

***Etlingera rubroloba* A.D. Poulsen Rhizome: Potential Immunostimulator against Phagocytosis and CD8 Cells**

Muhammad Ilyas Y^{1,2*}, Reymon Reymon¹, Adriatman Rasak¹, Bonni Rubak¹, Asniar Pascayantri², Fadhliyah Malik², Asriullah Jabbar², Wahyuni Wahyuni², La Ode Roni Setiawan², Halik Halik², and Idin Sahidin²

¹Politeknik Bina Husada Kendari, Kendari, Sulawesi Tenggara, Indonesia

²Departemen Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Halu Oleo, Kendari, Sulawesi Tenggara, Indonesia

Abstract

Etlingera rubroloba A.D. Poulsen, a medicinal plant from Southeast Sulawesi traditionally used to maintain physical vitality, has been scientifically reported to enhance innate immune function through the expression of macrophage surface receptor CD14. Nevertheless, its effects on macrophage phagocytic activity and cytotoxic T lymphocyte (CD8⁺) levels have not been elucidated. This study aimed to assess the immunostimulatory potential of *E. rubroloba* rhizome ethanol extract on macrophage phagocytosis and CD8⁺ levels in *Rattus norvegicus* (Wistar strain). Twenty-four male rats were allocated into six groups: normal control, negative control, positive control, and three treatment groups receiving the extract orally at doses of 200, 300, and 400 mg/kg body weight (BW) for seven consecutive days. On the eighth day, the animals were intraperitoneally infected with *Staphylococcus aureus*. Phagocytic activity was observed microscopically, and CD8⁺ levels were determined by ELISA. The 300 mg/kg BW dose produced the highest macrophage phagocytic activity (77.25%) and CD8⁺ concentration (650.71 ng/mL), both significantly different from the negative control ($p < 0.05$). These findings suggest that *E. rubroloba* rhizome has potential as a natural immunostimulatory agent.

Keywords: CD8⁺ cells, *Etlingera rubroloba* rhizome, immunomodulator, immune system, macrophage phagocytosis

Article History:

Submitted 17 January 2024

Revised 09 October 2025

Accepted 03 November 2025

Published 28 February 2026

*Corresponding author:

ilyasyusufmuhammad.apt@gmail.com

Citation:

Yusuf MI, Reymon R, Rasak A, Rubak B, Pascayantri A, et al. *Etlingera rubroloba* A.D. Poulsen Rhizome: Potential Immunostimulator against Phagocytosis and CD8 Cells Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology. 2026; 13 (1), 9-16.

Rimpang *Etlingera rubroloba* A.D. Poulsen sebagai Kandidat Immunostimulator terhadap Fagositosis Makrofag dan Sel CD8

Abstrak

Etlingera rubroloba A.D. Poulsen merupakan tumbuhan yang digunakan secara tradisional oleh masyarakat Sulawesi Tenggara untuk menjaga kebugaran tubuh dan telah terbukti secara ilmiah mampu meningkatkan sistem imun bawaan melalui peningkatan ekspresi reseptor sel makrofag (CD14). Namun, pengaruhnya terhadap aktivitas fagositosis makrofag dan kadar sel limfosit T sitotoksik (CD8⁺) belum pernah dilaporkan. Penelitian ini bermaksud mengevaluasi ekstrak etanol rimpang *E. rubroloba* terhadap efek peningkatan fagositosis makrofag dan kadar CD8⁺ pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar. Sebanyak 24 ekor tikus dibagi enam kelompok, yaitu kontrol normal, kontrol negatif, kontrol positif, serta kelompok ekstrak dosis 200, 300, dan 400 mg/kg BB. Ekstrak diberikan secara oral selama tujuh hari, kemudian pada hari kedelapan hewan uji diinfeksi *Staphylococcus aureus* secara intraperitoneal. Aktivitas fagositosis diamati secara mikroskopik, sedangkan kadar CD8⁺ diukur menggunakan metode ELISA. Dosis 300 mg/kg BB menghasilkan peningkatan aktivitas fagositosis tertinggi sebesar 77,25% dan kadar CD8⁺ tertinggi sebesar 650,71 ng/mL, dengan perbedaan bermakna dibandingkan kontrol negatif ($p < 0,05$). Temuan ini mengindikasikan bahwa rimpang *E. rubroloba* berpotensi dikembangkan sebagai kandidat imunostimulator alami.

Kata Kunci: fagositosis makrofag, imunomodulator, rimpang *Etlingera rubroloba*, Sel CD8⁺, sistem imun

1. Pendahuluan

Sistem imun berperan penting terhadap perlindungan tubuh dari berbagai serangan patogen infeksi seperti virus dan bakteri yang ditandai dengan munculnya respon kekebalan tubuh melalui fagositosis dan inflamasi.^{1,2} Dalam beberapa dekade terakhir, dunia dikagetkan dengan pandemi penyakit Covid-19 yang disebabkan virus SARS-CoV-2 telah menjadi ancaman global bagi kesehatan masyarakat khususnya di Indonesia dengan tingkat mortalitas sangat tinggi, sehingga salah satu upaya menekan angka kejadian mortalitas penyakit tersebut dengan mencegah infeksi melalui peningkatan sistem imun tubuh.³

