

**AKTIVITAS IMUNOSTIMULATOR EKSTRAK ETANOL BUAH
Etlingera rubroloba A.D. POULSEN TERHADAP KADAR CD8
MODEL *IN VIVO***

***IMMUNOSTIMULATORY ACTIVITY OF Etlingera rubroloba* A.D.
*POULSEN FRUIT ETHANOL EXTRACT AGAINST CD8 LEVELS
IN VIVO MODEL***

**Muhammad Ilyas Y.^{1,4*}, Ajeng Diantini², Mohammad Ghozali³, I Sahidin⁵,
Wa Ode Nurfinti⁵**

¹Program Doktor Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Jatinangor,
Indonesia

²Departemen Farmakologi dan Farmasi Klinik, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran,
Jatinangor, Indonesia

³Departemen Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran, Jatinangor,
Indonesia

⁴Politeknik Bina Husada Kendari, Kendari, 93117, Indonesia

⁵Fakultas Farmasi, Universitas Halu Oleo, Kendari, 93232, Indonesia

*Email : ilyasyusufmuhammad.apt@gmail.com

Submitted : 17 January 2022 Reviewed : 2 February 2022 Accepted : 10 March 2022

ABSTRAK

Pendekatan kemotaksonomi genus *Etlingera* memungkinkan *Etlingera rubroloba* A.D. Poulsen memiliki kandungan metabolit sekunder sebagai agen imunomodulator. Penelitian ini bertujuan mengetahui efek imunostimulator ekstrak etanol buah *E. rubroloba* A.D. Poulsen dengan parameter kadar CD8 (*Cluster of differentiation*) pada tikus jantan galur wistar. Hewan uji tikus sebanyak dua puluh empat ekor dibagi dalam enam kelompok perlakuan yaitu kontrol normal, kontrol pelarut (Na.CMC 0,5%), kontrol positif (ekstrak meniran komersil[®]), perlakuan ekstrak dosis 200, 300, 400 (mg/kgBB). Perlakuan diberikan selama tujuh hari berturut-turut secara per oral dan pada hari kedelapan masing-masing kelompok diinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus* 0,5 mL secara intraperitoneal. Kadar CD8 diukur dengan metode ELISA dan data dianalisis dengan *one way* ANOVA. Hasil penelitian menunjukkan perlakuan dosis ekstrak etanol buah *E. rubroloba* A.D. Poulsen memiliki efek imunostimulator berdasarkan kadar CD8 yang berbeda signifikan dengan kontrol pelarut ($p < 0,05$), sehingga berpotensi dikembangkan sebagai imunomodulator alamiah.

Kata Kunci : CD8, *Etlingera rubroloba* A.D. Poulsen, ELISA, Imunomodulator.

ABSTRACT

The chemotaxonomic approach of the genus Etlingera allows Etlingera rubroloba A.D. Poulsen contains secondary metabolites as immunomodulatory agents. This study aims to determine the immunostimulator effect of the ethanolic extract of the fruit of E. rubroloba A.D. Poulsen with parameters of CD8 levels (Cluster of differentiation) in male rats Wistar strain. Twenty-four rats were divided into six treatment groups, namely normal control, solvent control (Na.CMC 0.5%), positive control (commercial meniran extract), treatment with extract doses of 200, 300, 400 (mg/kgBB). The treatment was given for seven consecutive days orally, and on the eighth day, each group was infected with 0.5 mL of Staphylococcus aureus bacteria intraperitoneally. CD8 levels were measured by the ELISA method, and data were analyzed by one-way ANOVA. The results showed that the dose of the ethanol extract of the fruit of E. rubroloba A.D. Poulsen has an immunostimulator effect based on CD8 levels which is not significantly different from the solvent control ($p < 0.05$), so it has the potential to be developed as a natural immunomodulator.

Keywords : CD8, *Etlingera rubroloba* A.D. Poulsen, ELISA, Imunomodulator.

Penulis Korespondensi :

Muhammad Ilyas Y.

Program Doktor Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Jatinangor, Indonesia
Politeknik Bina Husada Kendari, Kendari, 93117, IndonesiaEmail : ilyasyusufmuhammad.apt@gmail.com**PENDAHULUAN**

Penyakit infeksi merupakan salah satu masalah kesehatan masyarakat yang utama di negara maju dan berkembang (Novard *et al.*, 2019). Infeksi terjadi akibat adanya replikasi mikroorganisme di dalam jaringan tubuh, hal ini merupakan proses interaksi antara patogen (*agent*), pejamu (*host*) dan lingkungan (Prahasanti, 2019). Efek infeksi agen penyakit maupun toksin dapat mengakibatkan perubahan patologis dan klinis yang muncul sejalan dengan proses infeksi, sehingga akan berakibat munculnya kekebalan khusus/ adaptif (*acquired adaptive immunity*) (Abbas, 2016).

Respon imun yang muncul diawali oleh meningkatnya sel fagosit ke arah sumber infeksi. Sel fagosit seperti neutrofil maupun makrofag akan bergerak ke arah sumber rangsangan, selanjutnya memfagosit sel yang dianggap asing tersebut (Besung *et al.*, 2016). Pentingnya meningkatkan fungsi dari sel makrofag dalam melakukan fagositosis terhadap agen infeksi. Ketika peran sel fagosit makrofag dalam respon alami kurang efektif, maka respon imun spesifik akan teraktivasi melalui persinyalan oleh sel makrofag yang mempresentingkan antigen (APC) terhadap sel limfosit T, salah satunya CD8 (*Cluster of differentiation*) (Nakiboneka *et al.*, 2019).

