

MONOGRAF
EFEK
**IMUNOMODULATOR
EKSTRAK TANAMAN**

Indonesia kaya akan tanaman herbal yang teruji memiliki efek imunomodulator. Pada buku ini akan dijelaskan aktivitas imunomodulator tanaman herbal. Salah satunya inulin yang secara masif banyak dimanfaatkan karena memiliki aktivitas antimikroba dan sebagai sumber prebiotik.

Inulin gembili (*Dioscorea esculenta* L.) merupakan salah satu bahan baku lokal yang dilaporkan memiliki potensi sebagai sumber Inulin. Silver merupakan logam yang dikembangkan dalam dunia kesehatan sebagai antibakteri. Efektifitas antibakterinya akan meningkat dalam bentuk nanopartikel.

Biosintesis nanosilver dengan menggunakan ekstrak tanaman dikembangkan karena lebih praktis dan aman terhadap lingkungan. Nanosilver memiliki keunggulan yakni sebagai substansi antimikroba, anti inflamasi, anti-angiogenesis, anti jamur, anti-viral, dan anti aktivitas platelet.

Imunomodulator adalah senyawa atau agen yang dapat mempengaruhi sistem imun, apabila tubuh terinfeksi agen patogen maka respon imun yaitu imunoglobulin (IgG dan IgM) akan meningkat pada serum darah dengan metode *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) Reader. Dosis nanosilver dipejankan secara oral pada mencit jantan galur Balb-C yang telah diinduksi vaksin BCG. Vaksinasi hewan uji dilakukan setiap 7 hari sekali selama 28 hari kemudian serum darah diambil dan dilakukan analisa dengan metode ELISA Reader. Hewan uji yang diberikan vaksinasi, maka vaksin tersebut akan menginisiasi IgG dan IgM, sehingga dapat diketahui dosis nanosilver dalam meningkatkan atau menurunkan respon IgG dan IgM.



MONOGRAF EFEK IMUNOMODULATOR EKSTRAK TANAMAN

Dian Eka Ermawati, M.Sc., Apt
Maya Uzia Beandrade, M.Sc., Apt

M. Nur Dewi Kartikasari, S.ST., M.Kes
M. Fiqri Zulpadly MH, M.Biomed., Apt

MONOGRAF
EFEK
**IMUNOMODULATOR
EKSTRAK TANAMAN**



Dian Eka Ermawati, M.Sc., Apt
Maya Uzia Beandrade, M.Sc., Apt
M. Nur Dewi Kartikasari, S.ST., M.Kes
M. Fiqri Zulpadly MH, M.Biomed., Apt

MONOGRAF

EFEK IMUNOMODULATOR EKSTRAK TANAMAN

Dian Eka Ermawati, M.Sc., Apt
Maya Uzia Beandrade, M.Sc., Apt
M. Nur Dewi Kartikasari, S.ST., M.Kes
M. Fiqri Zulpadly MH, M.Biomed., Apt



PT. PENA PERSADA KERTA UTAMA

MONOGRAF
EFEK IMUNOMODULATOR EKSTRAK TANAMAN

Penulis:

Dian Eka Ermawati, M.Sc., Apt
Maya Uzia Beandrade, M.Sc., Apt
M. Nur Dewi Kartikasari, S.ST., M.Kes
M. Fiqri Zulpadly MH, M.Biomed., Apt

ISBN: 978-623-455-381-9

Design Cover:

Retnani Nur Brilliant

Layout:

Hasnah Aulia

PT. Pena Persada Kerta Utama

Redaksi:

Jl. Gerilya No. 292 Purwokerto Selatan, Kab. Banyumas

Jawa Tengah

Email : penerbit.penapersada@gmail.com

Website : penapersada.com Phone : (0281) 7771388

Anggota IKAPI: 178/JTE/2019

All right reserved
Cetakan pertama: 2022

Hak Cipta dilindungi oleh undang-undang. Dilarang memperbanyak karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin penerbit

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum wr wb

Puji syukur kepada Allah SWT, atas izin Allah penulis dapat menyelesaikan buku Monograf “Efek Imunomodulator Ekstrak Tanaman”. Buku Monograf ini merupakan salah satu wujud tulisan yang berisi paparan teori, konsep dan hasil penelitian terkait dosis imunomodulator ekstrak tanaman yang diujikan pada hewan uji. Dosis imunomodulator yang didapatkan dikembangkan dalam formula sediaan farmasi untuk suplemen oral. Imunomodulator adalah senyawa atau agen yang dapat mempengaruhi sistem imun, apabila tubuh terinfeksi agen patogen maka respon imun yaitu imunoglobulin (IgG dan IgM) akan meningkat pada serum darah.

Ekstrak tanaman akan dilakukan uji efektivitas imunomodulator yang dipejankan dengan peringkat dosis secara oral pada mencit jantan galur Balb-C yang telah mendapatkan vaksinasi sebelum dan selama perlakuan. Serum darah hewan uji akan diambil pada akhir perlakuan dan dilakukan analisa menggunakan metode ELISA reader untuk dilihat profil imunoglobulin pada serum darah. Hasil penelitian ini penting sebagai dasar penelitian berikutnya dalam usaha pengembangan potensi imunomodulator ekstrak tanaman yang diharapkan dapat menjadi suplemen yang dapat membantu meningkatkan sistem imun tubuh.

Buku monograf ini disusun sebagai dosis imunomodulator ekstrak tanaman. Harapan penulis buku ini dapat digunakan sebagai acuan dan tambahan ilmu pengetahuan bagi mahasiswa, pengajar, peneliti ataupun pihak lain yang berminat mempelajari uji imunomodulator ekstrak tanaman. Pendapat dan saran yang bersifat konstruktif dari pembaca, para ahli, dan teman sejawat sangat penulis harapkan. Wassalamualaikum wr wb.

Surakarta, September 2022

Tim Penulis

DESKRIPSI BUKU

Indonesia kaya akan tanaman herbal yang teruji memiliki efek imunomodulator. Pada buku ini akan dijelaskan aktivitas imunomodulator tanaman herbal. Salah satunya inulin yang secara masif banyak dimanfaatkan karena memiliki aktivitas antimikroba dan sebagai sumber prebiotik. Inulin gembili (*Dioscorea esculenta* L.) merupakan salah satu bahan baku lokal yang dilaporkan memiliki potensi sebagai sumber Inulin. Silver merupakan logam yang dikembangkan dalam dunia kesehatan sebagai antibakteri. Efektifitas antibakterinya akan meningkat dalam bentuk nanopartikel. Biosintesis nanosilver dengan menggunakan ekstrak tanaman dikembangkan karena lebih praktis dan aman terhadap lingkungan nanosilver memiliki keunggulan yakni sebagai substansi antimikroba, anti inflamasi, anti-angiogenesis, anti jamur, antianti-viral, dan anti aktivitas platelet. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui efek imunomodulator nanosilver hasil biosintesis yang pada tahun 2020 telah dilakukan karakterisasi dan uji aktivitas antibakterinya terhadap bakteri gram positif dan negatif. Imunomodulator adalah senyawa atau agen yang dapat mempengaruhi sistem imun, apabila tubuh terinfeksi agen patogen maka respon imun yaitu imunoglobulin (IgG dan IgM) akan meningkat pada serum darah dengan metode *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) *Reader*. Dosis nanosilver dipejankan secara oral pada mencit jantan galur Balb-C yang telah diinduksi vaksin BCG. Vaksinasi hewan uji dilakukan setiap 7 hari sekali selama 28 hari kemudian serum darah diambil dan dilakukan analisa dengan metode ELISA *Reader*. Hewan uji yang diberikan vaksinasi, maka vaksin tersebut akan menginisiasi IgG dan IgM, sehingga dapat diketahui dosis nanosilver dalam meningkatkan atau menurunkan respon IgG dan IgM.

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	iii
DESKRIPSI BUKU	iv
DAFTAR ISI	v
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah.....	4
C. Tujuan Masalah	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Imunomodulator	5
B. Inulin Gembili.....	6
C. Bahan Alam Peningkat Imunitas	11
D. Nanopartikel Perak	37
E. Vaksinasi	43
F. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	51
G. Hewan Uji.....	52
BAB III PROSEDUR UJI AGEN IMUNOMODULATOR NANOSILVER DENGAN BIOREDUKTOR INULIN	57
A. Penyiapan Sampel Uji.....	57
B. Intepretasi hasil pengujian.....	61
C. Perlakuan Hewan Uji.....	65
D. Pengukuran Titer IgG degan ELISA <i>Reader</i>	67
E. Analisa Data.....	69
DAFTAR SINGKATAN	70
DAFTAR PUSTAKA	71

MONOGRAF
EFEK IMUNOMODULATOR EKSTRAK TANAMAN

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Sistem imun terdiri dari beberapa tipe sel yang melindungi tubuh dari bakteri, parasit, jamur, infeksi virus dan dari pertumbuhan sel tumor. Sel imun ini dapat menelan bakteri, membunuh parasite atau sel tumor, atau membunuh sel yang terinfeksi virus. Seringkali sel-sel ini bergantung pada *T helper* untuk aktivasi sinyal dalam bentuk sekresi sebagai sitokin, limfokin, atau lebih khusus lagi interleukin (Shantilal et al., 2018). Imunomodulator merupakan senyawa yang mengubah aktivitas sistem imun tubuh dengan dinamisasi regulasi sel-sel imun. Kerja imunomodulator meliputi fungsi peningkatan efektivitas vaksin (imunorestorasi), meningkatkan daya tahan tubuh (imunostimulasi) dan menekan respons imun (imunopresi) (Shantilal et al., 2018). Imunomodulator digunakan terutama pada penyakit imunodefisiensi, infeksi kronis, dan infeksi (Wahyuni et al., 2019).

Terdapat beberapa herbal yang pernah diteliti dan terbukti mampu meningkatkan imunitas. Beberapa herbal tersebut antara lain Jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*), Lemon (*Citrus limon*), Bawang putih (*Allium sativum*), Kunyit (*Curcuma longa*), Mengkudu (*Morinda citrifolia*), Pegagan (*Centella asiatica*), Ekinase (*Echinacea pupurea*), Meniran (*Phyllanti niruri*), Jahe Merah (*Zingiber officinale var. Rubrum*), Kencur (*Kaempferia galanga*), Temulawak (*Curcuma zanthorrhiza*), Sambiloto (*Andrographis paniculate*), Jinten Hitam (*Nigella sativa*), Cengkeh (*Syzygium aromaticum*), Daun Kelor (*Moringa oleifera*), Umbi gembili (*Dioscorea esculenta* L.) dan lain sebagainya.

Sistem kekebalan tubuh perlu dijaga agar terhindar dari berbagai macam penyakit. Jinten hitam (*Nigella sativa* L.) mengandung timokuinon yang berkhasiat sebagai imunostimulan (Majdalawieh, dkk., 2010; Salem, dkk., 2005).

Penelitian Sriningsih and Wibowo (2009) tentang pemberian minyak jinten hitam (*Nigella sativa* L.) pada tikus dengan dosis 10 mg/200 g BB; 20 mg/200 g BB; dan 40 mg/200 g BB dapat meningkatkan aktivitas makrofag terhadap infeksi bakteri *S. epidermidis*. Herba *Centella asiatica* L. Urban, mengandung tidak kurang dari 6% dari total turunan triterpenoid dinyatakan sebagai asiatikosida. *Centella asiatica* L. Urban atau pegagan, sudah terkenal sebagai obat tradisional selama bertahun-tahun. Pegagan juga digunakan untuk penyembuhan luka dan meningkatkan rentang memori. Ini juga bisa meningkatkan aktivitas sel hiperplasia dan kolagen pada jaringan luka. Jayathirta dan Mishra, 2004 menyatakan bahwa ekstrak *C. asiatica* dosis 100-500 mg/Kg BW pada tikus dapat secara signifikan meningkatkan total sel darah putih dan kemampuan fagosit makrofag melawan molekul karbon pada tikus. Yun Astuti, 2004 mengatakan bahwa efek imunostimulasi *C. asiatica* dapat meningkatkan kadar IgG pada tikus yang diinduksi sel darah merah domba. Pegagan mengandung enzim *proxeronase*, alkaloid dalam pegagan oleh enzim *proxeronase* pada dinding usus diubah menjadi *proxeronine* menjadi zat aktif *xeronine* untuk diserap ke dalam aliran darah ke sel dan jaringan lain. Aktivitas ini dapat mengaktifkan protein aktif sehingga produksi antibodi berjalan dengan baik untuk konstituen utama adalah protein antibodi.

Inulin merupakan salah satu jenis karbohidrat yang mengandung serat yang berasal dari tumbuhan dan merupakan komponen fungsional. Dalam bidang kesehatan, inulin secara masif banyak dimanfaatkan karena memiliki aktivitas antimikroba (Wahbi et al., 2020) dan sebagai sumber prebiotik (Azhar, 2009). Di Amerika dan Inggris, inulin dapat diproduksi secara komersial dari umbi tanaman chicory (*Cichorium intybus*). Namun, chicory tidak ditemukan dan belum diproduksi di Indonesia sehingga kebutuhan inulin baik untuk industri maupun untuk penelitian masih diimpor. Penelitian yang mengkaji tanaman lokal sebagai sumber inulin terus dikembangkan dalam rangka membatasi dan mengatasi

permasalahan impor. Salah satu bahan baku lokal yang dilaporkan memiliki potensi sebagai sumber inulin adalah gembili (*Dioscorea esculenta* L.) (Pratiwi et al., 2016). Menurut Yuniastuti et al. (2017) gembili (*Dioscorea esculenta* L.) merupakan salah satu tanaman lokal yang mengandung senyawa bioaktif inulin cukup tinggi (14,77%). Sehingga, gembili dapat dimanfaatkan sebagai sumber bahan baku inulin untuk mengurangi ketergantungan pada bahan impor dan diharapkan dapat menambah khasanah fitofarmaka di Indonesia.

Inulin merupakan serat yang larut dalam air dan dapat difermentasi. Inulin dapat ditemukan di beberapa tanaman seperti gandum, bawang, pisang, bawang putih, asparagus dan sawi putih (Charoenwongpaiboon et al., 2019). Inulin dikategorikan sebagai *Generally Recognized As Safe* (GRAS) oleh FDA untuk bidang pangan dan farmasi. Misalnya dalam pembuatan makanan bayi dan sebagai agen diagnostik untuk penentuan fungsi ginjal (Closa-Monasterolo et al., 2013). Inulin dapat dimanfaatkan sebagai agen bioreduktor logam seperti perak. Perak merupakan logam yang dikembangkan sebagai agen antibakteri kuat di bidang medis. Perak dalam bentuk garam (perak nitrat) dapat dibuat ukuran nanopartikel dengan bantuan inulin. Kelarutan inulin pada suhu 25 ± 2 °C pada proses biosintesis perak nitrat menghasilkan ukuran partikel sebesar 29,76 nm. Sedangkan pada suhu kelarutan inulin 60 ± 2 °C ukuran partikel sebesar 35,42 nm. Sementara itu, adanya variasi suhu kelarutan inulin tidak menunjukkan adanya perbedaan nyata terhadap kontrol perak nitrat pada uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli*, meskipun hasil spektra FTIR menunjukkan telah terjadinya interaksi antar gugus fungsi dari perak nitrat dan inulin umbi gembili artinya inulin hanya berperan sebagai *capping agent* dan tidak mempengaruhi aktivitas antibakteri nanopartikel perak (Ermawati, 2021).

Buku ini akan membahas efek imunomodulator tanaman herbal terhadap kadar immunoglobulin G (IgG) hewan uji yang telah diinduksi *agent* yang dapat mempengaruhi antibodi tubuh dengan metode ELISA *reader*. ELISA digunakan untuk

menemukan antibodi, dimana antigen mula-mula diikat pada suatu agen pembawa lalu ditambah antibodi yang akan dicari. Setelah itu ditambah lagi antibodi yang bertanda enzim, seperti *peroksidase fosfatase* dan substrat kromogenik yang bila bereaksi dengan enzim dapat menimbulkan perubahan warna. Perubahan warna yang terjadi sesuai dengan jumlah enzim yang diikat dan sesuai pula dengan kadar antibodi yang dicari (Barathawidjaja, 2000). *ELISA* cukup sensitif, *self-life* reagen panjang, dapat menggunakan spektrofotometer biasa, mudah dilakukan untuk automatisasi, dan tidak mengandung bahan radioaktif. Hasil dari penulisan buku ini diharapkan dapat menjadi salah satu landasan ilmiah pemanfaatan tanaman herbal dalam peningkatan kesehatan (imunitas tubuh), sehingga lebih lanjut dapat di kembangkan menjadi bentuk sediaan fitofarmaka.

B. Rumusan Masalah

1. Berapakah dosis efektif *nanosilver* inulin sebagai imunomodulator?
2. Apakah hasil analisa *ELISA nanosilver* inulin sebagai imunostimulan atau immunosupresan?

C. Tujuan Masalah

1. Pengembangan ekstrak bahan alam yang berpotensi sebagai suplemen dalam meningkatkan sistem imun tubuh.
2. Penerapan teknologi dalam mengukur kadar antibodi hewan uji menggunakan immunoglobulin kit dengan metode *ELISA reader*.
3. Mengembangkan ekstrak bahan alam yang terbukti sebagai imunomodulator dalam bentuk sediaan farmasi.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Imunomodulator

Imunomodulator adalah obat atau agen yang dapat memodulasi fungsi dan aktivitas sistem imun. Cara kerja Imunomodulator meliputi mengembalikan fungsi imun yang terganggu (imunorestorasi), memperbaiki fungsi sistem imun (imunostimulasi), dan menekan respons imun (imunopresi). Imunomodulator biasanya digunakan terutama pada penyakit imunodefisiensi, infeksi kronis dan kanker (Katzung, 2007). Imunomodulator dikelompokkan menjadi 1) imunostimulator, berfungsi untuk membantu meningkatkan fungsi dan aktivitas sistem imun, 2) imunoregulator, dapat membantu meregulasi sistem imun, dan 3) immunopresor dapat menghambat atau menekan aktivitas sistem imun. Kebanyakan tanaman obat yang telah diteliti membuktikan adanya kerja imunostimulator, misalnya stimuno®, sedangkan untuk immunopresor masih jarang dijumpai. Pemakaian tanaman obat sebagai imunostimulator dengan maksud menekan atau mengurangi infeksi virus dan bakteri intraseluler, untuk mengatasi imunodefisiensi atau sebagai perangsang pertumbuhan sel-sel pertahanan tubuh dalam sistem imunitas (BLOCK dan MEAD, 2003). Bahan yang dapat menstimulasi sistem imun disebut biological response modifiers (BRM), dibagi menjadi dua kelompok yaitu bahan biologis dan sintetik. Yang termasuk bahan biologis diantaranya adalah sitokin (interferon), hormon timus dan antibodi monoklonal, sedangkan bahan sintetik antara lain adalah senyawa muramil dipeptida (MDP) dan levamisol (TIZARD, 2000). Pada prinsipnya kerja sistem imun dalam menghadapi invasi bahan asing dari luar tubuh bekerja secara serempak, ibaratnya seperti suatu konser musik dengan sel limfosit T-helper (Th)CD4+ sebagai dirigen-nya. Dengan kata lain, suseptibilitas dan resistensi hewan terhadap infeksi

mikroba sangat tergantung pada aktivasi dari sel ThCD4+ yang berdiferensiasi menjadi 2 kelompok berdasarkan pola sekresi sitokin, yakni pola respon Th1 dan pola respon Th2. Sitokin merupakan protein pembawa pesan kimiawi, atau mediator komunikasi interseluler berperan mengendalikan respon imun baik pada sistem imunitas seluler maupun humoral (TIZARD, 2000).

B. Inulin Gembili

Makanan adalah elemen yang mempunyai peranan penting dalam kehidupan makhluk hidup. Kebutuhan makanan pokok di Indonesia diantaranya beras dan jagung, lalu ubi kayu dan ubi jalar. Indonesia yang merupakan negara agraris dapat menggunakan hasil bumi sebagai upaya peningkatan ketersediaan makanan, walaupun pemanfaatan tersebut belum dilakukan secara ekonomis dan intensif untuk pengkajian potensi sumber makanan yang baru. Hasil bumi di Indonesia sangat banyak bahkan berlimpah. Contoh hasil bumi yang melimpah ini yaitu umbi-umbian sebab bisa ditanam pada berbagai macam tingkatan tanah, kedalaman serta tingkat kekeringan. Hampir di semua daerah di Indonesia mempunyai berbagai macam jenis umbi-umbian, namun pemanfaatan umbi-umbian belum dilakukan secara ideal. Penurunan konsumsi umbi-umbian terjadi karena keterbatasan pengolahan kekinian (modern) sehingga tidak menarik minat masyarakat. Masyarakat hanya mengolahnya dengan cara dibakar, digoreng, maupun direbus, bahkan terkadang sama sekali tidak mengolahnya.

Kandungan air yang banyak pada bahan makanan sumber energi/karbohidrat seperti umbi-umbian menyebabkan penyimpanan yang tidak bertahan lama dan sulit diolah menjadi berbagai macam produk kuliner. Sebaliknya, konsumsi gandum meningkat sangat tajam dalam bentuk mie serta bakery. Gandum mempunyai kelebihan yaitu ketersediaannya yang berwujud tepung dan terjamin dalam pencadangan sebab prosentase air yang sedikit dan pengolahan sederhana menjadi

berbagai macam olahan kue, roti, mie hingga pasta. Gandum menjadi bahan makanan pokok dengan tingkat konsumsi yang cukup besar tidaklah bermanfaat dari segi kesehatan karena jumlah kandungan serat sangat rendah (maksimal 1%). Perubahan pola konsumsi tersebut meningkatkan jumlah kasus penyakit degeneratif (Winarti, Harmayani and Nurismanto, 2011).

Dioscorea esculenta L atau dikenal dengan Gembili yaitu sejenis umbi yang berasal dari famili *Dioscoreaceae* mempunyai umbi serta nabati termasuk pada genus *Dioscorea* atau uwi-uwian. Genus ini mempunyai \pm 600 jenis, dimana delapan diantaranya bisa membentuk umbi yang dapat dikonsumsi. Kelompok *dioscoreaceae* di Indonesia meliputi *Dioscorea pentaphylla*, *Dioscorea alata*, *Dioscorea bulbifera*, dan *Dioscorea hispida*. Famili *Dioscoreaceae* memiliki kelebihan yaitu dapat hidup dan bertunas di bawah tegakan hutan namun hingga sekarang masih menjadi tumbuhan subsiten. Tumbuhan tersebut bukan merupakan tumbuhan esensial yang dibudidayakan dan dikembangkan karena keterbatasan dalam penggunaan. Keutamaan dari kelompok *Dioscorea* yaitu memiliki elemen yang digunakan sebagai bahan makanan yang mengandung senyawa bioaktif atau fungsional (Yoga Prabowo, Estiasih and Purwantiningrum, 2014). Gembili termasuk dalam varietas tanaman yang memiliki buah di bawah tanah, tumbuh menjalar dan dapat mengapai tinggi sekitar 3-5 meter dengan batang yang memiliki duri berwarna hitam di sekitar umbi, dan daun berwarna hijau. Umbi gembili serupa ketela jalar yang berukuran sebesar tangan orang dewasa yang mengempal, berkulit tipis dan warnanya coklat muda. Warna umbi tersebut putih bersih, rasanya spesifik dan memiliki struktur sama ubi jalar. Budidaya gembili saat ini mengalami penurunan karena tingkat konsumsinya berkurang bahkan mengalami penurunan. Masyarakat jarang mengkonsumsi umbi gembili karena informasi mengenai manfaat umbi gembili bagi kesehatan sangat sedikit. Umbi sisa atau hasil buangan dan kulit kupasan umbi dapat dimanfaatkan sebagai makanan ternak juga sebagai

simpanan pangan waktu musim paceklik. Umbi gembili yang telah diolah atau dimasak biasanya dipergunakan sebagai sumber karbohidrat. Kandungan karbohidrat yang tinggi pada Gembili menjadikannya sebagai salah satu sumber makanan pokok. Umbi tersebut dapat juga digunakan sebagai bahan paduan dan kombinasi sayuran setelah digoreng, diolah atau dikukus dan menjadi makanan utama yang dapat menggantikan beras (Yoga Prabowo, Estiasih and Purwantiningrum, 2014). Onwueme (1984) dalam Richana and Surnarti (2004), menyatakan bahwa nutrien terbesar umbi gembili yaitu karbohidrat sebesar 27-33%. Dalam 100 gram umbi gembili terkandung karbohidrat sebesar 31,30 gram. Gembili mengandung karbohidrat yang terdiri dari gula, amilopektin dan amilosa. Elemen gula meliputi glukosa, sukrosa dan fruktosa yang menjadikan umbi terasa manis. Polisakarida yang larut pada air (WSP) juga terdapat pada umbi gembili. Selain itu, jumlah rendemen pada gembili merupakan jumlah tertinggi dibandingkan dengan umbi-umbi lain yaitu tepung umbi sekitar 24,28% dan tepung pati sekitar 21,44% sehingga sangat potensial untuk dikembangkan sebagai tepung ataupun pati. Gembili memiliki kandungan nutrien yang tinggi pada zat besi, fosfor, potasium, serat makanan, vitamin C, vitamin B6, lipid, sodium, dan indeks glisemik, serta senyawa bioaktif yang bermanfaat untuk kesehatan (Yoga Prabowo, Estiasih and Purwantiningrum, 2014).

