungan senyawa belerangnya dan senyawa tersebut memiliki banyak efek untuk pengobatan (Divya, dkk., 2017; Londhe, dkk., 2011).

A. sativum masih digunakan dalam pengobatan tradisional dan modern di seluruh dunia untuk mengobati berbagai penyakit (Ali, dkk., 2000; Moutia, dkk., 2018). Terbukti telah banyak digunakan sepanjang sejarah untuk efek profilaksis dan terapi. Efek imunomodulator dan antitumornya pun telah dibuktikan secara *in vitro* dan *in vivo* (Fallah-Rostami, dkk., 2013; Moutia, dkk., 2018). Selain itu, aktivitas biologis *A. sativum* juga mencakup stimulasi kekebalan tubuh, anti-infeksi (Colic & Savic, 2000; Moutia, dkk., 2018), antitrombotik, antioksidan, antidiabetik (Divya, dkk., 2017; Fratianni, dkk., 2016), antiaterosklerosis dan hipolipidemik (Londhe, dkk., 2011). Penggunaan *A. sativum* yang diusulkan lainnya seperti hepatoproteksi, antihelmentik, antiinflamasi dan penyembuhan luka telah ditunjukkan dalam berbagai studi (Divya, dkk., 2017; Moutia, dkk., 2018). Di samping itu, senyawa fenoliknya yang merupakan kelompok terbesar metabolit sekunder dalam *A. sativum* mampu menetralkan atau memadamkan radikal bebas (Divya, dkk., 2017; Picchi, dkk., 2012).

2.2 *Curcuma mangga* (Temu Mangga)

2.2.1 Tinjauan Umum *Curcuma mangga*

C. mangga adalah spesies tumbuhan rimpang yang termasuk keluarga Zingiberaceae (Abraham, dkk., 2011; Hong, dkk., 2016). Zingiberaceae adalah keluarga rimpang yang terkenal di Asia Tenggara dan spesiesnya banyak digunakan dalam pengobatan tradisional untuk mengobati beberapa penyakit. Selain itu, rimpang dari Zingiberaceae banyak digunakan sebagai rempah-rempah atau bumbu masak, bahkan rimpang ini sering dimakan mentah atau dimasak sebagai sayuran (Abraham, dkk., 2011; Abraham, 2010). *C. mangga* dikenal

dengan sebutan “*temu pauh*” di Malaysia, sementara di Indonesia dikenal dengan sebutan “*kunir putih* atau *temu mangga*”, karena rimpangnya memiliki aroma seperti mangga yang menyegarkan, dan disebut dengan “*Khamin khao*” di Thailand (Abraham, dkk., 2011; Hong, dkk., 2016; Malek, dkk., 2011; Raihana, dkk., 2011; Rajkumari & Sanatombi, 2018). Spesies *Curcuma* ini, memanifestasikan identitas rasa paling berbeda, karena terdapat rasa mangga mentah yang dikombinasikan dengan jahe dalam rimpangnya. Rasa tersebut berasal dari 3-carene, *cis* dan *trans* dihydroocimene, ocimene dan mycrene (Sasikumar, 2005; Singh, dkk., 2003; Sundram, dkk., 2012).

C. mangga Valetton & *C. van Zijp* termasuk tumbuhan rhizomatous dari genus *Curcuma* (Sundram, dkk., 2012). Genus ini memiliki sekitar 80 spesies. Distribusi geografis genus ini ada di seluruh wilayah subtropis dan tropis termasuk Asia Tenggara, Cina, India, Papua, dan Australia utara (Hadem & Sen, 2017; Rajkumari & Sanatombi, 2018). *Curcuma* adalah tumbuhan herba tebal, berdaging, memiliki rimpang, batang semu dan daun. Genus ini memiliki duri bunga yang muncul dari bagian atas batang semu atau kadang-kadang pada batang yang terpisah langsung dari rimpang. Warna bagian dalam rimpang bervariasi, yaitu putih, krem, kuning, oranye, biru, hijau kebiruan dan hitam (Hadem & Sen, 2017).

C. mangga adalah tumbuhan herba tahunan yang dapat tumbuh hingga berukuran 90-120 cm. Tumbuh bergerombol dan memiliki pseudostem. Rimpang lateral bercabang dari rimpang utama. Bagian longitudinal dari rimpang terdiri atas lingkaran lateral atau luar yang berwarna kuning pucat dan lingkaran dalam yang berwarna kuning pekat dengan tekstur serat nodular seperti tekstur jahe (*Zingiber officinale*). Rimpang *C. mangga* menghasilkan aroma seperti mangga mentah yang membuat spesies ini berbeda dengan kerabat dekatnya (Gusmaini & Januwati, 2004).

Ciri-ciri morfologi dari *C. mangga* lainnya adalah perbungaan muncul di antara daun basal, padat, berbentuk silindris, braktea tumbuh dari sumbu utama, brakteolanya kecil, tidak mencolok, tertutupi oleh braktea. Bunganya berwarna kekuning-kuningan sampai hijau limau dengan kelopak berbentuk silindris pendek, corolla berbentuk tabung, dan lobusnya bulat telur atau membujur.

Filamen persegi panjang atau membidang menyelubungi kepala sari di mahkota, kadang-kadang ada assesoris (tambahan) di terminal, staminode lateral yang besar dan kelopak seperti bibir yang cekung (Gusmaini & Januwati, 2004).

Daun *C. mangga* berbentuk bulat lonjong menyempit di ujungnya, panjangnya 15-95 cm dan lebar 5-23 cm, berwarna hijau dengan warna keunguan di sepanjang vena (Gambar 2.3). *C. mangga* memiliki sistem perakaran serabut. Akar utama dihasilkan dari rimpang utama dan rimpang lateral yang matang (Gusmaini & Januwati, 2004). Spesies lain yang relatif dekat dengan *C. mangga* adalah *C. xanthoriza*, *C. aeruginosa*, *C. zedoaria* dan *C. domestica* (Abraham, 2010; Rajkumari & Sanatombi, 2018; Rukmana, 1994).



Gambar 2.3. Morfologi *C. mangga*. a). daun *C. mangga*, b). rimpang *C. mangga* (Abraham, 2010)

2.2.2 Klasifikasi *C. mangga*

Klasifikasi dari *C. mangga* adalah (Dasuki, 1991):

- Kindom : Plantae
- Sub Kingdom : Tracheobionta
- Super Divisi : Spermatophyta
- Divisi : Magnoliophyta
- Sub Divisi : Angiospermae
- Kelas : Monocotyledonae
- Bangsa : Zingiberales
- Suku : Zingiberaceae

Marga : Curcuma

Spesies : *Curcuma mangga* L.

Temu mangga (*C. mangga*) memiliki sebutan yang berbeda-beda pada setiap daerah seperti kunir putih, kunyit putih, temu bayangan, temu poh (Jawa), temu pao (Madura), temu mangga, koneng johoh, koneng lalap, koneng lalab, koneng pare (Sunda), temu putih (Melayu), temu pauh (Malaysia) dan khamin khao (Thailand) (Hariana, 2004).

2.2.3 Kandungan Senyawa Kimia *C. mangga*

C. mangga dan spesies lain dari genus *Curcuma* merupakan bumbu unik yang belum banyak dimanfaatkan. Ujung segar rimpang muda *C. mangga* digunakan untuk membuat acar dan daun aromatiknya digunakan untuk membumbui ikan yang dikukus dan dibakar. Semua spesies dari *Curcuma* yang dapat dimakan ini merupakan sumber karbohidrat, protein, serat makanan yang baik, begitu pula dengan vitamin dan mineralnya. Rimpang *C. mangga* memiliki senyawa bioaktif tunggal seperti (E)-15,16-bisnorlabda-8 (17), 11-dien-13-one, zerumin A dan B, β -sitosterol, curcumin, 3-buten-2-ol, 4-[(1R, 4aR, 8aR)-decahydro 5, 5', 8- α -trimethyl-2-methylene-1-naphthalenyl]-(3E)-rel, calcaratarin A, asam copallic, 14, 15,16-trinor-labdan-8,12-diol, 8,12 epoxygermacra-1 (10), 4,7,11-tetraen-6-one, cyclohexanecarboxylic acid methyl ester, isopulegol, 2-menthen-1-ol menth-1-en-9-ol, octahydrocurcumin, labda-8 (17)-12-diene-15,16-dial, dan coronadiene. Sedangkan komposisi dari hasil minyak atsiri utamanya adalah Myrcene (46,5%), β -pinene (14,6%), caryophyllene oxide (18,71%), dan caryophyllene (12,69%) (Rajkumari & Sanatombi, 2018). Menurut penelitian yang dilakukan oleh Muchtaromah dkk (2017) menyatakan bahwa analisis fitokimia dari ekstrak etanol *C. mangga* mengandung flavonoid, triterpenoid, steroid dan saponin. Di samping itu, *C. mangga* mengandung senyawa antioksidan berupa kalkon dan flavanon (Kamazeri, dkk., 2012).

2.2.4 Khasiat *C. mangga*

Tumbuhan merupakan salah satu ciptaan Allah Swt yang memiliki banyak khasiat, karena di dalamnya banyak terkandung berbagai macam bahan aktif yang

bermanfaat untuk makhluk hidup yang lain. Allah Swt berfirman dalam surah An-Nahl (16) ayat 10-11 yang tertulis:

هُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً لَكُمْ مِنْهُ شَرَابٌ وَمِنْهُ شَجَرٌ فِيهِ تُسِيمُونَ
يُنْبِتُ لَكُمْ بِهِ الزَّرْعَ وَالزَّيْتُونَ وَالنَّخِيلَ وَالْأَعْنَابَ وَمِنْ كُلِّ الثَّمَرَاتِ إِنَّ فِي
ذَلِكَ لَآيَةً لِقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ

Artinya: “Dialah yang telah menurunkan air hujan dari langit untuk kamu, sebagiannya menjadi minuman dan sebagiannya lainnya menyuburkan tumbuhan, padanya kamu-kamu menggembalakan ternakmu. Dengan air hujan itu Dia menumbuhkan untuk kamu tanaman-tanaman; zaitun, kurma, anggur dan segala macam buah-buahan. Sungguh, yang demikian itu benar-benar terdapat tanda kekuasaan Allah bagi orang yang berpikir.” (Q.S. An Nahl (16): 10-11).

Ayat di atas menerangkan bahwa Allah Swt telah menumbuhkan berbagai macam tumbuhan dalam berbagai macam bentuk, warna, aroma, bahkan khasiatnya. Tumbuhan-tumbuhan tersebut di antaranya dapat dimanfaatkan sebagai makanan, obat dan lain sebagainya. Keberadaan khasiat, perbedaan bentuk, warna, dan lain sebagainya tidak akan diketahui kecuali oleh orang berilmu. Kejadian tersebut tidak lain menunjukkan kekuasaan dan kebesaran Allah (Shihab, 2002). Berdasarkan ayat tersebut dapat diketahui salah satu tumbuhan yang dapat dimanfaatkan oleh manusia sebagai pengobatan yaitu *C. mangga*.

Beberapa spesies dari genus *Curcuma* telah digunakan dalam pengobatan Ayurveda untuk mengobati berbagai penyakit dan gangguan kesehatan. Rimpang dan bagian lainnya dari *C. aeruginosa*, *C. angustifolia*, *C. caucia*, *C. leucorrhiza*, *C. longa*, *C. mangga*, *C. phaeocaulis*, dan *C. purpurascens* telah dilaporkan untuk pengobatan disentri, radang lambung, gangguan pencernaan, liver, diabetes, demam, batuk, bisul, kudis, nyeri dada, tonik untuk keseleo, memar, nyeri tubuh, anoreksia, coryza, dispepsia, rematik, sinusitis, antiseptik, pendarahan dan penyembuhan luka (Rajkumari & Sanatombi, 2018).

Rimpang *C. mangga* merupakan sumber pewarna kuning alami dan secara historis digunakan sebagai rempah-rempah, pengawet makanan, zat penyedap

rasa, dan untuk pengobatan berbagai penyakit (Al-Reza, dkk., 2010; Xiang, dkk., 2011). Menurut Larsen dkk (1999), setiap bagian dari spesies tanaman ini dilaporkan dapat dimakan baik mentah atau dimasak sebagai sayuran di berbagai negara di Asia. *C. mangga* juga dianggap sebagai produk makanan yang kaya nutrisi, karena tanaman tersebut merupakan tanaman yang kaya akan pati, karbohidrat, protein, lemak, vitamin, dan mineral. Beberapa laporan mengenai fitokonstituen, minyak atsiri, dan aktivitas farmakologis juga telah dipublikasikan sebelumnya (Chattopadhyay, dkk., 2004; Padalia, dkk., 2013). Aktivitas farmakologi dari tanaman ini yang telah terbukti antara lain sebagai anti-inflamasi, antimikroba, hipokolestemik, antirematik, antivirus, antifibrotik, antivenomous, antihepatotoksik, antidiabetik, antinosiseptif, antikanker, dan sifat gastroprotektif (Padalia, dkk., 2013; Policegoudra, dkk., 2010; Rajkumari & Sanatombi, 2018).

Rimpang dan pucuk muda dari *C. mangga* dapat dikonsumsi mentah dan sebagai perawatan *postpartum*, khususnya untuk membantu penyembuhan rahim yang telah banyak dimanfaatkan di kawasan Asia. Tanaman itu juga digunakan untuk mengobati penyakit kulit seperti bintik merah yang menyebabkan gatal-gatal dan dapat mengurangi panas tubuh yang disebabkan oleh demam terus menerus (Abraham, 2010; Foo, dkk., 2017; Hadem & Sen, 2017; Muchtaromah, dkk., 2017; Raihana, dkk., 2011; Yee, dkk., 2015). Rimpang dan daun *C. mangga* telah dilaporkan memiliki aktivitas sitotoksik dan efek antiproliferasi pada adenokarsinoma payudara, adenokarsinoma kolorektal (Kirana, dkk., 2003), adenokarsinoma paru, karsinoma serviks (Malek, dkk., 2011), karsinoma duktal (Widowati, dkk., 2011; Widowati, dkk., 2013), karsinoma prostat (Abas, dkk., 2006) dan adenokarsinoma lambung (Hong, dkk., 2016; Liu & Nair, 2011, 2012).

2.3 *Acorus calamus* (Jeringau)

2.3.1 Tinjauan umum *Acorus calamus*

Allah Swt telah menumbuhkan berbagai macam tumbuh-tumbuhan dengan berbagai bentuk dan kaya akan manfaat. Salah satu manfaat tersebut adalah untuk pengobatan herbal. Bagian tumbuhan yang biasanya dimanfaatkan sebagai obat antara lain daun, batang, akar, rimpang, bunga, buah dan bijinya. Hal tersebut sesuai dengan firman Allah dalam surah Asy-Syuara (26) ayat 7:

أَو لَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمَا أَنْبَأْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

Artinya: “Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, betapa banyak kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam (tumbuh-tumbuhan yang baik lagi bermanfaat?)”(Q.S. Asy-Syuara (26): 7).

Ayat di atas menunjukkan bahwa Allah telah menciptakan berbagai macam tumbuhan yang dapat diambil manfaatnya oleh makhluk hidup lainnya.

Hal ini juga membuktikan betapa besar kekuasaan Allah. Kata إِلَى pada awal ayat

أَو لَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ merupakan kata yang memiliki makna batas akhir. Kata ini

berfungsi memperluas arah pandangan hingga batas akhir, dengan demikian ayat ini mengajak manusia untuk memfokuskan pandangan hingga batas kemampuannya memandang, hingga mencakup macam tanah dan tumbuhannya,

juga manfaat dari tumbuh-tumbuhan tersebut. Kata زَوْجٍ memiliki makna

pasangan. Pasangan yang dimaksudkan oleh ayat ini adalah tumbuh-tumbuhan.

Tumbuh-tumbuhan di muka bumi ini juga berpasangan karena memiliki alat kelamin yaitu putik dan benang sari. Dengan berpasangan, tumbuhan dapat tumbuh dan berkembang. Ada kalanya, tumbuhan yang hanya memiliki satu jenis alat kelamin membutuhkan pasangan untuk melakukan penyerbukan. Sedangkan

kata كَرِيمٍ memiliki makna baik. Kata ini dapat digunakan untuk mendeskripsikan

sesuatu yang baik bagi objek yang disifati, seperti tumbuhan yang baik.

Tumbuhan baik ini berarti tumbuhan yang memiliki segudang manfaat. Salah satunya sebagai obat tradisional (Shihab, 2002).

Tumbuhan obat adalah tumbuhan yang memiliki metabolit sekunder dan merupakan sumber potensial obat kuratif dengan kandungan bahan kimia yang kompleks. India adalah negara terbesar ke-delapan yang kaya akan keanekaragaman tumbuhan dengan total sekitar 47.000 spesies, di mana lebih dari 7.500 spesies digunakan sebagai tumbuhan obat. Produk tumbuhan ini digunakan sebagai sumber obat utama di seluruh dunia untuk mengobati berbagai penyakit

manusia. Bahkan di Amerika Serikat saat ini sekitar 50% obat-obatan berasal dari sumber alami terutama dari berbagai tumbuhan (Copping, 1996). Begitu pula, penggunaan obat-obatan tradisional di negara-negara berkembang dan negara maju secara signifikan meningkat dalam beberapa tahun ini (Balakumbahan, dkk., 2010). Salah satu tumbuhan yang dimanfaatkan sebagai obat adalah *A. calamus*.

A. calamus adalah tumbuhan obat yang dikenal dengan sebutan Vaj Turki dari famili Acoraceae (Shahzad, dkk., 2015). Selain itu, *A. calamus* juga dikenal sebagai akar calamus, calamus, rumput myrtel, akar myrtel dan bacch (Imam, dkk., 2013). Famili Acoraceae disebut sebagai keluarga Arum yang mengandung 115 genera dan 2.000 spesies, di mana sekitar 25 genera dan lebih dari 140 spesies telah digunakan di India (Saxena, 2006; Shahzad, dkk., 2015). Genus *Acorus* berasal dari kata "*Acoron*" yang berarti pupil mata dan "*calamus*" berasal dari kata Yunani "*calamos*" yang berarti alang-alang (Raja, dkk., 2009; Shahzad, dkk., 2015). Rimpang tumbuhan ini digunakan untuk keperluan pengobatan di Unani serta Ayurveda sejak zaman kuno (Balakumbahan, dkk., 2010; Chandra & Prasad, 2017).

A. calamus umumnya dikenal sebagai obat dalam sistem pengobatan tradisional. *A. calamus* baik dalam bentuk kering atau bubuk memiliki rasa pedas yang digunakan sebagai pengganti jahe, kayu manis dan pala (Balakumbahan, dkk., 2010). Selain itu, rimpang *A. calamus* mengandung minyak aromatik yang telah digunakan secara medis sejak zaman kuno hingga sekarang dan telah dipanen secara komersial (Shahzad, dkk., 2015). Terdapat empat jenis Calamus yang umum digunakan dalam pengobatan herbal selama ini, antara lain: tipe I *A. calamus* L. var. *americanus*, diploid Amerika; tipe II *A. calamus* L. var. *vulgaris* L. (var. *calamus*), triploid Eropa; tipe III dan tipe IV *A. calamus* L. var. *angustatus* Bess dan var. *versus* L., tetraploid subtropis (Khare, 2013). Hal tersebut juga diperkuat oleh pernyataan Mukherjee dkk (2007) & Subositi (2015) bahwa berdasarkan perbedaan kariotipe terdapat empat keragaman *A. calamus* yaitu : *A. calamus* varietas *americanus*: diploid, fertil dan dapat dijumpai di Amerika Utara hingga Siberia; *A. calamus* varietas *calamus*: triploid, steril dan dapat dijumpai di Eropa, Himalaya, India dan sebagian Amerika Serikat; *A. calamus* varietas *angustatus*: tetraploid, sebagian fertil dan dapat dijumpai di bagian timur dan

selatan Asia dari Jepang dan China hingga Malesiana: *A. calamus* varietas verus L.: tetraploid dan ekotipe tropis.

A. calamus tersebar luas di seluruh daerah tropis dan subtropis, terutama di India dan Sri Lanka. Tumbuhan ini dapat tumbuh liar atau dibudidayakan dan ditemukan di rawa-rawa, jalur pendakian Himalaya hingga 1800 m di Sikkim. Keberadaan tumbuhan ini melimpah di Traktat rawa-rawa Kashmir, Sirmoor, Manipur dan bukit Naga. Selain itu, *A. calamus* ini dibudidayakan di Koratagere di Karnataka. Tumbuhan ini akan tumbuh baik di tanah berlempung atau tanah aluvial di tepi sungai (Chandra & Prasad, 2017; Imam, dkk., 2013). Sehingga sekarang banyak ditemukan liar di pinggiran kolam dan sungai di sebagian besar Negara Inggris (Imam, dkk., 2013).

A. calamus merupakan tumbuhan herba tahunan dengan percabangan yang luas, tidak terbatas dan merambat, rimpang aromatik yang panjang, silindris, tebalnya hingga 2,5 cm, berwarna keunguan hingga coklat muda pada bagian luarnya dan putih di bagian dalamnya (Chandra & Prasad, 2017; Kumar, dkk., 2013). Menurut Mukherjee dkk (2007), rimpang tumbuhan ini adalah bagian terpenting untuk pengobatan. Rimpangnya berkayu, bercabang, beruas, baunya kuat, khas, aromatik dan rasanya pahit. Permukaan rimpang yang dipotong melintang terlihat berwarna krem dengan semburatan merah muda dan dapat dibedakan menjadi daerah kortikal dan stelar. Secara mikroskopis, bagian epidermis rimpang memiliki sel yang memanjang secara radial dengan dinding yang sangat tebal. Bagian kortikal terdiri atas sel parenkim berdinding tipis, memiliki ruang interselular yang besar, dan bercak serat. Sedangkan bagian stelar memiliki sel-sel endodermal berbentuk silindris tunggal dengan butiran pati yang melimpah. Sel-sel minyak berukuran besar berwarna kekuningan, kemudian sel-sel yang mengandung oleoresin berwarna coklat gelap, serta butiran pati yang tersebar di korteks dan stele.

A. calamus mempunyai daun yang tebal, tegak dan bentuknya mirip dengan permukaan iris tetapi ujung-ujungnya sedikit berkerut. *A. calamus* berdaun ramping panjang seperti rumput atau seperti pedang yang menyebar dan tumbuh hingga panjangnya mencapai 1,5 m. Daun *A. calamus* yang dipotong atau ditumbuk akan menghasilkan aroma manis, seperti bau jeruk keprok. Daun *A.*

calamus memiliki satu ibu tulang daun di tengah yang menonjol, kemudian pada kedua sisinya terdapat sedikit urat daun sekunder dan banyak urat daun tersier. Lebar daunnya antara 0,7 cm hingga 1,7 cm, namun pada umumnya berukuran 1 cm. Daun simpodial *A. calamus* lebih pendek dari daun vegetatifnya. Daunnya tak berbatas, berselang-seling, berwarna hijau dan bergelombang (Chandra & Prasad, 2017). Guratan daunnya berwarna putih kecoklatan, kenyal serta memiliki sedikit akar (Kumar, dkk., 2013; Raja, dkk., 2009; Shahzad, dkk., 2015).

Bunga dari *A. calamus* sangat jarang tumbuh, jika tumbuh panjang bunganya lebih dari 3-8 cm, berbentuk silinder agak melengkung, berwarna coklat kehijauan serta ditutupi oleh duri yang mengelilingi. Bunganya kecil, *sessile*, padat serta spadix (tongkol) berukuran 5-10 cm. Spadix, pada saat ekspansi, panjangnya dapat mencapai 4,9 cm hingga 8,9 cm. Benang sari dari bunga *A. calamus* berwarna kuning dan berukuran kecil (Arushi & Ravinder, 2014; Kirtikar & Basu, 2008; Prajapati, dkk., 2009; Shahzad, dkk., 2015). Musim berbunga berkisar antara awal hingga akhir musim panas tergantung pada garis lintangnya dan tumbuh liar di tempat berawa. *A. calamus* memiliki buah yang berbentuk kecil seperti beri dan terdapat sedikit biji didalamnya (Gambar 2.4) (Chandra & Prasad, 2017; Imam, dkk., 2013).



Gambar 2.4. Morfologi *A. calamus*. a). daun dan spadix *A. calamus* (Kumar, dkk., 2013), b). rimpang *A. calamus* (Chandra & Prasad, 2017)

2.3.2 Klasifikasi *A. calamus*

Klasifikasi dari *A. calamus* menurut Singh dkk (2011) adalah:

Kingdom	: Plantae
Sub Kingdom	: Tracheobionta
Super Divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Sub Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Liliopsida
Sub Kelas	: Arecida
Bangsa	: Arales
Suku	: Acoraceae
Marga	: Acorus
Spesies	: <i>Acorus calamus</i> L.

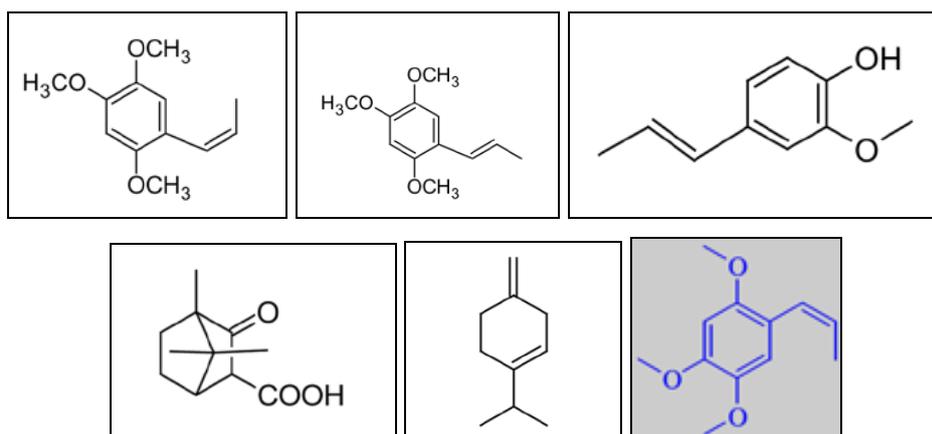
Setiap daerah memiliki sebutan yang berbeda-beda terhadap tumbuhan ini, antara lain: Jeringau (Indonesia), Daringo (Sunda), Dlingo (Jawa Tengah), Jharango (Madura), Jangu (Bali), Jerango (Gayo dan Batak), Jeurunger (Aceh), Jarianggu (Minangkabau), Kalamunga (Minahasa), Areango (Bugis), Ai wahu (Ambon), Bila (Buru), Kaliraga (Flores), Jeringo (Sasak), Jariangau (Kalimantan), Kareango (Makassar).

2.3.3 Kandungan Senyawa Kimia *A. calamus*

Studi fitokimia *A. calamus* yang telah dilakukan oleh Imam dkk (2013) menunjukkan keberadaan glikosida, flavonoid, saponin, tanin, senyawa polifenol, dan minyak atsiri. Selain itu, Tumbuhan ini telah dilaporkan adanya alkaloid dan minyak esensial yang mengandung calamen, clamenol, calameon, asarone dan sesquiterpen. Glikosida yang terkandung dalam *A. calamus* merupakan glikosida pahit yang disebut acorine yang berikatan dengan eugenol, pinene dan camphene (Chandra & Prasad, 2017; Kumar, dkk., 2013). Tumbuhan ini juga telah diteliti secara luas oleh peneliti lainnya dan ditemukan adanya kandungan kimia dari rimpang, daun dan akarnya yang meliputi β -asarone (Gambar 2.5a), α -asarone (Gambar 2.5b), elemicine, cisisoelemicine, cis dan trans isoeugenol (Gambar 2.5c) dan metil eter, camphene, P-cymene, α -selinene, β -gurjunene, β -cadinene, champor (Gambar 2.5d), terpinolen (Gambar 2.5e) dan calacorene, acorone,

acorenone (Gambar 2.5f), acoragermacrone, 2-deca-4,7 dienol, shyobunones, linalool dan preisocalamendiol (Chandra & Prasad, 2017; Imam, dkk., 2013).

A. calamus memiliki persentase senyawa aktif yang lebih tinggi pada β -asarone (11%), yang merupakan senyawa utama, kemudian diikuti oleh persentase dari camphene (2,27%), (E) β -ocimene (3,28%), camphor (1,54%), calarene (1,42%), α -selinene (5,02%) dan s-cadinol (2,00%) (Chandra & Prasad, 2017; Imam, dkk., 2013). Senyawa lain yang teridentifikasi dalam *A. calamus* adalah 4-terpineol, 2-allyl-5-ethoxy-4-methoxyphenol, epiudesmin, lisidin, spathulenol, borneol, furyletil keton, asam nonanoat, 2,2,5,5 tetramethyl-3-heksanol, bornil asetat, galgravin, retusin (9E, 12E, 15E)-9,12,15-octadecatrien-1-ol, butil butanoat, geranil asetat, sakuranin, asam asetat, isoelemicin, asam ursolic, asetofenon, asam dehidroabietik, isoeugenol metileter, apigenin 4, 7-dimetil ether, dehydroisoeugenol, elemicin dan asam linolenik (Balakumbahan, dkk., 2010). Persentase komponen kimia bervariasi tergantung pada bagian tumbuhan diekstraksi (Motley, 1994). β -asarone adalah konstituen utama dalam daun (27,4 hingga 45,5%), sedangkan acorenone dominan di rimpang (20,86%) diikuti oleh isocalamendiol (12,75%) (Chandra & Prasad, 2017; Imam, dkk., 2013).



Gambar 2.5. Fitokonstituen *A. calamus*. a). β -asarone, b). α -asarone, c). isoeugenol, d). champor, e). terpinolen (Mukherjee, dkk., 2007), f). acorenone (Balakumbahan, dkk., 2010)

2.3.4 Khasiat *A. calamus*

Bagian dari *A. calamus* yang biasa dimanfaatkan adalah daun, akar (rimpang) dan batang. Di Asia, *A. calamus* telah digunakan kurang lebih sejak 2000 tahunan. Orang-orang kuno Tiongkok menggunakannya untuk mengurangi pembengkakan dan sembelit (Chandra & Prasad, 2017). *A. calamus* memperlihatkan berbagai macam aktivitas farmakologisnya seperti aktivitas antibakteri, antijamur, antioksidan, efek bronkiodilatori, antidiabetes, antiinflamasi, antihepatotoksik, antimutagenik, hipolipidemik, insektisida, lucicidal, antiulcer, antidiare, aktivitas SSP, antikanker (Divya, dkk., 2011; Kumar, dkk., 2013), antispasmodik (Balakumbahan, dkk., 2010; Imam, dkk., 2013; Kumar, dkk., 2013), antihelmintik, imunomodulator, imunostimulan, antihipertensi, antioksidan, antipiretik dan karminatif (Imam, dkk., 2013). α -asarone dan β -asarone menunjukkan aktivitas antikanker terhadap sel-sel karsinoma manusia (Kumar, dkk., 2013; Palani, dkk., 2010).

A. calamus umumnya digunakan dalam sistem pengobatan tradisional negara-negara Asia dan Eropa (Chandra & Prasad, 2017). Rimpang calamus dimanfaatkan dalam berbagai keperluan pengobatan seperti memperbaiki nafsu makan, demam (Balakumbahan, dkk., 2010; Chandra & Prasad, 2017; Shahzad, dkk., 2015), gangguan saraf, nyeri dada, bronkitis (Chandra & Prasad, 2017), diare (Chandra & Prasad, 2017; Imam, dkk., 2013), kram perut, sakit gigi (Devi & Ganjewala, 2011; Divya, dkk., 2011; Muthulakshmi, dkk., 2015), menghilangkan rasa mual, obat penenang dan juga digunakan untuk pengobatan epilepsi, disentri, katarak dan tumor perut (Imam, dkk., 2013; Kirtikar & Basu, 2008).

Rimpang *A. calamus* digunakan dalam berbagai keperluan pengobatan baik secara internal maupun eksternal. Pada rematik, demam dan radang sendi, pasta *A. calamus* dapat dioleskan secara eksternal untuk meringankan rasa sakit dan pembengkakan. *A. calamus* yang dimanfaatkan secara internal juga digunakan dalam berbagai macam penyakit. Serbuk *A. calamus* yang diberi air garam suam-suam kuku dapat menginduksi muntah dan mengurangi dahak, sambil meredakan batuk dan asma. Dalam pengobatan epilepsi, kombinasi serbuk *A. calamus* dengan madu akan bekerja lebih baik. Dalam praktek pengobatan Unani, pemberian ramuan ini sangat baik dalam meningkatkan memori, penerimaan serta penghantar

stimulus. Selain itu, ramuan ini dapat merangsang kontraksi uterus, sehingga dapat menambah reaksi dalam persalinan dan bermanfaat dalam dismenore (Imam, dkk., 2013; Nadkarni, 2006). Sedangkan dalam sistem pengobatan Ayurvedic, rimpang *A. calamus* dianggap memiliki aroma yang khas, sebagai stimulan, tonik pahit, emesis, ekspektoran, emmenagogue, afrodisiak, pencahar dan diuretik. Rimpang dapat diolah dalam berbagai bentuk seperti bubuk, balsem, enema, kapsul dan lain sebagainya (Imam, dkk., 2013; Kirtikar, & Basu, 2008; Mukherjee, dkk., 2007).

2.4 Jamu subur kandungan

Jamu berasal dari bahasa Jawa kuno yaitu “*jampi*” atau “*usodo*”. Jamu memiliki arti pemulihan kesehatan dengan menggunakan segala bentuk ramuan obat-obatan ataupun doa-doa (Djojoseputro, 2012). Jamu adalah produk racikan bahan alam yang dimanfaatkan untuk memelihara kesehatan, mencegah penyakit, mengobati berbagai penyakit, menjaga kebugaran tubuh dan kecantikan. Jamu diracik dari bahan-bahan alami, seperti bagian-bagian dari suatu tumbuhan, yaitu rimpang, daun, bunga, buah dan kulit batang. Namun, ada pula jamu yang menggunakan bagian-bagian dari tubuh hewan (Adawiyah, 2013). Jamu merupakan warisan turun temurun bangsa Indonesia yang masih menjadi primadona dan memberikan dampak positif bagi kesehatan di berbagai lapisan masyarakat, bahkan masyarakat Madura selalu menjaga kesehatan tubuh mereka dengan mengkonsumsi jamu tradisional atau ramuan herbal (Mudjijono, dkk., 2014).

Masyarakat Madura mempercayai bahwa mengkonsumsi jamu hendaknya minimal sekali atau maksimal dua kali dalam seminggu setiap hari senin dan kamis, karena hari tersebut dianggap paling baik diantara hari-hari lainnya. Jamu Madura hingga saat ini masih eksis dan bagus. Minum jamu sudah menjadi kebiasaan masyarakat Madura, bahkan mereka sudah membiasakan anak-anak mereka dengan mengkonsumsi jamu sejak kecil, terutama di kalangan wanita untuk tetap menjaga kesehatan tubuh, khususnya organ reproduksi. Salah satu jamu yang terkenal dari Madura adalah jamu subur kandungan. Jamu ini sudah dikenal publik akan khasiat dan keistimewaannya. Pemasarannya telah sampai di

seluruh penjuru Indonesia seperti Surabaya, Malang, Jakarta dan kota-kota lainnya, bahkan sudah sampai ke luar negeri (Mudjijono, dkk., 2014).

Jamu subur kandungan ini diproduksi oleh PT. Ribkah Maryam Jokotole Bangkalan, Madura. Pemilik jamu ini adalah warga asli Madura yaitu Ibu Maryam (Gambar 2.6). Jamu subur kandungan asal Madura memiliki komposisi utama yaitu *A. sativum*, *C. manga* dan *A. calamus* (Mughtaromah, dkk., 2019; Mudjijono, dkk., 2014). Jamu subur kandungan kaya akan manfaat antara lain membantu memperkuat otot-otot rahim agar tidak mudah gugur, menyehatkan badan dan rahim, menyuburkan organ reproduksi agar mudah untuk dibuahi, membantu menormalkan siklus hormonal wanita, memperbanyak produksi sel telur pada ovarium dan mencegah keguguran. Selain itu, mengkonsumsi jamu subur kandungan dapat menghilangkan rasa lelah, melancarkan peredaran darah dan menormalkan siklus menstruasi. Racikan jamu subur kandungan ini diminum setelah masa menstruasi setiap hari selama sebulan. Sedangkan untuk perawatan, jamu ini cukup diminum dua kali dalam seminggu. Adapun reaksi dingin dalam tubuh saat meminum jamu ini akibat dari rimpang temu manga yang merupakan salah satu bahan dalam jamu subur kandungan ini (Mudjijono, dkk., 2014).

Nabi Muhammad Saw pernah menganjurkan pada ummatnya untuk menikah dengan wanita yang dapat mewujudkan mawaddah dan rohmah dalam kehidupan rumah tangganya nanti. Rosululloh Saw bersabda:

تَزَوَّجُوا الْوَدُودَ الْوَلُودَ إِنِّي مُكَاثِرُ الْأَنْبِيَاءِ يَوْمَ الْقِيَامَةِ

Artinya: “Menikahlah dengan wanita yang waduud dan waluud, karena aku bangga terhadap jumlah ummatku yang banyak di hadapan para nabi di hari kiamat”. (HR. Ahmad, 3/158, Ibnu Hibban dengan tartib Ibnu Bulban, 9/338, no. 4028, Al-Baihaqi, 7/81, Ath-Thabrani dalam kitab Al-Ausath, 5/207. Dishohihkan oleh Al-Albani Rahimahullohu Ta’alaa dalam Al-Irwa’, 6/195, no. 1783).

Al-waduud dalam hadits ini memiliki arti seorang wanita yang pecinta terhadap suaminya. Sedangkan makna Al-waluud adalah wanita yang dapat melahirkan banyak anak. Kedua sifat tersebut saling berkaitan, karena apabila salah satu dari dua sifat tersebut tidak ada pada wanita tersebut, maka dapat menyebabkan berkurangnya kecintaan suami terhadapnya. Seorang wanita yang

dapat melahirkan banyak anak dan penyayang berarti wanita tersebut tergolong wanita yang rahimnya kokoh atau subur, sehingga memperbanyak jumlah umat Nabi Muhammad Saw (Al-Jauziyah, 2000).



Gambar 2.6. Jamu subur kandungan Ribkah Jokotole (Mudjijono, dkk., 2014)

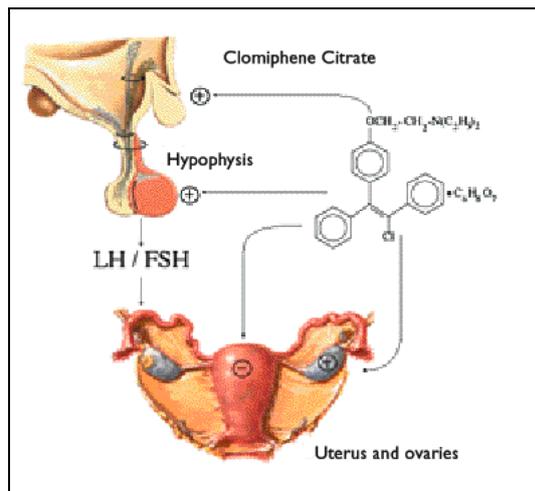
Jamu telah diterima di kalangan masyarakat untuk pengobatan, namun belum tentu diterima oleh kalangan medis sebagai alternatif obat. Inilah yang mendorong keberadaan program saintifikasi jamu. Saintifikasi ini berperan untuk pendeteksi keamanan bahan jamu, khususnya dari segi formulasi, distribusi, mutu dan budidayanya. Dengan adanya saintifikasi ini, pemanfaatan jamu atau obat tradisional dapat dikonsumsi sesuai dosis dan dapat dipertanggung jawabkan secara ilmiah dan memenuhi indikasi medis. Budidaya tanaman obat berbeda dengan budidaya tanaman pangan, karena pada budidaya tanaman obat diharapkan selain biomassa juga keberadaan senyawa bioaktifnya. Sehingga untuk mendapatkan pembuktian akurat, maka harus mempertimbangkan dan memperhatikan kualitas bahan baku (Siswanto, 2013).

2.5 Klomifen sitrat

Disfungsi ovulasi adalah salah satu penyebab paling umum kegagalan reproduksi pada wanita infertil. Infertilitas anovulasi dapat diakibatkan karena sindrom ovarium polikistik (PCOS), obesitas, disfungsi hipotalamus, stres,

hiperprolaktinemia, tumor hipofisis atau penyakit tiroid pada manusia (Chaube, dkk., 2014). Salah satu pengobatan untuk menyembuhkan kondisi tersebut adalah dengan induksi ovulasi yang dapat merangsang oosit dewasa. Selama ini, agen induksi ovulasi yang biasa digunakan di Indonesia adalah klomifen sitrat. Obat ini memiliki tingkat keberhasilan ovulasi yang relatif tinggi, sekitar 50-75% (Wiweko, dkk., 2016).

Klomifen sitrat adalah modulator reseptor estrogen selektif non-steroid (SERM) yang memiliki sifat agonis dan antagonis terhadap estrogen (Zakaria, dkk., 2018). Klomifen sitrat merupakan obat yang paling umum digunakan untuk induksi ovulasi, karena harganya yang murah, sangat efektif dan ramah penggunaannya. Klomifen sitrat ini pertama kali disintesis pada tahun 1956 dan telah tersedia secara komersial sejak tahun 1961 (Sovino, dkk., 2002). Obat antiestrogen ini berkompetisi dengan estrogen endogen pada sisi pengikatan reseptornya dengan memblokir reseptor di hipotalamus dan hipofisis, sehingga mengganggu mekanisme umpan balik estrogen endogen pada hipofisis dan hipotalamus. Hasilnya adalah peningkatan sekresi FSH dan LH oleh hipofisis, yang merangsang produksi folikel ovarium dan ovulasi (Gambar 2.7). Induksi ovulasi medis dengan klomifen sitrat saat ini merupakan pengobatan tingkat awal untuk anovulasi (Brown & Farquhar, 2016; Brown, dkk., 2009; Hashim, 2012; Tarlatzis, dkk., 2008; Vause, dkk., 2010). Sekitar 7% kehamilan yang dihasilkan dari ovulasi yang diinduksi oleh klomifen sitrat menghasilkan kehamilan kembar, dan 0,5% menghasilkan kehamilan triplet (Brown & Farquhar, 2016; Wolf, 2000).

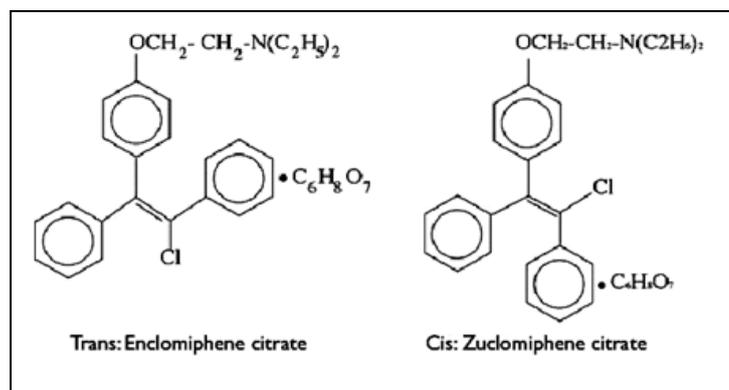


Gambar 2.7. Mekanisme kerja obat klomifen sitrat (Sovino, dkk., 2002)

Berdasarkan susunan kimianya, klomifen sitrat adalah turunan trifenilen yang memiliki kemiripan struktural dengan dietilboestrol. Klomifen memiliki dua bentuk isomer, yaitu cis dan trans, yang dalam nomenklaturinya saat ini masing-masing adalah zuclomiphene dan enclomiphene (Gambar 2.8). Aktivitas zuclomiphene sebagian besar bersifat anti-estrogenik (antagonis), sedangkan enclomiphene memiliki efek estrogenik (agonis). Sifat agonis estrogen terlihat hanya jika tingkat estrogen endogen sangat rendah. Kalau tidak, klomifen sitrat bertindak sebagai antagonis estrogen (Chaube, dkk., 2014). Pada racikan komersial, obat ini mengandung 40% zuclomiphene dan 60% enclomiphene (Sovino, dkk., 2002). Zuclomiphene diketahui jauh lebih kuat dari enclomiphene untuk menginduksi ovulasi. Zuclomiphene memiliki waktu paruh yang lebih lama daripada enclomiphene, hal ini dapat dideteksi keberadaannya dalam plasma 1 bulan setelah pemberiannya (Hashim, 2012).

Penggunaan umum klomifen sitrat adalah selama 5 hari dari hari kedua atau ketiga siklus menstruasi. Dosis harian dari klomifen sitrat yang disarankan adalah 50 mg hingga 100 mg dengan maksimum 250 mg (Brown & Farquhar, 2016; Hashim, 2012). Pemberian obat ini dapat dimulai dengan dosis 50 mg/hari kemudian meningkat menjadi 250 mg/hari. Namun pada umumnya menunjukkan bahwa dosis paling efektif adalah 100-150 mg/hari dan lebih dari 75% ovulasi terjadi dalam dosis tersebut (Hashim, 2012).

Banyak metode yang mengusulkan pasien mulai mengonsumsi klomifen sitrat pada hari ke 5 dari siklus menstruasi. Berdasarkan fisiologis ovarium, klomifen sitrat menginduksi peningkatan gonadotropin pada hari ke 5-9 dari siklus, yaitu ketika folikel dipilih. Pematangan folikel yang dimulai pada saat itu ditandai dengan perkembangan folikel preovulasi, peningkatan sirkulasi estrogen, gelombang preovulasi LH dan pelepasan LH yang mengarah ke ovulasi dengan tingkat progesteron postovulasi yang tinggi. Klomifen tidak dianjurkan selama kehamilan, karena dapat menyebabkan kelainan bawaan. Hal ini juga dikontraindikasikan pada penyakit hati kronis, karena pembersihan obat melalui hati, dan pengidap kista ovarium fungsional, karena dapat mengakibatkan tumbuh lebih besar. Selain itu, tidak dianjurkan pada pasien ovulasi normal, karena pemberiannya dapat menyebabkan gangguan yang mengarah pada penurunan kesuburan (Sovino, dkk., 2002).



