



## Aktivitas Imunostimulan Daun *Elaeocarpus grandiflorus* terhadap Jumlah Leukosit dan Histologi Limpa Tikus yang Diinduksi SDMD

Nugrahaningsih WH<sup>✉1)</sup>, Eny Susanti<sup>2)</sup>, Mutiara Diah Nisa<sup>3)</sup>

<sup>1),2),3)</sup>Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang, Indonesia

### Info Artikel

Diterima: 22 Agustus 2023

Disetujui: 17 November 2023

Dipublikasikan: 27 November 2023

#### Keywords:

*E. grandiflorus*, immunostimulant, leukocytes, spleen, SRBC

*E. grandiflorus*, imunostimulan, leukosit, limpa, SDMD

### Abstract

Recent findings highlight rejasas' kaempferol and quercetin content, suggesting potential immunostimulant properties in male rats. The aim of this study was to examine the activity of various doses of *Elaeocarpus grandiflorus* (rejasa) leaf extract on the number of leukocytes, neutrophils, lymphocytes, and histological features of the spleen in male rats induced by sheep red blood cells (SRBC). As many as 25 rats were divided into 5 groups. The negative control was given 1% Na.CMC, the positive control was given an immunostimulant drug, and the three treatment groups received doses of 100mg/kg, 200mg/kg, and 400mg/kg. Oral treatment for 7 days. SRBC was injected on the 8<sup>th</sup> day. On the 13th day termination was carried out. The average leukocyte results were  $6.54 \times 10^3$  cells/ $\mu$ L (K-),  $6.22 \times 10^3$  cells/ $\mu$ L (K+),  $10.8 \times 10^3$  cells/ $\mu$ L (P1),  $10.98 \times 10^3$  cells/ $\mu$ L (P2), and  $11.2 \times 10^3$  cells/ $\mu$ L (P3). The results of the number of lymphocytes have a percentage of 44% (KN), 50% (KP), 45% (P1), 52% (P2), and 50% (P3). The neutrophil count results were 44.3% (K-), 35% (K+), 37.4% (P1), 30.4% (P2), and 31.9% (P3). The results of the white pulp diameter measurements had an average of 418.0  $\mu$ m (K-), 440.8  $\mu$ m (K+), 471.2  $\mu$ m (P1), 489.8  $\mu$ m (P2), and 422.0  $\mu$ m (P3). The averages obtained from germinal center measurements were as follows 252.1 (K-), 225.8 (K+), 212.8 (P1), 216.3 (P2), and 198.4 (P3). ANOVA showed no significant white pulp diameter difference ( $p > 0.05$ ). In conclusion, the immunostimulatory activity test on rejasas extract on the parameters of leukocytes, neutrophils, and lymphocytes had a normal average number. Meanwhile, administration of rejasas extract to the spleen histology have no significant immunostimulating activity.

### Abstrak

Temuan terkini menunjukkan bahwa rejasas mengandung kaempferol dan quercetin, mengindikasikan potensi sifat imunostimulan pada tikus jantan. Tujuan penelitian ini adalah menguji aktivitas berbagai dosis ekstrak daun *Elaeocarpus grandiflorus* (rejasas) terhadap jumlah leukosit, neutrofil, limfosit, dan fitur histologis limpa pada tikus jantan yang diinduksi sel darah merah domba (SDMD). Sebanyak 25 tikus dibagi menjadi 5 kelompok. Kontrol negatif diberi 1% Na CMC, kontrol positif diberi obat imunostimulan, dan tiga kelompok perlakuan menerima dosis 100mg/kg, 200mg/kg, dan 400mg/kg. Perlakuan oral selama 7 hari. SDMD disuntikkan pada hari ke-8. Pada hari ke-13 dilakukan terminasi. Hasil rata-rata leukosit adalah  $6,54 \times 10^3$  sel/ $\mu$ L (K-),  $6,22 \times 10^3$  sel/ $\mu$ L (K+),  $10,8 \times 10^3$  sel/ $\mu$ L (P1),  $10,98 \times 10^3$  sel/ $\mu$ L (P2), dan  $11,2 \times 10^3$  sel/ $\mu$ L (P3). Hasil jumlah limfosit memiliki persentase 44% (KN), 50% (KP), 45% (P1), 52% (P2), dan 50% (P3). Hasil hitungan neutrofil adalah 44,3% (K-), 35% (K+), 37,4% (P1), 30,4% (P2), dan 31,9% (P3). Hasil pengukuran diameter pulpa putih memiliki rata-rata 418,0  $\mu$ m (K-), 440,8  $\mu$ m (K+), 471,2  $\mu$ m (P1), 489,8  $\mu$ m (P2), dan 422,0  $\mu$ m (P3). Rata-rata dari pengukuran germinal center adalah 252,1 (K-), 225,8 (K+), 212,8 (P1), 216,3 (P2), dan 198,4 (P3). ANOVA menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan pada diameter pulpa putih ( $p > 0,05$ ). Kesimpulannya, uji aktivitas imunostimulan pada ekstrak rejasas terhadap parameter leukosit, neutrofil, dan limfosit menunjukkan jumlah rata-rata yang normal. Sementara itu, pemberian ekstrak rejasas pada histologi limpa tidak memiliki aktivitas imunostimulan yang signifikan.

