

Hasil Penelitian

JENIS LEUKOSIT MENCIT (*Mus musculus*) PASCA STRES AKUT DENGAN PERLAKUAN EKSTRAK ETANOL BIJI PALA (*Myristica fragrans* Houtt)

Zulhaimi Hendrajid¹, Yuniasih M. J. Taihuttu² dan Parningotan Y. Silalahi², Laura B. S. Huwae², Vina Z. Latuconsina²

¹Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Pattimura Ambon

²Staf Pengajar Fakultas Kedokteran Universitas Pattimura Ambon

Abstrak

Glukokortikoid merupakan salah satu jenis hormon stres yang akan menekan respons imun normal dengan jalan memblokir program sel T helper satu yang merupakan penghasil interferon gamma. Glukokortikoid dapat memberikan dampak terhadap penurunan bobot badan, penurunan sistem imunitas tubuh, dan perubahan diferensiasi leukosit. Pala (*Myristica fragrans* Houtt) adalah tanaman tradisional Maluku dan mengandung senyawa metabolit sekunder yang dapat bersifat sebagai imunomodulator. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jumlah dan jenis leukosit mencit yang diinduksi stres dan diberi ekstrak etanol biji pala. Penelitian ini merupakan eksperimen murni dengan desain *post test only control group design*. Mencit sebanyak 30 ekor di bagi menjadi lima kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol normal (KN), kontrol negatif (K-), kontrol positif (K+), ekstrak etanol biji pala konsentrasi 4% (P1) dan 16% (P2). Pada K-, K+, P1 dan P2 diberi perlakuan stres dengan metode FST (*Forced Swim Test*) selama enam menit. Kemudian, pada kelompok K+ diberi obat alprazolam dosis 0,2 ml, P1 dan P2 diberi ekstrak etanol biji pala sebanyak 0.5 ml. Perlakuan diberikan selama 7 hari dan pada hari ke-8 dilakukan koleksi darah mencit intrakardial. Data hasil pengamatan dianalisis dengan ANOVA. Hasil penelitian menunjukkan kelompok P1 dapat menurunkan persentase neutrofil, meningkatkan persentase monosit dan limfosit, sedangkan pada P2 dapat menurunkan persentase neutrofil dan monosit, meningkatkan persentase limfosit dan tidak berpengaruh terhadap persentase eosinofil dan basofil. Sehingga dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak etanol biji pala tidak berpengaruh signifikan terhadap rata-rata persentase neutrofil, monosit, limfosit, eosinofil dan basofil ($p > 0,05$).

Kata Kunci: Stres, Pala, Leukosit

Abstract

Glucocorticoid represent a kind of stress hormone that suppressed the normal immune response by blockade T-Helper 1 cell program that has function to produce gamma interferon. Glucocorticoid could give some impact like losing weight, immunodeficiency, and change the differentiation of leukocyte. This fruit of nutmeg (Myristica fragrans Houtt) is a traditional plant in Maluku and contains secondary metabolite compounds that can induce the secretion of immune system (immunomodulatory). This research has a target to discover the number of mice leukocyte and its various cell that will be induced by stress itself and will be given ethanol extract of nutmeg seed. This research considers as pure experimental with posttest only control group design. 30 mice divided into 5 different groups, which are normal control (KN), negative control (stress), positive control (stress+0.2 Alprazolam), ethanol extract of nutmeg seed 4% (P1) and 16% (P2). Group control of K-, K+, P1, P2 were stress inducted using FST method for 6 minutes, and then give orally all the treatment for 7 days long and at the 8th days the blood collected intracardially. The counting process held as manual observation. The data analyzed by using ANOVA. The result of this research shows that P1 on the experiment could decrease the presentation of neutrophil, increase the presentation of monocyte and lymphocyte, meanwhile on P2 could decrease the presentation of neutrophil and monocyte, increase the presentation of lymphocyte and has no effect to the percentation of eosinophil and basophil. We can conclude that the giving of ethanol extract of nutmeg seed didn't give a specific effect to the average mount of neutrophil, monocyte, lymphocyte, eosinophil, and basophil ($p > 0.05$).

Keyword: Stress, Nutmeg, Leukocyte

PENDAHULUAN

Stres merupakan respon tubuh yang bersifat non spesifik terhadap segala ancaman.¹ Respon tubuh tersebut berupa proses adaptasi

yang bertahap dan menimbulkan perubahan fisiologis hingga maladaptif.² Keadaan stres selalu ditandai dengan meningkatnya sekresi suatu molekul sinyal CRF (*corticotropin*

releasing factor), suatu senyawa yang sekaligus berfungsi sebagai *neurotransmitter* dan sebagai hormon (neurohormon).³ Ada dua macam hormon stres utama, yaitu glukokortikoid dan katekolamin (adrenalin dan nor adrenalin).⁴ Glukokortikoid akan menekan respons imun normal dengan jalan memblokir program sel T helper satu yang merupakan penghasil interferon gamma. Interferon gamma ini sangat berperan dalam aktivasi sel plasma untuk menghasilkan immunoglobulin.