Gambar 2.8. Komponen obat klomifen sitrat (Sovino, dkk., 2002)

2.6 Ekstraksi

Ekstraksi adalah pemisahan bagian tumbuhan yang aktif menggunakan pelarut selektif melalui prosedur terstandar. Tujuan dari semua metode ekstraksi adalah untuk memisahkan metabolit tumbuhan yang larut dengan tidak larut (residu) (Azwanida, 2015). Secara umum, semakin halus ukuran partikel, semakin baik hasil ekstraksinya. Efisiensi ekstraksi akan ditingkatkan oleh ukuran partikel kecil karena peningkatan penetrasi pelarut dan difusi zat terlarut. Namun, ukuran

partikel yang terlalu halus akan menyebabkan absorpsi zat terlarut dalam jumlah besar dan kesulitan dalam penyaringan berikutnya (Zhang, dkk., 2018).

Ekstraksi memiliki berbagai macam metode, yaitu metode ekstraksi konvensional yang meliputi maserasi (Pandey, dkk., 2014; Zhang, dkk., 2018), perkolasi, refluks (Zhang, dkk., 2018), infusa, digestasi, sokletasi dan dekokta (Pandey, dkk., 2014). Metode tersebut biasanya menggunakan pelarut organik, membutuhkan pelarut dengan volume besar dan waktu ekstraksi yang lama. Sedangkan metode ekstraksi modern meliputi ekstraksi super critical fluid (SFC), ekstraksi cair bertekanan (PLE) dan ekstraksi dengan bantuan gelombang mikro (MAE). Metode tersebut telah diterapkan dalam ekstraksi produk alami, dan memiliki beberapa keuntungan seperti penggunaan pelarut organik yang lebih rendah, waktu ekstraksi lebih pendek dan selektivitas lebih tinggi. Beberapa metode ekstraksi yang umum digunakan akan dibahas di bawah ini (Azwanida, 2015).

Ekstraksi produk alami berlangsung melalui tahap-tahap berikut: (1) pelarut menembus ke dalam matriks padat; (2) zat terlarut larut dalam pelarut; (3) zat terlarut berdifusi keluar dari matriks padat; (4) zat terlarut hasil ekstraksi dikumpulkan (Zhang, dkk., 2018). Parameter dasar yang mempengaruhi kualitas ekstrak adalah bagian tanaman dan pelarut yang digunakan untuk prosedur ekstraksi. Sedangkan hal-hal yang akan mempengaruhi kuantitas dan komposisi metabolit sekunder dari suatu ekstrak tergantung pada jenis ekstraksi, waktu ekstraksi, suhu, sifat pelarut, konsentrasi pelarut dan polaritas (Pandey, dkk., 2014).

Pemilihan pelarut sangat penting untuk ekstraksi. Selektivitas, kelarutan, biaya dan keamanan harus dipertimbangkan dalam pemilihan pelarut. Berdasarkan hukum kesamaan dan intermiscibilitas, pelarut yang nilai polaritasnya dekat dengan polaritas zat terlarut cenderung berkinerja lebih baik dan sebaliknya (Zhang, dkk., 2018). Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi komponen aktif adalah air, etanol, metanol, kloroform, eter, dan aseton (Pandey, dkk., 2014). Alkohol (EtOH dan MeOH) adalah pelarut universal dalam ekstraksi pelarut untuk mendeteksi fitokimia (Zhang, dkk., 2018).

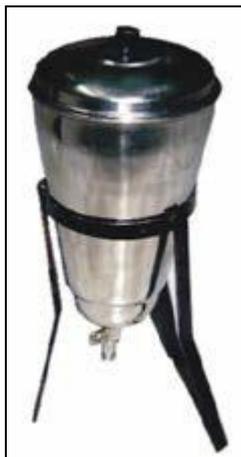
2.6.1 Metode Ekstraksi

2.6.1.1 Maserasi

Maserasi adalah teknik ekstraksi yang sangat sederhana yang digunakan dalam pembuatan wine dan telah diadopsi dalam penelitian tanaman obat. Maserasi melibatkan proses perendaman bahan tanaman (kasar atau bubuk) dalam wadah tertutup menggunakan pelarut dan dibiarkan pada suhu kamar selama minimal 3 hari dengan agitasi yang sering. Proses tersebut dimaksudkan untuk melunakkan dan menghancurkan dinding sel tanaman agar terlepas fitokimia terlarutnya. Setelah 3 hari, campuran ditekan atau disaring dengan saringan (Azwanida, 2015; Handa, dkk., 2008). Maserasi memiliki kekurangan yaitu waktu ekstraksi yang lama dan efisiensi ekstraksi yang rendah. Metode ini dapat digunakan untuk ekstraksi komponen termolabil dan efektif untuk ekstraksi senyawa fenolik (Pandey, dkk., 2014; Zhang, dkk., 2018).

2.6.1.2 Perkolasi

Perkolasi adalah prosedur yang paling sering digunakan untuk mengekstrak bahan aktif dalam persiapan tingtur dan ekstrak cair. Perkolator (bejana sempit berbentuk kerucut terbuka di kedua ujungnya) merupakan alat yang umum digunakan pada metode ini (Gambar 2.9) (Azwanida, 2015). Bahan-bahan padat dibasahi dengan sejumlah menstrum yang ditentukan dan dibiarkan selama sekitar 4 jam dalam wadah tertutup. Setelah itu, bahan hasil rendaman diletakkan pada perkolator dan bagian atas perkolator ditutup. Menstrum kembali ditambahkan untuk membentuk lapisan dangkal di atas bahan hasil rendaman dan campuran dibiarkan memaserasi dalam perkolator tertutup selama 24 jam. Saluran perkolator kemudian dibuka dan cairan yang terkandung di dalamnya dibiarkan menetes perlahan. Menstrum ditambahkan kembali sesuai kebutuhan, sampai ukuran perkolat sekitar tiga perempat volume yang dibutuhkan dari produk jadi (De Silva, dkk., 2017; Handa, dkk., 2008; Pandey, dkk., 2014). Perkolasi lebih efisien daripada maserasi karena terdapat proses kontinu dari pelarut jenuh yang secara terus-menerus digantikan oleh pelarut segar (Zhang, dkk., 2018).



Gambar 2.9. Percolator (Azwanida, 2015)

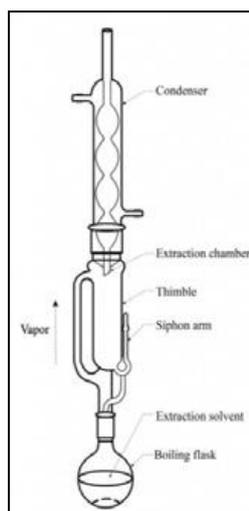
2.6.1.3 Refluks

Ekstraksi refluks adalah ekstraksi yang lebih efisien daripada perkolasi atau maserasi. Ekstraksi refluks membutuhkan waktu ekstraksi dan pelarut yang lebih sedikit. Namun, tidak dapat digunakan untuk ekstraksi produk alami termolabil (Zhang, dkk., 2018). Pada metode ini, bahan tanaman dimasukkan dengan pelarut ke dalam labu yang telah dihubungkan dengan kondensor. Pelarut yang digunakan dipanaskan hingga mendidih. Uap akan terkondensasi dan kembali ke labu (Mukhriani, 2014).

2.6.1.4 Sokletasi

Ekstraksi soklet adalah metode ekstraksi kontinu otomatis dengan efisiensi ekstraksi yang tinggi, serta membutuhkan lebih sedikit waktu dan pelarut daripada maserasi atau perkolasi. Sehingga metode ini dapat dikatakan sebagai metode integrasi ekstraksi refluks dan perkolasi (Zhang, dkk., 2018). Ekstraksi soklet hanya diperlukan jika senyawa yang diinginkan memiliki kelarutan terbatas dalam pelarut dan residu tidak larut dalam pelarut itu. Jika senyawa yang diinginkan memiliki kelarutan tinggi dalam pelarut, maka filtrasi sederhana dapat digunakan untuk memisahkan senyawa dari zat yang tidak larut. Metode ini tidak dapat digunakan untuk senyawa termolabil karena pemanasan yang lama dapat menyebabkan degradasi senyawa (Pandey, dkk., 2014). Dalam metode ini, sampel yang ditumbuk halus ditempatkan dalam kantong berpori atau “*thimble*” yang terbuat dari kertas saring atau selulosa yang kuat, kemudian diletakkan di ruang

bidal dari peralatan soklet (Gambar 2.10). Pelarut ekstraksi dipanaskan dalam labu bawah, dibiarkan menguap ke dalam bidal sampel dan mengembun dalam kondensor. Ketika cairan mencapai lengan pipa siphon, isi cairan dikosongkan ke labu bawah lagi dan proses dilanjutkan (Azwanida, 2015).



Gambar 2.10. Ekstraktor soklet tradisional (Azwanida, 2015)

2.6.1.5 Infusa

Infusa menggunakan prinsip yang sama seperti maserasi, yaitu bahan tanaman direndam dalam air dingin atau air rebusan. Namun, periode perendaman untuk infusa lebih pendek dan sampel direbus dalam volume air tertentu (misalnya. 1:4 atau 1:16) (Azwanida, 2015; Handa, dkk., 2008; Pandey, dkk., 2014).

2.6.1.6 Dekoktasi

Dekoktasi hanya cocok untuk mengekstraksi senyawa yang larut dalam air dan stabil terhadap panas, bahan tanaman keras (misalnya Akar dan kulit kayu) dan biasanya menghasilkan lebih banyak senyawa yang larut dalam minyak dibandingkan dengan maserasi dan infusa (Azwanida, 2015). Dekoktasi tidak dapat digunakan untuk ekstraksi komponen termolabil atau volatil (Zhang, dkk., 2018). Prosedur dalam metode ini adalah bahan tanaman direbus dalam air dengan

rasio misalnya 1:4 atau 1:16 dan dengan durasi yang ditentukan kurang lebih 15 menit, kemudian didinginkan dan disaring (Handa, dkk., 2008).

2.6.1.7 Pressurized Liquid Extraction (PLE)

Pressurized Liquid Extraction (PLE) telah dideskripsikan sebagai ekstraksi pelarut yang dipercepat, ekstraksi pelarut yang ditingkatkan, ekstraksi cairan bertekanan, ekstraksi cairan yang dipercepat, dan ekstraksi pelarut bertekanan tinggi oleh berbagai kelompok penelitian. PLE menerapkan tekanan tinggi dalam ekstraksi. Tekanan tinggi ini menjaga pelarut dalam keadaan cair di atas titik didihnya yang dapat menghasilkan kelarutan tinggi dan tingkat difusi tinggi. Penggunaan metode PLE dapat mengurangi waktu ekstraksi dan penggunaan pelarut serta memiliki pengulangan yang lebih baik dibandingkan dengan metode lain. Namun PLE memiliki kekurangan yaitu tidak dapat digunakan untuk mengekstraksi senyawa termolabil karena suhu ekstraksi yang tinggi. Ekstraksi ini telah berhasil diterapkan oleh para peneliti di Universitas Makau dan lembaga lainnya dalam mengekstraksi banyak jenis produk alami termasuk saponin, flavonoid dan minyak atsiri (Zhang, dkk., 2018).

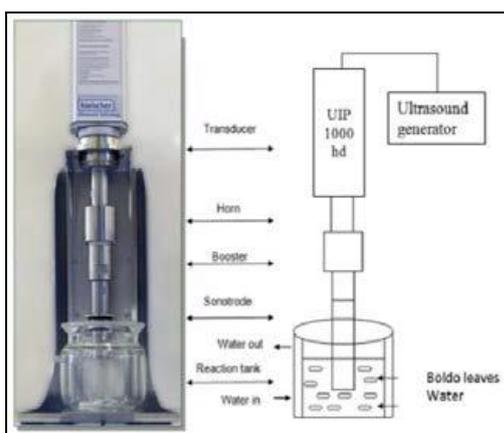
2.6.1.8 Microwave Assisted Extraction (MAE)

Microwave Assisted Extraction (MAE) adalah metode ekstraksi modern. Dalam metode MAE, energi gelombang mikro memfasilitasi pemisahan bahan aktif tanaman ke dalam pelarut. Gelombang mikro memiliki medan listrik dan magnet yang saling tegak lurus. Medan listrik menghasilkan panas melalui rotasi dipolar dan konduksi ionik. Berbeda dengan metode klasik, ekstraksi dengan bantuan gelombang mikro memanaskan seluruh sampel secara bersamaan. Selama ekstraksi, panas memutuskan ikatan hidrogen yang lemah karena rotasi dipol molekul dan migrasi ion terlarut meningkatkan penetrasi pelarut ke dalam sampel atau matriks (De Silva, dkk., 2017). Penerapan MAE memberikan banyak keuntungan, seperti meningkatkan hasil ekstrak, mengurangi degradasi termal dan pemanasan selektif bahan tumbuhan. MAE juga dikenal sebagai teknologi ramah lingkungan karena mengurangi penggunaan pelarut organik. Ada dua jenis metode MAE yaitu ekstraksi bebas pelarut (biasanya untuk senyawa volatil) dan ekstraksi pelarut (biasanya untuk senyawa non-volatil). Kondisi MAE dioptimalkan sebagai

berikut: 65% metanol sebagai pelarut ekstraksi, daya gelombang mikro 200 W dan waktu ekstraksi 260 detik (Zhang, dkk., 2018).

2.6.1.9 *Ultrasonic Assisted Extraction (UAE)*

Ekstraksi dengan bantuan ultrasonik (UAE) adalah teknik canggih yang memiliki kemampuan mengekstraksi sejumlah besar senyawa bioaktif dalam waktu ekstraksi yang lebih singkat (De Silva, dkk., 2017). Ekstraksi dengan bantuan ultrasonik (UAE) ini disebut sebagai ekstraksi ultrasonik atau sonikasi. Ekstraksi ini menggunakan energi gelombang ultrasonik dalam proses ekstraksinya. Ultrasonik dapat mempercepat disolusi dan difusi zat terlarut serta perpindahan panas yang dapat meningkatkan efisiensi ekstraksi. UAE melibatkan penggunaan ultrasound mulai dari 20 kHz hingga 2000 kHz. Efek mekanis kavitasi akustik dari USG meningkatkan kontak permukaan antara pelarut, sampel dan permeabilitas dinding sel (Azwanida, 2015). Keuntungan lain dari UAE termasuk sedikit penggunaan pelarut dan konsumsi energi, begitu pula suhu dan waktu ekstraksinya. UAE berlaku untuk ekstraksi senyawa termolabil dan non termolabil. UAE umumnya digunakan dalam ekstraksi banyak jenis produk alami (Gambar 2.11) (Zhang, dkk., 2018).



Gambar 2.11. Mesin UAE (Azwanida, 2015)

2.6.2 Pelarut Etanol

Metode ekstraksi yang umum dan sederhana yang biasa digunakan untuk mengetahui senyawa aktif dalam tumbuhan, seperti senyawa fenol, flavonoid bahkan antioksidan adalah metode ekstraksi menggunakan pelarut. Prosedur metode ini mudah dilakukan dan tingkat konsumsinya rendah. Pelarut ekstraksi yang digunakan antara lain pelarut non polar dan polar. Pelarut non polar yaitu etil asetat, kloroform, dan n-butanol, sedangkan pelarut polar termasuk air, metanol, dan etanol (Sun, dkk., 2015).

Keberadaan pelarut sangat penting untuk ekstraksi ini. Selektivitas, kelarutan, biaya dan keamanan harus dipertimbangkan dalam pemilihan suatu pelarut. Berdasarkan hukum kesamaan dan intermiscibilitas (seperti suka larut), pelarut dengan nilai polaritas dekat dengan polaritas zat terlarut cenderung memiliki kinerja lebih baik dan begitu pula sebaliknya. Alkohol (EtOH dan MeOH) adalah pelarut polar yang umum digunakan dalam metode ekstraksi dengan pelarut untuk analisis fitokimia (Zhang, dkk., 2018).

Etanol adalah golongan alkohol yang mudah terbakar, menguap dan tidak memiliki warna. Etanol merupakan sejenis cairan yang digunakan dalam sehari-hari, baik di dunia medis, industri dan lain sebagainya. Etanol tergolong sebagai alkohol berantai tunggal yang memiliki rumus kimia C_2H_5OH . Pelarut etanol ini merupakan isomer konstitusional dari dimetil eter. Departemen kesehatan RI menyarankan penggunaan etanol sebagai pelarut ekstraksi untuk keperluan yang berkaitan dengan pembuatan obat herbal, karena Harbone (1987) menyatakan bahwa etanol adalah pelarut yang baik dan tepat untuk ekstraksi.

Begitu pula menurut Sinambela (2003), ekstraksi tumbuhan obat menggunakan pelarut etanol adalah pemilihan yang tepat untuk standarisasi obat herbal. Etanol sangat efektif digunakan untuk ekstraksi karena mampu menghasilkan senyawa aktif yang optimal. Penggunaan etanol ini diharapkan senyawa-senyawa atau antioksidan yang dihasilkan dari ekstraksi dapat diaplikasikan pada makanan, minuman dan obat-obatan, sehingga aman dikonsumsi. Berbeda dengan methanol yang dapat bersifat toksik (Voight, 1994).

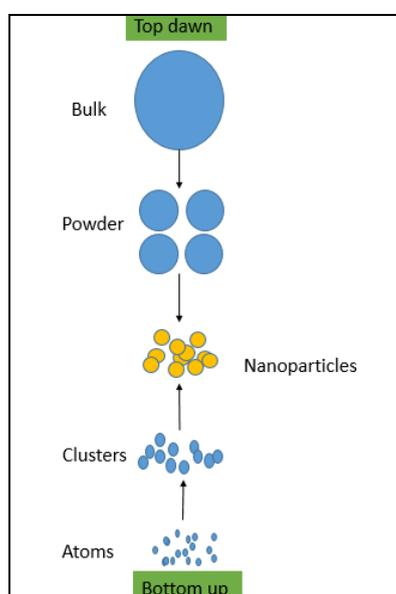
2.7 Nanopartikel

Nanoteknologi adalah ilmu tentang hal yang kecil, bahkan sangat kecil. Nanoteknologi merupakan teknologi yang memanfaatkan penggunaan atau manipulasi materi pada skala kecil. Studi Nanoteknologi dan *Nanoscience* telah muncul dengan cepat selama beberapa tahun terakhir di berbagai bidang. Nanoteknologi tidak harus dilihat sebagai teknik tunggal yang hanya memengaruhi area tertentu. Meskipun sering disebut sebagai “*ilmu kecil*”, nanoteknologi tidak hanya berarti struktur dan produk yang sangat kecil (Hagens, dkk., 2007). Nanopartikel farmasi didefinisikan sebagai nanopartikel pembawa obat padat, berukuran submikron (kurang dari 100 nm) yang mungkin dapat terurai secara alami (Pal, dkk., 2011).

Nano berasal dari bahasa Yunani, yaitu “*nanos*” yang berarti “*kurcaci*”. Sebutan ini menjadi semakin umum dalam literatur ilmiah. “*Nano*” sekarang merupakan label yang populer dalam bidang sains modern, dan baru-baru ini banyak kata “*nano*” yang muncul dalam kamus, termasuk nanometer, skala nano, teknologi nano, struktur nano, tabung nano, kawat nano, dan nanorobot. Namun, ada pula kata yang belum dikenal secara luas yang digunakan dalam publikasi ilmiah seperti sains dan alam. Kata tersebut termasuk nanoelektronik, nanokristal, *nanovalve*, nanoantenna, *nanocavity*, *nanoscaffolds*, nanofiber, nanomagnet, *nanoarray*, nanolitografi, *nanopatterning* dan nanoenkapsulasi. Nanopartikel adalah partikel yang sangat kecil yang memiliki kemampuan untuk masuk dan bertranslokasi dalam organisme hidup. Kemampuan ini dihasilkan dari ukurannya yang kecil yang memungkinkan untuk menembus hambatan fisiologis dan berjalan dalam sistem peredaran darah suatu individu (Buzea, dkk., 2007).

Nanopartikel memiliki dimensi lebih kecil dari 1 μm . Nanopartikel memiliki sifat yang unik dibandingkan dengan materi yang berukuran besar, hal ini karena adanya penurunan dimensi ke tingkat atom. Nanopartikel dapat memiliki bentuk amorf atau Kristal. Pada tingkat tertentu, nanopartikel dianggap sebagai materi dengan keadaan yang berbeda, yaitu keadaan padat, cair, gas, dan plasma. Contoh bahan dalam bentuk nanopartikel kristal adalah fullerene dan nanotube karbon, sedangkan bentuk padat kristal adalah grafit dan berlian (Buzea, dkk., 2007). Nanopartikel disintesis melalui penurunan ukuran menggunakan

metode *top-down* seperti penggilingan, homogenisasi tekanan tinggi dan proses sonikasi atau *bottom-up* seperti presipitasi reaktif dan perpindahan pelarut (Divya & Jisha, 2018; Vauthier, dkk., 2003). Pada metode yang pertama yaitu metode pemecahan (*top-down*), kekuatan eksternal diterapkan pada padatan yang akan dipecah menjadi partikel yang lebih kecil. Yang kedua adalah metode penumpukan (*bottom-up*) yang menghasilkan nanopartikel yang berasal dari gas atom atau cairan berdasarkan transformasi atom atau kondensasi molekuler (Gambar 2.12) (Horikoshi & Serpone, 2013).



Gambar 2.12. Metode pembuatan nanopartikel (Usman, dkk., 2019)

Metode *top-down* adalah metode memecah zat padat. Metode ini dapat dibagi menjadi pemecahan kering dan basah. Metode pemecahan kering yaitu zat padat tergilas sebagai hasil dari guncangan, kompresi, atau gesekan. Di sisi lain, pemecahan basah dari substrat padat dilakukan menggunakan pemecahan bantalan jatuh, pemecahan fluida sentrifugal, pemecahan butiran yang mengagitasi, pemecahan butiran saluran derek, dan lain sebagainya. Dibandingkan dengan metode kering, metode basah cocok untuk mencegah kondensasi nanopartikel yang terbentuk dan dengan demikian memungkinkan untuk mendapatkan nanopartikel yang sangat terdispersi. Sedangkan pendekatan metode *bottom-up*

secara umum dibagi menjadi metode fase gas dan metode fase cair. Meskipun metode fase gas meminimalkan terjadinya pengotor organik dalam partikel dibandingkan dengan metode fase cair, metode fase gas masih memerlukan penggunaan peralatan vakum yang rumit dengan kerugiannya adalah biaya yang tinggi dan produktivitas yang rendah (Horikoshi & Serpone, 2013).

Nanopartikel umumnya diidentifikasi berdasarkan ukuran, morfologi dan muatan permukaannya, menggunakan teknik mikroskopis canggih seperti pemindaian mikroskop elektron (SEM), mikroskop elektron transmisi (TEM) dan mikroskop kekuatan atom (AFM). Rata-rata diameter partikel, distribusi ukuran dan muatannya mempengaruhi stabilitas fisik dan distribusi *in vivo* dari nanopartikel. Teknik mikroskop elektron sangat berguna dalam memastikan bentuk keseluruhan nanopartikel polimer yang juga dapat menentukan toksisitasnya. Muatan permukaan nanopartikel mempengaruhi stabilitas fisik, redispersibilitas dispersi polimer serta kinerja *in vivo* (Pal, dkk., 2011).

Nanopartikel umumnya diklasifikasikan berdasarkan dimensi, morfologi, komposisi, keseragaman, dan aglomerasi. Berdasarkan morfologi, ada beberapa hal yang harus dipertimbangkan seperti kerataan, kebulatan, dan rasio. Nanopartikel rasio aspek tinggi termasuk *nanotube* dan kawat nano dengan berbagai bentuk, seperti heliks, zig-zag dan sabuk dengan panjang yang berbeda. Morfologi rasio aspek kecil meliputi bola, oval, kubik, prisma, heliks, atau pilar (Buzea, dkk., 2007). Nanopartikel diklasifikasikan menjadi nanopartikel organik dan anorganik (Divya & Jisha, 2018; Whitesides, 2003). Kelompok nanopartikel organik termasuk misel, dendrimer, liposom, hibrida dan nanopartikel polimer kompak. Kelompok nanopartikel anorganik termasuk *fullerene*, titik kuantum, silika dan nanopartikel emas (Cartaxo, 2018).

Selain di atas, Ada banyak pendekatan lainnya untuk mengklasifikasikan nanopartikel. Nanopartikel diklasifikasikan berdasarkan satu, dua dan tiga dimensi. Sistem satu dimensi antara lain lapisan tipis atau permukaan buatan yang telah digunakan selama puluhan tahun dalam bidang elektronik, kimia, dan teknik. Lapisan tipis ini berukuran 1-100 nm atau monolayer. Sedangkan sistem dua dimensi adalah *nanotube* karbon (CNTs). *Nanotube* karbon adalah atom karbon dengan ikatan heksagonal, berdiameter 1 nm dan panjang 100 nm serta lapisan

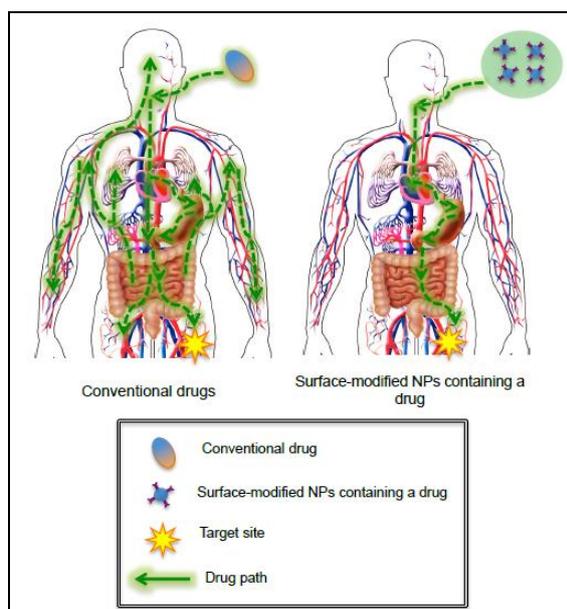
grafit yang digulung menjadi silinder. CNTs terdiri dari dua jenis, yaitu *nanotube* karbon tunggal (SWCNTs) dan karbon *nanotube* multisisi (MWCNTs) (Pal, dkk., 2011). Nanopartikel tiga dimensi meliputi *fullerene* (karbon 60), dendrimer dan titik kuantum. *Fullerene* adalah sangkar bulat yang mengandung 28 hingga lebih dari 100 atom karbon, mengandung C₆₀. Ini adalah bola yang berlubang yang terdiri atas ikatan karbon pentagonal dan heksagonal, sehingga menyerupai bola. *Fullerene* tahan terhadap tekanan ekstrem dan dapat kembali ke bentuk aslinya ketika tekanan dilepaskan (Pal, dkk., 2011; Tomalia, 2004).

Dendrimer mewakili kelompok baru dari polimer struktur terkontrol dengan dimensi nanometrik. Dendrimer digunakan dalam pemberian obat dan biasanya berdiameter 10 hingga 100 nm dengan beberapa gugus fungsional di permukaan yang menjadikannya efektif sebagai pembawa obat target. Dendrimer memiliki permukaan reaktif yang berbeda dan kompatibel dengan struktur organik seperti DNA, sehingga penggunaannya produktif dalam bidang medis dan biomedis. Aplikasi farmasi dari dendrimer antara lain formulasi anti-inflamasi nonsteroid, obat antimikroba dan antivirus, obat antikanker, pro-obat, dan agen skrining untuk penemuan obat (Cheng, dkk., 2008; Pal, dkk., 2011).

Titik-titik kuantum (QD) adalah material kecil yang mengandung droplet kecil elektron bebas. QD adalah nanokristal semikonduktor koloid yang berdiameter 2 hingga 10 nm. QD dapat disintesis dari berbagai jenis bahan semikonduktor melalui sintesis koloid atau elektrokimia. QD yang paling umum digunakan adalah cadmium selenide (CdSe), cadmium telluride (CdTe), indium phosphide (InP), dan indium arsenide (InAs). QD memiliki permukaan yang cukup untuk melapisi agen terapeutik untuk pengiriman obat simultan serta untuk rekayasa jaringan (Larson, dkk., 2003; Pal, dkk., 2011).

Keuntungan signifikan dari nanopartikel adalah peningkatan bioavailabilitas, proporsionalitas dosis, bentuk ukuran lebih kecil, peningkatan luas permukaan yang menghasilkan penyebaran zat aktif lebih cepat di lingkungan berair, seperti tubuh manusia (Gambar 2.13), bioavailabilitas yang lebih besar, lebih sedikit toksisitas dan mengurangi variabilitas makan/puasa (Pal, dkk., 2011). Karena keuntungan yang luar biasa, nanopartikel mendapat perhatian besar dari para peneliti di bidang multidisiplin ilmu. Nanopartikel dapat digunakan untuk

pengiriman obat (Buzea, dkk., 2007; Lee, dkk., 2011), peraba kimia dan biologis (Barrak, dkk., 2019), peraba gas (Mansha, dkk., 2016; Rawal & Kaur, 2013; Ullah, dkk., 2017), penangkapan CO₂ (Ganesh, dkk., 2017; Khan, dkk., 2019; Ramacharyulu, dkk., 2015) dan antioksidan. Kemudian dapat pula diaplikasikan dalam bidang bioremediasi, bioelektronik, teknik mesin, kosmetik dan lain-lain (Buzea, dkk., 2007).



Gambar 2.13. Distribusi obat konvensional vs. obat nanopartikel setelah pemberian oral pada tubuh manusia (Cartaxo, 2018)

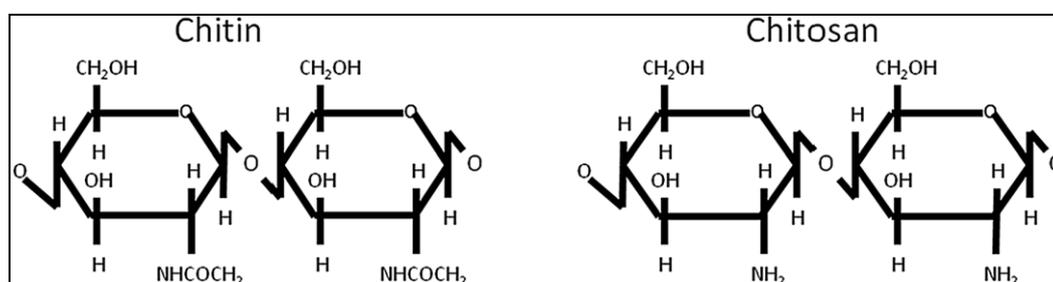
2.8 Kitosan

Kitosan adalah polisakarida linier biokompatibel yang terdiri dari ikatan β -(1-4)-D-glukosamin dan N-asetil-D-glukosamin yang terdistribusi secara acak. Kitosan diproduksi secara komersial melalui deasetilasi kitin yang merupakan elemen struktural dalam eksoskeleton crustacea dan dinding sel jamur (Arami, dkk., 2011). Kitin ditemukan pertama kali oleh Henri Braconnot pada tahun 1811 saat melakukan penelitian jamur. Kemudian, Prof. C. Rouget menemukan bahwa pengobatan alkali kitin dapat menghasilkan zat yang tidak seperti kitin dan dapat dilarutkan dalam asam. Penelitian tersebut dilakukan pada tahun 1859. Hoppe

Seiler menyebut zat tersebut dengan sebutan deasetilasi kitin atau kitosan (Badawy & Rabea, 2011).

Kitin adalah biopolimer panjang dan tidak memiliki cabang yang tersebar luas di alam. Kitin merupakan komponen utama kutikula serangga, dinding sel jamur, ragi dan ganggang hijau selain ditemukan pada eksoskeleton crustacea (Divya & Jisha, 2018; Einbu & Vårum, 2008). Kitin adalah polisakarida yang membentuk Kristal. Terdapat tiga bentuk kristal utama dari kitin yaitu α , β dan γ -kitin. α -Kitin memiliki rantai antiparalel sedangkan β -kitin memiliki ikatan hidrogen intrasheet dan rantai paralel. γ -Kitin adalah kombinasi dari α dan β kitin yang memiliki struktur paralel dan antiparalel (Divya & Jisha, 2018; Franca, dkk., 2008; Yen & Mau, 2007). Kitosan yang diperoleh dengan deasetilasi kitin, memiliki unit ikatan β 1-4 (kitin monomer) dan 2-amino 2-deoksi- β -D-glukopiranososa (unit D-glukosa; unit monomer kitosan) (Divya & Jisha, 2018; Park, dkk., 2011; Puvvada, dkk., 2012; Shahidi, dkk., 1999).

Kitosan mengandung setidaknya 60% unit D (Kumirska, dkk., 2011). Fraksi molar unit D dinyatakan sebagai derajat deasetilasi (DD) (Aranaz, dkk., 2012). Struktur kitin dan kitosan ditunjukkan pada Gambar 2.14. Derajat deasetilasi adalah karakteristik penting yang mempengaruhi kinerja kitosan di berbagai aplikasi (Kumirska, dkk., 2010). DD dapat ditentukan oleh titrasi potensiometri (Zhang, dkk., 2011), radiasi inframerah (Baxter, dkk., 1992), spektrofotometri UV (Kasaai, 2009), kromatografi permeasi gel (Kumar, 1999), NMR cair dan ^{13}C NMR padat. Kehadiran gugus amina bebas di sepanjang rantai kitosan membuatnya tidak seperti kitin (Divya & Jisha, 2018).



Gambar 2.14. Struktur kimia kitin dan kitosan (Divya & Jisha, 2018)

Setelah selulosa, kitosan adalah polimer alami yang paling melimpah. Kitosan berbeda dengan polisakarida lainnya yang biasanya tersedia. Kitosan memiliki kemampuan untuk membentuk kompleks polielektrolit dengan logam dan biomolekul anionik (Arami, dkk., 2011). Kitosan ini berwarna putih, keras dan tidak elastis (Badawy & Rabea, 2011; Divya & Jisha, 2018). Kitosan dianggap sebagai bahan non-toksik yang menciptakan biokompatibilitas dan biodegradabilitas (Arami, dkk., 2011; Frank, dkk., 2019), oleh karena itu dianggap sebagai produk yang dapat diperbarui, berkelanjutan, dan terjangkau. Selain itu, kitosan memiliki sifat fisikokimia dan biologis yang menarik seperti bioadhesivitas dan kapasitas pembentukan film pada kulit dan selaput lendir serta aktivitas antibakterinya (Frank, dkk., 2019). Dalam beberapa tahun terakhir, kitosan menjadi perhatian penting sebagai biomaterial yang kurang dimanfaatkan dalam berbagai aplikasi, termasuk pengolahan air, membran, hidrogel, perekat, antioksidan, biosensor, kemasan makanan, dan pengiriman obat (Arami, dkk., 2011).

Kombinasi dari sifat-sifat biologis dan kimia yang terkandung dalam kitosan menjadikannya sebagai biomaterial yang sangat bermanfaat untuk aplikasi pengantar obat. Selama beberapa dekade, kitosan dan turunannya telah digunakan sebagai formulasi nanopartikel polimer sebagai pengantar obat untuk terapi (Arami, dkk., 2011). Kitosan biasanya digunakan dalam industri biomedis, pertanian, rekayasa genetika, industri makanan, pengendalian pencemaran lingkungan, pengolahan air, pembuatan kertas, fotografi dan sebagainya (Cheba, 2011; Divya & Jisha, 2018).

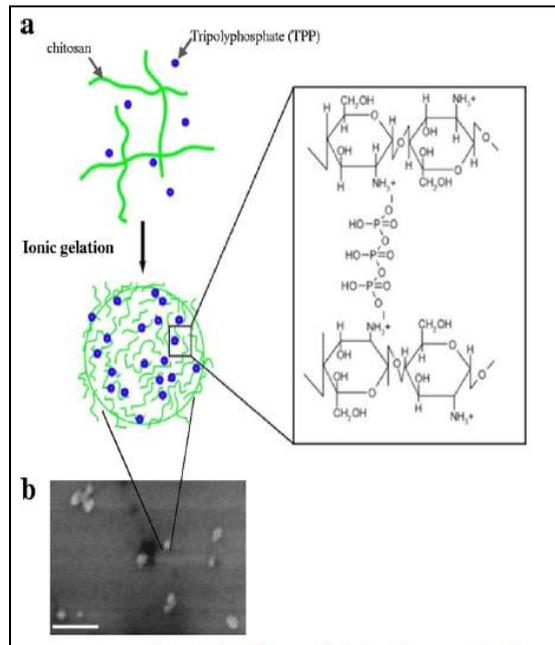
Selain dimanfaatkan di berbagai aplikasi, kitosan juga merupakan solusi yang ramah lingkungan untuk polusi yang disebabkan oleh industri pengolahan makanan laut. Setiap tahun, 60.000-80.000 ton limbah cangkang diproduksi secara global. Jumlah limbah yang banyak ini membuat proses degradasi menjadi lambat dan menjadi masalah bagi lingkungan. Konversi limbah cangkang menjadi kitin adalah solusi efektif untuk menyelesaikan masalah ini. Kitin memiliki banyak aplikasi dan juga dapat dideasetilasi menjadi kitosan yang memiliki segudang manfaat (Divya & Jisha, 2018; Divya, dkk., 2014).

2.8.1 Nanopartikel Tersalut Kitosan

Nanopartikel tersalut kitosan (ChNP) pertama kali dijelaskan pada tahun 1994 oleh Ohya dengan para peneliti sebidangnya. Mereka memanfaatkan ChNP sebagai pengantar obat antikanker intravena 5-fluorouracil (Grenha, 2012). Sejak itu, banyak metode yang telah digunakan untuk sintesis ChNP. Terdapat lima metode yang tersedia pada saat ini antara lain gelasi ionotropik (Gambar 2. 15), mikroemulsi, emulsifikasi difusi pelarut, kompleks polielektrolit dan metode reverse micellar (Tiyaboonchai, 2003). Berdasarkan metode tersebut, metode yang paling banyak digunakan adalah gelasi ionotropik dan kompleks polielektrolit, karena metode ini sederhana dan tidak menerapkan gaya geser tinggi atau cukup menggunakan pelarut organik (Divya & Jisha, 2018; Sailaja, dkk., 2011).

Berbagai jenis nanopartikel yang dikembangkan untuk aplikasi biomedis dapat dilapisi dengan kitosan. Penambahan larutan kitosan ke dalam formulasi nanopartikel yang disiapkan sebelumnya merupakan cara yang mudah. Larutan kitosan dapat pula ditambahkan selama pembentukan nanopartikel lainnya untuk melapisinya. Di bidang nanoteknologi farmasi, kitosan telah banyak digunakan sebagai polimer pembentuk partikel dan paling inovatif sebagai pelapis permukaan. Nanopartikel polimer, nanopartikel lipid, dan nanopartikel berbasis logam (atau logam oksida) adalah contoh nanopartikel pembawa obat atau zat aktif lainnya yang telah dimodifikasi dengan kitosan di berbagai aplikasi (Frank, dkk., 2019).

Beberapa penelitian *in vitro* dan *in vivo* telah menunjukkan bahwa modifikasi permukaan jenis-jenis nanopartikel yang dilapisi dengan kitosan dapat memberikan banyak keuntungan, termasuk meningkatkan stabilitas fisikokimia, mengontrol pelepasan obat, mempromosikan mukoadhesif dan penetrasi jaringan, memodulasi interaksi sel (serapan seluler dan toksisitas), meningkatkan efek antimikroba, dan meningkatkan ketersediaan hayati dan tingkat kemanjuran obat. Namun semua tergantung pada jenis nanopartikel dan sifat kimia komponen. Dalam hal ini termasuk pemanfaatan kitosan sebagai pelapis nanopartikel lainnya dalam aplikasi biomedis (Frank, dkk., 2019).



Gambar 2.15. Formasi nanopartikel kitosan metode gelasi ionik (De Paz, dkk., 2011)

2.9 Mencit (*Mus musculus*)

2.9.1 Klasifikasi Mencit (*Mus musculus*)

Mencit (*M. musculus*) memiliki klasifikasi sebagai berikut (Musser, dkk., 2016):

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Class	: Mammalia
Order	: Rodentia
Family	: Muridae
Genus	: Mus
Species	: <i>Mus musculus</i> L.

2.9.2 Deskripsi Umum Mencit (*M. musculus*)

M. musculus merupakan spesies palaeartik yang hubungannya erat dengan manusia dan telah banyak dikenal di seluruh dunia. Spesies ini tersebar luas di seluruh dunia meliputi Eropa utara, Amerika, Afrika dan Australasia. Terdapat beberapa subspecies dari *M. musculus* yang memiliki kisaran terbatas dalam

penyebarannya, misalnya *M. musculus musculus* di Eurasia utara, *M. musculus castaneus* di Asia Tenggara dan *M. musculus bactrianus* di India (Musser, dkk., 2016). Subspesies ini telah dikenal dengan baik sebagai hewan laboratorium (Raufaste, dkk., 2005; Viney, dkk., 2015).

M. musculus ditemukan di berbagai habitat buatan manusia termasuk rumah, lahan pertanian, jenis bangunan lainnya, dan bahkan di lokasi tambang batu bara. Kadang-kadang ditemukan liar di tempat-tempat umum dan beberapa ditemukan di tanah yang subur, padang rumput, bukit pasir, rawa-rawa, dan tepi jalan yang lusuh (Macholan, 1999; Wilson & Reeder, 2005). *M. musculus* cenderung tidak ditemukan di hutan dan padang pasir (Musser, dkk., 2016).

M. musculus adalah hewan laboratorium yang merupakan pahlawan biologi tanpa tanda jasa. Generasi demi generasi *M. musculus* ini telah digunakan di hampir setiap aspek dalam penelitian biologi. Strain *M. musculus* yang biasa digunakan di laboratorium antara lain C57BL/6, BALB/c dan lain sebagainya. *M. musculus* ini digunakan sebagai hewan laboratorium dan diperdagangkan sejak tahun 1920 hingga sekarang (Lundrigan, dkk., 2002; Viney, dkk., 2015). Hewan laboratorium ini harus dianugerahi nobel kehormatan untuk kontribusinya pada ilmu pengetahuan. Khususnya *M. musculus* yang telah banyak digunakan dalam studi genetika dan imunologi (Viney, dkk., 2015).

Kegunaannya dalam bidang imunologi terus berkembang. Imunologi dari *M. musculus* laboratorium telah berhasil ditemukan dan dapat mewakili kerja sistem kekebalan mamalia. Bidang imunologi menggunakan hewan laboratorium ini pada lingkungan yang dikontrol ketat, dengan manipulasi imun yang semakin kompleks termasuk manipulasi genetik dari stok genetik tertentu. *M. musculus* laboratorium pada dasarnya sengaja dipelihara agar menjadi hewan yang kualitasnya baik (fekunditas tinggi dan cepat). Sistem kekebalannya pun harus selalu diperhatikan. Perbandingan *M. musculus* liar dengan *M. musculus* laboratorium terletak pada pertumbuhannya, namun perkembangan biakannya sama. *M. musculus* liar lebih cepat tumbuh dibandingkan dengan *M. musculus* laboratorium (Viney, dkk., 2015).

M. musculus adalah hewan yang paling banyak digunakan dalam studi eksperimental yang telah diperkenalkan sebagai hewan laboratorium pada abad

XIX. Adaptasi yang mudah dan penggunaannya yang besar dalam studi eksperimental adalah fakta dari hewan ini. Selain itu, ukurannya yang kecil, sangat produktif, periode kehamilan pendek, domestikasi, biaya relatif murah dan pemeliharaan yang mudah (Chorilli, dkk., 2005). Penggunaannya menjadi sering sebab kemiripan genetiknya 99% dengan manusia, sehingga memungkinkan hewan ini memiliki mekanisme metabolisme yang hampir sama (Chorilli, dkk., 2005; Silva-Santana, dkk, 2019).

M. musculus mempunyai ciri-ciri tubuhnya berukuran kecil, berwarna putih dan berkaki empat (Akbar, 2010). Ciri-ciri tersebut sesuai dengan firman Allah yang termaktub dalam Al-Qur'an dalam surah An Nur (24) ayat 45:

وَاللَّهُ خَلَقَ كُلَّ دَابَّةٍ مِّن مَّاءٍ فَمِنْهُمْ مَّن يَمْشِي عَلَى بَطْنِهِۦ وَمِنْهُمْ مَّن يَمْشِي عَلَى رِجْلَيْنِ وَمِنْهُمْ مَّن يَمْشِي عَلَى أَرْبَعٍ يَخْلُقُ اللَّهُ مَا يَشَاءُ إِنَّ اللَّهَ عَلَىٰ كُلِّ شَيْءٍ قَدِيرٌ؛

Artinya: “Dan Allah telah menciptakan semua jenis hewan dari air, maka sebagian ada yang berjalan diatas perutnya dan sebagian berjalan dengan dua kaki, sedang sebagian (yang lain) berjalan dengan empat kaki. Allah menciptakan apa yang Dia kehendaki. Sungguh, Allah Mahakuasa atas segala sesuatu.” (Q.S. An Nur (24): 45).

Ayat di atas pada kalimat *وَمِنْهُمْ مَّن يَمْشِي عَلَى أَرْبَعٍ* menurut tafsir Al-Qurthubi (2008) adalah semua hewan yang ada di muka bumi ini berjalan menggunakan empat kaki, kecuali binatang melata yang berjalan dengan perut, seperti ular dan binatang yang berjalan dengan dengan dua kaki seperti hewan golongan aves dan manusia. Oleh karena itu, *M. musculus* adalah salah satu hewan yang diterangkan dalam Al-Qur'an karena termasuk dalam golongan hewan yang memiliki ciri-ciri berjalan menggunakan empat kaki (Gambar 2.16). Selain itu, ciri-ciri *M. musculus* yaitu memiliki rentang siklus estrus 4-5 hari (Akbar, 2010) dan masa kebuntingannya 21 hari (Whitfield, dkk., 2019). Pemeliharaan *M. musculus* sebaiknya ditempatkan pada kondisi ruang yang bersih, tidak basah dan jauh dari kebisingan yang dapat memicu stress mencit.