Kerja sistem imun yang optimal sangat penting untuk mengendalikan dan menghilangkan infeksi yang diperankan pertama kali oleh sistem imun non spesifik melalui fagositosis dan dapat ditingkatkan melalui bantuan sistem imun adaptif dengan cara memproduksi berbagai sitokin aktivator sel makrofag, sel natural killer, aktivasi sel limfosit T *helper* (CD4⁺) dan limfosit T sitotoksik (CD8⁺), sangat penting untuk mengendalikan replikasi, membatasi penyebaran virus, peradangan dan membersihkan sel yang terinfeksi.^{4,5}

Mekanisme fagositosis yang diperankan oleh sel makrofag sebagai pertahanan terdepan mengatasi patogen, bertanggung jawab dalam eradikasi dan presentasi antigen ke sel sistem imun adaptif melalui ikatan antara antigen peptida dengan molekul *major histocompatibility complex* kelas (MHC) I atau II ke reseptor sel T. MHC-I selanjutnya terikat pada koreseptor CD4⁺ mengaktifkan sel T-*helper* dan MHC-II dengan koreseptor CD8⁺ mengaktifkan sel limfosit T sitotoksik.^{6,7}

CD8⁺ yang aktif mensekresi sitokin interferon gama (IFN- γ) mengaktifkan makrofag naif lebih banyak, yang berdampak langsung peningkatan aktivitas fagositosis sel makrofag.⁸ CD8⁺ menghancurkan mikroorganisme melalui proses sitotoksiknya.⁹ Berbagai agen sintetik yang sudah digunakan sebagai agen imunostimulan seperti levamisol, thalidomide, namun alasan efek samping sering dikaitkan dari penggunaan agen-agen tersebut seperti nefrotoksitas, hepatotoksitas, gangguan sumsum tulang, gangguan saluran cerna menjadi masalah tersendiri sehingga perlu alternatif agen imunostimulator dari bahan alam. Ketersediaan agen imunomodulator yang masih relatif sedikit jumlahnya diperlukan pengembangan agen imunomodulator potensial bersumber dari tumbuhan cukup menjanjikan bagi peneliti bahan alam, salah satunya adalah tumbuhan endemik Sulawesi tenggara yaitu *Etlingera rubroloba* A.D Poulsen.¹⁰

Kandungan flavonoid dari tumbuhan dilaporkan mampu mengaktifkan sel natural killer (NK) mensekresi sitokin interferon gama (IFN- γ). Interferon gama tersebut sebagai sitokin utama pengaktivasi makrofag yang penting dalam respons imun seluler nonspesifik. Aktivasi makrofag oleh IFN- γ berlangsung cepat dan efisien, sehingga meningkatkan kemampuan fagositosis untuk menghancurkan antigen.^{11,12,13} *Specific macrophage activating factor* (SMAF) merupakan kumpulan berbagai molekul, termasuk interferon gama, yang berfungsi mengaktivasi makrofag. Aktivasi ini meningkatkan aktivitas fagositosis, sehingga makrofag mampu membunuh bakteri dengan lebih cepat. Flavonoid bekerja dengan mengaktivasi sel natural killer yang kemudian dan mengeluarkan IFN- γ . Interferon gama berperan dalam meningkatkan kemampuan fagositosis makrofag.^{14,15,16}

Penelitian sebelumnya tentang uji skrining fitokimia buah *E. rubroloba* memiliki kandungan senyawa tanin, terpenoid, saponin, dan flavonoid total sebesar 32,61 mgEQ/g dan diduga bersifat imunomodulator melalui peningkatan ekspresi CD4⁺ dan perkembangan limfokin yang dikeluarkan sel T limfosit serta sekresi sitokin IFN- γ memacu respon fagositosis oleh sel-sel imunokompeten, sehingga tanaman *E. rubroloba* berpotensi dikembangkan sebagai agen imunomodulator.^{7,17,18} Aktivitas farmakologi yang pernah dilaporkan dari buah *E. rubroloba* antara lain sebagai imunomodulator dan antioksidan,^{4,16,15} imunostimulator dengan meningkatkan kadar IFN- γ , CD14, dan CD8⁺,^{7,19,20} ekstrak dan isolat buah *E. rubroloba* meningkatkan ekspresi TLR-2, MHC-II dan kadar IL-12,^{15,5} batang *E. rubroloba* memiliki aktivitas anti inflamasi dan antioksidan,^{21,22} dan rimpang terbukti meningkatkan kadar CD14 lebih tinggi dibandingkan bagian buah dan batang,⁵ sehingga CD14 sebagai indikator jumlah sel makrofag sebagai sel fagosit, diharapkan akan meningkatkan aktivitas fagositosisnya terhadap antigen.

Berdasarkan informasi ilmiah pada latar belakang tersebut, namun kajian ilmiah dari rimpang *E. rubroloba* sebagai imunostimulator terhadap peningkatan aktivitas fagositosis sel makrofag dan ekspresi sel *Cluster of Differentiation*-8 (CD8⁺) belum diketahui, sehingga perlu penelitian lebih lanjut dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak rimpang *Etlingera rubroloba* A.D. Poulsen terhadap peningkatan aktivitas fagositosis sel makrofag dan ekspresi sel CD8⁺ pada tikus Wistar sebagai kandidat imunostimulator potensial.