Inulin merupakan senyawa bioaktif fungsional yang sering digunakan dalam dunia kesehatan dan farmasi karena memiliki berbagai manfaat seperti dapat menormalkan kadar gula dalam darah pada penderita diabetes dan menurunkan resiko kanker usus besar (Mensink *et al.*, 2015). Inulin dihasilkan oleh tanaman *cicory* yang tidak ditemukan di Indonesia sehingga Indonesia mencukupi kebutuhan inulin dengan cara impor. Beberapa penelitian di Indonesia telah dilakukan untuk memproduksi inulin dari bahan alam lokal, misalnya umbi gembili. Hasil analisis kadar inulin pada 10 jenis uwi diperoleh bahwa gembili (*Dioscorea esculanta* L.) memiliki kandungan

inulin tertinggi. Kandungan inulin pada gembili sebesar 1,53 g/mg tepung gembili (Winarti *et al.*, 2013). Hasil penelitian lain menunjukkan bahwa kandungan inulin yang terdapat dalam umbi Gembili sebesar 14,629% (Fajrih, Khoirudin and Fanani, 2020). Inulin termasuk salah satu unsur bahan makanan yang mengandung kadar serat pangan lebih dari 90% dan digunakan dalam makanan fungsional. Sifat Inulin yang larut di dalam air menyebabkannya tidak bisa dihancurkan oleh enzim-enzim pencernaan sehingga tidak mengalami perubahan struktur ketika mencapai usus besar. Namun, inulin dapat mengalami fermentasi dikarenakan proses mikroflora di dalam usus besar, merangsang pertumbuhan dan aktivitas bakteri non patogen dalam saluran cerna secara selektif. sehingga berdampak positif pada kesehatan jasmani. Oleh sebab itu, inulin dapat dimanfaatkan sebagai prebiotik (Winarti, Harmayani and Nurismanto, 2011). Oleh karena itu Inulin memiliki fungsi sebagai prebiotik (Marsono dalam (Fajrih, Khoirudin and Fanani, 2020)). Hampir seluruh inulin di dalam usus dapat difermentasi oleh mikrobia penghasil asam laktat sehingga produk akhirnya yaitu SCFA (*short chain unsaturated fat*) atau asam lemak rantai pendek. Keadaan ini menyebabkan pH usus menjadi turun yang akhirnya pertumbuhan dan aktifitas patogen menjadi terhambat, sebaliknya bakteri non patogen, khususnya *Lactobacillus*, dapat berkembang biak. Mekanisme tersebut berimplikasi pada peningkatan status kesehatan.

Inulin memiliki manfaat lain yaitu sebagai pengganti gula dan lemak yang memproduksi lebih rendah kadar kalori (Winarti, 2011). Inulin berupa zat yang digunakan untuk campuran heterogen polimer fruktosa yang banyak ditemukan di alam dan berfungsi sebagai karbohidrat cadangan pada tanaman. Oligofruktose yang merupakan subbagian inulin, berisi polimer dengan derajat polimerisasi (DP). Inulin dan oligofruktose mempunyai tingkat kalori yang rendah karena tidak dihancurkan didalam saluran cerna bagian atas. Inulin juga memberikan rangsangan pada bifidobacteria usus untuk tumbuh serta dapat merangsang proses sekresi insulin response

sehingga tidak menaikkan kadar glukosa serum. Nilai komersial inulin bersifat netral dan tidak beraroma yang dapat membuat *mouthfeel* di mulut, serta membuat makanan rendah lemak bersifat stabil dan *accepted*. Bahan makanan yang memiliki kadar lemak yang rendah dapat dibuat lebih manis, dan dinaikkan teksturnya tanpa mengurangi lemak dengan inulin. Pembuatan produk makanan dengan serat yang tinggi tidak dapat mempengaruhi cita rasa dengan inulin karena oligofruktosa dalam inulin bersifat fungsional. Hal ini dapat digunakan sebagai panduan dalam menyusun menu sehat yang kreatif dan inovatif bagi konsumen yang cerdas saat ini (Kathy R. Niness, 1999). Penggantian zat inulin yang dibuat dari ekstrak umbi gembili pada produk bakery (roti dan kue) diharapkan dapat menaikkan jumlah serat, menurunkan jumlah lemak, dan tetap mempertahankan sifat fisik bakery (mengembang dan empuk) sehingga diminati masyarakat sebagai konsumen. Di sisi lain, inulin yang merupakan serat larut dan mengandung sumber prebiotik juga bisa bermanfaat untuk menaikkan jumlah penyerapan kalsium (Sari *et al.*, 2019). Manfaat lain dari inulin yang ditemukan dalam penelitian yaitu sebagai antikanker, antidiabetik dan anti hiperlipidemia (menurunkan kadar lemak) (Winarti, Harmayani and Nurismanto, 2011). Pembahasan tentang manfaat inulin gembili sebagai anti hiperlipidemia belum banyak. Inulin gembili diharapkan dapat menurunkan kadar trigliserida. Trigliserida merupakan salah satu jenis lemak utama dalam darah yang fungsinya menyimpan kalori dan menyediakan energi untuk tubuh. Kadar trigliserida yang tinggi mengakibatkan resiko penyakit pembuluh darah lainnya. Oleh sebab itu, inulin gembili ini diharapkan menjadi formula yang dapat mengelola penyakit degeneratif dan penyakit pembuluh darah dengan baik juga mencegah perkembangan yang buruk.

Menurut Yuniastuti et al (2019) bahwa hasil isolasi dan identifikasi inulin dari umbi gembili menghasilkan komposisi padatan sebesar 3,983%, gula reduksi 3,3458 mg/mL, inulin sebesar 19,9098%, dan total gula sebesar 2,0667 mg/mL. (Yuniastuti and Iswari, 2019). Isolasi inulin tersebut menjadi

terobosan baru dalam upaya pemanfaatan sumber daya alam Indonesia yang sangat banyak. Jenis tumbuhan, cara ekstraksi dan presipitasi akan menghasilkan rendemen serta karakteristik yang berbeda. Misalnya, *Agave sisalana* akan menghasilkan inulin dengan derajat polimerisasi yang berbeda pada usia tumbuhan yang berbeda pula (Arrizon dkk., 2010). Perbedaan cara pengeringan memiliki pengaruh terhadap karakteristik hasil inulin. Penggunaan kabinet *dryer* untuk pengeringan membutuhkan sedikit biaya dan akan menghasilkan inulin yang bersifat semi kristalin sehingga memiliki tekstur yang keras dan pada proses formulasi akan menyebabkan sulit berinteraksi dengan bahan makanan lain (Park dkk. , 2006). *Shower dryer* digunakan dalam proses pengeringan memerlukan biaya yang tinggi, namun dapat menghasilkan inulin yang bersifat amorf dan mudah larut dalam air (Toneli dkk. , 2008). Oleh sebab itu, alternatif pengeringan dengan biaya kecil namun tidak mengubah sifat asli perlu dikaji dan diteliti, misalnya pengeringan dengan cara *froth mat drying*.

C. Bahan Alam Peningkat Imunitas

Terdapat beberapa herbal yang pernah diteliti dan terbukti mampu meningkatkan imunitas. Beberapa herbal tersebut antara lain Jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*), Lemon (*Citrus limon*), Bawang putih (*Allium sativum*), Kunyit (*Curcuma longa*), Mengkudu (*Morinda citrifolia*), Pegagan (*Centella asiatica*), Ekinase (*Echinacea pupurea*), Meniran (*Phyllanti niruri*), Jahe Merah (*Zingiber officinale var. Rubrum*), Kencur (*Kaempferia galanga*), Temulawak (*Curcuma zanthorrhiza*), Sambilotto (*Andrographis paniculate*), Jinten Hitam (*Nigella sativa*), Cengkeh (*Syzygium aromaticum*), Daun Kelor (*Moringa oleifera*) dan lain sebagainya.

1. Jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*)

Jeruk nipis banyak digunakan sebagai agen stimulan serta digunakan untuk menurunkan berat badan (Suryawanshi, 2011). Jeruk nipis memiliki aktivitas antioksidan yang berkaitan dengan kemampuannya dalam

mencari radikal bebas dan mengganggu rantai radikal (Maksoud et al., 2021). Flavonoid merupakan komponen bioaktif yang banyak terkandung pada jeruk nipis, dikelompokkan menjadi flavanon, flavon, dan flavonol. Selain itu juga terdapat kandunga limonoid seperti limonin dan nomilin, serta alkaloid seperti p-sinefrin (Suntar et al., 2018).

Air jeruk nipis mengandung 86% asam fenolik dari komponen total fenolik (Tounsi et al., 2011). Pada penelitian Jabri Karoui & Marzouk (2013) menghasilkan bahwa komponen aroma dari jeruk nipis terdiri dari hidrokarbon monoterpen termasuk limonen yang mudah menguap sebanyak 92%, diikuti oleh α -felandren sebesar 2% dan α -tujen sebesar 2%. Sesquiterpen teroksigenasi ditemukan pada air jeruk nipis dengan kariofilen oksida sebagai komponen terbesarnya (1,4%). Asam fenolik ditemukan sebesar 71% dengan asam p-kumarat (18%) dan asam ferulat (19%), diikuti oleh flavonoid mencapai 23% dengan rutin sebagai kandungan utamanya. Daun jeruk nipis mengandung senyawa bioaktif flavonoid, asam askorbat, dan fenolik sebagai antioksidan alami (Khettal et al., 2017). Daun jeruk nipis juga mengandung minyak esensial terutama limonen, linalool, α -terpineol, dan linalyl asetat (Gholivand et al., 2013). Analisis fitokimia dari daun jeruk nipis mengandung flavonoid, fitosterol, karbohidrat, saponin, minyak atsiri, tannin, terpenoid, dan protein (Periyanayagam et al., 2013).

Jeruk nipis memiliki aktivitas imunomodulator dengan memodulasi sistem imun alami dan berpotensi sebagai agen terapeutik dalam memodulasi sistem imun. Jeruk nipis memiliki kemampuan intraseluler dan ekstraseluler dalam memblok aktivasi *nuclear factor-kappa B* dan jalur pro-inflamatori. Komponen bioaktifnya juga dapat menghambat ekspresi gen sitokin pro-inflamatori seperti interleukin-1 α , interleukin-1 β , serta interleukin-6. Selain itu jeruk nipis juga berefek pada peningkatan fagositosis leukosit (Harun et al., 2015). Komponen polisakarida dari jeruk nipis juga

menunjukkan peningkatan aktivitas imun pada penelitian Shen et al., (2017) yaitu dapat mengaktifkan makrofag melalui jalur *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) dan $\text{NF}\kappa\beta$.

Selain memiliki efek pada sistem imun, jeruk nipis juga memiliki berbagai fungsi lainnya seperti antioksidan, antimikroba pada bakteri gram positif dan bakteri gram negatif, antikanker dan berefek sitotoksik, antidiabetes, antiobesitas, antijamur, antikolinesterase, meningkatkan kesuburan, dan baik untuk kesehatan jantung (Jain et al., 2020; Maksoud et al., 2021).

2. *Lemon (Citrus limon)*

Lemon merupakan salah satu buah yang populer di dunia dengan berbagai macam kegunaan. Banyak penelitian mengklaim bahwa vitamin C yang berperan signifikan terhadap imunitas dan menetralkan radikal bebas pada tubuh dan menurunkan resiko penyakit jantung. Lemon mengandung banyak vitamin (niasin, riboflavin, tiamin, kolin, asam pantotenat, asam folat, vitamin C, vitamin B6) serta mineral (kalsium, tembaga, zat besi, mangan, magnesium, fosfor, kalium, zink) yang dibutuhkan oleh tubuh. Lemon harus disimpan pada temperatur kamar dan dijauhkan dari sinar matahari secara langsung. Lemon dapat memperbaiki fungsi pencernaan, meningkatkan sistem imun tubuh, menaikkan energi, menghidrasi tubuh, memperbaiki kulit dan membantu dalam penurunan berat badan (Pal, 2017).

Komponen bioaktif yang paling penting pada buah lemon dan airnya adalah flavonoid, seperti flavanon (eriodiktiol, hesperidin, hesperetin, naringin), flavon (apigenin, diosmin), flavonol dan turunannya. Pada buah utuhnya, terdeteksi flavonoid lain yaitu flavonol (limositrin dan spinasetin) dan flavon (orientin dan vitexin). Beberapa flavonoid merupakan sifat khas dari buah lemon yaitu neohesperidin, naringin, dan hesperidin (Klimek-Szczykutowicz et al., 2020). Asam fenolat merupakan

komponen lainnya yang ditemukan di buah lemon. Di dalam buah lemon juga terdapat komponen kumarin, asam karboksilat, karbohidrat, asam amino, vitamin B kompleks, dan terutama vitamin C (asam askorbat) (Czech et al., 2020; Ledesma-Escobar et al., 2015). Komponen lain yang ada pada buah lemon adalah limonoid dimana limonoid ini merupakan metabolit sekunder yang teroksidasi tinggi dengan struktur triterpenoid trisiklik (Gualdani et al., 2016). Pada minyak biji lemon terdapat komponen utamanya yaitu asam lemak seperti asam arakidonat, asam behenate, dan asam linoleate, serta tokoferol dan karotenoid (Mucci et al., 2013). Komponen utama minyak atsiri lemon adalah monoterpenoid (limonen, β -pinen, γ -terpinen, sabinene, mirsen, geranial, linalool), serta furanokumarin (psoralen) dan flavon polimetoksilasi (Kaskoos, 2019).

Hesperidin merupakan senyawa flavonoid yang merupakan golongan flavanon. Senyawa ini memiliki berbagai efek farmakologis (Martínez et al., 2019). Berdasarkan penelitian secara *in silico*, hesperidin berinteraksi dengan berbagai kemokin dan mediator inflamatori seperti TNF- α , IL-1 β , IL-6, dan oksida nitrat (NOs) (Ganeshpurkar & Saluja, 2019). Penelitian lain terkait hesperidin secara *in vitro* menunjukkan aktivitas imunomodulatori. Hasil menunjukkan bahwa flavonoid ini meningkatkan aktivitas makrofag dengan cara meningkatkan proliferasi sel dan menghambat lipopolisakarida (LPS) dengan menekan produksi level TNF- α , IL-1 β , IL-6, and NO. Hesperidin memiliki aktivitas imunomodulatori dimana menginisiasi fungsi dari imunitas alami dengan mekanisme proliferasi makrofag dan menekan LPS yang terstimulasi akibat adanya TNF- α , IL-1 β , IL-6 and NO (Ganeshpurkar & Saluja, 2020a). Pada penelitian lain, hesperidin dapat meningkatkan sitotoksitas sel *Natural Killer* (NK) dan proporsi fagosit monosit, menurunkan sekresi sitokin oleh makrofag terstimulasi, meningkatkan sel T *helper* pada kelenjar timus, darah, dan limpa (Ruiz-Iglesias et al., 2020).

Perlakuan hesperidin dapat menurunkan NO, IL-10, IL-12, dan TNF- α yang berkaitan dengan respon imun yaitu menekan inflamasi dan meningkatkan fungsi makrofag (Dourado et al., 2013). Hesperidin juga dapat meningkatkan imunitas seluler dan humoral pada model tikus. Hesperidin menurunkan mielosupresi yang diinduksi siklofosamid, selain itu hesperidin juga mampu meningkatkan titer antibody dan level imunoglobulin (Ganeshpurkar & Saluja, 2020b).

Asam folat di dalam buah lemon juga berperan pada sintesis RNA, DNA, pembelahan sel, sintesis protein, dan pertumbuhan jaringan. Folat juga berperan pada regulasi imun intestinal dan berkontribusi pada fungsi perlindungan usus. Folat juga berperan pada regulasi sel T di dinding usus halus sehingga mencegah respon imun yang merugikan pada bagian tersebut. Kekurangan folat terbukti akan mempengaruhi system imun seperti penurunan sirkulasi limfosit T, mengurangi jumlah sel *Natural Killer*, menghambat proliferasi limfosit T sitotoksik CD8+, mengganggu proses pematangan sel dendritik yang menyebabkan turunnya produksi sitokin (IL-2, IFN- γ , dan IL-10). Kekurangan folat juga dapat menurunkan aktivitas fagositosis neutrophil (Miles & Calder, 2021).

Selain berperan sebagai imunomodulator, lemon juga memiliki berbagai aktivitas biologis lainnya seperti antikanker, efek antioksidan dari senyawa flavonoid, antiinflamasi dari senyawa hesperidin, antimikroba, antiparasit, antialergi, antidiabetes, antiobesitas, serta melindungi organ jantung dan pencernaan (Klimek-Szczykutowicz et al., 2020).

3. *Bawang putih (Allium sativum)*

Bawang putih (Family: *Amaryllidaceae*) merupakan herba aromatic dan telah banyak dikenal di berbagai negara karena memberikan banyak manfaat pengobatan. Ekstrak bawang putih diketahui dapat meningkatkan sistem imun serta menghambat kanker dan penyakit jantung. Allisin

merupakan komponen utama bawang putih yang mengandung sulfur dan bertanggung jawab terhadap rasa dan bau dari bawang putih. Alliin merupakan prekursor utama dari allisin yang merepresentasikan sekitar 70% total tiosulfinat (Sobolewska et al., 2015). Bawang putih diketahui mengandung senyawa fitokimia yang mengandung sulfur seperti ajoen, thiosulfinat (allisin), vinildhitiin, sulfida (diallyl disulfida (DADS), diallyl trisulfida (DATS)). Komponen organosulfur lain yang ada pada bawang putih adalah N-asetilsistein (NAC), S-Allil-sistein (SAC), dan S-allil-merkaptosistein (SAMC) dimana keseluruhannya merupakan turunan dari aliin. SAC memiliki aktivitas antioksidan, antiinflamasi, menambah energi, antiapoptosis serta mempengaruhi kapasitas sinyal dalam tubuh, sedangkan SAMC berperan sebagai antikanker melalui aktivitasnya dalam pencegahan pembelahan sel kanker (Y. Liu et al., 2015).

Bawang putih diketahui dapat meningkatkan sistem imun tubuh seluler dengan meningkatkan aktivitas sel NK yang berperan penting dalam pengobatan kanker (D. Wang et al., 2010). Bawang putih memiliki aktivitas imunomodulatori dengan berbagai mekanisme yaitu memodulasi sekresi sitokin dan kemokin, selain itu dapat menghambat transkripsi $\text{NF}\kappa\beta$, menghambat transkripsi dari gen sitokin yang terlibat pada respon proinflamasi ($\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , MCP-1 , dan IL-12). Mekanisme lainnya dalam pertahanan tubuh adalah dapat meningkatkan fagositosis makrofag dan menstimulasi sel T CD4^+ . Bawang putih juga dapat memodulasi profil Th2 dan meningkatkan produksi immunoglobulin (Arreola et al., 2015). Penelitian lain terkait imunostimulan yaitu pemberian ekstrak bawang putih dengan dosis 1 mg/mL dapat meningkatkan makrofag dan menstimulasi limfosit (Radjabian et al., 2018). Selain itu bawang putih juga berperan dalam meningkatkan respon imun dengan cara menurunkan level leptin dan resistin, meningkatkan sel T $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$, meningkatkan sel NK,

menurunkan PPAR γ , mengaktivasi *adenosin mono phosphate-activated protein kinase* (AMPK), menghambat jalur sinyal *toll-like receptor* (TLR), menekan TNF- α , IL-6, dan CRP (Donma & Donma, 2020). Selain berperan dalam meningkatkan respon imun, bawang putih juga dikenal memiliki berbagai manfaat lainnya seperti antioksidan, antikanker, antiinflamasi, antialzheimer, baik untuk dislipidemia, antidiabetes, antiobesitas, antihipertensi dan lain sebagainya (Batiha et al., 2020).

4. *Kunyit (Curcuma longa L.)*

Kunyit telah banyak digunakan sebagai pengobatan herbal dan untuk mengobati berbagai macam penyakit. Kurkumin (diferuloilmetan) merupakan unsur utama dari kunyit. Turunan kurkumin yaitu kurkuminoid (merupakan molekul polifenolik). Terdapat dua bentuk utama kurkuminoid yaitu desmetoksikurkumin dan bisdesmetoksikurkumin yang memberikan warna kuning pada kunyit. Selain kurkuminoid, komponen aktif lainnya dari kunyit termasuk seskuiterpen, diterpene, dan triterpenoid. Kurkumin memiliki dua komponen tautomerik dalam bentuk keton dan enol. Bentuk enol memiliki sifat lebih stabil dalam bentuk padat dan cairan. Kurkumin memiliki warna kuning muda dan dapat diaplikasikan sebagai pewarna makanan (Ahsan et al., 2020).

Kurkumin terdapat pada ekstrak kunyit mencapai 60-70%, diikuti oleh demetoksikurkumin sebesar 20-30%, lalu bisdesmetoksikurkumin sebesar 10-15%. Reaksi kimia yang terjadi pada aktivitas biologis dari kurkumin adalah reaksi donasi atom hidrogen sehingga kurkumin teroksidasi, selain itu dapat melalui reaksi adisi nukleofilik yang *reversible* dan *irreversible*, serta melalui reaksi degradasi dan enzimatik (Nelson et al., 2017). Kurkumin merupakan molekul hidrofobik dengan nilai log P 3,43 sehingga sulit larut air dan sukar terdistribusi dalam tubuh menyebabkan bioavailabilitasnya juga buruk. Kurkumin lebih larut dalam pelarut polar seperti DMSO, methanol, aseton, dan etanol,

tetapi kelarutan kurkumin dapat ditingkatkan Ketika bagian reaksi diketo terikat pada polimer, siklodekstrin, lipid, protein, dan struktur makromolekul lainnya (Priyadarsini, 2009). Dosis oral maksimum dari kurkumin adalah 8 g/hari selama 3 bulan. Pada dosis ini, kurkumin tidak menunjukkan efek berbahaya dan toksik pada manusia (Chainani-Wu, 2003). Kurkumoinoid juga telah disetujui oleh FDA dengan profil keamanan yang ditunjukkan dengan penelitian klinis dengan dosis antara 4000 dan 8000 mg/hari, serta dosis mencapai 12.000 mg/hari pada konsentrasi 95% kurkuminoid dengan tiga kandungan yaitu kurkumin, bisdemetoksikurkumin, dan demetoksikurkumin (Hewlings & Kalman, 2017). Selain mengandung kurkumin, kunyit juga mengandung karbohidrat dan serat. Selain itu mengandung protein dan lemak, tetapi tidak terkandung kolesterol di dalamnya. Kunyit juga mengandung piridoksin, vitamin C, kalium, kalsium, magnesium, dan fosfor (Ahmad et al., 2020).

Kunyit memiliki kemampuan dalam pengobatan yang terkait respon imun, penyakit metabolic, serta kanker. Beberapa mekanisme kurkumin yang bersifat imunomodulator yaitu kurkumin dapat mempengaruhi proliferasi sel T limfosit, selain itu kurkumin juga bersifat imunomodulator pada sel imun lainnya seperti sel B, neutrophil, eosinophil, monosit, makrofag, dan sel NK (Srivastava et al., 2011). Selain itu, kurkumin juga memberikan efek imunomodulator dengan menekan ekspresi IL-2, Foxp3, dan CD25, menghambat transduksi sinyal fosforilasi IL-2 reseptor, dan aktivasi transkripsi janus kinase 3, serta menekan fungsi sel T CD4+ CD25+ (Huang & Beevers, 2011). Kemampuan imunomodulatori dari kurkumin juga karena adanya interaksi dengan komponen selular seperti sel dendritik, makrofag, dan sel limfosit T dan B, selain itu juga komponen molekuler seperti sitokin dan berbagai factor transkripsi. Kurkumin diketahui menghambat sel dendritik yang berelasi dengan supresi ekspresi CD80 dan CD86, dimana keduanya menyediakan

sinyal stimulatori yang dibutuhkan pada aktivasi sel T dan mengganggu produksi sitokin inflamatori IL-12. Kurkumin diketahui juga dapat meningkatkan serum IgG dan IgM sehingga meningkatkan fungsi imun tubuh. Kurkumin juga dapat mempengaruhi jalur sinyal JAK/STAT dimana kurkumin sendiri dapat menghambat fosforilasi jalur STAT3 sehingga penurunan aktivitas ikatan DNA pada STAT3 dapat menekan ekspresi IL-1 β dan TNF- α (Liu et al., 2013). Kurkumin juga diketahui dapat menurunkan pelepasan sitokin pro-inflamatori dan nitrat oksida (NO), serta ekspresi iNOS dan NF κ B. Selain itu kurkumin juga dapat menurunkan pelepasan sitokin proinflamatori lainnya seperti TNF- α , IL-1 β , dan IL-6 (Catanzaro et al., 2018).