Selain itu, Suhu ruang untuk pemeliharaan *M. musculus* harus dijaga antara 18-19°C dengan kelembaban udaranya antara 30-70% (Akbar, 2010).

M. musculus betina dewasa yang berumur 35-60 hari biasanya memiliki berat badan 18-35 g. Lama hidup *M. musculus* umumnya 1-2 tahun, namun ada yang dapat mencapai 3 tahun. Sedangkan masa reproduksi *M. musculus* berlangsung 1,5 tahun. *M. musculus* jantan atau *M. musculus* betina dapat dikawinkan sekitar umur 8 minggu. Jumlah anak *M. musculus* yang dihasilkan dari proses kebuntingan adalah rata-rata 6-15 ekor dengan beratnya berkisar 0,5-1,5 g. *M. musculus* digunakan sebagai penelitian dengan pertimbangan bahwa hewan ini memiliki keuntungan antara lain dapat menghasilkan banyak anak dalam satu masa kebuntingan serta memiliki keselarasan pertumbuhan dengan kondisi manusia (Akbar, 2010; Burroni, dkk., 2014).



Gambar 2.16. Morfologi mencit (Akbar, 2010)

2.9.3 Reproduksi *M. musculus* Betina

Sistem reproduksi *M. musculus* betina secara umum terdiri dari ovarium dan sistem duktus. Sistem reproduksi ini tidak hanya menghasilkan atau menerima sel telur dan membawanya ke uterus, akan tetapi juga menerima dan mengantarkan sperma ke oviduk sebagai tempat fertilisasi. Perkembangan fungsi otot dan epitel pada saluran betina dipengaruhi oleh sirkulasi sekresi hormon estrogen dan progesteron dalam gonad betina selama siklus hormonal ovarium (Akbar, 2010).

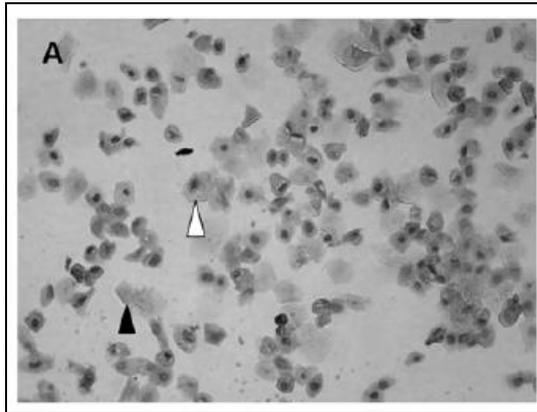
2.9.4 Siklus Estrus

Beberapa mamalia memiliki siklus reproduksi yang disebut sebagai siklus estrus. Siklus estrus adalah suatu siklus yang secara psikologis maupun fisiologis bersedia menerima pejantan untuk berkopulasi. Masa dari permulaan masa estrus ke masa estrus berikutnya disebut dengan siklus estrus. Siklus estrus adalah siklus reproduksi pada mamalia yang bukan primata. Siklus estrus merupakan gambaran dari berbagai aktivitas fisiologis yang berkaitan dengan hipotalamus, hipofisis dan ovarium. Selama siklus ini akan terjadi berbagai perubahan pada organ reproduksi maupun pada perubahan tingkah laku seksualnya (Akbar, 2010).

Tikus dan mencit adalah hewan poliestrus. Hewan poliestrus adalah hewan yang dalam periode satu tahunnya terjadi siklus estrus yang berulang-ulang. Siklus estrus hewan jenis ini dibagi menjadi lima fase yaitu proestrus, estrus, metestrus I, metestrus II dan diestrus. Siklus estrus *M. musculus* berlangsung 4-5 hari. Setiap fase dari siklus estrus ini dapat dideteksi melalui pemeriksaan apusan vagina. Apusan vagina merupakan cara yang relatif paling mudah dan murah untuk mempelajari aktivitas fungsional ovarium. Berikut penjelasan terkait siklus estrus secara umum yang dibagi menjadi empat tahap (Akbar, 2010; Burroni, dkk., 2014; Byers, dkk., 2012):

2.9.4.1 Tahap Proestrus

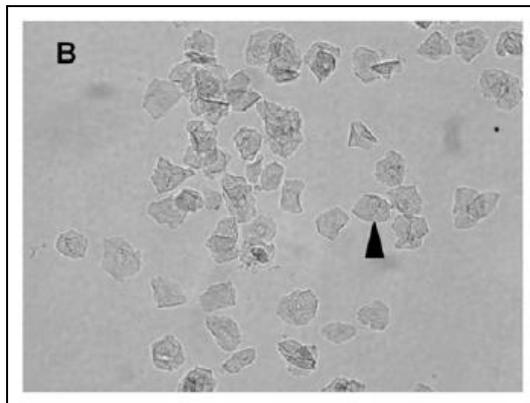
Proestrus adalah tahap sebelum tahap estrus yaitu tahapan dimana folikel tumbuh menjadi folikel atresia oleh pengaruh FSH (*Follicle Stimulating Hormone*). Tahap ini berlangsung selama 12 jam. Setiap folikel mengalami perkembangan yang cepat sekitar 2-3 hari sebelum tahap estrus. Pada tahap ini mulai persiapan untuk melepaskan ovum dari ovarium. Akibatnya produk estrogen dalam darah semakin meningkat sehingga menimbulkan perubahan-perubahan fisiologis. Perubahan fisiologis tersebut antara lain pertumbuhan dan perkembangan folikel ovarium, meningkatnya pertumbuhan endometrium, uteri dan serviks serta meningkatnya vaskularisasi dan keratinisasi lapisan epitel vagina. Sediaan apus vagina pada tahap proestrus ditandai dengan sejumlah sel epitel berinti, sel darah putih yang berkurang dan diganti dengan sel epitel terkornifikasi dan terdapat banyak lendir (Gambar 2.17) (Akbar, 2010).



Gambar 2.17. Tahap proestrus (Byers, dkk., 2012)

2.9.4.2 Tahap Estrus

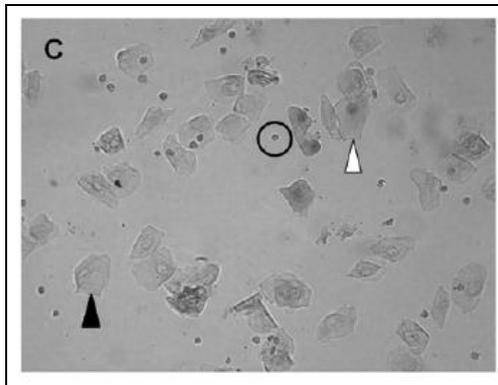
Estrus adalah tahapan yang ditandai dengan diterimanya pejantan oleh hewan betina untuk melakukan kopulasi, tahap ini berlangsung selama 12 jam. Pada tahap ini kadar estrogen meningkat sehingga aktivitas hewan semakin tinggi, biasanya ditandai dengan telinganya selalu bergerak-gerak. Ovulasi sel telur hanya terjadi pada tahap ini dan terjadi menuju akhir siklus estrus. Pada sediaan apus vagina, tahap ini ditandai dengan hilangnya sel darah putih dan epitel berinti, yang ada hanya sel epitel terkornifikasi dengan bentuk yang tidak beraturan dan berukuran besar (Gambar 2.18) (Akbar, 2010).



Gambar 2.18. Tahap estrus (Byers, dkk., 2012)

2.9.4.3 Tahap Metestrus

Metestrus adalah tahap setelah tahap estrus di mana badan kuning atau korpus luteum tumbuh dengan cepat dari sel granulosa folikel yang rusak oleh pengaruh hormon LH (*Luteinizing Hormone*) dan adenohipofisa. Tahap ini sebagian besar di bawah pengaruh hormon progesteron yang diproduksi oleh korpus luteum. Hormon progesteron dapat menghambat sekresi FSH oleh adenohipofisa sehingga menghambat terbentuknya folikel atresia yang lain dan mencegah terjadinya estrus. Selama tahap metestrus, uterus mempersiapkan seperlunya untuk menerima dan memberi nutrisi pada embrio. Menuju pertengahan hingga akhir metestrus, uterus menjadi sedikit lunak karena pelenturan otot-otot uterus. Tahap ini terjadi selama 21 jam. Pada sediaan apus vagina, tahap ini dicirikan dengan adanya sel epitel berinti, sel darah putih tidak terlihat dan jumlah epitel menanduk semakin sedikit (Gambar 2.19) (Akbar, 2010).

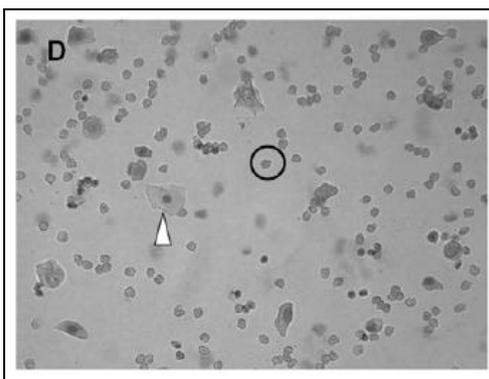


Gambar 2.19. Tahap metestrus (Byers, dkk., 2012)

2.9.4.4 Tahap Diestrus

Diestrus adalah tahap terakhir dan terlama pada siklus estrus. Tahap ini berlangsung selama 48 jam. Korpus luteum matang dan pengaruh progesteron terhadap saluran reproduksi menjadi semakin nyata. Endometrium semakin tebal dan kelenjar-kelenjar berhipertrofi. Serviks akan menutup dan lendir vagina mulai lengket. Lapisan mukosa vagina memucat dan otot uterus melunak. Pada akhir tahap ini korpus luteum menunjukkan perubahan retrogresif dan vakuolisasi

secara bertahap. Endometrium dan kelenjarnya beratrofi ke ukuran semula. Pada tahap ini mulai terjadi pertumbuhan folikel primer dan folikel sekunder dan siklus ini akan kembali ke proestrus. Pada sediaan apus vagina ditemui banyak sel leukosit dan sel epitel berinti yang tersebar dan homogen (Gambar 2.20) (Akbar, 2010).



Gambar 2.20. Tahap diestrus (Byers, dkk., 2012)

Setiap tahap dari siklus estrus akan memperlihatkan berbagai perubahan dengan ciri-ciri yang berbeda dari tahap proestrus, estrus, metestrus dan diestrus. Preparat apus vagina akan memperlihatkan setiap tahap dari siklus estrus pada *M. musculus*. Perubahan yang terjadi selama siklus estrus di sepanjang saluran reproduksi betina dapat teramati pada preparat mengenai perubahan sel epitel vagina seperti yang disajikan pada tabel 2.1 (Akbar, 2010).

Tabel 2.1 Perubahan sel epitel vagina *M. musculus* pada saat siklus estrus

Fase siklus estrus	Lama tahapan (jam)	Bentuk sel epitel vagina berdasarkan berbagai sumber			
		(Smith & Mangkoewijojo, 1988)	(Syahrur, 1994)	(Nalbandov, 1999)	(Dalal, Estep, & Jerse, 2001)
Proestrus	12 jam	Sel epitel berinti	Sel epitel berinti dan leukosit sedikit	Sel epitel berinti	Sel epitel berinti dan leukosit sangat sedikit
Estrus	12 jam	Sel epitel terkornifikasi	Sel epitel bertanduk banyak	Sel epitel terkornifikasi	Sel epitel bertanduk banyak

Metestrus	12 jam	Sel terkornifikasi, terdapat leukosit	Sel epitel bertanduk dan banyak leukosit	Sel terkornifikasi di antara leukosit	Sel epitel bertanduk dan banyak leukosit
Diestrus	65 jam	Leukosit dan epitel	Sel epitel berinti dan leukosit	Sel epitel berinti dan leukosit	Leukosit dan sel epitel berinti

Sumber : (Akbar, 2010).

Perubahan yang terjadi dalam siklus estrus *M. musculus* terlihat jelas dalam fisiologi dan anatominya. Perubahan ini dapat dideteksi menggunakan berbagai metode untuk menentukan tahapan-tahapannya. Identifikasi sel-sel vagina dianggap sebagai metode yang paling akurat untuk menentukan semua tahap siklus estrus, namun itu relatif membutuhkan waktu yang lama untuk mengumpulkan sel-sel vagina, kemudian dipindahkan ke slide kaca, dikeringkan dengan udara, diwarnai, dan dilihat. Metode sitologi vagina paling baik digunakan ketika semua 4 tahap siklus estrus perlu diidentifikasi. Metode ulas vagina ini menggunakan cotton bud yang dibasahi dengan larutan garam fisiologis dan dimasukkan ke dalam vagina *M. musculus*. Kapas diputar dengan lembut, diulas ke dinding vagina dan kemudian dilepas. Sel dipindahkan ke slide kaca kering dengan menggulung swab melintasi slide. Slide dikeringkan dengan udara dan kemudian diwarnai dengan sekitar 400 mL pewarna selama 45 detik. Slide dibilas dengan air, disalut dengan kaca penutup, dan segera diamati menggunakan mikroskop. Tahap siklus estrus ditentukan berdasarkan ada tidaknya leukosit, epitel terkornifikasi, dan sel epitel berinti (Byers, dkk., 2012).

2.10 Siklus Hormonal

Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) merupakan hormon yang diproduksi di hipotalamus dan disekresikan ke hipofisa anterior melalui vena portal hipotalamo-hipofisa. Hipofisa anterior tidak berserabut saraf. Pelepasan hormonnya dirangsang melalui pembuluh darah oleh faktor-faktor hormonal. Gonadotropin akan mempengaruhi sekresi hormon FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) dan LH (*Luteinizing Hormone*) dari hipofisa anterior. Kemudian FSH dan LH merangsang ovarium agar mensekresikan hormon estrogen dan progesteron, sehingga dapat mempengaruhi siklus estrus pada mamalia. Pada

tahap proestrus folikel-folikel ovarium masih berukuran kecil. Keberadaan FSH yang disintesis di hipofisa anterior dapat menyebabkan sel-sel granulosa yang terdapat di dalam folikel jumlahnya meningkat dengan cepat, sehingga terbentuk ruangan dalam folikel. Folikel ini disebut folikel atresia (Akbar, 2010).

Estrogen merupakan hormon reproduksi yang berperan untuk merangsang pertumbuhan sel epitel vagina dan folikel ovarium, serta merangsang pematangannya agar siap diovulasikan. Folikel yang telah matang akan memproduksi estrogen, sehingga mengakibatkan estrogen dalam darah meningkat. Kadar hormon estrogen yang tinggi dalam darah menunjukkan bahwa *M. musculus* sedang dalam tahap estrus dan hormon ini akan merangsang gonadotropin untuk memsekresi LH. Pada tahap berikutnya, LH terus menerus dihasilkan sehingga mengakibatkan terjadinya lonjakan LH yang penting untuk menginduksi ovulasi. Kemudian folikel berubah menjadi badan kuning atau korpus luteum yang mampu mensintesis progesteron (Akbar, 2010). Allah Swt telah berfirman dalam surah Ar Ra'du (13): 8 terkait keseimbangan hormon yang dibutuhkan dalam sistem reproduksi:

اللَّهُ يَعْلَمُ مَا تَحْمِلُ كُلُّ أُنْثَىٰ وَمَا تَغِيضُ الْأَرْحَامُ وَمَا تَزْدَادُ وَكُلُّ شَيْءٍ عِنْدَهُ
بِمِقْدَارٍ ۝

Artinya: “Allah mengetahui apa yang dikandung oleh setiap perempuan, apa yang kurang sempurna dan apa yang bertambah dalam rahim. Dan segala sesuatu ada ukuran di sisi-Nya.” (Q.S. Ar Ra'du (13): 8).

Ayat di atas menjelaskan bahwa pada kalimat وَمَا تَغِيضُ الْأَرْحَامُ وَمَا تَزْدَادُ

memiliki makna adanya kekurangan pada kandungan atau kelebihan dalam kandungan tersebut, baik terkait masa kandungan atau hal yang lain (Shihab, 2002). Kekurangan dan kelebihan tersebut dipengaruhi oleh berbagai macam hormon reproduksi di dalamnya. Hormon tersebut di antaranya estrogen, progesteron dan lain sebagainya. Oleh karena itu, hormon-hormon dalam sistem reproduksi perlu dijaga keseimbangannya.

Progesteron merupakan hormon yang menyebabkan terjadinya perubahan lapisan endometrium. Lapisan endometrium dipersiapkan untuk proses implantasi. Pembentukan lapisan endometrium terjadi pada tahap metestrus. Pada tahap siklus estrus berikutnya yaitu diestrus, apabila terjadi implantasi maka meningkatnya kadar progesteron penting untuk pertumbuhan plasenta. Plasenta tersebut dapat membentuk gonadotropin yang disebut HCG (*Human Chorionic Gonadotropine*). HCG ini untuk mempertahankan keberadaan korpus luteum. Apabila tidak terjadi implantasi, maka tidak akan terbentuk plasenta sehingga kadar hormon estrogen dan progesteron menurun. Penurunan kadar progesteron ini akan menyebabkan terjadinya peluruhan lapisan endometrium (Akbar, 2010).

2.11 Sistem Imun

Allah telah menciptakan manusia dalam bentuk yang sebaik mungkin, sempurna dan seimbang dengan dilengkapi sistem kekebalan tubuh sehingga tidak mudah terserang berbagai macam penyakit. Allah berfirman dalam surah At Tiin (95):4 yang berbunyi:

لَقَدْ خَلَقْنَا الْإِنْسَانَ فِي أَحْسَنِ تَقْوِيمٍ

Artinya: “*Sungguh, Kami telah menciptakan manusia dalam bentuk yang sebaik-baiknya.*” (Q.S. At Tiin (95):4).

Kata أَحْسَنِ تَقْوِيمٍ memiliki makna bahwa Allah telah menciptakan manusia dengan sempurna dan seimbang fisiknya serta sesuai letak anggota badannya. Namun, nikmat yang besar ini tidak disyukuri oleh kebanyakan manusia. Kebanyakan mereka berpaling dari sikap syukur, sibuk dengan permainan yang melalaikannya dan lebih senang dengan perkara yang hina, sehingga Allah Swt mengembalikan mereka ke tempat yang paling rendah, yaitu neraka yang merupakan tempat para pelaku maksiat yang durhaka (Musa, 2016b).

Adapun ayat lainnya yang mengungkapkan tentang kekuasaan Allah dalam menciptakan makhlukNya yaitu pada surah Al-A'laa (87) ayat 2-3:

الَّذِي خَلَقَ فَسَوَّىٰ، وَالَّذِي قَدَّرَ فَهَدَىٰۖ

Artinya: *“Yang menciptakan, dan menyempurnakan penciptaanNya. Dan yang menentukan kadar masing-masing dan memberi petunjuk.”* (Q.S. Al-A'laa (87): 2-3).

Ayat di atas mendeskripsikan bahwa Allah Swt menciptakan tubuh manusia dengan seimbang dan sesuai porsinya. Kemudian Allah Swt memberikannya hidayah dan petunjuk untuk kemaslahatannya (Musa, 2016b). Ayat di atas secara tersirat menyampaikan tentang keseimbangan sistem imun pada tubuh manusia yang telah diatur oleh Allah Swt, komponen dalam sistem imun tersebut bekerja sesuai dengan fungsi dan sifatnya masing-masing, sehingga membuat manusia tidak mudah terserang penyakit.

Imunologi adalah suatu ilmu yang mempelajari molekul, sel dan organ yang memiliki peran dalam mekanisme pengenalan dan pemusnahan benda asing sebagai bentuk pertahanan dalam tubuh individu (Playfair & Chain, 2009). Sistem imun merupakan sistem pertahanan dalam tubuh yang berkemampuan untuk membedakan molekul sendiri dengan molekul asing. Sistem imun terdiri atas sel-sel imun yang tersebar di seluruh tubuh seperti dalam darah, limfe, jaringan ikat dan jaringan epitel. Sel primer yang berperan dalam respon imun antara lain limfosit, sel mast, sel plasma, eosinofil, neutrofil, dan sel fagosit mononuklear (Mescher, 2012).

Organ utama dari sistem kekebalan tubuh adalah timus dan sumsum tulang. Sedangkan organ sekunder meliputi limpa, amandel, pembuluh getah bening, kelenjar getah bening, kelenjar gondok, adenoid, dan kulit. Ketika organ sistem kekebalan tubuh termasuk timus, limpa, bagian dari sumsum tulang, kelenjar getah bening dan jaringan limfatik sekunder dibutuhkan untuk penelitian, maka dapat dikeluarkan melalui pembedahan (Saxena, dkk., 2012). Fungsi utama sistem kekebalan adalah pengenalan dengan eliminasi antigen asing, pembentukan memori imunologis, dan pengembangan toleransi terhadap antigen diri (Luckheeram, dkk., 2012).

Kunci dari sistem kekebalan yang sehat adalah kemampuannya yang luar biasa untuk membedakan antara sel-sel tubuh sendiri dengan sel-sel asing. Pertahanan kekebalan tubuh biasanya berdampingan dengan sel-sel yang membawa molekul penanda diri yang khas. Tetapi ketika sel-sel imun menghadapi organisme yang membawa penanda asing, maka mereka dengan

cepat akan melakukan serangan. Apapun yang dapat memicu respons kekebalan ini disebut antigen atau mitogen. Antigen dapat berupa mikroba seperti virus, atau bahkan bagian dari mikroba. Jaringan atau sel dari orang lain (kecuali kembar identik) juga membawa penanda *nonself* dan bertindak sebagai antigen. Dalam situasi yang tidak normal, sistem kekebalan tubuh dapat mengira diri sendiri tidak cocok dan melancarkan serangan terhadap sel atau jaringan tubuh sendiri. Sehingga dapat mengakibatkan penyakit autoimun. Beberapa bentuk radang sendi dan diabetes adalah penyakit autoimun. Dalam kasus lain, sistem kekebalan tubuh merespon zat asing yang tampaknya tidak berbahaya seperti *ragweed pollen*. Hasilnya adalah alergi, dan antigen jenis ini disebut allergen (NIAID, 2003).

Sistem imun terdiri atas jaringan rumit yang bertanggung jawab untuk menjaga homeostasis tubuh dan merespons agresi secara umum (Cruvinel, dkk., 2010). Sistem kekebalan dibagi berdasarkan kecepatan dan spesifisitas reaksi (Parkin & Cohen, 2001). Secara konseptual, sistem imun dibagi menjadi dua yaitu imunitas bawaan dan imunitas adaptif. Imunitas bawaan merupakan respons yang cepat dan stereotip terhadap sejumlah besar rangsangan. Sel-sel efektor utama dalam imunitas bawaan adalah makrofag, neutrofil, sel dendritik, dan sel pembunuh alami (NK). Fagositosis, pelepasan mediator inflamasi, aktivasi protein sistem komplemen, serta sintesis protein fase akut, sitokin dan kemokin adalah mekanisme utama dalam imunitas bawaan. Mekanisme ini diaktifkan oleh rangsangan spesifik seperti lipopolisakarida, mannanosa dan asam teikoik yang merupakan pola molekuler yang berhubungan dengan patogen atau *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) dan mengaktifkan respon imun bawaan dengan berinteraksi pada reseptornya yang dikenal sebagai reseptor pengenalan pola (PRR), misalnya *Toll-like receptor* (TLRs) (Cruvinel, dkk., 2010; Parkin & Cohen, 2001).

Tidak seperti respon imun bawaan, respon imun adaptif atau didapat tergantung pada aktivasi sel khusus (limfosit) dan molekul terlarut yang disekresikan oleh limfosit. Ciri-ciri utama dari respon imun adaptif adalah spesifik dalam berbagai macam pengenalan, memori, respon khusus, pengendalian diri, dan toleransi terhadap komponen organisme itu sendiri. Meskipun sel-sel utama yang terlibat dalam respon imun adaptif adalah limfosit, sel penyaji atau *antigen*

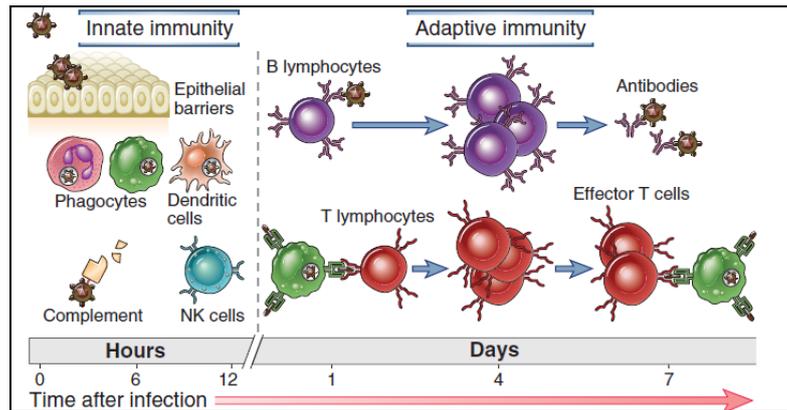
presenting cell (APC) tetap memainkan peran kunci dalam aktivasi sel utama dengan menghadirkan antigen yang terkait melalui molekul kompleks histokompatibilitas utama (MHC) ke T limfosit (TL) (Cruvinel, dkk., 2010).

2.12 Respon Imun

Respons imun terbagi menjadi dua yaitu respon bawaan dan adaptif. Respon bawaan dan adaptif adalah komponen dari sistem pertahanan yang terpadu di mana banyak sel dan molekul berfungsi secara kooperatif. Mekanisme kekebalan bawaan memberikan pertahanan awal yang efektif terhadap infeksi. Namun, banyak mikroba patogen telah berevolusi untuk melawan imunitas bawaan, dan eliminasi mereka membutuhkan mekanisme imunitas adaptif yang lebih kuat (Abbas, dkk., 2012). Berikut pembahasan terkait macam-macam respon imun.

2.12.1 Respon Imun Non Spesifik

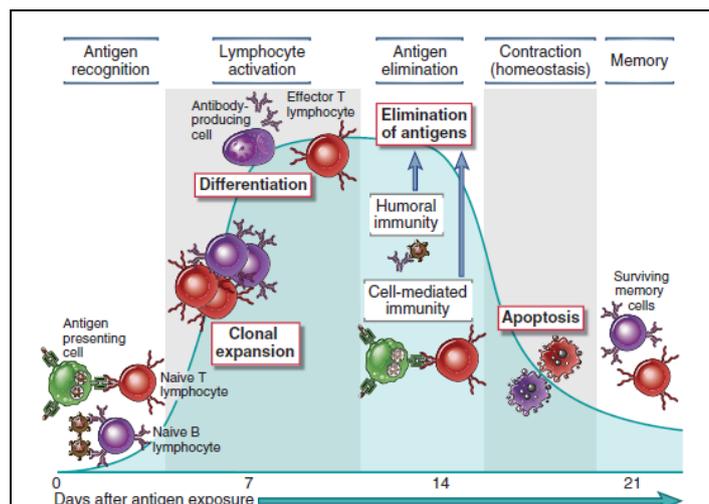
Pertahanan melawan antigen dimediasi oleh reaksi awal imunitas bawaan dan kemudian respon imunitas adaptif (Gambar 2.21). Imunitas bawaan juga disebut imunitas alami atau asli yang memberikan garis pertahanan awal melawan antigen. Pertahanan ini terdiri dari mekanisme pertahanan seluler dan biokimia yang ada bahkan sebelum infeksi dan siap untuk merespon dengan cepat terhadap infeksi. Imunitas bawaan pada dasarnya mampu merespon dengan cara yang sama terhadap infeksi berulang. Komponen utama imunitas bawaan adalah (1) hambatan fisik dan kimia, seperti epitel dan bahan kimia antigen yang diproduksi di permukaan epitel; (2) sel fagositik, seperti neutrofil, makrofag, sel dendritik, dan sel pembunuh alami (NK); (3) protein darah, termasuk anggota sistem komplemen dan mediator peradangan lainnya; dan (4) protein yang disebut sitokin yang mengatur dan mengoordinasi banyak aktivitas sel-sel kekebalan bawaan (Abbas, dkk., 2012).



Gambar 2.21 Mekanisme respon imun bawaan dan adaptif (Abbas, dkk., 2012)

2.12.2 Respon Imun Spesifik

Bentuk kekebalan kedua yaitu imunitas adaptif atau spesifik. Imunitas adaptif ini bergantung pada limfosit B dan T. Kerjanya membutuhkan waktu lebih lama tetapi lebih spesifik terhadap antigen. Imunitas adaptif lebih lambat karena pembentukan reseptor yang sempurna untuk antigen spesifik. Selain itu, karena bagian dari respons adaptif bergantung pada imunitas sebelumnya dan pengkategorian antigen yang dilakukan oleh imunitas bawaan (Abbas, dkk., 2012). Respon imun adaptif melibatkan sistem sel dan sinyal kimia yang kompleks dan saling berhubungan yang datang bersama untuk menyelesaikan tugasnya yang dimulai dari respon imun bawaan (Gambar 2.22) (Owen, dkk., 2009).

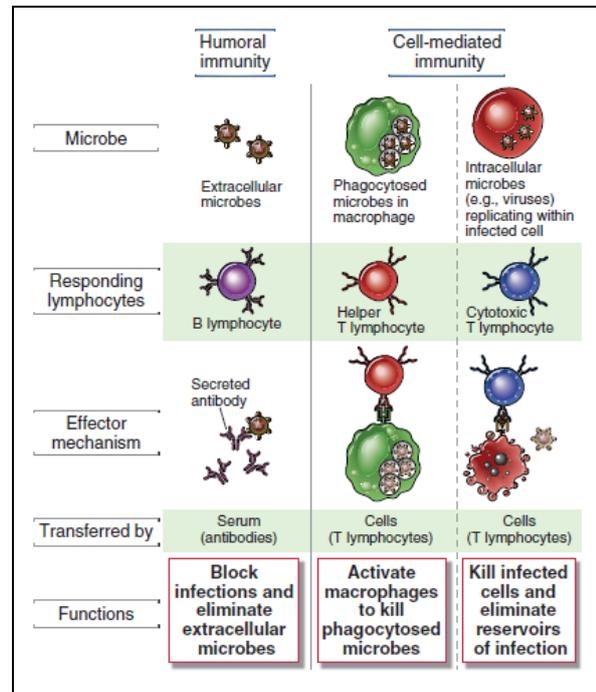


Gambar 2.22. Interaksi *antigen presenting cell* dengan sel T pada respon imun adaptif (Abbas, dkk., 2012)

Salah satu bagian yang signifikan dan unik dari imunitas adaptif adalah memori imunologis. Hal ini yang menyebabkan kemampuan sistem kekebalan tubuh untuk merespon jauh lebih cepat dan efisiensi yang lebih besar selama paparan kedua terhadap antigen yang sama. Tidak seperti hampir semua sistem biologis lainnya, respon imun vertebrata telah berkembang tidak hanya berkemampuan untuk belajar dari adaptasi dengan antigen asing secara *real time*, tetapi juga berkemampuan untuk menyimpan informasi terkait antigen tersebut untuk penggunaan di masa depan (Owen, dkk., 2009). Komponen utama imunitas adaptif adalah sel yang disebut limfosit dan produk yang disekresikannya, seperti antibodi. Zat asing yang memicu respons imun spesifik atau dikenali oleh limfosit atau antibodi disebut antigen (Abbas, dkk., 2012).

Ada dua jenis respons imun adaptif, yaitu imunitas humoral dan imunitas seluler yang dimediasi oleh berbagai komponen sistem kekebalan dan berfungsi untuk memusnahkan berbagai jenis antigen (Gambar 2.23). Imunitas humoral dimediasi oleh molekul dalam darah dan sekresi mukosa, yang disebut antibodi, yang diproduksi oleh sel yang disebut limfosit B. Antibodi akan mengenali antigen, menetralkan infektivitas berbagai antigen, dan menghilangkan antigen tersebut dengan berbagai mekanisme efektor. Sedangkan imunitas yang dimediasi sel disebut dengan imunitas seluler. Imunitas ini dimediasi oleh limfosit T. Antigen yang bertahan hidup dan berkembang biak di dalam sel fagosit dan sel

inang lainnya, mereka tidak dapat diakses oleh antibodi yang bersirkulasi. Sehingga pertahanan terhadap infeksi semacam itu akan dimediasi oleh sel yang disebut sel T (Abbas, dkk., 2012).



Gambar 2.23. Respon imun seluler dan humoral (Abbas, dkk., 2012)

2.12.2.1 Respon Imun Selular

Respon imun seluler merupakan respon imun adaptif yang dimediasi oleh sel T (limfosit T) (Owen, dkk., 2009). Sel T mengalami pematangan di Timus. Imunitas ini memiliki fungsi untuk meregulasi inflamasi non spesifik melalui aktivasi fungsi makrofag dan sel-sel lainnya. Selain itu, respon ini berfungsi menghancurkan sel atau sitotoksik spesifik terhadap sasaran antigen, meningkatkan fungsi dari sel B agar memproduksi antibodi, juga meningkatkan fungsi subpopulasi dari sel T (Abbas, dkk., 2012).

Keberadaan antigen dapat menyebabkan proliferasi dan diferensiasi sel T menjadi berbagai subpopulasi. Subpopulasi sel T antara lain sel T helper dan sel T sitotoksik. Sel T helper akan dapat mengenali antigen pada permukaan sel-sel yang merupakan *antigen presenting cell* (APC) melalui molekul *major*

histocompatibility complex (MHC) tingkat II dan *T-cell receptor* (TCR). Sedangkan sel T sitotoksik dapat memusnahkan antigen melalui *major histocompatibility complex* (MHC) tingkat I dengan kontak langsung pada sel target (*cell to cell contact*) (Kresno, 2001).

2.12.2.2 Respon Imun Humoral

Imunitas humoral adalah imunitas yang dimediasi oleh molekul dalam darah dan sekresi mukosa, yang disebut antibodi. Antibodi ini diproduksi oleh sel-sel yang disebut limfosit B. Antibodi sendiri bekerja secara spesifik dan dapat mengaktifkan berbagai mekanisme efektor (Abbas, dkk., 2012). Respon imun humoral ini berfungsi dalam perusakan antigen ekstraseluler dan mencegah terjadinya infeksi intraseluler. Mekanismenya, limfosit B akan mengenali antigen dan menjadikan limfosit B berdiferensiasi menjadi sel memori dan sel plasma yang akan mensekresikan antibodi yang biasanya berupa immunoglobulin. Immunoglobulin adalah glikoprotein yang memiliki fungsi sebagai reseptor pada antigen spesifik. Immunoglobulin dapat disekresikan mulai 10-100 juta macam pada setiap individunya. Immunoglobulin akan bekerja melalui tiga jalur yaitu netralisasi, opsonisasi dan aktivasi sistem komplemen (Raven, dkk., 2007).

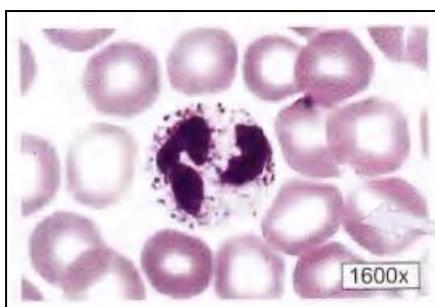
2.13 Leukosit

Leukosit adalah sel darah putih yang dapat bermigrasi ke jaringan. Jumlah leukosit dalam darah tergantung umur, jenis kelamin dan keadaan fisiologis. Pada *M. musculus* normal terdapat 2000-10000/ μ L leukosit dalam darah (Weiss & Wardrop, 2010). Leukosit secara garis besar diklasifikasikan menjadi dua kelompok, yaitu granulosit polimorfonuklear dan agranulosit mononuklear. Kedua kelompok ini berbentuk sferis saat dalam plasma darah, namun akan berbentuk amoeboid saat keluar dari pembuluh darah dan memasuki jaringan. Leukosit jenis granulosit memiliki dua tipe granul yang berbeda, yaitu granul spesifik dan granul azurofilik. Granul spesifik merupakan granul yang dapat mengikat komponen netral, asam dan basa. Sedangkan granul azurofilik merupakan lisosom khusus yang terpulau gelap dan terdapat sejumlah protein granulosit yang selalu bekerja sama secara kolektif jika terdapat mikroorganisme. Granulosit mempunyai inti polimorfik dengan jumlah lobus dua atau lebih serta memiliki sedikit mitokondria.

Leukosit yang termasuk dalam tipe granulosit antara lain neutrofil, eosinofil dan basofil. Leukosit tipe kedua yaitu agranulosit. Agranulosit tidak mempunyai granul spesifik, namun memiliki granul azurofilik. Inti dari agranulosit berbentuk bulat dan berlekuk. Leukosit tipe agranulosit ini meliputi monosit dan limfosit (Mescher, 2012).

2.13.1 Neutrofil

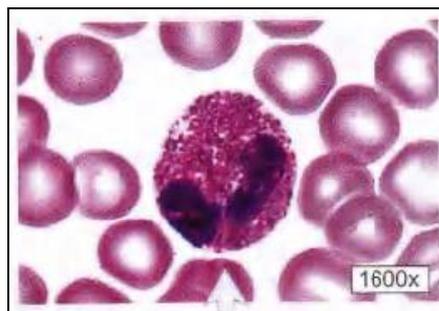
Neutrofil adalah leukosit yang jumlahnya sekitar 6,7-37,2% dari total leukosit (Nugroho, 2018). Neutrofil memiliki diameter kurang lebih 12-15 μ l pada apusan darah serta inti yang terdiri atas 2-5 lobus (Mescher, 2012) yang tidak beraturan (Hoffbrand, 2011). Neutrofil dapat dikatakan sebagai sel yang berumur pendek, karena neutrofil hanya memiliki waktu paruh 6-7 jam dalam darah dan rentang hidup 1-4 hari dalam jaringan ikat. Neutrofil tidak aktif jika dalam darah, namun akan menjadi aktif dan berbentuk amoeboid ketika dalam jaringan. Neutrofil juga memiliki dua tipe granul yaitu granul spesifik dan granul azurofilik (Mescher, 2012). Granul azurofilik neutrofil memiliki warna merah muda kebiruan dan abu-abu kebiruan untuk granul spesifiknya (Gambar 2.24) (Hoffbrand, 2011). Neutrofil merupakan fagosit aktif untuk partikel kecil dan mikroba. Neutrofil sanggup bertahan hidup dalam kondisi anaerob yang merupakan kondisi menguntungkan bagi bakteri, sehingga neutrofil dapat memfagosit bakteri tersebut (Mescher, 2012).



Gambar 2.24. Neutrofil (Mescher, 2012)

2.13.2 Eosinofil

Eosinofil merupakan kelompok leukosit yang jumlahnya lebih sedikit daripada neutrofil, yaitu berkisar 0,9-3,8% (Nugroho, 2018). Diameter eosinofil ini hampir sama dengan neutrofil pada sediaan apusan darah dengan inti bilobus yang khas. Ciri utama dari eosinofil adalah granul spesifik yang berukuran besar dan lonjong dengan banyak inti kristalin pipih (Mescher, 2012). Sel leukosit ini serupa dengan neutrofil, namun granula sitoplasmanya lebih kasar dan berwarna lebih merah gelap karena mengandung protein basa dan jarang terdapat lebih dari tiga lobus inti. Eosinofil memiliki rentang hidup lebih lama dalam darah dibandingkan dengan neutrofil (Gambar 2.25) (Hoffbrand, 2011; Parkin & Cohen, 2001). Eosinofil berperan dalam memfagosit kompleks antigen dan antibodi serta memodulasi respon inflamatorik (Mescher, 2012).

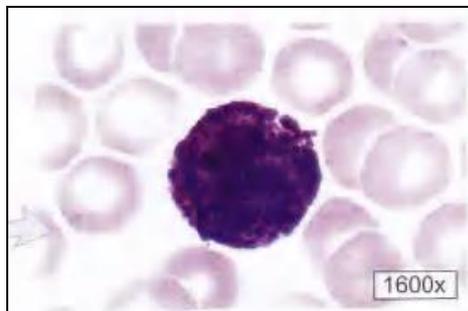


Gambar 2.25. Eosinofil (Mescher, 2012)

2.13.3 Basofil

Basofil adalah kelompok dari leukosit yang jumlahnya hanya sekitar 0-1,5 % dari total (Nugroho, 2018). Tipe ini biasanya sulit ditemukan dalam sediaan apusan darah. Basofil berdiameter kurang dari 12-15 μm dengan intinya terbelah menjadi dua atau lebih lobuli irregular. Inti basofil akan terwarnai biru tua pada preparat apusan darah (Gambar 2.26). Basofil juga memiliki granul spesifik dan granul azurofilik. Granul spesifiknya berdiameter 0,5 μm yang banyak mengandung histamin dan mediator peradangan lainnya. Basofil dapat disebut sebagai pelengkap fungsi sel mast pada reaksi hipersensivitas cepat dengan bermigrasi ke jaringan ikat (Mescher, 2012). Basofil memiliki tempat-tempat

perlekatan IgG dan degranulasinya dikaitkan dengan pelepasan histamin. Fungsinya berperan dalam respon alergi (Hoffbrand, 2011).



Gambar 2.26. Basofil (Mescher, 2012)

2.13.4 Monosit

Monosit adalah leukosit kelompok agranulosit yang jumlahnya sekitar 0,7-2,6% dari total leukosit dalam darah (Nugroho, 2018) dan memiliki diameter berkisar 12-20 μm serta berasal dari sumsum tulang. Inti dari monosit terkadang berbentuk lonjong, berbentuk seperti ginjal atau seperti huruf U, serta terletak agak eksentris. Sitoplasma monosit mengandung granula azurofilik dan bersifat basofilik (Gambar 2.27) (Mescher, 2012). Sitoplasma yang melimpah berwarna biru pucat dan mengandung banyak vakuola halus sehingga memberi rupa seperti kaca (Hoffbrand, 2011). Monosit dalam darah merupakan prekursor dari sistem fagosit mononuklear. Monosit dapat berdeferensiasi menjadi makrofag dalam jaringan ikat, mikroglia dan lain sebagainya (Mescher, 2012).

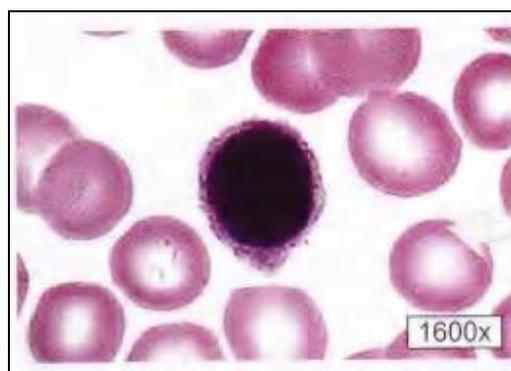


Gambar 2.27. Monosit (Mescher, 2012)

2.13.5 Limfosit

Limfosit merupakan anggota dari leukosit yang memiliki inti berbentuk sferis dan jumlahnya berkisar antara 63-75% dalam darah (Nugroho, 2018). Dalam darah, limfosit berdiameter kecil sekitar 6-8 μm , sedangkan dalam jaringan, limfosit biasanya berukuran sedang hingga besar yaitu 9-18 μm (Gambar 2.28). Berdasarkan molekul penanda di permukaannya, limfosit dibagi menjadi limfosit T, limfosit B dan sel NK (Natural Killer). Jangka hidup limfosit bervariasi dari beberapa hari dalam darah hingga beberapa tahun dalam jaringan. Leukosit ini satu-satunya tipe leukosit yang dapat kembali ke darah setelah jaringan mengalami diapedesis (Mescher, 2012).

Limfosit Ini adalah sel primer yang terlibat dalam respon imun adaptif. Sel ini memiliki reseptor antigen yang sangat berbeda dan dibagi menjadi dua kelompok utama. Limfosit B adalah prekursor sel plasma yang mengeluarkan antibodi. Sedangkan limfosit T sendiri dibagi menjadi dua kelompok utama, yaitu sel T CD4+ yang berfungsi sebagai sel pengatur dan koordinator dalam respon imun adaptif dan sel T CD8+ yang dapat berkembang menjadi sel sitotoksik dengan kapasitas untuk membunuh sel yang terinfeksi virus atau mikroba lainnya. Limfosit T sitotoksik (CTL) dan sel NK, yang disebutkan di atas, adalah dua jenis utama sel sitotoksik dalam sistem kekebalan tubuh (Hoffbrand, 2011).



Gambar 2.28. Limfosit (Mescher, 2012)

2.13.5.1 Limfosit B

Limfosit B merupakan sel penghasil antibodi. Antibodi yang dihasilkan berfungsi untuk menetralkan racun, mencegah organisme yang menempel pada permukaan mukosa, mengaktifkan komplemen, mengopsonisasi bakteri untuk fagositosis, dan meredakan tumor dan sel yang terinfeksi untuk serangan sitotoksik yang tergantung antibodi oleh sel-sel pembunuh (Parkin & Cohen, 2001). Limfosit B muncul dan matang di sumsum tulang dan hati janin. Limfosit B dapat berdiferensiasi menjadi sel plasma dan sel memori yang keduanya berperan dalam sistem imun adaptif. Dalam kasus ini, limfosit B membutuhkan bantuan dari limfosit T untuk menjadi aktif dan berkembang menjadi sel plasma (Majumdar, dkk., 2018).