Leukosit adalah sel darah yang berperan khusus dalam sistem pertahanan tubuh.⁵ Leukosit terdiri dari enam jenis, dan berperan dalam sistem imun. Sel neutrofil, eosinofil, basofil dan monosit termasuk dalam sistem imun nonspesifik, sedangkan sel limfosit termasuk dalam sistem imun spesifik. Sel basofil berperan dalam respon peradangan. Sel eosinofil berperan dalam respon terhadap penyakit parasitik dan alergi. Sel neutrofil berperan dalam pertahanan awal imunitas non spesifik terhadap infeksi bakteri. Sel limfosit berperan dalam membentuk antibodi yang bersirkulasi di dalam darah atau dalam sistem kekebalan seluler. Sel Monosit mengalami proses pematangan menjadi makrofag setelah masuk ke jaringan. Sel makrofag berperan dalam membersihkan tubuh dari sel mati dan debris lainnya.⁶

Glukokortikoid berefek pada peningkatan pembentukan energi yang berasal dari protein, lemak, dan karbohidrat. Akan tetapi,

glukokortikoid juga berdampak pada penurunan bobot badan, penurunan sistem imunitas tubuh, dan perubahan diferensiasi leukosit. Perubahan diferensiasi leukosit karena pengaruh glukokortikoid menyebabkan jumlah neutrofil meningkat di dalam pembuluh darah, sedangkan jumlah limfosit mengalami penurunan.

Kadar kortisol yang meningkat pada kondisi stres akan menyebabkan neutrofilia karena terjadinya stimulasi pembentukan neutrofil dan pelepasan neutrofil dari sumsum tulang. Kortisol dapat menyebabkan limfopenia, eosinopenia, dan basopenia melalui pelepasan dari sel-sel limpa dan paru-paru dan penurunan mitosis limfosit dari sumsum tulang.⁷

Hasil penelitian Sinaga⁸ menunjukkan bahwa pada mencit yang melakukan aktifitas fisik maksimal (AFM) dapat meningkatkan jumlah leukosit dan hitung jenis limfosit secara signifikan dan AFM dapat menurunkan hitung jenis neutrofil, eosinofil dan monosit secara signifikan, sedangkan hitung jenis basofil tidak ada perubahan. Selain itu, hasil penelitian Permatasari dan Probosari⁹ menunjukkan bahwa paparan asap rokok pada mencit berpengaruh terhadap total leukosit tikus wistar. Induksi deksametason (golongan obat-obatan kortikosteroid (glukokortikoid)) pada tikus juga dapat menurunkan total leukosit. Deksametason menyebabkan penurunan nilai absolut limfosit, monosit, dan eosinofil, peningkatan neutrofil namun tidak mempengaruhi basofil.⁷

Pengobatan yang umumnya dilakukan untuk mencegah stres adalah dengan menggunakan obat antidepresan. Obat antidepresan dibagi menjadi empat kelompok besar seperti *selective serotonin re-uptake inhibitors* (SSRIs), *serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors* (SNRIs), *tricyclic antidepressants* (TCAs), *mixed serotonergic effects* (mixed 5-HT), *serotonin and α 2adrenergic antagonist* dan *monoamine oxidase inhibitor* (MAOIs).¹⁰ Obat-obatan tersebut menimbulkan efek samping seperti hipotensi, kejang, sedatif, mulut kering, mual dan muntah. Untuk menghindari efek samping tersebut maka digunakan alternatif bahan alam antidepresan yaitu pala.¹¹

Pala merupakan tumbuhan berupa pohon yang berasal dari kepulauan Banda, Provinsi Maluku. Pala merupakan salah satu jenis rempah-rempah yang banyak digunakan dalam industri makanan, farmasi, dan kosmetik.¹² Secara empiris, pala telah lama digunakan untuk mengatasi stres, depresi, dan sulit tidur. Hal ini didukung oleh hasil penelitian Istriningsih¹³ yang menunjukkan bahwa infusan pala dapat memberikan efek antidepresan pada mencit putih jantan yang dipaksa berenang. Selain itu, ekstrak n-heksan biji pala memiliki aktivitas sebagai antidepresan yang signifikan melalui uji *tail suspension* dan *forced swim* dengan dosis yang memberikan efek antidepresan terbesar adalah 10 mg/kgBB. Standar pembanding yang digunakan adalah

imipramin dengan dosis 15 mg/kgBB dan fluoksetin dengan dosis 20 mg/kgBB.

Biji pala mengandung alkaloid, terpenoid, flavonoid, minyak atsiri, minyak lemak, myristisin, flaeugenol, isoeugenol, linalool, α - dan β - pinena.¹⁴ Flavonoid dan myristisin bekerja dengan menurunkan aktivitas monoamine oksidase (MAO).¹⁵ Selain itu, flavonoid juga memiliki efek imunomodulator. Imunomodulator merupakan senyawa yang dapat meningkatkan fungsi sistem imun. Flavonoid terbukti mampu menginduksi proliferasi dan aktivasi sel T melalui peningkatan produksi IL-2.¹⁶ Terpenoid bekerja sebagai antidepresan dengan meningkatkan kadar norepineprin (NE) dan serotonin (5-HT) dan juga bekerja dengan meningkatkan monoamine pada otak.¹⁵

Berdasarkan fenomena tersebut, penulis merasa tertarik untuk melakukan penelitian tentang hitung jenis leukosit mencit yang diberi ekstrak etanol biji pala (*Myristica fragrans* Houtt) pasca diberi paparan stres dengan metode *forced swim test*. Penelitian ini adalah untuk mengetahui jumlah dan jenis leukosit (neutropil, monosit, limfosit, eosinopil dan basopil) mencit yang diinduksi stres dan diberi ekstrak etanol biji pala (*Myristica fragrans* Houtt).

MATERI DAN METODE PENELITIAN

Desain penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimen murni sesungguhnya (*true experimental research*) dan rancangan yang dipakai adalah *post test only control group design* yaitu dengan

cara membandingkan hasil observasi pada kelompok kontrol dan perlakuan.¹⁷

Waktu dan lokasi penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni – Agustus 2019 pada Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Pattimura Ambon. Proses ekstraksi pada laboratorium Kimia Dasar Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Pattimura Ambon.