Selain berfungsi sebagai imunomodulatori, kurkumin juga memberikan berbagai manfaat kesehatan lainnya seperti antioksidan dengan cara menangkal radikal bebas yaitu reactive oxygen species (ROS) sebagai radikal superoksida, hidrogen peroksida, dan radikal nitrat oksida serta menghambat peroksidasi lipid (Ak & Gulcin, 2008). Kurkumin juga memiliki efek antiinflamasi karena kurkumin memiliki mekanisme yaitu (1) menghambat faktor transkripsi pro-inflamatori (NF κ B dan AP-1), (2) menurunkan sitokin pro-inflamatori seperti TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, MIP-1a, MCP-1, CRP, dan PGE2, (3) menurunkan enzim seperti 5-lipooksigenase dan COX-2 dan -5, (4) menghambat *mitogen activated protein kinase* (MAPK) serta jalur yang terlibat pada sintesis enzim NO sintase (Urdzikova et al., 2015). Kurkumin juga dapat mencegah karsinogenesis sebagai antiangiogenesis dengan menghambat faktor angiogenesis (VEGF) dan faktor pertumbuhan fibroblast. Kurkumin dapat menekan metastasis sel kanker serta meningkatkan apoptosis sel kanker melalui jalur sinyal PI3K/Akt (Astinfeshan et al., 2019). Selain manfaat diatas, kurkumin juga memiliki manfaat sebagai hepatoprotektif, antimikroba, mencegah penyakit kardiovaskuler, antivirus, antiarthritis, antijamur, antiobesitas, antidiabetes, mempercepat penyembuhan luka,

antialzheimer, menyembuhkan depresi dan kecemasan, serta lainnya (Rathore et al., 2020).

5. *Mengkudu (Morinda citrifolia)*

Mengkudu atau disebut juga pace atau noni, merupakan tanaman herbal yang tersebar di benua Pasifik Selatan terutama Malaysia, Indonesia, Taiwan, Filipina, Thailand, Vietnam, India, Afrika. Pada mengkudu mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, fenol, terpenoid, steroid, glikosida, triterpenoid, tannin, karbohidrat, protein, lemak (Ayunda et al., 2020). Beberapa kelas metabolit terdapat pada berbagai bagian tanaman mengkudu termasuk asam, alkohol dan fenol, antrakuinon, glikosida antrakuinon, karotenoid, ester, flavonoid, iridoid, keton, lakton, lignan, nukleosida, triterpenoid, sterol dan komponen kecil lainnya. Antrakuinon merupakan komponen fenolik utama pada mengkudu. Terdapat laporan bahwa antarkuinon (damnakantal) memiliki fungsi sebagai antikanker dan memiliki aktivitas sebagai anti-HIV. Antarkuinon ini berpotensi sebagai inhibitor tirosin kinase dan topoisomerase II (R. Singh, 2012). Kandungan monoterpene (limonen) pada mengkudu diketahui dapat mencegah kanker dan limonen ini dapat menstimulasi kelenjar timus untuk menstimulasi sel T yang dapat menghancurkan sel karsinoma (Ali et al., 2016).

Fraksi alkaloid dari buah mengkudu dengan dosis 0,5 dan 1,0 mg/mL diketahui memiliki aktivitas immunostimulan melalui peningkatan imun adaptif sel B dan sel T (Nayak & Mengi, 2010). Penelitian lain yaitu konsentrasi mengkudu sebesar 6% mampu meningkatkan konsentrasi *toll like receptor-4* (TLR-4) dan TLR-5, kemokin (IL-8), IL-12, serta menurunkan konsentrasi IL-6 dan TLR-7. Pada konsentrasi 4%, mengkudu mampu meningkatkan ekspresi TLR-3, TLR-4, dan TLR-5 yang mengindikasikan bahwa mengkudu memiliki aktivitas antivirus dan antibakteri (Lohani, 2010). Penelitian lain juga menemukan bahwa mengkudu bersifat imunomodulator melalui peningkatan sel T CD4+, CD4+IFN- α +, dan CD4+CD25+ (Mufidah et al., 2013). Pada penelitian

yang dilakukan oleh Murata et al., (2014), mengkudu ditemukan dapat menurunkan produksi IL-2 dan mengaktifasi sel *Natural Killer* pada mencit. Kandungan glikosida iridoid juga dapat mengaktifasi sel NK. Selain itu, mengkudu juga dapat menghambat produksi TNF- α yang merupakan promotor tumor endogen (Mahantesh et al., 2018). Mekanisme lain dari mengkudu yang beraktivitas imunostimulan yaitu jus buah mengkudu yang diminum selama 15 hari dapat menghambat produksi IL-4 pada splenosit dan meningkatkan IFN- γ . Komponen IFN- γ sendiri terlibat pada aktivasi makrofag sehingga hal ini dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag (West et al., 2018). Hal ini sama seperti penelitian yang dilakukan oleh Farizal et al., (2020) yang memberi mencit ekstrak etanol mengkudu dengan dosis 0,64 mg/KgBB; 1,28 mg/KgBB; dan 2,56 mg/KgBB, ternyata dapat meningkatkan fagositosis makrofag dibandingkan dengan kontrol.

Selain memberikan aktivitas imunostimulan, mengkudu juga memberikan manfaat kesehatan lainnya seperti antimikroba dan antiseptik, antijamur, antioksidan, antiinflamasi, antiarthritis, antidiabetes, berefek analgesik, mempercepat penyembuhan luka, antiemetik, antivirus, dan lain sebagainya (Abou Assi et al., 2017).

6. *Pegagan (Centella asiatica)*

Pegagan (*Centella asiatica*) atau Gotu kola merupakan herba yang banyak digunakan di Cina dan negara Asia Selatan lainnya untuk menyembuhkan berbagai macam penyakit. Pegagan mengandung triterpenoid pentasiklik seperti asiatikosida, brahmosida, asam madekasat, sentelosa, sentelosida, dan madekasosida (Murray & Pizzorno, 2012). Komponen kimia yang banyak bertanggungjawab terhadap aktivitas farmakologis adalah triterpene, terutama asiatikosida, asam asiatik, madekasosida, dan asam madekasat. Madekasosida ($C_{48}H_{78}O_{20}$) merupakan saponin triterpene pentasiklik dari pegagan dengan bobot molekul 975,1 g/mol. Asiatikosida ($C_{30}H_{48}O_6$) merupakan triterpene

pentasiklik yang memiliki bobot molekul 504,7 g/mol (Sun et al., 2020).

Pegagan sendiri memiliki manfaat sebagai imunostimulan pada tubuh. Pada penelitian yang dilakukan oleh Harun et al., (2021) yaitu kombinasi antara asam asiatik dan madekasosida dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag dan meningkatkan produksi nitrat oksida (NO). Fagositosis merupakan proses fisiologis makrofag pada imunitas alami. Fagositosis berkontribusi terhadap efektivitas makrofag pada respon inflamasi dalam melawan penyakit (Richards & Robert G., 2016). Penelitian serupa juga pernah dilakukan oleh (Ningsih & Wibowo, 2011) yang memberikan hasil bahwa pemberian ekstrak etanol sebanyak 40 mg/200 g BB tikus dapat meningkatkan aktivitas dan kapasitas makrofag secara signifikan. Mekanisme lain dari pegagan terkait imunomodulator yaitu ekstrak etanol daun pegagan dengan dosis antara 25 hingga 100 mg/mL dapat meningkatkan efek kemotaktik dan fagositosis pada neutrofil manusia. Ekstrak methanol dengan dosis antara 100-500 mg/Kg BB dapat meningkatkan indeks fagositosis sel darah putih mencit. Ekstrak air pegagan dengan dosis antara 15,625 hingga 1000 µg/mL dapat meningkatkan eritrosit secara *in vitro*, selain itu ekstrak air pegagan ini dengan dosis 100 mg/Kg BB dapat meningkatkan proliferasi limfosit serta antibodi IgM dan IgG. Ekstrak etanol daun pegagan pada dosis 50 dan 150 mg/Kg BB dapat meningkatkan sekresi IFN- γ pada mencit. Selain itu mekanisme lain dari pegagan dalam respon imun adalah dapat menurunkan level IL-10, menghambat sel mast dan ekspresi iNOS, COX-2, NF κ B, TNF- α , IL-1, IL-6, dan IgE (Harun et al., 2019).

Selain memiliki efek sebagai imunomodulator, pegagan juga memiliki efek farmakologis lainnya seperti anti-kanker dengan menginduksi apoptosis dari sel kanker, anti-bakteri pada bakteri gram positif dan gram negatif, anti-jamur, anti-inflamasi, neuroprotektif, antioksidan, antidepresan, mempercepat penyembuhan luka,

antidepresan, antidabetes, hepatoprotektif dan lain sebagainya (Prakash et al., 2017).

7. Ekinase (*Echinacea pupurea*)

Genus ekinase merupakan keluarga dari *Asteraceae*. Ekinase banyak tumbuh dan dibudidayakan di negara Amerika Serikat, Kanada, dan Eropa khususnya di negara Jerman dan dilaporkan banyak memberikan manfaat pada kesehatan (Sharifi-Rad et al., 2018). Komponen aktif dari ekinase adalah alkilamid, turunan asam kafeat, asam kaftarat, asam rosmarinate, ekinakosida, asam sikorat, poliasetilen, polisakarida, flavonoid, komponen terpenoid, komponen lipid, komponen nitrogen, dan konstituen lainnya (Gupta, 2020). Turunan asam kafeat memiliki efek imunomodulator dan mengurangi inflamasi serta stress oksidatif. Asam sikorat merupakan turunan asam kafeat yang merupakan salah satu komponen aktif pada ekinase (Wang et al., 2020).

Ekinase diketahui memiliki efek imunomodulator dengan beberapa mekanisme. Aktivitas imunostimulan dari tanaman ini dengan 3 mekanisme yaitu aktivasi fagositosis, stimulasi fibroblast, dan meningkatkan aktivitas leukosit. Ekinase dapat memperkuat sistem imun dalam melawan pathogen melalui aktivasi neutrophil, makrofag, leukosit polimorfonuklear, dan sel *Natural Killer* (NK). Komponen alkamida yang terdapat pada ekinase dapat meningkatkan cAMP, p38/MAPK, JNK, mempengaruhi $\text{NF}\kappa\beta$ dalam mengaktivasi sel B, mengaktivasi ATF-2/CREB-1 pada monosit manusia dan makrofag. Alkamida juga dapat mengstimulasi IL-10 dan menghambat TNF- α secara *in vitro*. Ekinase juga dapat menghambat COX-1 dan COX-2 serta 5-lipooksigenase dimana dapat menghambat sel NK dan beraktivitas sebagai antiinflamasi. Ekinase juga dapat meningkatkan monosit, neutrophil, sel darah putih serta globulin gamma (Manayi et al., 2015). Ekinase diketahui juga mempengaruhi sel imun dengan meningkatkan sel darah putih, menstimulasi faogistosis, meningkatkan produksi sel T, meningkatkan aktivitas lomfosit, serta meningkatkan

produksi sitokin dan sekresi enzim (El-Ashmawy et al., 2015). Selain beraktivitas sebagai imunomodulator, ekinase juga banyak memberikan manfaat Kesehatan lainnya seperti antiinflamasi, antivirus, antibakteri, antikanker, antijamur, dan lain sebagainya (Gupta, 2020).

8. *Meniran (Phyllanti niruri)*

Meniran banyak terdistribusi di area subtropik dan tropis yang meliputi Afrika, Amerika, dan Asia. Di negara Amerika sendiri, emniran banyak tumbuh di Brazil. Di benua Asia, meniran banyak tumbuh di India, Cina, Malaysia. Meniran diketahui banyak bermanfaat sebagai imunomodulator melalui fungsi imun alami dan adaptif (Jantan et al., 2019). Komponen fitokimia pada meniran yaitu alkaloid, glikosida, flavonoid, tannin, dan saponin. Komponen fenolik terutama tannin, merupakan komponen utama dari tanaman meniran (Nisar et al., 2018). Meniran dilaporkan memiliki senyawa lignan tertinggi pada tanamannya yaitu filantin, hipofilantin, filtetralin, dan niranantin (Danladi et al., 2018).

Meniran dikenal memiliki efek imunomodulatori dengan beberapa mekanisme dalam tubuh. Pada penelitian yang dilakukan oleh Eze et al., (2014) menemukan hasil bahwa ekstrak methanol meniran dapat meningkatkan jumlah sel leukosit. Penelitian lain yang menggunakan ekstrak air meniran memberikan hasil bahwa meniran dapat menginduksi proliferasi sel mononuklear darah perifer, peningkatan pelepasan nitrat oksida (NO), dan meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag (Putri et al., 2017). Selain itu, ekstrak meniran dapat meningkatkan fungsi sistem imun dengan menstimulasi sel NK, peningkatan sekresi TNF- α melalui sel Th-1 dan penurunan sekresi IL-10 melalui sel Th-2, sehingga meniran dapat memodulasi imunitas humoral dan seluler. Selain itu, ekstrak air meniran dapat meningkatkan ekspresi CD69 dan proliferasi limfosit B dan T. mekanisme lainnya yaitu meniran dapat meningkatkan produksi IFN- γ dan IL-4 (Tjandrawinata et al.,

2017). Selain bermanfaat dalam meningkatkan respon imun tubuh, meniran juga memiliki manfaat lainnya seperti berefek antidiabetes, antihiperlipidemia, efek nefroprotektif, antiplasmodial, antibakteri, hepatoprotektif, antivirus, memperbaiki sistem kardiovaskuler, berefek analgesik, antiulser, antiinflamasi, serta antikanker (Danladi et al., 2018).

9. *Jahe(Zingiber officinale)*

Rimpang jahe banyak digunakan sebagai bumbu saat memasak di berbagai negara, terutama negara Asia Selatan dan Asia Timur, Afrika Selatan, dan Amerika. Warna rimpang jahe dapat bervariasi antara putih, kuning, dan merah tergantung varietasnya. Jahe dapat digunakan dalam bentuk segar atau dalam bentuk bubuk kering (Kausar et al., 2021). Jahe mengandung komponen mayor aktif yaitu 6-gingerol, 6-shogaol, dan 6-paradol. Komponen aromatic yaitu zingiberene dan bisabolene. Komponen lainnya pada rimpang jahe adalah karbohidrat (50-70%), lipid (3-8%), terpen, serta komponen fenolik. Komponen terpen pada jahe meliputi zingiberene, β -bisabolen, α -farnesen, β -seskuifelandren, dan α -kurkumen. Komponen fenoliknya meliputi gingerol, paradol, dan shogaol. Kandungan minyak pada jahe meliputi campuran komponen seperti monoterpen yaitu felandren, kampen, sineol, linalool, limonen, sitral, geraniol, sitronelol, borneol, serta seskuiterpen yaitu α -zingiberen, ar-kurkumen, β -bisabolen, β -seskuifelandren, zingiberol, dan zingiberenol dengan kandungan lainnya seperti aldehid alifatik dan alkohol. Karakteristik bau dan rasa dari jahe karena adanya kandungan minyak atsiri sebesar 1-3% pada jahe segar, yang terdiri dari zingeron, shogaol, dan gingerol sebagai komponen utamanya. Pada jahe segar juga mengandung enzim zingibain yang merupakan protease sistein (Yadav et al., 2021).

Jahe memiliki aktivitas imunomodulator dengan cara meningkatkan respon imun non-spesifik dan meningkatkan imunitas humoral (Dhanik et al., 2017). Mekanisme imunomodulator dan antiinflamasi dari jahe yaitu adanya 6-shogaol dapat menghambat jalur sinyal PI3K/NF κ B, kandungan 6-shogaol dan 6-gingerol dapat menghambat produksi nitrat oksida (NO) dan PGE2. Ekstrak jahe sendiri juga dapat menurunkan produksi TNF- α (Mao et al., 2019). Selain itu ekstrak jahe juga dapat meningkatkan aktivitas fagositosis dari sel fagosit (Luhurningtyas et al., 2021). Penelitian secara *in vitro*, menemukan bahwa jahe dapat menghambat proliferasi limfosit yang dimediasi akibat adanya penurunan produksi IL-2 dan IL-10. Ekstrak air rimpang jahe dapat meningkatkan IL-1 β , IL-6, dan TNF- α pada makrofag yang teraktivasi. Diet rimpang jahe selama 12 minggu dapat meningkatkan hematokrit, hemoglobin, eritrosit, sel darah putih dan neutrofil (Radha Singh & Singh, 2019).

Selain berefek imunomodulator, jahe juga memiliki beberapa efek lainnya seperti antiinflamasi, antioksidan, antibakteri, antiemetik, berefek sitotoksik pada sel kanker, antidiabetes, dan lain sebagainya. Penggunaan jahe sebesar 6 gram atau lebih dapat menyebabkan iritasi pencernaan dan dapat menghilangkan proteksi mukosa pada pencernaan. Konsumsi jahe sebesar 2 gram per hari dinilai masih aman dan penggunaan jahe dengan dosis 0,5-1 gram bubuk jahe 2-3 kali sehari selama 3 bulan hingga 2,5 tahun tidak menyebabkan efek samping. Nilai LD 50 jahe pada tikus adalah 5 gram/Kg BB. Dosis lain yang direkomendasikan untuk mengkonsumsi ekstrak jahe adalah 15-20 mg atau jahe bubuk sebesar 250-1000 mg sebanyak 4 kali sehari (Supu et al., 2019).

10. *Kencur (Kaempferia galanga)*

Kencur merupakan rimpang yang banyak tumbuh di area tropis terutama negara Asia seperti Kamboja, Vietnam, Malaysia, Thailand, dan Indonesia. Tumbuhan ini juga

ditemukan di Asia Selatan, Taiwan, dan India (Preetha et al., 2016). Kencur merupakan keluarga dari Zingiberaceae. Rimpang kencur berwarna coklat kemerahan dengan bagian dalamnya berwarna putih.

Penelitian fitokimia telah dilakukan pada ekstrak kencur dengan pelarut polar dan non-polar. Senyawa etil-para-metoksisinamat dan etil-sinamat ditemukan sebagai komponen utama pada ekstrak kencur dengan pelarut heksan, methanol, dan diklorometan. Komponen utama minyak atsiri kencur termasuk etil-p-metoksisinamat, pentadekan, dan asam propanoate, sedangkan komponen lainnya adalah apigenin, germakren, kampen, alfa terpineol, kariofilen, delta 3-karen, borneol, kadinen, luteolin, alfa gurjunen, undekanon, alfa pinen, 1,8-sineol, disikloheksilpropanadinitril, isopropyl sinamat, kamfidin. Komponen yang penting pada ekstrak kencur adalah pentade kane, 3-karen, heptade kane, tetradecane, alfa gurjunen, sinamaldehyd, 8-hep8-heptade kane, kaempferol, etil sinamat, alfa terpineol, germakren, simen, beta-pinen, kampen, siklooktan, kaempferide, gamma elemen, eukaliptol, 1-metil-3-(1-metiletil), 1,6-siklodekadienen, beta-kariofilen, kadinen, delta limonen, borneol, alfa pinen, etil parametoksisinamat, 3,4-metoksifenil, 2-asam propeonat, dan 1-metil,2-(1-metiletil) (Khairullah et al., 2021).

Kencur memiliki aktivitas imunomodulator dengan meningkatkan aktivitas proliferasi limfosit (Sugiartanti & Wiedosari, 2021). Mekanisme lainnya yaitu ekstrak air kencur dan etanol kencur dapat meningkatkan aktivitas dan kapasitas fagositosis makrofag (Murningsih, 2010). Selain memberikan manfaat pada respin imun, kencur juga memiliki aktivitas lainnya seperti antimikroba, antivirus, aktivitas sitotoksik, efek sedatif, anti kanker, antitumor, antiplatelet, antirematik, antiosteoporosis, antioksidan, antiinflamasi, aktivitas hepatoptotektif, afrodisiak, antialergi, dan mempercepat penyembuhan luka (Pham et al., 2021).

11. *Temulawak (Curcuma zanthorrhiza)*

Temulawak (*family: Zingiberaceae*) merupakan tanaman yang banyak tumbuh di Indonesia dan negara Asia Selatan lainnya seperti Malaysia, Thailand, Vietnam, dan Filipina. Area tanam temulawak yang dibudidayakan di Indonesia mencapai 13.000.873 m² dengan hasil produksi mencapai 29.637.119 Kg. Rimpang temulawak berbentuk bulat oval seperti telur dengan ujungnya yang Panjang. Setiap tanaman memiliki cabang rimpang mencapai 3-4 buah (Rahmat et al., 2021).

Komponen aktif temulawak telah diteliti yaitu mengandung kurkuminoid dan terpenoid sebagai komponen utamanya. Metabolit sekunder utama dari minyak atsiri yang diperoleh dari temulawak adalah xantorizol (Mary et al., 2012). Fraksi larut heksana mengandung terpenoid seperti xantorizol sebagai komponen terbanyak. Komponen fenolik yaitu kurkuminoid, ditemukan paling banyak pada fraksi larut etil asetat. Asam amino seperti metionin, fenilalanin, triptofan, valin, alanin, lisin, dan leusin, banyak ditemukan pada fraksi methanol. Temulawak mengandung seskuiterpenoid bisabolene seperti bisakuron, bisakumul, bisakurol, kurlon, α -kurkumen, α -turmeron, xantorizol, germakrone, β -kurkumene, β -seskuifelandren, kurzerenon, α -turmeron, β -turmeron dan lain sebagainya. Temulawak juga mengandung monoterpene dengan nama kamper. Temulawak juga mengandung senyawa aktif lainnya yaitu polifenol dengan struktur diarylheptanoid linear, yang dikenal dengan senyawa kurkuminoid. Senyawa ini kebanyakan terdiri dari turunan disinamoil metana. Senyawa fenolik lain yang telah diidentifikasi dari temulawak adalah vanillin, 3-hidroksi-6-metilaseptofenon, dan dehidro-6-gingerdion (Rahmat et al., 2021).

Temulawak telah banyak digunakan untuk meningkatkan respon imun. Salah satu mekanismenya dengan menstimulasi makrofag melalui aktivasi spesifik pada jalur NF κ B (Kim et al., 2007). Temulawak juga dapat

meningkatkan proliferasi limfosit sehingga juga meningkatkan sel limfosit B dan sel limfosit T (Miksusanti, 2012). Penelitian lainnya terkait efek imunomodulator temulawak yaitu ekstrak etanol 0,75 mg/mL temulawak dapat meningkatkan proliferasi limfosit dan meningkatkan jumlahnya secara *in vitro* (Azimah et al., 2016). Selain itu, ekstrak etanol temulawak terbukti bersifat sebagai imunostimulan pada dosis 400 mg/KgBB dapat meningkatkan ekspresi sel CD4 dan CD secara *in vitro* (Taner, 2021). Temulawak juga dapat menghambat IL-6 dan TNF- α serta menekan iNOS melalui jalur sinyal NF κ B. Dosis ekstrak temulawak sebesar 10 dan 25 mg/KgBB per hari dapat menghambat senyawa sitokin inflamasi seperti TNF- α , IL-1 β , C-reactive protein pada jaringan adiposa, hati, dan adiposa (Devaraj et al., 2010). Selain memiliki efek imunostimulan dan antiinflamasi, temulawak juga memiliki aktivitas lainnya seperti antioksidan, antibakteri, antivirus, antidiabetes, hepatoprotektif, dan lain sebagainya (Rahmat et al., 2021).

12. *Sambiloto (Andrographis paniculate)*

Sambiloto merupakan family dari Acanthaceae yang banyak dibudidayakan di negara India, Thailand, Vietnam, dan Cina. Sejak tahun 1950, komponen kimia dari sambiloto telah diteliti. Komponen kimia utama yang terkandung dalam sambiloto adalah terpenoid (lakton diterpene entalabdane), flavonoid, dan iridoid. Lakton diterpenoid yang terkandung pada sambiloto banyak ditemukan pada bagian batang, daun, dan akar. Androgafolid merupakan kandungan aktif utama dari sambiloto dan pertama kali diisolasi tahun 1951. Kandungan androgafolid dalam sambiloto adalah sebesar 0,641%. Pada tahun 2014, komponen androgafolid yaitu neoandrogafolid, deoksianandrogafolid, dan dehidroandrogafolid telah diteliti menggunakan metode UPLC-PDA. Lakton diterpenoid lain juga telah diisolasi dan diidentifikasi dari tanaman ini, seperti bisandrogafolid, isoandrogafolid, dan 3,14-dideoksiandrogafolid. Selain androgafolid, komponen aktif

lain dari sambiloto adalah flavonoid yang terbagi menjadi lima tipe yaitu flavanon, flavon, flavonol, kalkon, dan isoflavon. Senyawa iridoid yang terkandung dalam sambiloto yaitu androgafidoid, 8-asetil-herpagide, dan procumbid. Pada tahun 2014, delapan asam organik diidentifikasi pada daun dan tangkai seperti asam kafeat, asam ferulat, dan asam protokatekuat (Jiang et al., 2021).

Senyawa-senyawa aktif dalam sambiloto diketahui banyak memberikan manfaat Kesehatan salah satunya sebagai imunomodulator. Penelitian yang dilakukan oleh Rajanna et al., (2021) dengan subyek uji manusia sehat meneliti sampel ekstrak sambiloto yang telah terstandardisasi dengan dosis 200 mg diberikan secara per oral setiap hari selama 30 hari. Hasil penelitian tersebut yaitu selama 30 hari ditemukan bahwa ekstrak sambiloto dapat meningkatkan sel T, sel T *helper*, dan secara signifikan meningkatkan IFN- γ dan IL-4, dan menurunkan IL-2. Penelitian lainnya yaitu ekstrak air sambiloto dengan dosis 250 dan 500 mg/KgBB dengan pemberian selama 84 hari memberikan hasil dapat meningkatkan sel darah putih secara signifikan serta meningkatkan monosit, IL-6 dan TNF- α (Bukoye & Musbau, 2011). Mekanisme lainnya terkait imunomodulator yaitu sambiloto mengontrol respon imun melalui jalur aktivasi sel T, yang merupakan faktor transkripsi penting dalam produksi sitokin saat aktivasi sel T. Senyawa androgafolid merupakan senyawa yang bertanggungjawab terhadap aktivitas imunomodulator ini. Androgafolid juga berperan pada peningkatan produksi antibodi dan meningkatkan respon imun non spesifik seperti meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag. Sitokin proinflamasi seperti IL-1 β , IL-6, GM-CSF, dan TNF- α juga secara efektif dapat menurun. Androgafolid dapat menstimulasi produksi limfosit T sitotoksik yang berperan dalam penghambatan sel tumor (S. M. Hossain et al., 2014). Penelitian lainnya juga memberikan hasil yang sama yaitu ekstrak etanol sambiloto sebesar 1 μ g/mL dapat

menstimulasi proliferasi limfosit mencapai 38% (Churiyah et al., 2015).