2. Bahan dan Metode

2.1. Alat

Alat-alat yang digunakan adalah *rotary vacuum evaporator* (Buchi®), mikroskop elektrik (Olympus®), autoklaf (Daihan Lab Tech®), Oven (Inaco®), labu Erlenmeyer (Pyrex®), timbangan analitik (Precisa®), spektrofotometer 20-D (Thermo SPECTronic®), kuvet, gelas ukur (Pyrex®), gelas kimia (Pyrex®), inkubator (Mettler®), botol vial, *water bath* (Stuart®), *laminar air flow* (LAF) (E-Scientific®), sentrifugasi (Boeco®).

2.2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah rimpang *Etlingera rubroloba* A.D. Poulsen, tikus putih strain Wistar jantan umur 2 bulan, bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923®, etanol 96%, alkohol 70%, Mc Farlan, kertas saring, Na-CMC 0,5% (Food Grade®), spuit (One Med®), NaCl fisiologis, phosphate buffered saline (PBS), nutrient agar (Merck®), set kit rat CD8+ Elisa (Aviva Systems Biology®), dan ekstrak meniran komersil (Dexamedica®).

2.3. Prosedur

2.3.1. Penyiapan dan Pengolahan Sampel

Rimpang *Etlingera rubroloba* seberat 5 kg diperoleh di Kabupaten Konawe Selatan, Kecamatan Laeya, Desa Punggaluku. Identifikasi botani dilakukan di Laboratorium Pendidikan Biologi, Universitas Halu Oleo. Rimpang dibersihkan, kemudian dikeringkan di bawah sinar matahari dengan penutup kain hitam agar pengeringan merata. Bahan kering dihaluskan hingga menjadi serbuk simplisia, kemudian ditimbang untuk memperoleh bobot akhir.^{23,24}

2.3.2. Penyiapan Ekstrak Etanol Rimpang *Etlingera rubroloba*

Sebanyak 2,8 kg serbuk rimpang diekstraksi metode maserasi dengan etanol 96% sebagai pelarut selama 3 × 24 jam.²⁵ Filtrat disaring dan pelarut diganti setiap 24 jam. Seluruh filtrat dikumpulkan, kemudian diuapkan pada alat *rotary vacuum evaporator* suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental, selanjutnya ditimbang untuk menghitung rendemen.^{26,27,28}

2.3.3. Skrining Fitokimia

Uji Golongan Flavonoid

Uji golongan flavonoid dilakukan dengan mencampurkan 1 mL ekstrak dengan 3 mL etanol 70%, kemudian dikocok, dipanaskan, dan disaring. Filtrat yang dihasilkan ditambahkan serbuk magnesium serta tiga tetes HCl pekat. Munculnya warna merah bata menunjukkan adanya kandungan senyawa flavonoid dalam ekstrak tersebut.^{16,28,29}

Uji Golongan Alkaloid

Uji golongan alkaloid ditetapkan dengan mencampurkan 1 mL ekstrak dengan dua tetes pereaksi Dragendorff. Terbentuknya endapan berwarna coklat sampai jingga menunjukkan hasil positif yang menandakan adanya kandungan alkaloid pada sampel.^{5,15}

Pemeriksaan Kandungan Senyawa Saponin Melalui Uji Kualitatif

Pemeriksaan kandungan senyawa saponin melalui uji kualitatif dilakukan dengan mencampurkan 1 mL ekstrak ke dalam 10 mL air suling, kemudian dipanaskan menggunakan penangas air. Setelah dikocok dan dibiarkan selama 15 menit, terbentuknya busa yang stabil menjadi indikator adanya senyawa saponin dalam ekstrak.^{16,30}

Uji Terhadap Senyawa Tanin

Uji terhadap senyawa tanin dilakukan dengan memanaskan 1 mL ekstrak hingga mendidih selama beberapa menit. Setelah itu, ke dalam larutan ditambahkan beberapa tetes pereaksi FeCl₃ 1%. Terbentuknya warna coklat kehijauan atau ungu kehitaman menunjukkan adanya kandungan senyawa tanin dalam ekstrak.^{4,16}

Analisis Kualitatif Senyawa Terpenoid Menggunakan Metode Liebermann-Burchard

Analisis kualitatif senyawa terpenoid menggunakan metode Liebermann-Burchard dilakukan dengan mencampurkan 1 mL ekstrak dengan 2 mL kloroform dan 3 mL H₂SO₄ pekat. Terbentuknya warna merah kecoklatan menunjukkan adanya senyawa golongan terpenoid dalam ekstrak.^{5,31}

2.3.4. Uji Imunostimulator Ekstrak Etanol Rimpang *Etlingera rubroloba*

Pembuatan Sediaan Ekstrak Uji

Ekstrak disuspensikan dalam larutan Na-CMC 0,5%. Jumlah suspensi yang diberikan disesuaikan dengan berat badan masing-masing hewan uji dan diberikan secara peroral.^{5,11}

Pembuatan Sediaan Pembanding

Sediaan pembanding berupa sediaan komersil ekstrak meniran® disuspensikan dalam Na-CMC 0,5% sebesar 0,135 mg/kg berat badan (BB).^{5,16}