CD8 merupakan marker dari sel T sitotoksik. Sel CD8 sangat penting terhadap penanganan penyakit infeksi virus, kanker/ tumor dan bakteri intraseluler, sehingga upaya untuk meningkatkan sistem pertahanan tubuh menjadi penting dilakukan dalam mempertahankan sistem pertahanan tubuh agar tetap maksimal. Peningkatan sistem pertahanan tubuh dapat dilakukan dengan cara pemberian imunomodulator (Ulfah *et al.*, 2017; Yusuf, Firdayanti dan Wahyuni, 2019).

Imunomodulator adalah senyawa yang dapat meningkatkan pertahanan tubuh baik secara spesifik maupun non spesifik terutama pada kondisi infeksi membutuhkan *imunostimulator*. Obat sintesis yang biasa digunakan sebagai imunomodulator untuk mengembalikan ketidakseimbangan sistem imun seperti obat golongan antiinflamasi nonsteroid, immunosupresan, dan imunostimulan. Penggunaan jangka panjang menjadi salah satu permasalahan seperti beberapa efek samping yang tidak diinginkan, masih sedikitnya produk yang tersedia serta imunomodulator yang tersedia di pasar obat dalam bentuk paten, yang mayoritas diimpor dari luar negeri. Dalam keadaan demikian, sangatlah perlu dipertimbangkan untuk memperoleh imunomodulator dari bahan alam agar faktor harga dapat ditekan serta diharapkan memiliki efek samping yang lebih kecil (Rahman *et al.*, 2016; Yusuf, Firdayanti dan Wahyuni, 2019).

Salah satu kelompok tumbuhan yang memiliki banyak manfaat sebagai bahan obat adalah famili *Zingiberaceae*. Genus *Etilingera* adalah salah satu yang terbesar di *Zingiberaceae*, yang disebut sebagai keluarga jahe-jahean yang mencakup lebih dari 1200 spesies (Handayani, 2018). Tumbuhan dari genus *Etilingera* ini telah dilaporkan memiliki aktivitas sebagai imunomodulator. Hal ini telah dibuktikan, menurut penelitian yang dilakukan oleh Wahyuni *et al.*, (2017) *Etilingera elatior* (Jack) R.M Smith memiliki efek imunomodulator pada dosis 300 mg/kgBB dan 400 mg/kgBB dengan meningkatkan aktivitas fagosit makrofag. Kandungan senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid pada tumbuhan tersebut diduga memiliki kemampuan meningkatkan fungsi sistem imun dengan meningkatkan efektivitas proliferasi limfokin yang dihasilkan oleh sel T sehingga akan merangsang sel-sel fagosit untuk melakukan respon fagositosis (Dewi *et al.*, 2013; Abror, 2018; Nakiboneka *et al.*, 2019). Penelitian Fristiohady *et al.*, (2019) buah *E. elatior* yang diformulasikan dalam granul *effervescent* dilaporkan memiliki aktivitas imunomodulator dan ekstrak buah meningkatkan sitokin interleukin-6 dan interleukin-1 β (Fristiohady *et al.*, 2020a).

Menurut [Ardiyani dan Axel \(2019\)](#) di Sulawesi Tenggara genus *Etlingera* (Zingiberaceae) ditemukan sebanyak 48 spesies, salah satunya *Etlingera rubroloba* A.D. Poulsen. Tumbuhan ini merupakan spesies *Etlingera* yang baru ditemukan dan belum banyak data informasi ilmiah mengenai kandungan metabolit dan aktivitas farmakologis. Berdasarkan pada pendekatan kemotaksonomi bahwa tumbuhan dengan jenis atau genus yang sama akan memiliki kandungan kimia sejenis atau bahkan sama ([Fachriyah et al., 2018](#)). Oleh karena itu, berdasarkan latar belakang di atas, maka penulis tertarik untuk mengetahui lebih lanjut mengenai efek imunostimulator ekstrak etanol buah *Etlingera rubroloba* A.D. Poulsen dengan parameter kadar CD8 pada tikus putih jantan galur wistar.

METODE PENELITIAN

Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur wistar diperoleh dari Laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Halu Oleo, kit Rat CD8 ELISA (*Bioassay Technology Laboratory*®), bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923®, etanol 96%, etanol 70%, standar Mc. Farlan, akuades, Na-CMC 0,5% (*Food Grade*®), NaCl fisiologis, klorofom, Nutrient Agar (NA) (*Merck*®), ekstrak meniran komersil® dan sampel buah *Etlingera rubroloba* A.D. Poulsen diperoleh dari Desa Punggaluku, Kabupaten Konawe Selatan dipanen bulan Juni 2021.

Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tumbuhan

Determinasi tumbuhan dilakukan untuk mengetahui apakah sampel penelitian benar merupakan buah *E. rubroloba* A.D. Poulsen. Determinasi dilakukan di Pusat Penelitian Biologi LIPI Cibinong.