Selain memiliki aktivitas sebagai imunomodulator, sambiloto juga memiliki aktivitas lainnya yaitu sebagai anti-inflamasi, neuroprotektif, antioksidan, antikanker, antimikroba, dan hepatoprotektif (Pandey & Rao, 2018). Aktivitas lainnya adalah sambiloto juga memiliki efek antimalaria, proteksi kardiovaskular, antireumatik dengan menurunkan IL-1 β , IL-6, dan TNF- α , sebagai antidiabetes, antiobesitas, antileukemia, dan lain sebagainya (Dai et al., 2019). Dosis aman sambiloto yang dapat diberikan ke manusia adalah sebesar 90-150 mg per hari (S. Hossain et al., 2021).

13. *Jinten Hitam (Nigella sativa)*

Jinten hitam (*family Ranunculaceae*) banyak ditanam di negara India dan area sekitarnya yang beriklim tropis. Jinten hitam berasal dari daerah Mediterania dan banyak ditemukan di Afrika Utara, Eropa Selatan, Asia selatan dan Asia tenggara. Jint Jinten hitam mengandung komponen seperti karbohidrat, protein, lemak, minyak, mineral (Fe, Cu, Zn, dan P), alkaloid, saponin, serta campuran lainnya. Alkaloid pada jinten hitam yaitu alkaloid pirozol (contoh: nigellisidin dan nigellidin) dan alkaloid isokuinolin (contoh: nigellisimin dan nigellisimin-N-oksida). Senyawa lain yang ditemukan pada jinten hitam yaitu timokuinon (30-48%), timohidrokuinon, dan ditimokuinon, 4-terpineol (4-7%), karvon, karvakrol (6-12%), t-anethol (1-4%), timol, α -pinen, α -hederin, limonen, dan lain sebagainya. Biji jinten hitam mengandung minyak tidak jenuh seperti asam linolenat, asam oleat (20%), asam eikodadienoat, asam linoleat (50-60%) asam palmitat, asam arakidik, asam palmitat, asam miristat, dan asam stearate (Khan, 2021). Senyawa timokuinon merupakan senyawa aktif yang paling banyak memberikan aktivitas farmakologi pada tubuh, salah satunya memiliki aktivitas sebagai imunomodulator (Thakur et al., 2021).

Aktivitas jinten hitam dalam memperkuat sistem imun telah banyak diteliti, salah satunya adalah pemberian ekstrak etanol jinten hitam dengan dosis 50, 100, dan 200 mg/KgBB dapat meningkatkan titer antibodi, limfosit, dan monosit secara signifikan (Marlinda, 2015). Selain itu, mekanisme jinten hitam sebagai imunostimulan adalah meningkatkan fungsi sel makrofag dan dapat meningkatkan immunoglobulin plasma (Mohammed & Al-Suwaiegh, 2016). Biji jinten hitam atau minyaknya juga dapat mempengaruhi sel T pada manusia melalui produksi IL-3, IL-1 β , dan interleukin lainnya (Assi et al., 2016). Hasil penelitian lain yaitu minyak jinten hitam yang diberikan dengan dosis 0,25; 2,5; dan 5 mL/KgBB/hari selama 14 hari dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag, sekresi IL-12 oleh makrofag, serta peningkatan ekspresi TLR4. Sitokin IL-12 sendiri adalah sitokin utama dalam regulasi respon imun yang biasanya diproduksi oleh limfosit teraktivasi serta sel makrofag, sel dendritic, neutrophil, dan monosit. IL-12 ini juga dapat meningkatkan aktivitas dari sel CD4 dan CD8, menginduksi sekresi IFN- γ dan sel NK, anti-angiogenesis, serta berperan dalam perbaikan DNA. Selanjutnya, timokuinon yang terkandung dalam jinten hitam melalui *Toll-Like Receptor-4* (TLR-4) dapat meningkatkan aktivitas makrofag pada tubuh (Akrom & Mustofa, 2017).

Selain bersifat imunomodulator, jinten hitam juga memiliki efek antikarsinogenik, antidiabetes, neuroprotektif, antiinflamasi, analgesik, proteksi terhadap saluran pernafasan, hepatoprotektif, nefroprotektif, gastroprotektif, antioksidan, antimikroba, antihipertensi, antikanker, dan lain sebagainya (Srinivasan, 2018). Jinten hitam dan minyaknya dilaporkan memiliki toksisitas yang sangat rendah. Penelitian toksikologi timokuinon dengan dosis 20 mg/KgBB dan 500 mg/KgBB secara *in vitro* dan *in vivo* dilaporkan menyebabkan kematian karena komplikasi lainnya pada dosis 500 mg/KgBB. Penelitian lainnya pada tikus dengan pemberian minyak jinten hitam dengan dosis mencapai 2,5

mL/KgBB/hari tidak memberikan toksisitas pada level histopatologi (Karaçil Ermumucu & Şanlıer, 2017). Penelitian LD₅₀ minyak jinten hitam ditemukan pada dosis 28,8 mL/KgBB yang diberikan secara per oral dan 2 mL/KgBB yang diberikan dengan ruter intraperitoneal dengan subyek mencit dan tikus. Toksisitas akut timokuinon dengan uji coba dosis antara 200, 300, dan 500 mg/KgBB dan dosis 20, 30, dan 40 mg/KgBB secara intraperitoneal, ditemukan bahwa timokuinon dapat ditoleransi dengan baik pada dosis 200 mg/KgBB yang diberikan secara per oral (Elnour & Abdelsalam, 2018).

14. *Cengkeh (Syzygium aromaticum)*

Cengkeh merupakan family dari *Myrtaceae*, takson dari tanaman dikotiledon, yang merupakan salah satu herba yang terkenal di dunia. Cengkeh banyak dibudidayakan dan merupakan tanaman asli dari pulau Maluku Utara di Indonesia. Daerah dan negara yang banyak membudidayakan cengkeh yaitu Pemba, Zanzibar, Indonesia, Madagaskar, Bacan, Motir, Tidore, Ternate, serta Irian Jaya. Negara India juga membudidayakan cengkeh seperti daerah Karnataka, tamil nadu, dan Kerala. India menjadi negara dengan konsumen cengkeh terbanyak setelah Indonesia. Pohon cengkeh dapat hidup hingga 100 tahun lebih dan membutuhkan sinar matahari dengan temperatur atmosfer tinggi antara 25-30°C dan kelembapan di atas 70% (Kaushal & Kaur, 2019).

Penelitian fitokimia telah dilakukan dan menemukan senyawa-senyawa kimia seperti komponen fenolik sebagai flavonoid, asam hidriksobenzoat, asam hidrokinamat, dan propen hidroksifenil. Eugenol merupakan senyawa bioaktif utama pada cengkeh yang ditemukan pada konsentrasi 9381,70 hingga 14.650,00 mg per 100 gram cengkeh yang segar. Sehubungan dengan asam fenolik, asam galat merupakan komponen yang ditemukan tinggi mencapai 783,50 mg/100 g cengkeh segar. Turunan asam galat lain sebagai tannin terhidrolisis juga ditemukan dengan konsentrasi tinggi yaitu

2375,8 mg/100 g cengkeh segar. Asam fenolik lain yang ditemukan pada cengkeh adalah asam kafeat, asam ferulat, asam elagat, dan asam salisilat. Flavonoid sebagai kaempferol, kuersetin, dan turunannya (terglikosilasi) juga ditemukan dalam cengkeh dengan konsentrasi rendah. Sebanyak 89% minyak atsiri cengkeh adalah eugenol, serta 5-15%-nya merupakan eugenol asetat dan β -kariofilen. Komponen penting lainnya yang ditemukan pada minyak atsiri cengkeh dengan konsentrasi mencapai 2,1% adalah α -humulen. Komponen minyak atsiri lainnya pada cengkeh yaitu β -pinen, limonen, farnesol, benzaldehid, 2-heptanon, dan etil heksanoat (Cortés-Rojas et al., 2014).

Cengkeh dikenal memiliki banyak manfaat Kesehatan salah satunya adalah memiliki aktivitas sebagai imunomodulator. Salah satu mekanismenya adalah dengan menekan pelepasan IFN- γ dan menginduksi sekresi IL-4, IL-10, dan TGF- β , sehingga cengkeh dinilai dapat meningkatkan respon imun humoral melalui respon sel Th2 (Dibazar et al., 2014). Selain itu, ekstrak cengkeh dengan dosis 150 mg/KgBB dapat meningkatkan limfosit melalui sekresi IL-2 yang berperan dalam aktivasi sel limfosit T. Pemberian ekstrak cengkeh dengan dosis 15, 75, dan 150 mg/KgBB dapat meningkatkan aktivitas sel makrofag yang penting pada tahap fagositosis dan sebagai APC atau *antigen presenting cell* (Wael et al., 2019). Penelitian lain yaitu emulsi eugenol yang diberikan selama 10 hari dapat meningkatkan produksi sitokin Th1 sehingga meningkatkan IFN- γ dan IL-2 serta menurunkan IL-4 dan IL-10. Mekanisme lainnya yaitu cengkeh dapat menekan produksi NO dan TNF- α (Sandner et al., 2020). Selain bersifat sebagai imunomodulator, cengkeh juga memberikan manfaat lainnya yaitu sebagai antibakteri, antioksidan, antijamur, antiinflamasi, antikanker, anestesi, dan lain sebagainya (Kaushal & Kaur, 2019).

15. Kelor (*Moringa oleifera*)

Kelor merupakan tanaman yang banyak tumbuh di Himalaya, India, Pakistan, Asia, Afrika, dan Arab, dan

sekarang terdistribusi di Filipina, Kamboja, serta Amerika. Kelor dapat tumbuh di daerah tropis dan sub-tropis. Bagian daun dari kelor mengandung mineral seperti kalsium, kalium, zinc, magnesium, zat besi, dan tembaga. Daun kelor memiliki nilai kalori yang rendah sehingga banyak digunakan untuk diet pada penderita obesitas. Bagian daunnya juga mengandung asam amino esensial dan kaya akan protein dan mineral. Vitamin juga terkandung pada tanaman ini seperti vitamin A, vitamin B, beta karoten, piridoksin, asam nikotinat, vitamin C, vitamin D, dan vitamin E (Thapa et al., 2019). Hasil skrining pada daun kelor menunjukkan bahwa bagian daun kaya akan sterol, triterpene (terpenoid), karotenoid, asam amino esensial, flavonoid, tannin, gula, dan serat. Turunan kumarin dan alkaloid terdapat pada bagian daun tetapi dalam jumlah yang kecil. Glikosida jantung, saponin, asam askorbat juga teridentifikasi pada daun kelor. Sebagai tambahan, daun kelor juga mengandung zeatin, kuersetin, asam kafeoilkuinat, beta sterol, dan kaempferol. Studi lain juga menunjukkan bahwa daun kelor yang berumur matang mengandung protein lebih rendah dibandingkan daun yang berumur lebih muda karena kandungan seratnya yang tinggi yaitu berkisar antara 9,13-28,2% (Jacques et al., 2019).

Kelor diketahui memiliki banyak aktivitas farmakologi, salah satunya bersifat sebagai imunomodulator. Pada penelitian yang dilakukan oleh Hefni et al., (2013) menemukan bahwa ekstrak daun kelor dengan dosis 14 dan 42 mg/KgBB dapat beraktivitas imunostimulan pada sel limfosit B dan sel *Th naïve*, sedangkan pada dosis 84/mgKgBB dapat sebagai immunosupresor pada sel *Th naïve*. Pada penelitian lain dengan menggunakan ekstrak daun kelor (dosis 0,1 µg/mL) dapat meningkatkan jumlah sel CD4+ dan CD8+ (Rachmawati & Rifa'i, 2014). Pemberian ekstrak daun kelor selama 14 hari juga dapat mempengaruhi produksi immunoglobulin yang berkaitan dengan respon imun. Ekstrak daun kelor ini diketahui dapat menurunkan

konsentrasi IgG dalam serum serta dapat meningkatkan level IgA dan IgM dalam serum pada dosis ekstrak sebesar 40 mg/KgBB. Pemberian ekstrak daun kelor dengan dosis 60 mg/KgBB dapat meningkatkan IgA dengan signifikan dibandingkan dosis sebelumnya (Obiazi et al., 2015). Ekstrak metanol daun kelor juga dapat bersifat sebagai imunostimulan dengan meningkatkan sel darah putih, limfosit, dan neutrophil pada dosis 1000 mg/KgBB (Nfambi et al., 2015). Penelitian lain dengan menggunakan ekstrak air dan etanol daun kelor dengan dosis 400 mg/KgBB yang diberikan selama 45 hari dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag yang juga berperan pada respon imun (Deshmukh et al., 2015). Penelitian lain dengan ekstrak daun kelor (dosis 125, 250, dan 500 mg/KgBB) memiliki aktivitas imunostimulan dari peningkatan titer antibodi (Mekeng, 2016). Ekstrak daun kelor dengan dosis 10, 30, 100 mg/KgBB juga terbukti sebagai immunostimulan dengan pemberian selama 6 hari, yaitu dapat meningkatkan indeks fagositosis (Dillasamola et al., 2018).

Ekstrak daun kelor juga dapat menghambat ekspresi protein dan gen dari IL-1 β dan IL-6 secara *in vitro*. Fraksi etil asetat dari daun kelor yang kaya akan senyawa fenolik diketahui dapat menurunkan ekspresi Rel A (p65) yang penting dalam aktivasi jalur pro-inflamasi NF κ B, serta dapat menurunkan ekspresi gen sitokin pro-inflamasi seperti IL-6, IL-8, dan TNF- α (Adamu et al., 2021). Selain berperan sebagai imunomodulator, kelor juga memiliki manfaat lainnya yaitu sebagai antikanker, antidiabetes, antihipertensi, antibakteri, antijamur, antiinflamasi, antiasma, antioksidan, mempercepat penyembuhan luka, memperbaiki gizi pada pasien malnutrisi, kardioprotektif, dan lain sebagainya (Fidrianny et al., 2021).

D. Nanopartikel Perak

1. *Nanopartikel*

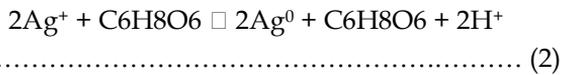
Nanopartikel Logam dan Karakterisasinya Nanopartikel merupakan partikel dengan ukuran 1-100 nm, dimana pada kondisi ini partikel berada di antara kondisi atomik dan kondisi molekuler/partikel berukuran besar (*bulk*) serta pada kondisi ini, bahan menunjukkan sifat barunya yang tak terduga dan tak biasa yang tidak bisa dijelaskan oleh hukum klasik fisika. Sifat fisik yang unik (seperti, sifat magnet, optis, mekanis, dan elektrik) dan mekanika kuantum (seperti, konfigurasi elektron) dari nanopartikel dapat berbeda-beda dengan perubahan ukuran partikel pada kondisi nano. Hal inilah yang kemudian menyebabkan nanomaterial dimanfaatkan untuk digunakan karena sifatnya yang sangat diperlukan, seperti misalnya sifat tertarget dan farmakokinetik, sifat optis, sifat katalis, sifat porositas, sifat elektromagnetik, dan sifat mekanis. Sifat fisikokimia unik dari nanopartikel ini juga selanjutnya diselidiki dalam berbagai bidang penelitian, termasuk ilmu pengetahuan dan medis (Rihn, 2018) . Terdapat dua aspek dari nanomaterial yang mengubah karakteristiknya secara mendasar bila dibandingkan dengan bahan saat dalam kondisi molekulernya. Kedua aspek tersebut dapat digambarkan sebagai sifat yang berhubungan dengan permukaan dan sifat kuantum. Pertama, nanomaterial memiliki rasio permukaan-volume yang secara signifikan lebih besar bila dibandingkan dengan bahan dalam kondisi molekulernya. Kedua, telah ditemukan bahwa struktur elektron partikel berukuran kecil umumnya sangat berlainan dan tidak tumpang-tindih seperti yang ditemukan pada partikel dalam bentuk ukuran besarnya. Secara umum, elektron dapat ditemukan pada level/tingkat energi yang berbeda (tinggi atau rendah), dan perbedaan antara level energi tinggi dan level energi rendah tersebut dikenal sebagai Kubo gap (δ). Adanya pengurangan ukuran partikel dapat meningkatkan (δ) sehingga energi yang dipancarkan oleh

foton akan mengubah frekuensi atau Panjang gelombang dan dengan demikian juga warnanya. Oleh karena itu, teknik analisis yang ada saat ini seperti UV/Vis mampu digunakan untuk melihat perubahan warna yang terjadi ketika nanopartikel logam berubah ukuran partikelnya atau karena adanya interaksi dengan biomolekul yang mengubah ukuran nanopartikel logam, seperti pada proses biosintesis (Soo et al., 2009). Berdasarkan sudut pandang struktural, metode untuk sintesis nanopartikel logam dapat dikategorikan kedalam pendekatan *bottom-up* atau *top-down*.

Sintesis nanopartikel logam dengan metode kimia maupun biologi termasuk dalam pendekatan *bottom-up*, dimana mekanisme sintesis didasarkan pada bergabungnya atom-atom atau molekul menjadi struktur molekuler yang masuk dalam ukuran nano. Sedangkan sintesis nanopartikel logam dengan metode fisika termasuk dalam pendekatan *top-down*, yaitu sintesis yang didasarkan pada reduksi ukuran partikel menggunakan Teknik mekanikal dengan cara memecah partikel berukuran besar menjadi partikel berukuran nano (Schröfel and Kratošová, 2011; Keat et al., 2015). Sintesis nanopartikel logam baik dengan menggunakan metode fisika maupun metode kimia, keduanya meskipun memiliki keuntungan, seperti diperolehnya nanopartikel dengan kemurnian tinggi pada sintesis nanopartikel logam menggunakan metode fisika atau waktu sintesis nanopartikel logam yang lebih singkat dengan metode kimia, namun kedua metode tersebut memiliki kelemahan yang dapat menjadi hambatan. Kelemahan yang ditemukan dalam penggunaan metode fisika untuk sintesis nanopartikel logam, antara lain penggunaan alat yang mahal dan konsumsi energi yang tinggi untuk menjaga tekanan serta suhu agar diperoleh nanopartikel yang diharapkan sehingga mengakibatkan biaya produksi menjadi mahal. Sedangkan kelemahan yang dijumpai pada sintesis nanopartikel logam dengan metode kimia, yaitu penggunaan senyawa toksik yang tidak ramah lingkungan dan mahal. Digunakannya senyawa kimia dalam

sintesis nanopartikel logam dapat menyebabkan adanya senyawa toksik yang mungkin menempel pada permukaan nanopartikel, sehingga bila nanopartikel tersebut digunakan sebagai bahan medis, maka dapat mengakibatkan munculnya efek samping yang tidak diharapkan (Schröfel and Kratošová, 2011; Sardar et al., 2014; Shah et al., 2015).

Saat ini telah berkembang metode biologi untuk sintesis nanopartikel logam yang menggunakan sedikit energi, senyawa non-toksik, dan rama lingkungan. Salah satu bahan biologi yang baru-baru ini diteliti dan dikembangkan sebagai bioreduktor dalam sintesis nanopartikel logam adalah ekstrak tumbuhan (Ahmed et al., 2016) . Adanya senyawa metabolit yang terkandung dalam ekstrak tumbuhan, sangat berperan sebagai agen pereduksi untuk reduksi ion logam menjadi nanopartikel logam dalam proses biosintesis nanopartikel. Senyawa-senyawa dalam tubuh seperti flavonoid, terpenoid, protein, gula pereduksi, dan alkaloid diketahui ikut berperan sebagai *reducing agents*/pereduksi maupun *capping agents*/penstabil selama pembentukan nanopartikel (Hebbalalu et al., 2013; Velgosova et al., 2017). Berikut merupakan salah satu contoh reaksi reduksi dalam sintesis nanopartikel logam perak (Ag) dengan asam sitrat (C6H5O7) dan asam askorbat (C6H8O6) baik berperan sebagai reduktor maupun sebagai *capping agent*, dimana reaksi dapat dituliskan (Prathna et al., 2011; Sigha et al., 2014):



Mekanisme biosintesis nanopartikel logam dengan menggunakan bioreduktor ekstrak tumbuhan terjadi dalam tiga tahap, yaitu fase aktivasi, fase pertumbuhan, dan fase terminasi. Fase aktivasi sebagai tahapan pertama dimulai dari didapatnya ion logam yang berasal dari bentuk garamnya

oleh metabolit aktif tumbuhan yang memiliki kemampuan untuk mereduksi. Pada tahap ini, ion logam berubah dari bentuk oksidasi mono- atau divalennya menjadi bentuk zero-valen dan kemudian dilanjutkan dengan nukleasi atom logam yang tereduksi tersebut. Selanjutnya, fase pertumbuhan dimulai dengan bergabungnya nanopartikel untuk membentuk morfologinya, seperti kubus, bulat, segitiga, heksagonal, pentagonal, batang, dan kawat. Tahap akhir biosintesis nanopartikel disebut sebagai fase terminasi, dimana nanopartikel telah membentuk morfologinya secara konstan dan metabolit tumbuhan menutupi nanopartikel tersebut (Kanchi and Ahmed, 2018). Karakterisasi sifat fisikokimia nanopartikel sangat perlu dilakukan, karena merupakan tahapan yang bertanggung jawab untuk memastikan karakteristik nanopartikel yang dihasilkan agar reproduktibilitas sebagai produk komersial terjaga, untuk melihat manfaat dan efisiensi saat nanopartikel diaplikasikan, maupun untuk menilai adakah efek merugikan yang potensial dapat terjadi pada lingkungan atau kesehatan manusia. Dengan demikian, dibutuhkan pendekatan multiteknik dan multidisiplin analitik untuk mendeteksi, mengkuantifikasi serta mengkarakterisasi nanopartikel yang berhubungan dengan komposisi kimia, ukuran dan distribusi ukuran partikel, sifat permukaan partikel dan juga jumlah serta konsentrasi dari nanopartikel yang diamati. TEM (*Transmission Electron Microscopy*) merupakan salah satu teknik paling kuat untuk analisis nanopartikel, karena kemampuannya untuk menyajikan visualisasi langsung nanopartikel, sehingga ukuran, bentuk, struktur, derajat dispersi serta keadaan agregasi nanopartikel yang diamati dapat diketahui. Spektroskopi UV/Vis merupakan teknik karakterisasi lain yang murah dan mudah digunakan untuk mempelajari nanopartikel logam, serta mengevaluasi stabilitas larutan koloid nanopartikel. Selain mengkarakterisasi sifat optis, spektrofotometer UV/Vis dapat digunakan untuk mengukur ukuran partikel rata-rata

nanopartikel yang didasarkan pada posisi puncak surface plasmon. Konsentrasi partikel dapat juga diukur, yaitu dengan menggunakan koefisien molar extinction pada panjang gelombang maksimum absorpsi tertinggi. Namun demikian, spektrofotometer UV/Vis memiliki keterbatasan pada sensitivitas dan selektivitasnya serta tidak cocok untuk menentukan ukuran partikel sampel polidispers karena terbatasnya resolusi spektrofotometer UV/Vis (Luque and Prinsen, 2019).

Hasil penelitian Velgosova et al (2017), menerangkan bahwa terjadinya perubahan warna setelah penambahan bioreduktor ke dalam larutan AgNO₃ merupakan indikasi telah terbentuknya nanosilver. Perubahan warna ini adalah hasil dari absorpsi radiasi pada daerah visibel spektrum elektromagnetik pada Panjang gelombang antara 380-450 nm yang merupakan lokasi *surface plasmon resonance nanosilver*. Pita *Surface Plasmon Resonance* (SPR) yang terukur pada spektra UV/Vis bergantung pada ukuran dan bentuk anisotrop nanosilver, dimana spektra nanosilver berukuran kecil berbentuk bulat memperlihatkan puncak tunggal dan pita yang simetris. Sedangkan partikel yang lebih besar dan bentuknya berbeda, spektra yang ditunjukkan memperlihatkan dua atau tiga puncak. Analisis dengan spektra UV/Vis juga dapat digunakan untuk menilai stabilitas nanosilver selama penyimpanan. Apabila pita SPR yang awalnya simetris kemudian menjadi tidak simetris maka dapat diindikasikan bahwa terjadi perubahan stabilitas pada nanosilver. Pergeseran panjang gelombang dari pendek menjadi panjang juga merupakan tanda bahwa stabilitas nanosilver berubah. Selain itu secara fisik, nanosilver yang stabilitasnya memburuk akan terlihat terjadi aglomerasi pada bagian dasar tempat nanosilver disimpan (Rai and Shegokar, 2017).

