PENGARUH EKSTRAK KOMBINASI BUNGA TELANG (*Clitoria ternatea*) BIRU DAN JERUK NIPIS (*Citrus aurantifolia*) TERHADAP JUMLAH SEL SUMSUM TULANG DAN INDEKS ORGAN LIMPA PADA MENCIT (*Mus musculus*) JANTAN

SKRIPSI

OLEH
YOLARISA IZZATI KHAFSAH
NIM. 220602110073

PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2026

HALAMAN PERSEMBAHAN

Assalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Puji syukur kehadirat Allah Subhanahu wa ta'ala atas segala karunia, ridho yang tiada batas. Segala limpahan rahmat taufiq dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul Pengaruh Ekstrak Kombinasi Bunga Telang (*Clitoria ternatea*) Biru dan Buah Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap Jumlah Sel Sumsum Tulang dan Indeks Organ Limpa pada Mencit (*Mus muscuus*) Jantan, sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana sains (S.Si). Sholawat serta salam semoga senantiasa tercurahkan kepada baginda Nabi Muhammad SAW beserta keluarga dan para sahabatnya yang telah berjuang di jalan Allah sehingga Islam sampai pada zaman sekarang.Penulis menyampaikan bahwa ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak yang telah menyampaikan bantuan, dukungan, dan doa dalam menyusun proposal skripsi ini, khusunya kepada:

1. Karya sederhana ini saya persembahkan kepada Ayah dan Ibu tercinta, dua hati paling tulus yang telah menjadi alasan terbesar di balik setiap perjuangan dalam hidupku. Terima kasih atas setiap doa yang tak pernah putus, setiap pengorbanan yang tak pernah diminta untuk dibalas, setiap air mata, lelah, dan kerja keras yang kalian usahakan demi masa depanku. Tidak akan pernah cukup kata untuk menggambarkan betapa besar cinta, kasih sayang, dan ketulusan yang telah kalian berikan. Semoga karya ini menjadi wujud kecil dari segala rasa terima kasih, bakti, dan cinta yang kupunya, sebagai persembahan untuk Ayah dan Ibu yang telah mengajarkanku arti kehidupan, keteguhan, dan cinta tanpa syarat.
2. Ibu Fitriyah, M.Si. selaku dosen pembimbing saya banggakan, sekaligus sosok guru pertama yang telah hadir dalam perjalanan pendidikan saya sejak bangku sekolah dasar. Terima kasih karena Allah telah menghadirkan Ibu bukan hanya sebagai tetangga dan guru di masa kecil saya, tetapi juga kembali sebagai pembimbing dalam salah satu fase terpenting perjalanan akademik saya hingga saat ini. Bagi saya, ini bukan sekadar kebetulan, melainkan bentuk kasih sayang Allah yang begitu indah. Terima kasih atas segala kesabaran, ketulusan, perhatian, ilmu, arahan, serta waktu yang telah Ibu berikan sejak dulu hingga saat ini. Terima kasih karena telah menjadi bagian dari perjalanan saya dalam belajar, bertumbuh, dan berproses, dari langkah kecil semasa sekolah dasar hingga mampu menyelesaikan karya ini. Terima kasih karena selalu membimbing dengan penuh kelembutan, memberikan masukan yang membangun, serta tetap sabar menghadapi segala kekurangan saya selama proses penelitian dan penulisan skripsi ini. Bagi saya, Ibu bukan hanya seorang dosen pembimbing, tetapi juga sosok pendidik yang jejak kebaikannya telah hadir dalam banyak bagian hidup saya. Semoga setiap ilmu, ketulusan, dan dedikasi yang Ibu berikan menjadi amal jariyah yang tidak pernah terputus, serta Allah membalas seluruh kebaikan Ibu dengan keberkahan, kesehatan, dan kebahagiaan yang berlimpah.
3. Bapak Muhammad Asmuni Hasyim, M.Si. selaku dosen pembimbing bidang keagamaan yang saya hormati. Terima kasih atas segala bimbingan, nasihat, ilmu,

serta arahan yang telah Bapak berikan dengan penuh kesabaran dan ketulusan. Terima kasih karena telah membimbing saya tidak hanya dalam penyusunan bagian keagamaan dalam skripsi ini, tetapi juga dalam memberikan pemahaman, nilai, dan motivasi yang bermakna. Semoga segala ilmu dan kebaikan yang Bapak berikan menjadi amal jariyah yang senantiasa membawa keberkahan.

4. Bapak Basyaruddin, M.Si., selaku laboran yang dengan penuh ketulusan, kesabaran, dan keikhlasan telah membimbing serta mendampingi saya dalam setiap proses penelitian ini. Terima kasih atas segala waktu, tenaga, ilmu, arahan, dan bantuan yang Bapak berikan tanpa lelah, bahkan dalam setiap kesulitan, kebingungan, dan tantangan yang saya hadapi selama penelitian berlangsung. Bapak bukan hanya membantu dalam urusan teknis penelitian, tetapi juga menjadi sosok pembimbing yang dengan sabar menuntun saya untuk terus belajar, memahami, dan menyelesaikan setiap proses dengan baik. Dedikasi, perhatian, dan kesungguhan Bapak dalam membantu setiap langkah perjalanan penelitian ini menjadi bagian yang sangat berarti dan tidak akan saya lupakan. Semoga segala kebaikan, ketulusan, dan ilmu yang telah Bapak berikan menjadi amal baik yang terus mengalir serta mendapatkan balasan terbaik dari Tuhan Yang Maha Esa.
5. Andina Sherlyana Dewi, rekan penelitian sekaligus partner perjuangan terbaik yang telah membersamai saya dari awal hingga akhir proses penelitian ini. Terima kasih karena telah menjadi teman seperjalanan yang begitu sabar, tulus, dan selalu ada di setiap proses panjang yang penuh cerita ini. Terima kasih telah bertahan menghadapi segala dinamika, termasuk menghadapi mood saya dalam berbagai keadaan, tetap membersamai, menguatkan, dan tidak lelah berjalan bersama hingga titik ini. Kehadiranmu bukan hanya sebagai rekan penelitian, tetapi juga sebagai bagian penting dari perjalanan yang penuh pelajaran, tawa, lelah, dan perjuangan. Terima kasih untuk setiap bantuan, kesabaran, pengertian, dan kenangan yang telah diukir bersama. Semoga segala kebaikanmu senantiasa kembali dalam bentuk kebahagiaan, kesuksesan, dan hal-hal indah yang kamu pantas dapatkan.
6. Kepada Sufiana Salsabilla, sahabat terbaikku. Terima kasih karena selalu hadir, bukan hanya di saat bahagia, tetapi justru di titik-titik terendah ketika dunia terasa begitu berat. Terima kasih telah menjadi tempat pulang bagi segala keluh kesah, menjadi pendengar paling sabar untuk setiap cerita yang kadang berantakan, serta menjadi pelukan hangat melalui kata-kata yang selalu menguatkan. Terima kasih karena tidak pernah lelah menampung semua cerita, air mata, kebingungan, bahkan versi terburuk dari diri saya, lalu tetap memilih bertahan di sisi saya. Kehadiranmu bukan sekadar sahabat, tetapi juga rumah yang menenangkan, penguat yang meneguhkan, dan bagian penting yang ikut membantu saya bertahan hingga sampai di titik ini. Sungguh, kebaikan, ketulusan, dan semua hal indah tentangmu akan selalu saya simpan dalam hati.
7. Kepada seluruh rekan saya. Terima kasih atas setiap tawa, dukungan, hiburan, dan kebersamaan yang kalian berikan. Semoga persahabatan, kebaikan, dan kenangan yang kita miliki selalu terjaga, dan semoga segala hal baik yang kalian berikan kembali kepada kalian dalam bentuk kebahagiaan, keberhasilan, dan kehidupan yang penuh berkah.

8. Kepada diri saya sendiri, terima kasih sudah berusaha, bertahan, dan menyelesaikan semua proses ini sampai akhir. Terima kasih karena tetap berjalan meskipun tidak selalu mudah, tetap mencoba meskipun sering merasa lelah, dan tidak memilih menyerah. Perjalanan ini mungkin tidak sempurna, tetapi setiap usaha, waktu, dan proses yang sudah dilalui patut dihargai. Terima kasih karena sudah sampai di titik ini.

PEDOMAN PENULISAN 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.

PENGARUH EKSTRAK KOMBINASI BUNGA TELANG (*Clitoria ternatea*) BIRU DAN BUAH JERUK NIPIS (*Citrus aurantifolia*) TERHADAP JUMLAH SEL SUMSUM TULANG DAN INDEKS ORGAN LIMPA PADA MENCIT (*Mus musculus*) JANTAN

Yolarisa Izzati Khafsah, Fitriyah, Muhammad Asmuni Hasyim

Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

ABSTRAK

Imunomodulator merupakan senyawa yang dapat memengaruhi sistem imun baik sebagai imunostimulan maupun imunosupresan dalam menjaga homeostasis tubuh. Gangguan sistem imun akibat stres oksidatif dan inflamasi dapat memengaruhi fungsi organ imun, termasuk sumsum tulang sebagai pusat hematopoiesis dan limpa sebagai organ limfoid sekunder. Bunga telang biru (*Clitoria ternatea*) dan buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) diketahui mengandung senyawa bioaktif berupa antosianin, flavonoid, dan vitamin C yang berpotensi sebagai imunomodulator alami. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak kombinasi bunga telang biru dan buah jeruk nipis terhadap jumlah sel sumsum tulang dan indeks organ limpa pada mencit (*Mus musculus*) jantan.Penelitian dilakukan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 6 perlakuan dan 4 ulangan menggunakan 24 ekor mencit jantan. Perlakuan terdiri atas kontrol negatif (Na-CMC), kontrol positif (Imboost), serta kombinasi ekstrak dosis 250, 500, 750, dan 1000 mg/kgBB yang diberikan secara oral selama 21 hari. Jumlah sel sumsum tulang dihitung menggunakan hemositometer Neubauer setelah isolasi sel dari femur mencit dan pewarnaan Trypan Blue, sedangkan indeks organ limpa dihitung berdasarkan perbandingan berat limpa terhadap berat badan mencit. Data dianalisis menggunakan uji One-Way ANOVA dan dilanjutkan dengan uji Tukey HSD pada taraf kepercayaan 95%.Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian kombinasi ekstrak bunga telang biru dan buah jeruk nipis berpengaruh nyata ($p<0,05$) terhadap jumlah sel sumsum tulang dan indeks organ limpa mencit jantan. Pada parameter jumlah sel sumsum tulang, dosis 500 mg/kgBB (K4) menunjukkan rata-rata tertinggi di antara kelompok perlakuan ekstrak, sedangkan dosis 250 mg/kgBB (K3), 750 mg/kgBB (K5), dan 1000 mg/kgBB (K6) menunjukkan nilai yang lebih rendah. Pada parameter indeks organ limpa, dosis 750 mg/kgBB (K5) menghasilkan rata-rata tertinggi dan berbeda nyata dibandingkan kelompok perlakuan lainnya. Analisis hasil menunjukkan bahwa peningkatan dosis ekstrak tidak selalu diikuti peningkatan respons biologis. Dosis 500 mg/kgBB merupakan dosis yang paling optimal dalam mendukung jumlah sel sumsum tulang, sedangkan dosis 750 mg/kgBB memberikan respons terbaik terhadap indeks organ limpa. Perbedaan respons tersebut mengindikasikan bahwa kombinasi ekstrak bunga telang biru dan buah jeruk nipis berpotensi sebagai imunomodulator alami melalui mekanisme yang berbeda pada organ hematopoietik dan organ limfoid sekunder.

Kata kunci: bunga telang biru, jeruk nipis, imunomodulator, jumlah sel sumsum tulang, indeks organ limpa, mencit.

THE EFFECT OF COMBINED EXTRACT OF BLUE BUTTERFLY PEA FLOWER (*Clitoria ternatea*) AND LIME FRUIT (*Citrus aurantifolia*) ON BONE MARROW CELL COUNT AND SPLEEN ORGAN INDEX IN MALE MICE (*Mus musculus*)

Yolarisa Izzati Khafsah, Fitriyah, Muhammad Asmuni Hasyim

Biology Program Study, Faculty of Science and Technology, The State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang

ABSTRACT

Immunomodulators are compounds that can influence the immune system either as immunostimulants or immunosuppressants in maintaining body homeostasis. Immune dysfunction caused by oxidative stress and inflammation may affect the function of immune organs, including the bone marrow as the primary site of hematopoiesis and the spleen as a secondary lymphoid organ. Blue butterfly pea flower (*Clitoria ternatea*) and lime fruit (*Citrus aurantifolia*) are known to contain bioactive compounds, including anthocyanins, flavonoids, and vitamin C, which have potential as natural immunomodulators. This study aimed to determine the effect of a combined extract of blue butterfly pea flower and lime fruit on bone marrow cell count and spleen organ index in male mice (*Mus musculus*). The study employed a Completely Randomized Design (CRD) consisting of six treatment groups with four replications using 24 male mice. The treatments included a negative control (Na-CMC), a positive control (Imboost), and combined extract doses of 250, 500, 750, and 1000 mg/kg body weight administered orally for 21 days. Bone marrow cell counts were determined using a Neubauer hemocytometer following cell isolation from the femur and Trypan Blue staining, whereas the spleen organ index was calculated based on the ratio of spleen weight to body weight. Data were analyzed using One-Way ANOVA followed by Tukey's HSD test at a 95% confidence level. The results showed that the administration of the combined extract of blue butterfly pea flower and lime fruit had a significant effect ($p < 0.05$) on bone marrow cell count and spleen organ index in male mice. For the bone marrow cell count parameter, the 500 mg/kg body weight dose (K4) exhibited the highest mean value among all extract-treated groups, whereas the 250 mg/kg body weight (K3), 750 mg/kg body weight (K5), and 1000 mg/kg body weight (K6) doses showed lower values. For the spleen organ index parameter, the 750 mg/kg body weight dose (K5) produced the highest mean value and differed significantly from the other treatment groups. The analysis indicated that increasing the extract dose did not always result in an increased biological response. The 500 mg/kg body weight dose was the most optimal for supporting bone marrow cell count, whereas the 750 mg/kg body weight dose produced the best response in the spleen organ index. These differences suggest that the combined extract of blue butterfly pea flower and lime fruit has potential as a natural immunomodulator through distinct mechanisms acting on hematopoietic organs and secondary lymphoid organs.

Keywords: blue butterfly pea flower, lime fruit, immunomodulator, bone marrow cell count, spleen organ index, mice.

نخاع خلايا عدد على الحامض الليمون وثمار الزرقاء البازلاء لزهرة المركب المستخلص تأثير الفئران ذكور في الطحال عضو ومؤشر العظم

هاشم أسموني ،فطريّة ،خفسة عزتي يولاريسا

برنامج دراسة علم الأحياء، كلية العلوم والتكنولوجيا، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانغ

الملخص

تُعدّ المعدِّلات المناعية مركّبات قادرة على التأثير في الجهاز المناعي سواءً بوصفها منشِّطات مناعية أو مثبِّطات مناعية للمحافظة على الاتزان الحيوي في الجسم. إن اضطرابات الجهاز المناعي الناتجة عن الإجهاد التأكسدي والالتهابات قد تؤثر في وظائف الأعضاء المناعية، بما في ذلك نخاع العظم بوصفه مركز تكوّن الدم، والطحال بوصفه عضوًا لمفيًا ثانويًا. تحتوي على مركبات حيوية فعالة مثل الأنثوسيانين ومن المعروف أن زهرة البازلاء الزرقاء وثمار الليمون الحامض ، والتي تمتلك قدرة محتملة كمعدِّلات مناعية طبيعية. هدفت هذه الدراسة إلى معرفة تأثير C والفلافونويدات وفيتامين المستخلص المركب لزهرة البازلاء الزرقاء وثمار الليمون الحامض على عدد خلايا نخاع العظم ومؤشر عضو الطحال في أُجريت الدراسة باستخدام التصميم العشوائي الكامل مع ست معاملات وأربع مكررات، شملت مجموعة . ذكور الفئران ، ومجموعة الضبط الموجب بالإضافة إلى مجموعات المعالجة بالمستخلص المركب (Na-CMC) الضبط السالب بجرعات 250 و500 و750 و1000 ملغم/كغ من وزن الجسم. أظهرت نتائج التحليل الإحصائي أن إعطاء المستخلص المركب لزهرة البازلاء الزرقاء وثمار الليمون الحامض قد أثّر في عدد خلايا نخاع العظم ومؤشر عضو الطحال لدى ذكور أعلى عدد (K4) ملغم/كغ من وزن الجسم 500 الفئران. وفي معيار عدد خلايا نخاع العظم، أظهرت مجموعة الجرعة من خلايا نخاع العظم مقارنةً بمجموعات المعالجة الأخرى، في حين أظهرت المجموعات ذات الجرعات 250 ملغم/كغ قيماً أقل. أما في معيار مؤشر عضو الطحال، فقد أظهرت (K6) ، و1000 ملغم/كغ(K5) ، و750 ملغم/كغ(K3) أعلى متوسط وكانت مختلفة معنوياً مقارنةً بمجموعات (K5) ملغم/كغ من وزن الجسم 750مجموعة الجرعة المعالجة الأخرى

الكلمات الرئيسية: زهرة البازلاء الزرقاء، الليمون الحامض، المعدِّلات المناعية، نخاع العظم، ا مؤشر الطحال، الفئران

KATA PENGANTAR

Assalamualaiakum Wr. Wb.

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "Pengaruh Ekstrak Kombinasi Bunga Telang (*Clitoria ternatea*) Biru dan Buah Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap Jumlah Sel Sumsum Tulang dan Indeks Organ Limpa pada Mencit (*Mus musculus*) Jantan". Shalawat dan salam senantiasa disampaikan kepada Nabi Muhammad saw. yang telah membawa cahaya Islam ditengah gelapnya masa jahiliyah. Berkat bimbingan dan motivasi dari berbagai pihak, penulis menyampaikan terima kasih khususnya kepada:

1. Prof. Dr. Hj. Ilfi Nurdiana, M.Si., CHARM, CRMP selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. H. Agus Mulyono, S.Pd., M.Kes. selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Prof. Dr. Hj. Retno Susilowati, M.Si. selaku Ketua Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Fitriyah, M.Si dan Muhammad Asmuni Hasyim, M.Si, selaku pembimbing I dan II, yang telah membimbing penulis dengan penuh kesabaran dan keikhlasan dalam meluangkan waktu untuk membimbing penulis sehingga tugas akhir ini dapat terselesaikan.
5. Kholifah Holil, M.Si dan Ns. Wiwik Agustiana, M.Biomed selaku penguji skripsi yang telah memberikan banyak masukan.
6. Prof. Dr. Evika Sandi Savitri, M.P. selaku Dosen wali, yang telah membimbing dan memberikan masukan sehingga penulis dapat menyelesaikan studi dengan baik.
7. Seluruh dosen dan laboran di Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan arahan dan masukan kepada penulis dalam melakukan rencana penelitian.
8. Kedua orang tua dan keluarga tercinta yang telah memberikan doa, penyemangat, dan motivasi kepada penulis**.**
9. Rekan penelitian di Laboratorium dan seluruh teman-teman biologi angkatan 2022.

Semoga segala kebaikan yang telah diberikan oleh berbagai pihak kepada penulis mendapat balasan yang lebih baik dari Allah SWT. Penulis berharap skripsi ini dapat memberikan manfaat, baik bagi diri penulis sendiri maupun bagi para pembaca.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

DAFTAR ISI

LEMBAR PERSETUJUAN ..... Error! Bookmark not defined.
LEMBAR PENGESAHAN..... Error! Bookmark not defined.
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN ..... **vii**
PEDOMAN PENULISAN SKRIPSI..... **viii**
ABSTRAK..... **ix**
ABSTRACT ..... **x**
الملخص..... **xi**
KATA PENGANTAR..... **xii**
DAFTAR ISI ..... **xiii**
DAFTAR GAMBAR..... **xv**
DAFTAR LAMPIRAN ..... **xvi**
BAB I PENDAHULUAN **1**
1.1 Latar Belakang 1
1.2 Rumusan Masalah 9
1.3 Tujuan Penelitian 9
1.4 Manfaat Penelitian 9
1.5 Batasan Masalah 10
BAB II TINJAUAN PUSTAKA **12**
2.1 Sistem Imun ……12
2.1.1 Sistem Imun Bawaan 13
2.1.2 Sistem Imun Adaptif 14
2.2 Sumsum Tulang..... 15
2.2.1 Hematopoiesis pada Sumsum Tulang 16
2.1.2 Faktor yang Mempengaruhi Jumlah Sel Sumsum Tulang 20
2.1.3 Respon Proliferasi Sumsum Tulang terhadap Dosis Senyawa Bioaktif 22
2.3 Limpa..... 24
2.3.1Fungsi Limpa dalam Sistem Imun..... 25
2.3.2Indeks Organ Limpa 26
2.3.3 Respons Limpa terhadap Dosis Senyawa Bioaktif..... 29
2.4 Imunomodulator..... 30
2.4.1 Imunostimulasi 31
2.4.2 Imunosupresi 32
2.5 Bunga Telang (*Clitoria ternatea)* 33
2.5.1 Kandungan Senyawa Aktif Bunga Telang (*Clitoria ternatea)* Biru..... 37
2.5.2 Potensi Senyawa Aktif Bunga Telang Biru *(Clitoria ternatea)* Sebagai Imunomodulator..... 40
2.6 Jeruk Nipis *(Citrus aurantifolia)*..... 45
2.6.1 Kandungan Senyawa Aktif Jeruk Nipis *(Citrus aurantifolia)*..... 47
2.6.2 Potensi Senyawa Aktif Jeruk Nipis *(Citrus aurantifolia)* Sebagai Imunomodulator..... 49
2.7 Mekanisme Imunomodulator Bunga Telang *(Clitoria ternatea)* Biru dan Buah Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia)*..... 52
2.8 Mencit *(Mus musculus)* 55
2.9 Metode Ekstraksi Maserasi..... 58

BAB III METODE PENELITIAN 60
3.1 Rancangan penelitian 60
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian 61
3.3 Alat dan Bahan 61
3.3.1 Alat 61
3.3.2 Bahan 62
3.4 Prosedur Penelitian 62
3.4.1 Persiapan Hewan Coba 62
3.4.1.1 Pembagian Kelompok 63
3.4.2 Pemberian Ekstrak Kombinasi Bunga Telang *(C. ternatea)* Biru dan Buah Jeruk Nipis *(C. aurantifolia)* 63
3.4.2.1 Penentuan Dosis Perlakuan 63
3.4.2.2 Pembuatan Ekstrak Kombinasi Bunga Telang (*C. ternatea*) Biru dan Buah Jeruk Nipis (*C. aurantifolia*) 64
3.4.2.3 Pemberian Kombinasi Ekstrak Bunga Telang (*C. ternatea*) Biru dan Buah Jeruk Nipis (*C. aurantifolia*) 65
3.4.3 Isolasi Sel Sumsum Tulang 66
3.4.4 Isolasi Organ Limpa 67
3.5 Analisis Data 68
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN 69
4.1 Pengaruh Ekstrak Kombinasi Bunga Telang (*C. ternatea*) Biru dan Buah Jeruk Nipis (*C. aurantifolia*) Terhadap Jumlah Sel Sumsum Tulang Pada Mencit (*M. musculus*) Jantan 69
4.2 Pengaruh Ekstrak Kombinasi Bunga Telang (*C. ternatea*) Biru dan Buah Jeruk Nipis (*C. aurantifolia*) Terhadap Indeks Organ Limpa Pada Mencit (*M. musculus*) Jantan 82
BAB V PENUTUP 90
5.1 Kesimpulan 90
5.2 Saran 90
DAFTAR PUSTAKA 92

DAFTAR GAMBAR

Gambar **Halaman**

Gambar 2.1 Tahapan hematopoiesis 18
Gambar 2.2 Histologi sumsum tulang normal pada mencit 20
Gambar 2.3 Histologi limpa normal pada mencit..... 25
Gambar 2.4 Morfologi Bunga Telang. 35
Gambar 2.5 Perubahan Struktur Senyawa Flavonoid (delphinidin-3-glukosida) seiring dengan peningkatan pH. 42
Gambar 2.6 Morfologi Jeruk Nipis..... 47
Gambar 2.7 Mencit. 58
Gambar 4.1 Pengamatan jumlah sel sumsum tulang……70
Gambar 4.3 Rata-rata Jumlah Sel Sumsum Tulang *M. musculus* Jantan..... 72
Gambar 4.4 Rata-rata indeks organ limpa *M.musculus* jantan.. 84

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Analisis Statistik Jumlah Sel Sumsum Tulang Menggunakan SPSS 109
Lampiran 2. Hasil Analisis Statistik Indeks Organ Limpa Menggunakan SPSS 109

BAB I
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Allah telah menciptakan manusia dalam bentuk yang sebaik mungkin, sempurna dan seimbang dengan dilengkapi berbagai sistem, salah satunya adalah sistem imun sehingga yang berperan penting dalam mempertahankan tubuh dari berbagai penyakit. Allah berfirman dalam surah At-Tin (95):4 yang berbunyi:

لَقَدۡ خَلَقۡنَا ٱلۡإِنسَٰنَ فِيٓ أَحۡسَنِ تَقۡوِيمٖ ٤

Artinya: *"sesungguhnya Kami telah menciptakan manusia dalam bentuk yang sebaik-baiknya."*(Q.S. At-Tin (95):4).

Kata أَحۡسَنِ تَقۡوِيمٖ mengandung makna bahwa Allah Swt telah menciptakan makhluk hidup dengan kesempurnaan dan keseimbangan baik secara fisik maupun fungsional (Hadidi, 2016). Menurut Shihab (2002) dalam *Tafsir Al-Mishbah*,frasa tersebut juga menunjukkan bahwa manusia diciptakan dalam bentuk dan susunan paling sempurna dibanding makhluk lainnya, baik dari segi fisik, akal, maupun potensi rohani. Ayat ini secara tersirat menunjukkan bahwa setiap organ tubuh memiliki fungsi yang saling melengkapi dalam menjaga kelangsungan hidup. Salah satu wujud kesempurnaan tersebut tampak pada keberadaan sistem imun yang berfungsi melindungi tubuh dari berbagai agen infeksi dan menjaga kestabilan fisiologis tubuh.

Sistem imun merupakan mekanisme pertahanan kompleks yang berperan penting dalam melindungi tubuh dari beragam patogen (Shantilal *et al*., 2018). Mekanisme ini tidak hanya melibatkan sel dan mediator molekuler, tetapi juga didukung oleh jaringan serta organ-organ imun yang bekerja dalam menjaga

homeostasis tubuh (Huang et al., 2007; Imran, 2023). Dalam menjalankan fungsinya, sistem imun didukung oleh organ limfoid primer dan organ limfoid sekunder (Mccomb *et al*., 2019). Organ limfoid primer berperan dalam pembentukan dan pematangan sel imun, sedangkan organ limfoid sekunder berfungsi sebagai aktivasi serta proliferasi sel imun dalam merespons antigen (Chowdhury *et al*., 2020). Salah satu organ limfoid primer yang memiliki peran utama dalam sistem imun adalah sumsum tulang (Mccomb *et al*., 2019).

Sumsum tulang merupakan pusat hematopoiesis utama yang bertanggung jawab terhadap produksi seluruh komponen sel darah (Lee *et al*., 2020), termasuk eritrosit, leukosit, trombosit, serta berbagai prekursor sel imun melalui proses proliferasi, diferensiasi, dan maturasi sel punca hematopoietik (*hematopoietic stem cells*) yang berlangsung secara kontinu sepanjang kehidupan (Belyasvsky *et al*., 2021). Secara struktural, sumsum tulang tersusun atas komponen hematopoietik dan komponen stroma. Komponen hematopoietik meliputi sel punca hematopoietik, sel progenitor, prekursor eritroid, mieloid, limfoid, serta berbagai sel darah yang sedang berkembang. Sementara itu, komponen stroma terdiri atas sel endotel, fibroblas, osteoblas, adiposit, dan matriks ekstraseluler yang membentuk lingkungan mikro hematopoietik (*hematopoietic niche*) yang berperan dalam mengatur proliferasi, diferensiasi, serta pemeliharaan sel hematopoietik (Pinho *et al*., 2018).

Keberadaan berbagai populasi sel tersebut menjadikan sumsum tulang sebagai indikator penting dalam penelitian imunologi dan imunomodulator. Jumlah sel sumsum tulang yang dihitung tidak merepresentasikan satu jenis sel tertentu, melainkan total populasi sel hematopoietik yang terdiri atas sel punca, sel progenitor,

serta berbagai prekursor sel darah dan sel imun pada berbagai tahap perkembangan (Catlin *et al*., 2011). Oleh karena itu, perubahan jumlah sel sumsum tulang dapat digunakan sebagai indikator biologis untuk mengevaluasi aktivitas hematopoiesis dan respons sumsum tulang terhadap kondisi fisiologis, patologis, maupun paparan senyawa bioaktif tertentu (Lucas, 2021).

Sumsum tulang yang berasal dari femur dan tibia sering digunakan sebagai sumber sel hematopoietik karena kedua tulang tersebut memiliki rongga medula yang luas dengan kepadatan sel hematopoietik yang tinggi (Strober, 2015). Selain menghasilkan jumlah sel yang memadai, femur dan tibia juga menghasilkan suspensi sel yang homogen, serta banyak digunakan sebagai standar dalam penelitian hematologi dan imunologi eksperimental (Tikhonova *et al*., 2019). Oleh karena itu, femur dan tibia dipilih dalam penelitian ini karena mampu merepresentasikan aktivitas hematopoiesis secara optimal dan menghasilkan jumlah sel yang cukup untuk dilakukan perhitungan jumlah sel sumsum tulang.

Selain sumsum tulang, limpa memiliki peran penting sebagai organ limfoid sekunder terbesar yang berfungsi dalam filtrasi antigen dari sirkulasi darah, aktivasi dan proliferasi limfosit, produksi imunoglobulin, serta koordinasi respons imun humoral dan seluler (Kopp, 1990; Corbin & Vicente, 2008). Limpa menjadi salah satu indikator penting dalam studi imunomodulator karena perubahan ukuran atau berat limpa yang dinyatakan dalam indeks organ limpa. Evaluasi terhadap indeks organ limpa dapat digunakan sebagai parameter biologis untuk menilai perubahan respons imun dan aktivitas proliferatif jaringan limfoid karena indeks limpa secara luas digunakan untuk merefleksikan status imunologis, proliferasi jaringan limfoid, serta

kondisi fisiologis maupun patologis sistem imun (Jiang *et al*., 2021). Bégay *et al*. (2022) melaporkan bahwa perubahan ukuran dan indeks limpa berkaitan dengan kapasitas imunologis, aktivitas hematopoietik, dan kompetensi pertahanan biologis sehingga parameter ini dapat memberikan gambaran mengenai kondisi serta keseimbangan sistem imun.

Dalam kondisi tertentu, sistem imun dapat mengalami disregulasi, baik dalam bentuk penurunan respons imun maupun peningkatan respons imun berlebih yang memicu inflamasi kronis (Long *et al*., 2023). Kondisi tersebut dapat dpengaruhi oleh berbagai faktor, termasuk infeksi yang menganggu homeostasis imunologis melalui perubahan respons imun dan metabolisme tubuh (Islam *et al*., 2025), stress oksidatif yang memicu kerusakan seluler, disregulasi jalur inflamasi (Manful *et al*., 2025), paparan toksin yang dapat mengganggu fungsi imun melalui peningkatan *reactive oxygen species* (ROS) (Mokarizadeh *et al*., 2015), serta gangguan metabolik yang berhubungan erat dengan perubahan fungsi dan regulasi sistem imun (Hu *et al*., 2024). Berbagai kondisi tersebut tidak hanya memengaruhi respons imun secara sistemik, tetapi juga dapat mengganggu fungsi organ-organ imun, termasuk sumsum tulang dan limpa.