2. Penyiapan Sampel

Sampel berupa buah *E. rubroloba* A.D. Poulsen yang dikumpulkan dari Desa Punggaluku, Kecamatan Laeya, Kabupaten Konawe Selatan. Buah dikumpulkan, dikeringkan di bawah sinar matahari yang dilapisi kain hitam kemudian dihaluskan hingga diperoleh serbuk simplisia, kemudian ditimbang dan diperoleh bobotnya ([Wahyuni et al., 2017](#)).

3. Ekstraksi

Metode ekstraksi yang digunakan yaitu metode maserasi. Serbuk buah *E. rubroloba* A.D. Poulsen sebanyak 2,8 kg simplisia dimasukkan ke dalam wadah maserator dan direndam dengan menggunakan pelarut etanol 96% selama 3 x 24 jam. Perbandingan 1 : 2 (jumlah pelarut yang digunakan dua kali dari jumlah sampel serbuk simplisia) ([Harborne, 1996](#)). Setiap 1 x 24 jam dilakukan penyaringan dan penggantian pelarut baru. Filtrat dikumpulkan dan dipekatkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak ditimbang untuk mengetahui bobotnya.

4. Uji Karakteristik Ekstrak

Karakteristik ekstrak meliputi penetapan kadar air, kadar abu, sari larut air, dan sari larut etanol.

Penetapan Kadar Air : diambil lebih kurang 1 gram ekstrak dan timbang saksama dalam wadah yang telah ditara. Keringkan pada suhu 105°C selama 5 jam dan ditimbang. Lanjutkan pengeringan dan timbang pada jarak 1 jam sampai perbedaan antara 2 penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25 % ([Depkes RI, 2000](#)).

Penetapan Kadar Abu : sampel ekstrak ditimbang dengan saksama lebih kurang 2 g dan dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijarkan dan ditara, pijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, dinginkan dan timbang. Jika cara ini arang tidak dapat dihilangkan, tambahkan air panas lalu saring melalui kertas saring bebas abu. Pijarkan sisa kertas dan kertas saring dalam krus yang sama. Masukkan filtrat kedalam krus. Uapkan dan pijarkan hingga bobot tetap ([Depkes RI, 2000](#)).

Penetapan Sari Larut Air : sampel ekstrak ditimbang 5 g dimasukkan ke dalam botol tertutup dan dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL air. Kemudian dikocok dengan menggunakan *shaker* selama 6 jam kemudian disaring. Hasil saringan diambil 20 mL filtrat dan masukan ke dalam cawan yang sudah ditara. Cawan dipanaskan pada suhu 110°C sampai berat konstan (Depkes RI, 2000).

Penetapan Sari Larut Etanol : sampel ekstrak ditimbang 5 g dimasukkan ke dalam botol tertutup dan dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL etanol 95%. Kemudian dikocok dengan menggunakan *shaker* selama 6 jam kemudian disaring. Hasil saringan diambil 20 mL filtrat dan masukan ke dalam cawan yang tidak ditara. Cawan dipanaskan pada suhu 110°C sampai berat konstan (Depkes RI, 2000).

5. Perlakuan Hewan Uji

Penelitian ini sudah disetujui oleh komisi etik penelitian kesehatan, Lembaga Penelitian Dan Pengabdian Kepada Masyarakat, Universitas Halu Oleo nomor : 707/UN29.20/PPM/2020. Hewan uji dibagi dalam 6 kelompok perlakuan, setiap kelompok terdiri dari 4 hewan uji, terdiri dari kelompok normal, kelompok kontrol pelarut (Na-CMC 0,5%), kelompok kontrol positif (ekstrak meniran komersil[®]), kelompok perlakuan dosis 200, 300 dan 400 (mg/kg BB). Perlakuan hewan uji dilakukan setiap 1 hari sekali selama 7 hari secara peroral dengan volume pemberian 3 mL per ekor ekor dengan ketentuan masing-masing kelompok : kontrol normal hewan uji tanpa perlakuan dan hanya diberikan pakan standar; kontrol positif diberikan ekstrak meniran komersil[®] dosis 0,135 mg/kgBB; kontrol pelarut diberikan suspensi Na. CMC 0,5 %; kelompok uji 1 diberikan ekstrak dosis 200 mg/kgBB; kelompok uji 2 diberikan ekstrak dosis 300 mg/kgBB dan kelompok uji 3 diberikan ekstrak dosis 400 mg/kgBB (Yusuf, Firdayanti dan Wahyuni, 2019; Wahyuni *et al.*, 2019).

6. Pengukuran Kadar CD8 Dengan ELISA Kit

Pada hari ke-8 pengujian setiap tikus diinfeksi dengan 0,5 mL suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* (150 x 10⁶ CFU/mL) melalui intraperitoneal dan dibiarkan selama 1 jam (Yusuf, Firdayanti dan Wahyuni, 2019; Ilyas *et al.*, 2020a). Infeksi dengan rute ini lebih efektif dalam menginfeksi organ bagian dalam. Di daerah *peritoneal* lebih banyak mengandung sel-sel polimorfonuklear dan makrofag sebagai sel presentasi antigen untuk jalur aktivasi sistem imun adaptiv (Nakiboneka *et al.*, 2019; Ilyas *et al.*, 2020a). Tikus *diutanasi* dengan kloroform lalu diambil sampel darah pada bagian vena ekor lateral. Sampel darah kemudian dimasukkan ke dalam tabung *vacutainer* yang berisi antikoagulan EDTA 0,1% dan disentrifugasi pada 3000 rpm pada suhu 25°C selama 20 menit, plasma yang diambil, dimasukkan ke dalam tabung *eppendorf* lalu disimpan pada suhu -20°C sampai waktu pemeriksaan CD8 dengan ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Pengukuran kadar CD8 pada sampel plasma darah hewan uji dilakukan menggunakan kit ELISA CD8 (Rat) mengikuti protokol pada kit, selanjutnya absorbansi diukur pada reader ELISA panjang gelombang 450 nm (Rangaraj *et al.*, 2014 ; Fristiody *et al.*, 2020b).