2. Logam Perak

Silver merupakan logam transisi yang termasuk ke dalam kelompok logam mulia (Medici et al., 2019) . Adapun karakteristik silver, antara lain nampak cemerlang, sangat lentur, dan merupakan unsur lunak, tetapi sedikit lebih keras daripada emas. Silver termasuk unsur dasar yang menyusun planet bumi dengan simbol Ag dan nomer atomnya 47, serta di alam ditemukan dalam bentuk sebagai unsur alami, logam campuran dengan logam lain (seperti emas), atau sebagai mineral. Secara kimiawi, silver memiliki empat keadaan oksidasi yang berbeda-beda, yaitu Ag^0 , Ag^{1+} , Ag^{2+} , dan Ag^{3+} (Riedel and Kaupp, 2009). Meskipun silver merupakan unsur yang tidak reaktif, tetapi silver dapat bereaksi dengan asam nitrat atau asam sulfur pekat panas membentuk garam silver terlarut. Silver juga memiliki sifat konduktivitas panas dan elektrik yang baik, namun penggunaannya di industri elektronik terbatas karena harganya yang mahal (Wang et al., 2013) . Dalam bentuk logam, silver tidak dapat larut dalam air, sedangkan dalam bentuk garamnya, seperti silver nitrat ($AgNO_3$) dan silver klorida ($AgCl$), silver dapat larut dalam air (Forough and Khalil, 2010). Berikut pemerian singkat dari silver nitrat (PubChem, 2019) :

Nama IUPAC	: silver nitrate
Rumus Molekul	: $AgNO_3$
Sinonim	: lunar caustic; nitric acid silver (I) salt
Berat Molekul	: 169,873 g/mol
Bentuk/Warna	: kristal belah ketupat tidak berwarna, transparan
Bau	: tidak berbau
Rasa	: pahit, rasa logam
Titik Didih	: 440 °C
Titik Lebur	: 212 °C
Kelarutan	: kelarutan dalam air sangat baik; larut dalam eter, gliserol
Stabilitas	: sensitif terhadap cahaya
pH	: 6

3. *Prosedur Biosintesis*

Proses biosintesis nanopartikel perak menggunakan inulin umbi gembili (*Dioscorea esculenta* L.) dilakukan menurut Kaviya dkk. (2011). Sejumlah 7 mL larutan inulin gembili ditambahkan ke dalam 36 mL larutan perak nitrat, pencampuran dilakukan pada suhu 60 °C selama 15 menit. Campuran antara larutan inulin dan AgNO₃ diendapkan selama 24 jam untuk memaksimalkan proses biosintesis. Hasil biosintesis pada dua variasi suhu kelarutan inulin selanjutnya dilakukan *scanning* menggunakan alat Spektrofotometer UV-Vis pada rentang Panjang gelombang 190-500 nm. Blanko yang digunakan adalah akuades.

E. **Vaksinasi**

Vaksinasi yaitu imunisasi aktif, artinya suatu usaha yang dilakukan secara sengaja dalam pemberian paparan antigen yang berasal dari patogen dan akan memberikan rangsangan terhadap sistem imun serta meningkatkan kekebalan sehingga subjek yang sudah mendapatkan vaksinasi tidak akan menderita penyakit apabila terpapar oleh antigen sejenis. Antigen yang dikirimkan dalam proses vaksinasi didesain agar tidak menimbulkan penyakit, tetapi bisa menghasilkan antibodi, limfosit maupun sel memori yang reseptif (Ranuh I.G.N, 2008). Imunisasi pasif dilakukan melalui pemberian imunoglobulin yang berasal dari plasma donor. Imunisasi pasif yang diberikan hanya dapat menyampaikan kekebalan sementara sebab pemberian imunoglobulin akan dimetabolisme sang tubuh. Waktu paruh IgG sekitar 28 hari, sedangkan imunoglobulin lainnya (IgM, IgA, IgE, IgD) mempunyai waktu paruh yang lebih pendek (Matondang and Siregar, 2008). Vaksinasi berarti sama halnya dengan memberikan antigen pada tubuh. Apabila terpapar oleh antigen, baik secara alami atau melalui vaksinasi, maka tubuh akan memberikan reaksi untuk menurunkan antigen tersebut melewati sistem imun.

Pada umumnya, sistem imun terbagi menjadi dua, yaitu sistem imun spesifik dan non-spesifik. Sistem imun non-spesifik artinya sistem pertahanan alamiah yang dibawa sejak lahir (innate) serta bisa ditujukan untuk bermacam-macam agen infeksi atau antigen. Sistem imun non-spesifik mencakup sel-sel fagosit, kulit, membran mukosa, interferon, lisozim, komplemen, dll. Sistem imun tersebut merupakan batas pertahanan pertama yang harus dilalui oleh agen infeksi yang masuk ke dalam tubuh. Jika sistem imun ini tidak berhasil menurunkan antigen, maka sistem imun spesifik akan bekerja (Wahab and Julia, 2002). Sistem imun spesifik adalah sistem pertahanan adaptif yang diperoleh selama kehidupan serta ditujukan secara khusus untuk satu jenis antigen. Sistem imun spesifik difungsikan sel T serta sel B (Matondang and Siregar, 2008). Pertahanan oleh sel T diketahui menjadi imunitas selular sedangkan pertahanan sel B diketahui menjadi imunitas humoral. Imunitas seluler berfungsi melawan antigen dalam sel (intrasel), sedangkan imunitas humoral berfungsi melawan antigen luar sel (ekstrasel). Sistem imun spesifik tersebut berperan pada pemberian vaksin untuk memberikan kekebalan terhadap satu jenis agen infeksi. Hal ini disebabkan adanya proses memori pada sistem imun spesifik (Baratawidjaja, 2004).

Kelenjar getah bening memiliki sel T naif yaitu sel T yang belum pernah terpajan oleh antigen. Jika terpajan antigen, sel T naif akan pecah menjadi sel efektor dan sel memori. Sel efektor akan melakukan migrasi ke daerah-daerah infeksi serta mengeliminasi antigen, sedangkan sel memori akan berada pada organ limfoid yang kemudian berfungsi jika terjadi pajanan antigen serupa (Baratawidjaja, 2004). Apabila sel B terpajan oleh antigen, maka akan menghadapi transformasi, proliferasi dan diferensiasi menjadi sel plasma yang akan menghasilkan antibodi. Antibodi akan melakukan penetralan terhadap antigen sehingga kemampuan menginfeksi turunkan. Diferensiasi dan proliferasi sel B tidak hanya menjadi sel plasma namun juga sebagian menjadi sel B memori. Sel B memori akan berada pada sirkulasi. Apabila sel B memori terpajan pada antigen yang sama,

maka akan terjadi proses diferensiasi dan proliferasi seperti semula dan akan membentuk antibodi yang lebih banyak (Matondang and Siregar, 2008). Sel memori yang ada akan memudahkan pengenalan antigen di pajanan yang kedua, artinya apabila seseorang/subjek yang sudah divaksin (berarti sudah mengalami terpajan oleh antigen) mengalami infeksi atau terpajan oleh antigen serupa, maka akan lebih praktis/mudah bagi sistem imun untuk mengenali antigen tersebut. Selain itu, respon imun pada pajanan yang ke 2 (respon imun sekunder) lebih baik daripada respon imun di pajanan antigen yang pertama (respon imun primer). Sel T dan sel B yang terlibat lebih banyak, pembentukan antibodi lebih cepat serta bertahan lebih lama, titer antibodi lebih banyak (terutama IgG) dan afinitasnya lebih tinggi. Oleh sebab itu, seseorang yang sudah pernah divaksin diharapkan tak akan mengalami penyakit dampak pajanan antigen serupa karena sistem imunnya memiliki kemampuan yang lebih baik dibandingkan dengan mereka yang tidak divaksin (Wahab and Julia, 2002)

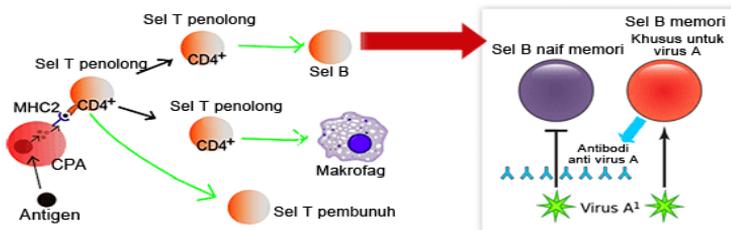
1. *Reaksi Vaksin-Sistem Imunitas menurut WHO (2022)*

Sistem imunitas dibentuk untuk mengenali dan menghancurkan benda asing yang masuk kedalam tubuh manusia termasuk pathogen. Patogen yaitu suatu benda atau bahan yang dapat menyebabkan penyakit pada manusia. Secara umum, patogen yaitu suatu organisme penyebab penyakit yang serupa dengan bakteri, virus serta produk biologisnya seperti toksin yang dihasilkan oleh organisme tadi.

- a. Bakteri yaitu mikroorganisme sel tunggal yang memiliki inti sel dan dapat membelah diri dengan cepat.
- b. Virus tidak bisa membelah diri, namun memerlukan sel serta jaringan hidup dari tubuh inang/pejamu untuk membelah dan memperbanyak diri.

Sistem imunitas yang terdapat pada tubuh manusia akan bereaksi terhadap masuknya bakteri maupun virus ke dalam tubuh melalui prosedur yg sangat rumit dan

kompleks. Sistem imunitas ini mengenali molekul (antigen) yg khas dari bakteri atau virus sehingga merangsang munculnya antibodi (sejenis protein) serta sejenis sel darah putih yang dikenal dengan limfosit. Limfosit tersebut menandai antigen yang masuk lalu menghancurkannya. Proses reaksi imunitas pada mulanya yaitu sistem pertahanan tubuh dalam melawan setiap benda asing yang masuk ke dalam tubuh; sejumlah limfosit yang dikenal sebagai sel memori akan segera berkembang menjadi limfosit dengan kemampuan membentuk zat kekebalan yg bertahan lama (*long lasting immunity*). Imunitas merupakan mekanisme tubuh manusia untuk melawan dan menghancurkan benda asing yg masuk ke dalam tubuh. Benda asing itu berupa virus, bakteri, organ transplantasi. Jika suatu sel atau jaringan seperti bakteri maupun organ tubuh ditransplantasikan pada tubuh seseorang maka tubuh orang itu akan menolaknya sebab benda asing tadi dianggap bukan bagian dari jaringan tubuh mereka. Benda asing tadi diduga menjadi pendatang (*invader*) yang harus dihancurkan. Secara sederhana bahwa sistem kekebalan (*immune system*) merupakan sistem tubuh manusia dalam melawan/ mengusir benda asing yg masuk kedalam tubuh mereka. Pertama, "*memory cells*" berusaha mengidentifikasi benda asing yang masuk dan disimpan dalam "*ingatan*" sel memori ini. Hal ini dikenal dengan reaksi imunitas primer.



Gambar 1. Mekanisme sistem imun tubuh dalam menangkal virus atau bakteri

Sel memori akan lebih cepat dan efektif dalam merangsang sistem imunitas untuk mengusir dan melawan benda asing yang telah dikenal sewaktu benda asing yang sama kembali masuk pada tubuh orang tersebut kedua kalinya dan seterusnya. Reaksi tubuh akan lebih efektif dan cepat dibandingkan dengan reaksi waktu pertemuan pertama kalinya dengan benda asing tadi.

2. Proses Kerja Vaksin

Tujuan utama seluruh jenis vaksin yaitu merangsang sistem kekebalan tubuh orang untuk melawan antigen, sehingga bila antigen tersebut menginfeksi kembali, maka terjadi proses reaksi imunitas. Kandungan vaksin berupa bakteri, virus, atau komponennya yang menggunakan kemajuan teknologi sudah dikendalikan. Vaksin mengandung antigen yang sama dengan antigen yang mengakibatkan penyakit, namun antigen dalam vaksin telah dikendalikan (dilemahkan). Pemberian vaksin tidak mengakibatkan orang mengalami penyakit seperti jika orang tersebut terpapar antigen yg sama secara alami. *Priming* yaitu suatu proses stimulasi atau sensitisasi keluarnya reaksi imunitas terhadap organisme atau toksin penyebab penyakit. Vaksinasi merupakan aktivitas pemberian vaksin kepada seseorang dimana vaksin berisi satu atau lebih antigen yang bertujuan membuat sistem imunitas bekerja menghancurkan antigen jika seseorang terpapar antigen yang sama. Ada dua cara mendapatkan kekebalan tubuh terhadap suatu antigen yaitu secara alami, berarti seseorang mengalami infeksi oleh patogen secara buatan melalui vaksinasi, namun kekebalan yang diperoleh tidak bertahan seumur hidup terhadap infeksi penyakit berbahaya yang mungkin timbul sangat kecil risikonya bila dibandingkan menggunakan risiko penyakit yang mungkin diderita karena dampak tidak dilakukan imunisasi. Risiko artinya kemungkinan seseorang untuk mengalami suatu insiden yang mungkin terjadi.



Gambar 2. Mekanisme kerja vaksin dalam membangun kekebalan tubuh, Sumber : WHO (2022)

Jenis-jenis Vaksin menurut IDAI (2015)

- a. *Live attenuated vaccine* yaitu vaksin hidup yang dirancang dari bakteri maupun virus yang telah dilemahkan daya virulensinya menggunakan cara kultur dan perlakuan yang berulang-ulang, tetapi masih mampu menyebabkan reaksi imunologi seperti infeksi alamiah. Sifat vaksin ini yaitu bisa tumbuh serta berkembang biak sampai menyebabkan respon imun sehingga diberikan dalam bentuk takaran kecil antigen. Respon imun yg diberikan seperti dengan infeksi alamiah, tak perlu dosis berganda. Terdapat impact netralisasi jika saat pemberiannya tidak tepat karena dipengaruhi oleh *circulating antibody*. Misalnya vaksin polio (Sabin), vaksin MMR, vaksin TBC, vaksin demam tifoid, vaksin campak, gondongan, serta cacar air (varisela).
- b. *Inactivated vaccine (Killed vaccine)* yaitu vaksin dirancang dari virus ataupun bakteri yang dimatikan dengan zat kimia (*formaldehid*) atau melalui pemanasan. Vaksin dapat berupa semua bagian yang berasal dari virus atau bakteri maupun sebagian berasal dari virus atau bakteri atau toksoidnya. Bersifat *inactivated vaccine*, artinya semua dosis antigen dapat dimasukkan dalam bentuk antigen karena vaksin tidak bisa hidup. Sebagian besar respon imun yang

terjadi merupakan humoral dan sedikit atau tidak menyebabkan imunitas seluler. Pada umumnya vaksin ini memerlukan dosis ulangan karena Titer antibodi dapat menurun setelah beberapa waktu. Dosis yang pertama tidak memberikan imunitas protektif, namun hanya mempercepat dan mempersiapkan sistem imun. Respon imunoprotektif akan muncul sesudah dosis ulangan ke-2 dan ke-3. Misalnya vaksin rabies, vaksin influenza, vaksin polio (Salk), vaksin pneumonia pneumokokal, vaksin kolera, vaksin pertusis, serta vaksin demam tifoid.

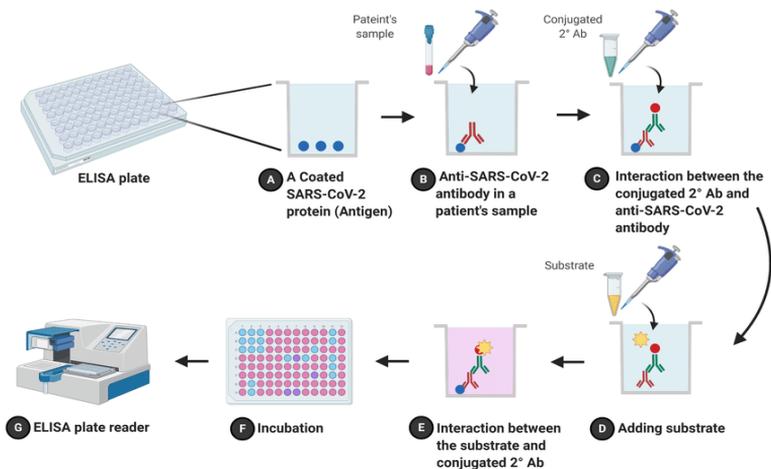
- c. Vaksin Toksoid yaitu vaksin yang dibuat berasal dari beberapa jenis bakteri yang menyebabkan penyakit dengan cara memasukkan racun yang dilemahkan ke dalam sirkulasi darah. Bahan bersifat imunogenik yang terbuat dari toksin kuman. Pembuatan bahan toksoid yang telah jadi disebut sebagai *natural fluid plain toxoid* yang dapat merangsang terciptanya antibodi antitoksin. Imunisasi bakteri toksoid akan efektif kurang lebih satu tahun. Penggunaan bahan ajuvan berfungsi untuk memperpanjang rangsangan antigenik dan menaikkan imunogenesitas. Misalnya Vaksin Difteri dan Tetanus.
- d. Vaksin Acellular serta Subunit yaitu vaksin yang berasal dari bagian tertentu pada bakteri atau virus dengan cara kloning dari gen bakteri atau virus melalui rekombinasi DNA, vaksin vektor virus dan vaksin antiidiotipe. Misalnya vaksin hepatitis B, vaksin hemofilus influenza tipe b (Hib) dan vaksin Influenza.
- e. Vaksin Idiotipe yaitu vaksin yang dibuat berdasarkan sifat fragment antigen binding yang berasal dari antibodi hasil klon sel B yang berisi asam amino. Asam amino tersebut dianggap sebagai idiotipe atau determinan idiotipe yang dapat berperan sebagai antigen. Vaksin ini bisa menahan laju pertumbuhan virus melalui netralisasi serta pemblokiran terhadap reseptor pre sel B.
- f. Vaksin Rekombinan yaitu vaksin yang mempunyai kemungkinan menghasilkan protein virus dalam jumlah

yang cukup besar. Gen virus yang dikehendaki, diekspresikan pada sel eukariot atau prokariot. Sistem ekspresi eukariot mencakup sel bakteri *Escherichia coli*, yeast, serta baculovirus. Selain menghasilkan vaksin protein, dengan teknologi DNA rekombinan juga dapat menghasilkan vaksin DNA. Virus digunakan sebagai vektor yang membawa gen sebagai antigen pelindung yang berasal dari virus lainnya. Misalnya gen sebagai antigen berasal dari berbagai virus yang disatukan dalam genom dari virus vaksinia serta imunisasi hewan menggunakan vaksin bervektor ini akan membentuk respon antibodi yang baik. Susunan vaksin ini seperti pada hepatitis B, membutuhkan epitop organisme yang patogen. Sintesis yang berasal dari antigen vaksin ini melalui isolasi dan penentuan kode gen epitop bagi sel penerima vaksin.

- g. Vaksin DNA (*Plasmid DNA Vaccines*) yaitu vaksin yang berpotensi dalam menginduksi imunitas seluler dengan pendekatan baru dalam teknologi vaksin. Vaksin DNA gen terpilih dari mikroba diklon dalam suatu plasmid bakteri yang direkayasa untuk menaikkan ekspresi gen yang diinsersikan ke dalam sel mamalia. DNA plasmid akan menetap dalam nukleus menjadi episom sesudah disuntikkan, tidak bersatu ke dalam DNA sel (kromosom) lalu terjadi proses sintesis antigen yang dikodeny. Selain itu, vektor plasmid berisi sekuens nukleotida yang sifatnya imunostimulan yang akan menginduksi imunitas seluler. Vaksin ini sesuai dengan isolasi DNA mikroba yang mengandung kode antigen yang patogen dan masih dalam perkembangan penelitian saat ini. Hasil penelitian pada hewan coba membuktikan bahwa vaksin DNA (bakteri dan virus) dapat merangsang respon humoral dan selular yang cukup besar, sedangkan saat ini masih terus dilakukan penelitian klinis pada manusia.

F. ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

ELISA digunakan untuk menemukan antibodi, dimana antigen mula-mula diikat pada suatu agen pembawa lalu ditambah antibodi yang akan dicari. Setelah itu ditambah lagi antibodi yang bertanda enzim, seperti peroksidase fosfatase dan substrat kromogenik yang bila bereaksi dengan enzim dapat menimbulkan perubahan warna. Perubahan warna yang terjadi sesuai dengan jumlah enzim yang diikat dan sesuai pula dengan kadar antibodi yang dicari (Barathawidjaja, 2000). ELISA cukup sensitif, *self-life* reagen panjang, dapat menggunakan spektrofotometer biasa, mudah dilakukan untuk otomatisasi, dan tidak mengandung bahan radioaktif. ELISA merupakan immunoassay heterogen paling populer yang mempunyai label enzim dan menggunakan fase padat dalam teknik pemisahan.



Gambar 3. Schematic flowchart of indirect ELISA. A coated SARS-CoV-2 protein (antigen) onto wells of ELISA plate (A) interacts with the first antibody (anti-SARS-CoV-2 antibody) that is in a patient's sample (B). (C) After adding a secondary antibody (a conjugated antibody), it recognizes and interacts with the first antibodies. The reaction is developed by adding a substrate (D) which is cleaved by the conjugated enzyme and changes the reaction color after incubation (E) and (F), respectively. (G) Results are read by ELISA plate reader.

Sumber: DOI: 10.7717/peerj.10180/fig 4

Teknik biokimia yang digunakan terutama pada imunologi untuk mendeteksi keberadaan antibodi atau antigen dalam sampel. ELISA telah digunakan sebagai alat diagnostik dalam kedokteran dan patologi tanaman, serta pemeriksaan kontrol kualitas di berbagai industri, seperti aplikasi ELISA dalam industri makanan. Secara sederhana, ELISA, digunakan untuk menentukan jumlah antigen yang tidak diketahui pada sampel, dengan cara mengikatkan antigen dengan antibodi spesifik yang ditempelkan di permukaan dinding ELISA *plate*. Antibodi yang sudah terikat dengan *enzym* yang akan berubah warna, sehingga dapat diketahui berapa antigen yang ada pada sampel. Intensitas warna akan diukur dengan alat yang dinamakan ELISA *Reader*, secara signifikan proses lebih cepat walaupun untuk sejumlah besar sampel, bebas dari gangguan klorofil pada sampel ekstrak, dithiothreitol, *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS), *2-mercaptoethanol*, *Nonidet P-40*, dan *phenylmethylsulfonyl fluoride* (dan protease inhibitor lainnya), lebih sensitif, dapat menganalisa sampel protein minimal pada konsentrasi 100-200 ng/ μ L (Syarif et al., 2020). Prinsip kerja dari teknik ELISA adalah berdasarkan reaksi spesifik antara antibodi dan antigen dengan menggunakan enzim sebagai penanda (marker). Enzim tersebut akan memberikan suatu tanda terdapatnya suatu antigen jika antigen tersebut sudah bereaksi dengan antibodi.