## PENDAHULUAN

Penyebaran virus corona yang menyebabkan penyakit Covid-19 pada tahun 2020 telah menjangkit hampir seluruh negara di dunia, virus menyebar dengan cepat dan menyebabkan pandemi global dalam waktu singkat. Infeksi ini telah menyebabkan jutaan kematian serta dampak sosial, ekonomi, dan kesehatan yang luar biasa. Sebagai bagian dari upaya mengatasi pandemi Covid-19, penelitian intensif dilakukan untuk memahami respons imun tubuh dan pengembangan terapi potensial dari tumbuhan herbal. Sistem imun memainkan peran krusial dalam melawan infeksi virus, termasuk SARS-CoV-2, dengan komponen utama yang terdiri dari sel darah putih atau leukosit dan organ limfoid, seperti limpa (Gasmi *et al.*, 2020).

Leukosit terdiri dari beberapa jenis, seperti neutrofil dan limfosit, yang berperan penting dalam merespons dan memerangi infeksi virus. Neutrofil bertanggung jawab untuk mengidentifikasi dan menyerang patogen dalam proses fagositosis, yaitu menelan dan mencerna mikroorganisme yang masuk ke dalam tubuh (Rosales, 2018). Sementara itu, limfosit adalah jenis leukosit yang mempunyai peran penting terhadap pengaturan respon kekebalan tubuh, termasuk respon imun adaptif. Adapun salah satu organ yang berperan penting dalam sistem imun, yaitu limpa. Limpa berfungsi sebagai tempat aktivasi dan pematangan sel limfosit (Lewis *et al.*, 2019). Sel-sel limfosit, termasuk limfosit T dan limfosit B, diaktifkan oleh pengenalan patogen. Limfosit T mengenali dan menghancurkan sel tubuh yang terinfeksi, sementara limfosit B memproduksi antibodi untuk mengikat dan mengeliminasi pathogen (Marshall *et al.*, 2018).

Imunostimulan merupakan zat atau agen yang merangsang atau meningkatkan fungsi sistem imun. Beberapa agen imunostimulan dapat memicu peningkatan produksi dan aktivasi sel-sel kekebalan, termasuk limpa, neutrofil, makrofag, dan limfosit, yang berujung pada respon kekebalan yang lebih kuat. (Jain *et al.*, 2022) Pemahaman tentang aktivitas imunostimulan dari jumlah leukosit dan gambaran histologi limpa memberikan informasi yang berarti mengenai respons imunologis terhadap infeksi dan implikasi penggunaan agen imunostimulan.

Salah satu tumbuhan yang menarik untuk diteliti adalah daun rejasa (*Elaeocarpus grandiflorus*). Rejasa memiliki potensi aktivitas imunostimulan karena mengandung senyawa flavonoid yang tinggi, seperti kaempferol dan quercetin (Habibah *et al.*, 2021). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa flavonoid dapat memodulasi respon imun yaitu diferensiasi, proliferasi, aktivasi sel imun, dan meningkatkan pembentukan sel T regulator (Martínez *et al.*, 2019). Quercetin juga dapat memodulasi berbagai jalur persinyalan yang terlibat dalam peradangan. Hal tersebut dapat menghambat aktivasi faktor-kappa B nuklir (NF- $\kappa$ B), faktor transkripsi yang mengatur ekspresi beberapa gen pro-inflamasi (Chen *et al.*, 2020). Di sisi lain senyawa kaempferol menunjukkan dapat mempengaruhi produksi sitokin oleh limfosit, seperti peningkatan produksi interleukin-2 (IL-2) dan interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), yang berperan dalam aktivasi dan proliferasi limfosit. Efek ini dapat berkontribusi pada produksi antibodi oleh limfosit (Alam *et al.*, 2020; Swarnalatha & Puratchikody, 2014). Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas imunostimulan dari ekstrak daun rejasa terhadap jumlah leukosit, neutrofil, limfosit, serta

gambaran histologi limpa pada tikus jantan (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi dengan sel darah merah domba sebagai antigen.

## **METODE**

Penelitian ini dilakukan dari bulan Juni 2022 – Agustus 2022 di Laboratorium Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang. Hematologi rutin dan pembuatan preparat histologi dilakukan di Laboratorium Kesehatan Hewan, Semarang. Penelitian ini menggunakan pemberian variasi dosis ekstrak daun rejasa pada tikus yaitu 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, dan 400 mg/kgBB untuk mengamati jumlah leukosit, neutrofil, limfosit, dan gambaran histologi limpa dengan indikator diameter pulpa putih dan *germinal center*. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain penelitian *randomized post-test only control group* menggunakan 25 ekor tikus putih jantan galur Wistar yang secara random dibagi menjadi 5 kelompok dengan masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus.

### **Hewan Uji dan *Ethical Clearance***

Pada penelitian ini digunakan 25 ekor tikus putih jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*), umur 2-3 bulan, berat rata-rata 200 gram. Tikus diperoleh dari Laboratorium Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang. Selama pemeliharaan tikus, tikus diberi pakan dan air minum secara *ad libitum*. Penelitian ini telah disetujui oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Universitas Negeri Semarang dengan nomor 303/KEPK/EC/2022.