Sampel penelitian

Sampel dalam penelitian ini menggunakan hewan uji yaitu mencit jantan dewasa strain balb/c dengan berat badan (BB) berkisar 20-30 gram sebanyak 30 ekor yang diperoleh dari Pusat Kemaritiman Universitas Pattimura Ambon.

Instrumen penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang mencit, tabung FST, *blender*, saringan, spatula, Erlenmeyer, *rotary evaporator*, gelas kimia, pipet ukur, botol minum, timbangan digital, jarum sonde, *dissecting set*, tabung EDTA, pipet, gunting, preparat dan spidol permanen. Sedangkan Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah pakan AD2, sekam padi, aquades, obat alprazolam, pita, eter, minyak imersi, larutan giemsa, selotif, kertas label, biji pala, etanol, antiseptik, sarung tangan, handuk dan masker.

PROSEDUR PENELITIAN

Aklimatisasi mencit

Aklimatisasi adalah pemeliharaan hewan coba dengan tujuan adaptasi terhadap lingkungan baru. Aklimatisasi dilakukan di laboratorium biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Pattimura Ambon selama 7 hari, apabila terdapat hewan coba yang sakit atau mati, atau BB turun $> 10\%$, maka akan dikeluarkan dari penelitian.¹⁸

Pemeliharaan mencit uji

Sebanyak 30 ekor mencit jantan diletakkan di dalam kandang (ukuran kandang: alas atas 21x21 cm, alas bawah 18x18 cm dan tinggi 12 cm). Tiap kandang berisi satu ekor mencit. Dasar kandang dilapisi dengan sekam padi setebal 0,5-1 cm dan diganti setiap 3 hari untuk mencegah infeksi yang terjadi akibat kotoran. Makanan yang diberikan pada mencit adalah pakan AD2 dan minuman yang diberikan adalah air keran yang diletakkan dalam botol. Makanan dan minuman diberikan secukupnya dalam wadah terpisah dan diganti setiap hari.¹⁹

Preparasi sampel

Sampel buah pala diambil dari Desa Liang Kabupaten Maluku Tengah. Buah pala dibelah dan dipisahkan bagian bijinya dan diperoleh berat biji pala sebesar 3 kg. Setelah itu, fuli dilepaskan dari biji pala, dan selanjutnya biji pala dikering-anginkan dalam

ruang laboratorium selama ± 3 minggu. Setelah kering sampel ditimbang dan diperoleh berat kering. Sampel kemudian diblender lalu diayak dengan ayakan sehingga diperoleh simplisia (serbuk) dari biji pala.²⁰

Ekstraksi dengan pelarut etanol

Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi. Pelarut etanol sebanyak 700 mL dimasukkan ke dalam Erlenmeyer, kemudian masukan serbuk biji pala sebanyak 200 g dan dikocok. Pengocokan dilakukan dengan *shaker* selama 3 jam dengan kecepatan 120 rpm (*rotation per minutes*) dan dimaserasi selama 24 jam. Kemudian disaring residu hasil maserasi dengan corong *buchner* dan dilarutkan kembali menggunakan pelarut yang sama sampai berwarna bening. Selanjutnya ekstrak yang didapat, dievaporasi menggunakan evaporator. Kemudian biji pala yang diperoleh ditimbang beratnya dengan neraca analitik, dan dihitung rendemennya²⁰

Pembuatan konsentrasi biji pala

Menurut Zulkaida dkk²¹ ekstrak etanol biji pala konsentrasi 8% lebih efektif dalam meningkatkan kadar albumin, sehingga dalam penelitian ini digunakan ekstrak etanol biji pala konsentrasi 4% dan 16%. Adapun cara pembuatan konsentrasi yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

a. Ekstrak etanol biji pala dengan konsentrasi 4%

Dibuat dengan cara melarutkan ekstrak etanol biji pala 100% ke dalam aquades. Sebanyak 4 ml ekstrak biji pala 100% ditambahkan aquades hingga volumenya mencapai 100ml.

b. Ekstrak etanol biji pala dengan konsentrasi 16%

Dibuat dengan cara melarutkan ekstrak etanol biji pala 100% ke dalam aquades. Sebanyak 16 ml ekstrak biji pala 100% ditambahkan aquades hingga volumenya mencapai 100ml.

Pembuatan larutan alprazolam

Untuk pemberian dosis alprazolam ditentukan berdasarkan faktor konversi berat badan dari manusia ke mencit. Dosis alprazolam yang diberikan pada mencit sebesar 0,2 ml.

Pengujian pada mencit

Mencit sebanyak 30 ekor dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan yaitu KN (Kelompok mencit yang tidak diberi perlakuan stres (kontrol normal)), K- (Kelompok mencit yang diberi perlakuan stres dan diberi aquades (kontrol negatif)), K+ (Kelompok mencit yang diberi perlakuan stres dan diberi obat alprazolam (kontrol positif)), P1 (Kelompok mencit yang diberi perlakuan stres dan diberi ekstrak etanol biji pala konsentrasi 4%) dan P2 (Kelompok mencit yang diberi perlakuan stres

dan diberi ekstrak etanol biji pala konsentrasi 16%).