Gangguan pada sumsum tulang dapat menyebabkan perubahan proses hematopoiesis melalui terganggunya proliferasi, diferensiasi, maupun viabilitas sel hematopoietik sehingga berdampak pada perubahan jumlah sel sumsum tulang (Ho & Méndez-Ferrer, 2020). Sementara itu, perubahan respons imun juga dapat memengaruhi limpa sebagai organ limfoid sekunder yang berperan dalam aktivasi dan proliferasi limfosit. Kondisi tersebut dapat tercermin melalui perubahan ukuran atau

berat limpa yang dinyatakan sebagai indeks organ limpa (Jiang et al., 2021). Oleh karena itu, jumlah sel sumsum tulang dan indeks organ limpa dapat digunakan sebagai parameter biologis untuk mengevaluasi perubahan fungsi hematopoietik dan status imunologis akibat paparan suatu senyawa.

Keterkaitan antara fungsi sumsum tulang dan limpa menunjukkan bahwa keseimbangan sistem imun memerlukan mekanisme pengaturan yang mampu mempertahankan homeostasis imunologis. Salah satu pendekatan yang dapat digunakan adalah melalui pemanfaatan senyawa imunomodulator. Imunomodulator merupakan senyawa yang mampu memodulasi aktivitas sistem imun dengan meningkatkan respons imun pada kondisi imunodefisiensi maupun menekan respons imun yang berlebihan pada kondisi hiperaktivasi imun atau inflamasi kronis (Saxena *et al*., 2012; Iwo, 2024). Dengan demikian, imunomodulator tidak hanya berperan sebagai imunostimulator atau imunosupresan, tetapi juga sebagai imunoregulator yang membantu menjaga keseimbangan sistem imun sesuai kebutuhan fisiologis tubuh (Sahota & Ahmed, 2016; Sharma *et al*., 2024).

Kondisi disregulasi tersebut menunjukkan bahwa sistem imun memerlukan mekanisme pengaturan yang mampu mempertahankan keseimbangan respons imun agar tetap berada dalam kondisi homeostasis (Calder, 2021). Oleh karena itu, diperlukan senyawa imunomodulator yang berperan dalam memodulasi aktivitas sistem imun. Imunomodulator dapat bekerja melalui peningkatan respons imun pada kondisi imunodefisiensi (Iwo, 2024). Sebalikya, imunomodulator juga dapat menekan respons imun berlebih pada kondisi hiperaktivasi imun atau inflamasi kronis (Saxena *et al*., 2012). Dengan demikian, imunomodulator tidak hanya berperan sebagai

imunostimulator, tetapi juga sebagai immunoregulator yang membantu menjaga stabilitas sistem imun sesuai kebutuhan fisiologis tubuh (Sahota & Ahmed, 2016). Kemampuan tersebut menunjukkan bahwa imunomodulator dapat membantu mempertahankan homeostasis sistem imun dengan menyeimbangkan respons imun agar tidak berlangsung secara berlebihan (Sharma *et al*., 2024).

Meskipun imunomodulator sintetis telah banyak digunakan dalam penanganan berbagai gangguan imunologis, penggunaan jangka panjangnya dilaporkan dapat menimbulkan efek samping, seperti gangguan pencernaan, reaksi alergi (Scheinfeld, 2003), demam, ruam (Hassan *et al*., 2015), hingga peningkatan asam urat (You *et al*., 2015). Tingginya risiko efek samping tersebut menjadikan produk alami sebagai alternatif menjanjikan dalam pengembangan imunomodulator. Senyawa yang berasal dari tumbuhan dinilai lebih aman, mudah diperoleh, dan memiliki mekanisme kerja multifaktor yang mendukung keseimbangan sistem imun (Middleton et al., 2009). Tumbuhan diketahui mengandung metabolit sekunder, seperti flavonoid, fenolik, terpenoid, alkaloid, dan vitamin bioaktif yang berpotensi sebagai imunomodulator alami (Indriyani *et al*., 2023).

Berbagai tumbuhan telah diteliti berpotensi sebagai imunomodulator, salah satunya adalah bunga telang (*Clitoria ternatea*) biru dan jeruk nipis *(Citrus aurantifolia)*. Bunga telang biru banyak mendapat perhatian karena kaya akan antosianin, terutama delphinidin dan turunannya seperti ternatin, yang tidak hanya berperan sebagai pigmen pemberi warna biru khas (Kazuma *et al*., 2003), tetapi juga memiliki aktivitas antioksidan, antiinflamasi, dan imunomodulator (Abidin *et al*., 2019). Solanki & Jain (2010) melaporkan bahwa senyawa bioaktif bunga telang

berperan dalam modulasi respons imun melalui penghambatan aktivitas inflamasi, sedangkan Mukherjee *et al*., (2008) menyatakan bahwa kandungan flavonoid, fenolik, dan saponin pada bunga telang turut memperkuat potensi biologisnya

Aktivitas tersebut didukung oleh penelitian Safhi *et al*., (2022) yang menunjukkan bahwa ekstrak bunga telang mampu menurunkan ekspresi sitokin proinflamasi seperti IL-6 dan IL-1β. Paparan inflamasi kronis juga dapat memicu disfungsi hematopoiesis dan mengganggu homeostasis jaringan imun melalui perubahan regulasi hematopoietik dan lingkungan mikro sumsum tulang (Ho & Méndez-Ferrer, 2020). Dengan demikian, kandungan antioksidan dan antiinflamasi bunga telang berpotensi membantu menjaga keseimbangan sistem imun melalui penekanan stres oksidatif dan mediator inflamasi yang dapat mengganggu homeostasis imunologis (Jeyaraj *et al*., 2022).

Selain bunga telang biru, jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) juga berpotensi sebagai imunomodulator karena mengandung flavonoid, minyak esensial, dan vitamin C dalam kadar tinggi (Ramadaini *et al*., 2020). Salah satu komponen utama yang berperan penting dalam sistem imun adalah vitamin C atau asam askorbat, yang dikenal sebagai antioksidan kuat karena mampu melindungi sel dari kerusakan oksidatif akibat *reactive oxygen species* (ROS), sekaligus mendukung aktivitas fagositosis sebagai bagian dari pertahanan imun bawaan (Carr & Maggini, 2017). Pada sistem imun adaptif, vitamin C juga berperan dalam mendukung pematangan, proliferasi, dan viabilitas limfosit T, serta meningkatkan aktivitas sel B dalam produksi antibodi dan fungsi sel *Natural Killer* (NK) dalam pertahanan imun (Mikirova et al., 2012).

Sa'adah et al., (2020) melaporkan bahwa senyawa bioaktif jeruk nipis berperan dalam meningkatkan proliferasi limfosit dan regulasi sitokin imun. Karena proses pembentukan, proliferasi, dan aktivasi sel imun berlangsung melalui keterlibatan organ limfoid primer seperti sumsum tulang sebagai pusat hematopoiesis (Janeway *et al*., 2001), dan organ limfoid sekunder seperti limfa sebagai lokasi utama respons imun terhadap antigen (Lewis, Williams, Eisenbarth, *et al*., 2019), potensi biologis jeruk nipis tersebut menunjukkan perannya dalam mendukung homeostasis sistem imun melalui pengaruh terhadap fungsi hematopoietik dan proliferasi jaringan imun.

Potensi imunomodulator jeruk nipis tersebut dapat menjadi lebih optimal apabila dikombinasikan dengan bunga telang biru yang mengandung berbagai senyawa bioaktif, terutama antosianin (Kazuma *et al*., 2003a). Mukherjee *et al*., (2008) menyatakan bahwa kandungan senyawa aktif pada bunga telang berkontribusi terhadap aktivitas antioksidan dan imunomodulator. Kombinasi kedua bahan ini berpotensi memeberikan efek yang saling mendukung karena vitamin C serta asam organik pada jeruk nipis dapat membantu meningkatkan kestabilan antosianin bunga telang melalui mekanisme kopigmentasi (Lu *et al*., 2021). Kondisi tersebut penting karena kestabilan antosianin berhubungan dengan kemampuan antioksidannya dalam membantu menekan stress oksidatif (Jang & Koh, 2023).

Pengendalian stres oksidatif dan inflamasi berlebih berperan penting dalam menjaga keseimbangan sistem imun serta mendukung fungsi sel imun secara optimal (Carr & Maggini, 2017). Oleh karena itu, kombinasi bunga telang biru dan jeruk nipis diduga dapat memberikan aktivitas imunomodulator yang lebih baik melalui aktivitas antioksidan, antiinflamasi, serta dukungan terhadap proliferasi dan regulasi sel imun

(Sa'adah *et al*., 2020). Potensi tersebut menjadi penting untuk dikaji lebih lanjut karena dapat memberikan pengaruh tidak hanya terhadap respons imun secara umum, tetapi juga terhadap fungsi organ imun seperti sumsum tulang sebagai pusat hematopoiesis dan limfa sebagai organ proliferasi jaringan imun (Janeway *et al*., 2001).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak kombinasi bunga telang (*Clitoria ternatea*) biru dan buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap jumlah sel sumsum tulang pada mencit (*Mus musculus*) jantan?
2. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak kombinasi bunga telang (*Clitoria ternatea*) biru dan buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap indeks organ limpa pada mencit (*Mus musculus*) jantan?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

1. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kombinasi bunga telang (*Clitoria ternatea*) biru dan buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap jumlah sel sumsum tulang pada mencit (*Mus musculus*) jantan.
2. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kombinasi bunga telang (*Clitoria ternatea*) biru dan buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap indeks organ limpa pada mencit (*Mus musculus*) jantan.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah:

1. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan data ilmiah mengenai aktivitas imunomodulator kombinasi ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea*) biru dan buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap jumlah sel sumsum tulang dan indeks organ limpa pada hewan uji, sehingga dapat memperkaya kajian di bidang imunologi dan farmakologi bahan alam.
2. Penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar ilmiah dalam pengembangan kombinasi bunga telang (*Clitoria ternatea*) biru dan buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) sebagai bahan alam yang berpotensi digunakan untuk mendukung fungsi sistem imun, serta menjadi referensi bagi penelitian lanjutan terkait formulasi dan pemanfaatan produk herbal berbasis kombinasi kedua tanaman tersebut.

1.5 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Mencit (*Mus musculus*) jantan yang digunakan dalam penelitian ini tidak diberikan paparan infeksi maupun induksi antigen tertentu.
2. Bunga telang yang digunakan dalam penelitian ini adalah bunga telang biru (*Clitoria ternatea*) yang diperoleh dari Benih Nusantara Farm Blora, sedangkan simplisia jeruk nipis yang digunakan adalah buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yang diperoleh dari Gubuk Herbal Solo.
3. Parameter sumsum tulang dalam penelitian ini terbatas pada perhitungan jumlah sel sumsum tulang yang diperoleh dari femur mencit menggunakan metode perhitungan sel dengan hemositometer/Neubauer chamber, tanpa mengamati aktivitas proliferasi atau diferensiasi sel.

4. Parameter organ limpa dalam penelitian ini terbatas pada pengukuran indeks organ limpa yang dihitung berdasarkan perbandingan berat limpa terhadap berat badan mencit, tanpa dilakukan pemeriksaan histopatologi maupun analisis populasi sel imun lainnya.

BAB II
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sistem Imun

Sistem imun manusia merupakan mekanisme pertahanan yang berperan penting dalam melindungi tubuh dari infeksi. Sistem ini merupakan jaringan kompleks yang terdiri dari sel, jaringan, dan organ yang bekerja sama untuk mengenali dan melawan beragam patogen, termasuk bakteri, virus, jamur, dan parasit (Yoshiura *et al*., 2006; Imran, 2023). Secara umum, sistem imun memiliki dua fungsi utama, yaitu melakukan pengawasan terhadap bahan berbahaya termasuk infektor dan benda asing, serta memberikan pertahanan tubuh terhadap infektor (Iwo, 2024). Respons imun terhadap antigen melibatkan beberapa tahapan, meliputi deteksi dan pengenalan benda asing, komunikasi antar sel, koordinasi respons, serta supresi penginvasi (Fauziah *et al*., 2023).

Dalam mnjalankan fungsinya, sistem imun didukung oleh organ limfoid primer dan sekunder. Organ limfoid primer, seperti sumsum tulang dan timus, berperan dalam pembentukan dan pematangan sel imun, sedangkan organ limfoid sekunder, seperti limpa dan kelenjar getah bening, menjadi tempat aktivasi serta interaksi sel imun dengan antigen (Mccomb *et al*., 2019). Selain organ, sistem imun juga terdiri dari berbagai jenis sel efektor, seperti sel *natural killer* (NK), sel T, sel B-1, sel mast (Uthaisangsook *et al*., 2002), dan sel penyaji antigen (*Antigen prencenting Cell*/APC) (Mccomb *et al*., 2019). Sel-sel ini dapat mengenali dan menghancurkan patogen serta sel yang terinfeksi (Shantilal *et al*., 2018).

Berdasarkan mekanisme kerjanya, sistem imun dibedakan menjadi sistem imun bawaan dan sistem imun adaptif (Fauziah *et al*., 2023). Sistem imun bawaan merupakan lini pertahanan pertama yang bekerja secara cepat dan nonspesifisik, sedangkan sistem imun adaptif bekerja secara spesifik terhadap antigen dan memiliki kemampuan membentuk memori imunologis (Warrington *et al*., 2011).

2.1.1 Sistem Imun Bawaan

Sistem imun bawaan merupakan sistem pertahanan tubuh yang ada sejak lahir dan berfungsi sebagai lini pertahanan pertama tubuh terhadap infeksi. Sistem ini bekerja secara cepat dan nonspesifik untuk mengenali, mencegah, serta menanggapi infeksi yang disebabkan oleh bakteri, virus, dan jamur (Putra, 2024). Mekanisme pertahanan imunitas bawaan terjadi segera, dalam hitungan jam setelah patogen masuk sehingga respons ini tidak memiliki memori imunologis. Secara fungsional, sistem imun bawaan berperan dalam mengaktivasi sel-sel imun melalui produksi sitokin serta menginisiasi respons inflamasi. Sistem ini juga berfungsi dalam membersihkan patogen dan sel yang rusak, serta berperan dalam mengaktvasi sistem imun adaptif melalui proses presentasi antigen (Warrington *et al*., 2011).

Sistem imun bawaan merupakan lini pertahanan pertama tubuh yang terdiri atas dua mekanisme utama. Garis pertahanan pertama bersifat mekanik dan kimiawi, yang berfungsi sebagai barier fisik untuk mencegah masuknya patogen melalui kulit, membran mukosa, serta sekresi seperti air mata, saliva, dan asam lambung. Apabila patogen berhasil menembus barier ini, tubuh akan mengaktifkan garis pertahanan kedua yang melibatkan mekanisme imun bawaan humoral dan seluler. Pertahanan humoral diperantarai oleh substansi antimikroba seperti interferon, sistem komplemen,

protein pengikat besi, dan peptida antimikroba, sedangkan pertahanan seluler melibatkan fagosit, sel *natural killer* (NK), serta respons inflamasi dan demam yang bekerja sinergis dalam menghancurkan patogen (Tate, 2012; Rahadianti *et al*., 2022). Komponen seluler dari sistem imun bawaan meliputi granulosit (sel polimorfonuklear), sel mast, makrofag, dan sel dendritik (Tosi, 2005) yang bertindak cepat dalam mengenali serta menyingkirkan patogen tanpa melibatkan proses memori imunologis (Mccomb *et al.*, 2019).

2.1.2 Sistem Imun Adaptif

Sistem imun adaptif merupakan imunitas spesifik yang memberikan respons terhadap antigen tertentu. Sistem ini akan berkembang ketika sistem imun bawaan tidak mampu mengeliminasi patogen secara efektif. Fungsi utama sistem imun adaptif adalah membentuk jalur efektor imunologis yang secara khusus menargetkan dan mengeliminasi patogen atau sel yang terinfeksi, serta menghasilkan memori imunologis yang memungkinkan respons lebih cepat pada infeksi berulang (Bonilla & Oettgen, 2010).

Respons ini melibatkan interaksi antara sel penyaji antigen (*Antigen precenting cell* / APC) dengan limfosit T dan B yang berperan dalam pembentukan respons imun spesifik. Limfosit T berperan dalam respons imun seluler melalui penghancuran sel yang terinfeksi, sedangkan limfosit B berperan dalam respons humoral melalui produksi antibodi. Proses ini melibatkan regulasi sitokin yang berfungsi dalam komunikasi antar sel imun serta penguatan respons imun (Warrington *et al*., 2011).

Setelah mengalami pematangan di organ limfoid primer (timus dan sumsum tulang), limfosit akan bermigrasi ke organ limfoid sekunder (kelenjar getah bening dan

limpa), untuk berinteraksi dengan antigen (Iwo, 2024). Organ limfoid primer berperan dalam pembentukan dan pematangan sel imun, di mana sumsum tulang menjadi tempat pembentukan sel punca hematopoietik dan maturase limfosit B, sedangkan timus berperan dalam pematangan limfosit T. Sementara itu, organ limfoid sekunder berfungsi sebagai tempat aktivasi limfosit melalui interaksi dengan antigen yang memicu respons imun adaptif (Chowdhury *et al*., 2020). Respons imun adaptif selanjutnya menghasilkan respons humoral dan seluler yang bekerja secara spesifik terhadap antigen (Lewis, Williams, Eisenbarth, *et al*., 2019). Aktivitas sistem imun adaptif ini dapat dipengaruhi oleh berbagai senyawa imunomodulator yang mampu meningkatkan maupun menekan respons imun sesuai kondisi fisiologis tubuh.(Iwo, 2024).

2.2 Sumsum Tulang

Sumsum tulang merupakan jaringan khusus yang berada di dalam rongga tengah tulang panjang seperti femur dan tibia serta tulang pipih seperti sternum dan pelvis. Secara umum, sumsum tulang dapat dikategorikan menjadi dua jenis utama, yaitu sumsum merah dan sumsum kuning (Wawrzyniak & Balawender, 2022). Sumsum merah merupakan tempat utama terjadinya proses produksi sel darah, sedangkan sumsum kuning tersusun atas jaringan adiposa (Belyasvsky *et al*., 2021).

Sebagai organ hematopoietik utama, sumsum tulang memiliki peran penting dalam produksi seluruh sel darah, termasuk eritrosit, leukosit, dan trombosit melalui proses hematopoiesis yang berlangsung secara kontinu sepanajng kehidupan. Proses ini diatur secara ketat oleh interaksi kompleks antara sitokin, faktor pertumbuhan, serta jalur persinyalan seluler (Belyasvsky *et al*., 2021). Hematopoiesis di sumsum tulang

berpusat pada sel punca hematopoietik (*hematopoietic stem cells*/HSC) yang bersifat multipotent dan mampu memperbarui diri. Sel ini berdiferensiasi menjadi sel progenitor yang selanjutnya berkembang menjadi berbagai garis keturunan sel darah, seperti eritropoiesis, myelopoiesis, dan limfopoiesis (Lee *et al*., 2020). Proses ini berlangsung sejak masa janin hingga dewasa dan terus beradaptasi dengan keutuhan fisiologis tubuh (Moreau, 2017).

Selain sebagai pusat hematopoiesis, sumsum tulang juga berfungsi sebagai organ imun sentral yang mendukung perkembangan, diferensiasi, dan pemeliharaan berbagai sel imun (Zhao *et al*., 2012). Limfosit B mengalami maturase di sumsum tulang, sedangkan prekursor limfoist T berasal dari sumsum tulang dan bermigrasi ke timus untuk pematangan lebih lanjut (Wawrzyniak & Balawender, 2022). Secara struktural, sumsum tulang tersusun atas komponen hematopoietik dan stroma yang membentuk mikro lingkungan atau *niche* hematopoietik. Karena perannya sebagai pusat pembentukan sel darah dan perkembangan sel imun, sumsum tulang menjadi salah satu parameter penting dalam menilai efek senyawa imunomodulator (Morrison & Scadden, 2014).

2.2.1 Hematopoiesis pada Sumsum Tulang

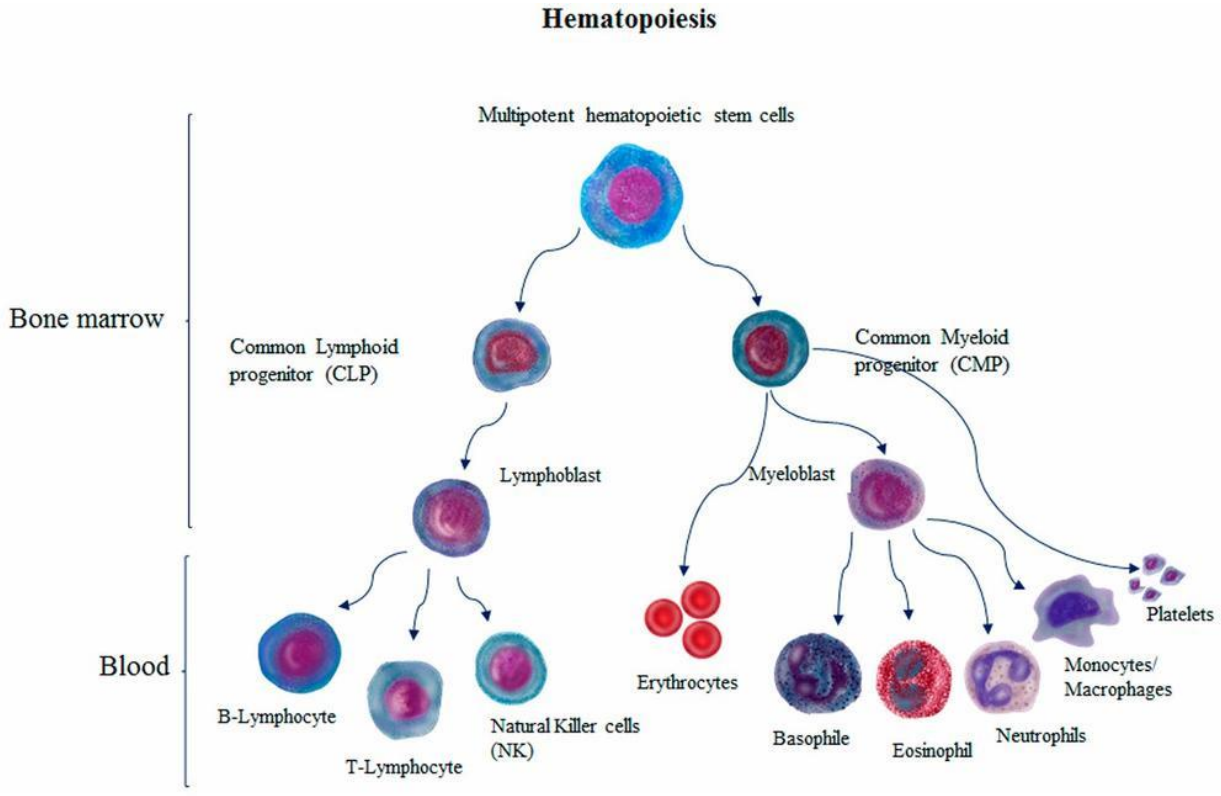
Hematopoiesis merupakan proses pembentukan, proliferasi, diferensiasi, dan maturasi seluruh komponen sel darah yang berlangsung secara kontinu sepanjang kehidupan untuk mempertahankan homeostasis tubuh (Sawai *et al*., 2016). Proses ini berfungsi menggantikan sel-sel darah yang mengalami penuaan, kerusakan, maupun kehilangan akibat proses fisiologis maupun patologis sehingga jumlah dan fungsi sel darah tetap terjaga. Pada mamalia dewasa, hematopoiesis terutama berlangsung di

sumsum tulang merah yang berperan sebagai organ hematopoietik utama dalam menghasilkan eritrosit, leukosit, trombosit, serta berbagai sel imun yang berperan dalam sistem pertahanan tubuh (Lee *et al*., 2020).

Sumsum tulang merah banyak ditemukan pada tulang pipih dan ujung tulang panjang. Pada mencit dewasa, aktivitas hematopoiesis paling aktif terdapat pada rongga medula tulang femur dan tibia karena kedua tulang tersebut mengandung sumsum tulang merah dalam jumlah besar yang kaya akan sel punca hematopoietik dan sel progenitor. Rongga medula menyediakan lingkungan mikro (*hematopoietic niche*) yang mendukung keberlangsungan hematopoiesis melalui interaksi antara sel hematopoietik dengan sel stroma, pembuluh darah, serta berbagai faktor pertumbuhan. Oleh karena itu, femur dan tibia menjadi sumber sumsum tulang yang paling sering digunakan dalam penelitian karena menghasilkan jumlah sel yang tinggi, suspensi sel yang homogen, serta mudah diisolasi tanpa menyebabkan kerusakan sel yang berarti (Strober, 2015; Tikhonova *et al*., 2019).

Proses hematopoiesis diawali oleh *hematopoietic stem cells* (HSC) yang memiliki dua sifat utama, yaitu self-renewal, yaitu kemampuan memperbanyak diri untuk mempertahankan populasi sel punca, serta multipotensi, yaitu kemampuan berdiferensiasi menjadi seluruh jenis sel darah. Pada tahap awal, HSC mengalami proliferasi melalui pembelahan sel sehingga menghasilkan HSC baru dan *multipotent progenitor* (MPP). Berbeda dengan HSC, MPP memiliki kemampuan proliferasi yang tinggi, tetapi kemampuan memperbarui dirinya mulai berkurang sehingga lebih berperan sebagai sel transisi menuju pembentukan berbagai garis keturunan sel darah (Kiel *et al*., 2005).

Tahap berikutnya adalah diferensiasi, yaitu proses ketika MPP berkomitmen menjadi dua garis keturunan utama, yaitu *common myeloid progenitor* (CMP) dan *common lymphoid progenitor* (CLP). CMP akan berkembang menjadi berbagai prekursor mieloid yang kemudian mengalami proliferasi dan diferensiasi lebih lanjut menjadi eritrosit, megakariosit, trombosit, neutrofil, eosinofil, basofil, monosit, makrofag, dan sebagian sel dendritik. Sementara itu, CLP akan berkembang menjadi prekursor limfoid yang menghasilkan limfosit B, limfosit T, dan sel *natural killer* (NK) yang berperan dalam sistem imun bawaan maupun adaptif (Sawai *et al*., 2016; Schürch *et al*., 2021).

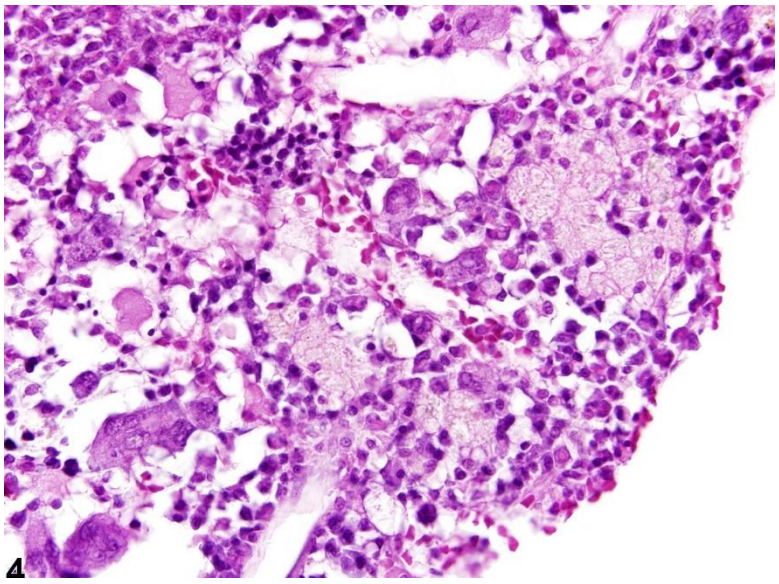


Gambar 2.1 Tahapan hematopoiesis (Sawai *et al*., 2016)

Setelah proses diferensiasi, setiap prekursor sel darah mengalami maturasi, yaitu serangkaian perubahan morfologi, struktur inti, sitoplasma, serta ekspresi molekul permukaan hingga terbentuk sel darah yang matang dan fungsional. Eritrosit mengalami pematangan melalui tahapan eritroblas hingga menjadi retikulosit dan akhirnya eritrosit matur. Granulosit berkembang melalui stadium mieloblas, promielosit, mielosit, metamielosit, *band cell*, hingga granulosit matur. Megakariosit mengalami endomitosis sebelum melepaskan trombosit ke dalam sirkulasi. Limfosit B menyelesaikan proses maturasinya di sumsum tulang, sedangkan prekursor limfosit T bermigrasi menuju timus untuk menjalani pematangan lebih lanjut sebelum dilepaskan ke sirkulasi sebagai limfosit T matur (Zhao *et al*., 2012).

Keberhasilan proses hematopoiesis dipengaruhi oleh berbagai faktor yang bekerja secara sinergis. Faktor intrinsik meliputi regulasi genetik dan faktor transkripsi yang mengendalikan proliferasi serta diferensiasi sel hematopoietik. Sementara itu, faktor ekstrinsik berasal dari lingkungan mikro sumsum tulang (*hematopoietic niche*) yang tersusun atas osteoblas, sel endotel, fibroblas, adiposit, megakariosit, makrofag, serta matriks ekstraseluler. Komponen-komponen tersebut menghasilkan berbagai sitokin dan faktor pertumbuhan, seperti *stem cell factor* (SCF), interleukin (IL), *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF), *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), *erythropoietin* (EPO), dan *thrombopoietin* (TPO) yang berfungsi mengatur pembentukan, proliferasi, diferensiasi, migrasi, dan maturasi sel hematopoietik sehingga keseimbangan produksi sel darah tetap terjaga (Pinho *et al*., 2018; Xu *et al*., 2024).

Pada jaringan sumsum tulang normal, aktivitas hematopoiesis ditandai oleh keberadaan berbagai tahap perkembangan sel hematopoietik yang meliputi eritropoiesis, leukopoiesis, dan trombopoiesis. Kompartemen hematopoietik tersusun padat oleh sel punca, sel progenitor, serta berbagai prekursor eritroid, mieloid, limfoid, dan megakariosit yang tersebar di antara sinusoid dan jaringan stroma (Romaniuk et al., 2016). Oleh karena itu, jumlah sel sumsum tulang dapat digunakan sebagai indikator aktivitas hematopoiesis karena mencerminkan keseluruhan populasi sel hematopoietik pada berbagai tahap perkembangan, mulai dari HSC, sel progenitor, hingga sel-sel prekursor yang sedang mengalami proliferasi, diferensiasi, dan maturasi sebelum dilepaskan menjadi sel darah matur di sirkulasi.



Gambar 2.2 Histologi sumsum tulang normal pada mencit (Xu *et al.*, 2024)

2.1.2 Faktor yang Mempengaruhi Jumlah Sel Sumsum Tulang

Produksi sel darah yang berlangsung secara berkelanjutan sepanjang hidup suatu organisme memerlukan sistem yang diatur secara ketat namun tetap adaptif. Dalam kondisi fisiologis, keseimbagan anatar pembaruan diri dan diferensiasi harus

dikontrol dengan baik untyuk memastikan produksi sel darah matang yang sesuai (Catlin *et al*., 2011). Pengaturan ini penting untuk menjaga proporsi sel eritrosit, mieloid, dan limfoid dalam tubuh. Dalam konsep klasik, sel punca hematopoietik (*hematopoietic stem cells*/HSC) berada di puncak hierarki dan memiliki kemampuan pembaruan diri (Busch *et al*., 2015).