### **Pembuatan Ekstrak Daun Rejasa (*Elaeocarpus grandiflorus*)**

Daun rejasa dikeringkan pada suhu 40° C dan dihaluskan menjadi serbuk simplisia dengan blender. Serbuk simplisia direndam dalam etanol 96% selama lima hari dengan pengadukan sehari sekali. Rendaman tersebut disaring menggunakan kertas saring dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*, kemudian dikeringkan menggunakan *water bath* untuk mendapatkan ekstrak etanol *Elaeocarpus glandiflorus* (Sinaga, 2020).

### **Pembuatan Sel Darah Merah Domba (SDMD)**

Darah domba yang didapat dicuci untuk mendapatkan sel darah merah domba dengan menambahkan PBS NaCl pH 7,4 2000 µL, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Selanjutnya, supernatan dibuang dan dilakukan dua kali pencucian dengan cara yang sama. Setelah itu, SDMD diambil sebanyak 2 mL, lalu ditambahkan dengan PBS NaCl pH 7,4 sebanyak 100 mL (Suriyani, 2019).

### **Prosedur Penelitian**

Perlakuan oral dilakukan selama 7 hari, kelompok K- diberikan suspensi Na.CMC, kelompok K+ diberikan suspensi obat imunostimulan, dan kelompok perlakuan P1, P2, P3 masing-masing diberikan suspensi ekstrak etanol daun rejasa dengan dosis yang berbeda, yaitu 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, dan 400 mg/kgBB. Kemudian, pada hari ke-8 diinjeksi SDMD 2% sebagai antigen sebanyak

1 mL secara intraperitoneal. Pada hari ke-13, dilakukan pengambilan darah melalui sinus orbitalis dan pembedahan. Organ limpa diambil untuk dibuat slide histologi.

### Pemeriksaan Hematologi Rutin

Pemeriksaan leukosit dalam tes darah lengkap melibatkan pengukuran total jumlah leukosit serta perbandingan persentase dari setiap jenis sel darah putih. Secara umum, dalam hasil tes darah lengkap, limfosit dan neutrofil adalah jenis leukosit yang paling banyak jumlahnya. Oleh karena itu, pada penelitian ini indikator yang diamati adalah jumlah leukosit, neutrofil, dan limfosit. Tahapan untuk menghitung jumlah total leukosit dilakukan dengan cara menampung sebanyak 1 mL sampel darah tikus ke dalam wadah berupa tabung yang sudah diberikan natrium sitrat terlebih dahulu sebagai antikoagulan untuk mencegah terjadinya pembekuan darah (Puspitasari, 2017). Sampel darah tersebut kemudian dilakukan pemeriksaan dengan menggunakan alat *Hematology Analyzer* yang dilakukan di Laboratorium Kesehatan Hewan Semarang.

### Analisis Gambaran Histologi Limpa

Histologi limpa dibuat dengan metode *embedding* dan pewarnaan *hematoxylin-eosin* (HE). Indikator yang digunakan pada penelitian ini adalah diameter pulpa putih dan *germinal center*. Pengambilan gambar histologi dilakukan menggunakan mikroskop Motic BA210 yang tersambung ke komputer dengan perbesaran 40X pada 5 lapang pandang. Kemudian, dilakukan pengukuran diameter pulpa putih dan *germinal center* menggunakan *software* Motic Image Plus 2.0. Pengukuran diameter pulpa putih dan *germinal center* dilakukan dengan cara menambahkan diameter maksimal transversal dan diameter maksimal tegak lurusnya kemudian dibagi dua (Alim *et al.*, 2012).

### Analisis Data

Data yang diperoleh pada penelitian ini dianalisis secara statistik menggunakan uji normalitas dengan metode *Shapiro-Wilk test*, uji homogenitas, dan uji *One-Way Anova*.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Berikut ini adalah hasil penelitian dari pengukuran jumlah leukosit, neutrofil, limfosit, dan gambaran histologi limpa pada tikus yang diinduksi SDMD. Dalam penelitian ini, SDMD berperan sebagai antigen yang digunakan dalam percobaan karena memiliki kemampuan khusus untuk mengaktifkan sistem kekebalan tubuh. Data dari hasil penelitian disajikan dalam Tabel 1 dan Tabel 2.