2.13.5.2 Limfosit T

Limfosit T atau sel T memiliki molekul penanda pada permukannya yang disebut reseptor sel T (TCR). Sel T ini bertanggung jawab atas respon imun spesifik seluler. Sel T memiliki tiga subpopulasi utama sebagai berikut (Mescher, 2012):

a. Sel T Helper

Sel T helper merupakan sel yang menghasilkan sitokin yang dapat meningkatkan terjadinya diferensiasi sel B menjadi sel plasma, meningkatkan sifat fagositik pada makrofag, mengaktifkan limfosit T sitotoksik dan menginduksi aktivitas peradangan. Sel T helper mempunyai suatu penanda pada permukannya yang disebut CD4+ atau sel T CD4+.

b. Sel T sitotoksik

Sel T sitotoksik dikenal sebagai CD8+ yang bekerja langsung pada sel asing yang menginfeksi melalui dua mekanisme. Pada mekanisme yang pertama, sel T sitotoksik ini akan melekat pada sel asing, kemudian melepaskan suatu protein yang disebut perforin yang dapat membentuk lubang pada membrane sel target, sehingga mengakibatkan lisis sel. Sedangkan mekanisme lainnya, sel T melekat pada sebuah sel, kemudian membunuhnya dengan memicu apoptosis.

c. Sel T Regulator

Sel T regulator merupakan salah satu subpopulasi dari limfosit T yang dikenal dengan sebutan CD4CD25. Sel ini berperan dalam toleransi imun dalam tubuh,

yaitu menekan respon imun yang berlebihan dan meningkatkan respon imun yang menurun. Sel-sel ini juga menghasilkan toleransi perifer yang dapat memback up toleransi sentral dari timus.

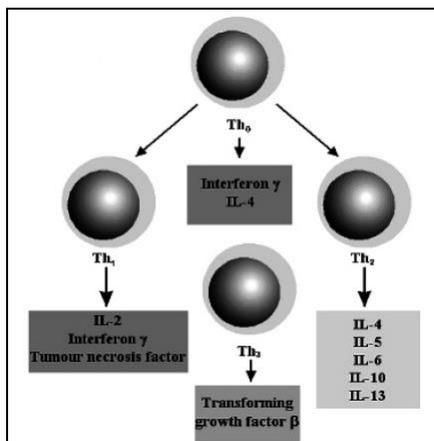
2.14 Sel CD4+

CD4+ adalah molekul yang ditemukan terutama pada permukaan limfosit T *helper*. CD yang ditunjuk adalah singkatan dari “*Cluster of Differentiation*” dan mengacu pada nomenklatur yang diterapkan oleh ahli imunologi, yang semuanya terlibat dalam pembuatan antibodi monoklonal terhadap protein permukaan sel darah. Ketika sekelompok antibodi monoklonal (antibodi yang diproduksi *in vitro* oleh klon tunggal limfosit B) ditemukan bereaksi dengan protein yang sama, hal itu mewakili sekelompok pereaksi yang mendefinisikan penanda spesifik dan penanda itu diberi nomor CD (Mishra, dkk., 2009). CD4+ diekspresikan pada sel T *helper*. Sesuai dengan namanya, sel-sel T *helper* membantu dalam aktivasi kelompok sel lain seperti sel B, sel T sitotoksik, makrofag, dan sel-sel lainnya (Ahmed, dkk., 2009; Majumdar, dkk., 2018). Sel-sel T CD4+ berperan dalam mencegah autoimunitas, menjaga imunitas sekunder (memori kekebalan) dan melindungi kehamilan (Vogt & Schulte, 2011).

Sel T CD4+ bersama dengan sel T CD8+ membentuk sebagian besar limfosit T. Sel T CD4+ setelah diaktifkan dan dibedakan menjadi sub tipe efektor yang berbeda memainkan peran utama dalam memediasi respons imun melalui sekresi sitokin spesifik. Sel T CD4+ dapat dibagi menjadi dua sub tipe, yaitu Th1 dan Th2 sesuai dengan profil sitokinnya dan memiliki sifat fungsional yang berbeda (Luckheeram, dkk., 2012). Sel-sel Th1 menghasilkan IFN- γ , IL-2, dan TNF- α/β yang menginduksi imunitas seluler dan produksi sitokin proinflamasi. Sel Th2 menghasilkan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, dan IL-13 yang mendukung imunitas humoral yang diperantarai oleh sel B dan pola sitokin antiinflamasi (Gambar 2.29) (Romagnani, 1991).

Berbagai penanda membran telah diusulkan untuk memisahkan Th1 dan Th2. Secara khusus, reseptor kemokin CCR3 tampaknya diekspresikan secara selektif pada Th2 tetapi tidak pada sel Th1 (Nakayama, dkk., 2017; Sallusto, 2016). Respon tipe Th1 dan Th2 tidak hanya memainkan peran yang berbeda dalam perlindungan tetapi juga dapat mempromosikan reaksi imunopatologis

yang berbeda. Penyakit radang kronis sering diperantarai Th1, dan penyakit alergi terkait IgE sering dikaitkan dengan respons Th2 (Aarvak, dkk., 1999; Constant & Bottomly, 1997; Romagnani, 1991).



Gambar 2.29. Kluster sel CD4+ dan sitokinnya (Eales, 2005)

2.15 Imunomodulator

Imunomodulator adalah zat alami atau sintetis yang membantu mengatur atau menormalkan sistem kekebalan tubuh. Imunomodulator memperbaiki sistem kekebalan tubuh yang tidak seimbang. Imunomodulator memperbaiki sistem kekebalan yang lemah dan meredam sistem kekebalan yang terlalu aktif. Imunomodulator direkomendasikan untuk orang dengan penyakit autoimun dan pada penyakit kronis untuk memulihkan kesehatan sistem kekebalan tubuh pada orang yang telah lama menjalani terapi antibiotik atau antivirus. Imunomodulator bertindak pada lokasi yang berbeda pada sistem kekebalan tubuh dan menargetkan berbagai sel yang memiliki beberapa lokasi aksi. Fungsi imunomodulator dalam urutan fisiologis tubuh adalah mengaktifkan makrofag dan sel-sel granulosit dengan meningkatkan fagositosis. Makrofag yang diaktifkan tidak hanya menunjukkan peningkatan fagositosis tetapi juga dikonversi menjadi sel sekretori sebagai sel efektor sitotoksik. Akibatnya, sel-sel tersebut mampu merangsang atau menekan sistem kekebalan humoral dan seluler (Saxena, dkk., 2012).

Manfaat imunomodulator berasal dari kemampuan mereka untuk merangsang mekanisme pertahanan alami dan adaptif, seperti sitokin, yang memungkinkan tubuh untuk membantu dirinya sendiri. Imunomodulator alami bertindak untuk memperkuat sistem kekebalan tubuh yang lemah dan menekan sistem kekebalan tubuh yang terlalu aktif. Sterol dan sterolin tumbuhan adalah imunomodulator alami yang ditemukan di beberapa buah dan sayuran mentah dan di alga, spirulina (Patil, dkk., 2012).

Obat imunomodulator memodifikasi respon sistem kekebalan dengan meningkatkan (imunostimulator) atau mengurangi (imunosupresif) produksi antibodi serum (Bascones-Martinez, dkk., 2014). Obat imunomodulator sintetik, seperti azathioprine, 6-mercaptopurine, methotrexate, dan mycophenolate mofetil bekerja dengan menekan sistem kekebalan tubuh dan mengurangi peradangan pada saluran pencernaan pada orang dengan penyakit radang usus, kolitis ulserativa, dan penyakit Crohn. Tacrolimus dapat digunakan pada penyakit Crohn ketika kortikosteroid terbukti tidak efektif (Saxena, dkk., 2012). Obat golongan imunomodulator bekerja menurut 3 cara, yaitu melalui imunorestorasi, imunostimulasi dan immunosupresi. Imunorestorasi dan imunostimulasi disebut imunopotensiasi atau *up regulation*, sedangkan immunosupresi disebut juga *down regulation*. Imunostimulasi adalah cara memperbaiki fungsi sistem imun dengan menggunakan bahan yang merangsang sistem tersebut (Djajakusumah, 2010).

2.15.1 Imunostimulasi

Imunostimulator adalah zat (obat-obatan dan nutrisi) yang melakukan imunostimulasi sistem kekebalan tubuh dengan mendorong aktivasi atau meningkatkan aktivitas organ apapun. Ada dua kategori utama imunostimulator: Imunostimulator spesifik, obat-obat ini memberikan spesifisitas antigenik dalam respons imun, seperti vaksin atau antigen lainnya. Imunostimulator non-spesifik adalah agen terlepas dari spesifisitas antigenik, menambah respons imun antigen lain atau merangsang komponen sistem kekebalan tanpa kekhususan antigen, seperti adjuvan. Banyak zat endogen adalah imunostimulator non-spesifik. Misalnya, hormon seks wanita diketahui merangsang respons imun adaptif dan bawaan. Hormon lain tampaknya juga mengatur sistem kekebalan tubuh, terutama prolaktin, hormon pertumbuhan, dan vitamin D (Saxena, dkk., 2012).

2.15.2 Imunosupresi

Imunopresi merupakan rangkaian *down regulation* dalam sistem kekebalan tubuh (Djajakusumah, 2010). Imunosupresan adalah zat yang digunakan untuk melakukan imunosupresi sistem imunitas. Terdapat dua tipe imunosupresan yaitu bisa eksogen sebagai obat imunosupresif atau endogen, seperti testosteron. Setelah transplantasi organ, tubuh hampir selalu menolak organ baru karena reseptor protein sel mereka berbeda dari yang asli. Akibatnya, sistem kekebalan mendeteksi jaringan baru sebagai “*musuh*”, dan mencoba untuk memusnahkannya dengan menyerang melalui leukosit, sehingga mengakibatkan kematian jaringan. Efek sampingnya adalah tubuh menjadi sangat rentan terhadap infeksi, seperti halnya AIDS. Obat-obatan ini bukan berarti tanpa efek samping dan risiko. Karena mayoritas dari mereka bertindak non selektif, sistem kekebalan tubuh kurang mampu melawan infeksi dan penyebaran sel-sel ganas. Efek sampingnya adalah tubuh menjadi sangat rentan terhadap infeksi, seperti halnya AIDS. Ada juga efek samping lain, seperti hipertensi, dislipidemia, hiperglikemia, radang lambung, hati, dan gagal ginjal (Saxena, dkk., 2012).

2.15.3 Imunorestorasi

Imunorestorasi adalah suatu cara mengembalikan fungsi sistem imun yang disumbangkan dengan berbagai komponen sistem imun, seperti imunoglobulin dalam bentuk imun serum globulin (ISG), globulin serum hiperimun (ISG), plasma, sumsum tulang transplantasi, jaringan hati, timus, plasmaferesis, dan leukoferesis (Djajakusumah, 2010).

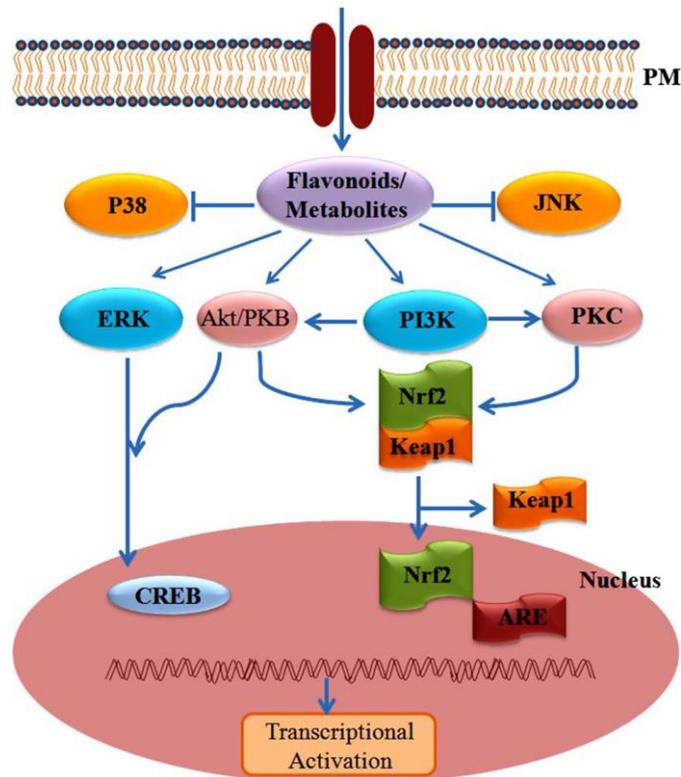
2.16 Mekanisme Imunomodulator *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus*

Sistem imun mempunyai peran sentral dalam melindungi tubuh dari berbagai faktor pemicu penyakit eksternal maupun internal. Sistem imun dapat mengatur dirinya sendiri melalui sel-sel pembantu atau penekan dan protein-protein yang dapat larut. Zat gizi dan senyawa bioaktif dalam suatu bahan atau tumbuhan berpotensi mempengaruhi hampir seluruh aspek imunitas. Keterkaitan antara sistem imun dan senyawa tersebut telah dipelajari secara komprehensif dan menunjukkan bahwa senyawa tersebut dapat berperan sebagai stimulus dalam meningkatkan fungsi sistem imun (Mirabeau & Samson, 2012).

Berbagai senyawa dalam tumbuhan disebut sebagai imunomodulator. Imunomodulator adalah senyawa yang mampu memodulasi mekanisme imunitas tubuh secara spesifik atau non spesifik. Imunomodulator ini sebagian besar bekerja sebagai mitogen, yaitu senyawa yang mampu menaikkan atau menekan proliferasi sel imun. Sel target dari imunomodulator antara lain makrofag, sel granulosit, sel T dan B (Parlinaningrum, dkk., 2014). Adapun tumbuhan dalam penelitian ini yang memiliki senyawa imunomodulator di antaranya, yaitu *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus*. Ketiga tumbuhan di atas memiliki kandungan senyawa bioaktif seperti flavonoid, saponin, tannin, polifenol, triterpenoid dan lain sebagainya (Muchtaramah, dkk., 2017). Berdasarkan senyawa-senyawa yang telah disebutkan, flavonoid merupakan salah satu senyawa aktif tumbuhan yang telah dikenal banyak kalangan memiliki efek imunomodulator pada sistem kekebalan. Banyak data penelitian yang menunjukkan bahwa flavonoid dapat menekan respon imun pro-inflamasi (Hosseinzada, dkk., 2019).

Flavonoid dianggap sebagai metabolit sekunder tanaman yang memiliki banyak fungsi farmakologis seperti antioksidan, anti-mutagenik, antibakteri, anti-angiogenik, anti-inflamasi, anti-alergi, modulasi enzim, dan anti-kanker (Ravishankar, dkk., 2013). Flavonoid bersifat polifenol dengan berbagai struktur. Berdasarkan keragaman ini, mereka dikategorikan menjadi flavon, flavanol, isoflavon, flavonol, flavanon, flavanonol, dan kalkon (Middleton, dkk., 2000). Struktur flavonoid yang beragam telah menghasilkan banyak khasiat termasuk efek antikanker dan anti-inflamasi (Cardenas, dkk., 2011; Middleton, dkk., 2000; Ravishankar, dkk., 2013). Baru-baru ini, telah ditunjukkan bahwa flavonoid dapat mempengaruhi respon sistem kekebalan dan memiliki efek modulator kekebalan (Hosseinzade, dkk., 2019).

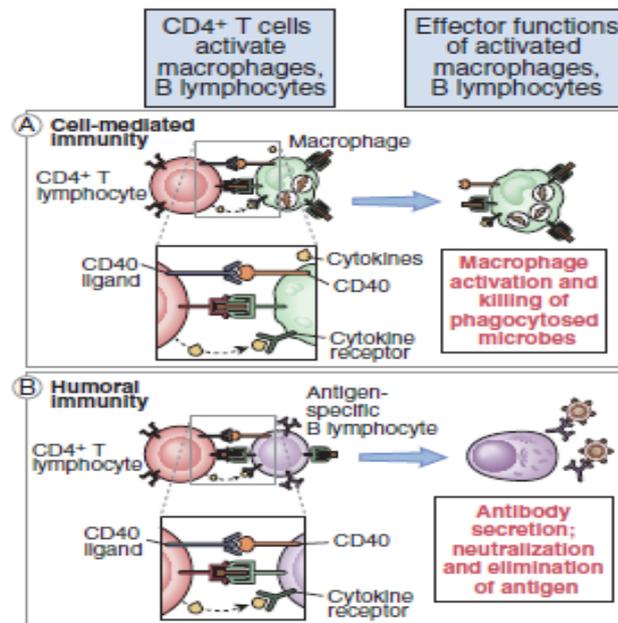
Flavonoid dapat memodulasi sistem imun dengan mengaktifkan berbagai jalur pensinyalan transkripsi sel, sehingga sel-sel imun dapat berproliferasi atau ditekan untuk mendapatkan sistem imun yang seimbang. Jalur-jalur pensinyalan transkripsi yang diaktifkan oleh flavonoid antara lain ERK, Akt / PKB, PI3K, dan PKC untuk meningkatkan kelangsungan hidup sel (Gambar 2.30) (Mansuri, dkk., 2014).



Gambar 2.30. Skema interaksi flavonoid dengan jalur pensinyalan sel (Mansuri, dkk., 2014)

Adapun salah satu sel imun yang diaktivasi oleh flavonoid yaitu sel T (Saifulhaq, 2009). Inisiasi respons sel T membutuhkan banyak reseptor pada sel T untuk mengenali ligan pada APC. Aktivasi penuh sel T bergantung pada pengenalan kostimulator pada APC. Sebutan kostimulator berasal dari fakta bahwa molekul-molekul ini memberikan rangsangan pada sel T yang berfungsi bersama dengan rangsangan oleh antigen. Dalam hal ini yang berperan sebagai kostimulator adalah flavonoid. Pada pengenalan antigen dan kostimulator, sel T mengekspresikan protein yang terlibat dalam proliferasi, diferensiasi, dan fungsi efektor sel. Sel T naif yang belum bertemu antigen (disebut sel istirahat) memiliki sintesis protein tingkat rendah. Dalam beberapa menit setelah pengenalan antigen, transkripsi gen baru dan sintesis protein terlihat di sel T yang diaktifkan. Menanggapi antigen dan kostimulator, sel T terutama sel CD4⁺, dengan cepat mengeluarkan beberapa sitokin berbeda yang memiliki aktivitas beragam. Sitokin adalah sekelompok besar protein yang berfungsi sebagai mediator imunitas dan inflamasi. Dalam kekebalan adaptif, sitokin disekresikan oleh sel T (Abbas &

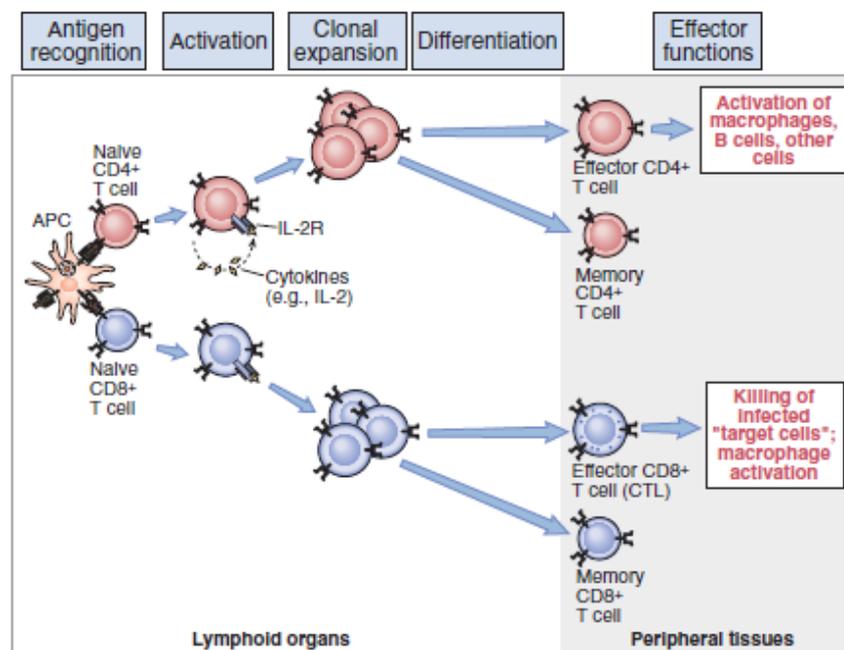
Lichtman, 2011). Proliferasi limfosit T akan mempengaruhi sel CD4+. Sel CD4+ ini merupakan subset dari sel T yang memainkan peran sentral dalam sistem imun. Sel CD4+ juga membantu sel B memproduksi kelas antibodi yang berbeda (Gambar 2.31) (Hosseinzade, dkk., 2019).



Gambar 2.31. Molekul yang terlibat dalam fungsi sel CD4+ (Abbas & Lichtman, 2011)

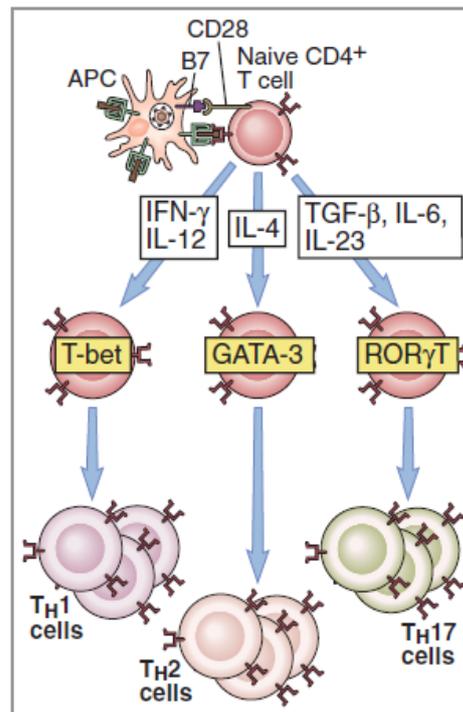
Sitokin pertama yang diproduksi oleh sel CD4 + dalam 1-2 jam setelah aktivasi adalah IL-2. Aktivasi juga dengan cepat meningkatkan kemampuan sel T untuk mengikat dan merespon IL-2, dengan meningkatkan ekspresi IL-2 reseptor. Sel T naif mengekspresikan dua rantai pensinyalan dari reseptor ini, tetapi tidak mengekspresikan rantai yang memungkinkan reseptor untuk mengikat IL-2 dengan afinitas tinggi. Dalam beberapa jam setelah aktivasi oleh antigen dan kostimulator, sel T menghasilkan reseptor rantai ketiga dan sekarang mampu mengikat IL-2 dengan kuat. Jadi, IL-2 yang diproduksi oleh sel T yang distimulasi antigen secara istimewa berikatan dengan dan bekerja pada sel T yang sama. Tindakan utama IL-2 adalah untuk merangsang kelangsungan hidup dan proliferasi sel T; untuk alasan ini IL-2 juga disebut faktor pertumbuhan sel T. IL-2

juga penting untuk pemeliharaan sel T regulator dan dengan demikian untuk mengontrol respons imun. IL-2 merangsang sel T untuk memasuki siklus sel dan mulai membelah, menghasilkan peningkatan jumlah sel T yang spesifik antigen (Gambar 2.32) (Abbas & Lichtman, 2011). Terdapat juga suatu penelitian yang menyatakan bahwa meningkatnya proliferasi sel T dapat melalui IL-4 selain melalui IL-2 (Middleton, dkk., 2000)



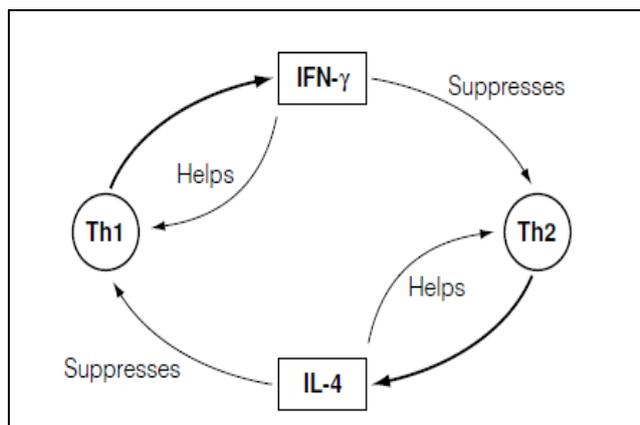
Gambar 2.32. Proliferasi dan diferensiasi sel T (Abbas & Lichtman, 2011)

Sel CD4+ dapat berdiferensiasi dan berproliferasi menjadi subset sel efektor yang menghasilkan set sitokin yang berbeda dengan fungsi yang berbeda. Subset yang didefinisikan pertama kali disebut sel Th1 dan sel Th2 (untuk sel T *helper* tipe 1 dan sel T *helper* tipe 2); baru-baru ini, subset ketiga telah diidentifikasi dan disebut sel TH17 karena sitokinnya yang khas adalah IL-17 (Gambar 2.33). Sel T regulator juga merupakan bagian lain dari sel CD4+, karena peran mereka dalam menekan respons imun. Sel Th1 dan Th2 dapat dibedakan tidak hanya oleh sitokin yang mereka hasilkan tetapi juga oleh reseptor sitokin dan molekul adhesi yang mereka ekspresikan (Abbas & Lichtman, 2011).



Gambar 2.33. Perkembangan subset Th1, Th2 dan Th17 (Abbas & Lichtman, 2011)

Sitokin dari Th1 dan Th2 dapat mengatur dirinya sendiri dan juga menghambat fungsi satu sama lain (Gambar 2.34). Tindakan stimulasi dan supresi sitokin yang diproduksi oleh sel Th1 dan Th2 satu sama lain juga memainkan peran utama dalam menentukan jenis dan tingkat respons imun. Flavonoid dapat memicu aktivasi efektor sel Th1 dan Th2 secara langsung dalam memproduksi sitokin tanpa adanya respon imun terhadap antigen intraseluler atau antigen ekstraseluler. Sitokin yang dihasilkan oleh Th1 dan Th2 mampu meningkatkan aktivasi makrofag, pembentukan antibodi dan sel-sel imun lainnya (Abbas & Lichtman, 2011). Dengan demikian, Flavonoid mampu meningkatkan aktivitas fagositosis secara cepat dalam memusnahkan antigen intraseluler dan meningkatkan pertahanan terhadap antigen ekstraseluler (Rosnizar, dkk., 2017). Misalnya, IL-4 dan IL-10 menurunkan regulasi respons Th1 sedangkan IFN γ memiliki efek antagonis pada sel Th2. Mekanisme pengaturan tersebut diperlukan untuk mencegah kerusakan tambahan serta penghematan energi (Abbas & Lichtman, 2011).



Gambar 2.34. Regulasi sel Th1 dan Th2 (Abbas & Lichtman, 2011)

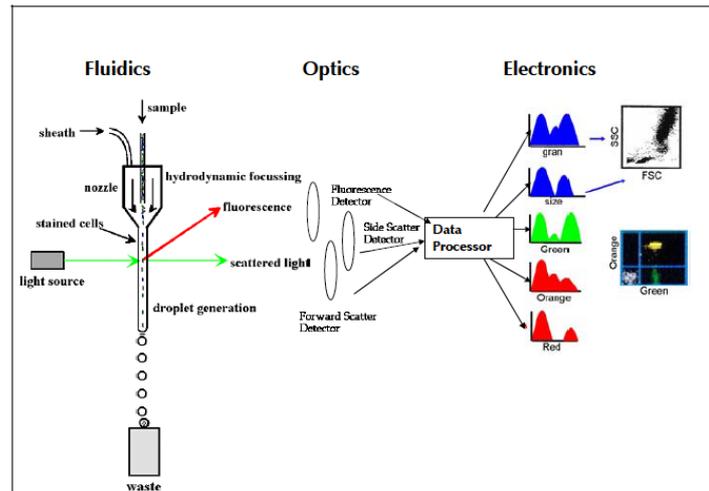
Jadi, fungsi pokok dari Th1 adalah sebagai pertahanan infeksi yang proses fagositosis sangat diperlukan. Th1 juga mensekresikan IL-2 yang berperan sebagai faktor pertumbuhan autokrin, mendorong proliferasi dan diferensiasi limfosit T. Sedangkan fungsi pokok sitokin-sitokin dari Th2 adalah merangsang sel B untuk produksi imunoglobulin dan mengaktifkan eosinofil, yang berfungsi sebagai mediator alergi dan pertahanan infeksi terhadap cacing. Th2 juga memproduksi sitokin bersifat antagonis terhadap IFN- γ dan menekan aktivasi makrofag, sehingga Th2 dapat berfungsi sebagai regulator fisiologis pada respon imun dengan menahan efek yang mungkin membahayakan yang berasal dari respon Th1. Sedangkan subset sel CD4⁺ terbaru yaitu Sel TH17, menghasilkan IL-17. terlibat dalam beberapa penyakit inflamasi dan mungkin berperan dalam pertahanan melawan infeksi bakteri (Abbas & Lichtman, 2011).

2.17 Flowsitometri

Munculnya teknologi antibodi monoklonal dan pengembangan flowsitometri telah memfasilitasi karakterisasi fenotipik berbagai jenis limfosit yang berbeda secara fungsional. Selain itu, ketersediaan flowsitometri dengan multi-parametrik menggunakan berbagai fluorokrom telah memungkinkan untuk pengukuran sejumlah besar subset sel. flowsitometri telah menambahkan dimensi baru pada penelitian medis dan biologi, termasuk imunologi (World Health Organization, 2007).

Flowsitometri mengacu pada teknologi yang secara simultan mengukur dan menganalisis berbagai karakteristik fisik dan kimia sel atau partikel biologis lainnya, karena mereka mengalir dalam aliran fluida melewati sensor optik. Flowsitometri ini memberikan informasi tentang ukuran relatif, granularitas relatif atau struktur internal, dan fluoresensi di beberapa daerah spektral yang dipancarkan oleh probe berlabel fluorokrom yang mengikat secara spesifik dan stoikiometrik ke konstituen seluler seperti antigen protein dan asam nukleat (World Health Organization, 2007).

Analisis immunofluorescence oleh flowsitometri adalah standar untuk pengukuran limfosit T CD4+ dan juga metode pilihan jika diperlukan dengan sampel yang besar. Uji flowsitometri bekerja pada prinsip hamburan cahaya karena ukuran yang berbeda, granularitas sel yang melewati sinar laser, dan juga fluoresensi yang dipancarkan oleh sel setelah pewarnaan dengan antibodi monoklonal spesifik. Pewarna antibodi monoklonal spesifik ini sebagai penanda permukaan sel yang akan diuji. Antibodi monoklonal secara spesifik mengikat reseptor permukaan yang berbeda seperti CD4+ untuk sel T *helper*. Persentase relatif dari sel-sel yang mengekspresikan reseptor spesifik (misalnya CD4+) pada permukaannya diperoleh dari flowsitometer. Penentuan jumlah limfosit T CD4+ absolut dengan flowsitometer dapat dilakukan dengan menggunakan metode platform ganda dan tunggal. Flowsitometer umumnya terdiri dari tiga sistem utama (Gambar 2.35): fluidisk, optik, dan elektronik (World Health Organization, 2007).



Gambar 2.35. Skema sederhana flowsitometri (World Health Organization, 2007)

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian tentang aktivitas imunomodulator nanopartikel kombinasi ekstrak *Allium sativum* (Bawang putih), *Curcuma mangga* (Temu mangga) dan *Acorus calamus* (Jeringau) terhadap profil leukosit dan sel CD4+ (*Cluster of Differentiation 4*) pada mencit betina (*Mus musculus*) merupakan penelitian eksperimental menggunakan rancangan acak kelompok (RAK) dengan 5 perlakuan dan 6 kali ulangan.

3.2 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan pada penelitian ini adalah:

- A. Variabel bebas: nanopartikel kombinasi ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* dengan dosis 25 mg/kgBB dan 50 mg/kgBB.
- B. Variabel terikat: total dan jenis leukosit serta sel CD4+ sebagai target yang akan dimodulasi.
- C. Variable terkendali: *M. musculus* betina galur Balb-C usia sekitar 2-3 bulan dengan berat badan 20-25 gr, mencit aktif, berambut lembut, rambut tidak mudah rontok dan yang diberi makan pellet BR 1 serta diberi minum air mineral secara *ad libitum*.

3.3 Tempat dan Waktu penelitian

Penelitian tentang aktivitas imunomodulator nanopartikel kombinasi ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* terhadap profil leukosit dan sel CD4+ *M. musculus* betina dilakukan di Laboratorium Fisiologi Hewan dan Laboratorium Hewan Coba Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, Laboratorium Farmasi Herbal, Universitas Ma Chung dan Laboratorium Biologi Molekuler, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini dimulai Maret 2020 hingga Agustus 2020.

3.4 Populasi dan Sampel

Penelitian ini menggunakan hewan coba *M. musculus* galur Balb-C, berjenis kelamin betina, berumur 2-3 bulan dan memiliki berat badan kisaran 20-25 gr. *M. musculus* ini didapat dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) Jl. Soekarno Hatta Kota Malang. *M. musculus* yang digunakan berjumlah 25 ekor yang dibagi menjadi 5 perlakuan dengan 6 kali ulangan. Penentuan ulangan pada penelitian ini dilakukan berdasarkan perhitungan menggunakan rumus Federer $(t-1)(r-1) \geq 15$ (Hanafiah, 2016). Berdasarkan rumus tersebut didapatkan perhitungan sebagai berikut:

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(5-1)(r-1) \geq 15$$

$$4(r-1) \geq 15$$

$$4r - 4 \geq 15$$

$$4r \geq 15 + 4$$

$$r = 19/4$$

$$r = 4,75$$

Berdasarkan hasil perhitungan yang didapatkan yaitu 4,75 maka dapat dibulatkan menjadi 5 dan untuk mengantisipasi terjadinya kematian hewan coba serta semakin banyaknya ulangan maka semakin tinggi pula tingkat akurasi. Oleh karena itu, dalam penelitian ini ulangannya digenapkan menjadi 6 kali ulangan.

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah kandang hewan coba, kawat penutup kandang, tempat pakan, tempat minum, spidol, kertas label, aluminium foil, plastik wrap, kantong plastik, karet gelang, tabung *ependorf* 15 ml, tube 1,5 ml, *disposable syringe* 1 ml (OneMed), sonde lambung hasil modifikasi dari spuit 3 ml, cawan petri, saringan *wire*, spatula, timbangan analitik (Sartorius), beaker glass 1000 ml (IWAKI), gelas ukur (IWAKI), Erlenmeyer (IWAKI) 500 ml, corong, kertas saring *whatmann*, toples, saringan *mesh*, perangkat *rotary evaporator*, mortar, pistil, *freezer* 4⁰ C, *sentrifuge* (Thermo scientific Heracus Labokuge 200), vortex, *ultrasonic processor* (Cole Pamer

CV188), oven (Heracus), *hot plate* (Barnstead/thermolyne), *homogenizer* (IKA T-25 Ultra-Turrax), *stirrer*, inkubator (Mettler UNB 400), *dissecting set*, papan seksi, mikroskop binokuler (Olympus), mikropipet (BioRad), tip biru (OneMed), pipet tetes, shaker, *object glass* (OneMed), *cover glass* (Sail Brand), perangkat hemasitometer (Assistant Germany), flowsitometer (FACS Calibur™) dan Software Cell Quest Pro™.

3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah *M. musculus* betina galur Balb-C berumur 2-3 bulan dan memiliki berat badan 20-25 gr, simplisia *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* yang diperoleh dari Balai Matera Medika Batu, ethanol 70%, kitosan, tween 80, sodium tripolifosfat (STPP), pakan BR 1, klomifen sitrat (Profertil), PMSG, HCG, giemsa, methanol, larutan turk, spleen/limpa, aquades, air mineral (Aqua), PBS steril, FITC (Fluoresceinisothiocyanate) - conjugated antimouse - CD4+ (BioLegend).

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Persiapan Hewan Coba

M. musculus diaklimatisasi di Laboratorium Hewan Coba, Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang selama 2 minggu, kemudian dibagi menjadi beberapa kelompok perlakuan yang mengacu pada penelitian sebelumnya yang terdiri atas kontrol negatif yaitu mencit yang hanya diberi aquades dan kelompok perlakuan yaitu mencit yang diberi nanopartikel kombinasi ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* dengan perbandingan (36%: 36%: 28%) masing-masing pemberian dengan dosis 25 mg/KgBB dan 50 mg/KgBB, pemberian jamu subur kandungan dengan dosis 75 mg/KgBB serta pemberian klomifen sitrat dengan dosis 0,9 mg/KgBB (Muchtarmah, dkk., 2020). *M. musculus* diberi pakan pellet BRI dan diberi minum secara *ad-libitum* berupa air mineral dari Laboratorium Hewan Coba, Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.6.1.1 Pembagian Kelompok

Penelitian ini menggunakan 5 kelompok perlakuan, masing-masing perlakuan terdiri dari 6 ekor *M. musculus* sebagai ulangan. Kelompok tersebut dibagi sebagai berikut:

- a. Kelompok I (kontrol negatif) : *M. musculus* yang diberi aquades
- b. Kelompok III (P1): *M. musculus* yang diberi perlakuan kombinasi dengan dosis 25 mg/KgBB
- c. Kelompok IV (P2): *M. musculus* yang diberi perlakuan kombinasi dengan dosis 50 mg/KgBB
- d. Kelompok V (P3): *M. musculus* yang diberi perlakuan jamu subur kandungan dengan dosis 75 mg/KgBB
- e. Kelompok II (P4): *M. musculus* yang diberi perlakuan klomifen sitrat dengan dosis 0,9 mg/KgBB

3.6.2 Pemberian Nanopartikel Kombinasi Ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus*

3.6.2.1 Penentuan Dosis Perlakuan

Penentuan dosis ini mengacu pada penelitian sebelumnya, nanopartikel kombinasi ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* tersalut kitosan diberikan kepada *M. musculus* secara oral dengan dosis yaitu 25 mg/kgBB dan 50 mg/kgBB. Sedangkan dosis klomifen sitrat dan jamu subur kandungan yaitu sebesar 0,9 mg/KgBB dan 75 mg/KgBB (Muchtarmah, dkk., 2020).

3.6.2.2 Pembuatan Ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus*

Total 100 gram dari simplisia *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* dimasukkan ke dalam beaker glass 1000 ml dengan rasio perbandingan 36%: 36%: 28% dan dimaserasi dengan etanol 70% dengan perbandingan 1:4 (Muchtarmah, dkk., 2020). Selanjutnya, direndam selama 24 jam dan sesekali diaduk. Setelah 24 jam, larutan tersebut disaring menggunakan kertas saring whatman. Untuk mempercepat proses pengeringan bisa digunakan vacuum dengan corong *buchner*. Ampas yang diperoleh dimaserasi lagi dengan etanol 70% dengan perbandingan 1:4 dan direndam selama 24 jam dengan sesekali diaduk. Filtrat yang diperoleh dari proses maserasi dipekatkan dengan *rotary*

evaporator pada suhu 40-50°C. Ekstraksi pekat yang dihasilkan ditempatkan pada erlenmeyer 250 ml (Muchtromah, dkk., 2020; Sidqi, 2011).

3.6.2.3 Pembuatan Nanopartikel Kombinasi Ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* Tersalut Kitosan

Pembuatan nanopartikel kombinasi ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* tersalut kitosan ini mengacu pada prosedur Pakki dkk (2016) yang telah dimodifikasi. Pembuatan sampel ini diawali dengan melarutkan 0,5% asam asetat glasial (AAG) dalam 100 ml aquades dan dihomogenkan menggunakan *stirrer*. Setelah homogen, ditambahkan dengan 0,5% kitosan dan kembali dihomogenkan menggunakan *stirrer*. Di samping itu, membuat larutan STTP 0,5% yang dilarutkan dalam 20 ml aquades dan dihomogenkan menggunakan homogenizer kecepatan 1000 rpm selama 10 menit. Kemudian kedua larutan tersebut dicampur dan dihomogenkan menggunakan homogenizer kecepatan 1000 rpm selama 10 menit. Setelah homogen, ditambahkan dengan 0,1 gr ekstrak kombinasi *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus*, kemudian diaduk menggunakan homogenizer dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Selanjutnya, ditambahkan tween 80 sebanyak 1 ml dan dihomogenkan menggunakan homogenizer kecepatan 10.000 selama 90 menit. Larutan yang telah dihomogenkan disonikasi pada frekuensi 20 kHz dengan amplitude 90% selama 90 menit. Kemudian, hasil sonikasi dituangkan dalam tabung *ependorf* 15 ml dan disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 30 menit untuk mendapatkan pellet. Pellet yang diperoleh diangin-anginkan atau dimasukkan freezer selama 24 jam dan dibiarkan liofilisasi untuk mendapatkan serbuk nanopartikel. Serbuk tersebut kemudian digerus, diayak dengan ayakan mesh dan disimpan untuk perlakuan.

3.6.2.4 Pemberian Nanopartikel Kombinasi Ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* Tersalut Kitosan

Nanopartikel kombinasi ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* tersalut kitosan diberikan pada *M. musculus* pada hari setelah sinkronisasi siklus estrusnya dengan PMSG dan HCG 5 IU per ekor. Induksi PMSG 5 IU dilakukan melalui intraperitoneal dan induksi HCG 5 IU diberikan setelah selisih 48 jam dari

induksi PMSG (Martin-Coello, dkk., 2008; Park, dkk., 2015). *M. musculus* disinkronkan dalam fase estrus, kemudian diberi kombinasi nanopartikel ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* sebanyak 0,5 ml/dosis secara oral selama 15 hari (tiga kali siklus estrus).

3.6.3 Penentuan Siklus Estrus

Penentuan siklus estrus pada *M. musculus* ini dilakukan menggunakan pipet tetes yang diisi dengan larutan NaCl 0,9%, kemudian dimasukkan secara perlahan pada lubang vagina dan larutan NaCl 0,9% yang ada pada pipet dikeluarkan (*pipetting*) sebanyak 1-2 kali untuk mendapatkan lendir. Lendir tersebut diteteskan pada objek glass dan ditunggu hingga sedikit mengering. Setelah itu, difiksasi dengan methanol 10% dan apusan tersebut kembali dikeringkan lalu diteteskan dengan larutan pewarna Giemsa. Setelah terwarnai, dibilas dengan aquades dan dikeringkan kembali. Apusan dapat diamati dengan mikroskop perbesaran 100x (Cora, dkk, 2015 modifikasi).

3.6.4 Perhitungan Jumlah dan Jenis Leukosit

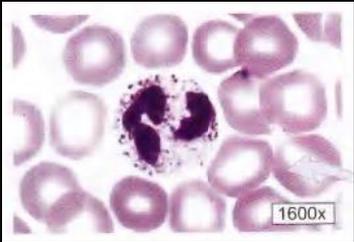
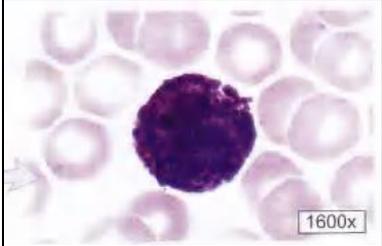
3.6.4.2 Perhitungan Jumlah Leukosit

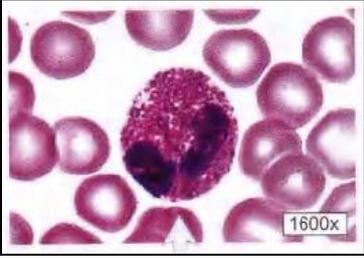
Darah terlebih dahulu diambil dari vena bagian ekor *M. musculus* (Paim, dkk., 2011). Kemudian darah diaspirasi menggunakan pipet thoma leukosit hingga batas garis 0,5, kemudian dilanjutkan dengan larutan turk (untuk melisiskan eritrosit) hingga batas garis 11. Campuran dalam pipet tersebut dihomogenkan dengan digoyangkan membentuk angka 8. Campuran yang terdapat di ujung pipet yang tidak ikut tergoyang dibuang dahulu. Campuran yang homogen kemudian diteteskan pada kamar hitung dengan menempelkan ujung pipet di antara dasar kamar hitung yang telah ditutupi dengan *cover glass*. Sampel diamati menggunakan mikroskop perbesaran 100x hingga 400x. Leukosit terlihat berwarna ungu kehitaman (Bjorner & Zhu, 2019). Kemudian Perhitungan leukosit dilakukan pada keempat kotak besar dengan rumus sel-sel yang terhitung x 20 (*factor dillution*) x 10 : 4 (jumlah kotak dalam mm³) (Dillasamola, dkk., 2019).

3.6.4.3 Pembuatan Apusan Darah dan Perhitungan Jenis Leukosit

Perhitungan Jenis Leukosit dilakukan untuk mengetahui persentase jenis-jenis Leukosit (Tabel 3.1). Darah diteteskan pada *object glass* yang telah disediakan. Darah diulas dengan menggunakan *object glass* lain dan dikeringkan. Ulasan darah difiksasi dalam metanol absolut selama 3-5 menit dan dibiarkan kering. Setelah tahap fiksasi, ulasan darah direndam dalam pewarna Giemsa untuk proses pewarnaan selama 1 menit. Setelah itu, dicuci menggunakan aquades yang mengalir untuk menghilangkan bagian yang tidak perlu terwarnai secara perlahan. Ulasan tersebut dikeringkan lalu diamati menggunakan perbesaran terendah hingga terbesar yaitu 1000x untuk mengamati jenis leukosit, hingga total yang teramati mencapai 100 sel (Bjorner & Zhu, 2019). Selanjutnya dilakukan perhitungan persentase jenis leukosit untuk menentukan nilai absolut dari masing-masing jenis leukosit dengan cara mengalikan persentase tersebut dengan jumlah total leukosit dan 100% (Akrom, 2009).

Tabel 3.1 Gambar dan ciri-ciri leukosit

No.	Jenis Leukosit	Gambar	Ciri - Ciri
1.	Neutrofil	 <p>(Mescher, 2012)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Neutrofil stem memiliki diameter antara (10-18) μ. - Diameter sel neutrofil tersegmentasi biasanya berkisar antara (9-16) μ. - Bentuk inti menyerupai “U” atau batang yang menggulung sebelum segmentasi. - Sitoplasma sedang-berlimpah. - Memiliki nukleus multi-lobus
2.	Basofil	 <p>(Mescher, 2012)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Butiran basofilik dalam sel ini berukuran besar dan sangat banyak. - Nukleus sering kali berlobus atau tidak tersegmentasi. - Diameter rata-rata berkisar antara kira-kira (10-15) μ.