G. Hewan Uji

Hewan laboratorium adalah hewan yang dipelihara secara intensif di laboratorium. Menurut Penjelasan atas Undang-undang Republik Indonesia Nomor 18 Tahun 2009, yang dimaksud dengan “hewan laboratorium” adalah hewan yang dipelihara khusus sebagai hewan percobaan, penelitian, pengujian, pengajaran, dan penghasil bahan biomedik ataupun dikembangkan menjadi hewan model untuk penyakit manusia. Teknik pengujian agen zat aktif yang berkhasiat sebagai pengobatan sangat penting untuk mendapatkan data khasiat yang akurat. Keterampilan dalam bekerja, iterprestasikan data,

dan kemampuan untuk menganalisa data akan menghasilkan kesimpulan yang lebih akurat. Pekerjaan dengan hewan uji akan memberikan penyimpangan yang besar bila tidak ditangani dengan baik dan benar karena sangat dipengaruhi oleh banyak faktor baik secara internal dari dalam dan sifat bawaan individual itu sendiri maupun faktor eksternal yang berasal dari luar hewan seperti kondisi lingkungan, teknik perlakuan dan sebagainya. Pengaruh dari semua faktor-faktor tersebut harus dapat diminimalisir sehingga penyimpangan data dapat diatasi agar kesimpulan percobaan mendekati hasil benar, akurat, dan tepat. Kesejahteraan hewan adalah suatu keadaan fisik dan psikologi hewan sebagai usaha untuk beradaptasi dengan kondisi lingkungan. Berdasarkan Undang- Undang Nomor 18 Tahun 2009, kesejahteraan hewan (*animal welfare*) adalah segala urusan yang berhubungan dengan keadaan fisik dan mental hewan menurut ukuran perilaku alami hewan yang perlu di terapkan dan ditegakkan untuk melindungi hewan dari perlakuan setiap orang yang tidak layak terhadap hewan yang dimanfaatkan manusia. Penelitian biomedis mengarah pada pemahaman yang lebih baik terhadap kesehatan yang meliputi penyakit pada manusia dan hewan. Penelitian tersebut membantu mengembangkan pengobatan dan obat yang bertujuan untuk meningkatkan kehidupan manusia dan hewan. Kesejahteraan hewan meliputi beberapa aspek antara lain umur panjang, penyakit, imunosupresi, perilaku, fisiologi, dan reproduksi. Hal-hal yang harus dipertimbangkan dalam penggunaan hewan sebagai hewan percobaan dengan mempertimbangkan kesejahteraan hewan laboratorium:

1. Tujuan eksperimen
2. Spesies hewan
3. Durasi discomfort atau distress
4. Jumlah hewan
5. Potensi realistik pencapaian tujuan
6. Durasi eksperimen (lama hidup hewan)
7. Kualitas perawatan hewan
8. Kemungkinan timbul nyeri

9. Kredibilitas peneliti

a. *Hewan Uji Mencit*

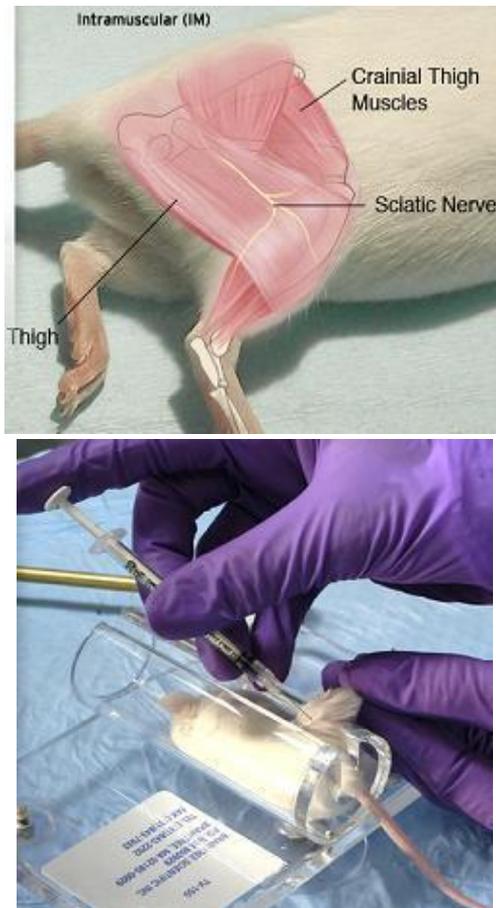
Hewan laboratorium mencit paling mudah ditangani, karena berukuran kecil, bersifat penakut, fotofobik cenderung berkumpul sesamanya, mempunyai kecenderungan untuk bersembunyi Ketika diamati manusia, dan lebih aktif pada malam hari. Suhu tubuh normal 37°C , laju respirasi normal 163 kali tiap menit. Cara memperlakukan mencit diangkat dengan memegangnya pada ujung ekornya dengan tangan kanan, dan dibiarkan menjangkau kawat kandang dengan kaki depannya, kemudian ekornya dipindahkan dari tangan kanan keantara jari manis dan jari kelingking tangan kiri, hingga mencit cukup erat dipegang. Pemberian obat dapat dimulai dengan cara:

- 1) Oral diberikan dengan alat suntik, dilengkapi dengan jarum oral. Kanulla ini dimasukkan melalui tepi langit-langit kebelakang sampai esofagus.
- 2) Subkutan diberikan dibawah kulit pada daerah tengkuk.
- 3) Intarvena penyuntikan dilakukan pada vena ekor menggunakan jarum no. 24 dengan cara mencit dimasukkan kedalam pemegang (dari kawat/bahan lain) dengan ekornya menjulur keluar. Ekor dicelupkan kedalam air hangat untuk mendilatasi vena guna mempermudah penyuntikan.
- 4) Intra muskular menggunakan jarum no 24 disuntikkan kedalam otot paha posterior.
- 5) Intra peritoneal untuk ini hewan dipegang pada punggungnya sehingga kulit abdomennya menjadi tegang. Pada saat penyuntikan posisi kepala mencit lebih rendah dari abdomennya. Jarum disuntikkan dengan membentuk sudut 100 dengan abdomen, agak menepi dari garis tengah untuk menghindari terkenanya kandung kencing. Jangan pula terlalu tinggi agar tidak mengenai hati. Volume penyuntikan

untuk mencit umumnya adalah 1 mL/100 g bobot badan. Kepekaan larutan obat yang disuntikan disesuaikan dengan volume yang dapat disuntikan tersebut.

Cara pembiusan hewan uji mencit sesuai prosedur, antara lain:

- a) Gas eter dan karbondioksida: gas eter dan karbondioksida dikenal sebagai gas lemas, dimana pengaplikasiannya diletakkan pada dasar bejana tertutup dengan menggunakan kapas, selanjutnya hewan uji dimasukkan kedalam wadah tersebut dan ditutup. Hewan uji akan lemas dan kehilangan kesadaran dalam kurun waktu tertentu.
- b) Halotan
- c) Luminal: pemberian injeksi luminal atau sodium phenobarbital secara intravena dengan dosis 45- 60 mg/Kg BB
- d) Ketamin HCl: pemberian melalui injeksi secara intra muskulat dengan dosis 22-44 mg/Kg BB
- e) Etil karbonat: larutan etil karbonat 25% dalam pelarut air diberikan secara intra peritoneal dengan dosis 1000-1250 mg/Kg BB



Gambar 4. Area injeksi anestesi pada hewan uji mencit (http://www.theodra.com/rodent_laboratory/injections.html)

Hewan yang sudah digunakan sebelum dikorbankan dilakukan injeksi ketamin hidroklorida akan digunakan untuk anestesi terlebih dahulu dengan dosis 22-44 mg/KgBB melalui injeksi intra muskular, setelah itu hewan dikorbankan dengan dislokasi cervical dengan dimasukkan dalam *incinerator*.

BAB III

PROSEDUR UJI AGEN IMUNOMODULATOR NANOSILVER DENGAN BIOREDUKTOR INULIN

A. Penyiapan Sampel Uji

1. *Alat dan Bahan*

Bahan yang digunakan yaitu Inulin yang disintesis dari umbi Gembili, perak nitrat (AgNO_3) (Merck, German), inulin standar (Aldrich SIGMA, USA), vaksin campak kering (PT. Biofarma, Indonesia), ELISA Kit (Bioassay Technology Laboratory, Labtech, China), Levamisole (Konimex), Prednisone (Phapros), akuadest, kertas whattman No.1 (UK), hewan uji (mencit galur Balb-C berat badan 20 g, CV Dunia Kaca, Surakarta, Indonesia), NaCl kristal (Merck KgaA, USA), NaOH (Merck KgaA, USA).

Alat yang digunakan antara lain: *Hotplate* (Maspion, Indonesia), timbangan analitik (US Solid Precision, US), lemari pendingin (Aqua, Jepang), aluminium foil (KlinPak, Indonesia), spuit 3 mL (OneMed, Indonesia), mikro hematokrit (Vitrex Medical, Denmark), sentrifuge (Hettich, Jerman), ELISA reader (Spark, Eropa), inkubator (Sakura EM200T, Jepang), well (BT Lab, China), vortex (Barnstead, USA), sealer (BT Lab, China), mikropipet ependorff (Multipette, Jerman), spektrofotometer UV-Vis (Genesys 150, USA), Particle Size Analyzer (HORIBA, USA), TEM (JEOL/EO JEM-1400 Jepang), FTIR (Shimadzu).

2. *Proses Biosintesis perak nitrat dengan larutan inulin*

Timbang seksama 3,33 gram serbuk gembili dilarutkan dalam 83,33 mL akuades pada suhu ruang diaduk hingga larut. Larutan disaring menggunakan kertas Whattman No.1 untuk mendapatkan filtrat jernih (larutan a). Akuades 165 mL dipanaskan hingga suhu 40 °C, kemudian ditambahkan 28,0 mg serbuk perak nitrat (larutan b). Sebanyak 7,0 mL larutan a ditambahkan ke dalam 36 mL larutan b. Pencampuran dilakukan pada suhu 60 °C selama 15 menit. Larutan

ditempatkan dalam gelas terlindung cahaya dan dienapkan selama 24 jam untuk memaksimalkan proses biosintesis (Ermawati dkk., 2021).

3. *Analisa hasil nanosilver inulin menggunakan instrumen*

SPR (*Surface Plasmon Resonance*) nanosilver dapat diketahui dengan bantuan alat Spektrofotometer UV-Vis pada rentang Panjang gelombang 190-500 nm. Blanko yang digunakan adalah akuades. Analisa dengan TEM (*Transmission Electron Microscopy*) dengan menganalisa larutan hasil biosintesis baik pada suhu kelarutan 40°C dilakukan analisa ukuran partikel menggunakan alat TEM sehingga didapatkan hasil kondisi suhu pencampuran optimum yang menghasilkan ukuran partikel yang diharapkan. Analisa FTIR dilakukan dengan cara sejumlah serbuk perak nitrat, serbuk inulin dan larutan biosintesis yang telah dilakukan sentrifugasi untuk mendapatkan endapan yang selanjutnya ditambahkan pellet KBr untuk dilakukan Analisa menggunakan alat FT-IR.

4. *Penyiapan hewan uji*

Hewan uji adalah mencit jantan galur Balb-C usia 6-8 minggu dengan berat badab 20-25 gram dikondisikan selama satu minggu pada siklus 12 jam terang dan 12 jam gelap. Suhu pengkondisian adalah suhu ruang yaitu 25-27°C pada kelembabab 55-60%, dan diberikan minum akuades ad libitum serta makan pellet BR. Hewan uji ditempatkan pada kandang box plastik ukuran 60x40x30 cm, atap kawat stiming, masing-masing 5 ekor mencit/box.

5. *Uji aktivitas imunomodulator*

Ethical Clearance (EC) diajukan sebelum prosedur penelitian dimulai. Form EC berisi prosedur penanganan hewan uji selama proses penelitian, prosedur anestesi, serta pengorbanan hewan uji setelah selesai seluruh tahap penelitian. Uji efektivitas dosis imunomodulator dilakukan dengan mengelompokkan hewan uji menjadi dua kelompok besar. Kelompok kontrol dibagi dalam lima kontrol dengan

masing-masing lima ekor mencit. Adapun lima kontrol tersebut adalah:

- a. kontrol AgNO₃ dosis 1,0 mg/kg.BB mencit (Amri dkk., 2020)
- b. kontrol stimulan herbal dosis 19,5 mg/Kg.BB mencit (BPOM, 2015)
- c. kontrol inulin dosis 4,0 mg/kg.BB,
- d. kontrol prednison dosis 3,0 mg/kg.BB,
- e. kontrol akuades dosis 25 mg/kg.BB (Ermawati dkk., 2016)

Kelompok perlakuan terdiri dari empat kelompok masing-masing lima ekor mencit (nanosilver dosis 2,0 mg/Kg.BB; 4,0 mg/Kg.BB; 8,0 mg/Kg.BB, dan 12 mg/Kg.BB). Prosedur anestesi dilakukan dengan membersihkan area tubuh mencit dengan *alcohol swab* 70% sebelum dilakukan vaksinasi atau pengambilan sampel darah. Pada hari ke 7 dan 14 dilakukan vaksinasi pada seluruh mencit. Pengambilan sampel darah dilakukan pada hari ke 0, 12, dan 19. Sampel darah diambil melalui vena sinus orbital menggunakan mikro hematokrit. Darah yang keluar dari mikro hematokrit diambil sebanyak 2,5 mL ditampung pada ependorff. Darah kemudian didiamkan selama 15 menit lalu disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm, maka akan didapatkan serum untuk diperiksa kadar IgG ELISA reader pada panjang gelombang 450 nm.

6. *Prosedur analisis menggunakan metode ELISA Reader*

Analisa serum menggunakan ELISA reader diawali dengan mengkondisikan reagen pada suhu ruang sebelum digunakan. Tahap awal yaitu pembuatan standard. Sebanyak 150 µL standard/ sampel diluent diencerkan hingga terbentuk 16.000 ng/mL larutan stok standar. Larutan didiamkan selama 15 menit dengan digojog perlahan. Disiapkan 5 replikasi pengenceran (8.000 ng/mL, 4.000 ng/mL, 2.000 ng/mL, 1.000 ng/mL, dan 500 ng/mL). Tahap selanjutnya yaitu pembuatan *Biotinylated Antigen*. *Biotinylated*

Antigen dalam vial disentrifugasi kemudian ditambahkan 1,0 mL *Biotinylated Antigen Diluent* dan divortex. Seluruh larutan dimasukan kembali kedalam vial *Biotinylated Antigen Diluent* dan divortex sehingga menghasilkan 6,0 mL larutan stok. Larutan didiamkan selama 10 menit sambil digojog perlahan. Tahap selanjutnya yaitu peyiapan *Avidin-HRP Concentrate*. Larutan *Avidin-HRP Concentrate* disentrifugasi dan dipipetkan seluruhnya ke dalam vial berisi *Avidin HRP Diluent*. Larutan divortex sehingga dihasilkan 6,0 mL larutan stok. Larutan didiamkan selama 10 menit dengan pengojogan perlahan. Penyiapan *Wash Buffer Concentrate 25x* dilakukan dengan mencampur 20 mL *Wash Buffer Concentrate* dengan 480 mL akuades untuk menghasilkan 500 mL *Wash Buffer*.

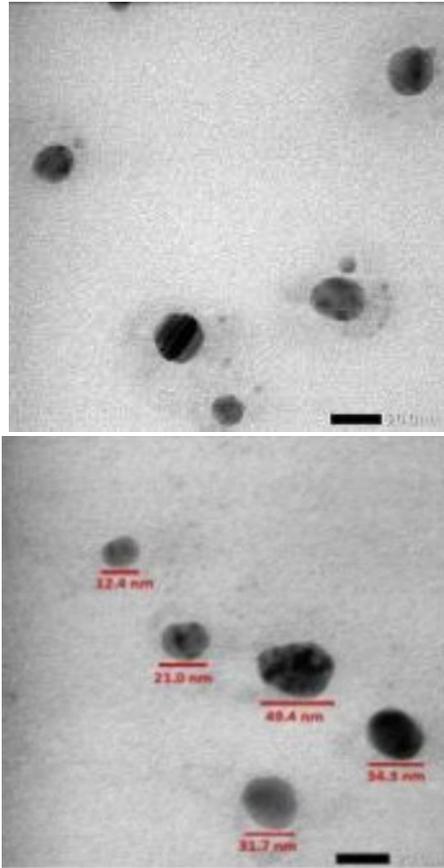
Reagen yang telah disiapkan, selanjutnya dilakukan prosedur *assay*. Sebanyak 50 μ L standard yang telah diencerkan dimasukan kedalam *standard well*. Sampel serum dimasukan sejumlah 50 μ L kedalam *sampel well*. *Biotinylated Antigen* 50 μ L selanjutnya dimasukan pada setiap *well* dan dicampur perlahan. Plat kemudian plat ditutup menggunakan *sealer* dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37 °C pada inkubator. Setelah proses inkubasi, *sealer* dibuka dan cairan dalam *well* dibuang. *Well* dicuci sebanyak lima kali dengan 300 μ L *Wash Buffer* secara manual. Plat dihentikan empat hingga lima kali secara terbalik pada bahan *absorbent (tissue)*. *Avidin-HRP* ditambahkan 50 μ L kedalam *standard well* dan *sampel well*. Plat ditutup menggunakan *sealer* dan diinkubasi kembali selama 60 menit pada suhu 37 °C. Setelah diinkubasi, *sealer* dilepas dan plat dicuci seperti langkah sebelumnya, kemudian dimasukan 50 μ L larutan substrat A pada tiap *well* dan kemudian ditambahkan 50 μ L larutan substrat B pada tiap *well*. Plat diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37 °C di ruangan gelap. Setelah diinkubasi, pada tiap *well* ditambahkan masing-masing 50 μ L *Stop Solution*. Warna biru pada larutan akan berubah menjadi warna kuning setelah penambahan *Stop Solution*. *Well* kemudian dibaca pada ELISA dengan

panjang gelombang 450 nm selama 10 menit untuk mengetahui kadar Immunoglobulin G pada masing masing sampel serum.

B. Interpretasi hasil pengujian

1. Karakterisasi nanosilver hasil biosintesis

Keberhasilan biosintesis nanopartikel perak menggunakan ekstrak tanaman umumnya ditandai dengan perubahan warna menjadi coklat kekuningan dan dihasilkan puncak absorpsi pada rentang 400-500 nm. Perubahan warna terjadi karena adanya gugus R-CHO yang dapat bereaksi dengan Ag^+ membentuk nanopartikel perak. Sehingga pada penelitian ini perlu dilakukan analisa TEM dan FTIR sebagai bahan pertimbangan keberhasilan proses biosintesis perak nitrat dengan variasi suhu kelarutan inulin (Lestari *et al.*, 2019). Nanoteknologi pada umumnya merupakan manipulasi materi dengan ukuran maksimum 100 nanometer, dalam bidang farmasi nanoteknologi digunakan sebagai teknologi yang didesain untuk menghasilkan material dengan sifat dan fungsi unik dibandingkan dengan material asalnya. Salah satu aplikasinya terdapat pada proses biosintesis inulin umbi gembili dengan perak nitrat. Kontrol ukuran selama proses biosintesis merupakan kriteria yang penting untuk dilakukan. Hal tersebut untuk memastikan bahwa ukuran partikel masih berada pada skala nanometer.



Gambar 5. Hasil analisis nanopartikel perak hasil biosintesis menggunakan TEM pada perbesaran 250.000 kali

Pengujian dengan *instrument Transmission Electron Microscopy* (TEM) dilakukan untuk mengetahui morfologi permukaan dan ukuran partikel sampel. Berdasarkan Gambar 5 hasil sampel biosintesis inulin umbi gembili (*Dioscorea esculenta* L.) dengan AgNO_3 pada suhu kelarutan inulin $25\text{ }^\circ\text{C}$ menunjukkan rata-rata ukuran partikel sebesar $29,76\text{ nm}$ dengan bentuk bulat tanpa adanya agregasi pada perbesaran 250.000 kali. Pada sampel tersebut juga terlihat

bahwa seluruh partikel tersebar secara merata dalam matriks campuran inulin dan AgNO_3 . Hasil TEM yang serupa ditemukan pada penelitian Charoenwongpaibon *et al.* (2019) yang menyatakan bahwa sintesis inulin nanopartikel (INNP) menunjukkan morfologi INNP yang memiliki bentuk bulat dengan kisaran diameter 25–60 nm. Pada penelitian tersebut konsentrasi suhu biosintesis (4 °C; 20 °C; 30 °C; 40 °C; dan 50 °C) memainkan peran dalam memperkecil ukuran diameter. Meningkatnya suhu akan memperkecil ukuran diameter. Gosh *et al.* (2012) juga meneliti biosintesis nanopartikel perak menggunakan *Dioscorea bulbifera* dengan hasil yaitu struktur berbentuk bulat secara umum, segitiga, dan heksagonal. Laju maksimal biosintesis diperoleh dari kombinasi suhu biosintesis 50 °C dan 0,7 mM AgNO_3 yang menunjukkan aktivitas antimikroba yang optimal terhadap berbagai jenis bakteri gram positif dan gram negatif. Penelitian tersebut menyatakan bahwa kandungan pati dari ekstrak *Dioscorea bulbifera* berperan sebagai *capping agent* yang bertanggung jawab untuk mereduksi Ag^+ menjadi Ag^0 . Pada penelitian Pugazhendi *et al* (2016) juga menyatakan bahwa hasil TEM dari biosintesis nanopartikel perak menggunakan *Dioscorea alata* menunjukkan struktur morfologi berbentuk bulat dengan kisaran ukuran partikel sebesar 16,62–22,43 nm.

Fourier Transform Infrared (FTIR) merupakan alat yang digunakan untuk mendeteksi gugus fungsi suatu senyawa. Prinsip kerja FTIR yaitu mengumpulkan sinar inframerah yang disebar pada permukaan sampel untuk mengetahui frekuensi gelombang yang diserap. Selanjutnya dari frekuensi yang terbaca ini kemudian akan diartikan untuk mengetahui gugus spesifik dari sampel tersebut. Pada penelitian ini, interaksi kimia antara inulin dengan AgNO_3 dievaluasi menggunakan spektroskopi FTIR pada bilangan gelombang 4000-500 cm^{-1} . Analisa FTIR dilakukan pada sampel serbuk AgNO_3 , serbuk inulin, larutan hasil biosintesis inulin- AgNO_3 . Gugus fungsi yang muncul pada sampel AgNO_3 serbuk antara lain Ag–N (407,96; 439,79); NO_3

(823,64); NO²⁻ (1381,09); C=O *stretching* (1763,01); O=C=O *stretching* (2065,85; 2361,94; 2394,73); dan O-H *stretching* (2735,18). Kemudian pada sampel serbuk inulin, gugus fungsi yang muncul antara lain ialah cincin piranosa (574,81); C-C *vibration* (709,83); C-H *bending* (763,84); fruktofuranosa (858,36; 928,76); O-H *bending* (1018,46; 1082,11); C-O-C (1154,45); O-H *bending* (1366,62); C=C (1647,28); C-H *stretching* (2930); dan O-H *stretching* (3379,43). Sedangkan pada sampel hasil biosintesis inulin suhu kelarutan 25 °C-AgNO³, gugus fungsi yang muncul antara lain ialah cincin piranosa (528,52; 577,71; 605,67); C-C *vibration* (708,87); C-H *bending* (761,91); fruktofuranosa (855,47; 931,66); O-H *bending* (1022,32; 1079,22); C-O-C (1153,48); NO²⁻ (1236,42; 1338,66; 1367,59; 1410,99); C=C (1637,64); C-H *stretching* (2929,03); dan O-H *stretching* (3379,43). Hasil tersebut terkonfirmasi pada penelitian Melanie et al. (2015) yang menyatakan bahwa pada bilangan gelombang dibawah 900 cm⁻¹ merupakan karakteristik dari karbohidrat inulin. Adanya pergeseran gelombang pada sampel hasil biosintesis inulin-AgNO³ menunjukkan bahwa telah terjadi interaksi antara gugus fungsi dengan nanopartikel perak yang mungkin disebabkan oleh pengaruh variasi suhu kelarutan inulin. Interaksi tersebut yang nantinya akan menghasilkan sifat paduan (sifat baru) yang berbeda dari sifat materi asalnya.

Karakterisasi nanosilver merupakan analisa ukuran partikel dari larutan nanosilver. Ukuran partikel merupakan karakteristik nanopartikel yang penting karena menentukan distribusi obat, toksisitas, serta mempengaruhi drug loading, drug relase, dan kestabilan sistem nanopartikel (Julianawati dkk., 2019). Ukuran dan distribusi ukuran partikel nano dapat diukur menggunakan alat *Particle Size Analyzer* (PSA). Karakterisasi nanosilver dengan PSA ini bertujuan untuk mengetahui distribusi ukuran dan keseragaman partikel (Prasetyaningtyas dkk., 2020). Teknik yang digunakan dalam PSA adalah *Lasser Diffraction*. Prinsip dari PSA adalah penghamburan cahaya laser oleh partikel-partikel yang

terdispersi dan melewati berkas sinar laser. Partikel dengan ukuran yang lebih besar akan menghamburkan cahaya dengan sudut yang relatif kecil dan sebaliknya untuk partikel yang berukuran lebih kecil (Oktavia dan Sutoyo, 2021). Hasil pengukuran yang didapatkan adalah larutan biosintesis nanosilver memiliki nilai Z-avarange, yaitu 481,4 nm. Hasil menunjukkan bahwa ukuran partikel nanosilver masih termasuk dalam rentang ukuran nanopartikel, hal ini sesuai dengan definisi nanopartikel yang merupakan partikel koloid padat dengan diameter 1-1000 nm (Kurniasari dan Atun, 2017).

Nilai Polidispers Indeks (PI) yang diperoleh dari analisis ini, yaitu 0,544. Polidispers Indeks menggambarkan distribusi ukuran partikel yang ada dalam sediaan nanopartikel. Semakin kecil jumlah indeks polidispersitas, maka semakin seragam ukuran partikel (Nurkhasanah dkk., 2015). Nilai PI 1 menunjukkan distribusi ukuran yang sangat luas dan mengandung partikel besar atau agregat yang dapat mengalami sedimentasi sedangkan nilai PI kurang dari 0,7 menunjukkan ukuran partikel yang seragam atau homogen (Nindhin dkk., 2008; Nurviana dkk., 2020). Pada Tabel I menunjukkan nilai PI nanosilver pada penelitian ini tidak melebihi 0,7 sehingga menunjukkan distribusi ukuran partikel yang homogen. Hasil karakterisasi *nanosilver* menggunakan PSA menunjukkan bahwa proses biosintesis menggunakan reduktor inulin gembili berhasil membentuk *nanosilver*.

C. Perlakuan Hewan Uji

Uji efektivitas dosis imunomodulator dilakukan dengan mengelompokkan hewan uji menjadi dua kelompok besar, yakni kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Penentuan jumlah subjek minimal ditentukan berdasarkan rumus Federer yaitu $(t-1)(n-1) \geq 15$, t merupakan jumlah perlakuan, sedangkan n merupakan banyak pengulangan pada tiap perlakuan (Wahyuningrum dan Probosari, 2012). Didapatkan $n \geq 3$.

Penelitian ini menggunakan 3 ekor mencit tiap kelompok. Berikut merupakan tabel dosis masing-masing kelompok.