**Tabel 1.** Hasil Rerata Jumlah Leukosit, Neutrofil, dan Limfosit

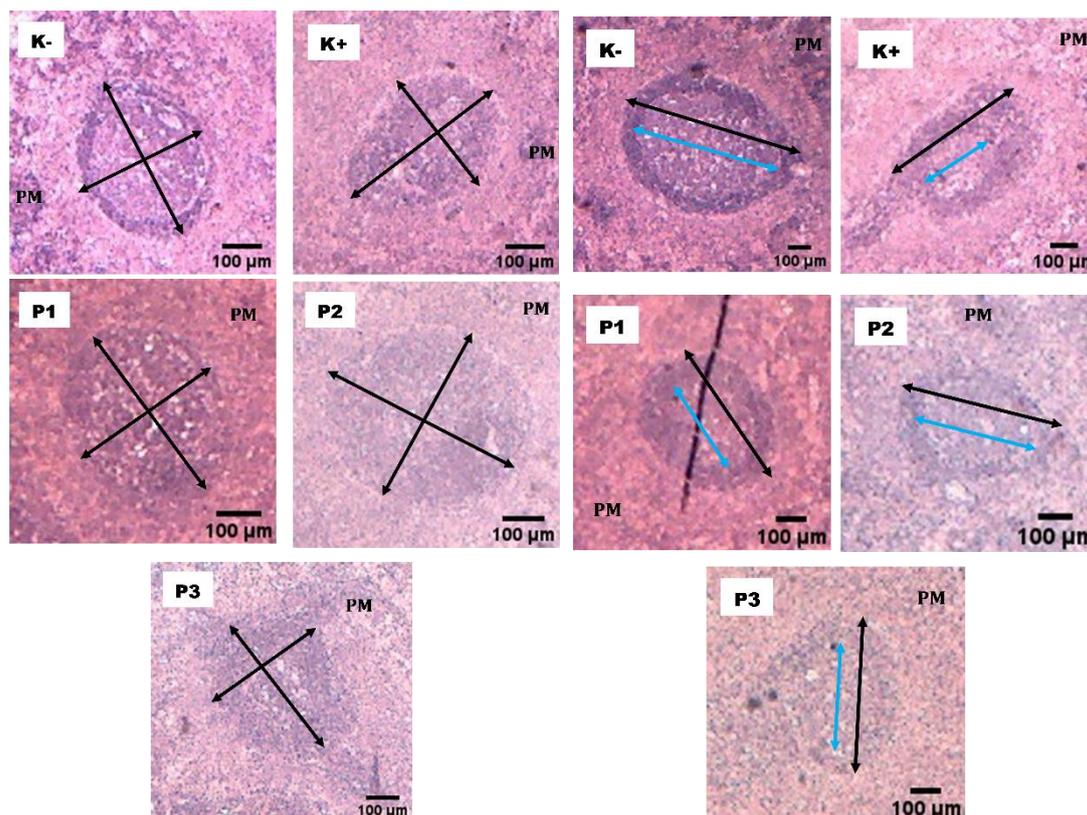
Kelompok	Rerata $\pm$ SD ( $10^3\mu\text{l}$ ) Leukosit	Rerata (%) Limfosit	Rerata (%) Neutrofil
K-	6,54 $\pm$ 4,72	44%	44,3%
K+	6,22 $\pm$ 2,20	50%	35%
P1	10,8 $\pm$ 3,42	45%	37,4%
P2	10,98 $\pm$ 4,07	52%	30,4%
P3	11,2 $\pm$ 5,43	50%	31,9%

Keterangan: K- = kontrol negatif Na.CMC 1%; K+ = kontrol positif obat imunostimulan; P1= ekstrak daun rejas 100 mg/kgBB; P2= ekstrak rejas 200 mg/kgBB; P3= ekstrak daun rejas 400 mg/kgBB

**Tabel 2.** Hasil Rerata Diameter Pulpa Putih dan *Germinal Center* Limpa

Kelompok	Rerata $\pm$ SD ( $\mu\text{m}$ ) Diameter Pulpa Putih	Rerata ( $\mu\text{m}$ ) <i>Germinal Center</i>
K-	418,0 $\pm$ 63,06	252,1
K+	440,8 $\pm$ 93,51	225,8
P1	471,2 $\pm$ 77,21	212,8
P2	489,8 $\pm$ 43,25	216,3
P3	422,0 $\pm$ 61,25	198,4

Keterangan: K- = kontrol negatif Na.CMC 1%; K+ = kontrol positif obat imunostimulan; P1= ekstrak daun rejas 100 mg/kgBB; P2= ekstrak rejas 200 mg/kgBB; P3= ekstrak daun rejas 400 mg/kgBB

**Gambar 1.** Gambaran Histologi Limpa

Keterangan: K- = kontrol negatif Na.CMC 1%; K+ = kontrol positif obat imunostimulan; P1= ekstrak daun rejas 100 mg/kgBB; P2= ekstrak rejas 200 mg/kgBB; P3= ekstrak daun rejas 400 mg/kgBB; pulpa merah (PM); pulpa putih ( $\leftrightarrow$ ); germinal center ( $\leftrightarrow$ ).

Diameter pulpa putih dan *germinal center* limpa didapatkan dari rata-rata diameter maksimal transversal dan diameter maksimal tegak lurus. Pada indikator diameter pulpa putih, hasil uji *One-Way* Anova menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan antara K- dan kelompok perlakuan dosis ( $p = 0,218$ ) maupun K+ dan kelompok perlakuan dosis ( $p = 0,46$ ), sedangkan pada indikator diameter *germinal center*, hasil disajikan secara deskriptif. Berdasarkan Gambar 1, didapatkan bahwa K- memiliki diameter *germinal center* yang lebih besar daripada kelompok perlakuan dosis dan K+. Selain itu, berdasarkan pengamatan yang telah dilakukan, K- memiliki *germinal center* pada semua

sampelnya. Sementara, *germinal center* pada sebagian sampel dari K+ dan kelompok perlakuan dosis tidak dapat teramati.