3.	Eosinofil	 <p>(Mescher, 2012)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Eosinofil memiliki Inti yang terdiri atas dua lobus yang dihubungkan oleh pita materi inti. - Diameternya biasanya berkisar antara (9-15) μ.
4.	Limfosit	 <p>(Mescher, 2012)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Diameter inti limfosit kecil berkisar antara (6-9) μ, sedangkan diameter inti besar kira-kira (10-15) μ. - Limfosit hanya berisi satu inti yang jarang atau hampir tidak berlobus. - Bentuk inti agak lonjong atau bulat dan berwarna gelap.
5.	Monosit	 <p>(Mescher, 2012)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Monosit berdiameter rata-rata (10-30) μ - Monosit hanya mengandung satu inti yang jarang atau hampir tidak berlobus. - Bentuk nukleus dalam monosit sering kali berbentuk bengkok (tapal kuda) atau berbentuk ginjal (reniform).

3.6.5 Analisis Flowsitometri Kadar CD4+

3.6.5.1 Pembedahan dan Isolasi Limpa

M. musculus dimatikan setelah hari ke 15 (tiga kali siklus estrus) pemberian nanopartikel kombinasi ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* tersalut kitosan dengan cara dislokasi leher. Dilakukan pembedahan pada bagian abdomen *M. musculus* dan diisolasi limpa. Limpa yang didapatkan di cuci menggunakan PBS steril 2-3 kali pencucian hingga bersih (Aden & Rifa'i, 2014).

3.6.5.2 Isolasi Sel CD4+ dan Analisis Flowsitometri

Limpa yang telah dibersihkan diletakkan pada cawan petri lain yang bersih, kemudian digerus limpa mencit menggunakan ujung batang *spuult* hingga halus dan ditambahkan 5 ml PBS steril. Disaring hasil gerusan menggunakan saringan *wire* dan diletakkan hasil saringan dalam tabung *ependorf* 15 ml baru. Selanjutnya, dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit. Supernatan yang didapat dibuang dan disisakan pellet yang berada di dasar. Pellet tersebut ditambahkan dengan 1 ml PBS steril dan diresuspensi menggunakan mikropipet. Suspensi sel diambil sebanyak 50 μ l dan dipindahkan dalam *microtube* 1,5 ml. Ditambahkan dengan 50 μ l larutan antibodi spesifik (FITC (*Fluoresceinisothiocyanate*)-*conjugated antimouse-CD4+*). Kemudian suspensi dihomogenkan menggunakan vortex dan diinkubasi selama 20 menit di ruang gelap. Suspensi tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit. Disisakan pellet yang dihasilkan dan ditambahkan PBS sebanyak 400 μ l dan dipindahkan pada kuvet FCM untuk analisis flowsitometri menggunakan alat flowsitometer (*flowcytometry FACS Calibur*TM). Hasil yang diperoleh dianalisis menggunakan BD *Cellquest Pro* TM (Aden & Rifa'i, 2014).

3.7 Analisis Data

Parameter dianalisis menggunakan uji sidik ragam (ANOVA) satu arah melalui program SPSS 16.0 dengan taraf signifikansi 5%. Apabila terdapat perbedaan yang signifikan maka dilanjutkan dengan uji lanjut yang sesuai dan dengan taraf signifikansi 5%. Uji lanjut ini dilakukan berdasarkan koefisien keragaman (KK). Menurut Hanafiah (2016), apabila KK besar (minimal 10% pada kondisi homogen atau minimal 20% pada kondisi heterogen), maka uji lanjut yang digunakan yaitu uji *Duncan*. Jika KK sedang (antara 5-10% pada kondisi homogen atau 10-20% pada kondisi heterogen), maka uji lanjut yang digunakan adalah uji BNT. Jika KK kecil (maksimal 5% pada kondisi homogen atau maksimal 10% pada kondisi heterogen), maka uji lanjut yang dipakai adalah uji BNJ.

Langkah awal yang dilakukan dalam analisis data adalah uji normalitas menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov*. Data dinyatakan terdistribusi normal

apabila nilai $p > 0,05$. Namun, apabila data tidak terdistribusi normal maka dapat dilakukan transformasi data atau dilakukan uji non-parametrik dengan *Kruskall-Wallis* dan *Mann-Whitney*. Data yang terdistribusi normal dapat dilanjutkan uji homogenitas *Levene test*. Jika data dinyatakan homogen, maka dapat dilanjutkan dengan uji parametrik *One Way Anova* dan apabila terdapat perbedaan yang signifikan, maka dapat dilanjutkan dengan uji lanjut yang sesuai (BNT, BNJ dan Duncan). Sedangkan jika data dinyatakan tidak homogen, maka data dapat ditransformasikan terlebih dahulu atau dilakukan uji *Brown-Forsythe* dan dilanjutkan dengan uji non-parametrik *Games-Howell* (Field, 2009). Data pada penelitian ini disajikan dalam bentuk tabel, diagram dan grafik flowsitometri.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Aktivitas Imunomodulator Nanopartikel Ekstrak *Allium sativum*, *Curcuma mangga* dan *Acorus calamus* terhadap Profil Leukosit pada Mencit (*Mus musculus*).

Modulasi sistem imun memainkan peran penting dalam menjaga kesehatan dan mencegah penyakit dalam tubuh (Nader, 2017). Modulasi sistem imun mengacu pada beberapa perubahan respon imun yang meliputi stimulasi, ekspresi, atau inaktivasi beberapa tahap respon imun. Modulasi respon imun ini dapat dipicu oleh bahan yang bersifat imunomodulator (Abood, 2017). Aktivitas imunomodulator merupakan bentuk efek biologis atau farmakologis dari suatu bahan atau herbal terhadap respon imun. Aktivitas imunomodulator digunakan untuk mengobati dan mencegah berbagai penyakit yang bersumber dari ketidakseimbangan sistem imun, sehingga homeostasis sistem imun tetap terjaga (Aden & Rifa'i, 2014).

Cara kerja imunomodulator ada dua jenis tergantung pada pengaruhnya, yaitu imunostimulator dengan meningkatkan respon imun atau immunosupresor dengan menekan respon imun (Saroj, dkk., 2012). Imunomodulator akan memodulasi sistem imun dengan menjaganya dalam keadaan siap melawan segala benda asing (Mishra, dkk., 2008). Di berbagai belahan dunia, ekstrak tumbuhan telah banyak diteliti untuk kemungkinan penggunaannya sebagai imunomodulator (Abood, 2017), karena tumbuhan dapat menghasilkan metabolit sekunder seperti alkaloid, steroid, fenolat dan lainnya yang dapat memulihkan kesehatan dan menyembuhkan berbagai macam penyakit yang terkait sistem imun (Aldi, dkk., 2019; Savant, dkk., 2014).

Penelitian yang melibatkan sistem imun saat ini merupakan salah satu bidang penelitian yang berkembang pesat karena sistem imun bertindak sebagai dasar patologis pada berbagai penyakit. Dalam konteks ini, telah banyak penelitian yang dilakukan untuk mengevaluasi dan memilih tumbuhan sebagai kandidat obat (Darmawan, dkk., 2017). Tumbuhan ini akan dikembangkan sebagai agen imunomodulator yang diduga lebih aman, poten dan memiliki efek

samping yang lebih rendah dibandingkan dengan obat sintetik (Bustanussalam, 2016). Selain itu, obat tradisional yang berasal dari herbal sangat mudah untuk didapatkan di sekitar, harganya yang ekonomis, dan pada umumnya dalam satu tumbuhan tidak hanya memiliki satu efek farmakologis (Ismail, 2015; Katno, 2009; Nursiyah, 2013). Berbeda dengan obat sintetik yang tersedia di masyarakat saat ini yang diketahui harganya lebih mahal dibandingkan dengan obat tradisional, memiliki efek samping yang lebih besar dan sulit didapatkan untuk daerah pedalaman (Ambo Lau, dkk., 2019).

Banyak senyawa dalam tumbuhan yang telah terbukti memiliki efek imunomodulator (Darmawan, dkk., 2017). Di antaranya tumbuhan yang diduga sebagai imunomodulator alami dalam penelitian ini adalah *Allium sativum* (Bawang putih), *Curcuma mangga* (Temu mangga) dan *Acorus calamus* (Jeringau). Adapun jenis sistem imun yang dapat dimodulasi yaitu sistem imun spesifik dan sistem imun non spesifik. Kedua jenis sistem imun tersebut sangat penting keberadaannya untuk menjaga homeostasis tubuh agar tidak mudah terserang penyakit (Vellayutham & Patil, 2015).

Sistem imun non spesifik yang terlibat dalam penelitian ini adalah leukosit. Leukosit merupakan unit penggerak utama dari sistem imun tubuh (Olaniyan, dkk., 2013). Leukosit memainkan peran penting dalam sistem imun dengan melindungi tubuh dari berbagai serangan infeksi. Leukosit ini juga menjadi perantara antara sistem imun non spesifik dengan sistem imun spesifik (Fathima & Khanum, 2017). Oleh karena itu, leukosit dapat dijadikan sebagai salah satu parameter dalam mengukur tingkat imunitas suatu individu. Parameter leukosit pada penelitian ini dilakukan dengan mengukur jumlah total leukosit pada masing-masing kelompok perlakuan.

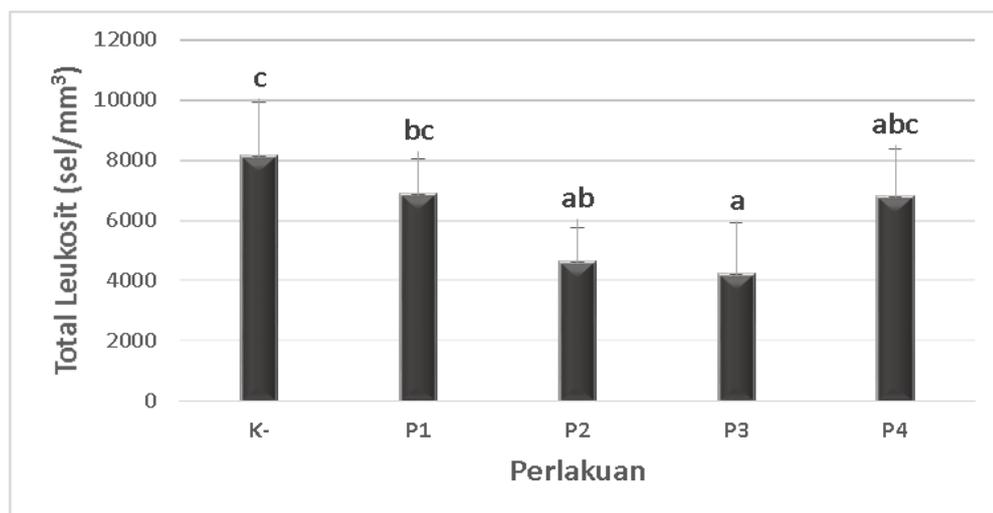
Hasil penelitian tentang aktivitas imunomodulator nanopartikel kombinasi ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* terhadap jumlah total leukosit *Mus musculus* didapatkan dari sampel darah *M. musculus* yang berasal dari 5 perlakuan dan 6 Ulangan. Data jumlah total leukosit pada setiap individu dalam masing-masing kelompok perlakuan dijumlah dan dirata-rata, kemudian dilakukan analisis menggunakan *software* SPSS 16.0. Jumlah total leukosit ini menunjukkan rata-rata hasil perhitungan yang beragam pada tiap kelompok perlakuannya.

Tabel 4.1. Aktivitas Imunomodulator Nanopartikel Ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* terhadap Jumlah Total Leukosit pada Mencit (*M. musculus*)

Perlakuan	Total Leukosit (sel/mm ³)						Rata – rata ± SD
	I	II	III	IV	V	VI	
K-	6000	7600	9200	10600	9000	6200	8133,3 ± 1809,6 ^c
P1	5000	7600	8200	6600	7600	6200	6866,7 ± 1170,8 ^{bc}
P2	6000	4200	4600	5400	2600	4800	4600,0 ± 1166,2 ^{ab}
P3	6400	2600	5800	4000	2000	4400	4200,0 ± 1725,1 ^a
P4	5600	5400	8800	8400	7200	5200	6766,7 ± 1592,1 ^{abc}

Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan taraf α 5% ($p < 0,05$)

Data hasil perhitungan jumlah total leukosit pada masing-masing kelompok perlakuan memiliki sebaran data yang normal berdasarkan uji *Kolmogorov-Smirnov*, yaitu $p=0,456$ dan homogen pada uji *Levene*, yaitu $p=0,455$ ($p > 0,05$), sehingga data tersebut telah memenuhi syarat untuk dilanjutkan uji parametrik *One Way Anova*. Rata-rata jumlah total leukosit yang telah didapatkan dari hasil perhitungan pada masing-masing kelompok perlakuan di antaranya yaitu kelompok K- ($8133,3 \pm 1809,6$), P1 ($6866,7 \pm 1170,8$), P2 ($4600,0 \pm 1166,2$), P3 ($4200,0 \pm 1725,1$) dan P4 ($6766,7 \pm 1592,1$) (Tabel 4.1).



Gambar 4.1. Rata-rata Jumlah Total Leukosit *M. musculus*. Keterangan: K-: Kelompok tanpa perlakuan; P1: Nanopartikel kombinasi ekstrak dosis 25 mg/kgBB; P2: Nanopartikel kombinasi ekstrak dosis 50 mg/kgBB; P3: Jamu subur kandungan dosis 75 mg/kgBB; P4: Klomifen sitrat dosis 0,9 mg/kgBB.

Hasil statistik dari jumlah total leukosit menggunakan *One Way Anova* diketahui $p=0,001$ ($p<0,05$), hal ini menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan, sehingga dilanjutkan dengan uji *Duncan*. Hasil uji lanjut *Duncan* menunjukkan bahwa jumlah total leukosit tertinggi yaitu pada kelompok kontrol (K-) dengan jumlah $8133,3 \text{ sel/mm}^3$, sedangkan yang terendah pada kelompok perlakuan P3 dengan jumlah $4200,0 \text{ sel/mm}^3$. Selain itu, hasil statistik menunjukkan bahwa kelompok perlakuan P2 dan P3 berbeda nyata dengan kelompok kontrol (K-) dengan mengalami penurunan pada jumlah total leukositnya. Sedangkan kelompok perlakuan P1 dan P4 menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol (K-), meskipun juga mengalami penurunan pada jumlah total leukositnya (Gambar 4.1).

Hodge dkk (2002) melaporkan bahwa pemberian ekstrak *A. sativum* dosis $\geq 10 \mu\text{g/ml}$ secara *in vitro* mampu menurunkan leukosit melalui penekanan sitokin proinflamasi seperti $\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-6 dan $\text{IFN}\gamma$. Sedangkan Rosdianto dkk (2016) melaporkan bahwa pemberian jamu subur kandungan yang komposisinya terdiri atas *A. sativum*, *C. domestica*, *C. rhizome*, *N. sativum*, *C. fructus*, *B. folium*, *G. soja*, *P. radiata* dan *E. folium* mampu meningkatkan jumlah total leukosit tikus putih dengan pemberian dosis $50,4 \text{ mg}$ selama 15 hari perlakuan.

Penurunan jumlah total leukosit pada penelitian ini disebabkan oleh pemberian nanopartikel kombinasi ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* yang di dalamnya terdapat berbagai macam senyawa seperti flavonoid, saponin, alkaloid dan lain sebagainya yang dapat menekan aktivitas inflamasi. Hal ini sesuai dengan pernyataan Middleton dkk (2000) dan Zhang dkk (2017) yang menyebutkan bahwa flavonoid yang terkandung dalam suatu tumbuhan terkadang tidak berjalan secara sinergis, karena senyawa tersebut dapat memiliki efek imunostimulan dan efek imunosupresan. Nanang dkk (2013) menambahkan bahwa senyawa steroid tumbuhan juga dapat menurunkan jumlah leukosit dan berpotensi sebagai antiinflamasi.

Peningkatan dan penurunan jumlah total leukosit dalam darah merupakan mekanisme respon tubuh terhadap antigen yang masuk. Purnomo dkk (2015) menyatakan bahwa level peningkatan dan penurunan jumlah total leukosit dalam sirkulasi darah menggambarkan kesanggupan leukosit dalam mencegah hadirnya

antigen dan peradangan. Tingginya jumlah leukosit belum dapat diasumsikan bahwa hewan tersebut dalam keadaan sakit. Meningkatnya jumlah leukosit menggambarkan adanya respon humoral dan seluler dalam melawan antigen. Moyes & Schulte (2008) dan Soeharsono dkk (2010) berargumen bahwa kesehatan fisik hewan dapat dilihat melalui jumlah leukosit yang didapatkan, dimana peningkatan jumlah leukosit mengindikasikan adanya peningkatan kemampuan imunitas tubuh. Sedangkan penurunan jumlah leukosit juga dapat dinyatakan bahwa tidak ditemukan adanya infeksi atau gangguan antigen yang menyerang tubuh.

Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa mencit model yang digunakan berada dalam keadaan normal/sehat, karena penurunan jumlah total leukosit yang terjadi pada kelompok perlakuan masih dalam batas jumlah total leukosit normal (Gambar 4.1). Menurut Ali dkk (2013), kondisi fisiologis tubuh yang sehat dan baik akan ditandai dengan keberadaan profil hematologi yang baik dan komponen darah (salah satunya leukosit) yang berada dalam kisaran normal. Leukosit merupakan komponen darah yang memiliki fungsi utama dalam mencegah infeksi. Jumlah leukosit lebih sedikit bila dibandingkan dengan komponen darah lainnya (Fathima & Khanum, 2017). Menurut Weiss & Wardrop (2010), jumlah total leukosit pada mencit normal yaitu berkisar antara 2000-10000/ μL . Leukosit juga merupakan mediator bagi sistem imun spesifik dan non spesifik. Leukosit terdiri atas dua tipe yaitu leukosit granulosit dan agranulosit. Leukosit granulosit terdiri atas neutrofil, basofil dan eosinofil. Sedangkan leukosit agranulosit terdiri atas limfosit dan monosit (Fathima & Khanum, 2017).

Jumlah total leukosit merupakan salah satu komponen kunci dalam sistem imun. Keberadaan sistem imun sangat dipengaruhi oleh leukosit, karena leukosit mampu mengenali benda asing dan membangun respon imun dalam tubuh (Shabbir, dkk., 2016; Sultana, dkk., 2011). Sugiharto dkk (2015) menyatakan bahwa jumlah total leukosit dan turunannya mampu memberikan gambaran status kesehatan pada hewan.

Guyton & Hall (1997) melaporkan bahwa jumlah total leukosit yang menggambarkan tingkat kesehatan dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor internal antara lain jenis kelamin, umur, penyakit serta hormon dan faktor

eksternal seperti kondisi lingkungan, tingkah laku, stress serta pakan yang diberikan. Isroli dkk (2009) menambahkan bahwa untuk dapat mengetahui tingkat imunitas tubuh hewan dapat dilihat berdasarkan variabel leukosit berupa jumlah total leukosit dan diferensiasi leukosit secara lengkap.

Variabel leukosit dan jenis leukosit merupakan salah satu komponen darah yang dapat menggambarkan status kesehatan imunitas pada hewan (Sugiharto, dkk., 2015). Pada penelitian ini dilakukan pengamatan dan perhitungan persentase terkait jenis-jenis leukosit yang meliputi leukosit granulosit dan leukosit agranulosit. Adapun Leukosit granulosit yang dapat teramati yaitu neutrofil, basofil dan eosinofil, sedangkan leukosit agranulosit yang teramati yaitu limfosit dan monosit.

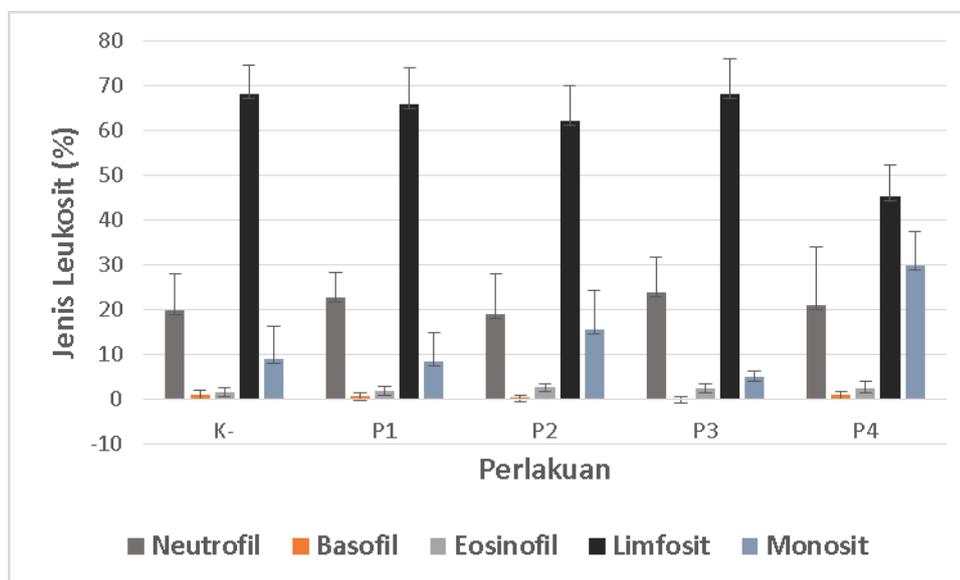
Tabel 4.2. Aktivitas Imunomodulator Nanopartikel Ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* terhadap Jenis Leukosit pada Mencit (*M. musculus*)

Perlakuan	Rerata Persentase Hitung Jenis Leukosit (%) \pm SD				
	Neutrofil	Basofil	Eosinofil	Limfosit	Monosit
K-	20,0 \pm 8,0	1,2 \pm 0,8 ^c	1,5 \pm 1,2	68,3 \pm 6,3 ^b	9,0 \pm 7,5 ^a
P1	22,8 \pm 5,5	0,8 \pm 0,7 ^{abc}	1,8 \pm 1,2	66,0 \pm 8,0 ^b	9,0 \pm 6,4 ^a
P2	19,2 \pm 9,0	0,3 \pm 0,5 ^{ab}	2,7 \pm 0,8	62,2 \pm 8,0 ^b	15,7 \pm 8,7 ^a
P3	23,9 \pm 7,9	0,2 \pm 0,4 ^a	2,5 \pm 1,0	68,3 \pm 7,6 ^b	5,2 \pm 1,2 ^a
P4	21,2 \pm 12,9	1,0 \pm 0,6 ^{bc}	2,5 \pm 1,6	45,3 \pm 7,2 ^a	30,0 \pm 7,5 ^b

Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan taraf α 5% ($p < 0,05$)

Data rata-rata hitung jenis leukosit telah dilakukan uji normalitas menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* dan masing-masing jenis leukosit pada tiap kelompoknya memiliki distribusi yang normal. Data dikatakan normal jika nilai $p > 0,05$. Kemudian dilakukan uji homogenitas menggunakan *Levene Test* dan diperoleh hasil bahwa jenis leukosit neutrofil, basofil, eosinofil dan limfosit homogen, karena hasil uji menunjukkan nilai $p > 0,05$. Sedangkan pada parameter monosit, uji homogenitasnya menunjukkan bahwa data parameter monosit tidak homogen atau nilai $p < 0,05$. Maka data parameter monosit dilanjutkan dengan uji non parametrik. Data hitung jenis leukosit yang telah memenuhi uji normalitas dan uji homogenitas, maka dilanjutkan dengan uji *One Way Anova*. Apabila

terdapat perbedaan yang signifikan maka dilanjutkan dengan uji *Duncan*, namun apabila tidak ada perbedaan yang signifikan maka tidak dilakukan uji lanjut.



Gambar 4.2. Rata-rata Persentase Hitung Jenis Leukosit *M. musculus*. Keterangan: K-: Kelompok tanpa perlakuan; P1: Nanopartikel kombinasi ekstrak dosis 25 mg/kgBB; P2: Nanopartikel kombinasi ekstrak dosis 50 mg/kgBB; P3: Jamu subur kandungan dosis 75 mg/kgBB; P4: Klomifen sitrat dosis 0,9 mg/kgBB.

Data rata-rata presentase hitung jenis leukosit pada penelitian ini dibandingkan dengan kelompok kontrol tanpa perlakuan. Parameter hitung jenis leukosit pada penelitian ini antara lain neutrofil, basofil, eosinofil, limfosit dan monosit. Hasil statistik uji *One Way Anova* terhadap rata-rata persentase neutrofil pada penelitian ini diketahui nilai $p > 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian nanopartikel ekstrak kombinasi *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* terhadap persentase neutrofil tidak memiliki perbedaan yang signifikan pada masing-masing kelompoknya (Gambar 4.2).

Rata-rata persentase neutrofil pada masing-masing kelompok yaitu K- (20,0%), P1 (22,8%), P2 (19,2%), P3 (23,9%) dan P4 (21,2%). Rata-rata persentase neutrofil pada masing-masing kelompok ini diketahui masih berada dalam kisaran normal (Tabel 4.2). Hal ini disebabkan mencit model yang

digunakan merupakan mencit sehat/normal dan diduga tidak terdapat antigen yang masuk yang dapat mengakibatkan inflamasi. Menurut Nugroho (2018), jumlah neutrofil normal pada mencit yaitu berkisar 6,7%-37,2%.

Persentase neutrofil yang cenderung stabil dan dipertahankan dalam batas normal menunjukkan bahwa tikus/mencit tersebut normal (Weiss & Wardrop, 2010). Pada penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak *A. sativum* dosis 1-2 ml/kgBB pada mencit sehat selama perlakuan 7 hari, 14 hari, 21, hari dan 28 hari mengalami penurunan jumlah neutrofil dalam darah, sedangkan pada dosis 4 ml/kgBB mampu menaikkan jumlah neutrofil namun masih berada dalam kisaran normal (Srivastava & Pathak, 2012).

Neutrofil dipilih sebagai salah satu parameter pada penelitian ini karena fungsi neutrofil yang berperan sebagai lini pertama pada sistem imun. Agra dkk (2016) dan Roseno dkk (2019) mengungkapkan bahwa neutrofil merupakan salah satu komponen leukosit yang dikenal sebagai *polymorphonuclear* (PMN) karena bentuknya yang beragam. Neutrofil merupakan leukosit yang paling banyak dijumpai pada darah tepi dan merupakan lini pertama pada sistem imun ketika tubuh mengalami kerusakan jaringan atau disebabkan karena adanya benda asing yang masuk ke dalam tubuh. Neutrofil merupakan leukosit yang pertama kali bermigrasi dari darah ke jaringan ketika terjadi peradangan dan memfagosit patogen (Dashputre & Naikwade, 2010).

Hasil pengamatan terhadap morfologi neutrofil menunjukkan bahwa inti sel neutrofil terlihat berwarna ungu kebiruan, inti sel berbentuk seperti batang yang melengkung dan tersegmentasi, inti sel terdiri atas lebih dari satu lobus yang melingkar. Diameter neutrofil mencapai sekitar 12,6 μm (Gambar 4.3a). Hal ini sesuai dengan pernyataan Al-Dulaimi dkk (2018) bahwa neutrofil memiliki bentuk nukleus yang beragam seperti huruf “U”, batang yang melengkung atau seperti pita. Nukleusnya terdiri atas lebih dari dua lobus atau multi lobus yang tumpang tindih atau melingkar. Neutrofil yang tersegmentasi memiliki diameter 9-16 μm , sedangkan yang belum tersegmentasi diameternya sekitar 10-18 μm .

Komponen jenis leukosit selanjutnya yaitu basofil. Hasil statistik uji *One Way Anova* rata-rata persentase basofil pada masing-masing kelompok diketahui nilai $p=0,04$ ($p<0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa adanya perbedaan yang

signifikan rata-rata persentase basofil pada masing-masing kelompoknya. Oleh karena itu, data rata-rata persentase basofil dilanjutkan dengan uji *Duncan*. Rata-rata persentase basofil pada penelitian ini yaitu K- (1,2%), P1 (0,8%), P2 (0,3%), P3 (0,2%) dan P4 (1,0%) (Tabel 4.2). Berdasarkan rata-rata tersebut diperoleh rata-rata persentase tertinggi pada kelompok kontrol dan rata-rata persentase terendah pada kelompok P3.

Hasil uji *Duncan* menunjukkan bahwa rata-rata persentase basofil pada kelompok perlakuan P3 (0,2%) berbeda nyata dengan kelompok kontrol (K-) (1,2%) dan dengan kelompok perlakuan P4 (1,0%). Begitu pula pada kelompok perlakuan P2 (0,3%) memiliki perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol (K-) dengan mengalami penurunan persentase basofil. Sedangkan kelompok perlakuan P1 (0,8%) tidak memiliki perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol (K-) (Gambar 4.2).

Penurunan rata-rata persentase basofil pada kelompok perlakuan bila dibandingkan dengan kelompok kontrol disebabkan oleh senyawa bioaktif yang terkandung dalam tumbuhan *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* yang mampu memodulasi sistem imun. Selain itu, penurunan yang terjadi pada kelompok perlakuan ini masih dalam kisaran persentase basofil normal. Hal ini diduga karena hewan model yang digunakan pada penelitian ini adalah hewan model normal. Kisaran normal persentase basofil yaitu 0-1,5% (Nugroho, 2018).

Basofil merupakan bagian dari sistem imun non spesifik yang muncul apabila terjadi peradangan atau alergi. Dengan rata-rata persentase basofil yang masih dalam kisaran normal menunjukkan bahwa tidak terjadinya peradangan pada hewan model dan membuktikan bahwa pemberian perlakuan tidak menimbulkan reaksi alergi pada hewan model (Muhsin, 2017). Aulia dkk (2017) dan Tizard (1988) juga mengatakan bahwa basofil mempunyai peran yang sama dengan sel mast, yaitu menginisiasi peradangan akut pada tempat deposisi antigen. Ketika jaringan mengalami peradangan, basofil akan melepaskan histamin, heparin, sedikit bradikinin, dan serotonin, begitu pula pada reaksi alergi (Radiati, dkk., 2008).

Hasil pengamatan basofil menggunakan mikroskop perbesaran 1000x menunjukkan bahwa basofil terlihat memiliki nukleus berwarna keunguan dengan

granula-granula di sitoplasmanya dan mengumpul di tengah. Nukleus basofil tampak tidak tersegmentasi dan diameter basofil diketahui sebesar 15,5 μm (Gambar 4.3b). Menurut Hoffbrand (2011), basofil merupakan leukosit yang jumlahnya paling sedikit dibandingkan dengan jenis leukosit lainnya, inti selnya teratur dan terdapat granula-granula di sitoplasmanya. Agustina dkk (2019) dan Al-Dulaimi dkk (2018) menambahkan bahwa basofil hampir sama dengan eosinofil namun inti sel basofil terletak mengumpul di tengah disertai kehadiran granula. Diameter basofil umumnya 10-15 μm .

Parameter eosinofil merupakan salah satu parameter penting dalam penelitian ini untuk mengetahui ada tidaknya infeksi parasit atau reaksi alergi, fungsi dari eosinofil hampir sama dengan basofil. Hasil statistik uji *One Way Anova* rata-rata persentase eosinofil pada penelitian ini diketahui nilai $p=0,404$ ($p > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa masing-masing kelompok perlakuan tidak memiliki perbedaan yang nyata terhadap rata-rata persentase eosinofil (Gambar 4.2). Rata-rata persentase eosinofil pada masing-masing kelompok yaitu K- (1,5%), P1 (1,8%), P2 (2,7%), P3 (2,5%) dan P4 (2,5%) (Tabel 4.2). Rata-rata persentase eosinofil tersebut pada masing-masing kelompok diketahui masih berada dalam kisaran normal. Menurut Nugroho (2018), jumlah eosinofil pada mencit normal yaitu berkisar 0,9%-3,8%. Hal ini membuktikan bahwa mencit model yang digunakan dalam keadaan sehat dan kandungan senyawa aktif dari *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* mampu memodulasi dengan mempertahankan nilai eosinofil dalam keadaan normal. Selain itu menurut Jatmiko (2015), tidak ditemukannya eosinofil atau nilai eosinofil dalam keadaan stabil menunjukkan tidak adanya mencit yang sakit akibat infeksi parasit.

Eosinofil merupakan jenis leukosit yang dibentuk dalam sumsum tulang belakang yang berfungsi sebagai respon adanya infeksi parasitik, peradangan dan alergi (Purnomo, dkk., 2015). Lokaspirnasari & Yulianto (2014) menyatakan bahwa eosinofil memiliki dua fungsi utama yaitu menyerang dan menghancurkan bakteri patogen serta menghasilkan enzim yang dapat menetralkan faktor radang. Dalam mencegah masuknya infeksi pada tubuh, eosinofil bekerja secara kimiawi dengan bantuan enzim dikeluarkan. Hal ini juga sesuai pendapat Isroli dkk (2009) dan Moyes & Schulte (2008) yang menyatakan bahwa eosinofil melakukan fungsi

imun melawan mikroorganisme dengan cara kimiawi yakni secara enzimatik. Faktor-faktor peningkatan eosinofil dapat terjadi karena hipersensitivitas misalnya karena parasit dan alergi (Dharmawan, 2002).

Hasil pengamatan eosinofil menggunakan mikroskop perbesaran 1000x menunjukkan bahwa eosinofil memiliki nukleus dua lobus dan granula-granula di sitoplasmanya. Eosinofil tampak berwarna keunguan lebih gelap dibandingkan dengan neutrofil. Diameter pada eosinofil diketahui sekitar 12 μm (Gambar 4.3c). Menurut Riley & Jemma (2015), leukosit jenis eosinofil memiliki bentuk inti seperti tapal kuda dengan granula-granula di dalamnya. Granula-granula tersebut mengandung heparin, histamin, dan leukotrin sebagai imunitas terhadap parasit. Eosinofil ini hampir sama dengan neutrofil. Akan tetapi, granula sitoplasmanya lebih kasar dan berwarna lebih gelap karena mengandung protein basa. Eosinofil mempunyai waktu paruh lebih lama dalam darah dibandingkan dengan neutrofil (Hoffbrand, 2011). Sedangkan Al-Dulaimi dkk (2018) menyatakan bahwa eosinofil memiliki kemampuan untuk melepaskan racun dari granulanya untuk membunuh patogen, seperti parasit dan cacing. Inti eosinofil seringkali memiliki dua lobus yang dihubungkan oleh pita bahan inti sel. Diameternya biasanya berkisar antara (9-15) μm .

Perhitungan persentase yang dilakukan selanjutnya yaitu perhitungan persentase limfosit. Hasil statistik uji *One Way Anova* rata-rata persentase limfosit pada masing-masing kelompok diketahui nilai $p=0,00$ ($p<0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antar rata-rata persentase limfosit pada masing-masing kelompok. Oleh karena itu, data rata-rata persentase limfosit kemudian dilanjutkan dengan uji *Duncan*. Rata-rata persentase limfosit pada penelitian ini yaitu K- (68,3%), P1 (66,0%), P2 (62,2%), P3 (68,3%) dan P4 (45,3%) (Tabel 4.2). Berdasarkan rata-rata tersebut diperoleh rata-rata persentase tertinggi pada kelompok kontrol dan P3, sedangkan rata-rata persentase terendah pada kelompok P4. Kemudian hasil uji lanjutnya akan dibandingkan dengan kelompok kontrol (Gambar 4.2).

Hasil uji *Duncan* menunjukkan bahwa rata-rata persentase limfosit pada kelompok P4 (45%) berbeda nyata dengan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan lainnya. Sedangkan kelompok P1, P2 dan P3 tidak memiliki perbedaan

yang signifikan dengan kelompok kontrol. Perbedaan signifikan yang terjadi pada kelompok P4 ini menunjukkan adanya penurunan persentase jumlah limfosit. Penurunan ini diduga disebabkan oleh penggunaan obat sintetik yang berupa kломifen sitrat. Menurut Astuti & Nurainy (2011), penurunan jumlah limfosit biasanya terjadi karena respon awal terhadap infeksi virus dan pada pemberian obat-obatan sehingga terjadinya efek immunosupresan, namun penurunan tersebut bersifat sementara karena akan kembali pada sifat limfosit yang dengan cepat merespon sistem imun. Selain itu, kломifen sitrat merupakan obat sintetik yang dapat bersifat agonis ketika esterogen endogen menurun atau antagonis ketika esterogen meningkat. Menurut Andrio (2012), penurunan limfosit dapat disebabkan oleh peningkatan hormon esterogen. Hormon esterogen ini memiliki efek sama seperti kortisol yang dapat menekan proliferasi limfosit.

Rata-rata persentase limfosit pada kelompok yang tidak memiliki perbedaan signifikan terhadap kelompok kontrol seperti P1, P2 dan P3 menunjukkan hasil rata-rata yang masih dalam kisaran persentase limfosit normal (Gambar 4.2). Menurut Nugroho (2018), kisaran normal persentase limfosit yaitu 63-75%. Hal ini menunjukkan bahwa mencit model yang digunakan dalam kondisi sehat dan tidak terpapar infeksi atau mengalami peradangan. Limfosit dipilih sebagai parameter dalam uji immunomodulator ini dikarenakan peran utamanya dalam respon imun spesifik. Menurut Schalm dkk (1995), limfosit merupakan sel imun yang berperan penting dalam sistem tanggap kebal humoral dan selular. Limfosit merupakan bagian dari leukosit agranulosit yang memiliki fungsi sebagai sistem imun tubuh dan memproduksi antibodi sebagai respon terhadap adanya antigen. Limfosit terdiri atas limfosit T yang terlibat dalam pembentukan limfosit teraktivasi lainnya yang dapat membentuk respon imunitas, dan limfosit B yang bertanggung jawab dalam produksi antibodi (Pargaputri & Andriani, 2018).

Limfosit T berperan pada reaksi inflamasi, aktivasi makrofag dan proliferasi limfosit B dalam produksi antibodi. Limfosit T juga berperan dalam pengenalan dan penghancuran sel yang terinfeksi mikroba. Kemampuan untuk mengenal antigen dimungkinkan oleh ekspresi molekul unik yang ada pada membrannya yang disebut TCR. Reseptor tersebut mempunyai sifat diversitas,

spesifitas, memori dan berperan dalam imunitas spesifik. Reseptor limfosit T dapat mengenal peptida antigen yang diikat oleh MHC dan dipresentasikan oleh APC. Antigen MHC yang dipresentasikan akan berproliferasi menjadi limfosit T efektor dan memori (Baratawidjaja & Rengganis, 2009). Limfosit T dibagi menjadi dua berdasarkan marker yang berada di permukaannya, yaitu sel T sitotoksik yang mengandung reseptor CD8+ dan sel T *helper* (Th) yang mengandung reseptor CD4+ (Romagnani, 2000).

Hasil pengamatan limfosit menggunakan mikroskop perbesaran 1000x menunjukkan bahwa limfosit memiliki nukleus berwarna ungu gelap, tidak berlobus dan hampir menutupi sitoplasmanya. Limfosit diketahui memiliki satu nukleus dan diameter selnya sekitar 6,4 μm (Gambar 4.3d). Menurut Al-Dulaimi dkk (2018), limfosit memiliki nukleus yang berukuran kecil atau besar tergantung pada tahap pematangannya. Limfosit kecil umumnya berdiameter antara (6-9) μm , sedangkan limfosit besar berdiameter antara (10-15) μm . Limfosit hanya berisi satu inti yang jarang atau hampir tidak berlobus. Bentuk inti agak lonjong atau bulat dan berwarna ungu gelap.

Perhitungan persentase jenis leukosit yang terakhir yaitu monosit. Data persentase monosit diketahui tidak homogen, sehingga dilanjutkan dengan uji non parametrik *Brown-Forsythe*. Hasil statistik uji *Brown-Forsythe* rata-rata persentase monosit pada penelitian ini diketahui nilai $p = 0,00$ ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan adanya perbedaan yang nyata pada rata-rata persentase monosit di masing-masing kelompok perlakuan, sehingga dilanjutkan dengan uji non-parametrik *Games-Howell*. Rata-rata persentase monosit pada masing-masing kelompok yaitu K- (9,0%), P1 (9,0%), P2 (15,7%), P3 (5,2%) dan P4 (30,0%). Berdasarkan rata-rata persentase monosit, diketahui rata-rata persentase tertinggi pada kelompok P4 dan terendah pada kelompok P3 (Tabel 4.2). Kemudian hasil uji non-parametrik *Games-Howell* akan dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Hasil uji non-parametrik *Games-Howell* menunjukkan bahwa rata-rata persentase monosit pada kelompok P4 (45%) berbeda nyata dengan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan lainnya. Sedangkan kelompok P1, P2 dan P3 tidak memiliki perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol. Perbedaan signifikan yang terjadi pada kelompok perlakuan P4 menunjukkan adanya

peningkatan persentase monosit dari kelompok kontrol. Peningkatan rerata persentase monosit pada kelompok P4 diduga disebabkan oleh pemberian obat sintetik kломifen sitrat. Kломifen sitrat sendiri merupakan obat penginduksi ovulasi. Obat ini mampu merangsang oosit dewasa sehingga kemudian terovulasikan (Wiweko, dkk., 2016). Menurut Richards dkk (2008) dan Abdulrahman & Fair (2019), peristiwa ovulasi merupakan peristiwa yang dapat memicu respon inflamasi fisiologis. Hal tersebut dapat menginduksi komponen sistem imun, salah satunya adalah IL-1. IL-1 akan menginduksi makrofag dalam jaringan dan aktivitas fagositosis yang tinggi dapat menginduksi peningkatan proliferasi monosit.

Hal tersebut juga didukung oleh pernyataan Astuti & Nurainy (2011) bahwa sel monosit mempunyai kemampuan fagositosis yang tahan lama sebagai respon terhadap imunitas tubuh dan memberikan kontribusi langsung pada perbaikan jaringan yang rusak. Di dalam jaringan monosit ini akan berubah menjadi makrofag yang dapat memfagositosis antigen yang masuk ke dalam tubuh. Peningkatan jumlah monosit ini sebagai respon homeostasis karena banyak monosit yang menuju jaringan untuk berubah menjadi makrofag yang akan mengatasi peradangan. Sel monosit yang masuk jaringan akan menjadi makrofag (Ganong, 1995). Peran utama makrofag adalah melakukan fagositosis, menghancurkan antigen dan jaringan mati, serta mengolah antigen sedemikian rupa sehingga antigen itu dapat merangsang respon imun. Makrofag yang aktif akan bermigrasi sebagai respon terhadap rangsangan kemotaktik (Aulia, dkk., 2017).

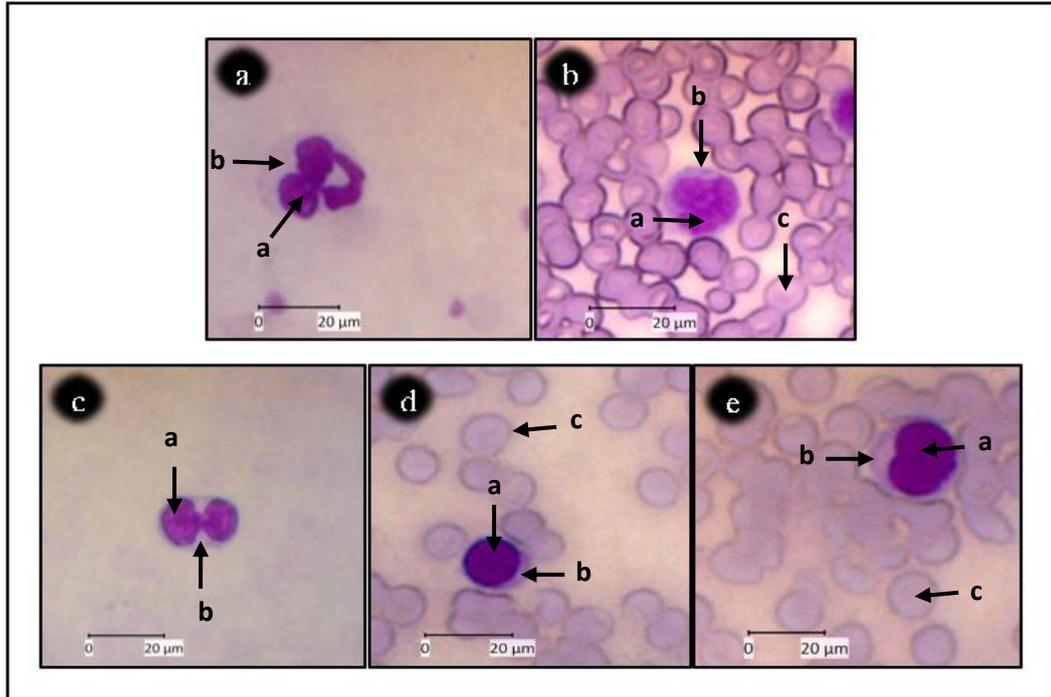
Rata-rata persentase monosit pada masing-masing kelompok perlakuan baik dari kelompok P1, P2, P3 dan P4 menunjukkan bahwa persentase monosit mengalami peningkatan dari persentase monosit normal (Gambar 4.2). Nugroho (2018) menyatakan bahwa kisaran normal persentase monosit yaitu 0,7-2,6%. Hal ini didukung oleh penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa ekstrak *C. mangga* dosis 400 mg/kgBB efektif meningkatkan makrofag secara *in vitro* (Yuandani & Suwarso, 2017), dan penelitian Darmawan dkk (2017) yang menunjukkan bahwa formulasi nanopartikel kombinasi *A. sativum* dan *P. niruri*

kadar 0,414% (penambahan 30 mg ekstrak) mampu memodulasi sistem imun dengan meningkatkan aktivitas fagositosis secara *in vitro*.

Peningkatan persentase monosit diduga disebabkan flavonoid mengaktifkan limfe untuk meningkatkan produksi monosit. Flavonoid memiliki sifat mudah larut dalam air dan berfungsi sebagai anti mikroba, anti virus, dan immunostimulan (Naiborhu, 2002). Selain itu, bahan yang mengandung flavonoid juga dapat meningkatkan aktivitas fagositosis (Syahida, dkk., 2013). Hal ini karena senyawa flavonoid berpotensi terhadap limfokin yang dihasilkan oleh sel T sehingga akan merangsang sel-sel fagosit untuk melakukan respon fagositosis (Nugroho, 2012).