Penyiapan Patogen Uji

Isolat *Staphylococcus aureus* diperoleh dari stok kultur dan dikembangkan pada media nutrient agar miring yang baru, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C.^{11,31,15} Koloni yang tumbuh disuspensikan dalam larutan NaCl 0,9%, dan tingkat kekeruhan suspensi disesuaikan dengan standar McFarland 0,5.^{4,9}

Perlakuan Pada Hewan Uji

Penelitian ini menggunakan 24 ekor tikus putih jantan sehat strain Wistar yang dibagi secara acak ke dalam enam kelompok perlakuan. Persetujuan etik penelitian diperoleh dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan LPPM Universitas Halu Oleo (Nomor: 176a/UN.29.20.1.2/PG/2023). Perlakuan diberikan secara oral sekali setiap hari hingga tujuh hari sesuai protokol penelitian berikut^{4,15} :

Kelompok normal : tidak diberikan perlakuan
Kelompok negatif : suspensi Na. CMC 0,5%
Kelompok positif : sediaan komersil ekstrak meniran® dosis 0,135 mg/kg BB
K1 : ekstrak *E. rubroloba* dosis 200 mg/kg BB
K2 : ekstrak *E. rubroloba* dosis 300 mg/kg BB
K3 : ekstrak *E. rubroloba* dosis 400 mg/kg BB

Uji Fagositosis Sel Makrofag

Seluruh hewan uji diinfeksi secara intraperitoneal dengan 0,5 mL suspensi *S. aureus* pada hari kedelapan dan dibiarkan selama satu jam sebelum dilakukan euthanasia menggunakan ketamin HCl. Pembedahan perut dilakukan secara aseptik untuk mengambil cairan peritoneal. Jika jumlah cairan tidak mencukupi, ditambahkan 1 mL larutan PBS steril pH 7,8, kemudian digoyangkan perlahan dan diambil menggunakan spuit 1 mL. Cairan yang diperoleh dibuat menjadi apusan tipis di atas kaca objek, difiksasi metanol 5 menit, diwarnai Giemsa 10% selama 20 menit, dibilas dengan air mengalir, dikeringkan, dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran (400–1000x).^{4,12,32}

Aktivitas fagositosis dihitung sebagai persentase makrofag yang melakukan fagositosis dari total 100 makrofag yang diamati (SPA).^{15,16,18}

$$\text{Aktivitas Fagositosis} = \frac{\text{Jumlah Sel Makrofag Aktif}}{\text{Jumlah Sel Makrofag Total}} \times 100 \%$$

Tabel 1. Hasil Skiring Fitokimia Ekstrak Etanol Rimpang *E. rubroloba*

Uji Senyawa	Pereaksi	Hasil Positif	Kesimpulan
Flavonoid	Mg + HCl	Warna merah bata	Positif
Alkaloid	Dragendorff	Warna merah kecoklatan.	Positif
Tanin	FeCl ₃	Warna hijau	Positif
Terpenoid	Liebermann Buchard	Warna coklat kemerahan	Positif
Saponin	Air + HCl 2 N	Busa stabil selama 5 menit	Positif

Pengukuran Kadar CD8⁺ dengan Elisa

Sebanyak 50 µL standar dan 40 µL sampel ditempatkan ke dalam sumuran sesuai kelompok, lalu ditambahkan antibodi anti-CD8⁺ dan Streptavidin-HRP masing-masing sebanyak 10 µL. Setelah dihomogenkan, plate diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam, kemudian dicuci lima kali menggunakan wash buffer sebanyak 0,35 mL per pencucian. Setiap sumuran diberi substrat A dan B (masing-masing 50 µL) dan diinkubasi 10 menit dalam ruang gelap pada suhu 37°C. Reaksi dihentikan dengan penambahan 50 µL stop solution, dan perubahan warna dari biru ke kuning dibaca nilai absorbansinya pada panjang gelombang 450 nm dengan pembaca ELISA dalam waktu 10 menit. Kadar CD8⁺ dihitung berdasarkan kurva standar menggunakan persamaan regresi linier yaitu : $y = 0,0042x + 0,4503$; $R^2 = 0,992$.^{9,33}

2.3.5. Analisis Data

Data dianalisis menggunakan perangkat lunak SPSS. Data nilai SPA dan kadar CD8⁺ dianalisis menggunakan uji ANOVA satu arah dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Perbedaan antar kelompok diuji lebih lanjut dengan uji Tukey pada tingkat signifikansi $p < 0,05$.^{5,21}