Leukosit merupakan sel darah putih berfungsi sebagai sistem pertahanan tubuh. Ketika tubuh terpapar infeksi, jumlah leukosit cenderung meningkat secara proporsional (Pattipeiluhu, 2022). Jumlah normal total leukosit pada tikus berkisar antara  $4 \times 10^3$  sel/ $\mu$ L hingga  $11 \times 10^3$  sel/ $\mu$ L (Tigner *et al.*, 2023). Tingginya jumlah leukosit pada kelompok dosis 400 mg/kgBB dapat disebabkan oleh peningkatan jumlah sel neutrofil dan limfosit (Tabel 1). Selain itu, ekstrak daun rejas mengandung banyak senyawa alkaloid, flavonoid, terpenoid, dan polifenol yang efektif sebagai imunostimulan (Savitri *et al.*, 2020). Flavonoid dapat meningkatkan perkembangan dan mobilisasi leukosit dalam sistem imun bawaan (Martínez *et al.*, 2019). Pemberian ekstrak etanol daun rejas dosis 400 mg/kgBB pada kelompok perlakuan menunjukkan angka tertinggi jumlah leukosit ( $11,2 \times 10^3$  sel/ $\mu$ L), kemungkinan disebabkan oleh kandungan flavonoid yang lebih tinggi dalam ekstrak tersebut, yang berperan dalam meningkatkan aktivitas imunostimulan berupa jumlah leukosit pada hewan uji.

Hasil analisis statistika *One-Way Anova* terhadap jumlah leukosit menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna. Meskipun memiliki perbedaan yang tidak bermakna antar kelompok, terdapat variasi dalam jumlah absolut leukosit yang dapat dilihat dari hasil pengukuran. Selain itu, hal tersebut dapat terjadi dikarenakan beberapa faktor, salah satunya adalah kurangnya SDMD sebagai antigen yang diinjeksikan kepada hewan uji. Respon imun yang diciptakan oleh tubuh hewan uji tidak dapat meningkat secara maksimal dikarenakan kekurangan stimulasi yang dihasilkan oleh SDMD. Hasil yang diperoleh pada kelompok kontrol positif dan negatif tidak menyebabkan peningkatan yang signifikan terhadap jumlah sel darah putih pada hewan uji (Tabel 1). Walaupun demikian, rata-rata jumlah leukosit pada kelompok kontrol positif ( $6,22 \times 10^3$  sel/ $\mu$ L) dan kelompok kontrol negatif ( $6,54 \times 10^3$  sel/ $\mu$ L) masih berada dalam rentang normal jumlah leukosit pada tikus putih. Tidak adanya peningkatan yang signifikan terhadap jumlah leukosit yang terjadi pada kelompok kontrol positif dapat disebabkan oleh pengaruh biokimia tubuh yang sama, ketika dimasukkan ke dalam tubuh hewan reaksinya sama, penurunan jumlah leukosit dapat disebabkan pula oleh migrasi leukosit dari darah perifer ke jaringan yang membutuhkan.

Limfosit adalah jenis sel imun adaptif (spesifik) yang berperan dalam membantu sel B dalam menghasilkan antibodi, mengenali dan melawan virus, serta mengaktifkan makrofag. Hasil analisis *One-Way Anova* terhadap jumlah limfosit menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna. Jumlah normal limfosit dalam darah tikus adalah 20-50% (Zamora-Bello *et al.*, 2022). Berdasarkan hasil penelitian (Tabel 1) jumlah limfosit pada kelompok kontrol negatif dan positif mengalami kenaikan jumlah limfosit, tetapi tetap berada dalam nilai normal. Demikian juga, kelompok basis perlakuan dosis 100 dan 400 mg/kgBB tetap berada dalam nilai normal limfosit. Namun, kelompok dosis 200 mg/kgBB mengalami peningkatan jumlah limfosit di atas nilai normal (Tabel 1). Hal ini dapat disebabkan oleh senyawa kaempferol dan quercetin yang banyak terkandung dalam ekstrak daun rejas. Kaempferol dan quercetin dapat mempengaruhi produksi sitokin oleh limfosit, seperti peningkatan produksi interleukin-2 (IL-2) dan

interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), yang berperan dalam aktivasi dan proliferasi limfosit. Efek ini dapat berkontribusi pada produksi antibodi oleh limfosit (Alam *et al.*, 2020)

Neutrofil merupakan sel imun bawaan (non spesifik) bersifat fagosit memiliki kemampuan sebagai pertahanan seluler (Marshall *et al.*, 2018) Jumlah normal neutrofil dalam darah tikus adalah 35-71% (Zamora-Bello *et al.*, 2022). Jumlah neutrofil pada kelompok perlakuan tidak memiliki pengaruh yang signifikan, hal ini dapat terjadi karena tubuh menggunakan sel-sel imun seperti neutrofil lebih cepat daripada memproduksinya, pembesaran limfa juga bisa menjadi salah satu faktor penurunan neutrofil. Limfa akan menjebak dan menghancurkan neutrofil dan sel darah lainnya atau neutrofil sudah dibersihkan sebagian besar oleh makrofag melalui proses fagositosis (Rosales, 2018). Saat peradangan terjadi, neutrofil direkrut ke tempat peradangan untuk membantu melawan infeksi atau cedera. Saat peradangan akan berakhir, makrofag akan membersihkan neutrofil yang tidak dibutuhkan lagi dan puing-puing selulernya, yang menyebabkan penurunan jumlahnya (Marwick *et al.*, 2018)