Analisis Data

Data diolah dengan aplikasi SPSS (*Statistical Product and Service Solution*). Analisa kadar CD8 dilakukan menggunakan metode *Analysis of Variance* (ANOVA) *one-way* dengan syarat terdistribusi normal, dengan taraf kepercayaan 95% dan tingkat signifikansi (tingkat kesalahan 5% ($\alpha = 0,05$)). ANOVA *One-Way* digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan efek antar 4 kelompok. Perbedaan dinyatakan signifikan apabila $p < 0,05$ (Ilyas *et al.*, 2020a; Fristiody *et al.*, 2020b).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Determinasi Tumbuhan

Determinasi tumbuhan merupakan proses yang dilakukan untuk menetapkan atau memastikan spesifikasi suatu tumbuhan dengan membandingkan terhadap tumbuhan lain yang telah dikenal atau diketahui sebelumnya (Ilyas *et al.*, 2020b). Sehingga dengan hal tersebut perlu dilakukan determinasi tumbuhan *Etlingera rubroloba* A.D. Poulsen dilakukan untuk memastikan kebenaran sampel yang digunakan dalam penelitian ini. Determinasi sampel dilakukan di Pusat Penelitian Biologi, LIPI Cibinong. Hasil determinasi menunjukkan bahwa tanaman yang diteliti merupakan tumbuhan *E. rubroloba* A.D. Poulsen.

Penyiapan Sampel

Sampel buah *E. rubroloba* diperoleh dari Desa Punggaluku, Kecamatan Laeya, Kabupaten Konawe Selatan, Provinsi Sulawesi Tenggara. Sampel buah yang dikumpulkan sebanyak 20 kg merupakan buah yang telah masak ditandai dengan warna buah yang kemerahan. Buah yang telah bersih dilakukan perancangan dengan bertujuan agar mempermudah dalam proses pengeringan (Isyanti, Andarwulan and Faridah, 2019). Selanjutnya dilakukan pembuatan simplisia kering. Proses pengeringan ini dimaksudkan untuk mengurangi kadar air yang terdapat pada sampel, sehingga dapat mencegah pembusukan oleh bakteri (Aminah *et al.*, 2017).

Ekstraksi

Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini yaitu metode ekstraksi dingin (maserasi). Proses ekstraksi dengan teknik maserasi dilakukan dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada suhu ruang. Prinsip metode maserasi adalah cairan penyari akan menembus dinding sel, zat aktif akan terlarut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dan di luar sel, sehingga larutan dengan konsentrasi tinggi akan terdesak ke luar sel (Susanty dan Fairus, 2016).

Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 96%. Pemilihan etanol sebagai pelarut didasarkan pada tingkat keamanan dan sifatnya yang mampu melarutkan hampir semua zat, baik yang bersifat polar, semipolar dan nonpolar serta dapat menarik senyawa flavonoid dan fenolik secara optimum (Ramadhani *et al.*, 2020; Yusuf *et al.*, 2018). Hasil ekstraksi dengan maserasi diperoleh ekstrak kental buah *E. rubroloba* sebanyak 364,4 g dengan nilai rendemen 13,01%. Nilai rendemen ini sangat diperlukan karena untuk mengetahui banyaknya ekstrak yang diperoleh selama proses ekstraksi serta memiliki hubungan dengan kandungan senyawa bioaktif sehingga apabila jumlah rendemen semakin banyak maka jumlah senyawa aktif yang terkandung pada ekstrak buah *E. rubroloba* juga semakin banyak (Ramadhani *et al.*, 2020).

Karakterisasi Ekstrak

Penetapan karakterisasi ekstrak meliputi parameter spesifik dan non spesifik. Karakterisasi ini dimaksudkan agar dapat menjamin bahwa produk ekstrak mempunyai nilai parameter tertentu yang konstan. Penentuan karakteristik ekstrak yang dilakukan meliputi parameter spesifik (kadar sari larut etanol dan kadar sari larut air) dan parameter non spesifik (kadar abu dan kadar air). Hasil karakterisasi ekstrak dapat dilihat pada Tabel I

Tabel I. Hasil Karakterisasi Ekstrak Etanol buah *E. rubroloba* A.D. Poulsen

Jenis Karakterisasi	Hasil	Pustaka (Depkes RI, 2000)
Kadar Abu	6%	< 7%
Kadar Air	4,26%	< 10%
Kadar Sari Larut Etanol	74,13%	-
Kadar Sari Larut Air	69,61%	-