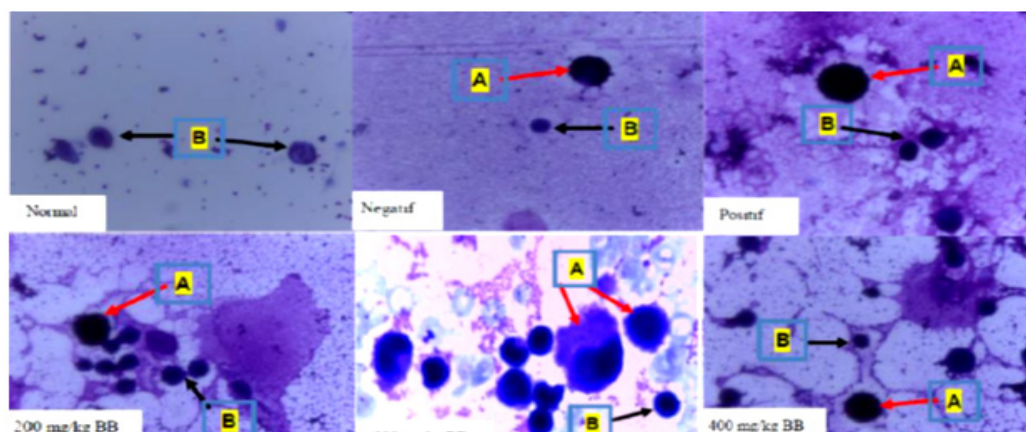
3. Hasil

3.1. Skrining Fitokimia

Pengambilan sampel dimulai dengan rimpang segar sebanyak 5 kg yang kemudian diolah menjadi 2,8 kg serbuk simplisia. Ekstraksi serbuk menghasilkan 80,6 gram ekstrak kental dengan rendemen 4,01%. Skrining fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi golongan metabolit sekunder pada sampel menggunakan pereaksi spesifik. Hasil analisis menunjukkan adanya flavonoid, alkaloid, tanin, terpenoid, dan saponin, seperti ditunjukkan tabel 1.

3.2. Aktivitas Fagositosis Makrofag

Pengujian aktivitas fagositosis makrofag dilakukan menggunakan metode mikroskopik dengan pewarnaan Giemsa 10% untuk membedakan makrofag aktif dan tidak aktif dalam memfagositosis bakteri. Makrofag aktif diidentifikasi berdasarkan perbedaan warna



Panah merah menandakan makrofag aktif, sedangkan panah hitam menunjukkan makrofag yang tidak aktif.

Gambar 1. Apusan tipis cairan intraperitoneal tikus setelah perlakuan, perbesaran 1000×

sitoplasma dan ukuran sel yang diamati pada mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 – 1000×. Hasil pengamatan aktivitas fagositosis makrofag disajikan pada gambar 1 dan tabel 2.

Berdasarkan tabel 2, dosis ekstrak *E. rubroloba* sebesar 300 mg/kg BB menghasilkan aktivitas fagositosis tertinggi, yaitu 81,5%, diikuti dosis 200 mg/kg BB sebesar 77,25%, dan dosis 400 mg/kg BB sebesar 74,5%. Aktivitas pada dosis 300 mg/kg BB tidak menunjukkan perbedaan signifikan dibandingkan kontrol positif (ekstrak meniran komersial®) berdasarkan uji Tukey ($p > 0,05$). Temuan ini menunjukkan bahwa ekstrak rimpang *E. rubroloba* dosis 300 mg/kg BB mampu meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag secara optimal.

3.3. Kadar CD8⁺ pada Tikus Strain Wistar setelah Perlakuan

Kadar CD8⁺ dianalisis dengan metode ELISA menggunakan plasma darah hewan uji. Akurasi hasil pengukuran dipengaruhi oleh beberapa faktor, termasuk teknik preparasi, konsentrasi antigen, dan metode preparasi antigen yang digunakan.^{5,14,33}

Hasil pengukuran kadar CD8⁺ setelah perlakuan, sebagaimana pada gambar 2, menunjukkan bahwa kelompok yang diberi ekstrak *E. rubroloba* dosis 300 mg/kg BB memiliki kadar CD8⁺ tertinggi. Namun pada dosis 400 mg/kg BB mengalami penurunan kadar, sementara kadar terendah tercatat pada kelompok kontrol negatif.

Hasil ini mengindikasikan bahwa dosis 300 mg/kg BB merupakan dosis yang paling efektif dalam meningkatkan CD8⁺. Efek imunostimulator ini didukung oleh analisis statistik lanjutan *Tukey* yang menunjukkan berbeda nyata antara kelompok dosis 300 mg/kg BB dan kontrol negatif ($p < 0,05$).

4. Pembahasan

Ekstrak etanol rimpang *E. rubroloba* yang diperoleh terlebih dahulu dilakukan pengujian fitokimia untuk mengidentifikasi kandungan metabolit sekunder yang ada dalam sampel rimpang yang berpotensi sebagai imunostimulator. Informasi ilmiah kandungan metabolit sekunder dari sampel ini belum pernah dilaporkan. Hasil uji skrining fitokimia yang diperoleh menunjukkan ekstrak rimpang *E. rubroloba* mengandung flavonoid.

Tabel 2. Hasil Aktivitas Fagositosis Sel Makrofag

Kelompok/Perlakuan	Aktivitas Fagositosis Makrofag (%) / Ulangan				Rerata Aktivitas Fagositosis (%) ± SD
	1	2	3	4	
Normal	0	0	0	0	0
Kontrol negatif (Na. CMC 0,5%)	49	45	40	46	45,0 ± 5,0
Kontrol positif (meniran komersial®)	70	79	80	77	76,5 ± 4,7a
Dosis 200 mg/kg BB	74	76	79	80	77,25 ± 4,8a,c
Dosis 300 mg/kg BB	79	80	86	81	81,5 ± 4,0a,b
Dosis 400 mg/kg BB	70	74	78	76	74,5 ± 4,5a,c