Sel punca hematopoietik (HSC) ditemukan dalam jumlah yang relatif sedikit, dan sebagaian besar berada dalam keadaan tidak aktif dengan frekuensi pembelahan yang sangat rendah. Sebagian besar proses hematopoiesis dalam kondisi normal didukung oleh progenitor multipoten (MPP) yang berada di hilir. HSC dan MPP secara bersama-sama disebut sebagai *hematopoietic stem and progenitor cells* (HSPC), yang berperan dalam mempertahankan produksi sel darah melalui kemampuan pembaruan diri dan diferensiasi yang terkoordinasi (Laurenti & Göttgens, 2018). Selain itu, sinyal inflamasi atau infeksi dapat mengubah nasib HSC, keluaran garis keturunan, serta fungsi sel, sehingga menambah kompleksitas dalam regulasi hematopoiesis (King & Goodell, 2011).

Sel punca hematopoietik berada dalam lingkungan mikro sumsum tulang yang dikenal sebagai *hematopoietic niche*. Niche ini merupakan jaringan multiseluler yang terdiri atas berbagai jenis sel seperti fibroblas, sel endotel, osteoblas, adiposit, dan kondrosit, serta komponen matriks ekstraseluler yang berfungsi untuk mendukung, melindungi, dan mengarahkan aktivitas HSC (Mendelson & Frenette, 2014). Gangguan pada interaksi dalam niche, baik akibat infeksi, penyakit kronis, maupun penuaan, dapat memengaruhi perilaku HSC dan mengubah hasil hematopoiesis (Helbling *et al*., 2019). Berbagai kondisi seperti infeksi, penyakit kronis, kanker, obesitas, dan penuaan

diketahui dapat memodulasi hematopoiesis serta menyebabkan perubahan jangka panjang pada sel hematopoietik (Schultze *et al*., 2019). Perubahan ini seringkali ditandai dengan ketidakseimbangan produksi sel darah, seperti peningkatan produksi sel mieloid (Mitroulis *et al*., 2018). Selain itu, rangsangan inflamasi sistemik juga dapat memperburuk kondisi melalui pembentukan biasa pada garis keturunan mieoloid (Christ *et al*., 2018).

Cedera hematopoietik sumsum tulang juga dapat terjadi akibat berbagai kondisi patologis yang mengganggu produksi dan diferensiasi sel hematopoietik. Mekanisme ini meliputi penuaan, paparan radiasi, induksi bahan kimia, infeksi, peradangan, serta interaksi dengan penyakit non-hematopoietik, yang pada akhirnya dapat menyebabkan mielosupresi dan perubahan komposisi sel. Selain faktor patologis, paparan senyawa bioaktif tertentu juga berpotensi memengaruhi jumlah sel sumsum tulang melalui stimulasi proliferasi, aktivitas antioksidan, maupun efek toksik yang bergantung pada dosis paparan (Long *et al*., 2025).

2.1.3 Respon Proliferasi Sumsum Tulang terhadap Dosis Senyawa Bioaktif

Proliferasi sel sumsum tulang dipengaruhi oleh berbagai faktor internal maupun eksternal, termasuk sitokin, faktor pertumbuhan, lingkungan mikro sumsum tulang, serta tingkat stress oksidatif. Dalam kondisi fisiologis, kadang *reactive oxygen species* (ROS) yang rendah diperlukan sebagai molekuk persinyalan untuk mendukung proliferasi dan diferensiasi *hematopoietic stem cells* (HSC). Namun, peningkatan stress oksidatif berlebih dapat menyebabkan kerusakan DNA, gangguan siklus sel, apotopsis dan penurunan kapasitas regeneratif sumsum tulang. Oleh karena itu, respons

proliferasi sum sum tulang sangat sensitive terhadap berbagai paparan senyawa bioaktif, termasuk yang berasal dari bahan herbal (Jang & Sharkis, 2007).

Respons biologis terhadap paparan suatu senyawa sangat dipengaruhi oleh dosis, yang dapat mengikuti konsep hormesis atau *biphasis dose-response.* Hormesis menjelaskan bahwa dosis rendah hingga sedang dapart memberikan efek stimulative atau protektif melalui aktivasi mekanisme adaptif seperti peningkatan sistem antioksidan, perbaikan DNA, dan stimulasi proliferasi sel (Calabrese, 2018), sedangkan, dosis tinggi cenderung menyebabkan efek penghambatan atau toksisitas (Mattson, 2008). Calabrese (2018) menjelaskan bahwa pola hormesis umunya membentuk kurva *J-shaped* atau *inverted U-shaped*, di mana terdapat rentang dosis optimal yang menghasilkan efek stimulatif maksimum sebelum akhirnya menurun akibat efek toksik. Dalam konteks proliferasi sel sumsum tulang, konsep ini menjadi landasan penting untuk memahami bahwa variasi dosis paparan data menghasilkan respons proliferative yang berbeda, sehingga evaluasi berbagai tingkat dosis diperlukan untuk menentukan rentang dosis optimal suatu senyawa dalam mendukung aktivitas hematopoietik tanpa menimbulkan efek toksik (Calabrese, 2018).

Konsep respons dosis juga sangat penting dalam penelitian senyawa herbal karena senyawa bioaktif seperti flavonoid, antosianin, dan vitamin C memiliki aktivitas biologis yang dipengaruhi oleh konsentrasi paparan (Carr & Maggini, 2017). Pada dosis rendah, senyawa-senyawa tersebut dapat memberikan efek protektif, imunomodukator, dan mendukung aktivitas hematopoietik, termasuk proliferasi sel progenitor sumsum tulang. Namun, pada dosis tinggi, beberapa senyawa antioksidan dapat menunjukkan aktivitas pro-oksidan yang meningkatkan pembentukan ROS,

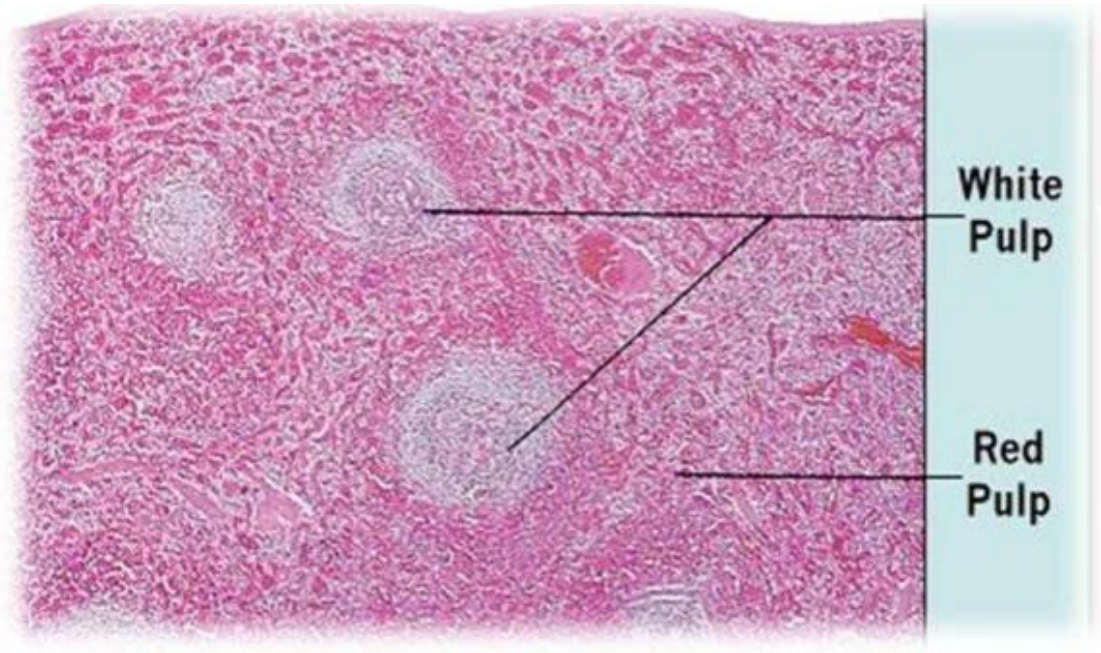
sehingga berpotensi menyebabkan stress oksidatif, gangguan proliferasi sel, hingga efek sitotoksik (Bouayed & Bohn, 2010).

2.3 Limpa

Limpa merupakan organ limfoid sekunder terbesar yang berperan penting dalam sistem imun, khususunya dalam pengawasan imun terhadap patogen yang beredar di dalam darah (Kopp, 1990: Corbin & Vicente, 2008). Secara anatomi dan histologis, limpa tersusun atas dua kompartemen utama, yaitu *red pulp* (RP) dan *white pulp* (WP), dengan morfologi yang dapat bervariasi antarspesies. *Red pulp* (RP) terdiri atas korda, sinus, dan pembuluh darah yang mengandung limfosit, makrofag, eritrosit, serta sejumlah kecil sel plasma. Kompartemen ini berfungsi dalam proses hemokateresis dan pengauran homeostasis besi melalui mekanisme yang membatasi ketersediaaan zat besi bagi patogen. Selain itu, *red pulp* juga merupakan tempat diferensiasi dan migrasi berbagai sel imun, seperti makrofag inflamasi, monosit, granulosit, sel dendritik, sel *natural killer,* dan sel plasma (Mebius *et al*., 2005).

White pulp (WP) merupakan area utama berlangsungnya respons imun adaptif terhadap antigen yang dibawa melalui darah, termasuk diferensiasi sel T dan sel B. *White pulp* (WP) tersusun atas tiga wilayah utama, yaitu *periarteriolar lymphoid sheath* (PALS), folikel limfoid, dan zona marginal (MZ). PALS merupakan daerah yang didominasi limfosit T CD3+ yang mengelilingi arteriola kecil. Di sekitarnya terdapat folikel limfoid yang terutama tersusun atas limfosit B. Folikel limfoid dibedakan menjadi folikel primer dan sekunder, di mana folikel sekunder memiliki pusat germinal yang berisi limfosit proliferatif, makrofag besar, sel dendritik folikuler, dan sejumlah kecil limfosit T. Struktur histologis limpa yang kompleks ini

menunjukkan bahwa limpa tidak hanya berperan sebagai organ limfoid, tetapi juga sebagai pusat integrasi antara sistem sirkulasi darah dan respons imun tubuh (Mebius *et al*., 2005).



Gambar 2.3 Histologi limpa normal pada mencit (Lewis *et al*., 2019)

2.3.1 Fungsi Limpa dalam Sistem Imun

Limpa berperan penting dalam identifikasi dan filtrasi antigen yang beredar di dalam darah, pematangan limfosit B, produksi imunoglobulin, serta respons imun yang dimediasi limfosit, terutama limfosit T-helper (Kopp, 1990: Corbin & Vicente, 2008). *White pulp* (WP) merupakan area utama berlangsungnya respons imun adaptif terhadap antigen yang dibawa melalui darah, termasuk diferensiasi sel T dan sel B. Melalui koordinasi antara PALS, folikel limfoid, dan zona marginal, limfa mampu memfasilitasi pengenalan antigen, aktivasi limfosit, proliferasi sel imun, erta pembentukan respons imun humoral dan seluler (Mebius *et al*., 2005).

Terdapat hubungan positif antara beban parasit atau penyakit dengan peningkatan ukuran limpa pada hewan, yang menandakan adanya aktivasi respons imun (Vincent & Ash, 1978: Corbin & Vicente, 2008). Namun, hubungan ini dapat dipengaruhi oleh faktor biologis seperti jenis kelamin dan usia, yang berkaitan dengan perbedaan kerentanan terhadap infeksi akibat faktor hormonal maupun perilaku terkait seleksi seksual (Moore & Wilson, 2002: Corbin & Vicente, 2008). Perubahan struktur dan ukuran limpa juga sering ditemukan pada berbagai infeksi sistemik yang disebabkan oleh virus, bakteri, maupun parasit (Kyaw *et al*., 2006). Kondisi ini dapat berupa hiperplasia jaringan limfoid atau stroma limpa yang kemudian diikuti atrofi limfoid dan disorganisasi kompartemen limpa pada kondisi infeksi berat atau kronis (Djokic *et al*., 2018). Menurut Hermida *et al.* (2018) perubahan populasi leukosit, khususnya penurunan limfosit T, dapat mengganggu interaksi sel imun yang diperlukan dalam eliminasi patogen. Selain itu, berat limpa juga diketahui dapat bervariasi pada kondisi tertentu seperti perkembangan tumor dan digunakan sebagai prediktor kekambuhan tumor, menunjukkan bahwa limpa memiliki keterkaitan erat dengan aktivitas imun sistemik dan kondisi patologis tubuh secara keseluruhan (Jiang, *et al*., 2021)

2.3.2 Indeks Organ Limpa

Indeks orgam limpa merupakan parameter biologis yang digunakan untuk mengavaluasi perubahan relatif limpa terhadap berat badan sebagai indikator kondisi fisiologis, aktivitas imunologis, proliferasi jaringan limfoid (Jiang *et al*., 2021), serta respons patologis sistemik (Bégay *et al*., 2022). Indeks organ limpa dihitung berdasarkan rasio berat limpa terhadap berat badan (Jiang, *et al*., 2021). Indeks organ

limpa sering digunakan sebagai biomarker untuk menilai modulasi sistem imun, aktivitas hematopoietik, maupun perubahan proliteratif jaringan limpa akibat paparan senyawa bioaktif (Bégay *et al*., 2022).

Limpa merupakan organ limfoid sekunder terbesar yang berperan dalam filtrasi antigen dari sirkulasi darah, aktivasi dan proliferasi limfosit, produksi imunoglobulin, serta koordinasi respons imun humoral dan seluler (Corbin & Vicente, 2008). Secara histologis, limpa tersusun atas pulpa putih (*white pulp*) yang kaya akan limfosit dan berperan dalam respons imun adaptif, serta pulpa merah (*red pulp*) yang berfungsi dalam filtrasi darah dan eliminasi eritrosit tua. Karena fungsinya yang erat berkaitan dengan aktivitas imunologis, perubahan ukuran maupun berat limpa sering digunakan sebagai indikator perubahan status imun dan aktivitas proliferatif jaringan limfoid (Lewis *et al*., 2019).

Perubahan nilai indeks limpa dapat mencerminkan kondisi biologis yang berbeda, di mana peningkatan indeks dapat berhubungan dengan proliferasi sel imun, hiperplasia jaringan limfoid, aktivasi hematopoiesis, atau respons patologis tertentu (Lei *et al*., 2024), sedangkan penurunan indeks dapat mengindikasikan atrofi organ, gangguan proliferasi sel, atau supresi imunologis (Jiang *et al*., 2021).

Bégay *et al*., (2022) melaporkan bahwa ukuran dan indeks limpa dapat bervariasi secara alami pada individu sehat sebagai bagian dari adaptasi fisiologis yang berkaitan dengan kapasitas imunologis dan aktivitas hematopoietik. Limpa yang lebih besar tidak selalu mengindikasikan penyakit, tetapi dapat mencerminkan peningkatan aktivitas jaringan limfoid dan kemampuan pertahanan biologis yang lebih baik. Pada mencit galur BALB/c jantan dewasa, ukuran dan berat limpa dapat bervariasi

bergantung pada umur, kondisi fisiologis, status imunologis, serta lingkungan pemeliharaan. Oleh karena itu, hingga saat ini belum terdapat satu nilai baku universal yang dapat digunakan sebagai batas normal indeks limpa pada semua mencit. Dalam penelitian eksperimental, interpretasi perubahan indeks limpa umumnya dilakukan melalui perbandingan antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol yang berada pada kondisi penelitian yang sama.

Meskipun demikian, peningkatan indeks limpa perlu dibedakan dari splenomegali. Splenomegali merupakan kondisi patologis yang ditandai oleh pembesaran limpa secara berlebihan akibat infeksi, inflamasi kronis, gangguan hematologis, neoplasia, infiltrasi sel abnormal, atau penyakit sistemik lainnya. Kondisi ini umumnya tidak hanya ditandai oleh peningkatan berat limpa, tetapi juga disertai perubahan histopatologis seperti kongesti vaskular, hiperplasia berlebihan, infiltrasi sel inflamasi, disorganisasi pulpa putih dan pulpa merah, serta gangguan fungsi imunologis organ (Lewis *et al*., 2019; Lei *et al*., 2024). Dengan demikian, peningkatan indeks limpa dalam penelitian imunomodulator tidak secara otomatis diinterpretasikan sebagai splenomegali, melainkan dapat mencerminkan peningkatan aktivitas imunologis dan proliferasi jaringan limfoid selama tidak disertai indikasi patologis lainnya (Jiang *et al*., 2021)l.

Pada kondisi paparan stress atau gangguan fisiologis, perubahan indeks organ limpa juga dapat mencerminkan penurunan homeostasis imunologis. Lei *et al*., (2024) menunjukkan bahwa paparan *restraint stress* akut dan kronis pada mencit menyebabkan penurunan ukuran dan berat limpa yang disertai penurunan signifikan *spleen index*, serta perubahan histopatologis berupa disorganisasi *white pulp*, kongesti

red pulp, dan penurunan proliferasi sel limpa. Temuan ini menunjukkan bahwa penurunan indeks limpa dapat berkaitan dengan gangguan kapasitas proliferatif jaringan limfoid, cedera patologis limpa, dan supresi fungsi imun akibat paparan stres berkepanjangan (Lei *et al*., 2024).

2.3.3 Respons Limpa terhadap Dosis Senyawa Bioaktif

Respons limpa terhadap paparan senyawa bioaktif dipengaruhi secara signifikan oleh karakteristik senyawa, tingkat dosis, serta durasi paparan. Sebagai lokasi utama aktivasi, diferensiasi, dan proliferasi sel imun, limpa memiliki sensitivitas tinggi terhadap perubahan lingkungan biologis, termasuk paparan senyawa fitokimia yang dpat memberikan efek imunomodulator, antioksidan, maupun sitotoksik bergantung pada konsentrasi yang diberikan (Corbin & Vicente, 2008).

Respons biologis terhadap senyawa bioaktif umumnya mengikuti konsep hormesis atau *biphasic dose-response*, yaitu suatu pola respons di mana paparan dosis rendah hingga sedang mampu menginduksi efek stimulatif atau protektif melalui aktivasi mekanisme adaptif seluler, seperti peningkatan sistem antioksidan endogen, regulasi inflamasi, dan stimulasi proliferasi sel, sedangkan dosis tinggi berpotensi melampaui kapasitas adaptif biologis sehingga memicu stres oksidatif, kerusakan seluler, dan penurunan fungsi imunologis (Mattson, 2008; Calabrese, 2018). Paparan senyawa bioaktif pada rentang dosis optimal dapat meningkatkan proliferasi limfosit, sedangkan paparan berlebih dapat menyebabkan atrofi limfoid, disorganisasi histoarsitektur limfa, serta supresi imun melalui peningkatam kerusakan oksidatif dan gangguan homeostasis seluler (Lei et al., 2024).

2.4 Imunomodulator

Imunomodulator merupakan senyawa yang berfungsi mengubah aktivitas sistem imun melalui pengaturan dinamis terhadap kerja sel-sel imun. Secara umum, imunomodulator berperan dalam meningkatkan daya tahan tubuh (imunostimulasi) maupun menekan respons imun berlebih (imunosupresi) (Shantilal *et al*., 2018), sehingga membantu mempertahankan homeostasis imun serta mencegah terjadinya gangguan autoimun dan peradangan berlebihan (Kessler *et al*., 2017).

Mekanisme kerja imunomodulator melibatkan interaksi dengan sistem imun untuk meningkatkan atau menurunkan respons imun, baik secara spesifik maupun nonspesifik, melalui mekanisme pertahanan seluler maupun humoral (Johnson *et al*., 2010). Senyawa ini dapat bekerja pada berbagai lokasi dalam sistem imun dan menargetkan beberapa jenis sel dengan mekanisme aksi yang beragam (Saxena *et al*., 2012). Secara fungsional, imunomodulator dapat menekan proses inflamasi dengan menghambat sitokin proinflamasi, mengaktivasi sel T regulator (treg), serta menstimulasi proliferasi sel T dan sel *natural killer* (NK) untuk mningkatkan respons imun (Iwo, 2024).

Efek imunomodulator bersifat tergantung dosis (*dosis-dependent*) dan dapat mengikuti pola *biphasic dose-response* (hormesis), di mana dosis rendah dapat memberikan efek imunostimulasi, sedangkan dosis tinggi dpat menimbulkan efek imunosupresif atau toksik terhadap sel imun (Friedewald *et al*., 2008). Senyawa bioaktif seperti flavonoid, antosianin, dan vitamin C diketahui memiliki aktivitas imunomodulator melalui pengaruh terhadap proliferasi sel imun serta regulasi produksi sitokin (Hosseinzade *et al*., 2019; Carr & Maggini, 2017)

Berdasarkan target kerjanya, imunomodulator terdiri atas imunomodulator spesifik yang bekerja secara selektif terhadap antigen tertentu, serta imunomodulator nonspesifik yang menstimulasi atau menekan respons imun tanpa mengarahkan aktivitas terhadap antigen tertentu. Imunomodulator nonspesifik dibagi menjadi tiga tipe, yaitu tipe I pada sistem imun normal, tipe II pada kondisi imunosupresi, dan tipe III pada keduanya (Lee *et al*., 2010). Sementara itu, berdasarkan sumbernya, imunomodulator dibedakan menjadi sintetik dan alami, di mana imunomodulator alami lebih banyak dikembangkan karena dinilai memiliki efek samping yang lebih rendah dibandingkan imunomodulator sintetik (Daniel *et al*., 2024).

2.4.1 Imunostimulasi

Imunostimulasi adalah substansi (obat atau nutrien) yang dapat meningkatkan kemampuan sistem imun untuk melawan infeksi dan penyakit, dengan meningkatkan aktivitas komponen sistem imun. Dalam konteks imunofarmakologi, imunostimulan termasuk ke dalam kelompok imunomodulator yang berfungsi menginduksi atau memperkuat respons imun tubuh terhadap berbagai gangguan patologis. (Patil *et al*., 2012). Penggunaan imunostimulan diperlukan terutama pada kondisi penyakit, infeksi, kanker, serta penyakit kronis yang berkaitan dengan penurunan fungsi sistem imun (Iwo, 2024). Dengan demikian, imunostimulan berperan penting dalam emningkatkan efektivitas pertahanan tubuh ketika respons imun berada dalam kondisi lemah atau tertekan (Patil *et al*., 2012).

Mekanisme kerja imunostimulan dilakukan dengan menstimulasi aktivasi dan proliferasi sel-sel imun, seperti limfosit T dan sel *natural killer* (NK), serta meningkatkan produksi sitokin dan antibodi tertentu yang berperan dalam respons

imun (Iwo, 2024). Selain itu, imunostimulan juga dapat mengaktifkan berbagai komponen pertahanan imun nonspesifik, seperti meningkatkan aktivitas fagositosis, sistem komplemen dan properdin, produksi imunoglobulin A sekretori (IgA), pelepasan interferon α dan γ, aktivasi limfosit T dan B, pembentukan antibodi spesifik, serta produksi berbagai sitokin immunoregulator (Petrunov *et al*., 2007).

Berdasarkan mekanisme kerjanya, imunostimulator diklasifikasikan menjadi dua kategori utama, yaitu imunostimulator spesifik dan nonspesifik. Imunostimulator spesifik bekerja dengan memberikan spesifisitas antigenik terhadap respons imun, seperti pada vaksin atau antigen tertentu. Sementara itu, imunostimulator nonspesifik bekerja tanpa bergantung pada kekhususan antigen, yaitu dengan meningkatkan respons imun terhadap berbagai antigen lain atau merangsang komponen sistem imun secara umum (Saxena *et al.*, 2012).

2.4.2 Imunosupresi

Imunosupresi merupakan salah satu mekanisme dalam imunomodulasi yang berfungsi menekan aktivitas sistem imun guna mengurangi peradangan serta mencegah kerusakan jaringan akibat respons imun yang berlebihan. Mekanisme ini merupakan bagian dari proses pengaturan sistem imun agar respons kekebalan tubuh tetap berada dalam keseimbangan sesuai kebutuhan fisiologis. Secara umum, imunosupresi dapat terjadi melalui beberapa mekanisme, antara lain dengan menghambat produksi sitokin proinflamasi, menekan aktivasi sel-sel imun, serta menginduksi pembentukan sel T regulator (Treg) yang berperan dalam mengendalikan reaksi imun berlebih (Iwo, 2024).

Secara fisiologis, mekanisme imunosupresif memiliki peran penting dalam induksi toleransi imun, terutama pada kondisi ketika tubuh harus menghindari respons imun terhadap antigen diri sendiri (*self-antigen*) maupun jaringan transplantasi. Proses ini berlangsung melalui induksi anergi atau eliminasi sel imun autoreaktif yang berpotensi menyerang jaringan tubuh sendiri, sehingga membantu mempertahankan toleransi imunologis. Oleh karena itu, imunomodulator dengan mekanisme supresif banyak dimanfaatkan dalam pengendalian penyakit autoimun serta pencegahan reaksi penolakan pada transplantasi organ (Iwo, 2024).

Dalam konteks patologis, imunosupresi juga dapat menggambarkan keadaan defisiensi sistem imun yang bersifat sementara maupun permanen akibat gangguan pada respons imun tubuh. Kondisi ini ditandai dengan terganggunya fungsi sel-sel imun sehingga respons pertahanan tubuh terhadap patogen menjadi menurun (Schat & Skinner, 2014). Keadaan imunosupresi tersebut dapat menyebabkan peningkatan kerentanan terhadap infeksi oleh berbagai patogen oportunistik maupun patogen sekunder lainnya akibat menurunnya efektivitas sistem imun dalam memberikan perlindungan terhadap tubuh (Venet & Monneret, 2018). Dengan demikian, imunosupresi dapat bersifat protektif apabila terjadi secara terkontrol untuk menjaga homeostasis imun dan mengendalikan respons imun berlebih, namun dpat merugikan apabila menurunkan efektivitas pertahanan tubuh sehingga meningkatkan kerentanan terhadap infeksi (Ashok *et al*., 2026).

2.5 Bunga Telang (*Clitoria ternatea)*

Bunga telang (*Clitoria ternatea L*.) umumnya dikenal dengan berbagai nama, seperti bunga teleng (Jawa), *butterfly pea* atau *blue pea* (Inggris), dan *Mazerion Hidi*

(Arab). Tanaman ini berasal dari daerah tropis Asia, termasuk Indonesia, dan telah tersebar luas ke Afrika, Australia, Amerika Utara, Pasifik Utara, hingga Amerika Selatan (The Plant Database). Klasifikasi lengkap bunga telang dalam (The Plant Database) ditunjukkan sebagai berikut:

Kindom : Plantae

Sub Kingdom : Tracheobionta

Super Divisi : Spermatophyta

Divisi : Magnoliophyta

Sub Divisi : Angiospermae

Kelas : Magnoliopsida

Bangsa : Fabales

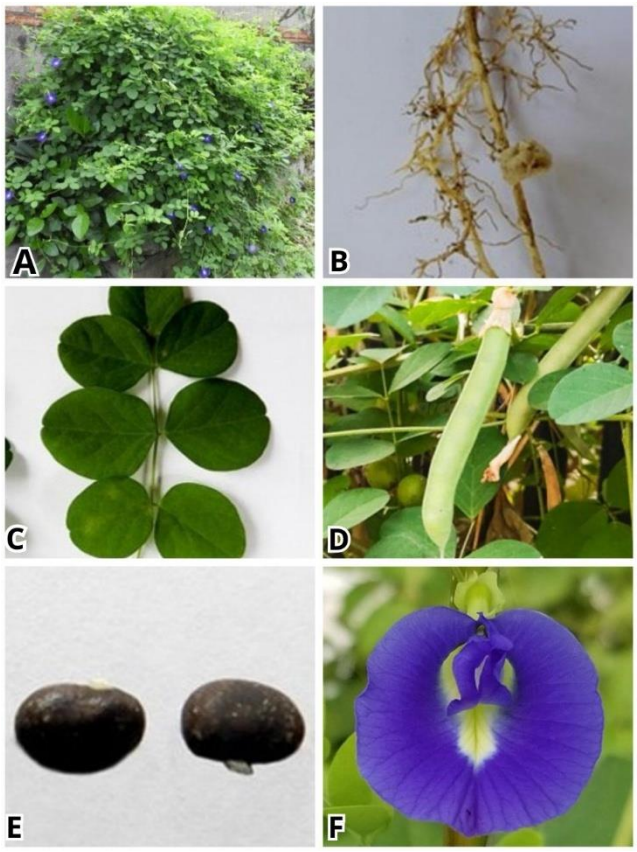
Suku : Fabaceae

Marga : *Clitoria*

Spesies : *Clitoria ternatea*

Organ generatif utama yang menjadi ciri khas spesies ini adalah bunga, yang berbentuk menyerupai kupu-kupu dengan ukuran 4–5 cm dan tumbuh tunggal dari ketiak daun. Morfologi bunga bersifat monosimetris dengan tipe khas Papilionoideae yang terdiri atas lima petal, yakni satu standar (*vexillum*), dua sayap (*alae*), dan dua lunas (*carina*) (Bishoyi & Geetha, 2012). Bunga telang memiliki variasi warna ungu, biru, pink, dan putih, dengan bunga telang biru menjadi salah satu varietas yang paling banyak dimanfaatkan dalam penelitian karena kandungan pigmen alaminya. Pada bunga telang biru, pigmen delphinidin berperan sebagai komponen utama yang menyebabkan warna biru pada kelopaknya (Kazuma *et al*., 2003b).

Warna biru khas pada bunga telang berkaitan dengan kandungan antosianin utama berupa ternatin, yaitu turunan *delphinidin* yang termasuk dalam golongan flavonoid (Kazuma *et al*., 2003b). Ternatin diketahui merupakan komponen pigmen dominan yang memberikan warna biru intens pada kelopak *Clitoria ternatea* serta berkontribusi terhadap aktivitas antioksidan alaminya melalui kemampuan menangkap



Gambar 2.4 Morfologi Bunga Telang (*Clitoria ternatea*) Biru; (A) tanaman, (B) akar, (C) daun (Suarna & Wijaya, 2021), (D) buah, (E) biji (Suarna & Wijaya, 2021), (F) bunga telang biru (Campbell *et al*., 2019).

radikal bebas dan menghambat stres oksidatif. (Chandrajith *et al*., 2021). Senyawa-senyawa tersebut diketahui mampu memodulasi keseimbangan redoks seluler, menekan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS), serta berpotensi mendukung aktivitas imunologis melalui mekanisme imunomodulator (Jeyaraj *et al.*, 2021).