Penentuan kadar abu bertujuan untuk memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal yang berasal dari proses awal sampai terbentuknya ekstrak serta dapat menggambarkan jumlah kandungan logam dalam ekstrak. Berdasarkan pengujian yang dilakukan diperoleh hasil kadar abu ekstrak etanol buah *E. rubroloba* sebanyak 6%. Hasil ini telah sesuai dengan persyaratan [Depkes RI \(2000\)](#) bahwa kadar abu tidak lebih dari 7%. Penetapan kadar air bertujuan untuk mengetahui besarnya kandungan air, terkait dengan kemurnian dan kontaminasi yang mungkin terjadi sehingga dapat digunakan pada jangka waktu yang lama. Kadar air ekstrak berperan dalam pertumbuhan mikroba sehingga sangat menentukan kualitas dan masa penyimpanan ekstrak. Berdasarkan pengujian yang dilakukan diperoleh hasil kadar air ekstrak etanol buah *E. rubroloba* sebanyak 4,26%. Hasil ini telah sesuai dengan persyaratan [Depkes RI \(2000\)](#) yaitu kadar air tidak lebih dari 10%. Semakin tinggi kadar air maka akan lebih mudah ditumbuhi jamur dan kapang sehingga dapat menurunkan aktivitas biologis ekstrak dalam masa penyimpanan ([Ramadhani et al., 2020](#)).

Penentuan kadar sari larut air dan etanol bertujuan untuk menentukan jumlah senyawa metabolit sekunder yang dapat disari oleh air maupun etanol, sehingga dapat memberikan gambaran mengenai besarnya metabolit sekunder yang terlarut. Berdasarkan pengujian yang dilakukan diperoleh hasil kadar sari larut etanol dan kadar sari larut air ekstrak etanol buah *E. rubroloba* yaitu sebesar 74,13% dan 69,61%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa jumlah senyawa polar yang dapat terlarut dalam air lebih kecil dari jumlah senyawa kurang polar (semi polar maupun non polar) yang dapat terlarut dalam etanol. Kadar sari larut etanol dan air juga menunjukkan senyawa kimia yang diduga berperan dalam menentukan efek farmakologi. Semakin tinggi persentasi kadar sari maka semakin baik ekstrak tersebut ([Isyanti, Andarwulan dan Faridah, 2019](#)).

Uji Efek Imunomodulator

Pengujian imunomodulator pada penelitian bertujuan untuk mengetahui efek imunostimulator ekstrak etanol buah *E. rubroloba* A.D. Poulsen dengan parameter kadar CD8 (*Cluster of Differentiation 8*) pada tikus jantan galur wistar, dengan menggunakan tiga variasi dosis yaitu dosis 200, 300 dan 400 (mg/kg BB). Pemilihan variasi dosis ini didasarkan pada penelitian sebelumnya oleh [Wahyuni et al., \(2017\)](#) dan [Fristiohady et al., \(2019; 2020a\)](#) menggunakan tumbuhan genus yang sama yaitu ekstrak etanol buah *Etilingera elatior*, dimana dosis 400 mg/kg BB menunjukkan efek imunostimulator yang paling baik berdasarkan peningkatan kadar CD8 pada tikus jantan galur wistar yang diinfeksi dengan bakteri *Staphylococcus aureus*.

Penggunaan bakteri *S. aureus* sebagai patogen karena bakteri ini merupakan bakteri flora normal dan bersifat gram positif serta bersifat antifagositosis sehingga dapat digunakan untuk menstimulasi aktivasi dari sel-sel fagositosis sebagai pertahanan *innate* ([Hariyanti et al., 2015](#); [Ilyas et al., 2020a](#)). Setelah diinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus*, seluruh kelompok perlakuan dibiarkan selama 1 jam sebelum dilakukan pembedahan, dengan tujuan untuk menstimulasi sistem imun *innate* dapat bekerja, karena sistem imun *innate* bekerja sekitar 0-12 jam setelah infeksi terjadi. Makrofag yang merupakan sistem imun *innate* mampu menahan infeksi selama periode 1 jam setelah dilakukan penginfeksian patogen ([Abbas, 2016](#)). Oleh karena itu, pengambilan sampel darah dilakukan 1 jam setelah infeksi patogen, sehingga akan diketahui sejauh mana kemampuan sistem imun dalam mengatasi invasi patogen tersebut ([Dewi et al., 2013](#)).

Pengukuran kadar CD8 dengan metode ELISA merupakan metode yang didasarkan pada kerja imunologi yang dikombinasi dengan reaksi enzimatik ([Rohima dan Ina, 2018](#)). Prinsip dasar ELISA adalah analisis interaksi sampel mengandung antigen dengan menggunakan konjugat antibodi yang dilabel enzim. Enzim ini akan bereaksi dengan substrat dan menghasilkan warna. Warna yang timbul dapat ditentukan secara kuantitatif dengan pembacaan nilai absorbansi (OD) pada ELISA *plate reader* ([Nakiboneka et al., 2019](#)).

Hasil pengukuran kadar CD8 pada tiap kelompok perlakuan pada [Tabel II](#), menunjukkan rata-rata kadar CD8 tertinggi adalah kelompok kontrol normal dibandingkan

dengan kelompok lainnya, hal ini digunakan sebagai rujukan standar nilai normal kadar CD8 dalam penelitian ini, dimana kontrol normal tanpa perlakuan penginfeksi bakteri *Staphylococcus aureus* sehingga kadar CD8 dalam hewan uji tidak mengalami penurunan yang berbeda dengan pada kelompok hewan uji kontrol pelarut, kontrol positif dan kelompok ekstrak yang dilakukan penginfeksi bakteri sehingga mengalami penurunan kadar CD8.