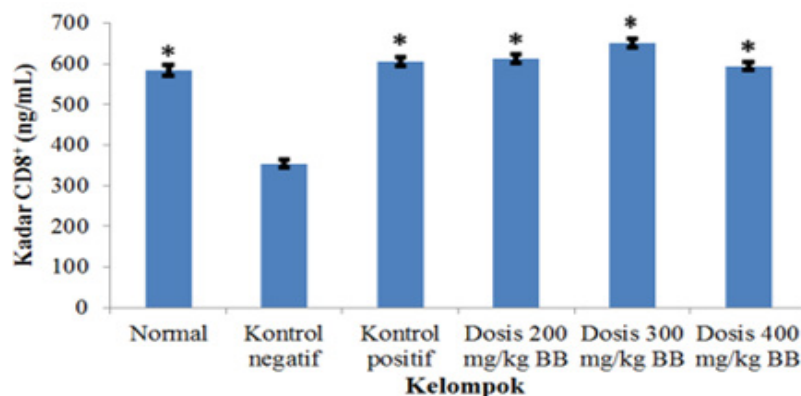
Keterangan :

Uji statistik post hoc Tukey ;

a : berbeda nyata terhadap kontrol negatif ($p < 0,05$)

b : berbeda nyata terhadap kontrol positif ($p < 0,05$)

c : tidak berbeda nyata terhadap kontrol positif ($p > 0,05$)



Gambar 2. Grafik Rata-Rata Kadar CD8⁺ Setiap Kelompok Perlakuan (*p<0,05 = uji post hoc Tukey berbeda nyata terhadap kelompok kontrol negatif)

Flavonoid ditunjukkan dengan adanya warna merah pada bagian atas larutan setelah penambahan amil alkohol, hal ini disebabkan tereduksinya senyawa flavonoid oleh asam klorida dan magnesium. Senyawa flavonoid memiliki aktifitas farmakologi yang pernah dilaporkan sebagai antioksidan, imunomodulator/immunostimulator, antidiabetes, antibakteri dan antijamur.^{16,34}

Uji alkaloid pada ekstrak rimpang *E. rubroloba* dengan menggunakan reagen Dragendorff menunjukkan adanya pembentukan endapan merah kecoklatan/jingga. Pembentukan tersebut disebabkan oleh keberadaan elektron bebas pada atom nitrogen alkaloid yang mampu menukar ion iodo dalam pereaksi Dragendorff, yang terdiri dari kalium iodida dan bismuth subnitrat.^{5,33} Senyawa tanin dalam ekstrak *E. rubroloba* ditunjukkan dengan adanya perubahan warna larutan menjadi hijau. Perubahan warna ini disebabkan oleh terbentuknya reaksi gugus hidroksil pada tanin dengan larutan FeCl₃.^{29,35,36}

Keberadaan saponin pada ekstrak *E. rubroloba* terindikasi melalui terbentuknya busa setinggi ±1 cm yang tetap stabil meskipun telah ditambahkan HCl. Stabilitas busa ini disebabkan oleh sifat amfifilik saponin, yang memiliki gugus polar glikosil dan gugus nonpolar steroid/terpenoid. Ketika dikocok, molekul saponin membentuk misel, di mana gugus polar menghadap keluar dan gugus nonpolar menghadap ke dalam, sehingga menghasilkan busa yang tampak stabil.^{35–37} Pengujian terpenoid dengan pereaksi Libermann Buchard menunjukkan hasil positif dengan terbentuknya larutan berwarna coklat kemerahan. Hal ini didasari oleh kemampuan senyawa terpenoid membentuk warna oleh H₂SO₄ dalam pelarut asam asetat anhidrid dengan gugus pada atom C-4 pada terpenoid.^{16,35}

Pengujian aktivitas imunomodulator terhadap sampel ekstrak etanol rimpang *E. rubroloba* dilakukan dengan mengukur aktivitas fagositosis makrofag

secara mikroskopik dan kadar CD8⁺ (*Cluster of Differentiation-8*) sebagai marker dari limfosit T-sitotoksik menggunakan metode ELISA. Pemilihan dilakukannya pengujian aktivitas fagositosis dan CD8⁺ karena pentingnya kedua parameter tersebut dalam pertahanan sistem imun tubuh. Sel sitotoksik (CD8⁺) berperan penting dalam proses penghancuran mikroorganisme, sedangkan makrofag merupakan lini pertama dalam pertahanan tubuh dalam melawan mikroorganisme. Kedua parameter ini juga memiliki keterkaitan yaitu CD8⁺ dapat mengaktifkan IFN-γ yang merupakan sitokin utama dalam meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag.^{4,19}

Pemberian ekstrak rimpang *E. rubroloba* pada dosis 200, 300, dan 400 mg/kg BB menunjukkan peningkatan aktivitas fagositosis makrofag yang berbeda nyata dibandingkan kontrol negatif (p<0,05), mengindikasikan adanya potensi imunostimulasi melalui aktivasi sistem imun non-spesifik. Menariknya, dosis 200 dan 400 mg/kg BB memiliki efektivitas yang sebanding dengan kontrol positif berupa sediaan komersial ekstrak meniran, sedangkan dosis 300 mg/kg BB menghasilkan respons fagositosis tertinggi dan berbeda signifikan dibandingkan kontrol positif. Fenomena tingginya respon pada dosis menengah ini sejalan dengan penelitian sebelumnya oleh Y *et al.*, (2022) dan Malik *et al.*, (2022), yang melaporkan bahwa pada dosis 300 mg/kg BB ekstrak buah *E. rubroloba* mampu meningkatkan fagositosis makrofag melalui induksi sekresi IL-12, sementara dosis lebih tinggi cenderung menurunkan aktivitas. Mekanisme penurunan ini diduga terkait dengan efek feedback imun yang menghambat aktivasi makrofag pada paparan senyawa bioaktif berlebih.^{20,18} Konsistensi hasil juga terlihat pada studi Jabbar *et al.* (2023), yang menunjukkan bahwa ekstrak batang *E. rubroloba* dosis 300 mg/kg BB memiliki aktivitas antioksidan kuat dan efek antiinflamasi melalui penekanan produksi sitokin proinflamasi IL-1β dan TNF-α, sedangkan dosis 400–500 mg/kg BB justru menurunkan aktivitas tersebut.²¹ Temuan serupa dilaporkan Wahyuni *et al.* (2017), yang