Monosit dipilih sebagai parameter karena fungsinya yang dapat memfagosit antigen dengan berubah menjadi makrofag dalam jaringan serta fungsinya sebagai APC (*Antigen Presenting Cell*) pada sel T. Monosit merupakan jenis sel darah putih yang termasuk dalam kelompok agranulosit yang dibentuk di sumsum tulang dan mengalami pematangan ketika masuk kedalam sirkulasi sehingga menjadi makrofag dan masuk ke jaringan (Purnomo, dkk., 2015). Monosit mampu memfagositosis 100 sel bakteri patogen dan menjadi sistem pengatur ketika terjadi peradangan dan merespon kekebalan (Frandsen, dkk., 2009).

Hasil pengamatan monosit menggunakan mikroskop perbesaran 1000x menunjukkan bahwa monosit memiliki nukleus berwarna ungu gelap, tidak berlobus dan sedikit melengkung. monosit mempunyai satu nukleus dengan diameter selnya sekitar 17,8 μm (Gambar 4.3e). Menurut Longo & Harrison (2012), pada pengamatan morfologi monosit menunjukkan inti sel monosit dengan sedikit lengkungan di bagian tengahnya. Monosit adalah jenis sel darah putih yang terbesar ukurannya. Rata-rata diameternya berkisar antara 10-30 μm dan sering disebut sebagai sel pemulung atau fagosit. Sel ini hanya mengandung satu inti yang jarang atau hampir tidak berlobus. Bentuk nukleus pada monosit sering kali berbentuk bengkok (tapal kuda) atau berbentuk ginjal (reniform) (Al-Dulaimi, dkk., 2018).



Gambar 4.3. Bentuk Morfologi Jenis leukosit berdasarkan pengamatan mikroskop perbesaran 1000x: a. Neutrofil, b. Basofil, c. Eosinofil, d. Limfosit dan e. Monosit. Keterangan: a. inti sel; b. sitoplasma; c. eritrosit.

4.2 Aktivitas Imunomodulator Nanopartikel Ekstrak *Allium sativum*, *Curcuma mangga* dan *Acorus calamus* terhadap Sel CD4+ pada Mencit (*Mus musculus*).

Komponen selular yang terlibat dalam respon imun adaptif yang digunakan sebagai parameter pada penelitian ini adalah sel CD4+. Menurut Puspitasari (2014), sel CD4+ dipilih sebagai parameter karena berfungsi sebagai regulator dan efektor. Sel CD4+ mengeluarkan molekul sitokin untuk melakukan fungsi regulatornya. Sitokin yang dihasilkan oleh sel CD4+ mampu mengendalikan proses imun seperti pembentukan imunoglobulin. Semakin meningkat jumlah sel CD4+ mengindikasikan bahwa semakin tinggi imunitas tubuh. Pengamatan terhadap jumlah relatif sel CD4+ dari organ limpa mencit dilakukan untuk mengetahui populasi sel CD4+ pada limpa mencit yang diberi nanopartikel kombinasi ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* dosis 25 mg/kgBB dan 50 mg/kgBB. Organ limpa dipilih karena organ limpa merupakan organ limfoid sekunder yang berperan dalam sistem imun. Menurut Aldi dkk (2019) limpa dikelompokkan dalam organ limfoid sekunder. Dalam organ ini, antigen dan limfosit akan berinteraksi satu sama lain sehingga limfosit akan berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel plasma yang menghasilkan antibodi.

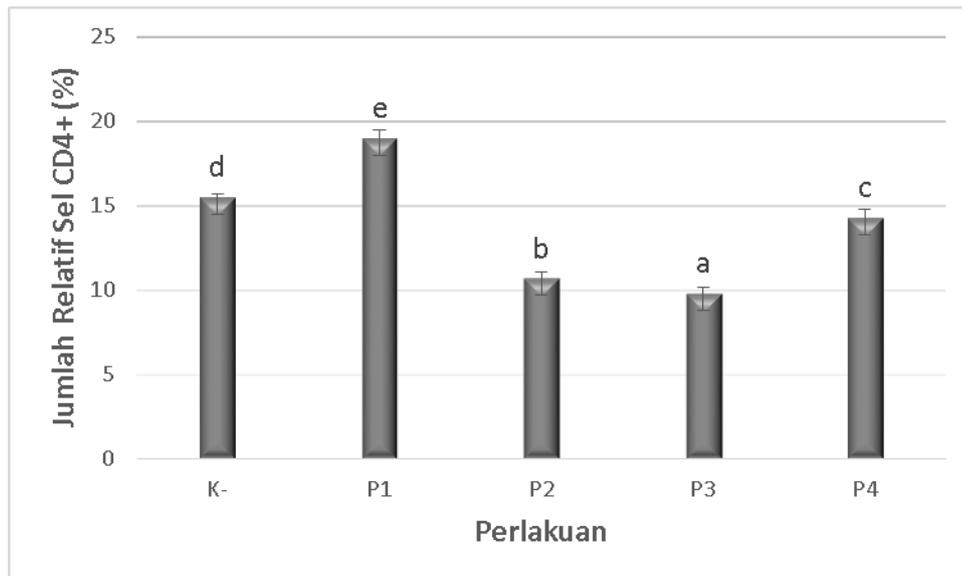
Hasil pengamatan terhadap jumlah relatif sel CD4+ pada penelitian ini terlihat bahwa pemberian nanopartikel kombinasi ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* dapat memodulasi jumlah relatif sel CD4+ ($p < 0,05$). Data jumlah relatif sel CD4+ ini dapat dilihat pada hasil analisis flowsitometri (Gambar 4.5) dan uji *One Way Anova*. Sebelum dilakukan uji *One Way Anova*, data jumlah relatif sel CD4+ terlebih dahulu diuji normalitasnya menggunakan uji *Kolmogorof-Smirnov* dan didapatkan hasil nilai $p = 0,998$ ($p > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa data jumlah relatif sel CD4+ terdistribusi normal. Kemudian diuji homogenitasnya menggunakan *Levene test* dan diperoleh hasil nilai $p = 0,152$ ($p > 0,05$), sehingga data dinyatakan homogen. Syarat untuk uji *One Way Anova* telah terpenuhi dan diperoleh hasil nilai $p = 0,000$ ($p < 0,005$). Berdasarkan hasil uji *One Way Anova* diketahui bahwa data jumlah relatif sel CD4+ memiliki perbedaan yang signifikan pada masing-masing kelompok, sehingga dilanjutkan dengan uji *Duncan* untuk mengetahui letak perbedaannya (Gambar 4.4).

Tabel 4.3. Aktivitas Imunomodulator Nanopartikel Ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* terhadap Sel CD4+ pada Mencit (*M. musculus*).

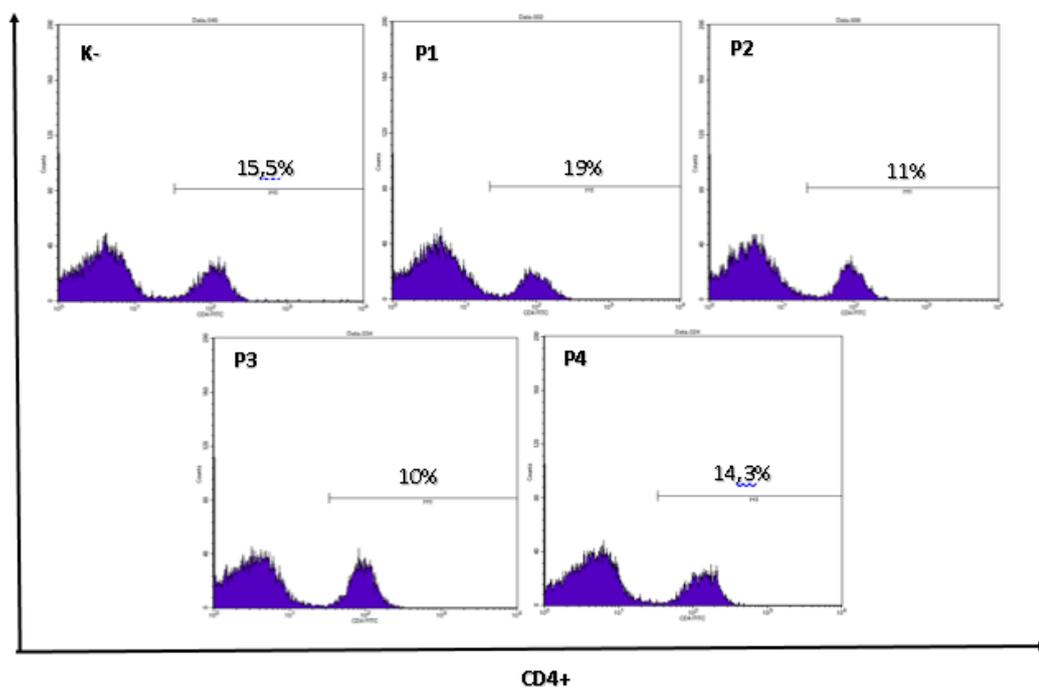
Persentase Jumlah Relatif Sel CD4+ (%)		
Perlakuan	N	Rata – rata ± SD
K-	6	15,5 ± 0,2 ^d
P1	6	19,0 ± 0,5 ^e
P2	6	11,0 ± 0,4 ^b
P3	6	10,0 ± 0,4 ^a
P4	6	14,3 ± 0,5 ^c

Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan taraf α 5% ($p < 0,05$)

Data rata-rata jumlah relatif sel CD4+ pada setiap kelompok diketahui K- (15,5%), P1 (19%), P2 (11%), P3 (10%) dan P4 (14,3%) (Tabel 4.3). Rata-rata jumlah relatif sel CD4+ tertinggi yaitu pada kelompok perlakuan P1 dan terendah pada kelompok perlakuan P3. Hasil uji lanjut *Duncan* menunjukkan bahwa setiap kelompok memiliki perbedaan yang signifikan. Masing-masing kelompok akan dibandingkan dengan kelompok kontrol (K-). Pada kelompok perlakuan P1, pemberian nanopartikel kombinasi ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* dosis 25 mg/kgBB diketahui dapat meningkatkan jumlah relatif sel CD4+ dan berbeda nyata dengan kelompok kontrol yaitu 19,0% (Gambar 4.4). Sedangkan pada kelompok pemberian nanopartikel kombinasi ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* dosis 50 mg/kgBB (P2), kelompok P3 (pemberian jamu subur kandungan dosis 75 mg/kgBB) dan kelompok P4 (pemberian klomifen sitrat dosis 0,9 mg/kgBB) diketahui menurunkan jumlah relatif sel CD4+ dan berbeda nyata dengan kelompok kontrol yaitu 11,0%, 10,0% dan 14,3% (Gambar 4.4).



Gambar 4.4. Grafik Rata-rata Jumlah Relatif Sel CD4+ *M. musculus*. Keterangan: K-: Kelompok tanpa perlakuan; P1: Nanopartikel kombinasi ekstrak dosis 25 mg/kgBB; P2: Nanopartikel kombinasi ekstrak dosis 50 mg/kgBB; P3: Jamu subur kandungan dosis 75 mg/kgBB; P4: Kломifen sitrat dosis 0,9 mg/kgBB.



Gambar 4.5. Hasil analisis flowsitometri jumlah relatif sel CD4+. Keterangan: K-: Kelompok tanpa perlakuan; P1: Nanopartikel kombinasi ekstrak dosis 25 mg/kgBB; P2: Nanopartikel kombinasi ekstrak dosis 50 mg/kgBB; P3: Jamu subur kandungan dosis 75 mg/kgBB; P4: Kломifen sitrat dosis 0,9 mg/kgBB.

Peningkatan jumlah relatif sel CD4+ pada kelompok P1, pemberian nanopartikel kombinasi ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* dosis 25 mg/kgBB ini diduga disebabkan oleh senyawa-senyawa yang terkandung di dalamnya seperti flavonoid, minyak atsiri, saponin, alkaloid, fenol, triterpenoid dan lain sebagainya (Muchtaromah, dkk., 2017). Hal ini sejalan dengan penelitian Liu dkk (2009) pada studi *in vivonya* yang menunjukkan bahwa kandungan minyak pada *A. sativum* memiliki efek ganda pada keseimbangan sel CD4+ (Th1 / Th2) pada tikus. Pada dosis rendah, respon sel CD4+ ditingkatkan menuju tipe Th1; sementara pada dosis tinggi, itu memicu tipe Th2, efek ganda ini mungkin disebabkan oleh adanya reseptor yang berbeda dengan afinitas yang berbeda, meskipun belum ada bukti yang spesifik.

Sedangkan penurunan jumlah relatif sel CD4+ pada kelompok P2, P3 dan P4 bila dibandingkan dengan kontrol, juga diduga disebabkan oleh reaksi senyawa-senyawa yang terkandung dalam nanopartikel kombinasi ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* yang tidak sinergis. Selain bekerja sebagai imunostimulan juga sebagai immunosupresan terhadap sel CD4+. Hal ini didukung oleh penelitian sebelumnya Muchtaromah dkk (2020) yang menyatakan bahwa kombinasi ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* mampu menurunkan jumlah relatif CD4+ TNF α yang merupakan sitokin dari kelompok Th1 pada dosis 50 mg/kgBB dan efektif sebagai antiinflamasi.

Konsep penurunan sel CD4+ menurut Wang dkk (2007) yaitu senyawa yang bersifat ampifilik yang terdapat dalam ekstrak herbal (flavonoid dan saponin) diketahui dapat meningkatkan level *Cyclin-Dependent- Kinase* (CDK) *inhibitor* yang berupa protein P27KIP. Protein P27KIP memiliki peran penting dalam meregulasi proliferasi sel pada fase G0/G1 dengan menekan kompleks G1 *Cyclin-CDK*. Adanya penghambatan ini mengakibatkan kompleks *Cyclin-CDK* tidak teraktivasi dan berdampak pada terganggunya fosforilasi protein, sehingga siklus sel tidak dapat berlanjut pada fase berikutnya dan proses proliferasi sel terhenti.

Penelitian ini juga sesuai dengan desain penelitian yang dilakukan oleh Asif & Djati (2014), dalam penelitiannya menunjukkan bahwa kandungan senyawa flavonoid dalam tumbuhan memiliki reaksi antagonis terhadap sel CD4+.

Flavonoid memiliki reaksi yang sangat kompleks, kadang kala sinergis dan kadang kala antagonis. Hal ini tergantung pada beberapa faktor yaitu komponen spesifik yang digunakan, tipe sel, konsentrasi, dan desain eksperimental. Mekanisme immunosupresan berkebalikan dengan mekanisme immunostimulan. Pada immunosupresan cenderung menekan proses transkripsi dari sitokin sehingga sitokin yang berperan dalam aktivasi sel semakin menurun jumlahnya. Immunosupresan menyebabkan penurunan jumlah sitokin IL-2 dan IFN γ sehingga dalam keadaan tersebut jumlah sel yang teraktivasi akan semakin sedikit.

Senyawa-senyawa yang terkandung dalam *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* ini bertindak sebagai mitogen yang dapat meningkatkan atau menurunkan sel CD4+. Meningkatnya jumlah relatif sel CD4+ ini diduga sebagai mekanisme homeostasis tubuh dengan meningkatkan peran sitokin Th2. Sedangkan menurunnya jumlah relatif sel CD4+ diduga sebagai reaksi antiinflamasi dalam tubuh. Nazir (2013) beranggapan bahwa senyawa bioaktif dalam tumbuhan dapat bertindak sebagai mitogen yang memberikan efek immunostimulan, yaitu meningkatkan imunitas atau menekan imunitas yaitu sebagai immunosupresan. Simplisia pada tumbuhan mempunyai lebih dari satu senyawa bioaktif atau multikomponen. Secara umum, ada yang bekerja secara sinergis (saling meningkatkan) atau antagonis (Ayundria & Rifa'i, 2014).

Middleton dkk (2000) mengungkapkan bahwa mitogen memicu aktivitas MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*). MAPK kemudian memicu terjadinya fosforilasi berbagai protein, salah satunya *protein transcription factor* yang digunakan dalam proses siklus sel, sehingga terjadi proliferasi dan diferensiasi sel CD4+. Selain mitogen mampu meningkatkan aktivitas IL-2 yang memicu proliferasi sel CD4+ dan berdiferensiasi ke arah sel Th1. Mitogen yang berasal dari senyawa tumbuhan ini juga mampu meningkatkan sitokin lainnya melalui aktivasi sel Th2 yang menghasilkan sitokin IL-4, IL-5 dan IL-10 (Puig, dkk., 2007). Ramiro dkk (2010) menambahkan bahwa IL-4 berperan dalam mengatur aktivasi Th1 maupun Th2, sehingga homeostatis imunitas tetap dalam kondisi batas normal.

4.3 Kajian Al-Qur'an dan Hadits Mengenai Hasil Penelitian

Masyarakat Indonesia mempunyai tradisi memanfaatkan tumbuhan dari alam sebagai jamu tradisional untuk memelihara kesehatan atau pengobatan yang telah terjadi sejak ratusan tahun yang lalu. Jamu tradisional ini dipilih sebagai alternatif pengobatan oleh masyarakat karena relatif lebih murah, efisien dan aman dari efek samping dibandingkan dengan obat sintetik. Berbagai macam tumbuhan-tumbuhan liar yang tumbuh di Indonesia dapat dimanfaatkan sebagai obat tradisional atau jamu untuk mengobati berbagai penyakit. Obat tradisional tersebut diharapkan aman untuk dikonsumsi oleh berbagai lapisan masyarakat dengan tanpa menimbulkan efek samping (Agustina & Busman, 2008). Pada hakikatnya, semua penyakit itu diciptakan oleh Allah Swt. Sehingga yang memberikan kesembuhan pun hanyalah Allah dan tentunya atas dasar usaha maksimal hamba-Nya, seperti pergi ke dokter atau konsumsi obat tradisional. Hal ini sesuai dengan hadits Rasulullah saw sebagai berikut:

إِنَّ اللَّهَ لَمْ يَنْزِلْ دَاءً إِلَّا وَأَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً، عِلْمُهُ مَنْ عِلْمَهُ وَجَهْلُهُ مَنْ جَهْلُهُ

Artinya: “*Sesungguhnya Allah Ta’ala tidak menurunkan penyakit, kecuali Allah juga menurunkan obatnya. Ada orang yang mengetahui ada pula yang tidak mengetahuinya.*” (H.R. Imam Ahmad)

Hadits di atas menunjukkan pemahaman bahwa setiap penyakit pasti ada obatnya. Namun, di dalam dunia pengobatan modern atau herbal, tentunya ada beberapa orang yang sudah mengetahui obat dari suatu penyakit tersebut dan ada pula yang belum mengetahuinya. Oleh karena itu, untuk mengetahui khasiat suatu obat atau herbal, maka perlu dilakukan suatu penelitian terkait pemanfaatan suatu obat atau herbal, diantaranya yaitu pemanfaatan *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* sebagai alternatif pengobatan herbal tradisional.

A. sativum, *C. mangga* dan *A. calamus* merupakan tumbuhan yang dapat digunakan sebagai obat tradisional. *A. sativum* telah digunakan sebagai tumbuhan obat sejak 5000 tahun yang lalu (Butt, dkk., 2009). *A. sativum* memiliki berbagai sifat farmakologis, seperti antioksidan (Feng, dkk., 2012; Ramoutar & Brumaghim, 2010; Sharma, dkk., 2017; Sun & Ku, 2006), hipokolesterolemia,

antiinflamasi dan antikanker (Sharma, dkk., 2017). *C. mangga* juga merupakan tumbuhan yang dimanfaatkan sebagai tumbuhan obat. *C. mangga* memiliki salah satu aktivitas biologis yaitu sebagai imunomodulator sistem imun (Yuandani, dkk., 2018). Begitu pula pada *A. calamus* yang digunakan sebagai tumbuhan obat di Asia kurang lebih sejak 2000 tahun yang lalu. Masyarakat menggunakan tumbuhan ini untuk mengurangi pembengkakan (antiinflamasi) dan sembelit (Chandra & Prasad, 2017). Oleh karena itu, dalam penelitian ini dilakukan pemanfaatan terhadap ketiga tumbuhan tersebut sebagai obat tradisional. Ketiga tumbuhan tersebut dimanfaatkan karena kandungan senyawa aktif yang kaya di dalamnya. Hal ini sebagaimana sesuai dengan ayat yang tercantum dalam Al-Qur'an surah Asy Syuaara (26) ayat 7:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَيْفَ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍۙ

Artinya: “Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, betapa banyak kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam (tumbuh-tumbuhan yang baik lagi bermanfaat? ”. (Q.S. Asy-Syuaara (26): 7).

Shihab (2002) menjelaskan bahwa pada kata *كريم* mempunyai arti baik.

Kata ini dapat menggambarkan sesuatu yang baik bagi obyek yang disifati, seperti tumbuhan yang baik. Tumbuhan baik ini memiliki arti tumbuhan yang memiliki banyak manfaat dan dapat dimanfaatkan dengan baik. Salah satunya yaitu sebagai obat tradisional. Pemanfaatan ini menjadi hal yang tak ternilai harganya bagi hambaNya yang berfikir.

Hasil penelitian ini menunjukkan pemberian nanopartikel kombinasi ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* pada dosis tertentu mampu memodulasi sistem imun. Pemberian nanopartikel kombinasi ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* dosis 25 mg/kgBB mampu meningkatkan jumlah relatif sel CD4+. Pemberian nanopartikel kombinasi ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* pada semua dosis mampu memodulasi sistem imun dengan cara menekan jumlah total leukosit. Sedangkan pada dosis 50 mg/kgBB mampu meningkatkan jumlah monosit dalam darah. Setiap jamu herbal memiliki

takaran dosis tertentu dalam pengkonsumsiannya agar mendapatkan hasil yang optimal. Sebagaimana firman Allah dalam surah Al-Qamar (54) ayat 49:

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ،

Artinya: “*Sesungguhnya Kami menciptakan segala sesuatu menurut ukurannya.*” (Q.S. Al-Qamar (54): 49).

Kata *بِقَدَرٍ* pada ayat di atas mempunyai makna yaitu Allah Swt telah menciptakan segala sesuatu berdasarkan porsinya masing-masing dan itu tidak kurang ataupun lebih (Shihab, 2002). Selain itu menurut kitab Hidayatul Insan bi Tafsiril Qur'an, ayat diatas memiliki makna bahwa apa yang terjadi pada semua makhluk hidup sudah ditetapkan oleh Allah. Allah telah menciptakan segala sesuatu menurut ukuran, yaitu suatu sistem dan ketentuan yang telah ditetapkan. Dan ketahuilah bahwa semua perintah kami yang menyangkut apa pun hanyalah diungkapkan dengan satu perkataan yang mudah dan cepat, seperti kedipan mata (Musa, 2016b).

Berdasarkan tafsiran-tafsiran di atas, didapatkan suatu pemahaman bahwa setiap tumbuhan memiliki kadar senyawa yang berbeda-beda dan setiap tumbuhan juga memiliki kemampuan yang berbeda-beda sesuai dengan porsinya dalam mempengaruhi fisiologi tubuh. Selain itu, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian nanopartikel kombinasi ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* mampu menjaga homeostasis imunitas tubuh dengan mempertahankan jumlah total leukosit dan persentase jenis leukosit dalam kisaran normal. Hal ini sesuai dengan firman Allah dalam surah Al-Infithar (82) ayat 6-8:

يَا أَيُّهَا الْإِنْسَانُ مَا غَرَّبَكَ رَبِّكَ الْأَلَّذِي خَلَقَكَ فَسَوَّاكَ
فَعَدَّلَكَ ۖ فِي أَيِّ صُورَةٍ مَّا شَاءَ رَكَّبَكَ ۝

Artinya: “*Wahai manusia, apakah yang telah memperdayakan kamu (berbuat durhaka) terhadap Tuhanmu yang Maha Pemurah, yang telah menciptakan kamu lalu menyempurnakan kejadianmu dan menjadikan*

(susunan tubuh)mu seimbang. Dalam bentuk apa saja yang Dia kehendaki, Dia menyusun tubuhmu.” (Q.S. Al-Infithar (82): 6-8)

Kata seimbang dalam ayat tersebut memiliki makna universal. Seimbang dapat diartikan sebagai keseimbangan bentuk tubuh, metabolisme dalam tubuh, fungsi tubuh bahkan sampai hal yang spesifik yaitu keseimbangan sistem imun tubuh. Makhluk hidup ini awalnya tidak ada. Kemudian Dia menciptakan makhluk yang ada di bumi ini dengan sempurna tanpa cacat. Contohnya, diciptakan dua tangan yang sama panjang, demikian pula kaki yang diciptakan sepasang dengan sama panjang. Dengan demikian, tidak pantas bagi makhlukNya untuk mengkhufuri nikmatNya yang telah diberikan. Dari ayat tersebut perlu diperhatikan bahwa penciptaan tubuh makhlukNya ini telah diatur sedemikian rupa tidak lain hanyalah agar mampu menjalankan perintah dan menjauhi larangan Allah Swt (Musa, 2016b).

BAB V

PENUTUP

5.1 Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh simpulan sebagai berikut:

1. Nanopartikel kombinasi ekstrak *Allium sativum*, *Curcuma mangga* dan *Acorus calamus* tersalut kitosan mampu memodulasi profil leukosit dengan cara mempertahankan jumlah total leukosit, persentase neutrofil, persentase basofil dan persentase eosinofil dalam kisaran normal pada mencit yang diberi dosis 25 mg/kgBB maupun 50 mg/kgBB. Begitu pula pada dosis 25 mg/kgBB mampu mempertahankan persentase limfosit dalam kisaran normal, namun pada dosis 50 mg/kgBB diketahui memiliki efek antiinflamasi dengan menurunkan persentase limfosit. Sedangkan pemberian dosis 25 mg/kgBB dan 50 mg/kgBB memberikan efek imunostimulan dengan meningkatkan persentase monosit.
2. Nanopartikel kombinasi ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* tersalut kitosan mampu memodulasi sel CD4+. Pada pemberian dosis 25 mg/kgBB menunjukkan efek imunostimulan terhadap jumlah relatif sel CD4+. Sedangkan pada pemberian dosis 50 mg/kgBB menunjukkan aktivitas antiinflamasi dengan menurunkan jumlah relatif sel CD4+.

5.2 Saran

Adapun saran yang dapat ditulis sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan pengujian *pre* dan *post* perlakuan agar dapat diketahui lebih jelas efek imunomodulator dari pemberian nanopartikel kombinasi ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* tersalut kitosan.
2. Sebaiknya dilakukan pengambilan sampel darah melalui intrakardial untuk mendapatkan jumlah sampel yang lebih banyak dan mencit langsung dikurbankan. Sehingga tingkat stress hewan bisa diminimalisir dan mendapatkan tingkat akurasi pengambilan darah yang tinggi pada metode haemasitometri. Namun, apabila sampel darah yang dibutuhkan sedikit dan

pengujian berkala, sebaiknya pengambilan darah dilakukan selain melalui intrakardial.

3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait jumlah absolut dari sel CD4+ agar dapat mengetahui lebih detail jumlah per volumenya dalam limpa.
4. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait komponen sistem imun lainnya seperti interleukin, interferon, makrofag dan lain sebagainya untuk mengetahui lebih detail mekanisme imunomodulator dari pemberian nanopartikel kombinasi ekstrak *A. sativum*, *C. mangga* dan *A. calamus* tersalut kitosan.

DAFTAR PUSTAKA

- Aarvak, T., Chabaud, M., Miossec, P. & Natvig, J. B. 1999. IL-17 is Produced by Some Proinflammatory Th1/Th0 Cells but Not by Th2 Cells. *Journal of Immunology*. 162(3): 1246–1251.
- Abas, F., Hui, L. S., Ahmad, S., Stanslas, J., Israif, D. A., Shaari, K. & Lajis, N. H. 2006. Biological Evaluation of Curcumin and Related Diarylheptanoids. *Zeitschrift Fur Naturforschung C*. 61(9): 625–631.
- Abbas, A. K. & Lichtman, A. H. 2011. *Basic Immunology: Function and Disorders of The Immune System* (3rd ed.). Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. 2012. *Cellular and Molecular Immunology*. Philadelphia: Elsevier Saunders.
- Abdulrahman, N. & Fair, T. 2019. Contribution of The Immune System to Follicle Differentiation, Ovulation and Early Corpus Luteum Formation. *Animal Reproduction*. 16(3): 440–448.
- Aboderin, F. I. & Oyetayo, V. 2006. Haematological Studies of Rats Fed Different Doses of Probiotic, *Lactobacillus plantarum*, Isolated From Fermenting Corn Slurry. *Pakistan J. Nutr.* 5: 102–105.
- Abood, W. N. 2017. Immunomodulatory and Natural Immunomodulators. *Journal of Allergy and Inflammation*. 1(2): 1 – 6.
- Abraham, F. 2010. Elicitation Effect on The Growth and Biochemical Activities of *Curcuma mangga* Val (Zingiberaceae) In Vitro Plantlets. *Thesis*. Universiti Sains Malaysia, Malaysia.
- Abraham, F., Bhatt, A., Keng, C. L., Indrayanto, G. & Sulaiman, S. F. 2011. Effect of Yeast Extract and Chitosan on Shoot Proliferation, Morphology and Antioxidant Activity of *Curcuma mangga* In Vitro Plantlets. *African Journal of Biotechnology*. 10(40): 7787–7795.
- Adawiyah, R. 2013. Jenis-Jenis Tumbuhan Berkayu dan Pemanfaatannya Oleh Suku Madura Di Pulau Gili Ketapang Probolingga. *Skripsi*. Universitas Jember, Jember.
- Aden, A. Z. & Rifa'i, M. 2014. Bioactivity of Ethanolic Extract of Propolis (EEP) in Balb/C Mice's CD4+CD25+ and B220+ Lymphocyte Cells. *The Journal of Experimental Life Sciences*. 4(2). 39–44.
- Aggio, R. B. M., Mayor, A., Coyle, S., Reade, S., Khalid, T., Ratcliffe, N. M. & Probert, C. S. J. 2016. Freeze-Drying: An Alternative Method for The

Analysis of Volatile Organic Compounds in The Headspace of Urine Samples Using Solid Phase Micro-Extraction Coupled to Gas Chromatography - Mass Spectrometry. *Chemistry Central Journal*. 10(1): 1–11.

- Agra, M, E. L., Widiastuti, N., Nurcahyani, H. & Busman. 2016. Uji Senyawa Taurin sebagai Antikanker Terhadap Jumlah Sel-Sel Leukosit dan Sel-Sel Eritrosit Mencit (*Mus musculus*) yang Diinduksi Benzo(A)pyren secara *In Vivo*. *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan*. 16(2): 68–75.
- Agustina, E., Lusiana, N. & Purnamasari, R. 2019. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daging Buah Kurma Ajwa (*Phoenix dactylifera*) terhadap Hitung jenis Leukosit Embrio dan Induk Mencit (*Mus musculus*) Bunting. *The Journal of Tropical Biology*. 3(2): 135–145.
- Agustina, I. & Busman, H. 2008. Struktur Histologi Folikel Primer, Sekunder dan Tersier Ovarium Mencit (*Mus musculus*) Setelah Pemberian Ekstrak Rimpang Rumput Teki (*Cyperus rotundus* L.). *Prosiding Seminar Nasional Sains Dan Teknologi II*.
- Ahmed, A., Saha, B., Patwardhan, A., Shivprasad, S. & Nandi, D. 2009. The Major Players in Adaptive Immunity: 1. Humoral Immunity. *Resonance*. 14(5): 455–471.
- Akbar, B. 2010. *Tumbuhan dengan Kandungan Senyawa Aktif yang Berpotensi sebagai Bahan Antifertilitas*. Jakarta: Adabia Press.
- Akrom, E. M. I. 2009. Gambaran Jumlah dan Hitung Jenis Leukosit Serta Waktu Jendal Darah pada Tikus Betina yang Diinduksi 7,12-Dimetilbenz(α)antrasen (DMBA) Setelah Pemberian Ekstrak Etanol Biji Jinten Hitam (*Nigella sativa* L.). *Jurnal Kedokteran*. 2(2): 69–78.
- Aldi, Y., Dillasamola, D. & Yanti, G. R. 2019. Immunomodulator Activity of Ethanol Extract of Tapak Liman Leaves (*Elephantopus scaber* Linn.). *Pharmacognosy Journal*. 11(6): 1419–1427.
- Aldi, Y., Husni, E., & Yesika, R. 2020. Activity of Kincung Flowers (*Etlingera elatior*.) on Total Leukocytes and Percentage of Leukocytes in Allergic Male White Mice. *Pharmacognosy Journal*. 12(1): 44–51.
- Al-Dulaimi, K., Banks, J., Chandran, V., Inmaculada, T. & Nguyen, K. 2018. Classification of White Blood Cell Types from Microscope Images: Techniques and Challenges. *Microscopy Science: Last Approaches on Educational Programs and Applied Research*. 8: 1–9.
- Ali, A. A., Ismoyowati. & Indrasanti, D. 2013. Jumlah Eritrosit, Kadar Hemoglobin dan Hematokrit pada Berbagai Jenis Itik Lokal terhadap Penambahan Probiotik dalam Ransum. *Jurnal Ilmiah Peternakan*. 1(3):

1001–1013.

- Ali, M., Thomson, M. & Afzal, M. 2000. Garlic and Onions: Their Effect on Eicosanoid Metabolism and Its Clinical Relevance. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 62(2): 55–73.
- Al-Jauziyah, I. Q. 2000. *Zadul Ma'ad*. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Al-Jazairi, A. B. J. 2008. *Tafsir Al-Quran Al-Aisar*. Jakarta: Darus Sunnah.
- Al-Kandahlawi, S. H. Z. 2007. *Aujazul Masalik Ila Muwattha' Malik*. Damaskus: Darul Qalam.
- Al-Mahalli, I. J., & As-Suyuthi, I. 2008. *Tafsir Jalalain*. Bandung: Sinar Baru Algensindo.
- Al-Qurthubi, S. I. 2008. *Tafsir Al-Qurthubi*. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Al-Reza, S. M., Rahman, A., Sattar, M. A., Rahman, M. O. & Fida, H. M. 2010. Essential Oil Composition and Antioxidant Activities of *Curcuma aromatica* Salisb. *Food and Chemical Toxicology*. 48(6): 1757–1760.
- Amagase, H. 2006. Clarifying The Real Bioactive Constituents of Garlic. *The Journal of Nutrition*. 136(3): 716-725.
- Amalia, F. A. & Aprianingsih, A. 2017. Business Model of Jamu as Indonesian Traditional Herbal Medicine in New Economy. *The Asian Journal of Technology Management (AJTM)*. 10(1): 19–28.
- Ambo Lau, S. H., Herman. & Rahmat, M. 2019. Studi Perbandingan Tingkat Pengetahuan Masyarakat Tentang Obat Herbal dan Obat Sintetik di Campagayya Kelurahan Panaikang Kota Makassar. *Jurnal Farmasi Sandi Karsa*. 5(1): 33–37.
- Amrul, H. M. Z. N., Susilo, F. & Huda, M. K. 2019. Etnobotani to Explore The Potential of Medicine Plants in Sumatera Utara. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 14(5): 38–42.
- Andrio. 2012. Gambaran Diferensiasi Leukosit Darah Perifer, Limpa dan Sumsum Tulang Mencit sebagai Respon terhadap Pemberian Vaksin Streptococcus agalactiae yang Diradiasi. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor.
- Arami, H., Stephen, Z., Veiseh, O. & Zhang, M. 2011. Chitosan-Coated Iron Oxide Nanoparticles for Molecular Imaging and Drug Delivery. *Adv Polym Sci*. 243: 163–184.
- Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Panos, I., Miralles, B., Acosta, N. & Heras, A. 2012. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Current*

Chemical Biology. 3(2), 203–230.

- Armendariz-Barragan, B., Zafar, N., Badri, W., Galindo-Rodriguez, S. A., Kabbaj, D., Fessi, H. & Elaissari, A. 2016. Plant Extracts: from Encapsulation to Application. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 13(8): 1165–1175.
- Arushi, K. & Ravinder, A. 2014. Pharmacognostic Study of *Acorus calamus*. *International Journal of Ayurveda and Pharmaceutical Chemistry*. 4(1): 1–8.
- Asif, N. & Djati, M. S. 2014. Perkembangan Sel T CD4 dan CD62L pada Organ Spleen Mencit yang Diinfeksi *Salmonella typhimurium* Setelah Pemberian Ekstrak Ethanol Daun *Polyscias obtusa* dan *Elephantopus scaber*. *Jurnal Biotropika*. 2(4): 223–228.
- Astuti, S. & Nurainy, F. 2011. Profil Darah Tikus Akibat Pemberian Tepung Kedelai Kaya Isoflavon. *Seminar Nasional Sains & Teknologi-IV*. Bandar Lampung.
- Astutik, S., Pretzsch, J. & Kimengsi, J. N. 2019. Asian Medicinal Plants' Production and Utilization Potentials: A Review. *Sustainability (Switzerland)*. 11(19): 1–33.
- Aulia, R., Sugito, Hasan, M., Karmil, T. F., Gholib. & Rinidar. 2017. The Number of Leukocyte and Leukocyte Differential in Broilers that Infected with *Eimeria tenella* and Given Neem Leaf Extract and Jaloh Extract. *Jurnal Medika Veterinaria*. 11(2): 93–99.
- Ayundria, Y. & Rifa'i, M. 2014. Bioactivity of Proplis to the CD4+ and CD8+ T cells Producing IFN- γ Cytokines in BALB/C Mice. *Jurnal Biotropika*. 2(2): 125–130.
- Azwanida, N. N. 2015. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*. 4(3): 3–8.
- Badawy, M. E. I. & Rabea, E. I. 2011. A Biopolymer Chitosan and Its Derivatives as Promising Antimicrobial Agents against Plant Pathogens and Their Applications in Crop Protection. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*. 11: 1–29.
- Balakumbahan, R., Rajamani, K. & Kumanan, K. 2010. *Acorus calamus*: An Overview. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4(25): 2740–2745.
- Baratawidjaja, K. G. & Rengganis, I. 2009. *Imunologi Dasar* (8th ed.). Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Barrak, H., Saied, T., Chevallier, P., Laroche, G., M'nif, A. & Hamzaoui, A. H.

2019. Synthesis, Characterization, and Functionalization of ZnO Nanoparticles by N-(trimethoxysilylpropyl) ethylenediamine triacetic acid (TMSEDTA): Investigation of The Interactions between Phloroglucinol and ZnO@TMSEDTA. *Arabian Journal of Chemistry*. 12(8): 4340–4347.
- Bascones-Martinez, A., Mattila, R., Gomez-Font, R. & Meurman, J. H. 2014. Immunomodulatory Drugs: Oral and Systemic Adverse Effects. *Journal section: Oral Medicine and Pathology*. 19(1): 24-31.
- Baxter, A., Dillon, M., Anthony Taylor, K. D. & Roberts, G. A. F. 1992. Improved Method for I.R. Determination of The Degree of N-Acetylation of Chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*. 14(3). 166–169.
- Bayan, L., Koulivand, P. H. & Gorji, A. 2014. Garlic: A Review of Potential Therapeutic Effects. *Avicenna Journal of Phytomedicine*. 4(1): 1–14.
- Beers, S. J. 2012. *Jamu, The Ancient Indonesian Art of Herbal Healing*. Hongkong: Periplus Editions HK. Ltd.
- Bjorner, M., & Zhu, L. 2019. A minimally Invasive , Low-Stress Method for Serial Blood Collection in Aging Mice. *Pathobiology of Aging & Age-Related Diseases*. 9(1): 4–7.
- Borlinghaus, J., Albrecht, F., Gruhlke, M. C. H., Nwachukwu, I. D. & Slusarenko, A. J. 2014. Allicin: Chemistry and Biological Properties. *Molecules*. 19(8): 12591–12618.
- Bradley, K. F., Rieger, M. A. & Collins, G. G. 1996. Classification of Australian Garlic Cultivars by DNA Fingerprinting. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 36(5): 613–618.
- Brown, J. & Farquhar, C. 2016. Clomiphene and Other Antioestrogens for Ovulation Induction in Polycystic Ovarian Syndrome. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. (12): 1-9.
- Brown, J., Farquhar, C., Beck, J., Boothroyd, C. & Hughes, E. 2009. Clomiphene and Anti-Oestrogens for Ovulation Induction in PCOS. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. (4): 1-63.
- Burroni, N., Loetti, M. V. & Busch, M. 2014. Reproductive Success in Mus Musculus (Rodentia) Exposed to Conspecific's Odors and Overcrowding in Laboratory Conditions. *Mastozoologia Neotropical*. 21(1): 115–120.
- Bustanussalam. 2016. Pemanfaatan Obat Tradisional (Herbal) sebagai Obat Alternatif. *BioTrends*. 7(1): 20–25.
- Butt, M. S., Sultan, M. T., Butt, M. S. & Iqbal, J. 2009. Garlic: Nature's

- Protection Against Physiological Threats. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 49(6): 538–551.
- Buzea, C., Pacheco, I. I. & Robbie, K. 2007. Nanomaterials and Nanoparticles: Sources and Toxicity. *Biointerphases*. 2(4): 17–71.
- Byers, S. L., Wiles, M. V., Dunn, S. L. & Taft, R. A. 2012. Mouse Estrous Cycle Identification Tool And Images. *Plos One*. 7(4): 1–5.
- Calder, P. C. 2013. Feeding The Immune System. *Proceedings of The Nutrition Society*. 72(3): 299–309.
- Cardenas, C., Quesada, A. R., & Medina, M. A. 2011. Anti-Angiogenic and Anti-Inflammatory Properties of Kahweol, A Coffee Diterpene. *PLoS ONE*. 6: 23407.
- Cartaxo, A. 2018. Nanoparticles Types and Properties – Understanding These Promising Devices in The Biomedical Area. *International Journal of Nanomedicine*. pp. 1–8.
- Chandra, D., & Prasad, K. 2017. Phytochemicals of *Acorus calamus* (Sweet Flag). *Journal of Medicinal Plants Studies*. 5(5): 277–281.
- Chang, C. F. 2011. The Role of Erk MAPK Pathway in CD4 T Cell Proliferation and Differentiation. *Disertation*. University of California.
- Chattopadhyay, I., Biswas, K., Bandyopadhyay, U. & Banerjee, R. K. 2004. Turmeric and Curcumin: Biological Actions and Medicinal Applications. *Current Science*. 87(1): 44–53.
- Chaube, S. K., Shrivastav, T. G., Prasad, S., Tiwari, M., Tripathi, A., Pandey, A. N. & Premkumar, K. V. 2014. Clomiphene Citrate Induces ROS-Mediated Apoptosis in Mammalian Oocytes. *Open Journal of Apoptosis*. 3(3): 52–58.
- Cheba, B. A. 2011. Chitin and Chitosan: Marine Biopolymers with Unique Properties and Versatile Applications. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*. 6(3): 149-153.
- Cheng, Y., Wang, J., Rao, T., He, X. & Xu, T. 2008. Pharmaceutical Applications of Dendrimers: Promising Nanocarriers for Drug Delivery. *Frontiers in Bioscience*. 13(4): 1447–1471.
- Childs, C. E., Calder, P. C. & Miles, E. A. 2019. Diet and Immune Function. *Nutrients*. 11(1933): 1–9.
- Chorilli, M., Michelin, D. C. & Salgado, H. R. N. 2005. Animais De Laboratório: O Camundongo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. 28(1): 11–23.

- Colic, M. & Savic, M. 2000. Garlic Extracts Stimulate Proliferation of Rat Lymphocytes In Vitro by Increasing IL-2 and IL-4 Production. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 22(1): 163–181.
- Constant, S. L. & Bottomly, K. 1997. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T Cell Responses: The Alternative Approaches . *Annual Review of Immunology*. 15(1): 297–322.
- Copping, L. G. 1996. *Crop Protection Agents From Nature*. In: *Natural Products and Analogs*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Cora, M. C., Kooistra, L. & Travlos, G. 2015. Vaginal Cytology of The Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for The Staging of The Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicologic Pathology*. 43(6): 776–793.
- Cruvinel, W. D. M., Júnior, D. M., Antônio, J., Araújo, P., Tieko, T. & Catelan, T. 2010. Immune System – Part I: Fundamentals of Innate Immunity with Emphasis on Molecular and Cellular Mechanisms of Inflammatory Response. *Bras J Rheumatol*. 50(4): 434-461.
- Dalal, S. J., Estep, J. S., Valentin-Bon, I. E. & Jerse, A. E. 2001. Standardization of The Whitten Effect to Induce Susceptibility to Neisseria Gonorrhoeae in Female Mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 40(2): 13–17.
- Darmawan, K. H., Martien, R., Erlangga, N. D., Sitohang, S. M., & Pambudi, H. 2017. Pemanfaatan Nano Ekstrak Etanolik Kombinasi Meniran (*Phyllanthus niruri* L.) dan Bawang Putih (*Allium sativum* L.) sebagai Imunomodulator Alami dalam Pengembangan Nanoherbal, Studi *In Silico* dan *In Vitro*. *Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*. 2(2): 110–119.
- Das, B. K., Swamy, A. V., Koti, B. C. & Gadad, P. C. 2019. Experimental Evidence for Use of *Acorus calamus* (Asarone) for Cancer Chemoprevention. *Heliyon*, 5(5): 1-11.
- Dashputre, N. L. & Naikwade, N. S. 2010. Immunomodulatory Activity of *Abutilon indicum* Linn on Albino Mice. *Int J Pharma Sci Res*. 1(3): 178–184.
- Dasuki, U. A. 1991. *Sistematika Tumbuhan Tingkat Tinggi*. Bandung: . Universitas Bidang Ilmu Hayati, Institut Teknologi Bandung.
- De Paz, L. E. C., Resin, A., Howard, K. A., Sutherland, D. S., & Wejse, P. L. 2011. Antimicrobial Effect of Chitosan Nanoparticles on *Streptococcus mutans* Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 77(11): 3892–3895.