2.5.1 Kandungan Senyawa Aktif Bunga Telang (*Clitoria ternatea)* Biru

Bunga telang biru 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 ٱلَّذِيٓ أَنزَلَ مِنَ ٱلسَّمَآءِ مَآءٗ لَّكُم مِّنۡهُ شَرَابٞ وَمِنۡهُ شَجَرٞ فِيهِ تُسِيمُونَ ١٠ يُنۢبِتُ لَكُم بِهِ ٱلزَّرۡعَ وَٱلزَّيۡتُونَ وَٱلنَّخِيلَ وَٱلۡأَعۡنَٰبَ وَمِن كُلِّ ٱلثَّمَرَٰتِۗ إِنَّ فِي ذَٰلِكَ لَأٓيَةٗ لِّقَوۡمٖ يَتَفَكَّرُونَ ١١

Artinya : *"Dialah, Yang telah menurunkan air hujan dari langit untuk kamu, sebahagiannya menjadi minuman dan sebahagiannya (menyuburkan) tumbuh-tumbuhan, yang pada (tempat tumbuhnya) kamu menggembalakan ternakmu. Dia menumbuhkan bagi kamu dengan air hujan itu tanam-tanaman; zaitun, korma, anggur dan segala macam buah-buahan. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar ada tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang memikirkan"*

Salah satu kata dalam ayat يُنۢبِتُ tesebut yakni memiliki makna yang berarti menumbuhkan. Menurut Shihab (2002) dalam *Tafsir Al-Mishbah*, kata tersebut tidak hanya menunjuk pada proses tumbuhnya tanaman secara fisik, tetapi juga mencerminkan bagaimana Allah Swt menumbuhkan berbagai potensi dan manfaat dalam setiap makhluk ciptaan-Nya. Dengan demikian, pertumbuhan yang dimaksud tidak hanya berupa munculnya batang, daun, atau buah, melainkan juga mencakup penumbuhan nilai guna dan khasiat yang melekat pada setiap jenis tumbuhan. Firman Allah dalam Surah An-Nahl ayat 10-11 menegaskan bahwa setiap tumbuhan memiliki

fungsi, manfaat, dan keunikan tersendiri sebagai tanda kebesaran dan kekuasaan-Nya. Hal ini sejalan dengan keberadaan bunga telang biru yang tidak hanya indah secara morfologis, tetapi juga memiliki kandungan bahan aktif yang berperan penting bagi kesehatan manusia.

Bunga telang biru dikenal sebagai tanaman yang kaya akan senyawa bioaktif, terutama antosianin dan turunannya, yang berperan dalam pewarnaan, aktivitas antioksidan, serta potensi imunomodulator (Budiasih, 2017). Selain senyawa fitokimia, bunga telang juga memiliki kandungan nutrisi berupa lemak, karbohidrat, serat, dan protein masing-masing sebesar 2,5%, 2,2%, 2,1%, dan 0,32%, serta kadar air sebesar 92,4%. Kandungan mineralnya meliputi kalsium (3,09 mg/g), magnesium (2,23 mg/g), kalium (1,25 mg/g), seng (0,59 mg/g), natrium (0,14 mg/g), dan zat besi (0,14 mg/g) (Neda *et a*l., 2013).

Berbagai penelitian menunjukkan bahwa bunga telang mengandung beragam metabolit sekunder penting, terutama pada bagian kelopak bunga, seperti alkaloid, tanin, glikosida, resin, steroid, saponin, flavonoid, dan fenol (Manjula *et al*., 2013). (Kazuma *et al*., 2003a) melaporkan bahwa glikosida flavonol malonilasi berhasil diisolasi dari kelopak bunga telang. Mukherjee *et al*. (2008) juga menyatakan bahwa komponen fenolik bunga telang sebagian besar terdiri atas antosianin jenis ternatin serta berbagai glikosida flavonol seperti kaempferol, rutin, quercetin, dan myricetin yang diisolasi dari ekstrak hidrofilik. Sementara itu, ekstrak lipofilik bunga telang mengandung berbagai asam lemak seperti asam palmitat, asam stearat, asam linoleat, dan asam fitanat, serta fitosterol seperti campesterol, stigmasterol, β-sitosterol, sitostanol, dan tokoferol seperti α-tokoferol serta γ-tokoferol (Tuan *et al*., 2021).

Sebagai sumber polifenol alami, bunga telang memiliki kandungan senyawa fenolik yang beragam, meliputi glikosida flavonol, myricetin, quercetin, kaempferol, asam fenolik, dan antosianin (Tuan *et al*., 2021). Hasil identifikasi senyawa fitokimia terhadap simplisia bunga telang juga menunjukkan hasil positif mengandung flavonoid, tanin, saponin, dan terpenoid (Purwaniati *et al*., 2020). Warna biru khas bunga telang berasal dari pigmen antosianin, khususnya delphinidin, yang merupakan komponen utama pembentuk warna biru pada kelopak bunga (Campbell *et al*., 2019). Bunga telang diketahui sebagai salah satu sumber antosianin poliasilasi stabil, terutama dalam bentuk ternatin A1–A3, B1–B4, C1–C4, dan D1–D3 yang sebagian besar merupakan turunan delphinidin 3,3’,5’-triglukosida (Kazuma *et al.*, 2003a). Stabilitas warna biru tersebut dipengaruhi oleh struktur poliasilasi, keberadaan ion logam, senyawa fenolik lain, serta efek kopigmentasi yang mampu memperkuat intensitas warna (Vidana *et al*., 2021). Purwaniati et al., (2020) melaporkan bahwa kandungan antosianin bunga telang berkisar antara 0,1080–0,1487%.

Komposisi senyawa bioaktif bunga telang secara umum meliputi asam fenolik, stilbenes, flavanol, flavonol, flavanon, antosianin, serta berbagai senyawa bioaktif lain seperti flobatanin, triterpenoid, antrakuinon, minyak volatil, steroid, dan alkaloid (de Morais *et al.*, 2020). Antosianin sendiri merupakan bagian dari kelompok besar senyawa fenolik yang berkontribusi terhadap total kandungan fenolik simplisia bunga telang (Handito *et al*., 2022).

Rentang kandungan senyawa aktif pada bunga telang dapat bervariasi tergantung pada metode ekstraksi, jenis pelarut, kondisi lingkungan tumbuh, tingkat kematangan bunga, serta proses pascapanen yang digunakan (Tuan *et al.*, 2021). Oleh

karena itu, perbedaan konsentrasi flavonoid, antosianin, maupun fenolik total antarpenelitian merupakan hal yang wajar dan mencerminkan pengaruh faktor biologis maupun teknis terhadap komposisi fitokimia bunga telang (Purwaniati *et al*., 2020). Variasi kandungan tersebut menunjukkan bahwa potensi biologis bunga telang tidak hanya ditentukan oleh keberadaan senyawa aktifnya, tetapi juga oleh konsentrasi relatif masing-masing komponen bioaktif. Dominasi flavonoid, antosianin, dan senyawa fenolik inilah yang menjadi dasar penting pemanfaatan bunga telang sebagai kandidat bahan alami dalam penelitian kesehatan, termasuk sebagai imunomodulator (Mukherjee *et a*l., 2008).

2.5.2 Potensi Senyawa Aktif Bunga Telang Biru *(Clitoria ternatea)* Sebagai Imunomodulator

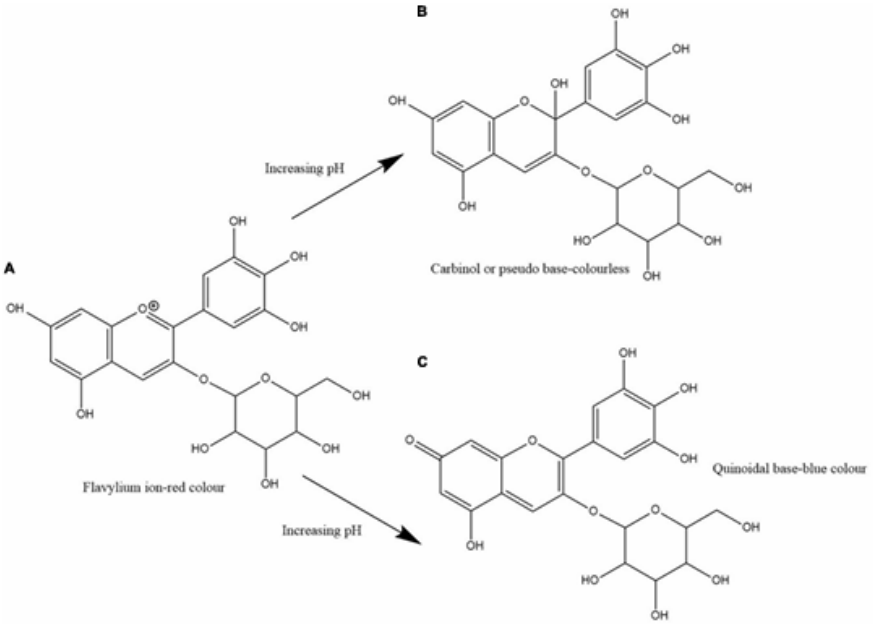
Bunga telang biru dikenal kaya akan senyawa aktif golongan flavonoid, terutama antosianin, yang berperan penting dalam memberikan warna biru khas pada mahkota bunganya sekaligus menyumbang berbagai aktivitas biologis seperti antioksidan, antiinflamasi (Suganya *et al*., 2014), dan imunomodulator (Solanki & Jain, 2010). Kandungan fenolik bunga telang berkorelasi dengan aktivitas antioksidan yang tinggi dan memberikan kontribusi terhadap berbagai efek farmakologis yang menguntungkan (Havananda & Luengwilai, 2019). Warna biru khas bunga telang berasal dari pigmen antosianin, yaitu senyawa dengan ikatan rangkap terkonjugasi yang berfungsi sebagai penghancur dan penangkal radikal bebas alami atau dikenal sebagai antioksidan alami pada manusia (Barrowclough, 2015). Cahyaningsih *et al*., (2019) melaporkan bahwa ekstrak antosianin dalam etanol 80% dari bunga telang

memiliki nilai IC50 sebesar 87,86 ppm, menunjukkan aktivitas antioksidan yang kuat terhadap radikal DPPH.

Antosianin termasuk dalam golongan pigmen alami yang larut dalam air dan tergolong dalam kelompok flavonoid (Liu *et al*., 2020). Secara struktural, antosianin merupakan glikosida turunan polihidroksi dan polimetoksi dari garam 2-fenilbenzopiril yang terdiri atas antosianidin (aglikon) dan residu karbohidrat seperti glukosa, xilosa, galaktosa, arabinosa, ramnosa, atau rutinosa. Residu karbohidrat ini umumnya terikat pada kerangka antosianidin melalui gugus hidroksil C3 pada cincin C (Oancea & Draghici, 2013). Struktur antosianin juga dapat mengalami asilasi dengan asam organik seperti asam p-kumarat, sinapik, galat, ferulat, kafeat, malat, suksinat, oksalat, tartarat, dan asetat (Bakowska-Barczak, 2005). Kompleksitas struktur ini membuat sifat antosianin sangat bergantung pada komposisi dan kondisi larutan serta dapat berinteraksi dengan senyawa lain yang memengaruhi warna dan kestabilannya (Liu *et al*., 2020).

Pada bunga telang biru, antosianin merupakan pigmen utama yang menghasilkan warna biru khas melalui proses biosintesis yang dikatalisis oleh enzim F3′5′H (flavonoid 3′,5′-hydroxylase). Enzim ini berperan penting dalam menambah jumlah gugus hidroksil pada cincin B, sehingga menyebabkan pergeseran warna ke arah biru (Togami *et al*., 2006). Selanjutnya, senyawa dihidromirisetin dikonversi menjadi leukodelphinidin tak berwarna oleh enzim DFR, lalu menjadi delphinidin oleh ANS. Tahap berikutnya melibatkan penambahan gugus glukosil oleh 3GT, pembentukan gugus malonil oleh A6MaT, serta glikosilasi lanjutan oleh UA3′5′GT hingga terbentuk ternatin C5, bentuk dasar kelompok ternatin yang berperan penting

dalam menghasilkan warna biru pada bunga telang (Kazuma *et al*., 2003b). Perubahan warna ini berkaitan dengan perubahan struktur kimia antosianin akibat peningkatan pH (Chandrajith *et al*., 2021), seperti ditunjukkan pada Gambar 13.



Gambar 2.5 Perubahan Struktur Senyawa Flavonoid (delphinidin-3-glukosida) seiring dengan peningkatan pH. Jalur (A-B) menunjukkan transformasi dari bentuk ion flavylium (merah) menjadi bentuk karbinol atau basa semu (tidak berwarna). Jalur (A-C) menunjukkan tranformasi dari bentuk ion flavylium menjadi bentuk basa quinoidal (biru) (Chandrajith *et al*., 2021).

Proses poli-asilasi dengan gugus p-kumaroyl juga berkontribusi terhadap stabilitas warna biru melalui mekanisme kopigmentasi intramolekul antara gugus asil dan kromofor antosianin (Lu *et a*l., 2021).Selain sebagai pigmen alami, antosianin dan flavonoid dalam bunga telang diketahui memiliki aktivitas biologis penting, terutama sebagai antioksidan dan antiinflamasi yang berkontribusi terhadap efek imunomodulator. Struktur kation flavylium antosianin berperan dalam menentukan kapasitas antioksidannya, yang sangat dipengaruhi oleh pH, suhu, dan pelarut (Tena *et*

al., 2020) .Senyawa ini mampu menangkal radikal bebas dan melindungi sel dari stres oksidatif yang menjadi pemicu gangguan sistem imun (Pisoschi & Negulescu, 2012).

Dalam konteks imunomodulator, ekstrak bunga telang diketahui memiliki pengaruh terhadap respons imun humoral dan seluler, dengan kemampuan menurunkan titer antibodi serta menghambat respons hipersensitivitas tipe lambat pada tikus yang disensitisasi SRBC. Efek imunomodulator tersebut diduga disebabkan oleh penurunan sensitisasi dan aktivitas sel imun yang diiringi oleh peningkatan sifat antioksidan dan antiinflamasi dari senyawa bioaktif yang terkandung di dalam bunga telang. Mekanisme imunosupresif ini diduga terkait dengan penghambatan aktivasi makrofag, limfosit B dan T, serta penurunan aktivitas fagositik dan produksi antibodi terhadap antigen SRBC. Penurunan aktivitas fagositik juga berkaitan dengan menurunnya kemampuan neutrofil dan makrofag dalam melakukan adhesi dan fagositosis, serta berkurangnya ekspresi molekul adhesi dan kemokin yang berperan dalam rekrutmen sel imun ke area inflamasi (Solanki & Jain, 2010).

Penelitian lain melaporkan bahwa pemberian ekstrak bunga telang pada tikus dengan *acute kidney injury* (AKI) akibat paparan cisplatin mampu menekan ekspresi gen IL-6, IL-1β, dan caspase-3 yang meningkat akibat induksi cisplatin. Penurunan ekspresi gen tersebut menunjukkan adanya efek protektif dan imunosupresif dari senyawa dalam bunga telang terhadap kerusakan jaringan dan peradangan (Safhi *et al*., 2022). Beberapa penelitian juga melaporkan bahwa kandungan flavonoid dalam ekstrak bunga telang efektif sebagai antiinflamasi (Al-Snafi, 2016; Cahyaningsih, 2019). Secara *in vitro*, aktivitas antiinflamasi ekstrak etanol bunga telang menunjukkan hasil yang setara dengan aspirin (Suganya *et al*., 2014).Efek antiinflamasi tersebut

dipengaruhi oleh kandungan flavonoid dan fenolik yang bekerja dengan menghambat pelepasan sitokin proinflamasi (Ginwala *et al*., 2019), yang menekan aktivitas jalur *nuclear factor kappa-B* (NF-κB) dan *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) (Nair *et al*., 2015), serta menghambat enzim siklooksigenase (COX) dan metabolisme asam arakidonat yang berperan penting dalam pembentukan prostaglandin (Siswati *et al*., 2021).

Secara klinis, pemberian oral ekstrak bunga telang dengan dosis 2 gram per hari terbukti menurunkan kadar IL-6 dan TNF-α pada pria obesitas setelah konsumsi makanan tinggi lemak (Thilavech *et al.*, 2021), serta menurunkan kadar IL-6 secara signifikan pada pasien kusta dengan reaksi reversal (Audina *et al*., 2023). Penelitian terhadap mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* juga menunjukkan bahwa infusa bunga telang mampu meningkatkan jumlah sel neutrofil dan limfosit secara signifikan, terutama pada dosis tertinggi (1 ml/20 g BB), yang menandakan adanya aktivitas imunostimulator untuk memperkuat respons seluler terhadap infeksi (Destiawan *et al*., 2024).

Lebih lanjut, antosianin dan ternatin sebagai senyawa utama dalam bunga telang dilaporkan memiliki aktivitas imunoregulator terhadap infeksi SARS-CoV-2 melalui mekanisme penghambatan pengikatan protein spike virus pada reseptor ACE2, penurunan produksi TNF-α, IL-1β, dan IL-6, serta peningkatan sekresi sitokin antiinflamasi IL-10 (Nugraha *et al*., 2021). Mekanisme ini memperkuat potensi antosianin tidak hanya sebagai pigmen pewarna alami, tetapi juga sebagai agen imunomodulator alami yang membantu menjaga keseimbangan dan kestabilan sistem imun tubuh.

2.6 Jeruk Nipis *(Citrus aurantifolia)*

Jeruk merupakan buah yang banyak dikonsumsi karena kandungan nutrisinya yang melimpah dan bermanfaat bagi kesehatan tubuh (Wang *et al.*, 2014). Di antara berbagai jenis jeruk, jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) merupakan salah satu yang paling banyak dimanfaatkan, baik sebagai bahan pangan, minuman, kosmetik, maupun obat tradisional (Swandiny *et al.*, 2021). Tanaman ini termasuk ke dalam famili Rutaceae (Mohammed & Ayoub, 2016), serta telah dibudidayakan secara luas di berbagai negara beriklim tropis dan subtropis, khususunya di wilayah Asia Tenggara (Phucharoenrak *et al*., 2022). Selain digunakan sebagai bumbu masakan, jeruk nipis juga memiliki nilai ekonomi dan kesehatan yang tinggi karena mengandung vitamin C dalam jumlah besar, mampu memenuhi hingga 50% kebutuhan harian tubuh (Socfindoconservation, 2024).Klasifikasi lengkap jeruk nipis dalam (POWO, 2024) ditunjukkan sebagai berikut:

Kindom : Plantae

Sub Kingdom : Tracheobionta

Super Divisi : Spermatophyta

Divisi : Magnoliophyta

Sub Divisi : Angiospermae

Kelas : Magnoliopsida

Bangsa : Sapindales

Suku : Rutaceae

Marga : *Citrus*

Spesies : *Citrus aurantifolia*

Secara morfologi, *C. aurantifolia* merupakan tanaman perdu kecil yang dapat tumbuh hingga 3–6 meter dengan banyak cabang dan duri tidak beraturan. Kulit batangnya halus berwarna cokelat hingga abu-abu (Weimer *et al*., 2021). Batangnya berkayu keras dan ulet, berwarna hijau saat muda dan berubah menjadi putih kecokelatan hingga cokelat ketika tua. Bunganya berbentuk bintang, berwarna putih, berukuran kecil, berbau harum, dan tumbuh dalam malai dari ketiak daun (Haryadi, 2018). Daunnya berukuran kecil, berbentuk oval dengan tangkai daun bersayap sempit. Permukaan atas daun berwarna hijau mengilap, sedangkan bagian bawahnya hijau muda. Saat diremukkan, daun mengeluarkan aroma khas yang kuat (Weimer *et al*., 2021). Buah jeruk nipis berbentuk bulat hingga lonjong dengan diameter sekitar 3–5 cm, berwarna hijau ketika muda dan berubah menjadi kekuningan saat matang. Kulit buahnya tipis, bertekstur halus, kaya akan minyak atsiri, dan memiliki biji berwarna putih berukuran sekitar 1 cm (Haryadi, 2018).



Gambar 2.6 Morfologi Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*); (A) ilustrasi tanaman (Sharul, 2021), (B) daun (Septiana *et al*., 2024), (C) bunga, (D) buah (Ramadaini *et al*., 2020).

2.6.1 Kandungan Senyawa Aktif Jeruk Nipis *(Citrus aurantifolia)*

Jeruk Nipis *(Citrus aurantifolia)* merupakan salah satu ciptaan Allah Swt yang mengandung berbagai senyawa bioaktif dengan manfaat penting bagi kesehatan. Salah satu potensi utamanya adalah sebagai agen imunomodulator yang dapat membantu menjaga keseimbangan sistem imun tubuh (Sa'adah *et al*., 2020). Secara tradisional, jeruk nipis telah banyak dimanfaatkan dalam pengobatan herbal (Swandiny *et al*., 2021), di mana hampir seluruh bagian tanamannya mulai dari daun, batang, akar, rimpang, bunga, buah, hingga bijinya diketahui memiliki khasiat farmakologis. Hal ini sejalan dengan firman Allah Swt. dalam surah *Asy-syu'ara* (26) ayat 7:

أَوَ لَمۡ يَرَوۡاْ إِلَى ٱلۡأَرۡضِ كَمۡ أَنۢبَتۡنَا فِيهَا مِن كُلِّ زَوۡجٖ كَرِيمٍ ٧

Artinya: *"Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, betapa banyak kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam (tumbuh-tumbuhan) yang baik lagi bermanfaat"*

Ayat tersebut menunjukkan bahwa Allah Swt. telah menciptakan berbagai jenis tumbuhan yang memiliki manfaat besar bagi makhluk hidup. Hal ini menjadi bukti kekuasaan-Nya yang luar biasa dalam menyediakan sumber kehidupan. Kata-kata dalam ayat ini menggambarkan keluasan pandangan manusia terhadap keanekaragaman tumbuhan di bumi. Kata كَرِيمٍ memiliki makna "baik". Kata ini dapat digunakan untuk mendeskripsikan sesuatu yang baik, seperti tumbuhan. Tumbuhan baik ini berarti tumbuhan yang memiliki segudang manfaat, salah satunya sebagai obat tradisional (Shihab, 2000).

Berbagai penelitian menunjukkan bahwa aktivitas biologis jeruk nipis erat kaitannya dengan keberadaan metabolit sekunder seperti alkaloid, kumarin, flavonoid (Al Namani *et al*., 2018), karotenoid, fenolik, terpen, limonoid, dan minyak esensial (Ramadaini *et al*., 2020). Kandungan metabolit sekunder ini dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti sifat fisikokimia, komposisi tanah, paparan sinar matahari, koordinat geografis (Loizzo i., 2012), serta bagian tanaman yang digunakan (Czech *et al*., 2021).

Secara fitokimia, jeruk nipis mengandung berbagai zat aktif yang berperan penting, antara lain flavonoid seperti apigenin, hesperetin, kaempferol, nobiletin, quercetin, dan rutin (Loizzo *et al*., 2012), flavon (Piccinelli *et al*., 2008), flavonol

(Peterson *et al*., 2006), naringenin (Poulose *et al*., 2005). Spadaro *et al*., (2012) melaporkan minyak atsiri buah jeruk yang terdiri atas limonene (59%), β-pinene (16%), γ-terpinene (9%), dan citral (5%). Costa *et al.* (2014) juga melaporkan komposisi serupa dengan limonene (54%), γ-terpinene (17%), β-pinene (13%), terpinolene (1%), α-terpineol (0,5%), dan citral (3%).

Lebih lanjut, Okwu & Emenike (2013) melaporkan bahwa jeruk nipis mengandung alkaloid (0,4 mg), flavonoid (0,6 mg), fenol (0,4 mg), tanin (0,04 mg), asam askorbat (62 mg), riboflavin (0,1 mg), tiamin (0,2 mg), dan niasin (0,5 mg) per 100 g jeruk. Jeruk nipis juga mengandung protein kasar (18%), serat kasar (8%), karbohidrat (78%), lemak kasar (1%), air (6%), abu (8%), dan energi pangan (363 g/kal) dari buah segar, serta mineral penting seperti kalsium (3%), fosfor (0,4%), kalium (1%), magnesium (0,6%), dan natrium (0,4%). Keberadaan vitamin, mineral, flavonoid, limonoid, dan minyak atsiri tersebut menunjukkan bahwa jeruk nipis merupakan sumber senyawa bioaktif kompleks yang berpotensi besar dalam pengembangan penelitian kesehatan (Okwu & Emenike, 2013).

2.6.2 Potensi Senyawa Aktif Jeruk Nipis *(Citrus aurantifolia)* Sebagai Imunomodulator

Jeruk nipis diketahui mengandung berbagai senyawa bioaktif yang berperan penting dalam menjaga kesehatan tubuh (Izah *et al*., 2024). Secara umum, jeruk nipis memiliki potensi besar sebagai imunomodulator karena senyawa bioaktif di dalamnya dapat menstimulasi maupun menekan aktivitas sistem imun sesuai kebutuhan tubuh, salah satunya flavonoid. Flavonoid merupakan salah satu senyawa utama dalam jeruk nipis yang berfungsi sebagai imunostimulan dengan cara meningkatkan aktivitas

fagositosis, oksidatif neutrofil, serta sitotoksisitas sel imun (Sa'adah *et al.*, 2020). Efek imunomodulator juga ditemukan pada jus jeruk nipis yang diduga berasal dari komponen protein yang mampu memengaruhi sistem kekebalan tubuh (Gharagoz, 2001; Meisyayati *et al*., 2016).

Penelitian pada genus yang sama, seperti *Citrus limon*, menunjukkan bahwa ekstrak lemon memiliki kemampuan imunostimulan dengan meningkatkan aktivitas makrofag yang dipengaruhi oleh flavonoid (Ramadhan, 2018). Flavonoid berperan dalam memengaruhi proliferasi limfosit sehingga sel Th1 teraktivasi dan memicu pembentukan Specific Macrophage Activating Factor (SMAF). Molekul SMAF seperti IFN-γ akan mengaktifkan makrofag sehingga meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag M1. Selain itu, flavonoid diketahui dapat mengaktivasi sel Natural Killer (sel NK) dalam merangsang sintesis IFN-γ (Susilo et al., 2013; Kirana *et al*., 2023).

Selain daging buahnya, kulit jeruk nipis juga mengandung senyawa flavonoid seperti hesperidin yang berperan penting dalam modulasi sistem imun. Flavonoid tersebut diketahui mampu meningkatkan jumlah limfosit T, menurunkan proporsi sel B, dan meningkatkan produksi IFN-γ, yang menandakan adanya efek imunostimulan (Erjon *et al*., 2022). Selain itu, minyak esensial dalam kulit jeruk nipis, yang kaya akan limonene, citral, dan linalool, dilaporkan dapat meningkatkan viabilitas sel B, menginduksi apoptosis pada sel abnormal, menghambat sekresi sitokin proinflamasi, serta meningkatkan sekresi IL-10 yang bersifat antiinflamasi (Valdivieso-Ugarte *et al*., 2019).

Kombinasi senyawa aktif jeruk nipis terutama flavonoid, minyak esensial, dan vitamin C berperan penting dalam pengaturan respons imun dan peradangan. Senyawa-

senyawa ini mampu menekan produksi sitokin proinflamasi seperti TNF-α, IL-1β, dan IL-6 melalui penghambatan jalur pensinyalan NF-κB (Campanati *et al*., 2021). Vitamin C, sebagai komponen bioaktif utama dalam jeruk nipis, berperan meningkatkan jumlah dan aktivitas sel darah putih, termasuk monosit, neutrofil, dan eosinofil, yang berfungsi sebagai lini pertahanan tubuh terhadap infeksi (Adebiyi *et al*., 2025). Dalam konteks imunologi, vitamin C memiliki peran penting dalam menjaga fungsi sistem imun bawaan maupun adaptif (Calder *et al*., 2020). Sel darah putih seperti neutrofil dan monosit mampu mengakumulasi vitamin C hingga 100 kali lebih tinggi dibandingkan kadar dalam plasma, menunjukkan bahwa vitamin ini sangat dibutuhkan untuk mendukung fungsi leukosit (Hemilä, 2017). Sebagai antioksidan kuat, asam askorbat menetralisir radikal bebas dan mendukung fungsi leukosit melalui peningkatan kemotaksis, fagositosis, serta penghancuran mikroba (Kim *et al*., 2012).

Dalam sistem imun adaptif, vitamin C berperan penting dalam pematangan dan proliferasi sel T serta meningkatkan aktivitas sel B dalam pembentukan antibodi (Mikirova *et al*., 2012). Selain itu, vitamin ini mampu menyeimbangkan kadar sitokin untuk mencegah hiperaktivitas sistem imun (Jeng *et al*., 1996). Penelitian terbaru juga menunjukkan bahwa asam askorbat mampu menghambat aktivasi dan diferensiasi sel B menjadi sel plasma melalui penghambatan fosforilasi STAT3, sehingga menekan ekspresi gen PRDM1 dan IRF4 yang berperan dalam pembentukan sel plasma dan produksi antibodi patogen (Yin & Wu, 2024).

Defisiensi asam askorbat dapat menurunkan aktivitas sitotoksik sel NK, sedangkan suplementasi vitamin C dosis fisiologis dapat meningkatkan produksi IFN-γ serta fungsi efektor sel NK terhadap sel kanker (Kim *et al*., 2012). Schmidt *et al*.,

(2022) juga menemukan bahwa pemberian vitamin C dosis tinggi mampu menekan produksi sitokin proinflamasi seperti IL-1β, IL-6, IL-8, dan TNF-α pada monosit yang dirangsang oleh LPS atau LTA, sehingga mencegah kerusakan jaringan akibat hiperaktivasi imun.

2.7 Mekanisme Imunomodulator Bunga Telang *(Clitoria ternatea)* Biru dan Buah Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia)*

Bunga telang biru mengandung antosianin utama berupa delphinidin dan ternatin yang termasuk golongan flavonoid dengan aktivitas antioksidan tinggi (Kazuma *et al*., 2003b). Antosianin dan flavonoid bunga telang mampu menangkap *reactive oxygen species* (ROS) serta menekan stres oksidatif seluler yang dapat merusak DNA, protein, dan membran sel (Cahyaningsih *et al*., 2019). Penekanan stres oksidatif penting dalam menjaga stabilitas lingkungan mikro sumsum tulang (*hematopoietic niche*), karena keseimbangan redoks berperan besar dalam viabilitas, proliferasi, dan diferensiasi *hematopoietic stem cells*/HSC. Dengan berkurangnya stres oksidatif, proliferasi sel progenitor hematopoietik di sumsum tulang dapat berlangsung lebih optimal sehingga berpotensi meningkatkan jumlah sel sumsum tulang (Jang & Sharkis, 2007).

Selain aktivitas antioksidan, ekstrak bunga telang juga menunjukkan aktivitas antiinflamasi melalui penurunan ekspresi sitokin proinflamasi seperti IL-6, IL-1β, TNF-α, dan caspase-3 (Safhi *et al*., 2022). Penekanan sitokin proinflamasi tersebut berperan dalam mengurangi inflamasi sistemik yang dapat menghambat hematopoiesis normal (King & Goodell, 2011). Flavonoid bunga telang juga diketahui mampu memodulasi jalur *nuclear factor kappa-B* (NF-κB) dan *mitogen-activated protein*

kinase (MAPK), sehingga menekan produksi mediator inflamasi berlebih (Nair *et al*., 2015). Melalui mekanisme ini, bunga telang berpotensi mempertahankan proliferasi sel sumsum tulang sekaligus melindungi organ limfoid dari kerusakan akibat inflamasi kronis (Safhi *et al*., 2022).

Bunga telang juga memiliki efek imunomodulator terhadap respons imun humoral dan seluler melalui regulasi aktivitas limfosit dan makrofag (Solanki & Jain, 2010). Regulasi tersebut dapat memengaruhi proliferasi sel imun pada organ limfoid sekunder seperti limpa, yang tercermin melalui perubahan indeks organ limfa (Corbin & Vicente, 2008). Aktivitas imunostimulator pada dosis tertentu dapat meningkatkan proliferasi limfosit dan aktivitas jaringan limfoid, sedangkan dosis lebih tinggi dapat menimbulkan efek imunosupresif sesuai konsep *biphasic dose-response* atau hormesis (Calabrese, 2018). Oleh karena itu, perubahan indeks limfa dapat menggambarkan tingkat stimulasi atau supresi sistem imun akibat paparan ekstrak bunga telang (Lei *et al*., 2024).