Sel neutrofil yang dimakan oleh makrofag dapat menjadi indikasi bahwa agen antiinflamasi berhasil. Makrofag memainkan peran penting dalam mengatasi peradangan dengan memfagositosis neutrofil. Pada proses inflamasi, neutrofil merupakan salah satu jenis sel darah putih yang terlibat dalam respons imun tubuh terhadap infeksi atau cedera. Peningkatan jumlah neutrofil dapat menjadi tanda adanya peradangan dalam tubuh. Oleh karena itu, penurunan jumlah neutrofil dapat menjadi indikasi bahwa peradangan telah teratasi dan agen antiinflamasi berhasil (Su *et al.*, 2020). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun rejasa memiliki efek antiinflamasi dengan menekan respons imun tubuh yang melibatkan neutrofil.

Limpa memiliki peran yang sangat penting dalam sistem kekebalan tubuh untuk melawan antigen yang diangkut oleh aliran darah. Pulpa putih pada limpa, yang terdiri dari sel-sel imun seperti limfosit B, limfosit T, dan sel dendritik, berfungsi mendeteksi dan merespons antigen, sekaligus sebagai tempat aktivasi dan proliferasi limfosit. Di dalam pulpa putih, terdapat struktur sementara yang terbentuk sebagai respon terhadap antigen yang disebut *germinal center*. *Germinal center* ini berkontribusi pada proliferasi sel B dan produksi antibodi (Finney *et al.*, 2018). Perubahan pada histologi limpa mengindikasikan adanya aktivitas serta respon imun akibat pengaruh dari antigen atau imunostimulan.

Berdasarkan hasil uji *One-Way Anova* terhadap indikator diameter pulpa putih pada limpa, tidak ditemukan perbedaan signifikan antara kelompok kontrol (K<sup>-</sup> & K<sup>+</sup>) dan kelompok perlakuan dosis. Tidak adanya perbedaan yang signifikan ini kemungkinan disebabkan oleh durasi perlakuan dengan ekstrak daun rejasa yang relatif singkat selama tujuh hari. Penelitian sebelumnya menunjukkan perbedaan signifikan pada diameter pulpa putih dengan durasi perlakuan dosis selama 21 dan 42 hari (Nata *et al.*, 2021). Karena itu, perubahan pada struktur jaringan kemungkinan memerlukan waktu perlakuan yang lebih lama.

Meskipun begitu, kelompok yang mendapat dosis perlakuan ekstrak daun rejasa memiliki rerata diameter pulpa putih yang lebih besar daripada K<sup>-</sup>. Hal tersebut mengindikasikan adanya peningkatan limfosit di dalam limpa akibat paparan antigen atau imunostimulan (Makiyah & Wardhani, 2017;

Rousdy & Wardoyo, 2018). Tidak adanya perbedaan signifikan antara K+ dan kelompok perlakuan dosis, menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun rejas memiliki efek imunostimulan yang hampir serupa dengan obat imunostimulan.

Tanaman rejas mengandung senyawa bioaktif seperti alkaloid, flavonoid, fenolik, dan terpenoid (Anggraito *et al.*, 2020). Flavonoid, termasuk kaempferol, quercetin, procyanidin, luteolin, dan naringin, merupakan komponen yang paling melimpah, membentuk lebih dari 50% dari total senyawa bioaktif (Habibah *et al.*, 2021). Flavonoid ini memiliki berbagai aktivitas farmakologis, termasuk aktivitas imunostimulan.

Flavonoid meningkatkan produksi interleukin 2 (IL-2), faktor pertumbuhan autokrin dan parakrin yang disekresikan oleh sel T (Hosseinzade *et al.*, 2019; Swarnalatha & Puratchikody, 2014). Hal ini mengarah pada proliferasi dan diferensiasi sel CD4+, membentuk Th1 atau Th2 (Boyman & Sprent, 2012). Th2 memiliki peran dalam proliferasi sel limfosit B dan produksi antibodi. Thelper 1 memengaruhi SMAF (faktor aktivasi makrofag spesifik), termasuk IFN  $\gamma$ , yang dapat mengaktifkan makrofag (Dillasamola *et al.*, 2021). Proliferasi sel limfosit yang terjadi ditandai dengan adanya peningkatan pada diameter pulpa putih limpa.

Sementara itu, pada hasil pengukuran diameter *germinal center*, kelompok perlakuan dosis memiliki diameter *germinal center* yang lebih kecil daripada kelompok negatif, dan sebagian besar sampel pada kelompok perlakuan dosis, *germinal center*nya tidak dapat teramati. Keadaan ini kemungkinan disebabkan oleh SDMD yang disuntikkan belum cukup merangsang respons imun di dalam limpa. Hal tersebut disebabkan pada kelompok perlakuan dosis, sel imun di luar limpa dan di area yang diinjeksi SDMD cukup untuk melawan SDMD ketika antigen tersebut disuntikkan secara intraperitoneal.