Pada kelompok mencit K-, K+, P1 dan P2 dimasukkan kedalam tabung silinder dengan diameter 20 cm dan tinggi 30 cm berisi air (25°C) dengan ketinggian air 15 cm dan dibiarkan berenang selama 6 menit. Setelah ini mencit diangkat dan dikeringkan badannya dengan handuk.²² Kemudian, pada kelompok K+ diberi obat alprazolam, P1 dan P2 diberi ekstrak etanol biji pala dengan konsentrasi yang sudah ditentukan. Perlakuan diberikan selama 7 hari.²³

Prosedur pembedahan mencit

Pada hari ke 8 akan dilakukan tindakan pembedahan. Tahapan pembedahan dilakukan sebagai berikut:

1. Mempersiapkan peralatan yang digunakan dalam pembedahan (*Minor set*). Peralatan yang digunakan sebelumnya dilakukan tindakan disinfeksi dengan direndam dalam larutan formalin 70%.
2. Masing-masing mencit pada tiap kelompok perlakuan dibius dengan menggunakan eter dalam wadah tertutup²⁴, hingga mencit sudah dalam keadaan tenang dan hanya terlihat pernafasan perut.²⁵
3. Setelah itu mulailah tindakan pembedahan dengan menggunakan *minor set*. Teknik pembedahan menggunakan teknik insisi Y yang dilakukan pada daerah abdomen.

Pengambilan darah

Pengambil darah sebanyak 2 cc dilakukan melalui jantung (*intra cardial*) dengan cara mencit dibedah. Darah yang telah diambil, kemudian dimasukkan ke dalam tabung darah yang sudah diberi antikoagulan EDTA sebelumnya.

Pembuatan preparat apusan darah tepi

Darah pada tabung vakum EDTA harus dikocok keatas dan kebawah agar plasma darah bercampur dengan sel-sel darah. Kemudian darah diambil menggunakan pipet tetes dan ditetaskan pada preparat (*object glass*). Selanjutnya *object glass* diletakkan pada sudut 25° - 30° pada tetesan darah, kemudian ditarik lurus sampai ujung preparat.²⁶

Pewarnaan preparat apus darah tepi dengan giemsa 10% dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- a. Meneteskan metanol ke atas preparat dan dibiarkan selama 5 menit. Lalu sisa metanol dibuang.
- b. Meneteskan larutan giemsa 10% (sampai semua apusan tergenangi) dan dibiarkan selama 15 menit.
- c. Preparat dibilas dengan air kemudian dikeringkan di udara.
- d. Preparat di periksa di bawah mikroskop setelah ditetesi dengan minyak imersi (pembesaran hingga 100x).²⁷

Perhitungan diferensiasi leukosit

Pengamatan leukosit dari preparat apusan darah dilakukan menggunakan mikroskop dengan

pembesaran hingga 100x. Preparat tersebut ditetesi dengan minyak emersi untuk memperjelas pengamatan. Jumlah leukosit yang dihitung adalah sebanyak 100 leukosit untuk setiap preparat. Keseratus leukosit tersebut dikelompokkan berdasarkan perbedaan ukuran, warna, jumlah dan granulasi sitoplasma, bentuk kromatin dan inti ke dalam lima kelompok yaitu: neutrofil, monosit, limfosit, eosinofil dan basofil. Hasil perhitungan dinyatakan dalam persen (%).²⁸

ANALISIS DATA

Hasil perhitungan terhadap jumlah leukosit selanjutnya dilakukan analisis statistik. Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) dengan uji statistik *Analysis of Variance One Way* (ANOVA). Jika terdapat perbedaan yang signifikan maka dilanjutkan dengan uji Beda

Nyata Terkecil (BNT) pada taraf signifikan 95%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

HASIL PENELITIAN

Hasil perhitungan terhadap rata-rata jenis dan jumlah leukosit kelompok mencit kontrol normal (KN), mencit yang diberi perlakuan stres dengan metode *Forced Swimming Test* (FST) selama 6 menit dalam kurun waktu 7 hari pada kelompok mencit kontrol negatif (K-), kelompok mencit kontrol positif (K+), kelompok mencit yang diinduksi stres dan diberi ekstrak etanol biji pala konsentrasi 4% (P1) dan konsentrasi 16% (P2) dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rata-rata persentase jenis leukosit mencit pasca stres akut dengan perlakuan ekstrak etanol biji pala

Kelompok perlakuan	Jumlah sampel	Jenis Leukosit (Mean ± SD)				
		Neutrofil	Monosit	Limfosit	Eosinofil	Basofil
KN	6	10,17±17,24	16,50±7,69	73,17±18,41	0,17±0,41	0,00±0,00
K-	6	12,50±13,50	31,83±25,37	55,50±20,95	0,17±0,41	0,00±0,00
K+	6	6,33±4,84	29,33±9,48	64,17±5,85	0,17±0,41	0,00±0,00
P1	6	5,67±5,39	32,00±17,44	61,83±14,33	0,17±0,41	0,00±0,00
P2	5	10,80±10,33	21,80±23,02	67,40±21,20	0,00±0,00	0,00±0,00

(Sumber: Hasil pengolahan data penelitian, 2019)

Hasil pada Tabel 1 terlihat bahwa rata-rata persentase neutrofil tertinggi terdapat pada kelompok K- yaitu sebesar 12,50% dan

terendah pada kelompok mencit P1 sebesar 5,67%. Rata-rata persentase monosit tertinggi berada pada kelompok P2 yaitu sebesar 32,00%

dan persentase monosit terendah terdapat pada kelompok KN yaitu sebesar 16,50%. Sedangkan rata-rata persentase limfosit tertinggi diperoleh pada kelompok KN sebesar 73,17% dan terendah pada kelompok mencit K- yaitu sebesar 55,50%. Sedangkan rata-rata persentase eosinofil dan basofil dalam penelitian ini cenderung tidak ditemukan.

Data hasil penelitian pada Tabel 1. kemudian dianalisis menggunakan *Analysis Of Variance* (ANOVA). Hasil analisis dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil analisis *Analysis of Variance* (ANOVA)

Jenis leukosit	F hitung	P
Persentase Neutrofil	0,403	0,805
Persentase Monosit	0,877	0,492
Persentase Limfosit	0,890	0,485
Persentase Eosinofil	0,207	0,932

Berdasarkan hasil ANOVA menunjukkan nilai f hitung neutrofil, monosit, limfosit dan eosinofil lebih besar dari 0,05 ($p > 0,05$) yang berarti bahwa pemberian ekstrak etanol biji pala pada mencit pasca stres akut tidak berpengaruh signifikan terhadap rata-rata persentase neutrofil, monosit, limfosit, eosinofil dan basofil.