Jeruk nipis mengandung vitamin C, flavonoid seperti hesperidin, quercetin, dan naringenin, serta minyak atsiri yang berperan sebagai antioksidan dan imunomodulator (Ramadaini *et al*., 2020). Vitamin C merupakan antioksidan kuat yang melindungi leukosit dari kerusakan oksidatif, meningkatkan kemotaksis neutrofil, fagositosis, dan aktivitas antimikroba (Carr & Maggini, 2017). Vitamin C juga mendukung proliferasi dan diferensiasi limfosit T dan B, serta meningkatkan fungsi sel *Natural Killer*/NK dalam respons imun adaptif dan bawaan (Mikirova *et al.*, 2012). Dukungan terhadap proliferasi sel imun ini berkontribusi terhadap homeostasis sistem imun dan berpotensi

mendukung stabilitas hematopoiesis melalui perlindungan terhadap lingkungan sumsum tulang (Carr & Maggini, 2017).

Flavonoid jeruk nipis diketahui mampu meningkatkan proliferasi limfosit, aktivasi sel T helper (Th1), serta produksi IFN-γ yang berperan dalam aktivasi makrofag dan penguatan respons imun seluler. Aktivasi makrofag dan peningkatan IFN-γ berkontribusi terhadap regulasi interaksi imun-hematopoietik yang dapat mendukung fungsi sumsum tulang selama pembentukan sel imun (King & Goodell, 2011). Selain itu, hesperidin dan flavonoid sitrus lainnya juga berperan dalam menekan sitokin proinflamasi seperti TNF-α, IL-6, dan IL-1β melalui penghambatan jalur NF-κB (Campanati *et al*., 2021). Penurunan inflamasi ini penting untuk menjaga integritas jaringan limfa dan mendukung proliferasi limfoid yang sehat (Jiang *et al*., 2021).

Limfa merupakan organ limfoid sekunder yang berfungsi dalam proliferasi, diferensiasi, dan aktivasi limfosit sebagai bagian dari respons imun sistemik (Mebius *et al*., 2005). Indeks organ limfa digunakan sebagai indikator biologis untuk menilai perubahan ukuran relatif limpa terhadap berat badan akibat stimulasi atau supresi imunologis (Jiang *et al*., 2021). Senyawa antosianin, flavonoid, dan vitamin C dari bunga telang dan jeruk nipis berpotensi meningkatkan indeks limfa melalui stimulasi proliferasi limfosit, perlindungan antioksidan jaringan limfoid, dan modulasi sitokin (Calder *et al*., 2020). Sebaliknya, jika dosis terlalu tinggi dan memicu efek hormesis, indeks limfa dapat menurun akibat penekanan proliferasi jaringan imun (Calabrese, 2018).

Kombinasi bunga telang dan jeruk nipis berpotensi memberikan efek sinergis karena antosianin bunga telang dapat distabilkan oleh kondisi asam dari asam sitrat dan

vitamin C jeruk nipis, sehingga meningkatkan kestabilan senyawa bioaktif dan kapasitas antioksidan total (Saprian & Nurmiyanto, 2014). Sinergi antioksidan ini dapat memperkuat perlindungan terhadap sumsum tulang dari stres oksidatif, mendukung proliferasi sel hematopoietik, serta mempertahankan homeostasis jaringan limfoid (Lu *et al*., 2021). Dengan demikian, kombinasi kedua ekstrak berpotensi memengaruhi jumlah sel sumsum tulang dan indeks organ limfa melalui mekanisme perlindungan redoks, modulasi inflamasi, proliferasi sel imun, dan regulasi hematopoiesis yang bergantung pada dosis pemberian (Calabrese, 2018).

2.8 Mencit *(Mus musculus)*

Mencit *(Mus musculus)* merupakan salah satu spesies mamalia yang paling luas persebarannya di dunia (Musser *et al*., 2021). Spesies ini umumnya hidup pada habitat komensal yang dekat dengan manusia (Singleton *et al*., 2005), namun seringkali juga ditemukan pada lahan petanian, dan habitat alami dengan sedikit intervensi manusia (Mcallan et al., 2008). Klasifikasi lengkap mencit *(M. musculus)* dalam (Musser e*t al*., 2021) ditunjukkan sebagai berikut:

Kindom : Kingdom

Sub Kingdom : Bilateria

Super Divisi : Deuterostomia

Divisi : Chordata

Sub Divisi : Vetebrata

Kelas : Mammalia

Bangsa : Rodentia

Suku : Muridae

Marga : *Mus*

Spesies : *Mus musculus* Linnaeus, 1758

Hewan ini memiliki ciri khas tubuh berukuran kecil, berwarna putih atau cokelat keabu-abuan dengan bulu halus, berkaki empat, serta termasuk hewan jinak, takut cahaya, aktif di malam hari (nokturnal), mudah dipelihara, memiliki siklus hidup pendek, dan tergolong poliestrus (Marangatua, 2008). Mencit (*M. musculus)* bersifat omnivora dan lebih menyukai makanan berupa biji-bijian atau sereal disbanding makanan rendah karbohidat (Singleton *et al*., 2005). Ciri-ciri tersebut sesuai dengan firman Allah yang dalam Al Qur'an dalam surah An Nur (24) ayat 45:

وَٱللَّهُ خَلَقَ كُلَّ دَآبَّةٍ مِّن مَّآءٍۖ فَمِنۡهُم مَّن يَمۡشِي عَلَىٰ بَطۡنِهِۦۖ وَمِنۡهُم مَّن يَمۡشِي عَلَىٰ بَطۡنِهِۦۖ وَمِنۡهُم مَّن يَمۡشِي عَلَىٰ رِجۡلَيۡنِۖ وَمِنۡهُم مَّن يَمۡشِي عَلَىٰٓ أَرۡبَعٖۚ يَخۡلُقُ ٱللَّهُ مَا يَشَآءُۚ إِنَّ ٱللَّهَ عَلَىٰ كُلِّ شَيۡءٖ قَدِيرٞ ٤٥

Artinya: "*Dan Allah telah menciptakan semua jenis hewan dari air, maka sebagian dari hewan itu ada yang berjalan di atas perutnya dan sebagian berjalan dengan dua kaki sedang sebagian (yang lain) berjalan dengan empat kaki. Allah menciptakan apa yang dikehendaki-Nya, sesungguhnya Allah Maha Kuasa atas segala sesuatu*." (Q. S An-Nur (24): 52)

Ayat diatas pada kalimat وَمِنۡهُم مَّن يَمۡشِي عَلَىٰٓ أَرۡبَعٖ menjelaskan bahwa 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 (Al-Hifnawi & Utsman, 2020).

Dalam penelitian biologi, Mencit *(M. musculus)* merupakan hewan laboratorium yang sangat penting dan dikenal sebagai "pahlawan biologi tanpa tanda

jasa", dikarenakan sekitar 40–80% penelitian laboratorium di dunia menggunakan mencit *(M. musculus)* sebagai hewan uji (Setyadi, 2006). Spesies ini sering digunakan karena memiliki banyak keunggulan, antara lain ukuran tubuh kecil, masa kehamilan yang pendek, jumlah anak banyak dalam satu kelahiran, siklus hidup singkat, serta mudah ditangani dan dipelihara (Chorilli *et al*., 2009). Selain itu, mencit *(M.musculus)* memiliki kemiripan genetik sekitar 99% dengan manusia, sehingga sering digunakan dalam studi genetika, biomedis, dan imunologi. Strain Mencit *(M. musculus)* yang umum digunakan di laboratorium antara lain C57BL/6 dan BALB/c (Viney *et al*., 2015).

Secara biologis, mencit *(M. musculus)* memiliki masa hidup berkisar 1-2 tahun, namun terdapat beberapa individu yang dapat mencapai 3 tahun. Masa reproduksi hewan ini berlangsung sekitar 1,5 tahun, dan sudah dapat dikawinkan pada umur 8 minggu. (Rowe *et al*., 1983; Burroni et al., 2014). Masa kebuntingan berlangsung sekitar 21 hari (Burroni *et al*., 2014), dengan rata-rata lima anak per kelahiran (Mcallan *et al*., 2008), serta mengalami estrus pasca melahirkan, yang memungkinkan

peningkatan populasi yang cepat ketika kondisi lingkungan mendukung (Burroni *et al*., 2014).



Gambar 2.7 Mencit(*Mus. musculus*) strain BALB/c (Centre For Comparative Medicine Research, 2025).

2.9 Metode Ekstraksi Maserasi

Maserasi adalah teknik ekstraksi yang sangat sederhana yang awalnya digunakan dalam pembuatan *wine* dan telah diadopsi secara luas dalam penelitian tanaman obat. Metode ini melibatkan proses perendaman bahan tanaman (kasar atau bubuk) di dalam wadah tertutup menggunakan pelarut, kemudian dibiarkan pada suhu kamar selama minimal tiga hari dengan agitasi sesekali. Proses tersebut bertujuan untuk melunakkan dan menghancurkan dinding sel tanaman agar senyawa fitokimia yang terlarut dapat keluar ke dalam pelarut. Setelah proses selesai, campuran kemudian ditekan atau disaring menggunakan saringan (Azwanida, 2015). Maserasi memiliki beberapa kelemahan, antara lain waktu ekstraksi yang lama dan efisiensi ekstraksi yang relatif rendah. Namun, metode ini memiliki keunggulan karena dapat digunakan untuk mengekstraksi komponen yang bersifat termolabil (mudah rusak oleh panas) sehingga cocok untuk senyawa yang tidak tahan suhu tinggi (Zhang *et al*., 2018).

Penelitian oleh Ćujić *et al*. (2016) menunjukkan bahwa metode ini tetap efektif digunakan untuk mengekstraksi senyawa aktif tertentu. Mereka berhasil memperoleh hasil tinggi dari total fenol dan total antosianin pada buah *chokeberry* menggunakan kondisi optimum berupa etanol 50%, rasio padatan–pelarut 1:20, dan ukuran partikel 0,75 mm, yang menunjukkan bahwa maserasi merupakan metode sederhana namun efektif untuk mengekstraksi senyawa fenolik dari bahan alami. Penelitian lain oleh Albuquerque *et al*. (2017) yang membandingkan tiga teknik ekstraksi yaitu maerasi, ekstraksi dengan bantuan gelombang mikro (*microwave assisted*/MAE), dan ekstraksi dengan bantuan ultrasonik. Metode MAE memberikan hasil yang paling tinggi, meskipun demikian, maserasi tetap memberikan hasil ekstraksi yang hampir sama pada suhu lebih rendah, hal ini memberikan keuntungan ekonomi karena penggunaan energi yang lebih efisien. Selanjutnya, Jin *et al*. (2011) meneliti daun *Cajanus cajan* yang dikenal dalam pengobatan tradisional Tiongkok untuk mengatasi hepatitis, cacar air, dan diabetes, di mana flavonoid merupakan senyawa bioaktif penting. Mereka membandingkan laju ekstraksi orientosida, luteolin, dan total flavonoid menggunakan beberapa metode yaitu ekstraksi dengan bantuan gelombang mikro, refluks, ultrasonik, dan maserasi. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa efisiensi ekstraksi orientosida, luteolin, dan total flavonoid paling rendah diperoleh dari metode maserasi, hal ini menegaskan bahwa meskipun sederhana, maserasi bukanlah metode dengan efisiensi tertinggi untuk semua jenis senyawa.

BAB III
METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan penelitian

Penelitian tentang aktivitas imunomodulator ekstrak kombinasi bunga telang *(Clitoria ternatea)* biru dan buah jeruk nipis *(Citrus aurantifolia)* terhadap jumlah sel sumsum tulang dan indeks organ limpa pada mencit *(Mus musculus)* jantan merupakan penelitian eksperimental menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 6 perlakuan dan 4 kali ulangan. Hewan coba yang digunakan berupa mencit galur Balb/C berjenis kelamin jantan berumur sekitar 2 bulan (The Jackson Laboratory, 2024). Bahan uji yang digunakan adalah simplisia bunga telang biru pada bagian mahkota bunga serta simplisia buah jeruk nipis.

Jumlah hewan coba yang digunakan sebanyak 24 ekor mencit, yang dibagi secara acak ke dalam 6 kelompok perlakuan sehingga setiap kelompok terdiri atas 4 ekor mencit. Penentuan jumlah ulangan dilakukn berdasarkan rumus modifikasi Federer, yaitu $t(r-1) \geq 15$ (Hanafiah, 2016). Berdasarkan jumlah perlakuan sebanyak 6 kelompok, maka diperoleh perhitungan:

$6 (r-1) \geq 15$

$6r-6 \geq 15$

$6r \geq 21$

$r \geq 3,5$

Berdasarkan hasil perhitungan yang didapatkan yaitu 3,5 maka dapat dibulatkan menjadi 4 sehingga, dalam penelitian ini ulangannya digenapkan menjadi 4 kali ulangan.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian mengenai aktivitas imunomodulator ekstrak kombinasi bunga telang (*Clitoria ternatea*) biru dan buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap jumlah sel sumsum tulang dan indeks organ limpa pada mencit (*Mus musculus*) jantan dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Hewan dan Laboratorium Hewan Coba Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2025 sampai Maret 2026.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi seperangkat alat gelas laboratorium berupa gelas beker (IWAKI), gelas ukur (IWAKI), erlenmeyer (IWAKI), tabung reaksi, batang pengaduk, corong kaca, cawan petri, dan pipet ukur (Pyrex®), blender (Miyako®), oven pengering (Thermo Scientific), kertas saring Whatman No.1, rotary evaporator (IKA® RV 10 Digital), timbangan analitik digital, mikropipet adjustable volume 10–100 µL dan 100–1000 µL (DragonLab®), sentrifus (Thermo Scientific), kandang hewan percobaan, timbangan hewan digital (A&D Company), sonde oral stainless steel, syringe 1 mL dan 3 mL (Terumo®), seperangkat alat bedah yang terdiri atas gunting bedah, pinset, dan skalpel, hemositometer Neubauer Improved (Assistant® Germany), objek glass dan cover glass (Sail Brand®), mikroskop cahaya binocular (Olympus® CX23), serta laptop untuk pengolahan dan analisis data menggunakan IBM SPSS Statistics dan Microsoft Excel.

3.3.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi simplisia bunga telang biru (*Clitoria ternatea*), simplisia buah jeruk nipis (*Citrus aurantiifolia*), etanol 70% analis, aquades steril, Na-CMC (*Natrium Carboxymethyl Cellulose*) 0,5%, Imboost, *phosphate buffered saline* (PBS) steril, Trypan Blue, aquades steril, larutan Turk, larutan Giemsa, NaCl fisiologis 0,9%, kapas, kasa steril, tisu, alkohol 70% pakan BR-1, air mineral, dan mencit (*Mus musculus*) jantan galur BALB/c.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan Hewan Coba

Mencit diaklimatisasi di Laboratorium Hewan Coba, Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, kemudian dibagi menjadi enam kelompok perlakuan. Kelompok kontrol negatif hanya diberi Na-CMC, kelompok kontrol positif diberi Imboost. Kelompok perlakuan 3, 4, 5, dan 6 masing-masing diberi ekstrak kombinasi bunga telang biru dan buah jeruk nipis dengan dosis berturut-turut 250 mg/kgBB, 500 mg/kgBB, 750 mg/kgBB, dan 1000 mg/kgBB. Pemberian dilakukan secara oral (*gavage*) sekali sehari selama 21 hari (Aprikou & Briggs, 2018; Jeyaraj *et al*., 2022). Dosis pemberian ditetapkan berdasarkan kapasitas lambung mencit, yaitu sekitar 0,4 ml, dengan penyesuaian volume agar tidak melebihi batas aman pemberian oral (McConnell et al., 2008). Setiap mencit ditimbang sebelum pemberian untuk penyesuaian dosis individual. Mencit diberi pakan pellet BR-1 dan diberi minum secara *ad-libitum* berupa air mineral dari Laboratorium Hewan Coba, Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.4.1.1 Pembagian Kelompok

Penelitian ini menggunakan 6 kelompok perlakuan, masing-masing perlakuan terdiri dari 6 ekor mencit jantan strain Balb-C. Kelompok tersebut dibagi sebagai berikut:

a. Kelompok I (kontrol negatif): Mencit yang diberi Na-CMC
b. Kelompok II (kontrol positif): Mencit yang diberi Imboost dengan dosis 4,56 mg/kgBB
c. Kelompok III : Mencit yang diberi perlakuan kombinasi ekstrak bunga telang biru dan buah jeruk nipis dengan dosis 250 mg/ kgBB
d. Kelompok IV : Mencit yang diberi perlakuan kombinasi ekstral bunga telang biru dan buah jeruk nipis dengan dosis 500 mg/kgBB
e. Kelompok V : Mencit yang diberi pelakuan kombinasi ekstrak bunga telang biru dan buah jeruk nipis dengan dosis 750 mg/kgBB
f. Kelompok VI : Mencit yang diberi perlakuan kombinasi ekstrak bunga telang biru dan buah jeruk nipis dengan dosis 1000mg/kgBB

3.4.2 Pemberian Ekstrak Kombinasi Bunga Telang *(C. ternatea)* Biru dan Buah Jeruk Nipis *(C. aurantifolia)*

3.4.2.1 Penentuan Dosis Perlakuan

Penentuan dosis ini mengacu pada penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa ekstrak bunga telang (*C. ternatea*) biru diketahui memiliki tingkat toksisitas akut yang rendah, dimana pemberian oral ekstrak bunga telang hingga dosis 2000 mg/kg BB pada tikus Wistar tidak menunjukkan mortalitas maupun abnormalitas signifikan, sehingga tergolong aman dan termasuk kategori toksisitas rendah menurut

klasifikasi OECD (Jeyaraj *et al*., 2021). Sementara itu, jus buah jeruk nipis memiliki LD_{50} sebesar 54,8 ml/kg BB, dengan tingkat toksisitas rendah pada dosis ≤50 ml/kg BB dan munculnya gejala toksik pada dosis ≥60 ml/kg BB (Ezeigwe & Ani, 2022).

Berdasarkan data tersebut, dosis kombinasi ekstrak dalam penelitian ini ditetapkan pada dosis 250, 500, 750, dan 1000 mg/kg BB. Rentang dosis tersebut dipilih untuk mewakili dosis rendah, sedang, hingga tinggi, namun tetap berada jauh di bawah batas toksik uang dilaporkan, sehingga diharapkan aman digunakan selama perlakuan sekaligus memungkinkan pengamatan terhadap respons biologis ekstrak kombinasi terhadap jumlah sel sumsum tulang dan indeks organ limfa. Pemilihan rentang bertingkat ini juga bertujuan untuk mengevaluasi kemungkinan hubungan dosis-respons (*dose-response relationship*) dari aktivitas imunomodulator ekstrak kombinasi bunga telang biru dan buah jeruk nipis.

3.4.2.2 Pembuatan Ekstrak Kombinasi Bunga Telang (*C. ternatea*) Biru dan Buah Jeruk Nipis (*C. aurantifolia*)

Pembuatan ekstrak kombinasi bunga telang biru dan buah jeruk nipis mengacu pada penelitian (Rahmah *et al*., 2023) yang telah dimodifikasi. Bunga telang biru yang akan digunakan terlebih dahulu disortasi untuk memisahkan bagian mahkota bunga dari kelopak bunga, dan bagian lainnya. Mahkota bunga kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40 °C selama ±20 menit untuk mengurangi kelembapan yang mungkin timbul selama penyimpanan. Setelah itu, bunga telang dihaluskan meggunakan blender dan diayak hingga diperoleh bubuk simplisia.

Sebanyak 50 gram serbuk simplisia bunga telang dicampurkan dengan 25 gram serbuk simplisia buah jeruk nipis sehingga diperoleh campuran simplisia dengan

perbandingan 2:1 (b/b). Campuran simplisia tersebut dimasukkan ke dalam wadah kaca dan ditambahkan etanol 70% sebagai pelarut, sesuai dengan rasio total perbandingan berat terhadap volume (1:10 b/v) yang disesuaikan dari kebutuhan pelarut masing-masing bahan (Khumairoh, 2020). Wadah ditutup rapat dan dibungkus dengan aluminium foil untuk menghindari paparan cahaya, kemudian dilakukan proses maserasi selama 24 jam pada suhu ruang (±25°C) (Solihah *et al*., 2024). Setelah itu, campuran disaring menggunakan kertas saring Whatman No. 1 untuk memperoleh filtrat. Filtrat diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak yang diperoleh disaring kembali apabila terdapat sisa partikel padat, kemudian disimpan dalam botol kaca gelap bertutup rapat pada suhu 4°C hingga digunakan pada tahap pengujian berikutnya.

3.4.2.3 Pemberian Kombinasi Ekstrak Bunga Telang (*C. ternatea*) Biru dan Buah Jeruk Nipis (*C. aurantifolia*)

Pemberian kombinasi ekstrak dilakukan secara oral menggunakan sonde satu kali sehari selama 21 hari berturut-turut (Aprikou & Briggs, 2018; Jeyaraj *et al.*, 2022). Mencit dibagi menjadi 6 kelompok, yaitu satu kelompok kontrol negatif yang hanya diberikan Na-CMC, satu kelompok kontrol positif yang diberikan imboost, serta empat kelompok perlakuan yang masing-masing menerima kombinasi ekstrak bunga telang biru dan buah jeruk nipis dengan dosis 250,500,750, dan 1000mg/kg BB. Dosis pemberian ditetapkan berdasarkan kapasitas lambung mencit, yaitu sekitar 0,4 ml, dengan penyesuaian volume agar tidak melebihi batas aman pemberian oral (McConnell *et al*., 2008). Kombinasi ekstrak disiapkan dalam bentuk suspensi homogen menggunakan larutan Na-CMC 0,5% sebagai vehicle agar mudah diberikan

melalui sonde (Singh *et al*., 2012). Pemberian dilakukan tiap hari pada jam yang sama untuk menjaga konsistensi, sementara kelompok kontrol positif diberi pembanding sesuai kebutuhan pengukuran. Sepanjang percobaan semua mencit mendapat pakan standar (BR-1) dan air bebas, serta dipantau kondisi fisik dan perilaku setiap hari.

3.4.3 Isolasi Sel Sumsum Tulang

Sel isolat diperoleh dari sumsum tulang mencit. Setelah dilakukan eutanasia sesuai prosedur etika, tulang femur dan tibia diambil dibersihkan dari jaringan otot yang menempel (Janeway *et al*., 2001). Ujung epifisis kedua tulang dipotong, kemudian sumsum tulang dikeluarkan (*flushing*) menggunakan syringe 1mL berisi PBS steril ke dalam cawan petri steril hingga rongga tulang tampak putih. Suspensi sumsum tulang yang diperoleh kemudian disaring menggunakan saringan sel berukuran 70 µm untuk mendapatkan suspensi sel tunggal (Swamydas & Lionakis, 2013).

Hasil saringan dimasukkan ke dalam tabung sentrifus 10 mL dan disentrifugasi pada kecepatan 2.500 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pellet yang dihasilkan diresuspensi dalam PBS steril, kemudian ditambahkan PBS steril untuk menghentikan reaksi dan disentrifugasi kembali dengan kondisi yang sama. Pellet yang dihasilkan selanjutnya diresuspensi kembali menggunakan 1 mL PBS steril hingga diperoleh suspensi homogen (Swamydas & Lionakis, 2013). Jumlah sel sumsum tulang dihitung menggunakan hemositometer Neubauer di bawah mikroskop Cahaya dengan bantuan pewarna Trypan Blue dengan faktor pengenceran 1:1 untuk membedakan sel hidup dan sel mati (Strober, 2015). Sel hidup dihitung pada kotak pengamatan, lalu jumlah sel dikonversi menjadi konsentrasi sel menggunakan rumus jumlah sel/mL =

(jumlah sel terhitung ÷ jumlah kotak yang diamati) × faktor pengenceran × 10^4 Nilai 10^4 digunakan karena volume satu kotak besar pada hemositometer Neubauer setara dengan 10^{-4} mL (Thermo Fisher Scientific, 2023).

3.4.4 Isolasi Organ Limpa

Limpa diambil setelah seluruh perlakuan selesai dan mencit dieutanasia sesuai prosedur etik penelitian hewan coba (AVMA Panel on Euthanasia, 2020). Mencit diposisikan terlentang pada papan bedah, kemudian area abdomen dibersihkan menggunakan alcohol 70% untuk menjaga kondisi aseptik sebelum pembedahan. Abdomen dibuka melalui insisi longitudinal menggunakan gunting bedah steril, lalu rongga abdominal dieksplorasi untuk mengidentifikasi organ limpa yang terletak di sisi kiri rongga abdomen berdekatan dengan lambung (Lewis, Williams, & Eisenbarth, 2019).

Limpa diambil secara hati-hati menggunakan pinset dan gunting steril untuk mencegah kerusakan jaringan organ. Organ yang telah diangkat kemudian dibersihkan dari jaringan lemak, pembuluh darah, dan jaringan ikat yang masih menempel, lalu dicuci menggunakan *phosphate buffered saline* (PBS) steril dingin guna menghilangkan sisa darah atau kontaminan permukaan (Jiang i., 2021). Setelah pencucian, limpa dikeringkan secara perlahan menggunakan kertas saring steril tanpa memberik tekanan berlebih agar tiak mempengaruhi berat organ (Kopp, 1990). Limpa yang telah bersih kemudian ditimbang menggunakan timbangan digital analitik untuk memperoleh berat organ absolut. Berat limpa selanjutnya digunakan untuk menghitung indeks organ limfa dengan rumus: Indeks organ limpa (%) = (berat limpa (g) / berat badan mencit (g) × 100 (Jiang *et al*., 2021).

3.5 Analisis Data

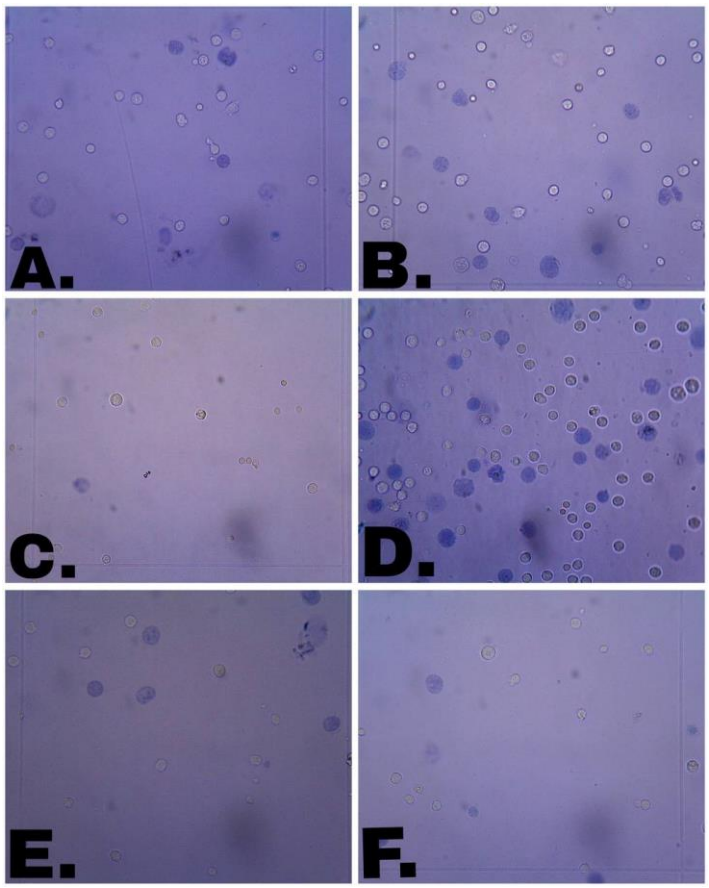
Parameter dianalisis menggunakan uji sidik ragam (ANOVA) satu arah melalui program SPSS 16.0 dengan taraf signifikansi 5%. Apabila terdapat perbedaan yang signifikan maka dilanjutkan dengan uji lanjut yang sesuai dan dengan taraf signifikansi 5%. Uji lanjut ini dilakukan berdasarkan koefisien keragaman (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.

BAB IV
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Ekstrak Kombinasi Bunga Telang (*C. ternatea*) Biru dan Buah Jeruk Nipis (*C. aurantifolia*) Terhadap Jumlah Sel Sumsum Tulang Pada Mencit (*M. musculus*) Jantan

Hasil penelitian mengenai pengaruh ekstrak kombinasi bunga telang biru dan buah jeruk nipis terhadap jumlah sel sumsum tulang pada mencit jantan diperoleh dari pengamatan pada 6 kelompok perlakuan dengan 4 ulangan. Data jumlah sel sumsum tulang pada masing-masing individu dalam setiap kelompok perlakuan dihitung, kemudian dirata-ratakan berdasarkan kelompok untuk selanjutnya dianalisis menggunakan SPSS versi 16.0. Hasil perhitungan menunjukkan adanya variasi nilai rata-rata proliferasi sel sumsum tulang pada masing-masing kelompok perlakuan.



Gambar 4.1 Pengamatan jumlah sel sumsum tulang menggunakan hemositometer (Neubauer) dengan pewarnaan Trypan Blue pada mikroskop cahaya perbesaran 400×; (A) K1, (B) K2, (C) K3, (D) K4, (E) K5, dan (F) K6.

Berdasarkan hasil pengamatan mikroskopis pada hemositometer, tampak populasi sel sumsum tulang yang tersebar pada seluruh bidang pengamatan dengan kepadatan yang bervariasi antar kelompok perlakuan. Sel-sel yang teramati umumnya berbentuk bulat hingga oval dengan ukuran yang beragam, yang menunjukkan karakteristik populasi sel sumsum tulang yang heterogen. Populasi tersebut terdiri atas berbagai sel hematopoietik pada tahap perkembangan yang berbeda, meliputi prekursor eritroid, prekursor mieloid, limfosit, monosit, serta sel progenitor hematopoietik yang secara normal terdapat dalam sumsum tulang (Morrison & Scadden, 2014; Swamydas & Lionakis, 2013). Keberadaan berbagai jenis sel tersebut mencerminkan fungsi

sumsum tulang sebagai organ hematopoiesis utama yang berperan dalam pembentukan dan perkembangan sel-sel darah (Kumar *et al*., 2021). Pengamatan mikroskopis ini dilakukan untuk membantu identifikasi dan perhitungan jumlah total sel sumsum tulang menggunakan hemositometer sebagai indikator proliferasi sel hematopoietik (Strober, 2015).