Kondisi tersebut terjadi karena daun rejas mengandung senyawa bioaktif, seperti flavonoid, yang memiliki aktivitas imunostimulan. Flavonoid dilaporkan dapat meningkatkan jumlah dan aktivitas sel B, sementara itu, jenis flavonoid quercetin dapat meningkatkan aktivitas fagositik makrofag peritoneal (Ghiringhelli *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2022). Hal ini mengakibatkan sirkulasi SDMD ke limpa pada kelompok perlakuan dosis tidak sebanyak dibandingkan dengan kelompok negatif. Keadaan ini berdampak pada pembentukan *germinal center*. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa reaksi *germinal center* secara langsung berkaitan dengan jumlah antigen (Baumjohann *et al.*, 2013).

## SIMPULAN

Dari hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa uji aktivitas imunostimulan pada ekstrak daun rejas terhadap parameter leukosit, neutrofil, dan limfosit memiliki jumlah rata-rata yang normal. Ekstrak daun rejas belum memiliki aktivitas imunostimulan yang signifikan terhadap diameter pulpa putih dan *germinal center* limpa, berdasarkan gambaran histologi limpa. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan durasi perlakuan lebih panjang untuk dapat melihat perbedaan yang signifikan pada gambaran histologi limpa.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Kami ucapkan terima kasih kepada Kepala Sekolah SMA Negeri 3 Salatiga, Jawa Tengah, Indonesia, yang telah menyediakan daun *E. grandiflorus* sebagai bahan penelitian kami. Selain itu, kami juga mengucapkan terima kasih kepada pemilik Subuh Jaya Farm yang telah membantu menyediakan darah domba sebagai bahan penelitian kami.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alam, W., Khan, H., Shah, M. A., Cauli, O., & Saso, L. (2020). Kaempferol as a dietary anti-inflammatory agent: current therapeutic standing. *Molecules*, 25(18). <https://doi.org/10.3390/molecules25184073>
- Alim, A., Nurunnabi, A., Mahbub, S., & Ara, S. (2012). Histomorphometric study of the human spleen. *Bangladesh Journal of Medical Science*, 11(04), 298–302.
- Anggraito, Y. U., Nugrahaningsih, W. H., Musafa, F., Mukhtar, K., Wijawati, Rostriana, Y., Safitri, & Habibah, N. A. (2020). Secondary metabolites in *Elaeocarpus grandiflorus* cell culture in WPM medium with various concentrations of PGR. *Journal of Physics: Conference Series*, 1524(1), 012054. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1524/1/012054>
- Baumjohann, D., Preite, S., Reboldi, A., Ronchi, F., Ansel, K. M., Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2013). Persistent antigen and germinal center b cells sustain t follicular helper cell responses and phenotype. *Immunity*, 38(3), 596–605. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.11.020>
- Boyman, O., & Sprent, J. (2012). The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 12(3), 180–190. <https://doi.org/10.1038/nri3156>
- Chen, T., Zhang, X., Zhu, G., Liu, H., Chen, J., Wang, Y., & He, X. (2020). Quercetin inhibits TNF- $\alpha$  induced HUVECs apoptosis and inflammation via downregulating NF- $\kappa$ B and AP-1 signaling pathway in vitro. *Medicine*, 99(38). <https://doi.org/10.1097/md.00000000000022241>
- Dillasamola, D., Aldi, Y., Wahyuni, F. S., Rita, R. S., Dachriyanus, Umar, S., & Rivai, H. (2021). Study of sungkai (*Peronema canescens*, Jack) leaf extract activity as an immunostimulators with in vivo and in vitro methods. *Pharmacognosy Journal*, 13(6), 1397–1407. <https://doi.org/10.5530/pj.2021.13.177>
- Finney, J., Yeh, C. H., Kelsoe, G., & Kuraoka, M. (2018). Germinal center responses to complex antigens. *Immunological Reviews*, 284(1), 42. <https://doi.org/10.1111/imr.12661>
- Gasmi, A., Noor, S., Tippairote, T., Dadar, M., Menzel, A., & Bjørklund, G. (2020). Individual risk management strategy and potential therapeutic options for the COVID-19 pandemic. *Clinical Immunology*, 215, 108409. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2020.108409>
- Ghiringhelli, F., Rebe, C., Hichami, A., & Delmas, D. (2012). Immunomodulation and anti-inflammatory roles of polyphenols as anticancer agents. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 12(8), 852–873. <https://doi.org/10.2174/187152012802650048>
- Habibah, N. A., Nugrahaningsih, N., Safitri, S., Musafa, F., & Wijawati, N. (2021). Profile of flavonoid and antioxidant activity in cell suspension culture of *Elaeocarpus grandiflorus*. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 13(3), 328–335. <https://doi.org/10.15294/biosaintifika.v13i3.32715>
- Han, L., Fu, Q., Deng, C., Luo, L., Xiang, T., & Zhao, H. (2022). Immunomodulatory potential of flavonoids for the treatment of autoimmune diseases and tumour. *Scandinavian Journal of Immunology*, 95(1), e13106. <https://doi.org/10.1111/sji.13106>
- Hosseinzade, A., Sadeghi, O., Biregani, A. N., Soukhtehazari, S., Brandt, G. S., & Esmailzadeh, A. (2019). Immunomodulatory effects of flavonoids: possible induction of T CD4+ regulatory cells through suppression of mTOR pathway signaling activity. *Frontiers in Immunology*, 10(Jan). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00051>
- Jain, P., Darji, P., Thakur, B. S., Jain, A., Jain, P. K., & Khare, B. (2022). Immunostimulants: Concepts, types and functions. *Asian Journal of Dental and Health Sciences*, 2(4), 26–34. <http://dx.doi.org/10.22270/ajdhs.v2i4.22>
- Lewis, S. M., Williams, A., & Eisenbarth, S. C. (2019). Structure-function of the immune system in the spleen. *Science Immunology*, 4(33). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aau6085>
- Makiah, S. N. N., & Wardhani, U. H. (2017). Potensi ekstrak etanol buah *Citrullus lanatus* sebagai agen imunosupresi melalui pengamatan histologi limpa mencit BALB/c. *Majalah Kedokteran Bandung*,