menunjukkan dosis 300 mg/kg BB secara *in vivo* efektif meningkatkan fagositosis makrofag, tetapi efektivitas menurun pada dosis yang lebih tinggi.²⁷

Adanya kecenderungan penurunan aktivitas farmakologi pada dosis 400 mg/kg BB disebabkan adanya peran kadungan metabolit sekunder dalam sampel rimpang *E. rubroloba* seperti flavonoid, alkaloid, tanin, terpenoid dan saponin yang diduga memiliki efek toksik terhadap hewan coba, yang berdampak pada kemampuan efek farmakologi dalam meningkatkan aktivitas fagositosis sel makrofag, namun perlu dibuktikan secara ilmiah dugaan tersebut.^{9,16}

Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa flavonoid berperan dalam stimulasi sistem imun dengan meningkatkan sekresi sitokin, seperti IL-1 dan IL-6, yang berfungsi memperkuat kemampuan fagositosis makrofag.^{5,14} Sementara itu, alkaloid memiliki aktivitas imunomodulator yang dapat meniru kerja IFN- γ , membantu mempertahankan respons imun tubuh, serta meningkatkan baik respon imun nonspesifik melalui aktivasi leukosit maupun respon imun spesifik dengan mengaktifkan makrofag untuk menelan agen infeksius yang masuk ke dalam tubuh.^{7,16} Tanin dapat berperan sebagai imunostimulator dengan mengoptimalkan fungsi sistem imun, melalui modulasi langsung sel makrofag sehingga aktivitas fagositosis sel makrofag meningkat, sedangkan senyawa terpenoid mempunyai mekanisme fagositosis bakteri melalui peningkatan sekresi beberapa sitokin aktivator sel makrofag seperti IL-12 dan IFN- γ .^{5,7}

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ketiga kelompok dosis ekstrak rimpang *E. rubroloba* meningkatkan kadar CD8⁺ yang berbeda nyata ($p < 0,05$) dibandingkan kontrol normal dan negatif. Peningkatan ini mengindikasikan potensi imunostimulator ekstrak dalam mengoptimalkan respon limfosit T sitotoksik saat menghadapi infeksi bakteri. Dibandingkan kontrol positif berupa ekstrak meniran komersial, tidak beda nyata ($p > 0,05$), menunjukkan bahwa efektivitas ketiga dosis tersebut sebanding dengan kontrol positif. Efek peningkatan kadar CD8⁺ diduga dipengaruhi oleh kandungan metabolit sekunder, termasuk flavonoid, alkaloid, tanin, terpenoid, dan saponin, yang secara sinergis berkontribusi terhadap modulasi respon imun, meskipun mekanisme pastinya memerlukan pembuktian lebih lanjut melalui studi molekuler.^{4,5,9,16}

5. Simpulan

Penelitian ini membuktikan bahwa ekstrak etanol rimpang *Etlingera rubroloba* A.D. Poulsen yang diberikan pada tikus jantan strain Wistar yang diinfeksi patogen dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag dan kadar CD8⁺. Hasil tersebut menunjukkan

bahwa *E. rubroloba* berpotensi sebagai agen imunostimulator alami yang dapat dikembangkan untuk pencegahan dan penanganan imunodefisiensi akibat penyakit infeksi

Konflik Kepentingan

Penulis menyatakan bahwa data yang dipublikasikan pada naskah ini tidak ada konflik kepentingan terhadap pihak manapun.