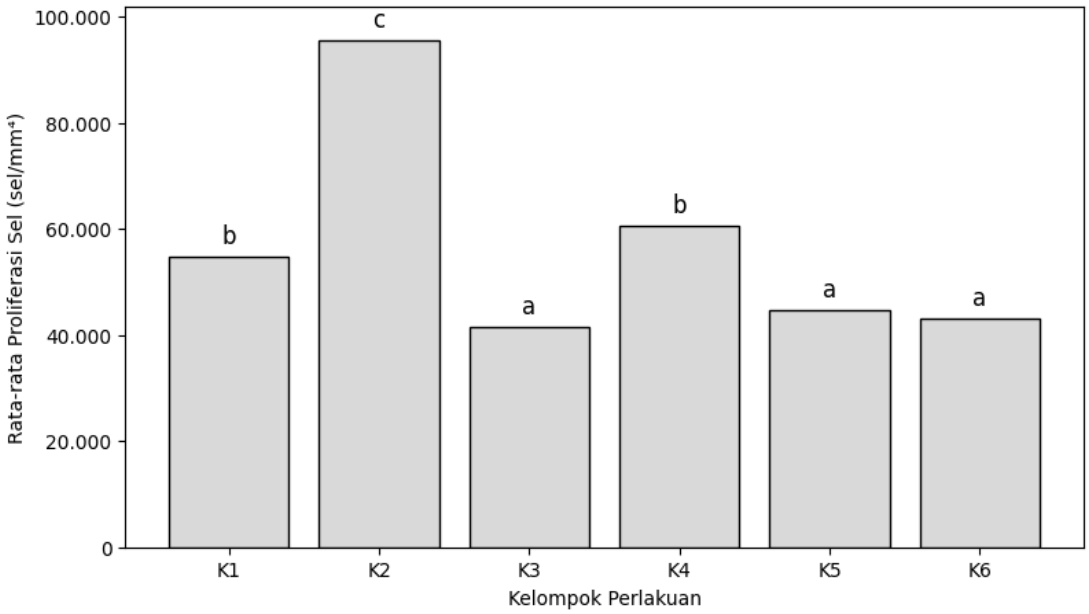
Tabel 4.1 Pengaruh Ekstrak Kombinasi C. ternatea dan C. aurantifolia Terhadap Jumlah Sel Sumsum Tulang pada M.musculus Jantan

Perlakuan	**Jumlah Sel Sumsum Tulang (sel/mm⁴)**				**Rata-rata ± SD**
	I	**II**	**III**	**IV**	
K1	4,72	5,20	5,64	6,34	5,475 ± 0,680[b]
K2	7,73	9,50	9,58	11,10	9,550 ± 1,389[c]
K3	3,63	3,68	4,30	5,00	4,153 ± 0,604[a]
K4	5,41	5,45	6,21	7,20	6,068 ± 0,820[b]
K5	3,71	4,00	4,89	5,26	4,465 ± 0,718[a]
K6	2,18	4,40	5,05	5,60	4,308 ± 1,489[a]

Keterangan: Jumlah sel sumsum tulang dinyatakan dalam satuan sel/mm⁴. Perbedaan huruf superskrip pada kolom rata-rata menunjukkan adanya perbedaan signifikan berdasarkan uji lanjut Tukey HSD pada taraf kepercayaan 95% ($p<0,05$).

Data hasil pengamatan jumlah sel sumsum tulang pada masing-masing kelompok perlakuan memiliki sebaran data yang normal berdasarkan uji Shapiro-Wilk, dengan seluruh kelompok menunjukkan nilai $p>0,05$, sehingga data terdistribusi normal. Data juga memenuhi asumsi homogenitas dan layak untuk dilanjutkan pada uji parametrik One Way ANOVA. Hasil analisis One Way ANOVA menunjukkan adanya

perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan dengan nilai signifikansi p=0,000 (p<0,05), sehingga dilanjutkan dengan uji lanjut Tukey HSD.



Gambar 4.2 Rata-rata Jumlah Sel Sumsum Tulang *M. musculus* Jantan. Keterangan: K1: Na-CMC; K2: Imboost; K3: dosis 250 mg/kgBB; K4: dosis 500 mg/kgBB; K5: dosis 750 mg/kgBB; K6: dosis 1000 mg/kgBB.

Hasil uji lanjut menunjukkan bahwa kelompok kontrol positif (K2) memiliki rata-rata jumlah sel sumsum tulang tertinggi yaitu sebesar 95.500 sel/mm⁴, sedangkan kelompok perlakuan K3 memiliki rata-rata terendah yaitu sebesar 41.525 sel/mm⁴. Kelompok K2 berbeda signifikan dengan seluruh kelompok perlakuan lainnya. Sementara itu, kelompok perlakuan K3, K5, dan K6 tidak menunjukkan perbedaan signifikan satu sama lain. Kelompok K4 menunjukkan rata-rata jumlah sel sumsum tulang tertinggi di antara seluruh kelompok perlakuan ekstrak, yaitu sebesar 60.675 sel/mm⁴, namun tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol negatif (K1). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kombinasi bunga telang biru dan buah jeruk nipis dosis 500 mg/kgBB memiliki kecenderungan meningkatkan proliferasi sel

sumsum tulang dibandingkan dosis perlakuan lainnya, meskipun efek peningkatannya belum melampaui kontrol positif (Gambar 4.1).

Rendahnya proliferasi sel sumsum tulang pada dosis 250 mg/kgBB (K3) diduga menunjukkan bahwa konsentrasi senyawa bioaktif pada dosis tersebut belum mencapai rentang biologis yang cukup untuk menghasilkan aktivitas imunomodulator secara optimal (Xi *et al*., 2022). Sebaliknya, dosis 500 mg/kgBB (K4) menunjukkan rata-rata proliferaso tertinggi di antara seluruh kelompok perlakuan ekstrak, sehingga diduga berada pada rentang dosis yang lebih optimal dalam menstimulasi proliferasi sumsum tulang. Pola ini mengindikasikan adanya hubungan *dose-response non-linear*, di mana peningkatan dosis tidak selalu diikuti dengan peningkatan aktivitas biologis secara proporsional. Fenomena ini sejalan dengan Calabrese (2018) yang menyatakan bahwa konsep *dose paradox*, yaitu kondisi ketika dosis sedang justru memberikan efek imunomodulator yang lebih efektif dibandingkan dosis tinggi.

Efek proliferatif pada dosis 500 mg/kgBB diduga berkaitan dengan kandungan bioaktif utama dalam bunga telang dan jeruk nipis, seperti antosianin, flavonoid, vitamin C, dan senyawa fenolik lain yang memiliki aktivitas antioksidan dan berpotensi mendukung modulasi biologis tubuh. Bunga telang diketahui kaya akan antosianin golongan ternatin yang merupakan turunan delphinidin (Kazuma *et al*., 2003). Antosianin tersebut berperan sebagai antioksidan alami yang mampu menangkal *reactive oxygen species* (ROS) dan melindungi sel dari kerusakan oksidatif (Escher *et al*., 2020). Jeruk nipis juga mengandung vitamin C serta flavonoid yang berkontribusi dalam menjaga stabilitas fisiologis melalui perlindungan seluler dan penekanan stres oksidatif (Addi *et al*., 2022).

Selain aktivitas biologis masing-masing senyawa, kombinasi bunga telang dan jeruk nipis juga diduga memberikan efek melalui mekanisme kopigmentasi. Kopigmentasi merupakan interaksi molekuler antara antosianin dengan flavonoid, asam organik, atau senyawa fenolik lain yang dapat meningkatkan stabilitas antosianin terhadap degradasi oksidatif (Trouillas *et al*., 2016). Pada kombinasi ini, antosianin golongan ternatin dari bunga telang berpotensi berinteraksi dengan asam askorbat dan asam sitrat dari jeruk nipis (Khoo *et al*., 2017). Interaksi tersebut diduga membantu mempertahankan stabilitas senyawa bioaktif sehingga aktivitas antioksidan dapat berlangsung lebih efektif dalam menekan stres oksidatif. Stabilitas ini mendukung terciptanya lingkungan fisiologis yang lebih kondusif bagi fungsi imun dan proses hematopoiesis, terutama ketika keseimbangan antar senyawa aktif berada pada rentang optimal seperti pada dosis 500 mg/kgBB (K4).

Namun, peningkatan dosis hingga 750 mg/kgBB (K5) dan 1000 mg/kgBB (K6) tidak menunjukkan peningkatan proliferasi sel sumsum tulang yang lebih tinggi dibandingkan dosis 500 mg/kgBB (K4). Kondisi ini menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi senyawa bioaktif tidak selalu menghasilkan efek biologis yang sebanding. Fenomena tersebut diduga berkaitan dengan pola respons bifasik atau hormesis, yaitu kondisi ketika senyawa bioaktif memberikan efek stimulatif pada dosis rendah hingga sedang (Calabrese, 2018), namun dapat menurun, mencapai plateau, atau bahkan bersifat inhibitif pada dosis yang lebih tinggi (Mattson, 2008).

Selain itu, pada konsentrasi tinggi, beberapa senyawa bioaktif seperti flavonoid dan polifenol dapat berpern sebagai pro-oksidan yang memicu stress seluler (Galati & O'Brien, 2004). Kondisi tersebut dapat meningkatkan pembentukan *reactive oxygen*

species (ROS) yang berlebihan sehingga mengganggu keseimbangan redoks dalam sel (Li *et al*., 2016). Ketidakseimbangan redoks tersebut dapat berdampak pada terganggunya fungsi seluler, termasuk proses proliferasi sel (Galati & O'Brien, 2004). Akibatnya, peningkatan dosis tidak selalu diikuti oleh peningkatan proliferasi, bahkan dapat menyebabkan penurunan respons biologis pada konsentrasi yang lebih tinggi (Li *et al*., 2016).

Fenomena peningkatan dosis yang tidak selalu diikuti oleh peningkatan respons biologis menunjukkan bahwa setiap senyawa memiliki rentang dosis optimal untuk menghasilkan efek yang maksimal. Pada dosis tertentu, suatu senyawa dapat memberikan efek stimulatif, namun ketika dosis ditingkatkan melebihi batas optimal, respons biologis dapat menurun akibat terjadinya kejenuhan reseptor, mekanisme umpan balik negatif, maupun perubahan aktivitas senyawa menjadi prooksidan (Katzung, 2018; Brunton *et al*., 2018). Oleh karena itu, efektivitas suatu bahan tidak hanya ditentukan oleh jumlah yang diberikan, tetapi juga oleh ketepatan dosis yang digunakan.

Konsep tersebut sejalan dengan firman Allah SWT dalam QS. Al-Qamar ayat 49:

إِنَّا كُلَّ شَيۡءٍ خَلَقۡنَٰهُ بِقَدَرٖ

Artinya: *Sesungguhnya kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran*

Makna *"* بِقَدَرٖ*"* mengandung makna bahwa segala sesuatu diciptakan dengan ukuran yang tepat, tidak kurang dan tidak lebih, sesuai dengan fungsi dan hikmahnya (Shihab, 2002). Dalam tafsir Al-Hifnawi & Utsman (2020) dijelaskan bahwa kata *qadar* bermakna ketetapan atau sistem yang telah diatur secara presisi oleh Allah SWT,

sehingga segala seuatu berjalan sesuai dengan hukum dan ketentuan yang berlaku (Al-Hifnawi & Utsman, 2020). Sejalan dengan hal tersebut, Tafsir Ibnu Katsir menjelaskan bahwa Allah SWT menciptakan seluruh makhluk dengan ukuran dan ketentuan tertentu, baik dari segi jumlah, kadar, maupun waktu kejadiannya (Ibn Kathir, 2003).

Dengan demikian, konsep ukuran (بِقَدَرٍ) dapat diinterpretasikan sebagai adanya batas optimal suatu sistem biologis, termasuk penggunaan suatu zat. Sebagaimana peningkatan dosis ekstrak tidak selalu menghasilkan peningkatan jumlah sel sumsum tulang, penggunaan suatu zat yang melebihi batas optimal juga berpotensi menurunkan efektivitas biologisnya (Brunton *et al.*, 2018).

Prinsip ukuran dan keseimbangan dalam penggunaan dosis juga mencerminkan nilai muamalah dalam Islam, yang meliputi muamalah ma'Allah, muamalah ma'an-nas, dan muamalah ma'al-alam. Muamalah ma'Allah tercermin melalui upaya manusia memahami dan memanfaatkan ketentuan Allah SWT yang telah menetapkan segala sesuatu menurut ukuran dan kadar tertentu. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dosis ekstrak yang lebih tinggi tidak selalu menghasilkan efek biologis yang lebih baik, sehingga manusia dituntut untuk mengikuti prinsip keseimbangan yang telah ditetapkan Allah SWT dalam memanfaatkan sumber daya alam.

Muamalah ma'an-nas diwujudkan melalui tanggung jawab dalam menentukan dosis yang efektif dan aman bagi kesehatan. Sebagaimana dosis 500 mg/kgBB memberikan respons proliferasi sel sumsum tulang yang lebih optimal dibandingkan dosis yang lebih tinggi, penggunaan bahan herbal secara tepat dapat memaksimalkan manfaat dan meminimalkan risiko yang berpotensi merugikan diri sendiri maupun orang lain. Sementara itu, muamalah ma'al-alam tercermin dalam pemanfaatan

tanaman bunga telang dan jeruk nipis secara proporsional sesuai kebutuhan. Penggunaan dosis yang optimal menunjukkan bahwa pemanfaatan bahan alam tidak harus dilakukan secara berlebihan untuk memperoleh manfaat yang maksimal, sehingga mendukung prinsip efisiensi penggunaan sumber daya serta menjaga kelestarian lingkungan dan keberlanjutan ketersediaan tanaman obat di alam (Shihab, 2002; Habibullah, 2018; Rahmad, 2025).

Selain faktor dosis, variasi respons proliferasi sel sumsum tulang pada masing-masing kelompok juga dapat dipengaruhi oleh karakteristik senyawa bioaktif dalam ekstrak. Senyawa flavonoid diketahui memiliki aktivitas biologis yang kompleks dan dapat memberikan efek yang berbda tergantung pada kondisi biologis yang terlibat (Middleton *et al*., 2009). Pada kondisi tertentu, flavonoid dapat berperan sebagai imunostimulan melalui peningkatan aktivitas sel imun, namun pada kondisi lain juga dapat menunjukkan efek imunosupresif tergantung pada konsentrasi, tipe sel, dan kondisi fisiologis organisme (Zhang *et al*., 2015).

Senyawa bioaktif dalam tumbuhan umumnya bersifat multikomponen, sehingga satu jenis ekstrak dapat mengandung berbagai senyawa aktif dengan mekanisme kerja yang berbeda (Wagner & Ulrich-Merzenich, 2009). Interaksi antar senyawa tersebut dapat terjadi secara sinergis maupun antagonis, yang pada akhirnya mempengaruhi efek biologis yang dihasilkan. Interaksi sinergis terjadi ketika kombinasi senyawa meningkatkan efek biologis secara keseluruhan, sedangkan interaksi antagonis terjadi ketika suatu senyawa menghambat atau menurunkan aktivitas senyawa lainnya (Aden & Rifa'i, 2014).

Efek antagonis yang ditunjukkan oleh kombinasi ekstrak bunga telang biru dan buah jeruk nipis pada dosis 750 mg/kgBB (K5) dan 1000 mg/kgBB (K6) diduga berkaitan dengan interaksi antar senyawa bioaktif yang tidak selalu bersifat sinergis. Caesar & Cech (2019) menyatakan dalam sistem fitokimia, senyawa seperti flavonoid, polifenol, dan metabolit sekunder lain dapat berinteraksi dalam bentuk sinergi, aditif, maupun antagonis tergantung pada komposisi dan konsentrasi masing-masing komponen. Antagonisme terjadi ketika satu senyawa menghambat atau menurunkan efek biologis senyawa lain, sehingga respons yang dihasilkan menjadi lebih rendah dibandingkan efek individualnya (Chaachouay, 2025).

Pada kombinasi ekstrak tumbuhan, fenomena antagonis dapat dipengaruhi oleh kompleksitas komposisi fitokimia yang bersifat multikomponen, Setiap senyawa memiliki target molekuler dan mekanisme kerja yang berbeda, sehingga interaksi antar senyawa dapat menyebabkan kompetisi pada reseptor, perubahan jalur sinyal seluler, atau gangguan terhadap bioavailabilitas senyawa aktif lainnya Selain itu, variasi faktor seperti dosis, rasio kombinasi, serta kondisi fisiologis organisme juga berperan dalam menentukan apakah interaksi tersebut bersifat sinergis atau justru antagonis (Chaachouay, 2025).

Dalam penelitian ini, kemungkinan efek antagonis pada kombinasi ekstrak bunga telang dan buah jeruk nipis dapat terjadi ketika konsentrasi senyawa bioaktif yang tinggi menyebabkan ketidakseimbangan interaksi antar komponen (Wagner & Ulrich-Merzenich, 2009). Ketidakseimbangan tersebut dapat memengaruhi jalur molekuler yang terlibat dalam respons imun, sehingga efektivitas mekanisme imunomodulator tidak berlangsung secara optimal (Spelman *et al*., 2006). Kondisi ini

dapat berdampak pada penurunan aktivitas proliferasi sel atau terganggunya regulasi sistem imun akibat interaksi senyawa yang saling menghambat (Wagner & Ulrich-Merzenich, 2009). Oleh karena itu, meskipun kedua bahan secara individual memiliki potensi imunomodulator, kombinasi keduanya tidak selalu menghasilkan efek yang lebih tinggi. Sebaliknya, efek biologis dapat menurun apabila interaksi antar senyawa tidak berada pada rasio yang optimal, sehingga respons imun yang dihasilkan menjadi kurang efektif (Spelman *et al*., 2006).

Pada tingkat seluler, beberapa senyawa bioaktif seperti flavonoid dan saponin diketahui dapat memengaruhi regulasi siklus sel melalui mekanisme penghambatan aktivitas *cyclin-dependent kinase* (CDK). Protein p27^Kip1 merupakan salah satu inhibitor CDK yang berperan dalam menghambat transisi siklus sel dari fase G1 ke fase S, sehingga menyebabkan terjadinya penghentian siklus sel pada fase G0/G1 dan menurunkan proliferasi sel (Sherr & Roberts, 1999). Beberapa senyawa flavonoid dilaporkan mampu meningkatkan ekspresi p27^Kip1 sehingga berkontribusi terhadap penghambatan proliferasi sel melalui regulasi siklus sel (Chen, 2010).

Selain itu, senyawa bioaktif dari bahan alam diketahui dapat memodulasi respons imun melalui regulasi produksi sitokin. Middleton *et al*. (2000) menyatakan bahwa flavonoid mampu menekan produksi sitokin seperti IL-2 yang berperan dalam proliferasi dan aktivasi limfosit T. Penurunan produksi sitokin tersebut dapat menyebabkan berkurangnya aktivasi sel imun, termasuk limfosit, sehingga jumlah sel yang terproliferasi menjadi lebih rendah (Spelman *et a*l., 2006). Dalam kaitannya dengan sistem imun, sumsum tulang merupakan organ hematopoietik utama yang berperan dalam pembentukan berbagai sel imun, termasuk prekursor leukosit dan

limfosit (Xu *et al*., 2024). Peningkatan jumlah sel sumsum tulang dapat mengindikasikan adanya stimulasi terhadap proses hematopoiesis, yaitu proses pembentukan dan diferensiasi sel darah yang berlangsung di dalam sumsum tulang (Morrison & Scadden, 2014).

Aktivitas hematopoiesis yang meningkat akan berkontribusi pada peningkatan produksi sel imun, termasuk leukosit dan limfosit, yang berperan dalam mempertahankan respons imun tubuh. Sebaliknya, penurunan jumlah sel sumsum tulang dapat mencerminkan adanya hambatan proliferasi sel hematopoietik atau gangguan pada lingkungan sumsum tulang yang berperan dalam regulasi pertumbuhan dan diferensiasi sel. Gangguan pada lingkungan sumsum tulang dapat memengaruhi keseimbangan antara proliferasi dan diferensiasi sel hematopoietik, sehingga berdampak pada penurunan produksi sel imun dan melemahnya respons imun (Morrison & Scadden, 2014). Oleh karena itu, jumlah sel sumsum tulang dapat digunakan sebagai indikator aktivitas pembentukan sel imun serta kapasitas regeneratif sistem imun pada hewan uji.

Dalam kajian hematopoiesis, hingga saat ini belum terdapat kisaran baku jumlah total sel sumsum tulang yang dinyatakan sebagai nilai normal tunggal. Hal ini disebabkan karena jumlah sel sumsum tulang sangat bervariasi tergantung pada jenis tulang yang diamati, strain hewan, umur, serta kondisi fisiologis individu (Morrison & Scadden, 2014). Boggs (1984) melaporkan bahwa jumlah sel sumsum tulang pada mencit umumnya dinyatakan berdasarkan jumlah sel per tulang, seperti femur, bukan dalam bentuk nilai absolut tunggal. Hal ini disebabkan karena hasil isolasi sumsum tulang sangat dipengaruhi oleh lokasi tulang, metode ekstraksi, serta kondisi fisiologis

hewan uji. Pada mencit normal, jumlah sel sumsum tulang yang diperoleh dari satu femur dilaporkan berkisar antara 1×10^7 hingga 2×10^7 sel per femur (Boggs, 1984), pada beberapa kondisi dapat bervariasi hingga sekitar 3×10^7 sel per femur tergantung teknik isolasi dan karakteristik biologis hewan (Challen, 2009).

Meskipun jumlah sel yang diperoleh pada penelitian ini masih berada dalam kisaran yang dilaporkan pada mencit normal, efektivitas ekstrak kombinasi bunga telang biru dan jeruk nipis tetap perlu dibandingkan dengan kontrol positif untuk menilai kemampuan proliferatifnya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa respons proliferatif yang dihasilkan oleh ekstrak kombinasi bunga telang biru dan jeruk nipis masih lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol positif (K2). Temuan ini menunjukkan bahwa aktivitas imunomodulator ekstrak cenderung bersifat suportif dan regulatif, bukan sebagai stimulator kuat yang mampu menghasilkan proliferasi sel hematopoietik setara dengan agen farmakologis standar. Imboost sebagai kontrol positif mengandung senyawa yang telah diformulasikan secara khusus untuk menstimulasi respons imun secara lebih terarah dan konsisten, sehingga efek proliferatif yang dihasilkan relatif lebih tinggi. Sebaliknya, ekstrak bahan alam mengandung berbagai senyawa bioaktif yang bekerja secara sinergis melalui mekanisme yang lebih kompleks, seperti modulasi produksi sitokin, perlindungan terhadap stres oksidatif, pengurangan inflamasi berlebih, serta pemeliharaan homeostasis sistem imun (Spelman *et al*., 2006).

Selain itu, peningkatan jumlah sel sumsum tulang yang tidak setinggi kontrol positif tidak selalu menunjukkan efektivitas yang lebih rendah. Imunomodulator berbasis bahan alam pada umumnya tidak bertujuan menghasilkan stimulasi imun yang

berlebihan, melainkan menjaga keseimbangan respons imun agar tetap optimal. Johnson *et al*. (2010) menjelaskan bahwa senyawa alami cenderung bekerja secara bertahap melalui berbagai jalur biologis yang saling berinteraksi, sehingga efeknya lebih bersifat regulatif dibandingkan agen farmakologis yang dirancang untuk menghasilkan stimulasi imun secara langsung. Oleh karena itu, peningkatan jumlah sel sumsum tulang pada dosis 500 mg/kgBB mengindikasikan bahwa ekstrak kombinasi masih memiliki potensi dalam mendukung proliferasi sel hematopoietik, meskipun efektivitasnya belum mencapai tingkat stimulasi yang ditunjukkan oleh kontrol positif.

4.2 Pengaruh Ekstrak Kombinasi Bunga Telang (*C. ternatea*) Biru dan Buah Jeruk Nipis (*C. aurantifolia*) Terhadap Indeks Organ Limpa Pada Mencit (*M. musculus*) Jantan

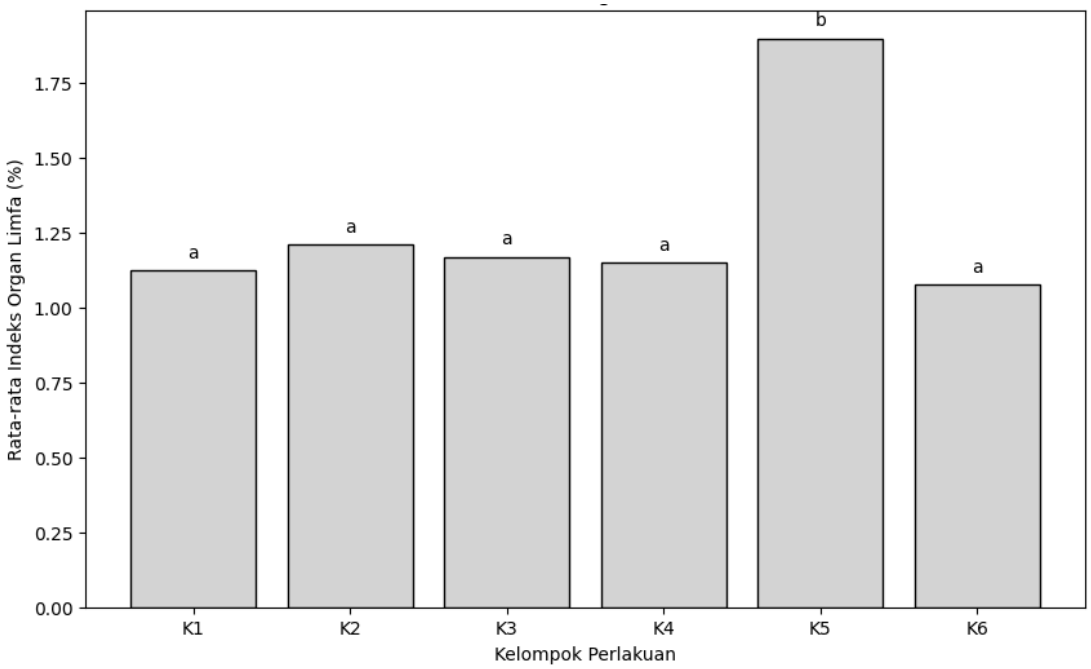
Hasil penelitian menganai pengaruh ekstrak kombinasi bunga telang biru dan buah jeruk nipis terhadap indeks organ limpa pada mencit jantan diperoleh dari pengamatan pada 6 kelompok perlakuan dengan 4 ulangan. Data indeks organ limpa pada masing-masing individu dalam setiap kelompok perlakuan dihitung, kemudian dirata-ratakan berdasarkan kelompok untuk selanjutnya dianalisis menggunakan SPSS versi 16.0. Hasil perhitungan menunjukkan adanya variasi nilai rata-rata indeks organ limfa pada masing-masing kelompok perlakuan.

Tabel 4.2 Pengaruh Ekstrak Kombinasi *C. ternatea* dan *C. aurantifolia* terhadap Indeks Organ Limpa pada *M. musculus* Jantan

Perlakuan	Rata-rata ± SD
K1	1,1235 ± 0,4496[a]
K2	1,2093 ± 0,3428[a]
K3	1,1685 ± 0,1928[a]
K4	1,1490 ± 0,2228[a]
K5	1,8958 ± 0,3043[b]
K6	1,0745 ± 0,0756[a]

Keterangan: Indeks organ limpa dinyatakan dalam persen (%). Perbedaan huruf superskrip pada kolom rata-rata menunjukkan adanya perbedaan signifikan berdasarkan uji lanjut Tukey HSD pada taraf kepercayaan 95% ($p<0,05$). Kelompok dengan huruf superskrip yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata, sedangkan huruf berbeda menunjukkan perbedaan signifikan.

Data hasil pengamatan indeks organ limpa pada masing-masing kelompok perlakuan menunjukkan adanya variasi nilai rata-rata antar kelompok. Data indeks organ limpa pada setiap kelompok perlakuan terlebih dahulu diuji normalitasnya menggunakan uji Shapiro-Wilk dan menunjukkan distribusi data normal ($p>0,05$). Selanjutnya, uji homogenitas menggunakan Levene test memperoleh nilai signifikansi $p=0,335$ ($p>0,05$), sehingga data dinyatakan homogen dan memenuhi syarat untuk dilanjutkan pada analisis parametrik One Way ANOVA. Berdasarkan uji lanjut Tukey HSD, kelompok K1, K2, K3, K4, dan K6 berada pada subset homogen yang sama sehingga tidak menunjukkan perbedaan signifikan satu sama lain, sedangkan kelompok K5 berada pada subset berbeda dengan nilai rata-rata tertinggi. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan pada kelompok K5 memberikan pengaruh paling besar terhadap peningkatan indeks organ limpa dibandingkan kelompok perlakuan lainnya (Tabel 4.2).



Gambar 4.3 Rata-rata indeks organ limpa *M.musculus* jantan. Keterangan: K1: Na-CMC; K2: Imboost; K3: dosis 250 mg/kgBB; K4: dosis 500 mg/kgBB; K5: dosis 750 mg/kgBB; K6: dosis 1000 mg/kgBB.

Hasil uji lanjut menunjukkan bahwa kelompok perlakuan K5 (dosis 750 mg/kgBB) memiliki rata-rata indeks organ limpa tertinggi yaitu sebesar 1,8958%, sedangkan kelompok K6 (dosis 1000 mg/kgBB) memiliki rata-rata terendah yaitu sebesar 1,0745%. Kelompok K5 berbeda signifikan dengan seluruh kelompok perlakuan lainnya. Sementara itu, kelompok K1, K2, K3, K4, dan K6 tidak menunjukkan perbedaan signifikan satu sama lain. Kelompok K5 menunjukkan rata-rata indeks organ limpa tertinggi di antara seluruh kelompok perlakuan ekstrak maupun kontrol, yang mengindikasikan bahwa pemberian ekstrak kombinasi bunga telang biru dan buah jeruk nipis dosis 750 mg/kgBB memiliki pengaruh paling optimal terhadap peningkatan indeks organ limpa mencit jantan.

Peningkatan indeks organ limpa pada kelompok K5 mengindikasikan adanya stimulasi terhadap organ limfoid sekunder yang berperan penting dalam regulasi dan

respons sistem imun. Limpa merupakan organ limfoid sekunder terbesar dalam tubuh yang memiliki fungsi utama sebagai tempat penyaringan antigen, eliminasi partikel asing dari sirkulasi darah, serta pusat interaksi antara *antigen-presenting cells* dengan limfosit T dan limfosit B dalam memicu respons imun adaptif (Lewis, Williams, & Eisenbarth, 2019). Di dalam *white pulp* organ limpa terjadi proses aktivasi, proliferasi, dan diferensiasi limfosit sebagai bagian dari pembentukan respons imun humoral maupun seluler terhadap antigen yang masuk ke dalam tubuh (Ruddle & Akirav, 2009).

Peningkatan indeks organ limpa juga kemungkinan berkaitan dengan meningkatnya aktivitas pada *white pulp* yang merupakan area utama aktivasi, proliferasi, dan diferensiasi limfosit T dan B selama respons imun adaptif berlangsung. *White pulp* limpa diketahui tersusun atas zona limfosit T dan folikel limfosit B yang berperan penting dalam pembentukan respons imun terhadap antigen yang masuk ke dalam tubuh (Zhao *et al*., 2015).Oleh karena itu, perubahan ukuran atau indeks organ limpa sering dikaitkan dengan perubahan aktivitas imunologis, karena peningkatan berat relatif limfa dapat mencerminkan terjadinya peningkatan proliferasi sel imun, aktivitas limfosit, serta stimulasi fisiologis organ limfoid akibat paparan senyawa imunomodulator (Chen *et al*., 2019).

Tingginya indeks organ limpa pada kelompok (K5) dosis 750 mg/kgBB diduga berkaitan dengan kandungan senyawa bioaktif utama dalam kombinasi ekstrak bunga telang biru dan buah jeruk nipis, seperti antosianin, flavonoid, vitamin C, dan senyawa fenolik lainnya yang memiliki aktivitas antioksidan dan imunomodulator. Antosianin bunga telang diketahui mampu melindungi sel imun dari kerusakan akibat radikal bebas dan mendukung aktivitas limfosit (Mukherjee *et al.*, 2008). Sementara itu,

vitamin C dan flavonoid pada jeruk nipis berperan dalam meningkatkan fungsi fagosit, proliferasi limfosit, serta regulasi respons imun melalui mekanisme antioksidan dan antiinflamasi (Carr & Maggini, 2017). Kombinasi kedua bahan tersebut diduga memberikan efek sinergis dalam mempertahankan aktivitas organ limfoid sehingga mendukung peningkatan indeks organ limfa pada mencit.