Tabel II. Hasil Rata-Rata Kadar CD8 Tiap Kelompok Pada Tikus Setelah Perlakuan Ekstrak Etanol *E. rubroloba*

Kelompok	Rata-rata (ng/L)	± SD
Kontrol Normal (tanpa perlakuan)	597,39 ^{a*}	85,58
Kontrol Pelarut (Na-CMC 0,5 %)	299,89 ^{b*}	114,35
Kontrol Positif (ekstrak meniran komersil [®])	483,5 ^{a*}	64,16
Ekstrak Dosis 200 mg/kg BB	518,78 ^{a*}	38,09
Ekstrak Dosis 300 mg/kg BB	549,33 ^{a*}	58,18
Ekstrak Dosis 400 mg/kg BB	473,22 ^{a*}	25,96

Keterangan : a* = berbeda signifikan terhadap kontrol pelarut (p<0,05)
b* = berbeda signifikan terhadap kontrol positif (p<0,05)

CD8 merupakan marker dari limfosit T sitotoksik yang berperan dalam mengatasi infeksi bakteri, sehingga peningkatan CD8 salah satu parameter menilai fungsi dari sistem imun spesifik (Dewi *et al.*, 2013; Nakiboneka *et al.*, 2019). Untuk menilai adanya peningkatan aktivitas imunostimulan dari perlakuan sampel uji serta kontrol positif sebagai imunostimulator. Rata-rata kadar CD8 pada kelompok dosis ekstrak 200 dan 300 (mg/kg BB) lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol positif, sedangkan kelompok dosis 400 mg/kg BB dan kontrol negatif lebih rendah kadar rata-rata CD8 dibandingkan dengan kontrol positif. Berdasarkan hasil rata-rata kadar CD8 pada Tabel II tersebut, yang paling baik dalam meningkatkan fungsi sistem imun atau sebagai imunostimulator berdasarkan kadar CD8 adalah kelompok ekstrak dosis 300 mg/kg BB, diikuti dengan kelompok ekstrak dosis 200 mg/kg BB karena lebih tinggi kadar CD8 dari kelompok kontrol positif sebagai kelompok pembanding yang sudah terbukti secara ilmiah sebagai imunomodulator obat herbal terstandar (OHT).

Hasil analisis uji *post hoc* Tukey pada Tabel II menunjukkan kelompok dosis ekstrak jika dibandingkan dengan kontrol pelarut berbeda signifikan (p<0,05), menunjukkan ekstrak buah *E. rubroloba* memiliki efek atau potensi imunostimulator, selanjutnya kelompok dosis ekstrak jika dibandingkan dengan kontrol positif tidak berbeda signifikan (p>0,05), artinya ekstrak buah *E. rubroloba* memiliki aktivitas imunostimulator yang sama dengan kontrol positif yang diberikan ekstrak meniran komersil yang telah teruji dapat meningkatkan fungsi sistem imun/imunomodulator (Yusuf, Firdayanti dan Wahyuni, 2019). Adanya efek imunostimulator pada hewan uji setelah perlakuan sampel diduga karena adanya kandungan metabolit sekunder yang terdapat pada ekstrak buah *E. rubroloba* yang dapat meningkatkan sistem imun. Penelitian oleh Ilyas *et al.*, (2020) dimana ekstrak etanol buah *E. rubroloba* mengandung senyawa metabolit sekunder golongan flavonoid, alkaloid, saponin, tannin dan terpenoid. Hal ini sejalan penelitian sebelumnya oleh Wahyuni *et al.*, (2017) dan Fristiohady *et al.*, (2019; 2020a) dimana ekstrak buah tumbuhan *E. elatior* terbukti memiliki efek imunomodulator dengan meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag dan sekresi sitokin yang berperan memicu aktivasi sel-sel imun adaptiv.

Senyawa flavonoid memiliki efek imunostimulan dikarenakan flavonoid jenis flavonol glikosida yang bersifat mitogen dengan memacu proliferasi sel T dan sel B yang diduga melalui produksi sitokin IL-2, IL-4 dan IL-1 (Fristiohady *et al.*, 2020a). Proliferasi sel limfosit T akan meningkatkan aktivitas dari limfosit T helper (CD4) dan limfosit T sitotoksik (CD8) (Febrianty dan Sasmito, 2015; Dewi *at al.*, 2013). Sel CD4 berdiferensiasi menjadi limfosit T helper-1 yang mensekresikan sitokin IFN- γ dan TNF- α serta memacu sel *natural killer*. Sel CD8 juga menghasilkan sitokin IFN- γ , selanjutnya akan mengaktifkan makrofag menghasilkan senyawa nitrit oksida membunuh mikroba dan memfagositosis patogen (Sholikhah dan Rahayuningsih, 2015; Nakiboneka *et al.*, 2019).

KESIMPULAN

Ekstrak etanol buah *Etilingera rubroloba* A.D. Poulsen memiliki efek imunostimulator dengan meningkatkan kadar CD8 pada model *In Vitro*, sehingga berpotensi dikembangkan sebagai imunomodulator almhiah.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Laboratorium Penelitian Fakultas Farmasi dan Laboratorium Fakultas Kedokteran, Universitas Halu Oleo Kendari yang telah memfasilitasi terlaksananya penelitian ini hingga selesai.