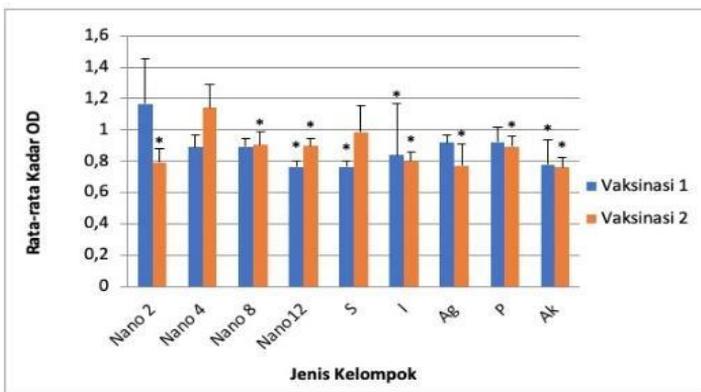
1. AgNO₃ 1 mg/KgBB mencit (Amri dkk., 2020)
2. Imunostimulan Herbal 19,5 mg/KgBB mencit (BPOM, 2015)
3. Inulin 5 mg/KgBB mencit (Ermawati dkk., 2016)
4. Prednison 3 mg/KgBB mencit (Ermawati dkk., 2016)
5. Akuades 25 mg/KgBB mencit (Ermawati dkk., 2016)
6. *Nanosilver* 2 mg/KgBB
7. *Nanosilver* 4 mg/KgBB
8. *Nanosilver* 8 mg/KgBB
9. *Nanosilver* 12 mg/KgBB

Pengambilan sampel darah dilakukan pada hari ke 0, 12, dan 19. Sampel darah diambil melalui vena sinus orbital menggunakan mikro hematokrit. Darah yang keluar dari mikro hematokrit diambil sebanyak 2,5 mL ditampung pada ependorff. Darah kemudian didiamkan selama 15 menit lalu disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm, maka akan didapatkan serum untuk diperiksa kadar IgG *ELISA reader* pada panjang gelombang 450 nm.

Analisa serum menggunakan *ELISA reader* diawali dengan mengkondisikan reagen pada suhu ruang sebelum digunakan. Setelah semua reagen telah disiapkan, selanjutnya dilakukan prosedur *assay*. Prosedur *assay* dilakukan dengan ditambahkan 50 µL larutan standar ke dalam *well*, selanjutnya ditambahkan 50 µL sampel ke dalam *well*. Ditambahkan 50 µL *Biotinylated Antigen*. Diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37 °C. *Well* dicuci sebanyak lima kali menggunakan 300 µL *wash buffer*. Ditambahkan 50 µL *Avidin-HRP*. Diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37 °C. *Well* dicuci sebanyak lima kali menggunakan 300 µL *wash buffer*. Ditambahkan 50 µL larutan substrat A dan 50 µL larutan substrat B ke dalam *well*. Diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37 °C. Ditambahkan 50 µL *stop solution*. *Well plate* dibaca pada *ELISA* dengan panjang gelombang 450 nm selama 10 menit (Elabscience, 2021).

D. Pengukuran Titer IgG dengan ELISA Reader

Uji efektivitas dosis imunomodulator *nanosilver* bertujuan untuk mengetahui dosis *nanosilver* yang memberikan efek imunomodulator terbaik. Penggunaan vaksin berperan sebagai antigen yang dapat merangsang respon imun humoral melalui produksi antibodi yang memberikan imunitas (Radji, 2009). Vaksinasi dilaksanakan dua kali sebab selama kurun waktu tersebut, diharapkan telah terjadi sensitasi sel B yang akan berproliferasi, berdiferensiasi, dan berkembang menjadi sel plasma yang memproduksi antibodi yaitu Immunoglobulin M (IgM) dan Immunoglobulin G (IgG). IgM merupakan imunoglobulin yang pertama kali diproduksi sebagai respon imun terhadap antigen yang diikuti pengalihan ke produksi IgG atau antibodi kelas lain (Abbas dkk., 2007). Pengambilan sampel darah dilakukan melalui bagian vena sinus orbital di bagian sudut mata karena pengambilan lebih mudah serta meminimalisir kemungkinan terjadi lisis (Fatimah dkk., 2018). Hasil *Optical Density* (OD) Immunoglobulin G sebelum vaksinasi, setelah vaksinasi ke-1, dan setelah vaksinasi ke-2.



Gambar 6. Grafik Perbandingan Rata-rata Kadar OD Pasca Vaksinasi 1 dengan Vaksinasi 2. Dimana S (stimulant herbal); I (Inulin); Ag (perak); P (prednisone); dan Ak (air)

Perlakuan *Nanosilver* dosis 4 mg/KgBB; *Nanosilver* dosis 8 mg/KgBB; dan *Nanosilver* dosis 12 mg/KgBB mengalami kenaikan nilai OD. Pada perlakuan *Nanosilver* dosis 2 mg/KgBB; inulin; AgNO₃; Prednison, dan akuades mengalami penurunan nilai OD. Kenaikan nilai OD berbanding lurus dengan kenaikan kadar imunoglobulin G, semakin tinggi nilai OD nya maka kadar imunoglobulin G nya akan semakin besar. Begitu pula sebaliknya, semakin rendah nilai OD nya maka kadar imunoglobulin G nya akan semakin kecil (Serang dkk., 2019).

Berdasarkan Gambar 6, akuades sebagai kontrol negatif berbeda nyata dengan *nanosilver* dosis 4 mg/KgBB. Imunostimulan herbal sebagai kelompok kontrol positif menunjukkan peningkatan kadar OD yang signifikan, yakni 29,04%. Imunostimulan herbal bekerja sebagai dengan meningkatkan sistem imun. Namun, imunostimulan herbal sebagai kontrol positif tidak berbeda nyata dengan ekstrak dosis 4 mg/KgBB dengan peningkatan kadar OD sebesar 28,43%. Hal ini berarti kemampuan stimulo dalam meningkatkan Titer Imunoglobulin G sebanding dengan *nanosilver* dosis 4 mg/KgBB.

Pengambilan serum pertama kali pasca vaksinasi menimbulkan respon imun primer yang ditandai dengan munculnya IgM sehingga produksi IgM lebih besar dibandingkan IgG. Pengambilan serum kedua akan menimbulkan respon imun sekunder yang ditandai dengan meningkatnya produksi IgG sehingga IgG lebih banyak dibandingkan IgM (Sasmito, 2006). IgM terbentuk 4-5 hari setelah terpapar antigen, sedangkan IgG dibentuk setelah 5 hari terpapar serta mencapai puncak pada 2-3 pekan setelah terpapar (Marliana dan Widhyasih, 2018). Jumlah IgG yang tidak linear pada kelompok perlakuan disebabkan oleh belum maksimalnya IgG yang terbentuk serta dimungkinkan terpengaruh oleh penyakit jamur kulit yang menghinggapi mencit pada masa penelitian. Hal tersebut juga berlaku pada kelompok lainnya.

E. Analisa Data

Hasil data pembacaan ELISA dilakukan analisis statistik untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan bermakna pada masing-masing perlakuan dan kontrol. Pengujian normalitas dilakukan menggunakan *Shapiro-Wilk* karena data yang digunakan berada di bawah 50 data. Hasil menunjukkan bahwa seluruh data terdistribusi normal $p\text{-value} > 0,05$. Selanjutnya dilakukan uji *One Way Anova*. Pengujian homogenitas varian menunjukkan hasil bahwa nilai $p\text{-value} > 0,05$ yang berarti variasi data homogen. Oleh karena itu, data memenuhi syarat untuk dilakukan uji *One way ANOVA*. Pada uji *One Way ANOVA* nilai signifikansi yang dihasilkan adalah $<0,05$ sehingga perlu dilanjutkan pada uji *Post Hoc* dengan metode LSD. Uji *Post Hoc* dengan metode LSD bertujuan untuk melihat adanya perbedaan bermakna pada masing-masing kelompok. Perbedaan masing-masing kelompok ditandai dengan tanda “*” pada hasil *mean difference*. Hasil uji *Post Hoc* LSD menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan antara sampel *Nanosilver* dosis 4 mg/KgBB dengan kontrol lainnya, namun tidak berbeda signifikan dengan kontrol stimulan herbal.

Dosis efektif *nanosilver* dengan bio reduktor inulin gembili sebagai imunomodulator dalam penelitian ini terbukti sebagai imunostimulator adalah dosis 4 mg/KgBB. Dosis ini tidak berbeda signifikan dengan kontrol stimulan herbal dalam meningkatkan kadar imunoglobulin G mencit.

DAFTAR SINGKATAN

mg	: miligram
Kg	: kilogram
ng	: nanogram
nm	: nanometer
mL	: mililiter
μ L	: mikroliter
Kkal	: kilo kalori
BB	: Berat Badan
dkk	: dan kawan-kawan
$^{\circ}$ C	: derajat celcius
IgG	: Immunoglobulin G
IgM	: Immunoglobulin M
ELISA	: Enzime Linked Immunosorbent Assay
PSA	: Particle Size Analyzer
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
WHO	: World Health Organization
UV/Vis	: Ultraviolet/Visible
ANOVA	: Analysis of Variance
LSD	: Least Significant Difference
PI	: Polidisperse Indeks
OD	: Optical Density

DAFTAR PUSTAKA

- Abou Assi, R., Darwis, Y., Abdulbaqi, I. M., Khan, A. A., Vuanghao, L., & Laghari, M. H. (2017). Morinda citrifolia (Noni): A comprehensive review on its industrial uses, pharmacological activities, and clinical trials. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(5), 691–707. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.06.018>
- Adamu, U. M., Lawal, H., & Ramasamy, R. (2021). Immunomodulatory functions of moringa oleifera (Lam.). *Malaysian Journal of Medicine and Health Sciences*, 17(7), 54–63.
- Ahmad, R. S., Hussain, M. B., Sultan, M. T., Arshad, M. S., Waheed, M., Shariati, M. A., Plygun, S., & Hashempur, M. H. (2020). Biochemistry, Safety, Pharmacological Activities, and Clinical Applications of Turmeric: A Mechanistic Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Ahsan, R., Arshad, M., Khushtar, M., Ahmad, M. A., Muazzam, M., Akhter, M. S., Gupta, G., & Muzahid, M. (2020). A Comprehensive Review on Physiological Effects of Curcumin. *Drug Research*, 70(10), 441–447. <https://doi.org/10.1055/a-1207-9469>
- Ak, T., & Gulcin, I. (2008). Chemico-Biological Interactions Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-Biological Interactions*, 174, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.05.003>
- Akrom, & Mustofa. (2017). Black cumin seed oil increases phagocytic activity and secretion of IL-12 by macrophages. *Biomedical Research (India)*, 28(12), 5241–5246.
- Ali, M., Kenganora, M., & Manjula, S. N. (2016). Health benefits of morinda citrifolia (Noni): A review. *Pharmacognosy Journal*, 8(4), 321–334. <https://doi.org/10.5530/pj.2016.4.4>
- Arreola, R., Quintero-Fabián, S., Lopez-Roa, R. I., Flores-Gutierrez, E. O., Reyes-Grajeda, J. P., Carrera-Quintanar, L., & Ortuno-Sahagun, D. (2015). Immunomodulation and anti-inflammatory effects of garlic compounds. *Journal of Immunology Research*. <https://doi.org/10.1155/2015/401630>

- Assi, M. A., Hezmee, M., Noor, M., Farhana Bachek, N., Ahmad, H., Haron, A. W., Sabri, M., Yusoff, M., & Rajion, M. A. (2016). The Various Effects of *Nigella Sativa* on Multiple Body Systems in Human and Animals. *PJSRR Pertanika Journal of Scholarly Research Reviews*, 2(3), 1–19. <http://www.pjsrr.upm.edu.my/>
- Astinfeshan, M., Rasmi, Y., Kheradmand, F., & Karimipour, M. (2019). Food Bioscience Curcumin inhibits angiogenesis in endothelial cells using downregulation of the PI3K / Akt signaling pathway. *Food Bioscience*, 29(April), 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.04.005>
- Ayunda, N., Zulharmita, M., Azizah, Z., & Rivai, H. (2020). Review of Phytochemical and Pharmacological Activities of Noni (*Morinda citrifolia* L.). *Scholars Academic Journal of Pharmacy*, 9(12), 340–346. <https://doi.org/10.36347/sajp.2020.v09i12.003>
- Azimah, D., Yuswanto, Wahyono, Santosa, D., & Setyowati, E. P. (2016). Efek Imunomodulator dari Kombinasi Ekstrak Etanol Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees) dan Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) Terhadap Proliferasi Sel Limfosit Mencit Balb/c Secara in vitro. *Traditional Medicine Journal*, 21(3), 157–168.
- Baratawidjaja, K. G. (2004) *Imunologi dasar : Sistem Imun*. 6th edn. Jakarta: FKUI.
- Batiha, G. E. S., Beshbishy, A. M., Wasef, L. G., Elewa, Y. H. A., Al-Sagan, A. A., El-Hack, M. E. A., Taha, A. E., Abd-Elhakim, Y. M., & Devkota, H. P. (2020). Chemical constituents and pharmacological activities of garlic (*Allium sativum* L.): A review. *Nutrients*, 12(3), 1–21. <https://doi.org/10.3390/nu12030872>.
- Bukoye, O., & Musbau, A. (2011). Immune Modulation Potentials of Aqueous Extract of *Andrographis paniculata* Leaves in Male Rat. *Researcher*, 3(1), 48–57. <http://www.sciencepub.net/researcher>
- Catanzaro, M., Corsini, E., Rosini, M., Racchi, M., & Lanni, C. (2018). Immunomodulators inspired by nature: A review on

- curcumin and Echinacea. *Molecules*, 23(11), 1–17.
<https://doi.org/10.3390/molecules23112778>
- Chainani-Wu, N. (2003). Safety and Anti-Inflammatory Activity of Curcumin: A Component of Tumeric (*Curcuma longa*). *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 9(1), 161–168.
- Churiyah, C., Pongtuluran, O. B., Rofaani, E., & Tarwadi, T. (2015). Antiviral and Immunostimulant Activities of *Andrographis paniculata*. *HAYATI Journal of Biosciences*, 22(2), 67–72.
<https://doi.org/10.4308/hjb.22.2.67>
- Cortés-Rojas, D. F., de Souza, C. R. F., & Oliveira, W. P. (2014). Clove (*Syzygium aromaticum*): A precious spice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(2), 90–96.
[https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(14\)60215-X](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(14)60215-X)
- Czech, A., Zarycka, E., Yanovych, D., Zasadna, Z., Grzegorzcyk, I., & Kłys, S. (2020). Mineral Content of the Pulp and Peel of Various Citrus Fruit Cultivars. *Biological Trace Element Research*, 193(2), 555–563. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01727-1>
- Dai, Y., Chen, S. R., Chai, L., Zhao, J., Wang, Y., & Wang, Y. (2019). Overview of pharmacological activities of *andrographis paniculata* and its major compound andrographolide. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59, S17–S29.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1501657>
- Danladi, S., Idris, M., & Umar, I. (2018). Review on pharmacological activities and phytochemical constituents of *Phyllanthus niruri* (Amarus). *The Journal of Phytopharmacology* 2018;, 7(3), 341–348.
- Deshmukh, P., Sharma, R. K., Sharma, V., & Panka, J. (2015). Immunomodulatory Activity of *Moringa oleifera* in Albino Rats. *Journal of Animal Research*, 5(2).
<https://doi.org/10.1515/jbcpp-2014-0104>
- Devaraj, S., Ismail, S., Ramanathan, S., Marimuthu, S., & Fei, Y. M. (2010). Evaluation of the hepatoprotective activity of standardized ethanolic extract of *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(23), 2512–2517.

<https://doi.org/10.5897/jmpr10.453>

- Dhanik, J., Arya, N., Nand, V., & Jyotsna Dhanik, C. (2017). A Review on Zingiber officinale. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(3), 174–184.
- Dibazar, S. P., Fateh, S., & Daneshmandi, S. (2014). Clove (*Syzygium aromaticum*) ingredients affect lymphocyte subtypes expansion and cytokine profile responses: An in vitro evaluation. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(4), 448–454. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.04.005>
- Dillasamola, D., Aldi, Y., Fakhri, M., Diliarosta, S., Biomechy Oktomali, P., & Noverial. (2018). Immunomodulatory effect test from moringa leaf extract (*Moringa oleifera* L.) with carbon clearance method in male white mice. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 11(9), 241–245. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i9.26703>
- Donma, M. M., & Donma, O. (2020). The effects of allium sativum on immunity within the scope of COVID-19 infection. *Medical Hypotheses*, 144(May), 109934. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109934>
- Dourado, G., Carlos, I. Z., & Cesar, T. B. (2013). Orange Juice and Hesperidin Promote Differential Innate Immune Response in Macrophages ex vivo. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 3. <https://doi.org/10.1024/0300-9831/a000157>
- El-Ashmawy, N. E., El-Zamarany, E. A., Salem, M. L., El-Bahrawy, H. A., & Al-Ashmawy, G. M. (2015). In vitro and in vivo studies of the immunomodulatory effect of Echinacea purpurea on dendritic cells. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 13(2), 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2015.05.002>
- Elabscience. 2021, *Mouse IgG (Immunoglobulin G) ELISA Kit*, Elabscience, USA.
- Elnour, S. A., & Abdelsalam, E. B. (2018). Some Biological and Pharmacological Effects of the Black Cumin (*Nigella sativa*): A Concise Review. *American Journal of Research Communication*, 6(3), 10–35.

- Ermawati, D. E., Ediati, S., Mufrod, Pramitha, E. N. D., Ni, P. U. A., Anggi, K. D., Muchammad, H., & Aini, S. (2016). Optimum Dose and Formulation of *Centella asiatica* L. Urban Extract Against IgG of Wistar Strain Male Mices which Induced by BCG Vaccine. *J.Food Pharm.Sci*, 04(01), 5-9.
- Ermawati, D. E., Yuniastuti, A., dan Fadjrin, H. I. (2021). Effectiveness of Nanosilver Biosynthesis using Inulin Gembili Tuber (*Discorea esculenta* L.) on Variation of Inulin Solution Towards Particle Sizes and Antibacterial Activities. *Journal of Physics*, 1912(01), 1-7.
- Eze, C. O., Nworu, C. S., Esimone, C. O., & Okore, V. C. (2014). Immunomodulatory activities of methanol extract of the whole aerial part of *Phyllanthus niruri* L. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 6(4), 41-46. <https://doi.org/10.5897/JPP2013.0305>.
- Fajrih, N., Khoirudin, M. and Fanani, A. F. (2020) 'Pertumbuhan dan Status Kesehatan Broiler yang Diberi Umbi Gembili sebagai Prebiotik Inulin', *Jurnal Peternakan Indonesia (Indonesian Journal of Animal Science)*, 22(2), p. 141. doi: <https://doi.org/10.25077/jpi.22.2.141-149.2020>.
- Fatimah, S., Arisandi, D., & Saputri, M. S. (2018). Total Cholesterol Level of Hypercholesterolemia Male Wistar Rats (*Rattus norvegicus*) with Ethanol Extracts of Purple Sweet Potato Leaf (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). *Journal of Health (JoH)*, 05(01), 33-39.
- Farizal, J., Marlina, L., Muslim, Z., Kesehatan, J. A., Bengkulu, P. K., Indragiri, J., & Harapan, P. (2020). Testing effect of immunomodulator ethanol extract of mengkudu in mencit BALB/C infected plasmodium berghei. *Jurnal Teknologi Dan Seni Kesehatan*, 11(2), 246-255.
- Fidrianny, I., Kanapa, I., & Singgih, M. (2021). Phytochemistry and pharmacology of moringa tree: An overview. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 11(3), 10776-10789. <https://doi.org/10.33263/BRIAC113.1077610789>
- Ganeshpurkar, A., & Saluja, A. (2019). In silico interaction of hesperidin with some immunomodulatory targets: A

- docking analysis. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 56, 28–33.
- Ganeshpurkar, A., & Saluja, A. (2020a). Immunomodulatory effect of rutin , catechin , and hesperidin on macrophage function. 57(February), 58–63.
- Ganeshpurkar, A., & Saluja, A. (2020b). Protective Effect of Hesperidin on Humoral and Cell-mediated Immunity in Rat Model. *Pharmacognosy Communications*, 10(2), 83–88. <https://doi.org/10.5530/pc.2020.2.16>
- Gholivand, M. B., Piryaei, M., & Abolghasemi, M. M. (2013). Analysis of volatile oil composition of Citrus aurantium L. by microwave-assisted extraction coupled to headspace solid-phase microextraction with nanoporous based fibers. *Journal of Separation Science*, 36(5), 872–877. <https://doi.org/10.1002/jssc.201200674>
- Gualdani, R., Cavalluzzi, M. M., Lentini, G., & Habtemariam, S. (2016). The chemistry and pharmacology of citrus limonoids. In *Molecules* (Vol. 21, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/molecules21111530>
- Gupta, P. (2020). A Review on Echinacea Purpurea L. Purple Coneflower Bioactive Compounds used as Belligerent. *International Journal of Trend in Scientific Research and Development (IJTSRD)*, 4(5), 52–55. www.ijtsrd.com/papers/ijtsrd31716.pdf <https://www.ijtsrd.com/biological-science/biotechnology/31716/a-review-on-echinacea-purpurea-l-purple-coneflower-bioactive-compounds-used-as-belligerent/dr-priyanka-gupta>
- Harun, N. H., Ahmad, W. A. N. W., & Suppian, R. (2021). Immunostimulatory effects of asiatic acid and madecassoside on the phagocytosis activities of macrophages cell line (J774A.1). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 11(11), 104–111. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2021.1101114>
- Harun, N. H., Septama, A. W., & Jantan, I. (2015). Immunomodulatory effects of selected Malaysian plants on the CD18/11a expression and phagocytosis activities of

- leukocytes. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(1), 48–53. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(15\)30170-2](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(15)30170-2)
- Harun, N. H., Septama, A. W., Wan Ahmad, W. A. N., & Suppian, R. (2019). The potential of centella asiatica (Linn.) urban as an anti-microbial and immunomodulator agent: A review. *Natural Product Sciences*, 25(2), 92–102. <https://doi.org/10.20307/nps.2019.25.2.92>.
- Harso, A. (2017). Nanopartikel dan Dampaknya Bagi Kesehatan Manusia Universitas. *Jurnal Ilmiah Dinamika Sains*, 01(01), 20–26.
- Haryani, Y., Kartika, G. F., Yuharmen, Y., Putri, E. M., Alchalish, D. T. & Melanie, Y. (2016). Pemanfaatan Ekstrak Air Rimpang Jahe Merah (*Zingiber officinale* Linn. var. rubrum) pada Biosintesis Sederhana Nanosilver. *Chimica et Natura Acta*, 04(03), 151-155.
- Hefni, M., Rifa'i, M., & Widodo. (2013). Aktivitas ekstrak daun kelor terhadap respons imun humoral pada mencit yang diinfeksi salmonella typhi. *Jurnal Veteriner*, 14(4), 519–526.
- Hewlings, S. J., & Kalman, D. S. (2017). Curcumin: A review of its effects on human health. *Foods*, 6(10), 1–11. <https://doi.org/10.3390/foods6100092>
- Hossain, S. M., Urbi, Z., Sule, A., & Hafizur Rahman, K. M. (2014). *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Wall. ex Nees: A Review of Ethnobotany, Phytochemistry, and Pharmacology. *The Scientific World Journal*, 2014, 1–28.
- Hossain, S., Urbi, Z., Karuniawati, H., Mohiuddin, R. B., Qrimida, A. M., Allzrag, A. M. M., Ming, L. C., Pagano, E., & Capasso, R. (2021). *Andrographis paniculata* (Burm. f.) wall. ex nees: An updated review of phytochemistry, antimicrobial pharmacology, and clinical safety and efficacy. *Life*, 11(4), 1–39. <https://doi.org/10.3390/life11040348>
- Huang, S., & Beevers. (2011). Pharmacological and clinical properties of curcumin. *Botanics: Targets and Therapy*, 1, 5–18. <https://doi.org/10.2147/btat.s17244>.
- IDAI (2015) *Jenis vaksin dan imunisasi*. Jakarta. Available at: <https://mediaimunisasi.com>.