Meskipun kelompok K5 menunjukkan nilai indeks organ limpa yang lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol positif (K2), kondisi tersebut tidak dapat secara langsung diinterpretasikan sebagai splenomegali patologis. Peningkatan berat relatif limpa dapat terjadi sebagai respons fisiologis terhadap stimulasi sistem imun yang ditandai oleh peningkatan proliferasi limfosit, ekspansi area *white pulp*, serta meningkatnya aktivitas imunologis pada organ limfoid sekunder (Lewis *et al*., 2019). Limpa merupakan organ yang sangat dinamis terhadap perubahan aktivitas imun, sehingga peningkatan indeks organ limpa sering digunakan sebagai indikator terjadinya aktivasi dan proliferasi sel imun setelah pemberian senyawa imunomodulator (Chen *et al*., 2019). Sebaliknya, splenomegali patologis umumnya tidak hanya ditandai oleh peningkatan ukuran atau berat organ, tetapi juga disertai perubahan struktur jaringan, infiltrasi sel abnormal, kongesti vaskular, inflamasi kronis, atau gangguan fungsi organ yang memerlukan pemeriksaan histopatologi untuk memastikan diagnosisnya (Chapman & Hill, 2020). Karena penelitian ini hanya mengevaluasi indeks organ limpa tanpa analisis histopatologi, maka peningkatan indeks organ limpa pada kelompok K5 lebih tepat diinterpretasikan sebagai indikasi meningkatnya aktivitas imunologis dan proliferasi limfosit dibandingkan sebagai kondisi splenomegali patologis.

Tingginya indeks organ limfa pada kelompok K5 dibandingkan kontrol positif juga menunjukkan bahwa kombinasi ekstrak bunga telang biru dan buah jeruk nipis pada dosis 750 mg/kgBB mampu memberikan stimulasi yang lebih besar terhadap organ limfoid sekunder. Efek tersebut diduga berkaitan dengan aktivitas sinergis antosianin, flavonoid, vitamin C, dan senyawa fenolik lainnya yang berperan dalam meningkatkan proliferasi limfosit, menjaga viabilitas sel imun melalui aktivitas antioksidan, serta memodulasi produksi sitokin yang berperan dalam respons imun adaptif (Carr & Maggini, 2017; Shakoor *et al*., 2021). Dengan demikian, peningkatan indeks organ limpa pada kelompok K5 kemungkinan mencerminkan terjadinya hiperplasia limfoid fisiologis akibat stimulasi imun yang optimal, bukan pembesaran organ yang bersifat patologis.

Hasil penelitian ini sejalan dengan Shakoor *et al*., (2021) yang menyatakan bahwa senyawa flavonoid dan antosianin mampu meningkatkan aktivitas organ limfoid dan proliferasi limfosit melalui mekanisme antioksidan dan imunomodulator. Senyawa flavonoid diketahui mampu menangkal radikal bebas dan menurunkan stres oksidatif sehingga dapat menjaga stabilitas membran sel imun serta mendukung viabilitas dan proliferasi limfosit. Selain itu, antosianin juga berperan dalam meningkatkan aktivitas sel imun melalui regulasi produksi sitokin dan modulasi respons inflamasi tubuh. Aktivitas tersebut berkontribusi terhadap peningkatan fungsi organ limfoid, termasuk limfa, yang menjadi pusat aktivasi dan diferensiasi limfosit selama respons imun berlangsung (Shakoor *et al*., 2021). Grigore (2017) juga menyatakan bahwa pemberian ekstrak kaya antioksidan dapat meningkatkan aktivitas sistem imun melalui peningkatan proliferasi limfosit dan aktivitas organ imun pada hewan coba.

Optimalnya dosis 750 mg/kgBB (K5) diduga berkaitan dengan tercapainya konsentrasi efektif senyawa aktif dalam tubuh yang mampu menstimulasi aktivitas organ limfa secara maksimal, khususnya dalam meningkatkan proliferasi dan diferensiasi sel imun. Pada dosis ini, senyawa bioaktif yang diberikan berada pada tingkat yang cukup untuk menginduksi respons imun tanpa menimbulkan efek penurunan aktivitas biologis. Fenomena ini sesuai dengan konsep bahwa efek imunomodulator sangat dipengaruhi oleh dosis, di mana konsentrasi tertentu diperlukan untuk mencapai respons biologis yang optimal (Calabrese, 2018).

Tingginya respons pada kelompok K5 dibandingkan kontrol positif diduga karena kombinasi senyawa bioaktif dari bunga telang dan jeruk nipis bekerja secara sinergis melalui aktivitas antioksidan, antiinflamasi, dan imunomodulator yang lebih kompleks terhadap organ limfoid. Senyawa flavonoid dan antosianin diketahui mampu memodulasi respons imun dengan mengurangi stres oksidatif, menghambat mediator inflamasi, serta meningkatkan aktivitas sel imun seperti limfosit dan makrofag (Shakoor *et al*., 2021). Selain itu, kombinasi flavonoid dan vitamin C dilaporkan memiliki efek sinergis dalam meningkatkan aktivitas antioksidan dan regulasi respons inflamasi sehingga berpotensi memberikan efek imunomodulator yang lebih optimal dibandingkan pemberian senyawa tunggal (Chrysikopoulou *et al*., 2026).

Peningkatan indeks organ limfa pada dosis 750 mg/kgBB (K5) juga sejalan dengan peningkatan jumlah sel sumsum tulang pada dosis yang sama. Kondisi ini mengindikasikan adanya stimulasi sistem hematopoiesis dan proliferasi sel imun yang berlangsung secara terintegrasi antara sumsum tulang sebagai organ hematopoietik primer dan limfa sebagai organ limfoid sekunder. Aktivasi proliferasi sel imun pada

sumsum tulang dapat meningkatkan produksi sel limfoid yang selanjutnya bermigrasi menuju organ limfoid sekunder seperti limfa untuk mendukung respons imun adaptif (Janeway *et al*., 2001).

Sebaliknya, pada dosis yang lebih rendah (K3 dan K4), respons peningkatan indeks organ limfa belum menunjukkan perbedaan signifikan, yang mengindikasikan bahwa konsentrasi senyawa aktif belum mencapai ambang efektif untuk memberikan efek imunomodulator yang optimal. Sementara itu, pada dosis yang lebih tinggi (K6), rata-rata indeks organ limfa justru mengalami penurunan dan tidak berbeda signifikan dibandingkan kelompok lainnya. Kondisi ini menunjukkan adanya pola respons dosis yang tidak linear, di mana peningkatan dosis tidak selalu diikuti oleh peningkatan efek biologis (Calabrese, 2018). Fenomena ini dikenal sebagai konsep hormesis, yaitu suatu respons biologis di mana dosis rendah hingga sedang memberikan efek stimulatif, sedangkan dosis yang lebih tinggi dapat menurunkan respons akibat kejenuhan reseptor, mekanisme umpan balik negatif, atau peningkatan beban metabolik dalam tubuh (Mattson, 2008). Pada konsentrasi tinggi, senyawa antioksidan juga dapat berubah menjadi prooksidan sehingga berpotensi meningkatkan stres oksidatif seluler dan memengaruhi stabilitas respons imun tubuh. Kondisi tersebut diduga menyebabkan efektivitas imunomodulator ekstrak pada dosis 1000 mg/kgBB menjadi menurun dibandingkan dosis optimal 750 mg/kgBB (Bouayed & Bohn, 2010).

BAB V
PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh simpulan sebagai berikut:

1. Pemberian ekstrak kombinasi bunga telang biru (*Clitoria ternatea*) dan buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) berpengaruh terhadap jumlah sel sumsum tulang pada mencit (*Mus musculus*) jantan. Di antara kelompok perlakuan ekstrak, dosis 500 mg/kgBB (K4) menghasilkan rata-rata jumlah sel sumsum tulang tertinggi sehingga merupakan dosis yang paling efektif dalam meningkatkan jumlah sel sumsum tulang.
2. Pemberian ekstrak kombinasi bunga telang biru (*Clitoria ternatea*) dan buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) berpengaruh terhadap indeks organ limpa pada mencit (*Mus musculus*) jantan. Dosis 750 mg/kgBB (K5) menghasilkan rata-rata indeks organ limpa tertinggi sehingga merupakan dosis yang paling efektif dalam meningkatkan indeks organ limpa.

5.2 Saran

Adapun saran yang dapat ditulis adalah sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan optimasi dosis dan rasio kombinasi ekstrak bunga telang biru (*Clitoria ternatea*) dan buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) untuk memperoleh dosis yang lebih optimal serta meminimalkan kemungkinan efek antagonis maupun toksik akibat pemberian dosis yang terlalu tinggi..
2. Perlu dilakukan pengamatan lebih lanjut terhadap parameter imunologi lainnya, seperti jumlah leukosit, limfosit, sitokin, maupun analisis

histopatologi organ limpa untuk memperoleh informasi yang lebih lengkap mengenai aktivitas imunomodulator ekstrak kombinasi bunga telang biru (*Clitoria ternatea*) dan buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*).

3. Perlu dilakukan pengamatan lebih lanjut terkait mekanisme proliferasi sel sumsum tulang secara lebih spesifik melalui pengamatan marker proliferasi sel atau analisis molekuler yang berkaitan dengan proses hematopoiesis.
4. Penelitian selanjutnya disarankan untuk menggunakan model hewan yang diinduksi antigen atau infeksi sehingga aktivitas imunomodulator ekstrak dapat diamati pada kondisi sistem imun yang terstimulasi.
5. Penelitian selanjutnya disarankan untuk menggunakan sumber sumsum tulang selain femur dan tibia, seperti vertebra (tulang belakang) atau sternum, guna membandingkan jumlah sel yang diperoleh serta aktivitas hematopoiesis pada masing-masing lokasi.

DAFTAR PUSTAKA

Abidin, Z., Manah, N., Hadi, Saugi, N., Fuad, F., Mazni, & H, H. (2019). The colour stability of natural blue dye extracted from Clitoria ternatea L. in poly(acrylamide-co-acrylic acid) coating film. *Pigment Resin Technol*, *48*, 265–271.

Abood, W. (2017). Immunomodulatory and Natural Immunomodulators. *Journal of Allergy and Inflammation*, *1*(2), 1–6.

Addi, M., Elbouzidi, A., Abid, M., Tungmunnithum, D., Elamrani, A., & Hano, C. (2022). applied sciences An Overview of Bioactive Flavonoids from Citrus Fruits. *Applied Sciences*, *12*(29), 1–15.

Adebiyi, O. A., Biochemistry, A., Unit, N., & Unit, M. (2025). Growth Performance and Immune Response of Weaned Pigs Fed Diets Supplemented With Varying Levels of . *Nigerian Journal of Animal Production*, 939–943.

Aden, A. Z., & Rifa'i, M. (2014). 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. *J Exp Life Sci*, *4*(2), 2–7.

Al-Hifnawi, M. I., & Utsman, M. H. (2020). *Tafsir Al-Qurtubi*. Pustaka Azzam.

Al Namani, J., Baqir, E., Al Abri, A., Al Hubaishi, T., Husain, A., & Khan, S. A. (2018). Phytochemical screening, phenolic content and antioxidant activity of citrus aurantifolia l. Leaves grown in two regions of oman. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *14*(1), 27–34.

Albuquerque, B. R., Prieto, M. A., Barreiro, M. F., Rodrigues, A., Curran, T. P., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Catechin-based extract optimization obtained from Arbutus unedo L. fruits using maceration/microwave/ultrasound extraction techniques. *Industrial Crops and Products*, *95*, 404–415.

AN, T., Dolgalev, I., Hu, H., & al, et. (2019). The bone marrow micro environment at single-cell resolution. *Nature*.

Anggia Destiawan, R., Imroatul Muflihah, A., Hidayati, S., Hariani Nurjanah, M., Sandi Basuki, A. O., Asista Indarusanti, D., Hayati, F., & Amalia, N. (2024). Effect of *Clitoria ternatea* Infusion on the Neutrophil Cells and Lymphocyte Cells in a Model of *Salmonella typhimurium* Infection. *Jurnal Biosains Pascasarjana*, *26*(2), 185–192. https://doi.org/10.20473/jbp.v26i2.2024.185-192

Aprikou, J., & Briggs, O. (2018). *Citrus aurantifolia* (Lime) Juice Negatively Influences Estrous Cycle of Wistar Rats. *Journal of Pharma*, *8*(1), 38–43.

Ashok, A., MacPhail, A. I., Giles, M. L., & Gardiner, B. J. (2026). Preventing infections in immunosuppressed patients. *Australian Prescriber*, *49*(1), 22–29. https://doi.org/10.18773/austprescr.2026.003

Audina, N., Muniroh, M., Kusumaningrum, N., M, F. E. P., & Yuniati, R. (2023). *Clitoria ternatea* Extract as Adjuvant Therapy on Reducing IL – 6 Levels in Reversal Reaction. *Biosaintifika*, *15*(1), 105–111.

AVMA Panel on Euthanasia. (2020). AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition. *AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals*.

Azwanida, N. (2015). Medicinal & Aromatic Plants A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants , Principle , Strength and Limitation. *Medicinal*

& Aromatic Plants, *4*(3), 3–8. https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196

Bakowska-Barczak, A. (2005). Acylated anthocyanins as stable, natural food colorants - A review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, *14*, 107–116.

Barrowclough, R. A. (2015). The Effect of Berry Consumption on Cancer Risk. *Journal of Nutritional Health & Food Engineering*, *2*(1), 1–9.

Bégay, V., Cirovic, B., Barker, A. J., Klopfleisch, R., Hart, D. W., Bennett, N. C., Lewin, G. R., & Lewin, G. R. (2022). Immune competence and spleen size scale with colony status in the naked mole-rat. *Open Biology*, *12*.

Belyasvsky, A., Petinati, N., & Drize, N. (2021). Hematopoiesis During Ontogenesis, Adult Life, an Aging. *Int J Mol Sci*, *22*.

Bishoyi, A. K., & Geetha, K. A. (2012). Polymorphism in flower colour and petal type in Aparajita (Clitoria ternatea). *Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, *3*(2), 11–14.

Boggs, D. (1984). The total marrow mass of the mouse: A simplified method of measurement. *American Journal of Hematology*, *16*(3), 277–286.

Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(2), S33–S40. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017

Bouayed, J., & Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants — Double-edged swords in cellular redox state Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *3*(4), 228–237. https://doi.org/10.4161/oxim.3.4.12858

Brunton, L., Hilal-Dandan, R., & Knollman, B. (2018). *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (13th ed). McGraw Hill.

Budiasih, K. S. (2017). Kajian Potensi Farmakologis Bunga Telang (Clitoria ternatea). *Prosiding Seminar Nasional Kimia UNY*, *4*, 201–206.

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.

Busch, K., Klapproth, K., Barile, M., Flossdorf, M., Holland-Letz, T., Schlenner, S. M., Reth, M., Höfer, T., & Rodewald, H.-R. (2015). Fundamental properties of unperturbed haematopoiesis from stem cells in vivo. *Nature*, *518*(7540), 542–546. https://doi.org/10.1038/nature14242

Caesar, L. K., & Cech, N. B. (2019). Synergy and antagonism in natural product extracts: when 1 + 1 does not equal 2. *Natural Product Reports*, *36*(6), 869–888. https://doi.org/10.1039/c9np00011a

Cahyaningsih, E. (2019). Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Bunga Telang (Clitoria ternatea L.) dengan Metode Spektrofotometer UV-Vis. *Jurnal Ilmiah Medicamento*, *5*(1).

Cahyaningsih, E., Era, S. K. P., & Santoso, P. (2019). Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Bunga Telang (Clitoria Ternatea L.) dengan Metode Spektrofotometri Uv-Vis. *Jurnal Ilmiah Medicamento*, *5*(1), 51–57.

Calabrese, E. J. (2018). Hormesis : Path and Progression to Significance. *Internaional Journal of Molecular Sciences*, *19*(1), 1–15. https://doi.org/10.3390/ijms19102871

Calabrese, E. J., Hayes, A. W., Pressman, P., Dhawan, G., Kapoor, R., Agathokleous, E., & Calabrese, V. (2024). Quercetin induces its chemoprotective effects via hormesis. *Food and Chemical Toxicology*, *184*, 114419. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.114419

Calder, P. C. (2021). Nutrition and Immunity : Lessons for COVID-19. *Nutrition and Diabetes*, *11*(19), 1–8. https://doi.org/10.1038/s41387-021-00165-0

Calder, P. C., Carr, A. C., Gombart, A. F., & Eggersdorfer, M. (2020). Reply to "comment on: Optimal nutritional status for a well-functioning immune system is an important factor to protect against viral infections. nutrients 2020, 12, 1181." *Nutrients*, *12*(8), 1–3. https://doi.org/10.3390/nu12082326

Campanati, A., Marani, A., Martina, E., Diotallevi, F., Radi, G., & Offidani, A. (2021). Psoriasis as an Immune-Mediated and Inflammatory Systemic Disease: From Pathophysiology to Novel Therapeutic Approaches. *Biomedicines*, *9*(11). https://doi.org/10.3390/biomedicines9111511

Campbell, S. M., Pearson, B., & Marble, C. (2019). Butterfly Pea (Clitoria ternatea) Flower Extract (BPFE) and Its Use as a pH-Dependent Natural Colorant 1. *IFAS Extencion*. https://doi.org/10.32473/edis-ep573-2019

Carr, A. C., & Maggini, S. (2017). Vitamin C and immune function. *Nutrients*, *9*(11), 1–25. https://doi.org/10.3390/nu9111211

Catlin, S. N., Busque, L., Gale, R. E., Guttorp, P., & Abkowitz, J. L. (2011). The replication rate of human hematopoietic stem cells in vivo. *Blood*, *117*(17), 4460–4466. https://doi.org/10.1182/blood-2010-08-303537

Chaachouay, N. (2025). Synergy, Additive Effects, and Antagonism of Drugs with Plant Bioactive Compounds. *Drugs and Drug Candidates*, *4*, 4. https://doi.org/10.3390/ddc4010004

Challen, G. (2009). Mouse hematopoietic stem cell identification and analysis. *Cytometry Part A*, *16*(3), 277–286.

Chandrajith, G., Gamage, V., Lim, Y. Y., & Choo, W. S. (2021). Anthocyanins From Clitoria ternatea Flower : Biosynthesis , Extraction , Stability , Antioxidant Activity , and Applications. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 1–17. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.792303

Chen, C., Su, X., & Hu, Z. (2019). Immune promotive effect of bioactive peptides may be mediated by regulating the expression of SOCS1/miR-155. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *18*(3), 1850–1862. https://doi.org/10.3892/etm.2019.7734

Chen, D. (2010). Regulation of p27Kip1 expression by natural compounds in cancer cells. *Cancer Letters*, *290*(1), 1–10.

Chorilli, M., Paganotte, D., & Salgado, H. (2009). Animais de laboratório: o camundongo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, *28*.

Chowdhury, M., Hossain, N., Kashem, M., Shahid, A., & Alam, A. (2020). Immune response in COVID-19. *Journal of Infection and Public Health*, *13*, 1619–1629.

Christ, A., Gu, P., Schultze, J. L., Latz, E., Lauterbach, M. A. R., Duewell, P., Biswas, D., Pelka, K., Ulas, T., Moorlag, S. J. C. F. M., Kumar, V., Park, M. H., Joosten, L. A. B., & Groh, L. A. (2018). Article Western Diet Triggers NLRP3-Dependent Innate Immune Reprogramming. *Cell*, *11*, 162–175. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.013

Christopher, M., Rao, L., Woloszynek, J., & Link, D. (2011). Expression of the G-CSF receptor in monocytic cells is sufficient to mediate hematopoietic progenitor mobilization by G-CSF in mice. *The Journal of Experimental Medicine*, *208*(2), 251–260.

Chrysikopoulou, V., Rampaouni, A., & Adamantidi, T. (2026). Beneficial synergistic roles of flavonoids and vitamin C against inflammatory complications, cancer, and cardiovascular diseases: A comprehensive review. *Applied Sciences*, *16*(4), 1838.

Corbin, E., & Vicente, J. (2008). Spleen mass as a measure of immune strength in mammals. *Mammal*, *38*(1), 108–115. https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.2007.00112.x

Ćujić, N., Šavikin, K., Janković, T., Pljevljakušić, D., Zdunić, G., & Ibrić, S. (2016). Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food Chemistry*, *194*, 135–142.

Czech, A., Malik, A., Sosnowska, B., & Domaradzki, P. (2021). Bioactive Substances, Heavy Metals, and Antioxidant Activity in Whole Fruit, Peel, and Pulp of Citrus Fruits. *Int. J. Food Sci.*, *2021*, 6662259. https://doi.org/10.1155/2021/6662259

Daniel, O., Digyo, K., Studi, P., Kedokteran, S., & Medik, D. M. (2024). Aktivitas Imunomodulator Infusa Ginseng Jawa (Talinum paniculatum) pada Mencit (Mus musculus). *Jurnal Veteriner Dan Biomedis*, *2*(1), 1–8.

de Morais, J. S., Sant'Ana, A. S., Dantas, A. M., Silva, B. S., Lima, M. S., Borges, G. C., & Magnani, M. (2020). Antioxidant activity and bioaccessibility of phenolic compounds in edible flowers through a simulated intestinal barrier. *Food Research International*, *131*. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109046

Djokic, V., Akoolo, L., Parveen, & N. (2018). Babesia microti infection changes host spleen architecture and is cleared by a Th1 immune response. *Front*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00085

Erjon, Sari, E. R., & Triyani, R. (2022). Efek Imunostimulan Ekstrak Etanol Daun Jengkol (*Archidendron jiringa* (Jack) I.C. Nielsen) Pada Mencit Jantanh. *Jurnal Ilmiah Farmasi Farmasyifa*, *5*(1), 62–70. https://doi.org/10.29313/jiff.v5i1.7704

Escher, G. B., Marques, M. B., do Carmo, M. A. V, Azevedo, L., Furtado, M. M., Sant'Ana, A. S., da Silva, M. C., Genovese, M. I., Wen, M., Zhang, L., Oh, W. Y., Shahidi, F., Rosso, N. D., & Granato, D. (2020). *Clitoria ternatea* L. petal bioactive compounds display antioxidant, antihemolytic and antihypertensive effects, inhibit α-amylase and α-glucosidase activities and reduce human LDL cholesterol and DNA induced oxidation. *Food Research International*, *128*, 108763.

Ezeigwe, O., & Ani, O. N. (2022). Toxicological Studies of *Citrus aurantifoli*a Fruit Juice in Wistar Rats. *Asian Journal of Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*, *10*(4), 39–47. https://doi.org/10.9734/ajbgmb/2022/v10i430251

Fauziah, P., Mainassy, M., Ode, I., Affandi, I., Cesa, F., Umar, F., & Prajawanti, K. (2023). *Imunologi* (E. Damayanti (ed.); I). Penerbit Widina Bhakti Persada.

Field, A. (2009). *Discovering Statistics Using SPSS* (3rd ed.). SAGE Publications.

Friedewald, V. E. J., Cather, J. C., Gordon, K. B., Kavanaugh, A., Ridker, P. M., & Roberts, W. C. (2008). The editor's roundtable: psoriasis, inflammation, and

coronary artery disease. *The American Journal of Cardiology*, *101*(8), 1119–1126. https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2007.11.032

Fulzele, K., Krause, D., Panaroni, C., Saini, V., & Barry, K. (2013). Myelopoiesis is regulated by osteocytes through Gsalpha-dependent signaling. *Blood*, *121*, 930–939.

Galati, G., & O'Brien, P. J. (2004). Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Biology and Medicine*, *37*(3), 287–303. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.034

Ginwala, R., Bhavsar, R., Chigbu, D. G. I., Jain, P., & Khan, Z. K. (2019). Potential role of flavonoids in treating chronic inflammatory diseases with a special focus on the anti-inflammatory activity of apigenin. *Antioxidants*, *8*(2), 1–28.

Grigore, A. (2017). *Plant phenolic compounds as immunomodulatory agents*. Intech Open.

H, R., Ritter, J., Flower, R., & Henderson, G. (2016). *Rang & Dale's Pharmacology* (8th ed). Elseiver.

Habibullah, E. (2018). Prinsip-Prinsip Muamalah dalam Islam. *Ad-Deenar: Jurnal Perbankan Syariah*, *2*(1), 25–48.

Hadidi, A. Y. M. (2016). *Tafsir Al-Quran Al-Karim Hidayatul Insan Bi Tafsir Al Quran* (4th ed.). Tafsir Al Qur'an Al Karim.

Hanafiah, K. A. (2016). *Rancangan Percobaan*. Raja Grafindo Persada.

Handito, D., Basuki, E., Saloko, S., Dwikasari, L. G., & Triani, E. (2022). Analisis Komposisi Bunga Telang (Clitoria ternatea) Sebagai Antioksidan Alami Pada Produk Pangan. *Prosiding SAINTEK LPPM Universitas Mataram*, *4*.

Haryadi, N. (2018). *Jeruk-jeruk Bumbu*. Pustaka Baru.

Hassan, I., Dorjay, K., & Anwar, P. (2015). Thalidomide in dermatology: revisited. *Indian Journal of Dermatology*, *60*(2), 213. https://doi.org/10.4103/0019-5154.152580

Havananda, T., & Luengwilai, K. (2019). Variation in Floral Antioxidant Activities and Phytochemical Properties among Butterfly Pea (Clitoria ternatea L.) Germplasm. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *66*, 645–658.

Helbling, P. M., Pin, E., Gerosa, R., Boettcher, S., & Manz, M. G. (2019). Global Transcriptomic Profiling of the Bone Marrow Stromal Microenvironment during Postnatal Resource Global Transcriptomic Profiling of the Bone Marrow Stromal Microenvironment during Postnatal Development , Aging , and Inflammation. *Cell Reports Resource*, *29*, 3313–3330. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.11.004

Hemilä, H. (2017). Vitamin C and Infections. *Nutrients*, *9*(4). https://doi.org/10.3390/nu9040339

Hermida, M. E., Vilas, C., Melo, B. De, & Lima, S. (2018). Histological Disorganization of Spleen Compartments and Severe Visceral Leishmaniasis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *8*(November), 1–10. https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00394

Ho, Y.-H., & Méndez-Ferrer, S. (2020). Microenvironmental contributions to hematopoietic stem cell aging. *Haematologica*, *105*(1), 38–46.

https://doi.org/10.3324/haematol.2018.211334

Hole, C. R., Wager, C. M. L., Castro-lopez, N., Campuzano, A., Cai, H., Wozniak, K. L., Wang, Y., & Jr, F. L. W. (2019). Induction of Memory-like Dendritic Cell Responses in Vivo. *Nature Communications*, *10*, 1–13. https://doi.org/10.1038/s41467-019-10486-5

Hosseinzade, A., Sadeghi, O., Biregani, A. N., Regulatory, C. D., & Through, C. (2019). Immunomodulatory Effects of Flavonoids : Possible Induction of T CD4 + Regulatory Cells Through Suppression of mTOR Pathway Signaling Activity. *Frontiers in Immunology*, *10*(January), 1–12. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00051

Hu, T., Liu, C., Lei, M., Zeng, Q., Li, L., Tang, H., & Zhang, N. (2024). Metabolic regulation of the immune system in health and diseases : mechanisms and interventions. *Springer Nature*, *9*(268). https://doi.org/10.1038/s41392-024-01954-6

Ibn Kathir. (2003). *Tafsir al-Qur'an al-'Azhim*. Dar al-Fikr.

Imran, R. (2023). The Complex Interplay of the Immune System in Fighting Infections. *International Journal of Clinical Rheumatology*, *18*(7), 176–179. https://doi.org/10.37532/1758-4272.2023.18(7).176-179

Indriyani, N. N., Anshori, J. Al, Permadi, N., Nurjanah, S., & Julaeha, E. (2023). Bioactive Components and Their Activities from Different Parts of Citrus aurantifolia (Christm.) Swingle for Food Development. *Foods*, *12*(2036).

Islam, S., Monir, S. B., Haque, N., Feroz, F., Acharjee, M., & Pan, F. (2025). Immunometabolic crossroads : infections as bidirectional modulators in diabetes and metabolic syndromes. *Frontiers in Immunology*, *December*, 1–16. https://doi.org/10.3389/fendo.2025.1710157

Iwo, M. I. (2024). *Orasi Ilmiah Guru Besar Institut Teknologi Bandung: Pengembangan Industri Berbasis Lignoselulosa* (R. Lestari (ed.); I). ITB PRESS. www.itbpress.id

Izah, S., Richard, G., & Tamaraukepreye, C. (2024). Citrus aurantifolia: Phytochemical Constituents, Food Preservative Potentials, and Pharmacological Values. *Reference Series in Phytochemistry*, 333–358.

Janeway, C., Travers, P., & Walport, M. (2001). *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease.* (5th editio). Garland Science. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27123/?utm_source=chatgpt.com

Jang, Y., & Koh, E. (2023). Lemon juice improved color acceptance of aronia (Aronia melanocarpa) pound cake by copigmentation. *Food Science and Biotechnology*, *32*(11), 1531–1539. https://doi.org/10.1007/s10068-023-01286-1

Jang, Y., & Sharkis, S. J. (2007). Stem Cells in Hematology A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood*, *110*(8), 3056–3063. https://doi.org/10.1182/blood-2007-05-087759.An

Jeng, K. C. G., Yang, C. S., Siu, W. Y., Tsai, Y. S., Liao, W. J., & Kuo, J. S. (1996). Supplementation with vitamins C and E enhances cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in healthy adults. *American Journal of Clinical Nutrition*, *64*(6), 960–965. https://doi.org/10.1093/ajcn/64.6.960

Jeyaraj, E. J., Lim, Y. Y., & Choo, W. S. (2022). and antibacterial activities of Clitoria ternatea flower extracts and anthocyanin - rich fraction. *Scientific Reports*, 1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-022-19146-z

Jeyaraj, E., Lim, Y., & Choo, W. (2021). Extraction methods of butterfly pea (Clitoria ternatea) flower and biological activities of its phytochemicals. *Journal Science Technology*, *58*, 2054–2067.

Jia, D., Lu, W., Wang, C., Sun, S., Cai, G., Li, Y., Wang, G., Liu, Y., Zhang, M., & Wang, D. (2016). Investigation on Immunomodulatory Activity of Calf Spleen Extractive Injection in Cyclophosphamide-induced Immunosuppressed Mice and Underlying Mechanisms. *Scandinavian Journal of Immunology*, *84*(1), 20–27. https://doi.org/10.1111/sji.12442

Jiang, W. E. I., Li, Y. U., Zhang, S., Kong, G., & Li, Z. (2021). Association between cellular immune response and spleen weight in mice with hepatocellular carcinoma. *Oncology Letters*, *22*(625), 1–10. https://doi.org/10.3892/ol.2021.12886

Jiang, W. E. I., Li, Y. U., Zhang, S., Kong, G., Penelitian, P., & Gabungan, R. (2021). Association Between Cellular Immune Response and Spleen Weight in Mice with Hepatocellular Carcinoma. *Oncology Letters*, *22*(625), 1–10. https://doi.org/10.3892/ol.2021.12886

Jin, S., Yang, M., Kong, Y., Yao, X., & Wei, Z. (2011). Microwave-assisted extraction of flavonoids from Cajanus cajan leaves. *Zhongcaoyao*, *42*(11), 2235–2239.

Johnson, A., Ziegler, R., & Hawley, L. (2010). *Microbiology and Immunology* (5 th editi). Lippincot Williams& WLKINS.