DAFTAR PUSTAKA

- Abror, Y.K., Woelansari, E.D. dan Suhariyadi, S. (2018). Immunomodulator of Ethanol Extracts of The Leaves *Azadirachta indica* Against Macrophage Peritoneal Cell in Mice Induced The Vaccine BCG', *Jurnal Teknologi Laboratorium*, 7(1), p. 8. doi:10.29238/teknolabjournal.v7i1.110.
- Abbas, A. K., Andrew H. L., dan Shiv P., (2016). *Basic Immunology Functions and Disorders of the Immune System*, Elsevier : Canada.
- Ahmad, A.R., Juwita, Siti A.D.R., dan Abdul M., (2015). Penetapan Kadar Fenolik dan Flavonoid Total Ekstrak Metanol Buah dan Daun Patikala (*Etilingera elatior* (Jack) R.M.Sm), *Pharm Sci Res*, Vol. 2 (1).
- Aminah, Nurhayati T., dan Zainal A., 2017, Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Kulit Buah Alpukat (*Persea americana* Mill.) Dengan Metode Spektrofotometri Uv-Vis, *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, Vol. 4(2).
- Ardiyani, M., dan Axel D. P., (2019). An Update of the Genus *Etilingera* (Zingiberaceae) in Sulawesi Including the Description of a New Species, *Journal Reinwardtia*, Vol. 18 (1).
- Besung, I. N. K., Nyoman M. A., Ketut S., dan Ni K. S., 2016. Hubungan Antara `Aktivasi Makrofag Dengan Kadar Interleukin-6 dan Antibodi Terhadap *Salmonella Typhi* Pada Mencit, *Jurnal Kedokteran Hewan*, Vol. 10 (1).
- Depkes RI, (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta.
- Dewi, L. K., Sri W., dan Muhaimin R., 2013. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.) Terhadap Peningkata Jumlah Sel T CD4+ dan CD8+ pada Timus Mencit (*Mus musculus*), *Biotropika*, Vol. 1(2).
- Fachriyah, E., Dewi K., dan Pratama J. W., (2018). Improvement of Bioactivity with Nanoparticle Fabrication: Cytotoxic Test of Ethanol, N-Hexane and Ethyl Acetate Extract from Red Galangal Rhizome (*Alpinia purpurata* (Vieill.) K. Schum) in Bulk and Nanoparticle size using BSLT Method, *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, Vol. 21, (10).
- Febrianty, H., dan Sasmito D., (2015). Modulasi Sel T CD4 dan CD8 pada Spleen Ayam Arab Putih (*Gallus turcicus*) dengan Ransum yang Mengandung Daun Pepaya (*Carica papaya* L.), *Jurnal Biotropika*, Vol. 3(3).

- Fristiohady, A., Wahyuni, W., Malik, F., *et al.* (2020a). Level of Cytokine Interleukin-6 and Interleukin 1- β on Infectious Rat Model Treated with *Etlingera elatior* (Jack) R.M. Smith Fruit Extract as Immunomodulator, *Borneo Journal of Pharmacy*, 3 (2), pp. 52–57. doi:10.33084/bjop.v3i2.1318.
- Fristiohady, A., Wahyuni, W., Malaka, M.H., *et al.* (2020b). Ethanolic Extract of *Xestospongia Sp.* Induces CD4+ and CD14 Cells Levels on Wistar Male Rat Infected with *Staphylococcus aureus*, *Pharmacology and Clinical Pharmacy Research*, 5 (2), pp. 56–61. doi:10.15416/pcpr.v5i2.26986.
- Fristiohady, A., Wa Ode Sitti Zubaidah, Wahyuni, Mirda, Saripuddin, Rina A., La Ode Muhammad Julian P., dan Sahidin, (2019). Immunomodulator Activity of Effervescent Granule of Wualae Fruit (*Etlingera elatior* (Jack) R.M. Smith) Based on Specific Phagocytic Activity, *Borneo Journal of Pharmacy*, Vol. 2 (2).
- Handayani, N., Subagus W., Triana H., dan Retno M., (2018). Uji Aktivitas Fagositosis Makrofag Ekstrak Etanol Daun Suji (*Dracaena angustifolia* (Medik.) Roxb.) Secara In Vitro, *Pharmacy Medical Journal*, Vol. 1 (1).
- Harborne, J.B., 1996. *Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan* Terbitan ke-2, Cetakan ke-4, ITB Press, Bandung.
- Hariyanti., Hadi, S., dan Sari, N., (2015). Efek Imunomodulator Fraksi Etanol dari Ekstrak Etanol 70 % Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostona* L.) Berdasarkan Peningkatan Aktivitas dan Kapasitas Fagositpsis Makrofag Peritoneym Mencit Secara In Vitro, *Pharmacy*, Vol. 12 (1).
- Ilyas, M. Y., Diantini, A., Sahidin, I., Ghozali, M., Halimah, E., & Julaeha, E. (2020, 28 Oktober). Immunomodulatory Potentials of *Etlingera rubroloba* A.D. Poulsen Against CD4 Levels in Wistar Male Rats, international Conference of Pharmacy and Health Sciences 2020. <https://ff.unair.ac.id/conferences/icphs2020/eposter>
- Ilyas, M.Y. et al. (2020a). Ativitas Imunomodulator Ekstrak Etanol pons *Callyspongia sp.* Terhadap Fagositosis Makrofag Pada Mencit Jantan Balb/C, *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina*, 5(1), pp. 44–55.
- Ilyas, M.Y. et al. (2020b). Penurunan Kadar Kolesterol Triglicerida Tikus Putih Wistar Jantan (*Rattus novergicus*) Yang Diberi Ekstrak Terpurifikasi Batang Galing (*Cayratia trifolia* L. Domin.), *Medical Sains : Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, 4(2), pp. 79–86. doi:10.37874/ms.v4i2.136.
- Isyanti, M., Andarwulan, N. dan Faridah, D.N. (2019). Karakteristik Fisik dan Fitokimia Buah Kecombrang (*Etlingera elatior* (Jack) R.M. Sm)', *Warta Industri Hasil Pertanian*, 36(2):96–105.
- Novard, M. F. A., Netti S., dan Roslaili R., (2019). Gambaran Bakteri Penyebab Infeksi pada Anak Berdasarkan Jenis Spesimen dan Pola Resistensinya di Laboratorium RSUP Dr. M. Djamil Padang Tahun 2014–2016. *Jurnal Kesehatan Andalas*, Vol. 8 (2).
- Nakiboneka, Ritah et al. (2019). Interferon Gamma (IFN- γ) Negative CD4 + and CD8 + T-Cells Can Produce Immune Mediators in Response to Viral Antigens. *Vaccine* 37(1): 113–22.
- Prahasanti, K., (2019). Gambaran Kejadian Infeksi Pada Usia Lanjut, *Qanun Medika*, Vol. 3 (1).
- Rahman, H., Yufri A., dan Elda M., (2016). Aktifitas Imunomodulator Dan Jumlah Sel Leukosit Dari Ekstrak Kulit Buah Naga Merah (*Hylocereus Lemairei* (Hook.) Britton & Rose) Pada Mencit Putih Jantan, *Jurnal Farmasi Higea*, Vol. 8 (1).
- Ramadhani, M.A., Anita K.H., Novel F.L., dan Armin H.J., (2020). Skrining Fitokimia Dan Penetapan Kadar Flavonoid Total Serta Fenolik Total Ekstrak Daun Insulin (*Tithonia diversifolia*) Dengan Maserasi Menggunakan Pelarut Etanol 96 %, *Indonesion Journal of Pharmacy and Natural Product*, Vol. 3(1).
- Rangaraj, N., Vaghasiya, K., Jaiswal, S., Sharma, A., Shukla, M., dan Lal, J., (2014). Do Blood Sampling Sites Affect Pharmacokinetics, *Chemistry and Biology Interface*, Vol. 4 (3).