- De Silva, G. O., Abeysundara, A. T. & Aponso, M. M. W. 2017. Extraction Methods, Qualitative and Quantitative Techniques for Screening of Phytochemicals from Plants. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*. 5(2): 29–32.
- Devi, C. S., Tarafder, A., Shishodiya, E. & Mohanasrinivasan, V. 2015. Encapsulation of Staphylokinase and Leucasaspera Plant Extracts Using Chitosan Nanoparticles. *International Journal of PharmTech Research*. 7(4): 654–661.
- Devi, S. A. & Ganjewala, D. 2011. Antioxidant Activities of Methanolic Extracts of Sweet-Flag (*Acorus calamus*) Leaves and Rhizomes. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*. 17(1): 1–11.
- Dewi, L. K., Widyarti, S. & Rifa'i, M. 2013. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.) terhadap Peningkatan Jumlah Sel T CD4+ dan CD8+ pada Timus Mencit (*Mus musculus*). *Jurnal Biotropika*. 1(1): 24–26.
- Dharmawan, N. S. 2002. *Pengantar Patologi Klinik Veteriner, Hematologi Klinik*. (3rd ed.). Denpasar: Pelawa Sari.
- Dillasamola, D., Aldi, Y., & Kolobinti, M. 2019. 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. *Pharmacognosy Journal*. 11(6): 1290–1298.
- DiPaolo, J. A. & Carruthers, C. 1960. The Effect of Allicin from Garlic on Tumor Growth. *Cancer Research*. 20(4): 431–434.
- Divya, B., Suman, B., kumar, Ll., Venkataswamy, M., Eswari, B. & Thyagaraju, K. 2017. The Role of *Allium sativum* (Garlic) in Various Diseases and Its Health Benefits: A Comprehensive Review. *International Journal of Advanced Research*. 5(8): 592–602.
- Divya, G., Gajalakshmi, S., Mythili, S. & Sathiavelu, A. 2011. Pharmacological Activities of *Acorus calamus*: A Review. *Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research*. 4(1): 57–64.
- Divya, K. & Jisha, M. S. 2018. Chitosan Nanoparticles Preparation and Applications. *Environmental Chemistry Letters*. 16(1): 101–112.
- Divya, K., Rebello, S. & Jisha, M. S. 2014. A Simple and Effective Method for Extraction of High Purity Chitosan from Shrimp Shell Waste. *International Conference on Advances in Applied Science & Environmental Engineering*. 12: 141–145.
- Djajakusumah, T. S. 2010. The Role of Immunomodulator in The Treatment of

- Sexually Transmitted Infections. *PKB*. pp. 144–163.
- Djojoseputro, S. 2012. *Resep dan Khasiat Jamu Tradisional Nusantara*. Surabaya: Penerbit Liris.
- Dvorak, A. M. 2005. *Ultrastructure of Mast cells and Basophils*. Basel: Karger Medical and Scientific Publishers.
- Eales, L. J. 2005. *Immunology for Life Scientists*. UK: John Wiley & Sons.
- Einbu, A. & Vårum, K. M. 2008. Characterization of Chitin and Its Hydrolysis to GlcNAc and GlcN. *Biomacromolecules*. 9(7): 1870–1875.
- Elfahmi., Woerdenbag, H. J. & Kayser, O. 2014. Jamu: Indonesian Traditional Herbal Medicine Towards Rational Phytopharmacological Use. *Journal of Herbal Medicine*. 4(2): 51–73.
- El-Zemaity, M. S., Shadia I. Salama., Ahmed, A. A. & Mahmoud, E. R. 2009. Some Factors Affecting The Susceptibility of Four Stored Garlic Cultivars to Infestation with *Cryptoblabes gnidiella* (Milliere). *Arab Univ. J. Agric. Sci*. 17(1): 185–191.
- Fallah-Rostami, F., Tabari, M. A., Esfandiari, B., Aghajanzadeh, H. & Behzadi, M. Y. 2013. Immunomodulatory Activity of Aged Garlic Extract Against Implanted Fibrosarcoma Tumor in Mice. *North American Journal of Medical Sciences*. 5(3): 207–212.
- FAO. 2013. *Production and Trade Statistics*. Italia: FAO.
- Fathima, S. J. & Khanum, F. 2017. Blood Cells and Leukocyte Culture - A Short Review. *Open Access Blood Research & Transfusion Journal*. 1(2): 1–2.
- Feng, Y., Zhu, X., Wang, Q., Jiang, Y., Shang, H., Cui, L. & Cao, Y. 2012. Allicin Enhances Host Pro-Inflammatory Immune Responses and Protects Against Acute Murine Malaria Infection. *Malaria Journal*. 11(268): 1–9.
- Field, A. 2009. *Discovering Statistics Using SPSS* (3rd ed.).
- Foo, Y. Y., Periasamy, V., Kiew, L. V., Kumar, G. G. & Malek, S. N. A. 2017. *Curcuma mangga*-mediated Synthesis of Gold Nanoparticles: Characterization, Stability, Cytotoxicity, and Blood Compatibility. *Nanomaterials*. 7(123): 1-15.
- Franca, E. F., Lins, R. D., Freitas, L. C. G. & Straatsma, T. P. 2008. Characterization of Chitin and Chitosan Molecular Structure in Aqueous Solution. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 4(12): 2141–2149.
- Frandsen, R. D., Wike, W. L. & Fails, A. D. 2009. *Anatomy and Physiology of*

Farm Animal. (7th ed.). Iowa: Willey-Blackwell.

- Frank, L. A., Onzi, G. R., Morawski, A. S., Pohlmann, A. R., Guterres, S. S. & Contri, R. V. 2019. Chitosan as A Coating Material for Nanoparticles Intended for Biomedical Applications. *Journal Pre-Proof*. pp. 1–47.
- Fратиanni, F., Riccardi, R., Spigno, P., Ombra, M. N., Cozzolino, A., Tremonte, P. & Nazzaro, F. 2016. Biochemical Characterization and Antimicrobial and Antifungal Activity of Two Endemic Varieties of Garlic (*Allium sativum* L.) of the Campania Region, Southern Italy. *Journal of Medicinal Food*. 19(7): 686–691.
- Fritsch, R. M. & Friesen, N. 2009. Evolution, Domestication and Taxonomy. *Allium Crop Science: Recent Advances*. pp 1–30.
- Ganesh, M., Hemalatha, P., Peng, M. M. & Jang, H. T. 2017. One Pot Synthesized Li, Zr Doped Porous Silica Nanoparticle For Low Temperature CO₂ Adsorption. *Arabian Journal of Chemistry*. 10: 1501–1505.
- Ganong, W. 1995. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Jakarta: EGC.
- Gebreyohannes, G. & Gebreyohannes, M. 2013. Medicinal Values of Garlic: A Review. *International Journal of Medicine and Medical Sciences*. 5(9): 401–408.
- Goncagul, G., & Ayaz, E. 2010. Antimicrobial Effect of Garlic (*Allium sativum*). *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*. 5(1): 91–93.
- Grenha, A. 2012. Chitosan Nanoparticles: A Survey of Preparation Methods. *Journal of Drug Targeting*. 20(4): 291–300.
- Gruhlke, M. C. H. & Slusarenko, A. J. 2012. The Biology of Reactive Sulfur Species (RSS). *Plant Physiology and Biochemistry*. 59: 98–107.
- Gruhlke, M. C. H., Nicco, C., Batteux, F. & Slusarenko, A. J. 2017. The Effects of Allicin, A Reactive Sulfur Species from Garlic, on A Selection of Mammalian Cell Lines. *Antioxidants*. 6(1): 1–16.
- Gusmaini, M. Y. & Januwati, M. 2004. Teknologi Perbanyakkan Benih Sumber Temu Mangga. *Perkembangan Teknologi TRO*. 16(1): 1-8.
- Guyton, A. C. & Hall, J. E. 1997. *Fisiologi kedokteran*. Jakarta: EGC.
- Hadem, K. L. H. & Sen, A. 2017. Curcuma Species: A Source of Anticancer Drugs. *Journal of Tumor Medicine & Prevention*. 1(5): 135-140.
- Hagens, W. I., Oomen, A. G., de Jong, W. H., Cassee, F. R. & Sips, A. J. A. M. 2007. What Do We (Need To) Know About The Kinetic Properties of

Nanoparticles In The Body?. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 49(3): 217–229.

Hanafiah, K. A. 2016. *Rancangan Percobaan*. Jakarta: Raja Grafindo Persada.

Handa, S. S., Khanuja, S. P. S., Longo, G. & Rakesh, D. D. 2008. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. *International Centre for Science and High Technology*. pp. 1- 260.

Hanson, K. M., Gayton-Ely, M., Holland, L. A., Zehr, P. S. & Soderberg, B. C. 2005. Rapid Assessment of β -asarone Content of *Acorus calamus* by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography. *Electrophoresis*. 26(4): 943–946.

Hapsari, D., Sari, P., & Pradono, J. 2009. Pengaruh Lingkungan Sehat, dan Perilaku Hidup Sehat terhadap Status Kesehatan. *Supplement*. Pp. 40–49.

Harbone, J. B. 1987. *Metode Fitokimia*. Bandung: Penerbit ITB.

Hariana, H. A. 2004. *Tumbuhan Obat dan khasiatnya*. Jakarta: Niaga Swadaya.

Hashim, H. A. 2012. Management of Women with Clomifene Citrate Resistant Polycystic Ovary Syndrome – An Evidence Based Approach. *Polycystic Ovary Syndrome*. 7(10): 1–22.

Hodge, G., Hodge, S. & Han, P. 2002. *Allium sativum* (Garlic) Suppresses Leukocyte Inflammatory Cytokine Production in Vitro: Potential Therapeutic Use in The Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*. 48(4): 209–215.

Hodge, G., Hodge, S., & Han, P. 2002. *Allium sativum* (Garlic) Suppresses Leukocyte Inflammatory Cytokine Production *in Vitro*: Potential Therapeutic Use in The Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Cytometry. The Journal of the International Society for Analytical Cytology*. 48(4): 209–215.

Hoffbrand, A. V. 2011. *Hoffbrand's Essential Haematology*. London: John Wiley & Sons, Ltd.

Hong, G. W., Hong, S. L., Lee, G. S., Yaacob, H. & Malek, S. N. A. 2016. Non-Aqueous Extracts of *Curcuma mangga* Rhizomes Induced Cell Death in Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Line (HT29) Via Induction of Apoptosis and Cell Cycle Arrest at G0/G1 Phase. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 9(1): 8–18.

Horikoshi, S. & Serpone, N. 2013. Introduction to Nanoparticles. *Microwaves in Nanoparticle Synthesis: Fundamentals and Applications*. pp. 1–24.

Hosseinzade, A., Sadeghi, O., Biregani, A. N., Soukhtehzari, S., Brandt, G. S., &

- Esmailzadeh, A. 2019. Immunomodulatory Effects of Flavonoids: Possible Induction of T CD4+ Regulatory Cells Through Suppression of mTOR Pathway Signaling Activity. *Frontiers in Immunology*. 10(51): 1–12.
- Ibrahim, K. S. & El-Sayed, E. M. 2016. Potential Role of Nutrients on Immunity. *International Food Research Journal*. 23(2): 464–474.
- Imam, H., Riaz, Z., Azhar, M., Sofi, G. & Hussain, A. 2013. Sweet Flag (*Acorus calamus* Linn.): An Incredible Medicinal Herb. *International Journal of Green Pharmacy*. 7(4): 288–296.
- Irianto, H. E., & Ijah, M. 2011. Proses dan Aplikasi Nanopartikel Kitosan sebagai Penghantar Obat. *Squalen*. 6(1): 1–8.
- Ismail. 2015. Faktor yang Mempengaruhi Keputusan Masyarakat Memilih Obat Tradisional di Gampong Lam Ujong. *Idea Nursing Journal*. 6(1): 7–14.
- Isroli, Susanti, S., Widiastuti, E., Yudiarti, T. & Sugiharto. 2009. Observasi Beberapa Variabel Hematologis Ayam Kedu pada Pemeliharaan Intensif. *Prosiding Seminar Nasional Kebangkitan Peternakan*.
- Jacob, C. & Anwar, A. 2008. The Chemistry Behind Redox Regulation with A Focus on Sulphur Redox Systems. *Physiologia Plantarum*. 133(3): 469–480.
- Jantan, I. B., Yassin, M. S. M., Chin, C. B., Chen, L. L. & Sim, N. L. 2003. Antifungal Activity of The Essential Oils of Nine Zingiberaceae Species. *Pharmaceutical Biology*. 41(5): 392–397.
- Jatmiko, W, S. 2015. Eosinofil Sel Penyaji Antigen. *Bioeksperimen: Jurnal Penelitian Biologi*. 1(1): 18–23.
- Josling, P. A. 2005. *The Heart of Garlic Nature's Aid to Healing The Human Body*. Chicago: HEC Publishing.
- Kamazeri, T. S. A. T., Samah, O. A., Taher, M., Susanti, D. & Qaralleh, H. 2012. Antimicrobial Activity and Essential Oils of *Curcuma aeruginosa*, *Curcuma mangga*, and *Zingiber cassumunar* from Malaysia. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 5(3): 202–209.
- Karsono, A. H., Tandrasasmita, O. M. & Tjandrawinata, R. R. 2014. Molecular Effects of Bioactive Fraction of *Curcuma mangga* (DLBS4847) as A Downregulator of 5 α -reductase Activity Pathways in Prostatic Epithelial Cells. *Cancer Management and Research*. 6: 267–268.
- Kasaai, M. R. 2009. Various Methods for Determination of The Degree of N-Acetylation of Chitin and Chitosan: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(5): 1667–1676.

- Katno, P. S. 2009. *Tingkat manfaat dan keamanan tanaman obat dan obat tradisional*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi UGM.
- Khan, I., Saeed, K. & Khan, I. 2019. Nanoparticles: Properties, Applications and Toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*. 12(7): 908–931.
- Khare, C. P. 2013. *Indian Medicinal Plants: An Illustrated Dictionary*. New Delhi: Springer Science and Business Center LLC.
- Kirana, C., Record, I. R., McIntosh, G. H. & Jones, G. P. 2003. Screening for Antitumor Activity of 11 Species of Indonesian Zingiberaceae Using Human MCF-7 and HT-29 Cancer Cells. *Pharmaceutical Biology*. 41(4): 271–276.
- Kirtikar, K. R. & Basu, B. D. 2008. *Indian Medicinal Plants with Illustrations* (2nd ed.). Dehradun: International Book Distributors.
- Kresno, S. B. 2001. *Imunologi: Diagnosis dan Prosedur laboratorium* (4th ed.). Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Kumala, S., Dewi, A. T. & Nugroho, Y. A. 2004. Efek Immunostimulan Ekstrak Etanolik Herba Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap IgG Mencit Jantan. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 2(2): 53–58.
- Kumar, R. M. N. V. 1999. Chitin and Chitosan Fibres: A Review. *Bulletin of Materials Science*. 22(5): 905–915.
- Kumar, S., Bajwa, B. S., Kaur, B., Singh, K. & Nandan, D. 2013. Herbal Plants as Potential Anticancer Agents: A Review. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 4(3): 233–251.
- Kumirska, J., Czerwicka, M., Kaczyński, Z., Bychowska, A., Brzozowski, K., Thöming, J. & Stepnowski, P. 2010. Application of Spectroscopic Methods For Structural Analysis of Chitin and Chitosan. *Marine Drugs* 8(5): 1567–1636.
- Kumirska, J., Weinhold, M. X., Thöming, J. & Stepnowski, P. 2011. Biomedical Activity of Chitin/Chitosan Based Materials- Influence of Physicochemical Properties Apart from Molecular Weight and Degree of N-Acetylation. *Polymers*. 3(4): 1875–1901.
- Kuttan, G. 2000. Immunomodulatory Effect of Some Naturally Occuring Sulphur-Containing Compounds. *Journal of Ethnopharmacology*. 72(1–2): 93–99.
- Lanzotti, V., Scala, F. & Bonanomi, G. 2014. Compounds from Allium Species with Cytotoxic and Antimicrobial Activity. *Phytochemistry Reviews*. 13(4): 769–791.
- Larsen, K., Ibrahim, H., Khaw, S. H. & Saw, L. G. 1999. *Gingers of Peninsular*

Malaysia and Singapore. Borneo: Natural History Publications.

- Larson, D. R., Zipfel, W. R., Williams, R. M., Clark, S. W., Bruchez, M. P., Wise, F. W. & Webb, W. W. 2003. Water-Soluble Quantum Dots for Multiphoton Fluorescence Imaging in Vivo. *Science*. 300(5624): 1434–1436.
- Lee, J. E., Lee, N., Kim, T., Kim, J. & Hyeon, T. 2011. Multifunctional Mesoporous Silica Nanocomposite Nanoparticles for Theranostic Applications. *Accounts of Chemical Research*. 44(10): 893–902.
- Lestarinigrum, N. A. & Karwur, F. F. 2012. Pengaruh Vitamin E Tokotrienol dan Gabungannya dengan Asam Askorbat terhadap Jenis Leukosit Tikus Putih (*Rattus norvegicus* L.). 4(1): 46–56.
- Liu, C. T., Su, H. M., Lii, C. K. & Sheen, L. Y. 2009. Effect of Supplementation With Garlic Oil on Activity of Th1 and Th2 Lymphocytes from Rats. *Planta Medica*. 75(3): 205–210.
- Liu, Y. & Nair, M. G. 2011. Labdane Diterpenes in *Curcuma mangga* Rhizomes Inhibit Lipid Peroxidation, Cyclooxygenase Enzymes and Human Tumour Cell Proliferation. *Food Chemistry*. 124(2): 527–532.
- Liu, Y. & Nair, M. G. 2012. *Curcuma longa* and *Curcuma mangga* Leaves Exhibit Functional Food Property. *Food Chemistry*. 135(2): 634–640.
- Lokaspirnasari, W. R. & Yulianto, A. B. 2014. Gambaran Sel Eosinofil, Monosit, dan Basofil Setelah Pemberian Spirulina pada Ayam yang Diinfeksi Virus Flu Burung. *Jurnal Veteriner*. 15(4): 499–505.
- Londhe, V., Gavasane, A. T., Nipate, S. S., Bandawane, D. D. & Chaudhari, P. D. 2011. Role of Garlic in Various Diseases: An Overview. *Journal of Pharmaceutical Research and Review*. 1(4): 129–134.
- Longo, D. L. & Harrison, T. R. 2012. *Atlas of Hematology and Analysis of Peripheral Blood Smears*. New York: McGraw-Hill.
- Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D. & Xia, B. 2012. CD4 +T Cells: Differentiation and Functions. *Clinical and Developmental Immunology – Hindawi*. 12: 1-11.
- Lundrigan, B. L., Jansa, S. A. & Tucker, P. K. 2002. Phylogenetic Relationships in The Genus *Mus*, Based on Paternally, Maternally, and Biparentally Inherited Characters. *Systematic Biology*. 51(3): 410–431.
- Lydyard, P. M., Whelan, A., & Fanger, M. W. 2004. *Immunology* (Vol. 53). New York: BIOS Scientific Publisher.
- Macholan, M. 1999. *Mus musculus*. London: Academic Press.

- Majumdar, S., Pathak, S. & Nandi, D. 2018. Thymus: The Site for Development of Cellular Immunity. *Resonance*. 23(2): 197–217.
- Makiyah, S. N. N., & Wardhani, U. H. 2017. Potensi Ekstrak Etanol Buah *Citrullus lanatus* sebagai Agen Imunosupresi melalui Pengamatan Histologi Limpa Mencit BALB / c. *MKB*. 49(4): 245–251.
- Malek, S. N. A., Lee, G. S., Hong, S. L., Yaacob, H., Wahab, N. A., Faizal Weber, J. F. & Shah, S. A. A. 2011. Phytochemical and Cytotoxic Investigations of *Curcuma mangga* Rhizomes. *Molecules*. 16(6): 4539–4548.
- Mansha, M., Qurashi, A., Ullah, N., Bakare, F. O., Khan, I. & Yamani, Z. H. 2016. Synthesis of In₂O₃/graphene Heterostructure and Their Hydrogen Gas Sensing Properties. *Ceramics International*. 42(9): 11490–11495.
- Mansuri, M. L., Parihar, P., Solanki, I., & Parihar, M. S. 2014. Flavonoids in Modulation of Cell Survival Signalling Pathways. *Genes and Nutrition*. 9(400): 1–9.
- Martin-Coello, J., González, R., Crespo, C., Gomendio, M. & Roldan, E. R. S. 2008. Superovulation and In Vitro Oocyte Maturation in Three Species Of Mice (*Mus musculus*, *Mus spretus* and *Mus spicilegus*). *Theriogenology*. 70(6): 1004–1013.
- Martins, N., Petropoulos, S. & Ferreira, I. C. F. 2016. Chemical Composition and Bioactive Compounds of Garlic (*Allium sativum* L.) as Affected by Pre- and Post-Harvest Conditions: A Review. *Thesis Review*. University Of Thessaly, Nea Ionia, Magnesia, Greece.
- Mathialagan, R., Mansor, N., Shamsuddin, M. R., Uemura, Y. & Majeed, Z. 2017. Optimisation of Ultrasonic-Assisted Extraction (UAE) of Allicin from Garlic (*Allium sativum* L.). *Chemical Engineering Transactions*. 56(14): 1747–1752.
- Medzhitov, R. 2008. Origin and Physiological Roles of Inflammation. *Nature*. 454(7203): 428–435.
- Mescher, A. L. 2012. *Junqueira's Basic Histology Book & Atlas 12th*. Jakarta: EGC.
- Middleton, E., Kandaswami, C. & Theoharides, T. C. 2000. The Effect of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implication for Inflammation, Heart Disease and Cancer. *Pharmacol Rev*. 52(1): 673–751.
- Mirabeau, T. Y., & Samson, E. S. 2012. Effect of *Allium cepa* and *Allium sativum* on Some Immunological Cells in Rats. *African Journal Traditional Complement Altern Med*. 9(3): 374–379.

- Miron, T., Rabinkov, A., Mirelman, D., Wilchek, M. & Weiner, L. 2000. The Mode of Action of Allisin: Its Ready Permeability Through Phospholipid Membranes May Contribute to Its Biological Activity. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*. 1463(1): 20–30.
- Mishra, K., Ganju, L., Sairam, M., Banerjee, P. K. & Sawhney, R. C. 2008. A Review of High Throughput Technology for The Screening of Natural Products. *Biomed Pharmacother*. 62: 94–98.
- Mishra, S., Dwivedi, S. P., Dwivedi, N. & Singh, R. B. 2009. Immune Response and Possible Causes of CD4+T-cell Depletion in Human Immunodeficiency Virus (HIV) - 1 Infection. *The Open Nutraceuticals Journal*. 2(1): 46–51.
- Mitasari, Z., Gofur, A., & Listyorini, D. 2017. *Mus musculus* (Linnaeus, 1758) Immune Responses Caused by *Escherichia coli* (Migula, 1895) Infection. *KnE Life Sciences*. Pp. 285–293.
- Motley, T. J. 1994. The Ethnobotany of Sweet Flag, *Acorus calamus*, (Araceae). *Economic Botany*. 48: 397–412.
- Moutia, M., Habti, N. & Badou, A. 2018. In Vitro and In Vivo Immunomodulator Activities of *Allium sativum* L. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 18(1): 1–10.
- Moyes, C. D. & Schulte, P. M. 2008. *Principles of Animal Physiology* (2nd ed.). New York: Perarson International.
- Muchtaromah, B., Ahmad, M., Koestanti, E. S., Ma'rifatul, Y. A. & Labone, V. A. 2017. Phytochemicals, Antioxidant and Antifungal Properties of *Acorus calamus*, *Curcuma mangga*, and *Allium sativum*. *KnE Life Sciences*. 17: 93–104.
- Muchtaromah, B., Annisa, R. & Sofiyah, S. 2019. Pengaruh Poliherbal Ekstrak Jeringau, Temu Mangga dan Bawang Putih pada Fungsi Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*). *Jurnal Biology Science & Education*. 8(1): 71–81.
- Muchtaromah, B., Mutiah, R., Yusmalasari, D. R., Mardiyana, P., Sharmin, T., & Fadholly, A. 2020. Efficacy of *Allium sativum*, *Curcuma mangga* and *Acorus calamus* Extract Combination on Rat Fertility. *Pharmacognosy Journal*. 12(1): 197–203.
- Muchtaromah, B., Savitri, E. S., Fauziyah, A. N., Basyaruddin, M., Purnobasuki, H., Safitri, E. & Andriani, J. 2020. Evaluating the Effect of Polyherbal Extract of *Allium sativum*, *Curcuma mangga*, and *Acorus calamus* on Immunomodulation and Ovarian Activity in Cisplatin-Induced Rats. *Systematic Reviews in Pharmacy*. 11(7): 485–489.

- Muchtaromah, B., Wahyudi, D., Ahmad, M., & Annisa, R. 2020. Nanoparticle Characterization of *Allium sativum*, *Curcuma mangga* and *Acorus calamus* as a Basic of Nanotechnology on Jamu Subur Kandungan Madura. *Pharmacognosy Journal*. 12(5): 1152–1159.
- Mudjijono., Herawati, I., Munawaroh, S. & Sukari. 2014. *Kearifan Lokal Orang Madura tentang Jamu untuk Kesehatan Ibu dan Anak*. Yogyakarta: Balai Pelestarian Nilai Budaya (BPNB).
- Muhsin, M. 2017. Peran Sel Granulosit pada Penyakit Filariasis. *Kedokteran Syiah Kuala*. 17(1): 43–53.
- Mukherjee, P. K., Kumar, V., Mal, M. & Houghton, P. J. 2007. *Acorus calamus*: Scientific Validation of Ayurvedic Tradition from Natural Resources. *Pharmaceutical Biology*. 45(8): 651–666.
- Mukhriani. 2014. Ekstraksi Pemisahan Senyawa dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Journal Kesehatan*. 7(2): 361–367.
- Musa, A. Y. M. B. 2016a. Tafsir Al Qur'an Hidayatul Insan Jilid 1. Tafsir Al Qur'an Al Karim.
- Musa, A. Y. M. B. 2016b. *Tafsir Al Qur'an Hidayatul Insan Jilid 4*. Tafsir Al Qur'an Al Karim.
- Musser, G., Hutterer, R., Krystufek, B., Yigit, N. & Mitsain, G. 2016. *Mus musculus*. *The IUCN Red List of Threatened Species*. 8235: 8.
- Muthulakshmi, T., Saleh, A. M., Kumari, N. V., Mohana Priya, K. & Palanichamy, V. 2015. Screening of Phytochemicals and *In Vitro* Antioxidant Activity of *Acorus calamus*. *International Journal of Drug Development and Research*. 7(1): 44–51.
- Muthuraman, A. & Singh, N. 2012. Acute and Sub-Acute Oral Toxicity Profile of *Acorus Calamus* (Sweet Flag) in Rodents. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2(2): 1017-1023.
- Nader, D. N. 2017. Immunomodulation Mechanisms in Disease and in the Surgical Patient. *Immunological Investigations*. 46(8): 765–768.
- Nadkarni, K. M. 2006. *Indian Medicinal Plants and Drugs with Their Medicinal Properties and Uses*. New Delhi: Srishti Book Distributors.
- Naiborhu, P. E. 2002. Ekstraksi dan Manfaat Ekstrak Mangrove (*Sonneratia caseolaris* dan *Sonneratia alba*) sebagai Bahan Alam antibakterial Pada Patogen Udang Windu, *Vibrio harveyi*. *Tesis*. Institut Pertanian Bogor.
- Nakayama, T., Hirahara, K., Onodera, A., Endo, Y., Hosokawa, H., Shinoda, K.

- & Okamoto, Y. 2017. Th1 and Th2 Cells in Health and Disease. *The Annual Review of Immunology*. 35: 53–84.
- Nakkala, J. R., Mata, R., Gupta, A. K., & Sadras, S. R. 2014. Biological activities of green silver nanoparticles synthesized with *Acorous calamus* rhizome extract. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 85: 784–794.
- Nalbandov, A. V. 1999. *Fisiologi Reproduksi pada Mamalia dan Unggas (Reproductive, Psikology of Mammals and Birds)*. Jakarta: Penerbit UI.
- Nanang, F., Putri, S., Sutomo. & Subagus, W. 2013. Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Metanolik Buah Mangga Kasturi (*Mangifera casturi*) Melalui Penghambatan Migrasi Leukosit pada Mencit yang Diinduksi Thioglikolat. *Jurnal Traditional Medicine Journal*. 18(3): 151–156.
- National Institute of Allergy and Infectious Diseases. 2003. *Understanding the Immune System How It Works*. USA: NIH Publication.
- Nazir, N. 2013. Immunomodulatory Activity of Isoflavones Isolated from Iris Kashmiriana: Effect on T-Lymphocyte Proliferation and Cytokine Production in Balb/C Mice. *Journal of Biomedicine & Preventive Nutrition*. 3: 151–157.
- Nugroho, R. A. 2018. *Mengenal Mencit Sebagai Hewan Laboratorium*. Samarinda: Mulawarman University Press.
- Nugroho, Y. A. 2012. Efek Pemberian Kombinasi Buah Sirih (*Piper bettle* L.), Daun Miyana (*Plectranthus scutellarioides* (L.) R. BR.), Madu, dan Kuning Telur terhadap Peningkatan Aktivitas dan Kapasitas Fagositosis Sel Makrofag. *Media Litbang Kesehatan*. 22(1): 1-5.
- Nursiyah. 2013. Studi Deskriptif Tanaman Obat Tradisional yang digunakan Orang Tua Untuk Kesehatan Anak Usia Dini di Gugus Melati Kecamatan Kalikajar Kabupaten Wonosobo. *Skripsi*. Universitas Negeri Semarang.
- Olaniyan, O. T., Meraiyebu, A. B., Arogbonlo, A., Dare, J. B., Shekins, O. & Shafe, M. O. 2013. Effects of Aqueous Extract of Onion (*Allium cepa*) on Blood Parameters in Adult Wistar Rats (*Rattus norvegicus*). *International Journal of Pharmaceutical Sciences Invention*. 2(3): 42–45.
- Otunola, G. A., Afolayan, A. J., Ajayi, E. O., & Odeyemi, S. W. 2017. Characterization, Antibacterial and Antioxidant Properties of Silver Nanoparticles Synthesized from Aqueous Extracts of *Allium sativum*, *Zingiber officinale*, and *Capsicum frutescens*. *Pharmacognosy Magazine*. 13(2): 201–208.
- Owen, J. A., Punt, J. & Stranford, S. A. 2009. *Immunology*. New York: W. H. Freeman and Company.

- Padalia, R. C., Verma, R. S., Sundaresan, V., Chauhan, A., Chanotiya, C. S. & Yadav, A. 2013. Volatile Terpenoid Compositions of Leaf and Rhizome of *Curcuma amada* Roxb. from Northern India. *Journal of Essential Oil Research*. 25(1): 17–22.
- Paim, F. C., Duarte, M. M. M. F., Costa, M. M., Da Silva, A. S., Wolkmer, P., Silva, C. B. & Lopes, S. T. A. 2011. Cytokines in Rats Experimentally Infected with *Trypanosoma evansi*. *Experimental Parasitology*. 128(4): 365–370.
- Pakki, E., Sumarheni., Aisyah, I. & Safirahidzni, S. 2016. Formulasi Nanopartikel Ekstrak Bawang Dayak (*Eleutherine americana* (Aubl) Merr) dengan Variasi Konsentrasi Kitosan - Tripolifosfat (TPP). *J. Trop. Pharm. Chem.* 3(4): 15–19.
- Pal, S. L., Jana, U., Manna, P. K., Mohanta, G. P. & Manavalan, R. 2011. Nanoparticle: An Overview of Preparation and Characterization. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 1(6): 228–234.
- Palani, S., Raja, S., Kumar, R. P., Parameswaran, P. & Kumar, B. S. 2010. Therapeutic Efficacy of *Acorus calamus* on Acetaminophen Induced Nephrotoxicity and Oxidative Stress in Male Albino Rats. *Acta Pharmaceutica Scientia*. 52(1): 89-100.
- Pandey, A., Tripathi, S. & Pandey, C. A. 2014. Concept of Standardization, Extraction and Pre Phytochemical Screening Strategies for Herbal Drug. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 115(25): 115–119.
- Pandit, S., Mukherjee, P. K., Ponnusankar, S., Venkatesh, M. & Srikanth, N. 2011. Metabolism Mediated Interaction of α -asarone and *Acorus calamus* with CYP3A4 and CYP2D. *Fitoterapia*. 82(3): 369–374.
- Pargaputri, A. F. & Andriani, D. 2018. Pengaruh Pemberian Terapi Oksigen Hiperbarik terhadap Jumlah Limfosit Darah pada Kandidiasis Oral Imunosupresi Model. *Jurnal Kedokteran Gigi*. 12(2): 36–44.
- Park, J. K., Chung, M. J., Choi, H. N. & Park, Y. Il. 2011. Effects of The Molecular Weight and The Degree of Deacetylation of Chitosan Oligosaccharides on Antitumor Activity. *International Journal of Molecular Sciences*. 12(1): 266–277.
- Park, S., Kim, T., Kim, J., Chang, K., Lee, H., & Lee, D. 2015. Repeated Superovulation via PMSG / hCG Administration Induces 2-Cys Peroxiredoxins Expression and Overoxidation in the Reproductive Tracts of Female Mice. *Molecules and Cells*. 38(12): 1071–1078.
- Parkin, J. & Cohen, B. 2001. An Overview of The Immune System. *Lancet*. 357:

1777–1789.

- Parlinaningrum, D., Widyarti, S., & Rifa'i, M. 2014. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol *Annona muricata* Linn. terhadap Peningkatan Jumlah B220 pada *Mus musculus*. *Jurnal Biotropika*. 2(5): 269–272.
- Parslow, T., Daniel, S., Abba, T. & John, I. 2001. *Medical Immunology* (10th ed.). New York: Graw Hill medical publishing.
- Pasaribu, W., Longdong, S. N. J. & Mudeng, J. D. 2015. Efektivitas Ekstrak Daun Pacar Air (*Impatiens balsamina* L.) Untuk Meningkatkan Respon Imun Non Spesifik Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Budidaya Perairan Januari*. 3(1): 83–92.
- Patil, U. S., Jaydeokar, A. V. & Bandawane, D. D. 2012. Immunomodulators: A Pharmacological Review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 4(1): 30–36.
- Picchi, V., Migliori, C., Lo Scalzo, R., Campanelli, G., Ferrari, V. & Di Cesare, L. F. 2012. Phytochemical Content in Organic and Conventionally Grown Italian Cauliflower. *Food Chemistry*. 130(3): 501–509.
- Playfair, J. H. I. & Chain, B. M. 2009. *At a Glance Immunologi* (9th ed.). Jakarta: Erlangga.
- Policegoudra, R. S., Rehna, K., Rao, L. J. & Aradhya, S. M. 2010. Antimicrobial, Antioxidant, Cytotoxicity and Platelet Aggregation Inhibitory Activity of A Novel Molecule Isolated and Characterized from Mango Ginger (*Curcuma amada* Roxb.) Rhizome. *Journal of Biosciences*. 35(2): 231–240.
- Pooler, M. R. & Simon, P. W. 1993. Characterization and Classification of Isozyme and Morphological Variation in A Diverse Collection of Garlic Clones. *Euphytica*, 68(1–2): 121–130.
- Prajapati, N. D., Purohit, S. S., Sharma, A. K. & Kumar, T. 2009. *A Hand Book of Medicinal Plants*. India: Jodhpur Agro Bios.
- Puig, P., Pérez-Cano, F. J., Santana, C., Castellote, C., Pulido, M. I. & Permanyer, J. 2007. Spleen Lymphocyte Function Modulated by A Cocoa Enriched Diet. *Journal Experimental Immunology*. 149: 535–542.
- Purbowatiningrum, N, Ismiyanto, Fachriyah, E., Eviana, I., Eldiana, O. & Sektianingrum, A. N. 2016. Antidiabetic Activity from Garlic Acid Encapsulated Nanochitosan. *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering*. 172(1): 1–6.
- Purnomo, D., Sugiharto, S. & Isroli, I. 2015. Total Leukosit dan Diferensial Leukosit Darah Ayam Broiler Akibat Penggunaan Tepung Onggok

- Fermentasi *Rhizopus oryzae* pada Ransum. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*. 25(3): 59–68.
- Puspitasari, R. 2014. Efek Imunostimulator Ekstrak Etanol Kayu Manis (*Cinnamomum burmanii*) Terhadap CD4, dan interferon Gamma pada Mencit Balb/C yang Diinfeksi Bakteri *Salmonella enteritidis*. *Disertasi*. Universitas Brawijaya.
- Putri, A. I., Sundaryono, A. & Candra, I. N. 2018. Karakterisasi Nanopartikel Kitosan Ekstrak Daun Ubijalar (*Ipomoea batatas* L.) Menggunakan Metode Gelasi Ionik. *Jurnal Pendidikan Dan Ilmu Kimia*. 2(2): 203–207.
- Putri, D. R. 2019. Uji Daya Immunomodulator Campuran Ekstrak Etanolik Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.F. Nees) dan Kunir Mangga (*Curcuma mangga* Val) terhadap Proliferasi Limfosit Mencit Jantan Balb / C Secara *In Vitro*. *Prosiding 1st Seminar Nasional Dan Call for Paper Arah Kebijakan Dan Optimalisasi Tenaga Kesehatan Menghadapi Revolusi Industri 4.0*. Ponorogo: Universitas Muhammadiyah Ponorogo.
- Putzu, L., & Ruberto, C. Di. 2013. White Blood Cells Identification and Counting from Microscopic Blood Image. *World Academy of Science, Engineering and Technology*. 73: 363–370.
- Puvvada, Y. S., Vankayalapati, S. & Sukhavasi, S. 2012. Extraction of Chitin from Chitosan from Exoskeleton of Shrimp for Application in The Pharmaceutical Industry. *International Current Pharmaceutical Journal*. 1(9): 258–263.
- Rabinkov, A., Miron, T., Mirelman, D., Wilchek, M., Glozman, S., Yavin, E. & Weiner, L. 2000. S-Allylmercaptogluthione: The Reaction Product of Allicin with Glutathione Possesses SH-Modifying and Antioxidant Properties. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 1499(1–2): 144–153.
- Rabinowitch, H. D. & Currah, L. 2002. *Allium Crop Science: Recent Advances*. London: CABI Publishing.
- Radiati, L. E., Umam, K., Awwaly, A., Kalsum, U. & Jaya, F. 2008. Pengaruh Pemberian Ekstrak Propolis terhadap Sistem Kekebalan Seluler pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Strain Wistar. *Jurnal Teknologi Pertanian*. 9(1): 1–9.
- Raheel, A., Raheel Babar, H., Ullah, M. A. & Iqbal, Ali Zaffar, M. 2019. Adaptability Studies of Garlic (*Allium sativum*) Advanced Lines. *Journal of Scientific Agriculture*. 3: 19–21.
- Rahman, M. M., Fazlic, V. & Saad, N. W. 2012. Antioxidant Properties of Raw Garlic (*Allium sativum*) Extract. *International Food Research Journal*. 19(2):

589–591.

- Raihana, R., Faridah, Q. Z., Julia, A. A., Abdelmageed, A. H. A. & Kadir, M. A. 2011. In Vitro Culture of *Curcuma mangga* from Rhizome Bud. *Journal of Medicinal Plant Research*. 5(28): 6418–6422.
- Raja, A. E., Vijayalakshmi, M. & Devalarao, G. 2009. A Review Article. *Acorus calamus* Linn. Chemistry and Biology. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2(2): 256–261.
- Rajkumari, S. & Sanatombi, K. 2018. Nutritional Value, Phytochemical Composition, and Biological Activities of Edible *Curcuma* Species: A Review. *International Journal of Food Properties*. 20: 2668–2687.
- Ramacharyulu, P. V. R. K., Muhammad, R., Praveen Kumar, J., Prasad, G. K. & Mohanty, P. 2015. Iron Phthalocyanine Modified Mesoporous Titania Nanoparticles for Photocatalytic Activity and CO₂ Capture Applications. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 17(39): 26456–26462.
- Ramadon, D. & Abdul, M. 2016. Pemanfaatan Nanoteknologi dalam Sistem Penghantaran Obat Baru untuk Produk Bahan Alam. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 14(2): 118–127.
- Ramiro, E., Franch, A., Castellote, C., Cristina, A., Pulido, M. I. & Castell, M. 2010. Effect of *Theobroma cacao* Flavonoids on Immune Activation of A Lymphoid Cell Line. *Journal of Nutrition*. 93(10): 859–866.
- Ramoutar, R. R., & Brumaghim, J. L. 2010. Antioxidant and Anticancer Properties and Mechanisms of Inorganic Selenium, Oxo-Sulfur, and Oxo-Selenium Compounds. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 58(1): 1–23.
- Raufaste, N., Orth, A., Belkhir, K., Senet, D., Smadja, C., Baird, S. J. E. & Boursot, P. 2005. Inferences of Selection and Migration in The Danish House Mouse Hybrid Zone. *Biological Journal of the Linnean Society*. 84(3): 593–616.
- Raven, P., Johnson, G., Mason, K. A. & Losos, J. 2007. *Biology*. New York: McGraw-Hill Education.
- Ravishankar, D., Rajora, A. K., Greco, F., & Osborn, H. M. 2013. Flavonoids as Prospective Compounds for Anti-Cancer Therapy. *Int J Biochem Cell Biol*. 45: 2821– 2831.
- Rawal, I. & Kaur, A. 2013. Synthesis of Mesoporous Polypyrrole Nanowires/Nanoparticles for Ammonia Gas Sensing Application. *Sensors and Actuators, A: Physical*. 203: 92–102.
- Richards, J. A. S., Liu, Z. & Shimada, M. 2008. Immune-Like Mechanisms in

- Ovulation. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 19(6): 191–196.
- Riley, L. & Jedda, R. 2015. Evaluation of Patients with Leukocytosis. *Journal of Medicine*. 92(11): 1004–1011.
- Romagnani, S. 1991. Type 1 T Helper and Type 2 T Helper Cells: Functions, Regulation and Role in Protection and Disease. *Clinical Laboratory*. 21: 152–158.
- Romagnani, S. 2000. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. 85(1): 9–18.
- Rosdianto, A. M., Manalu, W. & Maheshwari, H. 2016. Profil Hematologis Tikus Putih (*Rattus novergicus* sp.) Betina Setelah Pemberian Jamu Kesuburan. *Jurnal Farmasi Indonesia*. 8(1): 283–293.
- Roseno, M., Sudaryat, Y. & Widyastiwi. 2019. Aktivitas Immunomodulator Ekstrak Etanol Kemukus (*Piper cubeba*), Kiseureuh (*Piper aduncum*), dan Cabe Jawa (*Piper retrofractum*) pada Mencit Jantan Galur Balb / C. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 17(2): 255–261.
- Rosnizar, R., Maulida, S., Eriani, K., & Suwarno. 2017. Potensi Ekstrak Daun Flamboyan (*Delonix regia* Raf.) terhadap Peningkatan Aktivitas dan Kapasitas Makrofag. *Bioleuser*. 1(3): 104–115.
- Ruangsang, P., Tewtrakul, S. & Reanmongkol, W. 2010. Evaluation of The Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of *Curcuma mangga* Val and Zijp Rhizomes. *Journal of Natural Medicines*. 64(1): 36–42.
- Ruggieri, A., Anticoli, S., D'Ambrosio, A., Giordani, L. & Viora, M. 2016. The Influence of Sex and Gender on Immunity, Infection and Vaccination. *Ann Ist Super Sanita*. 52(2): 1198–1204.
- Rukmana, R. 1994. *Kencur*. Yogyakarta: Kanisius.
- Sadsoeitoeboen, P., Rifa, M., Sasmito Djati, M., & Soemarno. 2019. Pengaruh Ekstrak Rumpuk Kebar (*Biophytum petersianum* Klotzsch) terhadap Jumlah B220 pada Mencit Betina. *Jurnal Triton*. 10(1): 1–10.
- Saifulhaq, M. 2009. Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Mahkota Dewa Dosis Bertingkat Terhadap Proliferasi Limfosit Lien pada Mencit BALB / C. *Biomedika*. 1(2): 33–36.
- Sailaja, A. K., Amareshwar, P. & Chakravarty, P. 2011. Different Techniques Used for The Preparation of Nanoparticles Using Natural Polymers and Their Application. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3(2): 45–50.

- Sallusto, F. 2016. Heterogeneity of Human CD4 + T Cells Against Microbes . *Annual Review of Immunology*. 34(1): 317–334.
- Saroj, P., Verma, M., Jha, K. K. & Pal, M. 2012. An overview on Immunomodulation. *Journal of Advanced Scientific Research*. 3(1): 7–11.
- Sasikumar, B. 2005. Genetic Resources of Curcuma : Diversity, Characterization and Utilization. *Plant Genetic Resources*. 3(2): 230–251.
- Satriyati, E. 2017. Menjaga Tradisi Minum Jamu Madura dengan Penyampaian Pesan Interpersonal Kesehatan. *Dimensi*. 10(2): 24–35.
- Savant, C., Kulkarni, A. R., Mannasaheb, B. A. Aziz. & Gajare, R. 2014. Immunostimulant phytoconstituents from *Mangifera indica* L. bark oil. *Journal Phytopharmacol*. 3: 139–148.
- Savitri, E. S. 2016. Uji Antifungi Ramuan Tradisional Madura “Subur Kandungan.” *Al-Kauniyah Jurnal Biologi*. 8(1): 1–5.
- Saxena, N. B. 2006. *Plant Taxonomy*. Meerut: Pragati Prakashan.
- Saxena, R., Sharma, A., Bharti, M. & Rathore, M. 2012. Immunomodulator A New Horizon : An Overview. *Journal of Pharmacy Research*. 5(4): 2306–2310.
- Schalm, O., Jain, N. C., & Carrol, E. J. 1995. *Veterinary Hematology*. (3rd ed.). Philadelphia: Lea and Febiger.
- Schroeder Jr, H. W. & Cavacini, L. 2010. Structure and Function of Immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 125(2): 41–52.
- Shabbir, A., Butt, H. I., Shahzad, M., Arshad, H. M. & Waheed, I. 2016. Immunostimulatory Effect of Methanolic Leaves Extract of *Psidium guajava* (Guava) on Humoral and Cell-Mediated Immunity in Mice. *Journal of Animal and Plant Sciences*. 26(5): 1492–1500.
- Shahidi, F., Arachchi, J. K. V. & Jeon, Y. J. 1999. Food Applications of Chitin and Chitosans. *Trends in Food Science and Technology*. 10(2): 37–51.
- Shahzad, N., Alam, A., Sultana, N. & Asma, K. 2015. Phytochemical and Pharmacological Studies of Vaj Turki (*Acorus calamus* Linn) & Unani Description – A Review. *International Journal of Pharma Sciences and Research*. 6(10): 1241–1244.
- Shalih. 2000. *Tafsir al-Mukhtashar*. Riyadh: Markaz Tafsir Lid Diraasatil Qur’aniyyah.