JY, 10.3390/ijms22179231 Lee, cells, H. S. H. stem, & regeneration, their roles in tissue. (2020). Int J Stem Cells. *2020*, *13:1-*. https://doi.org/10.3390/ijms22179231

Katzung, B. (2018). *Basic and Clinical Pharmacology* (14th. ed). McGraw-Hill Companies, Inc.

Kazuma, K., Noda, N., & Suzuki, M. (2003a). Malonylated Flavonol Glycosides from the Petals of Clitoria ternatea. *Phytochemistry*, *62*, 229–237.

Kazuma, K., Noda, N., & Suzuki, M. (2003b). Flavonoid composition related to petal color in different lines of Clitoria ternatea. *Phytochemistry*, *64*(6), 1133–1139. https://doi.org/10.1016/s0031-9422(03)00504-1

Kessler, B., Rinchai, D., Kewcharoenwong, C., Nithichanon, A., Biggart, R., Hawrylowicz, C. M., Bancroft, G. J., & Lertmemongkolchai, G. (2017). Interleukin 10 inhibits pro-inflammatory cytokine responses and killing of Burkholderia pseudomallei. *Scientific Reports*, *7*, 42791. https://doi.org/10.1038/srep42791

Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., & Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research*, *61*(1), 1361779. https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1361779

Khumairoh, L. (2020). *Perbedaan Pelarut Etanol 96% dan Etil Asetat pada Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Bunga Telang (Clitoria ternat*. Universitas Ngudi Waluyo, Ungaran.

Kim, J. E., Cho, H. S., Yang, H. S., Jung, D. J., Hong, S. W., Hung, C. F., Lee, W. J., & Kim, D. (2012). Depletion of ascorbic acid impairs NK cell activity against ovarian cancer in a mouse model. *Immunobiology*, *217*(9), 873–881. https://doi.org/10.1016/j.imbio.2011.12.010

King, K. Y., & Goodell, M. A. (2011). Inflammatory modulation of HSCs: viewing the HSC as a foundation for the immune response. *Nature Reviews Immunology*, *11*(10), 685–692. https://doi.org/10.1038/nri3062

Kirana, I. D. A., Bodhi, W., Lebang, J. S., & Fatimawati. (2023). Uji AKtivitas Fagosistosis Makrofag dari ekstrak Kulit Buah Jeruk Nipis (Citrus aurantifolia) Sebagai Imunomodulator. *Jurnal Kesehatan Tambusai*, *4*(September), 3021–3027.

Kopp, W. C. (1990). The immune functions of the spleen. In *In: The Spleen: Structure, Function and Clinical Significance* (pp. 103–126). Chapman & Hall Medical.

Kyaw, H., M., Holmes, M., E., Toolis, F., Wayne, B., Chalmers, J., Jones, & G., I. (2006). Evaluation of severe infection and survival after splenectomy. *Am*. https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2005.07.044

Laurenti, E., & Göttgens, B. (2018). From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature*, *553*(7689), 418–426. https://doi.org/10.1038/nature25022

Lee, S. J., Chinen, J., & Kavanaugh, A. (2010). Immunomodulator therapy: monoclonal antibodies, fusion proteins, cytokines, and immunoglobulins. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(2 Suppl 2), S314—23. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.08.018

Lei, L., Li, Y., Li, M., Xin, H., Tian, X., Zhang, Y., Shi, W., & Cong, B. (2024). Pathological changes in the spleen of mice subjected to different time courses of restraint stress. *Scientific Reports*, *361*, 1–9. https://doi.org/10.1038/s41598-024-64475-w

Lewis, S. M., Williams, A., & Eisenbarth, S. C. (2019). Structure and function of the immune system in the spleen. *Science Immunology*, *4*(33), eaau6085. https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aau6085

Lewis, S. M., Williams, A., Eisenbarth, S. C., Haven, N., Haven, N., & Sciences, G. (2019). Structure-function of the immune system in the spleen. *Sci Immunol*, *4*(33), 1–25. https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aau6085.Structure-function

Li, Y., Yao, J., Han, C., Yang, J., Chaudhry, M. T., Wang, S., Liu, H., & Yin, Y. (2016). Quercetin , Inflammation and Immunity. *Nutrients*, *8*(3), 1–14. https://doi.org/10.3390/nu8030167

Liu, P., Li, W., Hu, Z., Qin, X., & Liau, G. (2020). Isolation, purification, identification, and stability of anthocyanins from Lycium ruthenicum. *LWT*, *126*. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109334

Loizzo, M. R., Tundis, R., Bonesi, M., Menichini, F., De Luca, D., Colica, C., & Menichini, F. (2012). Evaluation of Citrus aurantifolia Peel and Leaves Extracts for Their Chemical Composition, Antioxidant and Anti-Cholinesterase Activities. *J. Sci. Food Agric.*, *92*, 2960–2967. https://doi.org/10.1002/jsfa.5634

Long, A., Kleiner, A., & Looney, R. J. (2023). Immune dysregulation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *151*(1), 70–80.

https://doi.org/10.1016/j.jaci.2022.11.001

Long, J., Lai, H., Huang, Y., You, F., & Jiang, Y. (2025). Unraveling the pathogenesis of bone marrow hematopoietic injury and the therapeutic potential of natural products. *Pharmacological Research*, *212*(January), 107589. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2025.107589

Lu, C., Li, Y., Cui, Y., Ren, J., Qi, F., & Qu, J. (2021). Isolation and functional analysis of genes involved in polyacylated anthocyanin biosynthesis in blue Senecio cruentus. *Frontiers in Plant Science*, *12*. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.640746

Lucas, D. (2021). Structural Organization of the Bonemarrow and its Role in Hematopoiesis. *Curr Opin Hematol*, *28*, 36–42.

Manful, C. F., Fordjour, E., Subramaniam, D., Sey, A. A., Abbey, Lord, & Thomas, R. (2025). Antioxidants and Reactive Oxygen Species : Shaping Human Health and Disease Outcomes. *International Journal of Molecular Sciences*, *26*(7520), 1–42.

Manjula, P., Mohan, C. H., Sreekanth, D., Keerthi, B., & Devi, B. P. (2013). Phytochemical Analysis of Clitoria ternatea Linn., a Valuable Medicinal Plant. *Journal of Indian Botany*, *92*, 173–178.

Marangatua, P. (2008). *Penampilan Reproduksi Mencit (Musmusculus) yang Diberi Daun Torbangun (Coleus amboinicuslour) dan Taraf sop Daun Torbangun Kering*. Program Studi Teknologi Produksi Ternak Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor.

Mattson, M. P. (2008). Hormesis defined. *Ageing Research Reviews*, *7*(1), 1–7. https://doi.org/10.1016/j.arr.2007.08.007

MCALLAN, B. M., WESTMAN, W., CROWTHER, M. S., & DICKMAN, C. R. (2008). Morphology, growth and reproduction in the Australian house mouse: differential effects of moderate temperatures. *Biological Journal of the Linnean Society*, *94*(1), 21–30. https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2008.00977.x

Mccomb, S., Canada, C., Thiriot, A., & Krishnan, L. (2019). Introduction to the Immune System. *Methods Mol Biol*, 1–24. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9597-4

McConnell, E. L., Basit, A. W., & Murdan, S. (2008). Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *60*(1), 63–70. https://doi.org/10.1211/jpp.60.1.0008

Mebius, E., R., Kraal, & G. (2005). Structure and function of the spleen. *Nat*. https://doi.org/10.1038/nri1669

Meisyayati, S., Apriyanto, W., & Rikmasari, Y. (2016). Efek Imunomodulator Jus Herbal Kombinasi Bawang Putih, Jahe Merah, Jeruk Nipis, Cuka Apel Dan Madu Terhadap Mencit Putih Jantan. *Jurnal Ilmiah Bakti Farmasi*, *1*(2), 59–66.

Mendelson, A., & Frenette, P. S. (2014). Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. *Nature Medicine*, *20*(8), 833–846. https://doi.org/10.1038/nm.3647

Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. (2009). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Oxid Med Cell Longev*, *2*(5), 272–278.

Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells. *Pharmacological Reviews*, *52*(4), 673–751.

Mikirova, N., Casciari, J., Rogers, A., & Taylor, P. (2012). Effect of high-dose intravenous vitamin C on inflammation in cancer patients. *Journal of Translational Medicine*, *10*(1), 1. https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-189

Mitroulis, I., Kalafati, L., Hajishengallis, G., & Chavakis, T. (2018). Myelopoiesis in the Context of Innate Immunity. *Journal of Innate Immunity*, *10*(5–6), 365–372. https://doi.org/10.1159/000489406

MJ, K., Iwashita, T., ÖH, Y., & SJ, M. (2005). Spatial differences in hematopoiesis but not in stem cells indicate a lack of regional patterning in definitive hematopoietic stem cells. *Dev Biol*.

Mohammed, R. M. O., & Ayoub, S. M. H. (2016). Study of Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of Citrus aurantifolia Seed Extracts. *American Journal of Analytical Chemistry*, *7*, 254–259. https://doi.org/10.4236/ajac.2016.73023

Mokarizadeh, A., Faryabi, M. R., Rezvanfar, M. A., & Abdollahi, M. (2015). A comprehensive review of pesticides and the immune dysregulation : mechanisms , evidence and consequences. *Informa Healthcare*, *6516*(4), 258–278. https://doi.org/10.3109/15376516.2015.1020182

Moore, S. L., & Wilson, K. (2002). Parasites as a viability cost of sexual selection in natural populations of mammals. *Science*, *297*, 2015–2017.

Moreau, J. (2017). *B Cell Dynamics within the Bone Marrow Microenvironment: Comparisons of Inflammation and Steady State [Thesis]*. *Canada*. University of Toronto.

Morrison, S., & Scadden, T. (2014). The Bone Marrow Nichen for Hematopoietic Stem Cell. *Nature*, *505*(34).

Mukherjee, P. K., Kumar, V., Kumar, N. S., & Heinrich, M. (2008). The Ayurvedic medicine Clitoria ternatea--from traditional use to scientific assessment. *Journal of Ethnopharmacology*, *120*(3), 291–301. https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.09.009

Musser, G., Hutterer, R., Kryštufek, B., Yigit, N., & Mitsainas, G. (2021). Mus musculus (amended version of 2016 assessment). *The IUCN Red List of Threatened Species*, *8235*. https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2021-1.RLTS.T13972A197519724.en

Nader, D. (2017). Immunomodulation Mechanisms in Disease and in the Surgical Patient. *Immunological Investigations*, *46*(8), 765–768.

Nagareddy, P., Murphy, A., Stirzaker, R., Hu, Y., Yu, S., & Miller, R. (2013). Hyperglycemia promotes myelopoiesis and impairs the resolution of atherosclerosis. *Cell Metab*, *17*, 695–708.

Nair, V., Bang, W. Y., Schreckinger, E., Andarwulan, N., & Cisneros-Zevallos, L. (2015). Protective Role of Ternatin Anthocyanins and Quercetin Glycosides from Butterfly Pea (Clitoria ternatea Leguminosae) Blue Flower Petals against Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Inflammation in Macrophage Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(28), 6355–6365.

Neda, G. D., Rabeta, & Ong, M. T. (2013). Chemical Composition and Anti-Proliferative Properties of Flowers of Clitoria ternatea. *International Food*

Research Journal, *20*, 1229–1234.

Nugraha, A. P., Rahmadhani, D., Shoffa, M., Rizqianti, Y., Kharisma, V., & Ernawati, D. (2021). Molecular docking of anthocyanins and ternatin in Clitoria ternatea as coronavirus disease oral manifestation therapy. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, *12*(4), 362–367. https://doi.org/10.4103/japtr.japtr

Oancea, S., & Draghici, O. (2013). pH and Thermal Stability of Anthocyanin-based Optimised Extracts of Romanian Red Onion Cultivars. *Czech Journal of Food Sciences*, *31*, 283–291. https://doi.org/10.17221/302/2012-CJFS

Okwu, D., & Emenike, I. (2013). Nutritive Value and Mineral Content of Different Varieties of Citrus Fruits. *Journal of Food Technology*.

Patil, U. S., Jaydeokar, A. V, & Bandawane, D. D. (2012). Immunomodulators: A pharmacological review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, *4*, 30–36.

Peterson, J. J., Beecher, G. R., Bhagwat, S. A., Dwyer, J. T., Gebhardt, S. E., Haytowitz, D. B., & Holden, J. M. (2006). Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis*, *19*, S74–S80. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.12.009

Petrunov, B., Nenkov, P., & Shekerdjiisky, R. (2007). The role of immunostimulants in immunotherapy and immunoprophylaxis. *Biotechnol Biotechnol Equip*, *2*(4), 454–462.

Phucharoenrak, P., Muangnoi, C., & Trachootham, D. (2022). A Green Extraction Method to Achieve the Highest Yield of Limonin and Hesperidin from Lime Peel Powder (Citrus aurantifolia). *Molecules*, *27*, 820. https://doi.org/10.3390/molecules27030820

Piccinelli, A. L., García Mesa, M., Armenteros, D. M., Alfonso, M. A., Arevalo, A. C., Campone, L., & Rastrelli, L. (2008). HPLC-PDA-MS and NMR characterization of C-glycosyl flavones in a hydroalcoholic extract of Citrus aurantifolia leaves with antiplatelet activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(5), 1574–1581. https://doi.org/10.1021/jf073485k

Pinho, S., Tony, M., Yang, E., Wei, Q., Caus, N., & Frennete, P. (2018). Lineage-biased, hematopoietic stem cells are regulated by distinct niches. Developmental Cell. *Cell Press*, *44*, 634–641.

Pisoschi, A., & Negulescu, G. (2012). Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, *01*. https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000106

Poulose, S. M., Harris, E. D., & Patil, B. S. (2005). Citrus limonoids induce apoptosis in human neuroblastoma cells and have radical scavenging activity. *The Journal of Nutrition*, *135*(4), 870–877. https://doi.org/10.1093/jn/135.4.870

POWO. (2024). *Plants of the World Online*. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. https://powo.science.kew.org/.

Purwaniati, A. R., Arif, R., & Yuliantini, A. (2020). Analisis kadar antosianin total pada sediaan bunga telang (Clitoria ternatea L.) dengan metode pH diferensial menggunakan spektrofotometri visible. *Jurnal Farmagazine*, *7*(1).

Putra, R. A. (2024). The Role of Innate Immunity against Mycobacterium Leprae : A Systematic Literature. *Scientific Journal of Dermatology and Venereology*, *2*(1), 31–37. https://doi.org/https://doi.org/10.59345/sjdv.v1i2.47

Pyrzynska, K. (2022). Hesperidin: A Review on Extraction Methods, Stability and Biological Activities. *Nutriens*, *14*(2387), 1–11.

Rahadianti, D., Kedokteran, F., & Islam, U. (2022). Sistem Imunitas Alamiah dan Sistem Imunitas Adaptif. *Nusantara Hasana Journal*, *2*(3), 98–106.

Rahmad. (2025). Fiqih Muamalah dan Fiqih Lingkungan dalam Menjawab Tantangan Ekonomi Digital dan Pelestarian Alam. *Jurnal Tahqiqa*, *19*(1).

Rahmah, S., Ramdan, K., & Wulandari, R. (2023). Determination of Anthocyanin Levels in Telang Flower (Clitoria Ternatae) Using the Differential pH Method Based on Three Types of Solvents. *Jurnal Kesehatan*, *10*(01), 45–53.

Ramadaini, K., Azizah, Z., Zulharmita, & Rivai, H. (2020). Overview of Pharmacology and Product Development of Lime (Citrus aurantifolia) Rind. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Medicine*, *5*(12), 35–45.

Ramadhan, A. (2018). *Uji Aktivitas Ekstrak Lemon (Citrus limon) sebagai Imunomodulator pada Sistem Imunitas Mencit Model Balb/C*. Universitas Brawijaya.

Research, C. for C. M. (2025). *BALB/c Mouse Strain Data*. The University of Hong Kong. https://ccmr.hku.hk/en/Animals/Animals/Animal-Strains/Mouse/BALBc?utm_source=chatgpt.com

Robb, L. (2007). Cytokine Receptors and Hematopoietic Differentiation. *Oncogone*, *26*(23).

Romaniuk, A., Lyndina, Y., Sikora, V., & Lyndin, M. (2016). Structural features of bone marrow. *Interventional Medicine & Applied Science*, *8*(3), 121–126. https://doi.org/10.1556/1646.8.2016.3.3

Ruddle, N. H., & Akirav, E. M. (2009). Secondary lymphoid organs: responding to genetic and environmental cues in ontogeny and the immune response. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *183*(4), 2205–2212. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804324

Sa'adah, N. N., Indiani, A. M., Nurhayati, A. P. D., & Ashuri, N. M. (2020). Bioprospecting of parijoto fruit extract (Medinilla speciosa) as antioxidant and immunostimulant: Phagocytosis activity of macrophage cells. *AIP Conference Proceedings*, *2260*(1).

Safhi, F. A., Alshamrani, S. M., Jalal, A. S., Awad, N. S., Sabit, H., Abdelgawad, F. E., Khalil, S. S., Khodeer, D. M., & Mobasher, M. A. (2022). Asian Pigeonwing Plants (Clitoria ternatea) Synergized Mesenchymal Stem Cells by Modulating the Inflammatory Response in Rats with Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury. *Pharmaceuticals*, *15*, 1–14. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ph15111396

Sahota, M. B., & Ahmed, K. (2016). a Review on a Life of Spice Turmeric (Curcuma Longa). *Sci.Int.(Lahore)*, *28*(1), 375–378.

Saprian, J., & Nurmiyanto, A. (2014). Uji Efektivitas Jeruk Nipis (Citrus aurantifolia) dalam Mempercepat Laju Disinfeksi Bakteri Escheria Coli pada Proses Solar Water Disinfection. *Jurnal Sains Dan Teknologi Lingkungan*, *6*, 14–25.

Sawai, C., Babovic, S., Upadhaya, S., Knapp, D., Lavin, Y., Lau, C., Goloborodko, A.,

& Feng, J. (2016). Hematopoietic Stem Cells Are the Major Source of Multilineage Hematopoiesis in Adult Animals. *Immunity*, *45*, 597–609.

Saxena, R., Sharma, A., Bharti, M., & Rathore, M. (2012). Immunomodulator A New Horizon : An Overview. *Journal of Pharmacy Research*, *5*(3), 2306–2310.

Schat, K. A., & Skinner, M. A. (2014). Chapter 16 - Avian Immunosuppressive Diseases and Immunoevasion. In K. A. Schat, B. Kaspers, & P. Kaiser (Eds.), *Avian Immunology (Second Edition)* (Second Edition, pp. 275–297). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396965-1.00016-9

Scheinfeld, N. (2003). Cimetidine: A Review of Recent Developments and Reports in Cutaneous Medicine. *Dermatol Online Journal*, *9*(4).

Schmidt, T., Kahn, R., & Kahn, F. (2022). Ascorbic acid attenuates activation and cytokine production in sepsis-like monocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, *112*(3), 491–498. https://doi.org/10.1002/JLB.4AB0521-243R

Schultze, J. L., Mass, E., & Schlitzer, A. (2019). Emerging Principles in Myelopoiesis at Homeostasis and during Infection and Inflammation. *Immunity*, *50*(2), 288–301. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.01.019

Schurch, C., Caraccio, C., & Nolte, M. (2021). Diversity, localization, and (patho) physiology of mature lymphocyte populations in the bone marrow. *Blood*, *137*(22), 3015–3026.

Septiana, M., Kurniasari, A., Adilah, S., Putri, J. N., Asni Akmalia, H., Amaliyah, N., Al Faroqi, R., Artikel, I., & Artikel, G. (2024). The Taxonomic Affinity of 7 members of Rutaceae Based on Morphological Characters. *Al Kawnu : Science and Local Wisdom Journal*, *4*(1), 17–23. https://doi.org/10.18592/ak.v4i1.13899

Setyadi, A. (2006). *No TitleOrgan Reproduksi dan Kualitas Sperma Mencit (Mus musculus) yang Mendapat Pakan Tambahan Kemangi (Ocimum basilicum) Segar*. Program Studi Teknologi Produksi Ternak Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor.

Shakoor, H., Feehan, J., & Apostolopoulos, V. (2021). Immunomodulatory effects of dietary polyphenols. *Nutrients*, *13*(3), 728.

Shantilal, S., Vaghela, J., & Sisodia, S. (2018). Review on Immunomodulation And Immunomodulatory Activity of Some Medicinal Plant. *Europen Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, *5*(8), 163–174.

Sharma, Y., Arora, M., & Bala, K. (2024). The potential of immunomodulators in shaping the future of healthcare. *Discover Medicine*, *1*(1), 37. https://doi.org/10.1007/s44337-024-00029-3

Sharul. (2021). *Citrus aurantifolia (Christm. & Panzer)*. Global Information Hub On Integrated Medicine. https://globinmed.com/conservation/citrus-aurantifolia-christm-a-panzer/

Sherr, C. J., & Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & Development*, *13*(12), 1501–1512.

Shevyrev, D., Tereshchenko, V., Berezina, T. N., & Rybtsov, S. (2023). Hematopoietic Stem Cells and the Immune System in Development and Aging. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(6). https://doi.org/10.3390/ijms24065862

Shihab, M. Q. (2000). *Tafsir Al-Mishbah: pesan, kesan dan keserasian Al-Qur'an* (Issue v. 4). Lentera Hati. https://books.google.co.id/books?id=i1SZNAAACAAJ

Shihab, M. Q. (2002). *Tafsir Al-Mishbah: Pesan, Kesan, dan Keserasian al-Qur'an* (Volume 15). Lentera Hati.

Singh, S., Dwivedi, R., & Chaturvedi, V. (2012). Influence of Vehicles Used for Oral Dosing of Test Molecules on the Progression of Mycobacterium tuberculosis Infection in Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *56*(11), 6026–6028. https://doi.org/10.1128/AAC.01702-12

Singleton G. R., Brown, P. R., Pech, R. P., Jacob, J., Mutze G. J., & Krebs C. J. (2005). One hundred years of eruptions of house mice in Australia – a natural biological curio. *Biological Journal of the Linnean Society*, *84*(3), 617–627. https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2005.00458.x

Siswati, A. S., Rini, L. U., & Rinonce, H. T. (2021). Interleukin-6 Sebagai Faktor Risiko Terjadinya Reaksi Lepra Dini. *Media Dermato Venereologica Indonesiana*, *48*(1).

Socfindoconservation. (2024). *Citrus aurantifolia*. Internet. https://www.socfindoconservation.co.id/plant/203

Solanki, Y. B., & Jain, S. M. (2010). Immunomodulatory Activity of Ayurvedic Plant Aparajita (Clitoria Ternatea L .) In Male Albino. *Global Journal of Science Frantier Research*, *10*(3), 2–8.

Solihah, I., Herlina, H., & Mareta, F. (2024). Ethanol Extract of Jackfruit Leaves (*Artocarpus heterophyllus* Lmk .) Promotes Burn Wound Healing in Sprague Dawley Male Rats. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, *11*(3), 93–98. https://doi.org/10.33096/jffi.v11i3.978

Spadaro, F., Costa, R., Circosta, C., & Occhiuto, F. (2012). Volatile composition and biological activity of key lime Citrus aurantifolia essential oil. *Natural Product Communications*, *7*(11), 1523–1526.

Spelman, K., Burns, J., Nichols, D., Winters, N., Ottersberg, S., & Tenborg, M. (2006). Modulation of cytokine expression by traditional medicines: a review of herbal immunomodulators. *Alternative Medicine Review : A Journal of Clinical Therapeutic*, *11*(2), 128–150.

Strober, W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Urrent Protocols in Immunology*, *111*.

Suganya, G., Sampath Kumar, P., Dheepa, B., & Sivakumar, R. (2014). In vitro antidiabetic, antioxidant and anti-inflammatory activity of Clitoria Ternatea L. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, *6*(7), 342–347.

Swamydas, M., & Lionakis, M. S. (2013). Isolation, purification and labeling of mouse bone marrow neutrophils for functional studies and adoptive transfer experiments. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, *77*, e50586. https://doi.org/10.3791/50586

Swandiny, G. F., Nafisa, S., & Gangga, E. (2021). Standardization of 70% Ethanol Extract and 96% Lime Leaves as Antioxidants with DPPH and FRAP. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, *10*, 47–52.

Tarantino, G., Savastano, S., Capone, D., & Colao, A. (2011). Spleen: A new role for an old player? *World Journal of Gastroenterology*, *17*(33), 3776–3784. https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i33.3776

Tena, N., Martín, J., & Asuero, A. G. (2020). State of the Art of Anthocyanins:

Antioxidant Activity, Sources, Bioavailability, and Therapeutic Effect in Human Health. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, *9*(5). https://doi.org/10.3390/antiox9050451

Thakur, A., Ambwani, S., Kumar, S., & Ambwani, T. (2025). Exploring the immunomodulatory potential of Clitoria ternatea using chicken lymphocytes. *The Journal of Phytopharmacology*, *14*(4), 287–290. https://doi.org/10.31254/phyto.2025.14409

The Jackson Laboratory. (2024). *Body Weight Information for BALBc*. Body Weight Chart-C57BL/6J. https://www.jax.org/jax-mice-and-services/strain-data-sheet-pages/body-weight-chart-000651?utm_source=chatgpt.com

The Plant Database. (n.d.). In *National Plant Data Center* (p. 70874 4490). USDA. Retrieved September 27, 2025, from https://plants.usda.gov/

Thermo Fisher Scientific. (2023). *Counting cells using a hemocytometer*. Thermo Fisher Scientific. https://www.thermofisher.com/id/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/counting-cells-in-a-hemacytometer.html?utm_source=chatgpt.com

Thilavech, T., Adisakwattana, S., Channuwong, P., Radarit, K., Jantarapat, K., Ngewlai, K., Sonprasan, N., & Chusak, C. (2021). Clitoria ternatea flower extract attenuates postprandial lipemia and increases plasma antioxidant status responses to a high-fat meal challenge in overweight and obese participants. *Biology*, *10*(10).

Togami, J., Tamura, M., Ishiguro, K., Hirose, C., Okuhara, H., Ueyama, Y., Nakamura, N., Yonekura-Sakakibara, K., Fukuchi-Mizutani, M., Suzuki, K. I., Fukui, Y., Kusumi, T., & Tanaka, Y. (2006). Molecular characterization of the flavonoid biosynthesis of Verbena hybrida and the functional analysis of verbena and Clitoria ternatea F3′5′H genes in transgenic verbena. *Plant Biotechnology*, *23*(1), 5–11. https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.23.5

Tosi, M. F. (2005). Innate Immune Responses to Infection. *Journal Allergy and Clinical Immunology*, *116*(2), 241–249. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.05.036

Trouillas, P., Sancho-García, J. C., De Freitas, V., Gierschner, J., Otyepka, M., & Dangles, O. (2016). Stabilizing and Modulating Color by Copigmentation: Insights from Theory and Experiment. *Chemical Reviews*, *116*(9), 4937–4982. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00507

Tuan Putra, T. N. M., Zainol, M. K., Mohdisa, N. S., & Mohdmaidin, N. (2021). Chemical Characterization of Ethanolic Extract of Butterfly Pea Flower (Clitoria ternatea). *Food Research*, *5*, 127–134. https://doi.org/10.26656/fr.2017.5(2).127

Uthaisangsook, S., Day, N. K., Bahna, S. L., Good, R. A., & Haraguchi, S. (2002). Innate Immunity and its Role Against Infections. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, *88*(3), 253–265. https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)62005-4

Valdivieso-Ugarte, M., Gomez-Llorente, C., Plaza-Díaz, J., & Gil, Á. (2019). Antimicrobial, antioxidant, and immunomodulatory properties of essential oils: A systematic review. *Nutrients*, *11*(11), 1–29. https://doi.org/10.3390/nu11112786

Venet, F., & Monneret, G. (2018). Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. *Nature Reviews Nephrology*, *14*(2), 121–137. https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.165

Vidana, G., Lim, Y., & Choo, W. (2021). Anthocyanins from Clitoria ternatea flower: Biosynthesis, extraction, stability, antioxidant activity, and applications. *Frontiers in Plant Science*, *12*. https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fpls.2021.792303

Vincent, A. L., & Ash, L. R. (1978). Splenomegaly in jirds (Meriones unguiculatus) infected with Brugia malayi (Nematoda: Filaroidea) and related species. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene*, *27*, 514–520.

Viney, M., Lazarou, L., & Abolins, S. (2015). The laboratory mouse and wild immunology. *Parasite Immunology*, *37*(5), 267–273. https://doi.org/10.1111/pim.12150

Wagner, H., & Ulrich-Merzenich, G. (2009). Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, *16*(2), 97–110. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.12.018

Wang, L., Wang, J., Fang, L., Zheng, Z., Zhi, D., Wang, S., Li, S., Ho, C. T., & Zhao, H. (2014). Anticancer Activities of Citrus Peel Polymethoxyflavones Related to Angiogenesis and Others. *BioMed Research International*, *2014*, 453972. https://doi.org/10.1155/2014/453972

Warrington, R., Watson, W., Kim, H. L., & Antonetti, F. R. (2011). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma, and Clinical Immunology*, *7*(1), 1–8. https://doi.org/10.1186/1710-1492-7-S1-S1

Wawrzyniak, A., & Balawender, K. (2022). Structural and Metabolic Changes in Bone. *Animals*, *15*(12).

Weimer, P., Lisboa, M., Mossman, V., Immig, L., & Castilhos, J. (2021). Citrus aurantifolia (Christm) Swingle: Biological Potential and Safety Profile of Essential Oils from Leaves and Fruit Peels. *Food Biosci*, *40*.

Xi, X., Wang, J., Qin, Y., You, Y., Huang, W., & Zhan, J. (2022). The Biphasic Effect of Flavonoids on Oxidative Stress and Cell Proliferation in Breast Cancer Cells. *Antioxidant*, *11*(4), 1–22.

Xu, H., Li, Y., & Gao, Y. (2024). The role of immune cells settled in the bone marrow on adult hematopoietic stem cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *81*(420).

Yao, L., Liu, W., Bashir, M., Nisar, M. F., & Wan, C. (Craig). (2022). Eriocitrin: A review of pharmacological effects. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *154*, 113563. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113563

Yin, Y., & Wu, S. (2024). Ascorbic acid alleviates rheumatoid arthritis by inhibiting the production of autoantibodies. *Cell Communication and Signaling* , *22*(1), 1–15. https://doi.org/10.1186/s12964-024-01756-x

You, Y., Wang, L., Li, Y., Wang, Q., Cao, S., Tu, Y., Li, S., Bai, L., Lu, J., Wei, Z., Chen, W., & Hao, F. (2015). Multicenter randomized study of inosine pranobex versus acyclovir in the treatment of recurrent herpes labialis and recurrent herpes genitalis in Chinese patients. *The Journal of Dermatology*, *42*(6), 596–601. https://doi.org/10.1111/1346-8138.12845

Zhang, Q.-W., Lin, L.-G., & Ye, W.-C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine*, *13*, 20. https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x

Zhang, Y., Gan, R., Li, S., Zhou, Y., Li, A., & Xu, D. (2015). Antioxidant Phytochemicals for the Prevention and Treatment of Chronic Diseases. *Molecules*,

20(12), 21138–21156. https://doi.org/10.3390/molecules201219753

Zhao, E., Xu, H., Wang, L., Kryczek, I., Wu, K., Hu, Y., Wang, G., & Zou, W. (2012). Bone marrow and the control of immunity. *Cellular & Molecular Immunology*, *9*, 11–19. https://doi.org/10.1038/cmi.2011.47

Zhao, L., Liu, L., & Zhu, B. (2015). Regulation of adaptive immune responses by guiding cell movements in the spleen. *Frontiers in Microbiology*, *6*(June), 1–6. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00645