PEMBAHASAN

Persentase neutrofil mencit pasca stres akut dengan perlakuan ekstrak etanol biji pala

Berdasarkan hasil penelitian terlihat bahwa rata-rata persentase neutrofil pada

kelompok mencit K- (di induksi stres tanpa diberi perlakuan obat) mengalami peningkatan. Hal ini disebabkan karena terjadinya pelepasan kortisol yang muncul pada saat hewan dalam kondisi stres. Tingkat kortisol yang tinggi akan mengakibatkan sumsum tulang melepaskan neutrofil sehingga pada sirkulasi darah persentasenya akan meningkat.²⁹

Dalam kondisi stres, kadar kortisol akan menjadi sangat tinggi dikarenakan adanya pengiriman rangsangan ke hipotalamus sehingga hipotalamus akan mensekresi CRH yang dapat merangsang hipofise untuk melepaskan ACTH. Dengan adanya peningkatan sekresi ACTH maka akan merangsang korteks adrenal untuk meningkatkan sekresi kortisol. Selain itu, kortisol akan tetap meningkat karena adanya hambatan *negative feedback* ke hipotalamus dan hipofise sehingga sekresi CRH dan ACTH tetap berlangsung. Normalnya pelepasan ACTH dari kelenjar hipofise anterior akan ditekan saat kadar glukokortikoid meningkat (*negative feedback mechanism*).³⁰ Namun, pada kondisi stres hal ini tidak terjadi karena *stresor* dapat mengesampingkan *negative feedback mechanism*.

Menurut Norris³¹ *Negative feedback* yang muncul saat awal-awal stress mengurangi ketersediaan Ca^{2+} di intraselular hipofisis anterior sehingga pelepasan ACTH harusnya dihambat, namun pelepasan AVP tidak terpengaruh oleh mekanisme *negative feedback*

tersebut, akibatnya kadar AVP tetap sehingga tetap merangsang sel-sel kortikotropik di pars distalis hipotalamus yang mengakibatkan pelepasan CRH ke kelenjar hipofisis anterior tetap berlangsung, akibatnya pelepasan glukokortikoid dari korteks adrenal tetap berlangsung.

Peningkatan persentase neutrofil dibandingkan normal mengindikasikan mencit mengalami neutrofilia. Glukokortikoid mampu menginduksi mobilisasi neutrofil dari sumsum tulang dan menghambat apoptosis neutrofil dalam sirkulasi sambil mempromosikan migrasi neutrofil ke dalam jaringan. Kondisi ini yang menyebabkan terjadinya neutrofilia pada kasus induksi stres secara akut atau subakut.⁷

Pada kelompok mencit K+, P1 dan P2 rata persentase neutrofil lebih rendah jika dibandingkan dengan K- tetapi pada kelompok mencit P2 rata-rata persentase neutrofil hampir sama dengan KN. Penurunan persentase neutrofil pada kelompok mencit P1 dan P2 dalam penelitian ini disebabkan karena adanya kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak etanol biji pala yaitu senyawa flavonoid, alkaloid dan saponin yang dapat berfungsi sebagai imunomodulator dengan memodulasi sistem imun tubuh dengan cara meningkatkan respon imun/meningkatkan mekanisme pertahanan tubuh baik *innate* maupun *adaptive*.³⁰

Respon imun selain dipengaruhi oleh infeksi (bakteri, jamur, virus), juga dipengaruhi

oleh usia, asupan/status gizi, faktor stress dan sistem endokrin.³² Sistem imun *innate* merupakan pertahanan awal, selanjutnya diperlukan mekanisme imunitas *adaptive* (*T cell mediated immunity*)/ imunitas seluler.³³

Persentase monosit mencit pasca stres akut dengan perlakuan ekstrak etanol biji pala

Rata-rata persentase monosit pada kelompok mencit K- (Tabel 1.) lebih tinggi jika dibandingkan dengan KN. Peningkatan persentase monosit dalam penelitian ini disebabkan karena respon imun sekunder akibat stres sehingga jumlah monosit didalam darah meningkat untuk segera masuk ke dalam jaringan darah. Peningkatan monosit diduga juga berhubungan dengan konsumsi oksigen yang meningkat selama stres sehingga dapat pula meningkatkan produksi radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan sel. Teori lain menyatakan bahwa meningkatnya monosit sebagai respon yang timbul akibat stres sehingga menyebabkan adanya perubahan hemodinamik pembuluh darah atau perubahan interaksi monosit di dalam sel endotelial yang dimediasi oleh katekolamin.³⁴

Pada kelompok mencit K+ dan P2 rata-rata persentase monosit cenderung mengalami penurunan. Hal ini mengindikasikan bahwa pemberian ekstrak etanol biji pala dapat menurunkan kadar monosit di dalam darah. Meilawaty³⁵ mengemukakan bahwa senyawa antioksidan akan dapat mengurangi radikal

bebas yang dapat merusak membran sel. Radikal bebas dapat diredam oleh sistem antioksidan endogen yang merupakan lini pertahanan pertama, namun dalam keadaan stres oksidatif dimana radikal bebas yang terbentuk lebih tinggi daripada sistem oksidan yang mampu meredamnya maka keberadaan antioksidan eksogen sebagai lini pertahanan kedua sangat diperlukan.³⁶