- Rohima, I. E., dan Ina S. N., (2018). Identifikasi Protein Hewani Pada Produk Bumbu Instan dengan Metode Elisa (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), *Pasundan Food Technology Journal*, Vol. 5 (3).
- Susanty dan Fairus B., 2016 Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi Dan Refluks Terhadap Kadar Fenolik Dari Ekstrak Tongkol Jagung (*Zea mays L.*), *Konversi*, Vol. 5(2).
- Sholikhah, A.R. dan Rahayuningsih, H.M. (2015). Pengaruh Ekstrak Lompong (*Colocasia esculenta L. Schoot*) 30 Menit Pengukusan Terhadap Aktivitas Fagositosis Dan Kadar NO (Nitrit Oksida) Mencit Balb/C Sebelum Dan Sesudah Terinfeksi *Listeria monocytogenes*, *Journal of Nutrition College*, 4(4), pp. 463–468. doi:10.14710/jnc.v4i4.10148.
- Ulfah, M., Vitri S. N. C., dan Indira K., (2017). Pengaruh Pemberian Seduhan Teh Daun Sirsak (*Annona muricata L.*) Terhadap Aktivitas Fagositosis Sel Makrofag dan Proliferasi Sel Limfosit Mencit Galur Balb/C yang Diinduksi Vaksin Hepatitis B, *Momentum*, Vol. 13 (2).
- Wahyuni, Hajrul M.M., Adryan F., Ilyas M.Y., dan Sahidin, (2017). Potensi Imunomodulator Ekstrak Etanol Buah Kecombrang (*Etlingera elatior* (Jack) R.M.Smith) terhadap Aktivitas Fagositosis Makrofag Mencit Jantan Galur Balb/c, *Jurnal Ilmiah Farmasi*, Vol. 6 (3).
- Wahyuni, W. et al. (2019). Efek Imunomodulator Ekstrak Etanol Spons *Melophlus sarasinorum* Terhadap Aktivitas Fagositosis Sel Makrofag Pada Mencit Jantan Balb/C, *Jurnal Farmasi Galenika* 5(2), pp. 147–157. doi:10.22487/j24428744.2019.v5.i2.13611.
- Yusuf, M.I., Firdayanti dan Wahyuni (2019). Peningkatan Imunitas Non Spesifik (*Innate Immunity*) Mencit Balb/C Yang Diberi Ekstrak Etanol Daun Tumbuhan Galing (*Cayratia trifolia L. Domin*), *Medical Sains : Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, 3(2), pp. 83–92. doi:10.37874/ms.v3i2.55.
- Yusuf, M. et al. (2018). Antioxidant and Antidiabetic Potential of Galing Stem Extract (*Cayratia trifolia Domin*), *Pharmacognosy Journal*, 10(4), pp. 686–690. doi:10.5530/pj.2018.4.113.