- Jabri Karoui, I., & Marzouk, B. (2013). Characterization of bioactive compounds in Tunisian bitter orange (*Citrus aurantium* L.) peel and juice and determination of their antioxidant activities. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/345415>
- Jacques, A. S., Arnaud, S. S. S., Fréjus, O. O. H., & Jacques, D. T. (2019). Review on biological and immunomodulatory properties of *Moringa oleifera* in animal and human nutrition. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 11(3), 74–79. <https://doi.org/10.5897/jpp2019.0555>
- Jain, S., Arora, P., & Popli, H. (2020). A comprehensive review on *Citrus aurantifolia* essential oil: its phytochemistry and pharmacological aspects. *Brazilian Journal of Natural Sciences*, 3(2), 354. <https://doi.org/10.31415/bjns.v3i2.101>
- Jantan, I., Haque, M. A., Ilangkovan, M., & Arshad, L. (2019). An Insight Into the Modulatory Effects and Mechanisms of Action of *Phyllanthus* Species and Their Bioactive Metabolites on the Immune System. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00878>
- Jiang, M., Sheng, F., Zhang, Z., Ma, X., Gao, T., Fu, C., & Li, P. (2021). *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees and its major constituent andrographolide as potential antiviral agents. *Journal of Ethnopharmacology*, 272(November 2020), 113954. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.113954>
- Karaçil Ermumucu, M. Ş., & Şanlıer, N. (2017). BLACK CUMIN (*Nigella sativa*) AND ITS ACTIVE COMPONENT OF THYMOQUINONE: EFFECTS ON HEALTH. *Journal of Food and Health Science*, 3(4), 170–183. <https://doi.org/10.3153/jfhs17020>
- Kaskoos, R. A. (2019). Essential Oil Analysis by GC-MS and Analgesic Activity of *Lippia citriodora* and *Citrus limon*. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 22(1), 273–281. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2019.1603123>
- Kausar, T., Anwar, S., Hanan, E., Yaseen, M., Aboelnaga, S. M. H., & Azad, Z. R. A. A. (2021). Therapeutic Role of Ginger (*Zingiber officinale*) - A Review. *Journal of Pharmaceutical*

- Research International*, 33, 9-16.
<https://doi.org/10.9734/jpri/2021/v33i29b31584>
- Kaushal, S., & Kaur, K. (2019). Phytochemistry and pharmacological aspects of *Syzygium aromaticum*: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(1), 398-406.
<https://www.researchgate.net/publication/330215481>
- Khairullah, A. R., Solikhah, T. I., Ansori, A. N. M., Hanisia, R. H., Puspitarani, G. A., Fadholly, A., & Ramandinianto, S. C. (2021). Medicinal importance of *kaempferia galanga* L. (zingiberaceae): A comprehensive review. *Journal of HerbMed Pharmacology*, 10(3), 281-288.
<https://doi.org/10.34172/jhp.2021.32>
- Khan, N. T. (2021). *Nigella Sativa* (Kalonji), Its Essential Oils and Their Therapeutic Potential. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 33(1), 25448-25454.
<https://doi.org/10.26717/bjstr.2021.33.005335>
- Khettal, B., Kadri, N., Tighilet, K., Adjebli, A., Dahmoune, F., & Maiza-Benabdeslam, F. (2017). Phenolic compounds from Citrus leaves: Antioxidant activity and enzymatic browning inhibition. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 14(1). <https://doi.org/10.1515/jcim-2016-0030>
- Kim, A. J., Kim, Y. O., Shim, J. S., & Hwang, J. K. (2007). Immunostimulating activity of crude polysaccharide extract isolated from *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71(6), 1428-1438.
<https://doi.org/10.1271/bbb.60241>
- Klimek-Szczykutowicz, M., Szopa, A., & Ekiert, H. (2020). Citrus limon (Lemon) Phenomenon – A Review of the Chemistry, Pharmacological Properties, Applications in the Modern Pharmaceutical, Food, and Cosmetics Industries, and Biotechnological Studies. *Plants*, 9.
<https://doi.org/10.3390/plants9010119>
- Ledesma-Escobar, C. A., Priego-Capote, F., & Luque De Castro, M. D. (2015). Characterization of lemon (*Citrus limon*) polar extract by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in high resolution mode. *Journal of Mass Spectrometry*, 50(11),

- 1196–1205. <https://doi.org/10.1002/jms.3637>
- Liu, L., Lan, Y., Xiang, G., Chen, X., Yang, K., Xue, Y., Xie, Q., Kui, H., Li, X., & Tian, H. (2013). Curcumin ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis by blocking STAT3 signaling pathway. *International Immunopharmacology*, 17(2), 314–320. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2013.06.020>
- Liu, Y., Yan, J., Han, X., & Hu, W. (2015). Garlic-derived compound S-allylmercaptocysteine (SAMC) is active against anaplastic thyroid cancer cell line 8305C (HPACC). *Technology and Health Care*, 23(S1), S89–S93. <https://doi.org/10.3233/thc-150936>
- Lohani, M. (2010). Immunomodulatory properties of Noni (*Morinda citrifolia*) [Clemson University]. In *ProQuest Dissertations and Theses*. <http://search.proquest.com.ezp-prod1.hul.harvard.edu/docview/305196216?accountid=11311>
- Luhurningtyas, F. P., Susilo, J., Yuswantina, R., Widhihastuti, E., & Ardiyansah, F. W. (2021). The Immunomodulatory Activity and Phenolic Content of Red Ginger Rhizome Extract (*Zingiber officinale* Rosc. Var. *Rubrum*). *Indonesian Journal of Pharmacy and Natural Product*, 4(1), 51–59.
- Mahantesh, P. S., Hiremath, J. S., Lokesh, C. H., Ravi, Y., Sameer Hussain, M. D., & Pooja, M. R. (2018). Noni a Wonder Plant (Therapeutic Properties): A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(2), 2722–2728. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.702.331>
- Maksoud, S., Abdel-Massih, R. M., Rajha, H. N., Louka, N., Chemat, F., Barba, F. J., & Debs, E. (2021). Citrus aurantium l. Active constituents, biological effects and extraction methods. an updated review. *Molecules*, 26(19), 1–18. <https://doi.org/10.3390/molecules26195832>
- Manayi, A., Vazirian, M., & Saeidnia, S. (2015). Echinacea purpurea: Pharmacology, phytochemistry and analysis methods. *Pharmacognosy Reviews*, 9(17), 63–72. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.156353>
- Mao, Q. Q., Xu, X. Y., Cao, S. Y., Gan, R. Y., Corke, H., Beta, T., & Li, H. Bin. (2019). Bioactive compounds and bioactivities of

- ginger (*zingiber officinale roscoe*). *Foods*, 8(6), 1–21.
<https://doi.org/10.3390/foods8060185>
- Marlinda, L. (2015). EFFECTIVITY OF BLACK CUMIN SEEDS EXTRACT TO INCREASE PHAGOCYTOSIS. *Journal of Majority*, 4, 58–64.
- Martínez, G., Mijares, M. R., & Sanctis, J. B. De. (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>
- Mary, H. P. A., Susheela, G. K., Jayasree, S., Nizzy, A. M., Rajagopal, B., & Jeeva, S. (2012). Phytochemical characterization and antimicrobial activity of *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(2 SUPPL.).
[https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60288-3](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60288-3).
- Matondang, C. S. and Siregar, S. . (2008) *Aspek Imunologi Imunisasi, Pedoman Imunisasi di Indonesia*. Jakarta: Satgas Imunisasi Ikatan Dokter Anak Indonesia.
- Mekeng, E. L. (2016). *UJI AKTIVITAS IMUNOSTIMULAN EKSTRAK ETANOL 70% DAUN KELOR (Moringa oleifera Lamk) TERHADAP TITER ANTIBODI MENCIT JANTAN GALUR BALB/C*. STIKes Ngudi Waluyo.
- Menkes. 2017, *Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 12 Tahun 2017 Tentang Penyelenggaraan Imunisasi*, Menkes, Jakarta.
- Mensink, M. A. *et al.* (2015) 'Inulin, a flexible oligosaccharide I: Review of its physicochemical characteristics', *In Carbohydrate Polymers*, 130, pp. 405–419. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.05.026>.
- Miksusanti, M. (2012). Lymphocyte Proliferation by Temu Lawak (*Curcuma xanthorrhiza* ROXB) Essential Oil. *4th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Technology*, 29, 205–209.
- Miles, E. A., & Calder, P. C. (2021). *Effects of Citrus Fruit Juices and Their Bioactive Components on Inflammation and Immunity : A Narrative Review*. 12(June), 1–18.

- <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.712608>
- Mohammed, A. A., & Al-Suwaiegh, S. B. (2016). Effects of *Nigella sativa* on mammals' health and production. *Adv. Anim. Vet. Sci*, 4(12), 630–636. http://nexusacademicpublishers.com/uploads/files/AAVS_4_12_630-636.pdf
- Mucci, A., Parenti, F., Righi, V., & Schenetti, L. (2013). Citron and lemon under the lens of HR-MAS NMR spectroscopy. *Food Chemistry*, 141(3), 3167–3176. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.151>
- Mufidah, Z., Rifa'i, M., & Rahayu, S. (2013). Aktivitas Imunomodulator Ekstrak Buah Mengkudu pada Mencit yang Diinfeksi *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Veteriner*, 14(4), 501–510.
- Murata, K., Abe, Y., Futamura-Masuda, M., Uwaya, A., Isami, F., & Matsuda, H. (2014). Activation of cell-mediated immunity by *Morinda citrifolia* fruit extract and its constituents. *Natural Product Communications*, 9(4), 445–450. <https://doi.org/10.1177/1934578x1400900401>
- Murningsih, T. (2010). PENGARUH EKSTRAK AIR DAN ETANOL *Kaempferia* spp. TERHADAPAKTIVITAS DAN KAPASITAS FAGOSITOSIS SELMAKROFAG YANG DIINDUKSI BAKTERI *Staphylococcus epidermidis*. *Berita Biologi: Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati*, 10, 235–239.
- Murray, M. T., & Pizzorno, J. E. J. (2012). *Textbook of natural medicine* (P. J. E. J. E. & M. T (eds.); 4th ed.).
- Nayak, S., & Mengi, S. (2010). Immunostimulant activity of noni (*Morinda citrifolia*) on T and B lymphocytes. *Pharmaceutical Biology*, 48(7), 724–731. <https://doi.org/10.3109/13880200903264434>
- Nelson, K. M., Dahlin, J. L., Bisson, J., Graham, J., Pauli, G. F., & Walters, M. A. (2017). The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(5), 1620–1637. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00975>
- Nfambi, J., Bbosa, G. S., Sembajwe, L. F., Gakunga, J., & Kasolo, J. N. (2015). Immunomodulatory activity of methanolic leaf extract

- of *Moringa oleifera* in Wistar albino rats. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 26(6), 603–611. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2014-0104>
- Ningsih, S., & Wibowo, A. E. (2011). Immune-Enhancing Effect of Ethanol Extract of Pegagan Herb (*Centella Asiatica Urban*) on Rat. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 9(2), 122–125. <http://jifi.farmasi.univpancasila.ac.id/index.php/jifi/article/view/299>
- Nisar, M. F., He, J., Ahmed, A., Yang, Y., Li, M., & Chunpeng, W. (2018). Chemical Components and Biological Activities of the Genus *Phyllanthus*: A Review of the Recent Literature. *Molecules*, 23. <https://doi.org/10.3390/molecules23102567>
- Obiazi, H. A. K., Okwu, G. I., & Akpe, A. R. (2015). Effect of *Moringa Oleifera* Leaf Extract on Immunoglobulins of Albino Wistar Rats. *International Journal of Science and Research*, 6(5), 2319–7064. <https://doi.org/10.21275/ART20173574>
- Pal, M. (2017). Lemon: A Versatile Fruit of Multiple Uses. *Agriculture World, July*.
- Pandey, G., & Rao, C. (2018). Andrographolide: its pharmacology, natural bioavailability and current approaches to increase its content in *andrographispaniculata*. *International Journal of Complementary & Alternative Medicine*, 11(4), 355–360. <https://doi.org/10.15406/ijcam.2018.11.00425>
- Periyanayagam, K., Dhanalakshmi, S., Karthikeyan, V., & Jagadeesan, M. (2013). Phytochemical studies and GC / MS analysis on the isolated essential oil from the leaves of *Citrus Aurantium Linn*. *J. Nat. Prod. Plant Resour*, 3(6), 19–23.
- Pham, N. K., Nguyen, H. T., & Nguyen, Q. B. (2021). A review on the ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacology of plant species belonging to *Kaempferia L.* genus (*Zingiberaceae*). *Pharmaceutical Sciences Asia*, 48(1), 1–24. <https://doi.org/10.29090/PSA.2021.01.19.070>
- Prakash, V., Jaiswal, N., & Srivastava, M. (2017). A review on medicinal properties of *Centella asiatica*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 10(10), 69–74. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10i10.20760>

- Prasetiowati, A. L., Prasetya, A. T. & Wardani, S. (2018). Sintesis Nanosilver dengan Bioreduktor Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.ra) Uji Aktivitasnya sebagai Antibakteri. *Indonesian Journal of Chemical Science*, 07(02), 160-166.
- Preetha, T. S., Krishnan, P. N., Thankappan, C., Preetha, S., Suvarna Preetha, T., & Sudarsanan Hemanthakumar, A. (2016). A comprehensive review of *Kaempferia galanga* L. (Zingiberaceae): A high sought medicinal plant in Tropical Asia. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 4(3), 270-276.
- Priyadarsini, K. I. (2009). Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 10(2), 81-95. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2009.05.001>
- Putri, D. U., Rintiswati, N., Soesatyo, M. H., & Haryana, S. M. (2017). Immune modulation properties of herbal plant leaves: *Phyllanthus niruri* aqueous extract on immune cells of tuberculosis patient - in vitro study. *Natural Product Research*. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1311888>.
- Radji, M. (2009). Vaksin DNA: Vaksin Generasi Keempat. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 06(01), 18-37.
- Rachmawati, I., & Rifa'i, M. (2014). In Vitro Immunomodulatory Activity of Aqueous Extract of *Moringa oleifera* Lam. Leaf to the CD4 +, CD8+ and B220+ Cells in *Mus musculus*. *The Journal of Experimental Life Sciences*, 4(1), 15-20. <https://doi.org/10.21776/ub.jels.2014.004.01.03>
- Radjabian, T., Yektaei, Z. H., Ghazanfari, T., Nasiri, Z., & Fotovvat, M. (2018). The Immunoregulatory Effects of Four. *Immunoregulation*, 1(3), 143-152.
- Rahmat, E., Lee, J., & Kang, Y. (2021). Javanese Turmeric (*Curcumaxanthorrhiza* Roxb.): Ethnobotany, Phytochemistry, Biotechnology, and Pharmacological Activities. *Hindawi Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 15. <https://doi.org/10.1155/2021/9960813>

- Rajanna, M., Bharathi, B., Shivakumar, B. R., Deepak, M., Prashanth, D. S., Prabakaran, D., Vijayabhaskar, T., & Arun, B. (2021). Immunomodulatory effects of *Andrographis paniculata* extract in healthy adults – An open-label study. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 12(3), 529–534. <https://doi.org/10.1016/j.jaim.2021.06.004>.
- Ranuh I.G.N (2008) *Imunisasi upaya pencegahan primer: Pedoman Imunisasi di Indonesia*. Jakarta: Satgas Imunisasi Ikatan Dokter Anak Indonesia.
- Rathore, S., Mukim, M., Sharma, P., Devi, S., Chandra Nagar, J., & Khalid, M. (2020). Curcumin: A Review for Health Benefits. *International Journal of Research and Review (Ijrrjournal.Com)*, 7(1), 1.
- Richards, D. M., & Robert G., E. (2016). How cells engulf: a review of theoretical approaches to phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci*, 113(22), 6113–6118.
- Roitt, I., Brostoff, J., & Male, D. 2001, *Immunology, 10th ed.*, Gower Medical Publ., London.
- Ruiz-Iglesias, P., Estruel-Amades, S., Camps-Bossacoma, M., Massot-Cladera, M., Franch, À., Pérez-Cano, F. J., & Castell, and M. (2020). Influence of Hesperidin on Systemic Immunity of Rats Following an Intensive Training and Exhausting Exercise. *Nutrients*, 12.
- Sandner, G., Heckmann, M., & Weghuber, J. (2020). Immunomodulatory activities of selected essential oils. *Biomolecules*, 10(8), 1–16. <https://doi.org/10.3390/biom10081139>.
- Sari, D. R. *et al.* (2019) ‘Suplementasi Inulin Umbi Gembili dengan *Lactobacillus plantarum* (Sinbiotik) terhadap Nisbah Daging-Tulang Ayam Broiler’, *Jurnal Peternakan Indonesia (Indonesian Journal of Animal Science)*, 21(3), p. 284. doi: <https://doi.org/10.25077/jpi.21.3.284-293.2019>.
- Serang, Y., & Indrasari, F. (2019). Uji Aktivitas Imunomodulator Ekstrak Buah Petai (*Parkia speciosa* H.) terhadap Titer Immunoglobulin (IgG) pada Mencit Balb/c yang Diinduksi dengan SDMD. *Jurnal Poltek Tegal*, 08(01), 76-81.

- Shantilal, S., Vaghela, J. S., & Sisodia, S. S. (2018). Review on Immunomodulation And Immunomodulatory Activity of Some Medicinal Plant. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 5(8), 163–174.
- Sharifi-Rad, M., Mnyer, D., Morais-Braga, M. F. B., Carneiro, J. N. P., Bezerra, C. F., Coutinho, H. D. M., Salehi, B., Martorell, M., del Mar Contreras, M., Soltani-Nejad, A., Uribe, Y. A. H., Yousaf, Z., Iriti, M., & Sharifi-Rad, J. (2018). Echinacea plants as antioxidant and antibacterial agents: From traditional medicine to biotechnological applications. *Phytotherapy Research*, 32(9), 1653–1663. <https://doi.org/10.1002/ptr.6101>
- Shen, C. Y., Yang, L., Jiang, J. G., Zheng, C. Y., & Zhu, W. (2017). Immune enhancement effects and extraction optimization of polysaccharides from *Citrus aurantium* L. var. *amara* Engl. *Food and Function*, 8(2), 796–807. <https://doi.org/10.1039/c6fo01545j>
- Singh, R. (2012). *Morinda citrifolia* L. (Noni): A review of the scientific validation for its nutritional and therapeutic properties. *Journal of Diabetes and Endocrinology*, 3(6), 77–91. <https://doi.org/10.5897/jde10.006>
- Singh, Radha, & Singh, K. (2019). Zingiber Officinale: a Spice With Multiple Roles. *Research Journal of Life Sciences, Bioinformatics, Pharmaceutical and Chemical*, 5(2), 113. <https://doi.org/10.26479/2019.0502.09>
- Sobolewska, D., Podolak, I., & Makowska-Wąs, J. (2015). *Allium ursinum*: botanical, phytochemical and pharmacological overview. *Phytochemistry Reviews*, 14(1), 81–97. <https://doi.org/10.1007/s11101-013-9334-0>.
- Solomon, S. D., Bahadory, M., Jeyarajasingam, A. V., Rutkowsky, S. A., & Boritz, C. (2007). Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. *Journal of Chemical Education*, 84(02), 322–325.
- Srinivasan, K. (2018). Cumin (*Cuminum cyminum*) and black cumin (*Nigella sativa*) seeds: Traditional uses, chemical constituents, and nutraceutical effects. *Food Quality and Safety*, 2(1), 1–16. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyx031>

- Srivastava, R. M., Singh, S., Dubey, S. K., Misra, K., & Khar, A. (2011). Immunomodulatory and therapeutic activity of curcumin. *International Immunopharmacology*, 11(3), 331–341. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.08.014>
- Sugiartanti, D. D., & Wiedosari, E. (2021). Immunomodulation Effect of Kaempferia galanga Ethanolic Extract On In Vitro Lymphocyte Cell Proliferation. *Buletin Penelitian Tanaman Rempah Dan Obat*, 32(1), 31. <https://doi.org/10.21082/bullitro.v32n1.2021.31-39>
- Sun, B., Wu, L., Wu, Y., Zhang, C., Qin, L., Hayashi, M., Kudo, M., Gao, M., & Liu, T. (2020). Therapeutic Potential of Centella asiatica and Its Triterpenes: A Review. *Frontiers in Pharmacology*, 11(September), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.568032>
- Suntar, I., Khan, H., Patel, S., Celano, R., & Rastrelli, L. (2018). An overview on Citrus aurantium L.: Its functions as food ingredient and therapeutic agent. *Oxid. Med. Cell. Longev*, 2018.
- Supu, R. D., Diantini, A., & Levita, J. (2019). RED GINGER (Zingiber officinale var. rubrum): ITS CHEMICAL CONSTITUENTS, PHARMACOLOGICAL ACTIVITIES AND SAFETY. *FITOFARMAKA: Jurnal Ilmiah Farmasi*, 8(1), 23–29. <https://doi.org/10.33751/jf.v8i1.1168>
- Suryawanshi, J. A. S. (2011). An overview of Citrus aurantium used in treatment of various diseases. *African Journal of Plant Science*, 5(7), 390–395.
- Taner, J. (2021). EFEK EKSTRAK ETANOL RIMPANG TEMULAWAK (CURCUMA XANTHORRHIZA ROXB) TERHADAP JUMLAH SEL T CD4 DAN SEL T CD8 PADA HISTOPATOLOGI LIMPA TIKUS. Universitas Sumatera Utara.
- Thakur, S., Kaurav, H., & Chaudhary, G. (2021). Nigella sativa (Kalonji): A Black Seed of Miracle. *International Journal of Research and Review*, 8(4), 342–357. <https://doi.org/10.52403/ijrr.20210441>
- Thapa, K., Poudel, M., & Adhikari, P. (2019). Moringa oleifera: A

- Review Article on Nutritional Properties and its Prospect in the Context of Nepal. *Acta Scientific Agriculture*, 3(11), 47–54. <https://doi.org/10.31080/asag.2019.03.0683>
- Tiwari, D. K., Jin, T. J., & Behari. (2011). Dose-Dependent In-Vivo Toxicity Assessment of Silver Nanoparticle in Wistar Rats, *Toxicol. Mech. Methods*, 21(01), 13–24.
- Tjandrawinata, R. R., Susanto, L. W., & Nofiarny, D. (2017). The use of *Phyllanthus niruri* L . as an immunomodulator for the treatment of infectious diseases in clinical settings *Asian Pacific Journal of Tropical Disease. Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 7(3), 132–140. <https://doi.org/10.12980/apjtd.7.2017D6-287>
- Tounsi, M. S., Wannas, W. A., Ouerghemmi, I., Jegham, S., Njima, Y. Ben, Hamdaoui, G., Zemni, H., & Marzouk, B. (2011). Juice components and antioxidant capacity of four Tunisian Citrus varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(1), 142–151. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4164>
- Urdzikova, L. M., Karova, K., Ruzicka, J., Kloudova, A., Shannon, C., Dubisova, J., Murali, R., Kubinova, S., Sykova, E., Jhanwar-uniyal, M., & Jendelova, P. (2015). The Anti-Inflammatory Compound Curcumin Enhances Locomotor and Sensory Recovery after Spinal Cord Injury in Rats by Immunomodulation. *Int. J. Mol. Sci.*, 17, 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms17010049>.
- Wael, S., Mahulette, F., Watuguly, W. T., & Wahyudi, D. (2019). Pengaruh Ekstrak Daun Cengkeh (*Syzygium aromaticum*) terhadap Makrofag Pengaruh Ekstrak Daun Cengkeh (*Syzygium aromaticum*) terhadap Limfosit dan Makrofag Mencit Balb / c Effect of Leaf *Syzygium aromaticum* on Lymphocytes and Macrophages Mice Balb / c. *Traditional Medicine Journal*, 23(2).
- Wahab, S. and Julia, M. (2002) *Sistem imun, imunisasi, dan penyakit imun*. Jakarta: Widya Medika.
- Wahyuni, W., Yusuf, M. I., Malik, F., Lubis, A. F., Indalifiany, A., & Sahidin, I. (2019). Efek Imunomodulator Ekstrak Etanol Spons *Melophlus sarasinorum* Terhadap Aktivitas

- Fagositosis Sel Makrofag Pada Mencit Jantan Balb/C. *Jurnal Farmasi Galenika (Galenika Journal of Pharmacy) (e-Journal)*, 5(2), 147-157.
<https://doi.org/10.22487/j24428744.2019.v5.i2.13611>.
- Wahyuningrum, M. R., & Probosari, E. (2011). Pengaruh Pemberian Buah Pepaya (*Carica papaya* L.) terhadap Kadar Trigliserida pada Tikus Sprague Dawley dengan Hiperkolesterolemia. *Journal of Nutrition College*, 01(01), 192-198.
- Wang, D., Feng, Y., Liu, J., Yan, J., Wang, M., & Changlong, J. S. (2010). Black Garlic (*Allium sativum*) Extracts Enhance the Immune System. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 4(1), 37-40.
- Wang, M. jie, Raza, S. H. A., Wu, Q., Xue, C. hua, Liu, J. hua, Zhang, L. fei, Zhang, W. ying, Wang, A. chao, & Wu, H. (2020). Cichoric acid from extracted *Echinacea purpurea* induces the proliferation and apoptosis of peripheral blood mononuclear cells from yaks. *Electronic Journal of Biotechnology*, 47, 17-28.
<https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2020.06.003>
- West, B. J., Deng, S., Isami, F., Uwaya, A., & Jensen, C. J. (2018). The potential health benefits of noni juice: A review of human intervention studies. *Foods*, 7(4), 1-22.
<https://doi.org/10.3390/foods7040058>.
- WHO (2022) *Dasar-dasar keamanan vaksin*. Geneva.
- Winarti, S. *et al.* (2013) 'Pengaruh Foaming Pada Pengeringan Inulin Umbi Gembili (*Dioscorea Esculenta*) Terhadap Karakteristik Fisiko-Kimia Dan Aktivitas Prebiotik Effect Of Foaming In Drying Of Lesser Yam Inulin (*Dioscorea Esculenta*) On The Physicochemical Characteristics And Prebi', *In Agritech*, 33(4).
- Yadav, V., Yadav, P., Sahu, S., Yadav, M., & Narayan Gupta, S. (2021). A Review Literature On Ginger. *International Journal of Creative Research Thoughts*, 9(1), 2320-2882. www.ijcrt.org.
- Yoga Prabowo, A., Estiasih, T. and Purwantiningrum, I. (2014) 'UMBI GEMBILI (*Dioscorea esculenta* L.) SEBAGAI BAHAN PANGAN MENGANDUNG SENYAWA BIOAKTIF : KAJIAN PUSTAKA Gembili (*Dioscorea esculenta* L.) as Food Contain Bioactive Compounds: A Review', *Jurnal Pangan dan*

Agroindustri, 2(3), pp. 129-135.

Yuniastuti, A. and Iswari, R. S. (2019) 'Isolation and Identification of Inulin and Fos from *Dioscorea Esculenta*', *KnE Social Sciences*.
doi: <https://doi.org/10.18502/kss.v3i18.4696>.