Biji pala mengandung senyawa antioksidan seperti flavonoid. Senyawa flavonoid penting untuk mempertahankan integritas membran. Reaksi flavonoid dengan H₂O₂, radikal peroksil dan peroksida lipid menghasilkan senyawa antara yang mempercepat proses terminasi radikal bebas lain, sehingga dapat melindungi sel dari kerusakan.³⁷ Menurut Makiyah dan Wardhani³⁸, flavonoid mengatur penurunan aktivitas produksi radikal bebas pada sel mononuklear darah tepi (monosit) juga berhubungan langsung dengan sitokin proinflamasi. Flavonoid mencegah kerusakan monosit akibat radikal bebas dan memfasilitasi proteksi seluler melalui stabilisasi membran.³⁹

Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa rata-rata persentase monosit pada kelompok K- sama dengan kelompok P1 bahkan rata-rata persentase monosit pada kelompok P1 lebih tinggi. Hal ini disebabkan karena dosis ekstrak etanol biji pala yang diberikan pada mencit pasca stres akut masih rendah sehingga tidak dapat untuk menetralkan radikal bebas. Karena

semakin kecil dosis maka kandungan senyawa kimia yang terdapat pada ekstrak etanol biji pala juga kecil. Hal ini sesuai dengan pendapat Marlinda *et al*⁴⁰, yang menyatakan bahwa dosis ekstrak akan berkaitan dengan kandungan senyawa kimia yang ada didalamnya. Semakin kecil dosis, maka kandungan senyawa kimia juga kecil dan semakin besar dosis maka kandungan senyawa kimia yang ada pada ekstrak juga besar.

Persentase limfosit mencit pasca stres akut dengan perlakuan ekstrak etanol biji pala

Hasil pada Tabel 1. terlihat bahwa rata-rata persentase limfosit pada kelompok mencit K- lebih rendah jika dibandingkan dengan rata-rata persentase limfosit pada kelompok mencit KN, K+, P1 dan P2. Penurunan persentase limfosit pada kelompok mencit K- dalam penelitian ini mengindikasikan mencit mengalami limfositopenia. Hal ini disebabkan karena induksi stres akan mempengaruhi reseptor pada sitoplasma di luar membran mitokondria yang menstimulasi mekanisme apoptosis. Limfosit yang berada pada organ limfoid akan mengalami apoptosis sehingga kepadatan folikel limfoid akan berkurang (depleksi). Depleksi terjadi akibat apoptosis yang melibatkan enzim caspase. Selain itu, stres akan menurunkan aktifitas *Cluster Differentiaton* (CD)4+ dan CD8+, yang berakibat pada penurunan sel B dan sel T, sel B dan sel T teraktifasi, dan peningkatan *natural killer*.⁴¹

Rata-rata persentase limfosit pada K+, P1 dan P2 cenderung mengalami peningkatan. Hal ini mengindikasikan aktivitas CD4+ dan CD8+ sel limfosit mulai kembali normal. Terjadinya peningkatan persentase limfosit pada P1 dan P2 dalam penelitian ini disebabkan karena adanya kandungan senyawa flavonoid dalam ekstrak etanol biji pala. Flavonoid dapat meningkatkan produksi IL-2, yaitu salah satu sitokin yang berperan dalam proliferasi sel limfosit. IL-2 adalah salah satu sitokin yang berperan dalam mengatur respon imun, berfungsi sebagai mitogen bagi sel T, secara potensial meningkatkan proliferasi dan fungsi sel T, sel B, dan sel NK, memperbaiki pembentukan antigen, dan meningkatkan produksi dan pelepasan dari sitokin lainnya.⁴²

Persentase eosinofil dan basophil mencit pasca stres akut dengan perlakuan ekstrak etanol biji pala

Rata-rata persentase eosinofil dan basofil terhadap diferensiasi sel berjalan secara stabil, presentase diferensiasi selnya tidak mengalami perubahan jumlah yang signifikan, baik pada perlakuan maupun pada kontrol. Hal ini disebabkan karena eosinofil lebih berperan memiliki aktif dalam mengatur reaksi alergi akut, peradangan, mengatur investasi parasit, memfagositosis bakteri, dan membentuk kompleks antigen-antibodi.⁴³ Selain itu, Kusnugroho dan Siahaan⁴⁴ menyatakan bahwa jumlah eosinofil dan basofil cenderung rendah pada saat stres, pelepasan kortikosteroid, dan

infeksi akut. Sebab stres juga memicu hypothalamus mensekresikan hormon kortisol yang menekan sistem imun sehingga berdampak menurunkan jumlah eosinofil.⁴⁰

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Dari hasil dan pembahasan, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Pada kelompok mencit yang diberi perlakuan stres dan ekstrak etanol biji pala dengan konsentrasi 4% (P1) dapat menurunkan persentase neutrofil dan meningkatkan persentase monosit dan limfosit.
2. Pada kelompok mencit yang diberi perlakuan stres dan ekstrak etanol biji pala dengan konsentrasi 16% (P2) dapat menurunkan persentase neutrofil dan monosit, meningkatkan persentase limfosit dan tidak berpengaruh terhadap persentase eosinofil dan basofil.

Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh ekstrak biji pala terhadap diferensiasi leukosit dengan menggunakan pelarut yang lain.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang perbandingan metode FST dan TST terhadap diferensiasi leukosit mencit dengan menggunakan ekstrak biji pala

tetapi dengan konsentrasi ekstrak yang lebih tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Perwitasari DT, Nurbeti N dan Armyanti T. Faktor-faktor yang Mempengaruhi Tingkatan Stres pada Tenaga Kesehatan di RS Universitas Tanjungpura Pontianak Tahun 2015. *Jurnal Cerebellum*. 2016;2(3):553-61.
- Munaya N, Brahmadi A, dan Sakti YBH. Efek Stres Puasa terhadap Ketebalan Epitel dan Diameter Tubulus Seminiferus *Rattus norvegicus*. *Mutiara Medica, Jurnal Kedokteran dan Kesehatan*. 2018;18(1):1-7.
- Taufiqurrohmah. *Berdamai dengan Stres*. Yogyakarta: Pusat Ilmu. 2015.
- Larasati R. Pengaruh Stres Pada Kesehatan Jaringan Periodontal. *Jurnal Skala Husada*. 2016;13(1): 81-9.
- Mauliza D, Rusli, Roslizawaty, Rosmaidar, Rinidar dan Masyitha D. The Total of Leukocytes Mice (*Mus musculus*) Exposed To Secondhand Smoke Extract And Given Watermelon (*Citrullus vulgaris*). *Jurnal Medika Veterinaria*. 2018;12(1):48-2.
- Bakhri SAK. Analisis Jumlah Leukosit Dan Jenis Leukosit Pada Individu Yang Tidur Dengan Lampu Menyala Dan Yang Dipadamkan. *Jurnal Media Analisis Kesehatan*. 2018;1(1):83-1.
- Amanda F. Profil Dan Diferensiasi Leukosit Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur *Sprague Dawley* Model Hiperglikemia Melalui Pemberian Deksametason. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 2018.
- Sinaga FA. Stress Oksidatif Dan Status Antioksidan Pada Aktivitas Fisik Maksimal. *Jurnal Generasi Kampus*. 2016;9(2):176-89.
- Permatasari ND dan Probosari E. Pengaruh Pemberian Sari Batang Nanas (*Ananas comosus*) Terhadap Total Leukosit Tikus Wistar Yang Diberi Paparan Asap Rokok. *Journal of Nutrition College*. 2015;4(2):264-70.
- Clevenger SS, Malhotra D, Dang J, Vanle B, and IsHak WW. The role of selective serotonin reuptake inhibitors in preventing relapse of major depressive disorder. *Ther Adv Psychopharmacol*. 2018;8(1):49-8
- Istriningsih E, Khoirunnisa dan Ika KSD. Efek Antidepresan Kombinasi Infusa Biji Pala (*Myristica fragrans*) dan Daun Kemangi (*Ocimum basilicum*) Pada Mencit Jantan Putih (*Mus musculus*). *Jurnal Para Pemikir*. 2018;7(2):254-58.
- Nurjannati. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Pala (*Myristica folium*) terhadap *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). Skripsi. Program Ekstensi Sarjana Farmasi. Fakultas Farmasi. Universitas Sumatera Utara. Medan. 2018.
- Lamdasari CT. Aktivitas Antifungi Minyak Atsiri Dan Ekstrak Metanol Daun Pala (*Myristica fragrans* Houtt.) Terhadap *Rhizoctonia* sp. Skripsi. Departemen Hasil Hutan. Fakultas Kehutanan. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 2016.
- Ginting B, Mustanir, Helwati H, Desiyana LS, Eralisa dan Mujahid R. Antioxidant Activity Of N-Hexane Extract Of Nutmeg Plants From South Aceh Province. *Jurnal Natural*. 2017;17(1):39-44.
- Puspitasari L. Ekstrak etanol daun pandan wangi (*pandanus amaryllifolius r.*) 10% menurunkan *immobility time* dan kadar kortisol tikus jantan galur wistar yang depresi. *Intisari Sains Medis*. 2017;8(1):24-30.
- Yudina MS, Gumay AR dan Muniroh M. Efek Pemberian Ekstrak Daun *Carica pubescens* Terhadap Jumlah Limfosit Tikus *Sprague dawley* Yang Diinduksi *Azoxymethane* : Studi Di Laboratorium Penelitian Dan Pengujian Terpadu 4 Universitas Gadjah Mada. *Jurnal Kedokteran Diponegoro*. 2019;8(1):255-66.
- Miranti AS. Astika WU dan Innawati J. Pengaruh Ekstrak Kulit Manggis Terhadap Katalase Organ Hepar Tikus Terpapar Flufenazin Dekanoat. *Jurnal Kedokteran Diponegoro*. 2016;5(4):1269-75.
- Annisa dan Hasanah. Efek Jus Bawang