- Sharma, P., Kumar, P., Sharma, R., Gupta, G. & Chaudhary, A. 2017. Immunomodulators: Role of Medicinal Plants in Immune System. *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology*. 7(6): 552–556.
- Shihab, M. Q. 2002. *Tafsir Al Mishbah: Pesan, Kesan dan Keserasian Al-Qur'an*. Jakarta: Lentera Hati.
- Sholikhah, E. N. 2016. Indonesian Medicinal Plants as Sources of Secondary Metabolites for Pharmaceutical Industry. *Journal of The Medical Sciences*. 48(4): 226–239.
- Sidqi, T. 2011. Pembuatan dan Karakterisasi Nanopartikel Ekstrak Temulawak dengan Metode Ultrasonikasi. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor.
- Silva-Santana, G., Aguiar-Alves, F., Silva, L. E., Barreto, M. L., Silva, J. F. R., Gonçalves, A., Mattos-Guaraldi, A. L. & Lenzi-Almeida, K. C. 2019. Compared Anatomy and Histology between *Mus musculus* Mice (Swiss) and *Rattus norvegicus* Rats (Wistar). *Preprints*. 87(7): 1-33.
- Sinambela, J. M. 2003. Fitoterapi, Fitostandar dan Temulawak. *Prosiding Simposium Nasional Universitas Padjajaran*. pp. 174–178.
- Singh, N., Singh, J., Kaur, L., Sodhi, N. S. & Gill, B. S. 2003. Morphological, Thermal and Rheological Properties of Starches from Different Botanical Sources. *Food Chemistry*. 81(2): 219–231.
- Singh, R., Sharma, Pramod, K. & Malviya, R. 2011. Pharmacological Properties and Ayurvedic Value of Indian Buch Plant (*Acorus calamus*): A Short Review. *Advances in Biological Research*. 5(3): 145–154.
- Siswanto. 2013. Saintifikasi Jamu Sebagai Upaya Terobosan untuk Mendapatkan Bukti Ilmiah tentang Manfaat dan Keamanan Jamu. *Buletin Penelitian Sistem Kesehatan*. 15(2): 203–211.
- Smith, J. B. & Mangkoewijojo. 1988. *Pembiakan dan penggunaan hewan percobaan di daerah tropis*. Jakarta: Penerbit UI.
- Soeharsono, L., Adriani, E., Hernawan, K., Kamil, A., & Mushawwir, A. 2010. *Fisiologi Ternak Fenomena dan Nomena Dasar, Fungsi dan Interaksi Organ pada Hewan*. Bandung: Widya Padjajaran.
- Sovino, H., Sir-Petermann, T. & Devoto, L. 2002. Clomiphene Citrate and Ovulation Induction. *Reproductive Biomedicine Online*. 4(3): 303–310.
- Srivastava, S., & Pathak, P. H. 2012. Changes in WBC Differential Count Pattern in Male Albino Rats Treated with Garlic (*Allium sativum*) Extract. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 3(6): 1716–1720.

- Stone, K. D., Prussin, C. & Metcalfe, D. D. 2010. IgE, Mast Cells, Basophils, and Eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 125(2): S73–S80.
- Subositi, D. 2015. Keragaman Genetik Dringo (*Acorus calamus* L .). *Buletin Kebun Raya*. 18(2): 125–134.
- Sudiono, J. 2014. *Sistem Kekebalan Tubuh*. Jakarta: EGC.
- Sugiharto, S., Yudiarti, T. & Isroli, I. 2015. Functional Properties of Filamentous Fungi Isolated from The Indonesian Fermented Dried Cassava With Particular Application on Poultry. *Jurnal Mycobiology*. 43(4): 413–422.
- Suharjana. 2012. Kebiasaan Berprilaku Hidup Sehat dan Nilai - Nilai Pendidikan Karakter. *Jurnal Pendidikan Karakter*. 2(2): 189–201.
- Suleria, H. A. R., Butt, M. S., Khalid, N., Sultan, S., Raza, A., Aleem, M. & Abbas, M. 2015. Garlic (*Allium sativum*): Diet Based Therapy of 21st Century-A Review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 5(4): 271–278.
- Sultana, S., Khanum, S. & Devi, K. 2011. Immunomodulatory Effect of Methanol Extract of *Solanum xanthocarpum* Fruits. *Intl. J. Pharm. Sci. Res*. 2(2): 93–97.
- Sun, C., Wu, Z., Wang, Z. & Zhang, H. 2015. Effect of Ethanol/Water Solvents on Phenolic Profiles and Antioxidant Properties of Beijing Propolis Extracts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine - Hindawi*. 15: 1–3.
- Sun, X. & Ku, D. D. 2006. Allicin in Garlic Protects Against Coronary Endothelial Dysfunction and Right Heart Hypertrophy in Pulmonary Hypertensive Rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 291(5): 2431–2438.
- Sundram, T. C. M., Annuar, M. S. M. & Khalid Norzulaani, N. 2012. Optimization of Culture Condition for Callus Induction from Shoot Buds for Establishment of Rapid Growing Cell Suspension Cultures of Mango Ginger (*Curcuma mangga*). *Australian Journal of Crop Science*. 6(7): 1139–1146.
- Susanti, E. & Kholisoh, N. 2018. Konstruksi Makna Kualitas Hidup Sehat (Studi Fenomenologi pada Anggota Komunitas Herbalife Klub Sehat Ersanddi Jakarta). *Jurnal Lugas*. 2(1): 1–12.
- Susanti, N. 2016. Aktivitas Antimikroba Ekstrak Rimpang Jeringau (*Acorus calamus*) Terhadap Pertumbuhan *Candida albicans*. *Jurnal Biodjati*. 1(1): 55-58.

- Swain, S. L., Agrewala, J. N., Brown, D. M., Jelley-Gibbs, D. M., Golech, S., Huston, G., McKinstry, K. K. 2006. CD4+ T-Cell Memory: Generation and Multi-Faceted Roles for CD4 + T Cells in Protective Immunity to Influenza. *Immunol Rev.* 211: 8–22.
- Syahida, I. E. A., Sarjito, Prayitno, S. B. & Mariana, A. 2013. Pengaruh Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) terhadap Profil Darah dan Kelulusan Hidup Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophyla*. *Journal of Aquaculture Management and Technology.* 2(4): 94–107.
- Syahrum. 1994. *Reproduksi dan embriologi dari satu sel menjadi organisme*. Jakarta: Balai penerbit FK UI.
- Tarlatzis, B. C., Fauser, B. C. J. M., Legro, R. S., Norman, R. J., Hoeger, K., Pasquali, R. & Van Steirteghem, A. 2008. Consensus on Infertility Treatment Related to Polycystic Ovary Syndrome. *Human Reproduction.* 23(3): 462–477.
- Tatfeng, Y., Mirabeau. & Samson, E. S. 2012. Effect of *Allium cepa* and *Allium sativum* on Some Immunological Cells in Rats. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 9(3): 374–379.
- Thayyarah, N. 2013. *Buku Pintar Sains dalam Al-Quran*. Jakarta: Penerbit Zaman.
- Thomson, M. & Ali, M. 2005. Garlic (*Allium sativum*): A Review of Its Potential Use as An Anti-Cancer Agent. *Current Cancer Drug Targets.* 3(1): 67–81.
- Tirmidzi. 2008. *Jami' at Tirmidzi*. Riyadh: Darussalam.
- Tiyaboonchai, W. 2003. Chitosan Nanoparticles : A Promising System for Drug Delivery. *Naresuan University Journal.* 11(3): 51–66.
- Tizard, I. 1988. *Pengantar Immunologi Veteriner* (2nd ed.). Surabaya: Airlangga University.
- Tomalia, D. A. 2004. Birth of A New Macromolecular Architecture: Dendrimers as Quantized Building Blocks for Nanoscale Synthetic Organic Chemistry. *Aldrichimica Acta.* 37(2): 39–57.
- Torri, M. C. 2013. Traditional Jamu Versus Industrial Jamu: Perceptions and Beliefs of Consumers in The City of Yogyakarta: What Future for Traditional Herbal Medicine in Urban Indonesia?. *International Journal of Entrepreneurship and Small Business.* 19(1): 1–20.
- Trifunski, S., Munteanu, M. F., Agotici, V., Pintea, S. & Gligor, R. 2015. Determination of Flavonoid and Polyphenol Compounds in *Viscum Album*

- and *Allium sativum* Extracts. *International Current Pharmaceutical Journal*. 4(5): 382–385.
- Ullah, H., Khan, I., Yamani, Z. H. & Qurashi, A. 2017. Sonochemical-Driven Ultrafast Facile Synthesis Off SNO₂ Nanoparticles: Growth Mechanism Structural Electrical and Hydrogen Gas Sensing Properties. *Ultrasonics Sonochemistry*. 34: 484–490.
- Usman, A. I., Aziz, A. A. & Noqta, O. A. 2019. Application of Green Synthesis of Gold Nanoparticles: A Review. *Jurnal Teknologi*. 81(1): 171–182.
- Van Leeuwen, E. M. M., Sprent, J., & Surh, C. D. 2009. Generation and Maintenance of Memory CD4⁺ T Cells. *Curr Opin Immunol*. 21(2): 167–172.
- Vause, T. D. R., Cheung, A. P., Cheung, A. P., Sierra, S., Claman, P., Graham, J. & Chee-Man Wong, B. 2010. Ovulation Induction in Polycystic Ovary Syndrome. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*. 32(5): 495–502.
- Vauthier, C., Dubernet, C., Chauvierre, C., Brigger, I. & Couvreur, P. 2003. Drug Delivery to Resistant Tumors: The Potential of Poly(Alkyl Cyanoacrylate) Nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. 93(2): 151–160.
- Vellayutham, R. & Patil, V. S. 2015. *In Vitro* Evaluation for Immunomodulatory Activity of *Acorus calamus* on Human Neutrophils. *International Research Journal of Pharmacy*. 6(7): 450–452.
- Viney, M., Lazarou, L. & Abolins, S. 2015. The Laboratory Mouse and Wild Immunology. *Parasite Immunology*. 37(5): 267–273.
- Vogt, R. & Schulte, P. A. 2011. Evaluation of Immune Responses. *IARC Scientific Publications*. 163: 215–239.
- Voight, R. 1994. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Wahyudi, C. T., Wijayanti, S. D., & Harijono, H. 2018. Pengaruh Konsentrasi Media Penyalut dan Lama Ultrasonikasi terhadap Ukuran Partikel dan Aktivitas Antioksidan Nano Ekstrak Bawang Putih Tunggal (*Allium sativum* L.). *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 6(3): 8–17.
- Wahyuni, W., Leorita, M., Fristiohady, A., Yusuf, M. I., Malik, F., Febriansyah, H., & Sahidin, S. 2019. Efek Imunomodulator Ekstrak Etanol Spons *Xestospongia* Sp. terhadap Aktivitas Fagositosis Makrofag pada Mencit Jantan Galur Balb/C. *Jurnal Mandala Pharmacon Indonesia*. 5(1): 1–16.
- Wallock-Richards, D., Doherty, C. J., Doherty, L., Clarke, D. J., Place, M., Govan, J. R. W. & Campopiano, D. J. 2014. Garlic Revisited: Antimicrobial

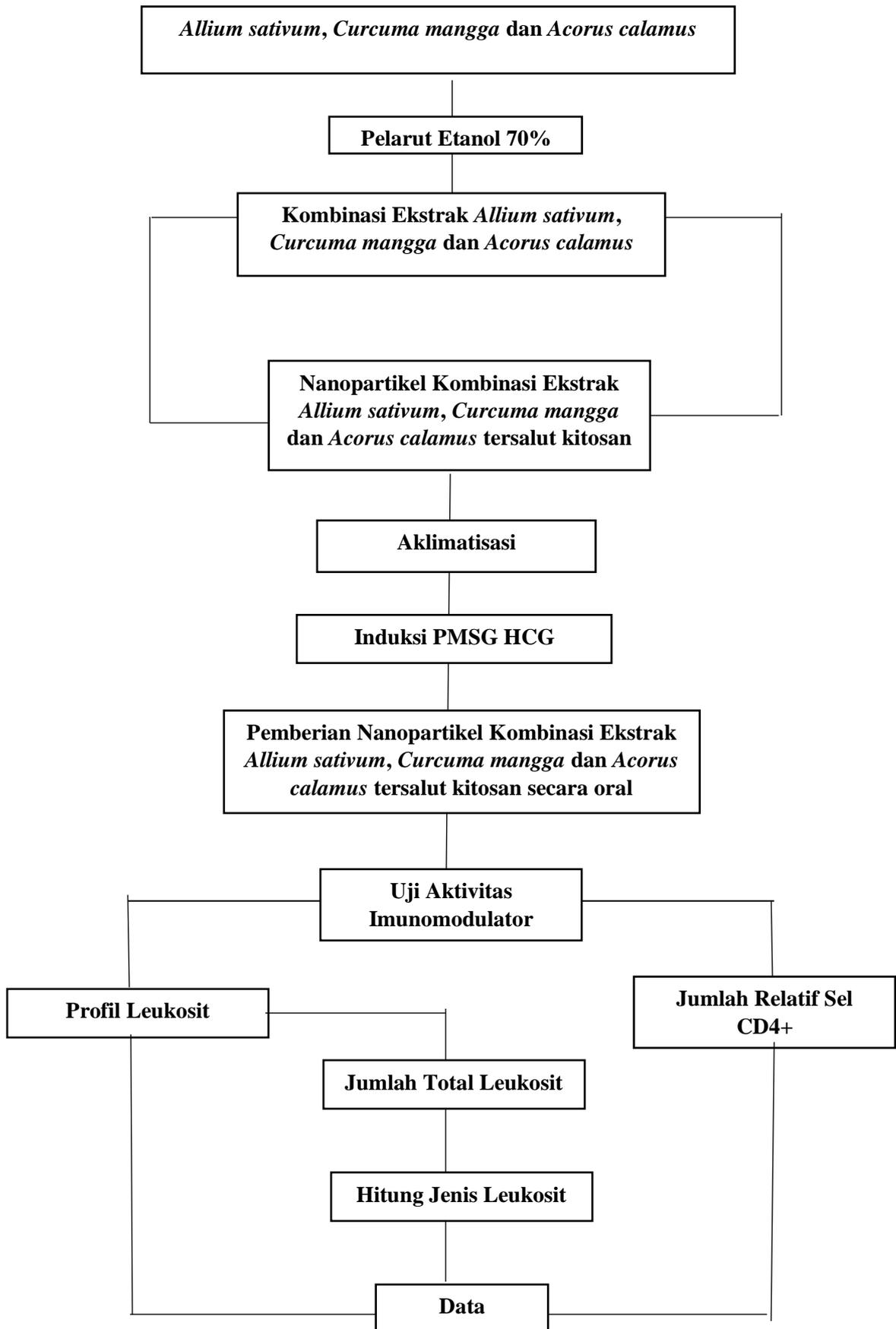
- Activity of Allicin-Containing Garlic Extracts Against Burkholderia Cepacia Complex. *Plos One*. 9(12): 1–13.
- Walters, S. A. 2008. Production Method and Cultivar Effects on Garlic Over-Wintering Survival, Bulb Quality, and Yield. *HortTechnology*. 18(2): 286–289.
- Wang, J. X., Tang, W., Shi, L. P., Zhou, R., Ni, J., Fu, Y. F. & Zuo, J. P. 2007. Investigated of The Immunosuppressive Activity of Artemether on T-cell Activation and Proliferation. *Journal of Pharmacology*. 150: 652–661.
- Wardani, G., Mahmiah. & Sudjarwo, S. A. 2018. Immunostimulatory Activity of Chitosan Nanoparticles on Wistar Albino Rats. *Pharmacognosy Journal*. 10(5): 892–898.
- Wardhana, M. 2016. *Pengantar Psikoneuroimunologi*. Bali: Universitas Udayana.
- Weber, N. D., Andersen, D. O., North, J. A., Murray, B. K., Lawson, L. D. & Hughes, B. G. 1992. In Vitro Virucidal Effects of *Allium sativum* (Garlic) Extract and Compounds. *Planta Medica*. 58(5): 417–423.
- Weiss, D. J. & Wardrop, K. J. 2010. *Schalm's Veterinary Hematology*. New Jersey: Wiley-Blackwell.
- Whitacre, C. C., Reingold, S. C., O'Looney, P. A., Blankenhorn, E., Brinley, F., Collier, E. & Lahita, R. 1999. A Gender Gap in Autoimmunity. *Science's Compass*. 283(5406): 1277–1278.
- Whitesides, G. 2003. Focus on Nanobiotechnology. *Nature Biotechnology*. 21(10): 1161–1165.
- Whitfield, L., Gibbs, P. & Morris, T. 2019. Veterinary Control of Reproduction in Rodent Colonies. *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 41: 711–723.
- Widowati, W., Mozef, T., Risdian, C. & Yellianty, Y. 2013. Anticancer and Free Radical Scavenging Potency of *Catharanthus roseus*, *Dendrophthoe petandra*, *Piper bettle* and *Curcuma mangga* Extracts in Breast Cancer Cell Lines. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science*. 2(2): 137-142.
- Widowati, W., Mozef, T., Risdian, C., Ratnawati, H., Tjahjani, S. & Sandra, F. 2011. The Comparison of Antioxidative and Proliferation Inhibitor Properties of *Piper bettle* L., *Catharanthus roseus* (L) G . Don , *Dendrophthoe petandra* L., *Curcuma mangga* Val . Extracts on T47D Cancer Cell Line. *International Research Journal of Biochemistry and Bioinformatics*. 1(2): 22-28.
- Widyastuti, Dyah Ayu. 2013. Profil Darah Tikus Putih Wistar pada Kondisi Subkronis Pemberian Natrium Nitrit. *Jurnal Sain Vererainer*. 31(2): 201–215.

- Wiesner, M. R. 2007. *Environmental Nanotechnology Application and Impacts of Nano materials*. USA: The McGraw-Hill Companies.
- Wilson, D. & Reeder, D. M. 2005. *Mammal Species of the World*. USA: Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD.
- Wiweko, B., Moegni, E. M., Madjid, V. & Mushlihani, M. 2016. The Effectiveness of Clomiphene Citrate and Letrozole for Ovulation Induction Related to Endometrial Thickness and Number of Dominant Follicle. *E-Journal Kedokteran Indonesia*. 4(2): 99–103.
- Wolf, L. J. 2000. Ovulation Induction. *Clinical Obstetrics and Gynecology*. 43(4): 902–15.
- World Health Organization. 2007. *Laboratory Guidelines for enumerating CD4 T Lymphocytes in the context of HIV/AIDS*. New Delhi.
- Xiang, Z., Wang, X. Q., Caib, X. J. & Zenga, S. 2011. Metabolomics Study on Quality Control and Discrimination of Three Curcuma Species Based on Gas Chromatograph-Mass Spectrometry. *Phytochemical Analysis*. 22(5): 411–418.
- Yasirin, A., Rahayu, S. & Junaidi, S. 2014. Latihan Senam Aerobik dan Peningkatan Limfosit CD4 (Kekebalan Tubuh) pada Penderita HIV. *Journal of Sport Sciences and Fitness*. 3(3): 1–6.
- Yee, F. Y., Periasamy, V. & Malek, S. N. A. 2015. Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using Aqueous Ethanol Extract of *Curcuma mangga* Rhizomes as Reducing Agent. *AIP Conference Proceedings*. 1657: 1–8.
- Yen, M. T. & Mau, J. L. 2007. Selected Physical Properties of Chitin Prepared from Shiitake Stipes. *LWT - Food Science and Technology*. 40(3): 558–563.
- Yuandani & Suwarso, E. 2017. Immunomodulatory Effects of Ethanol Extract of *Curcuma mangga* Rhizomes in Mice. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 10(9): 148–150.
- Yuandani, Yuliasmi, S. & Satria, D. 2018. Analysis of Compounds and Immunostimulatory Properties of *Curcuma mangga* Rhizomes on Male Mice. *Rasayan Journal of Chemistry*. 11(2): 844–849.
- Zakaria, A. E. M. M., Hammour, M. E., Aly, M. A. E. M. & Holla, A. H. A. E. H. 2018. Comparative Study between Effect of Clomiphene Citrate, Tamoxifen and Letrozole on Endometrial Thickness in Induction of Ovulation in Patient with Polycystic Ovarian Syndrome. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*. 72(8): 5009–5013.

- Zhang, J. M., Liao, W., He, Y. X., He, Y., Yan, D. & Fu, C. M. 2013. Study on Intestinal Absorption and Pharmacokinetic Characterization of Diester Diterpenoid Alkaloids in Precipitation Derived from Fuzi-Gancao Herb-Pair Decoction for Its Potential Interaction Mechanism Investigation. *Journal of Ethnopharmacology*. 147(1): 128–135.
- Zhang, L., Wang, Q., Zhang, S. Q., Yina, Y., Du, X. & Han, Z. 2017. Anti-Tumor and Immunomodulatory Effect of Flavonoid Extracts from *Patrinia heterophylla* on Cervical Carcinoma Bearing Mice. *Natural Product Communications*. 12(7): 1069–1072.
- Zhang, Q. W., Lin, L. G. & Ye, W. C. 2018. Techniques for Extraction and Isolation of Natural Products: A Comprehensive Review. *Chinese Medicine (United Kingdom)*. 13(1): 1–26.
- Zhang, Y., Zhang, X., Ding, R., Zhang, J. & Liu, J. 2011. Determination of The Degree of Deacetylation of Chitosan by Potentiometric Titration Preceded by Enzymatic Pretreatment. *Carbohydrate Polymers*. 83(2): 813–817.
- Zin, T. T. 2017. Morphological and Anatomical Studies on *Allium sativum* L . cv . Yatsauk hmwar phyu. *Universities Research Journal*. 9(2): 1–16.
- Zmora, N., Bashiardes, S., Levy, M. & Elinav, E. 2017. The Role of The Immune System in Metabolic Health and Disease. *Cell Metabolism*. 25(3): 506–521.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Alur Penelitian



Lampiran 2: Data Jumlah Total Leukosit Setelah Perlakuan Pemberian Nanopartikel Kombinasi Ekstrak *Allium sativum*, *Curcuma mangga* dan *Acorus calamus*

Perlakuan	Ulangan						Jumlah	Rerata
	1	2	3	4	5	6		
K-	6000	7800	9200	10600	9000	6200	48800	8133,333
P1	5000	7600	8200	6600	7600	6200	41200	6866,667
P2	6000	4200	4600	5400	2600	4800	27600	4600
P3	6400	2600	5800	4000	2000	4400	25200	4200
P4	5600	5400	8800	8400	7200	5200	40600	6766,667
Jumlah	29000	27600	36600	35000	28400	26800	183400	30566,67

Lampiran 3: Data Jumlah Persentase Neutrofil Setelah Perlakuan Pemberian Nanopartikel Kombinasi Ekstrak *Allium sativum*, *Curcuma mangga* dan *Acorus calamus*

Perlakuan	Ulangan						Jumlah	Rerata
	1	2	3	4	5	6		
K-	23	27	28	7	15	20	120	20
P1	26	20	26	24	13	28	137	22,83333
P2	24	19	8	11	33	20	115	19,16667
P3	18	24	39	18	21	23	143	23,83333
P4	13	18	22	18	46	10	127	21,16667
Jumlah	104	108	123	78	128	101	642	107

Lampiran 4: Data Jumlah Persentase Basofil Setelah Perlakuan Pemberian Nanopartikel Kombinasi Ekstrak *Allium sativum*, *Curcuma mangga* dan *Acorus calamus*

Perlakuan	Ulangan						Jumlah	Rerata
	1	2	3	4	5	6		
K-	1	0	1	2	1	2	7	1,166667
P1	1	0	0	1	1	2	5	0,833333
P2	1	1	0	0	0	0	2	0,333333
P3	0	0	1	0	0	0	1	0,166667
P4	1	1	1	2	1	0	6	1
Jumlah	4	2	3	5	3	4	21	3,5

Lampiran 5: Data Jumlah Persentase Eosinofil Setelah Perlakuan Pemberian Nanopartikel Kombinasi Ekstrak *Allium sativum*, *Curcuma mangga* dan *Acorus calamus*

Perlakuan	Ulangan						Jumlah	Rerata
	1	2	3	4	5	6		
K-	1	3	1	1	0	3	9	1,5
P1	2	4	1	1	1	2	11	1,833333
P2	2	2	3	2	3	4	16	2,666667
P3	1	2	2	3	4	3	15	2,5
P4	0	3	4	4	1	3	15	2,5
Jumlah	6	14	11	11	9	15	66	11

Lampiran 6: Data Jumlah Persentase Limfosit Setelah Perlakuan Pemberian Nanopartikel Kombinasi Ekstrak *Allium sativum*, *Curcuma mangga* dan *Acorus calamus*

Perlakuan	Ulangan						Jumlah	Rerata
	1	2	3	4	5	6		
K-	2	2	3	13	17	17	54	9
P1	1	2	6	12	14	16	51	8,5
P2	7	6	28	23	16	14	94	15,66667
P3	5	4	4	6	5	7	31	5,166667
P4	30	31	33	29	17	40	180	30
Jumlah	45	45	74	83	69	94	410	68,33333

Lampiran 7: Data Jumlah Persentase Monosit Setelah Perlakuan Pemberian Nanopartikel Kombinasi Ekstrak *Allium sativum*, *Curcuma mangga* dan *Acorus calamus*

Perlakuan	Ulangan						Jumlah	Rerata
	1	2	3	4	5	6		
K-	72	69	67	77	67	58	410	68,33333
P1	70	74	67	62	71	52	396	66
P2	66	72	61	64	48	62	373	62,16667
P3	76	70	54	73	70	67	410	68,33333
P4	56	47	40	47	35	47	272	45,33333
Jumlah	340	332	289	323	291	286	1861	310,1667

Lampiran 8: Data Jumlah Relatif Sel CD4+ Setelah Perlakuan Pemberian Nanopartikel Kombinasi Ekstrak *Allium sativum*, *Curcuma mangga* dan *Acorus calamus*

Perlakuan	Ulangan						Jumlah	Rerata
	1	2	3	4	5	6		
K-	15,64	15,33	15,88	15,56	15,59	15,28	93,28	15,54667
P1	19,13	19,52	18,34	19,2	18,33	19,03	113,55	18,925
P2	10,8	10,34	10,95	10,6	10,22	11,21	64,12	10,68667
P3	10,28	9,6	9,84	9,49	10,2	9,43	58,84	9,806667
P4	13,76	14,78	14,39	13,65	14,81	14,69	86,08	14,34667
Jumlah	69,61	69,57	69,4	68,5	69,15	69,64	415,87	69,31167

Lampiran 9: Perhitungan Statistik Jumlah Total Leukosit

1. Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Total Leukosit
N		30
Normal Parameters ^a	Mean	6113.33
	Std. Deviation	2065.602
Most Extreme Differences	Absolute	.083
	Positive	.083
	Negative	-.064
Kolmogorov-Smirnov Z		.456
Asymp. Sig. (2-tailed)		.985
a. Test distribution is Normal.		

2. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Total Leukosit

<u>Levene</u> Statistic	df1	df2	Sig.
.944	4	25	.455

3. Uji ANOVA

ANOVA

ANOVA					
Total Leukosit					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6.615E7	4	1.654E7	7.181	.001
Within Groups	5.758E7	25	2303200.000		
Total	1.237E8	29			

4. Uji Duncan

Homogeneous Subsets

Total Leukosit

		N	Subset for alpha = 0.05		
<u>Perlakuan</u>			1	2	3
<u>Duncan^a</u>	<u>Jamu Subur Kandungan</u>	6	4200.00		
	<u>Nano 50</u>	6	4600.00		
	<u>Klomifen</u>	6		6766.67	
	<u>Nano 25</u>	6		6866.67	
	<u>Kontrol Negatif</u>	6		8133.33	
	Sig.		.652	.152	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

Lampiran 10: Perhitungan Statistik Jumlah Persentase Leukosit

1. Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Neutrofil	Basofil	Eosinofil	Limfosit	Monosit
N		30	30	30	30	30
Normal Parameters ^a	Mean	21.40	.70	2.20	62.03	13.67
	Std. Deviation	8.512	.702	1.215	11.186	10.978
Most Extreme Differences	Absolute	.119	.274	.178	.172	.195
	Positive	.119	.274	.172	.095	.195
	Negative	-.111	-.232	-.178	-.172	-.124
Kolmogorov-Smirnov Z		.652	1.500	.976	.941	1.067
Asymp. Sig. (2-tailed)		.789	.022	.296	.338	.205
a. Test distribution is Normal.						

2. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Neutrofil	.478	4	25	.751
Basofil	.631	4	25	.645
Eosinofil	1.065	4	25	.395
Limfosit	.092	4	25	.984
Monosit	2.887	4	25	.043

3. Uji ANOVA

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<u>Neutrofil</u>	Between Groups	89.867	4	22.467	.279	.889
	Within Groups	2011.333	25	80.453		
	Total	2101.200	29			
<u>Basofil</u>	Between Groups	4.467	4	1.117	2.839	.045
	Within Groups	9.833	25	.393		
	Total	14.300	29			
<u>Eosinofil</u>	Between Groups	6.133	4	1.533	1.045	.404
	Within Groups	36.667	25	1.467		
	Total	42.800	29			
<u>Limfosit</u>	Between Groups	2244.133	4	561.033	10.128	.000
	Within Groups	1384.833	25	55.393		
	Total	3628.967	29			
<u>Monosit</u>	Between Groups	2349.000	4	587.250	12.815	.000
	Within Groups	1145.667	25	45.827		
	Total	3494.667	29			

4. Uji Duncan

Homogeneous Subsets

Basofil

	Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
<u>Duncan^a</u>	JAMU SUBUR KANDUNGAN	6	.17		
	NANO 50	6	.33	.33	
	NANO 25	6	.83	.83	.83
	KLOMIFEN	6		1.00	1.00
	KONTROL NEGATIF	6			1.17
	Sig.			.093	.093

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

Limfosit

		N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
<u>Duncan^a</u>	Perlakuan			
	KLOMIFEN	6	45.33	
	NANO 50	6		62.17
	NANO 25	6		66.00
	KONTROL NEGATIF	6		68.33
	JAMU SUBUR KANDUNGAN	6		68.33
	Sig.		1.000	.201

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

5. Uji Brown-Forsythe**Robust Tests of Equality of Means**

<u>Monosit</u>				
	<u>Statistic^a</u>	df1	df2	Sig.
Brown-Forsythe	12.815	4	19.329	.000

a. Asymptotically F distributed.

6. Uji Gomes Howell

Multiple Comparisons^a

Moestik

Games-Howell

① Perilaku	② Perilaku	Mean Difference (-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
KONTROL NEGATIF	NANO 25	.500	4.006	1.000	-12.75	13.75
	NANO 50	-6.667	4.674	.627	-22.12	8.78
	JAMU SUBUR KANDUNGAN	3.833	3.081	.731	-8.30	15.96
	KLOMIFEN	-21.000	4.313	.005	-35.19	-6.81
NANO 25	KONTROL NEGATIF	-.500	4.006	1.000	-13.75	12.75
	NANO 50	-7.167	4.400	.516	-21.90	7.57
	JAMU SUBUR KANDUNGAN	3.333	2.648	.724	-7.02	13.69
	KLOMIFEN	-21.500	4.015	.002	-34.78	-8.22
NANO 50	KONTROL NEGATIF	6.667	4.674	.627	-8.78	22.12
	NANO 25	7.167	4.400	.516	-7.57	21.90
	JAMU SUBUR KANDUNGAN	10.500	3.578	.141	-3.65	24.65
	KLOMIFEN	-14.333	4.681	.073	-29.80	1.14
JAMU SUBUR KANDUNGAN	KONTROL NEGATIF	-3.833	3.081	.731	-15.96	8.30
	NANO 25	-3.333	2.648	.724	-13.69	7.02
	NANO 50	-10.500	3.578	.141	-24.65	3.65
	KLOMIFEN	-24.833	3.092	.002	-37.01	-12.66
KLOMIFEN	KONTROL NEGATIF	21.000	4.313	.005	6.81	35.19
	NANO 25	21.500	4.015	.002	8.22	34.78
	NANO 50	14.333	4.681	.073	-1.14	29.80
	JAMU SUBUR KANDUNGAN	24.833	3.092	.002	12.66	37.01

a. The mean difference is significant at the .005 level.

Lampiran 11: Perhitungan Statistik Jumlah Relatif Sel CD4+

1. Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		CD4
N		30
Normal Parameters ^a	Mean	13.8623
	Std. Deviation	3.40157
Most Extreme Differences	Absolute	.182
	Positive	.182
	Negative	-.105
Kolmogorov-Smirnov Z		.998
Asymp. Sig. (2-tailed)		.272
a. Test distribution is Normal.		

2. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

CD4

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.842	4	25	.152

3. Uji ANOVA

ANOVA					
CD4					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	331.413	4	82.853	500.698	.000
Within Groups	4.137	25	.165		
Total	335.550	29			

4. Uji Duncan

Homogeneous Subsets

CD4						
Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Duncan ^a						
JAMU SUBUR KANDUNGAN	6	9.8067				
NANO 50	6		10.6867			
KLOMIFEN	6			14.3467		
KONTROL NEGATIF	6				15.5467	
NANO 25	6					18.9250
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

Lampiran 12: Perhitungan Dosis

1. Dosis Perlakuan Pemberian Nanopartikel Kombinasi Ekstrak *Allium sativum*, *Curcuma mangga* dan *Acorus calamus*

Penentuan dosis nanopartikel kombinasi ekstrak *Allium sativum*, *Curcuma mangga* dan *Acorus calamus* mengacu pada penelitian sebelumnya Muhctaromah dkk (2017) yang menyatakan bahwa penggunaan optimal kombinasi ekstrak *Allium sativum*, *Curcuma mangga* dan *Acorus calamus* adalah pada dosis 50 mg/kgBB. Sehingga pada penelitian ini diambil dosis 50 mg/kgBB dan rentang dibawahnya yaitu 25 mg/kgBB. Pemilihan dosis 25 mg/kgBB ini didasarkan pada hipotesis penelitian ini dimana pemberian nanopartikel kombinasi ekstrak *Allium sativum*, *Curcuma mangga* dan *Acorus calamus* dosis rendah diharapkan sudah dapat mempengaruhi parameter.

Berikut adalah perhitungan pemberian nanopartikel kombinasi ekstrak *Allium sativum*, *Curcuma mangga* dan *Acorus calamus* pada mencit:

a. Perhitungan Dosis 25 mg/kgBB

Dosis Acuan: 25 mg/kgBB

Berat Badan Mencit 20 gr

$$\text{Perhitungan} = \frac{\text{Berat Badan Mencit} \times \text{Dosis}}{1000}$$

$$\text{Dosis untuk 20 gr mencit} = \frac{20 \times 25}{1000} = 0,5 \text{ mg}$$

$$\text{Dosis untuk 25 gr mencit} = \frac{25 \times 25}{1000} = 0,625 \text{ mg}$$

b. Perhitungan Dosis 50 mg/kgBB

Dosis Acuan: 50 mg/kgBB

Berat Badan Mencit 20 gr

$$\text{Perhitungan} = \frac{\text{Berat Badan Mencit} \times \text{Dosis}}{1000}$$

$$\text{Dosis untuk 20 gr mencit} = \frac{20 \times 50}{1000} = 1 \text{ mg}$$

$$\text{Dosis untuk 25 gr mencit} = \frac{25 \times 50}{1000} = 1,25 \text{ mg}$$

2. Dosis Perlakuan Pemberian Jamu Subur Kandungan

Penentuan dosis jamu subur kandungan ini mengacu pada penelitian sebelumnya Muhctaromah dkk (2017) yaitu 75 mg/kgBB. Dosis jamu subur kandungan perkapsul yaitu 500 mg/kgBB yang diminum 8 kapsul/hari (2 x sehari @4 kapsul) dan dihitung menggunakan faktor konversi 0,018 (Laurence, 1964), sehingga diperoleh perhitungan sebagai berikut:

$$500 \text{ mg/kgBB} \times 8 = 4000 \text{ mg/kgBB}$$

4000 mg/kgBB x 0,018 = 72 mg/kgBB, kemudian dibulatkan dengan menaikkan dosis menjadi 75 mg/kgBB

$$\text{Dosis untuk 20 gr mencit} = \frac{20 \times 75}{1000} = 1,5 \text{ mg}$$

$$\text{Dosis untuk 25 gr mencit} = \frac{25 \times 75}{1000} = 1,9 \text{ mg}$$

3. Dosis Perlakuan Pemberian Obat Sintetik Kломifen Sitrat

Penentuan dosis obat sintetik kломifen sitrat ini mengacu pada penelitian sebelumnya Muhctaromah dkk (2017) yaitu 0,9 mg/kgBB. Dosis kломifen pertablet yaitu 50 mg/kgBB dengan faktor konversi 0,018(Laurence, 1964), sehingga diperoleh perhitungan sebagai berikut:

$$50 \text{ mg/kgBB} \times 0,018 = 0,9 \text{ mg/kgBB}$$

$$\text{Dosis untuk 20 gr mencit} = \frac{20 \times 0,9}{1000} = 0,018 \text{ mg}$$

$$\text{Dosis untuk 25 gr mencit} = \frac{25 \times 0,9}{1000} = 0,02 \text{ mg}$$

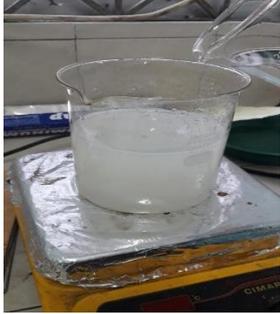
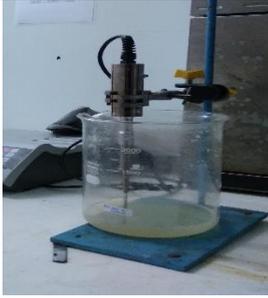
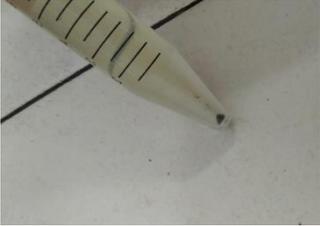
Lampiran 13: Dokumentasi Penelitian

L.13.1 Proses Ekstraksi

		
<p>Penimbangan simplisia kombinasi <i>Allium sativum</i>, <i>Curcuma mangga</i> dan <i>Acorus calamus</i> (36%:36%:28%)</p>	<p>Ekstraksi maserasi menggunakan pelarut etanol 70% dan dishaker</p>	<p>Penyaringan untuk mendapatkan maserat</p>
		
<p>Pemekatan ekstrak menggunakan <i>Rotary Evaporator</i></p>	<p>Didapatkan ekstrak pekat dan dipindahkan ke botol</p>	<p>Botol ekstraksi disimpan dalam freezer</p>

L.13.2 Pembuatan Nanopartikel Kombinasi Ekstrak *Allium sativum*, *Curcuma mangga* dan *Acorus calamus*

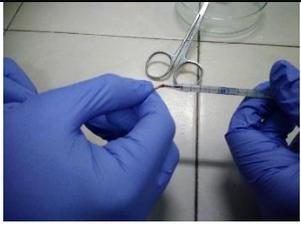
		
<p>Penimbangan ekstrak</p>	<p>Penimbangan kitosan</p>	<p>Penimbangan STTP</p>

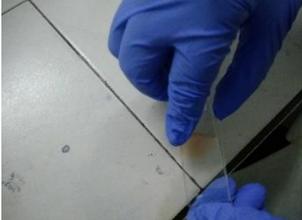
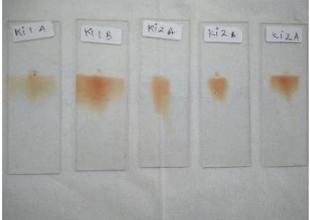
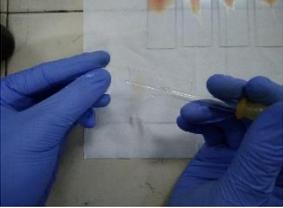
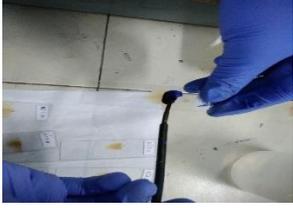
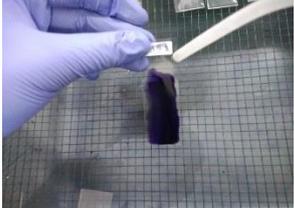
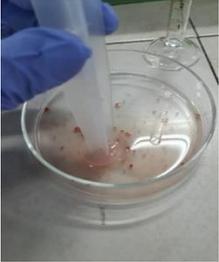
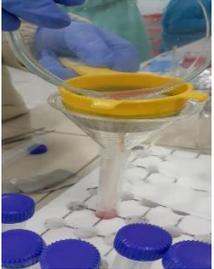
 <p>Homogenasi larutan kitosan-STPP dan penambahan larutan AAG</p>	 <p>Pencampuran ekstrak ke larutan kitosan-STTP-AAG</p>	 <p>Homogenasi menggunakan homogenizer ultra turrax</p>
 <p>Penambahan <i>tween 80</i></p>	 <p>Sonikasi</p>	 <p>Penuangan larutan pada tabung <i>ependorf 15 ml</i></p>
 <p>Sentrifugasi</p>	 <p>Pemisahan pellet dengan supernatan</p>	 <p>Hasil pellet nanopartikel</p>
 <p>Hasil pengeringan pellet</p>	 <p>Penumbukan pellet</p>	 <p>Penyaringan serbuk nanopartikel menggunakan ayakan 30 mesh</p>

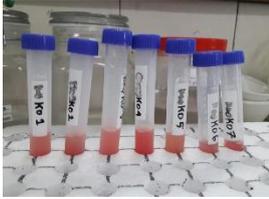
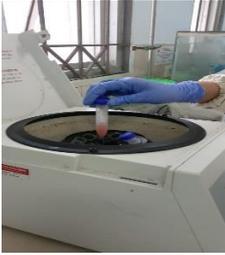
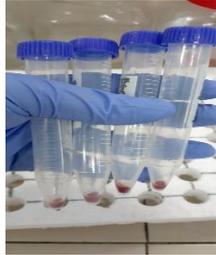
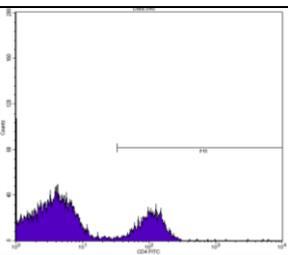
 <p>Penimbangan serbuk nanopartikel</p>	 <p>Hasil serbuk nanopartikel</p>	 <p>Penyimpanan dalam freezer</p>

L.13.3 Proses Perlakuan dan Pengujian Sampel

 <p>Aklimatisasi dan pemeliharaan mencit</p>	 <p>Penimbangan berat badan mencit</p>	 <p>Sinkronisasi menggunakan PMSG HCG</p>
 <p>Induksi PMSG HCG</p>	 <p>Pemberian perlakuan melalui sonde oral</p>	 <p>Proses apus vagina mencit</p>

 <p>Fiksasi preparat apusan vagina dengan methanol 10%</p>	 <p>Pewarnaan preparat apusan vagina dengan Giemsa</p>	 <p>Perangkat haemositometer</p>
 <p>Bahan untuk pembuatan preparat apus darah</p>	 <p>Pemotongan ekor mencit</p>	 <p>Pengisapan darah menggunakan pipet thoma</p>
 <p>Pengisapan larutan turk</p>	 <p>Pengocokan sampel pada pipet thoma</p>	 <p>Pembuangan tetesan awal yang tidak ikut tercampur</p>
 <p>Penetesan sampel pada kamar hitung haemositometer</p>	 <p>Pengamatan sampel pada kamar hitung</p>	 <p>Penetesan darah pada objek glass (pembuatan apusan darah)</p>

 <p>Perataan darah menggunakan objek glass</p>	 <p>Pengapusan darah menggunakan objek glass</p>	 <p>Hasil apusan darah</p>
 <p>Fiksasi menggunakan methanol absolut</p>	 <p>Pewarnaan menggunakan giemsa</p>	 <p>Washing dan diperoleh preparat apusan darah</p>
 <p>Dislokasi mencit</p>	 <p>Pembedahan mencit dan pengambilan organ limpa</p>	 <p>Pencucian organ limpa dengan PBS</p>
 <p>Penimbangan organ limpa</p>	 <p>Penggerusan organ limpa dan penambahan 5 ml PBS</p>	 <p>Penyaringan sampel hasil gerusan</p>

 <p>Hasil penyaringan</p>	 <p>Sentrifugasi</p>	 <p>Pemisahan pellet dan supernatant dan didapatkan pellet</p>
 <p>Resuspensi sampel dengan 1 ml PBS</p>	 <p>Pemindahan sampel pada tube 1,5 ml</p>	 <p>Penambahan antibodi CD4+</p>
 <p>Penambahan larutan fiksatif</p>	 <p>Penambahan larutan permeabilitas</p>	 <p>Sentrifugasi</p>
 <p>Perolehan pellet</p>	 <p>Penambahan PBS</p>	 <p>Hasil analisis flowsitometri</p>