- 49(4), 245–251. <https://doi.org/10.15395/mkb.v49n4.1024>
- Marshall, J. S., Warrington, R., Watson, W., & Kim, H. L. (2018). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 14(2), 49. <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1>
- Martínez, G., Mijares, M. R., & De Sanctis, J. B. (2019). Effects of flavonoids and its derivatives on immune cell responses. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 13(2), 84–104. <https://doi.org/10.2174/1872213x13666190426164124>
- Marwick, J. A., Mills, R., Kay, O., Michail, K., Stephen, J., Rossi, A. G., Dransfield, I., & Hirani, N. (2018). Neutrophils induce macrophage anti-inflammatory reprogramming by suppressing NF- $\kappa$ B activation. *Cell Death & Disease*, 9(6), 665. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0710-y>
- Nata, I. D. G. A. T., Linawati, N. M., Ratnayanti, I. G. A. D., & Sugiritama, I. W. (2021). Efek pemberian teh kombinasi bunga *Euphorbia milii* dan propolis terhadap diameter pulpa putih limpa tikus wistar jantan. *Jurnal Medika Udayana*, 10(5), 8–12. <https://doi.org/10.24843/MU.2021.V10.i5.P01>
- Pattipeiluhu, S. (2022). Infeksi *Aeromonas hydrophila* dan dampaknya pada gejala klinis dan parameter darah ikan nila *Oreochromis niloticus*. *Journal of Fisheries and Marine Research*, 6(3). <https://doi.org/10.21776/ub.jfmr.2022.006.03.2>
- Puspitasari, D. A. (2017). *Perbedaan Hasil Pemeriksaan Prothrombin Time pada Plasma Segar dan Plasma Simpan Suhu 2-8 °C Selama 2-8 jam*. Muhammadiyah University of Semarang. <http://repository.unimus.ac.id/id/eprint/398>
- Rosales, C. (2018). Neutrophil: A cell with many roles in inflammation or several cell types? *Frontiers in Physiology*, 9, 113. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00113>
- Rousdy, D. W., & Wardoyo, E. R. P. (2018). Histologi limpa dan hematologi mencit yang diinfeksi *Escherichia coli* setelah pemberian asam humat gambut Kalimantan. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia (JBBi)*, 5(2), 168. <https://doi.org/10.29122/jbbi.v5i2.2900>
- Savitri, G. R., Triatmoko, B., & Nugraha, A. S. (2020). Skrining fitokimia dan uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi tumbuhan anyang-anyang (*Elaeocarpus grandiflorus* J. E. Smith.) terhadap *Escherichia coli*. *JPSCR: Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*, 5(1), 22. <https://doi.org/10.20961/jpscr.v5i1.32206>
- Sinaga, E. (2020). *Analisis Imunostimulan Ekstrak Etanol Daun Pirdot (Saurauia vulcani Korth.) pada Tikus (Rattus norvegicus L.)*. Universitas Negeri Medan.
- Su, Y., Gao, J., Kaur, P., & Wang, Z. (2020). Neutrophils and macrophages as targets for development of nanotherapeutics in inflammatory diseases. *Pharmaceutics*, 12(12). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121222>
- Suriani. (2019). Pengaruh pemberian ekstrak etanol rimpang temu ireng (*Curcuma aeruginosa*) terhadap peningkatan imunoglobulin G (Igg) pada tikus putih jantan. *Jurnal Herbal Indonesia*, 1(1), 33–42.
- Swarnalatha, S., & Puratchikody, A. (2014). Cytokine mediated immunomodulatory properties of Kaempferol-5-O- $\beta$ -D-glucopyranoside from methanol extract of aerial parts of *Indigofera aspalathoides* Vahl ex DC. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 5(1), 73–78.
- Tigner, A., Ibrahim, S. A., & Murray, I. V. (2023). *Histology, White Blood Cell*. StatPearls Publishing.
- Zamora-Bello, I., Hernandez-Baltazar, D., Rodríguez-Landa, J. F., & Rivadeneyra-Domínguez, E. (2022). Optimizing rat and human blood cells sampling for in silico morphometric analysis. *Acta Histochemica*, 124(6), 1519. *Acta Histochemica*, 124(6), 151917. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.acthis.2022.151917>