- Bombay (*Allium cepa* LINN.) Terhadap Motilitas Spermatozoa Mencit Yang Diinduksi Streptozotocin (STZ). Jurnal Ilmu Kesehatan dan Kedokteran Keluarga. 2015;11(2):92-101.
19. Puspawati L. Efek Ekstrak Biji Pepaya (*Carica papaya* L.) Terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*) Galur Wistar Yang Diinduksi Aloksan. Skripsi. Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Umum Universitas Muhammadiyah Surakarta. 2019.
 20. Saranaung A, Sangi MS dan Katja DG. Pengaruh Ukuran Bahan terhadap Rendemen dan Kualitas Minyak Biji Pala (*Myristica Fragrans* Houtt) dengan Metode Soxhletasi. Jurnal Mipa Unsrat Online. 2018;7(1):39-43.
 21. Zulkaidah, Ramadhan A dan Dhafir F. Entitled the Effect of Extract of Nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt) to Albumin, Globulin in Rats (*Rattus norvegicus*). e-Jipbiol. 2014;3:27-32.
 22. Praja S, Yuniarni U, Fitrianiingsih. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) Sebagai Antidepresan terhadap Mencit Swiss Webster Jantan, Prosiding Farmasi. 2016;2(1).
 23. Jha P, Bhalerao S and Dhole M. Comparison of antianxiety action of *Arnica montana* and alprazolam for acute anxiety in wistar rats. The Pharma Innovation Journal. 2018;7(2): 230-33.
 24. Rizki KP, Rochmah WW, Cempaka NG, Hartono H dan Fajrin FA. Aktivitas Antikanker Pektin Kulit Buah Kakao Terhadap Jumlah Sel Goblet Kolon. IJPST. 2015;2(3):75-82.
 25. Purnomo D, Sugiharto dan Isroli. Total leukosit dan diferensial leukosit darah ayam broiler akibat penggunaan tepung onggok fermentasi *rhizopus oryzae* pada ransum. Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan. 2015;25(3):59-68.
 26. Zilvanhisna EF. Klasifikasi Trombosit Pada Citra Hapusan Darah Tepi Berdasarkan Gray Level Co-Occurrence Matrix Menggunakan Backpropagation. Institut Teknologi Sepuluh Nopember. Surabaya. 2017:1-109.
 27. Ardina R dan Rosalinda S. Morfologi Eosinofil Pada Apusan Darah Tepi Menggunakan Pewarnaan Giemsa, Wright, Dan Kombinasi Wright-Giemsa. Jurnal Surya Medika. 2018;3(2):5-12
 28. Sariwating P. Pengaruh Pemberian Ekstrak Air Daun Gambir Laut (*Clerodendron inerme* (L) Gaertn.) Secara Infusa Terhadap Hasil Diferensiasi Leukosit Mencit (*Mus musculus*) Terinfeksi *Plasmodium berghei* ANKA. Skripsi Jurusan Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Pattimura. Ambon. 2013.
 29. Titisari N, Asri K, Fauzi A, Masnur I dan Kurniawan I. Kadar Hormon Kortisol Dan Rasio Neutrofil/Limfosit (N/L) Satwa Lutung Jawa Pada Saat di Kandang Perawatan Dan Kandang Karantina di Hutan Coban Talun, Batu. Journal of Tropical Animal Production. 2019;20(1):29-37.
 30. Andriani MD. Kadar Kortisol, Triiodotironin (T3), DAN Tiroksin (T4) Kerbau Lumpur (*Bubalus bubalis*) Selama Lima Belas Hari Pascatransportasi. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 2012:1-47.
 31. Norris DO. *Vertebrate Endocrinology*. Ed ke-4. Philadelphia: El Savier Saunders. 2010.
 32. Subowo. *Imunologi Klinik*. Edisi ke-2. Jakarta : Sagung Soto; 2010:413-463.
 33. Abbas AK, Lichtman AH, Shiv Pillai. *Celullar And Molecular Immunology*. 6th edition. Saunders elsevier; 2009: 355-60 .
 34. Irianti E. Pengaruh Aktifitas Fisik Sedang Terhadap Hitung Leukosit Dan Hitung Jenis Sel Leukosit Pada Orang Tidak Terlatih. Tesis. Sekolah pascasarjana. Universitas Sumatera Utara. Medan. 2008.
 35. Meilawaty Z. Effect Of Propolis Toward The Number And Type Of Blood Leucocyte Count Of Male Mice (*Mus musculus*). Dental Journal. 2013;46(4):196-201.
 36. Sulastrri D dan Keswani RR. Pengaruh Pemberian Isoflavon Terhadap Jumlah

- Eritrosit Dan Aktivitas Enzim Katalase Tikus Yang Dipapar Sinar Ultraviolet. *Majalah Kedokteran Andalas*. 2015;33(2):169-78.
37. DiSilvestro R. Flavonoid as Antioxidants in *Handbook of Nutraceutical and Functional Foods*. Edited by Wildman, REC. CRC Press Boca Raton London. 2001.
 38. Makiyah SNN dan Wardhani UH. Potensi Ekstrak Etanol Buah *Citrullus lanatus* sebagai Agen Imunosupresi melalui Pengamatan Histologi Limpa Mencit BALB/c. *MKB*. 2017;49(4):245-51.
 39. Sumah LM, Nindatu M danKakisina P. Efek pemberian ekstrak metanol kulit batang pohon pulai (*Alstonia scholaris* L. R. Br.) terhadap hasil diferensiasi leukosit mencit (*mus musculus*) yang diinfeksi *plasmodium berghei* angka. *Molucca Medica*. 2012;5(1): 39-53.
 40. Marlinda M, Widiastuti EL, Susanto GN dan Sutyarso. Pengaruh Pemberian Senyawa Taurin dan Ekstrak Daun Dewa *Gynura segetum (Lour) Merr* terhadap Eritrosit dan Leukosit Mencit (*Mus musculus*) yang Diinduksi Benzo[α]Piren. *Jurnal Natur Indonesia*. 2016;17(1):13–21.
 41. Mehra N, Sharp A, Lorente D, Dolling D, Sumanasurya S, Johnson B, Dearnaley D, Parker C, Bono DJ. 2017. Neutrophils to lymphocytes ratio in castration-resistant prostate cancer patients treated with daily oral corticosteroids. *Clinical Genitourinary Cancer*. 2017:1-7.
 42. Sukmayadi AE, Sumiwi SE, Barliana MI dan Aryanti AD. Aktivitas Imunomodulator Ekstrak Etanol Daun Tempuyung (*Sonchus arvensis* Linn.). *IJPST*. 2014;1(2): 65-72.
 43. Aulia R, Sugito, Hasan MT, Karmil F, Gholib dan Rinidar. The Number Of Leukocyte And Leukocyte Differential In Broilers That Infected With *Eimeria tenella* And Given Neem Leaf Extract And Jaloh Extract. *Jurnal Medika Veterinaria*. 2017;11(2):93-9.
 44. Kusnugroho, D.B.P & Siahaan, D. 2014. Eosinopenia sebagai Penanda Diagnosis Sepsis. *CDK* 41(10): 741–44.