Daftar Pustaka

1. Sheshe S, Nazifi A, Labbo AM, Khalid GM, Yahya A, Muhammad U, et al. Mechanism of Antiviral Immune Response and COVID-19 Infection. *Asian J Immunol.* 2020;3(1):91-8.
2. Ilyas YM, Sukweenadhi J, Kustiawan PM, Firdayanti, Nuswantoro A, Wibowo A, et al. *Imunologi Dasar*. Edisi kesatu. Jakarta: CV Eureka Media Aksara; 2023.
3. Tibar FNA, Kurniati I, Rahmawati S, Tjiptaningrum A. Respon imun terhadap infeksi SARS-CoV-2. *J Kedokt Syiah Kuala.* 2023;23(1):197-201.
4. Y MI, Diantini A, Ghazali M, Sahidin I, Fristiody A. Immunomodulatory Potency *Etlingera rubroloba* A.D Poulsen Fruit Ethanol extract against Macrophage Phagocytic Activity and CD4 Levels in Wistar Male Rats *Res J Pharm Technol.* 2022;15(9):4067-72.
5. Ilyas MY, Sahidin I, Jabbar A, Yodha AWM, Diantini A, Pradipta SI, et al. Effect of Immunomodulating Extract and Some Isolates from *Etlingera rubroloba* A.D. Poulsen Fruits on Diabetic Patients with Tuberculosis. *Molecules.* 2023;28(5):1-15.
6. Rosales C, Uribe-querol E. Phagocytosis : A Fundamental Process in Immunity. *Hindawi BioMed Res Int.* 2017;2017:18.
7. Y MI, Malik F, Jabbar A. Peningkatan Sitokin Interferon Gama Tikus Wistar Setelah Diberikan Ekstrak Etanol Buah *Etlingera rubroloba* A.D. Poulsen Sebagai Imunostimulator. Increased Interferon-Gamma Cytokines In Wistar Rats Treated With *Etlingera rubroloba* A . D . Poulsen Fruits. *Med Sains.* 2023;8(2):559-66.
8. Araújo-souza PS De, Hanschke SCH, Viola JPB. Epigenetic Control of Interferon-Gamma Expression in CD8 T Cells. *J Immunol Res.* 2015;2015.
9. Ilyas MY, Diantini A, Ghazali M, Nurfinti WO. Aktivitas Imunostimulator Ekstrak Etanol Buah *Etlingera rubroloba* A.D. Poulsen Terhadap Kadar CD8 Model In Vivo: Immunostimulatory Activity of *Etlingera rubroloba* A.D. Poulsen Fruit Ethanol Extract Against CD8 Levels In Vivo Model. *Med Sains J Ilm Kefarmasian.* 2021;6(2):123-132.
10. Mannasaheb BA, Joshi H. Immunomodulatory Medicinal Plants Of India: A Review. *Int J Pharmacol Toxicol.* 2017;4(2):109-15.
11. Ilyas MY, Firdayanti, Wahyuni. Peningkatan Imunitas Non Spesifik (Innate Immunity) Mencit Balb/C Yang Diberi Ekstrak Etanol Daun Tumbuhan Galing (*Cayratia trifolia* L. Domin). *Med Sains J Ilm Kefarmasian.* 2019;3(2):83–92.
12. Wahyuni W, Yusuf MI, Malik F, Lubis AF, Indalifany A, Sahidin I. Efek Imunomodulator Ekstrak Etanol Spons

- Melophlus sarasinorum Terhadap Aktivitas Fagositosis Sel Makrofag Pada Mencit Jantan Balb/C. J Farm Galen 2019;5(2):147-57.
13. Ilyas MY, Jabbar A, Bafadal M, Malaka MH, Firdayanti F, Sahidin I. Aktivitas Imunomodulator Ekstrak Etanol pons *Callyspongia* sp. Terhadap Fagositosis Makrofag pada Mencit Jantan Balb/C. J Ilm Ibnu Sina. 2020;5(1):44-55.
14. Fristiohady A, Wahyuni W, Malik F, Yusuf MI, Salma WO, Hamsidi R, et al. Level of Cytokine Interleukin-6 and Interleukin 1- β on Infectious Rat Model Treated with *Etlingera elatior* (Jack) R.M. Smith Fruit Extract as Immunomodulator. Borneo J Pharm. 2020;3(2):52-7.
15. Ilyas YM, Diantini A, Halimah E, Amalia R, Ghozali M, Juliaha E, et al. Potential Immunomodulator Fraction Fruit Of *Etlingera rubroloba* A.D Poulsen Against Macrophage Phagocytosis And Interleukin-12 Levels In BCG-Stimulated Balb/C Mice. Int J Pharm Res. 2021;13(1):3262-9.
16. Ilyas YM, Diantini A, Halimah E, Amalia R, Ghozali M, Juliaha E, et al. Phytochemical Analysis and Immunomodulatory Potential on Diabetic-Infected Tuberculosis by Fruit *Etlingera rubroloba* A.D. Poulsen. Pakistan J Biol Sci. 2022;25(7):669-75.
17. Fristiohady A, Wahyuni W, Malaka MH, Madu D, Muthalib D, Munasari D, et al. Ethanolic Extract of *Xestospongia* Sp. Induces CD4+ and CD14 Cells Levels on Wistar Male Rat Infected with *Staphylococcus aureus*. Pharmacol Clin Pharm Res. 2020;5(2):56-61.
18. Malik F, Bafadal M, Munasari D, Andriani R, Yusuf MI, Sahidin, et al. Aktivitas Imunomodulator Ekstrak. Etanol. Buah *Etlingera rubroloba* A.D. Poulsen. Terhadap Fagositosis Sel Makrofag Pada Tikus Jantan Galur Wistar. J Mandala Pharmacon Indones. 2022;8(1):96-112.
19. Y MI, Diantini A, Ghazali M, Sahidin I, Nurfinti WO. Aktivitas Imunostimulator Ekstrak Etanol Buah *Etlingera rubroloba* A.D. Poulsen Terhadap Kadar CD8 Model In Vivo Immunostimulatory Activity Of *Etlingera rubroloba* A.D. Poulsen Fruit Ethanol Extract Against CD8 Levels In Vivo Model. Med Sains J Ilm Kefarmasian. 2021;6(2):123-32.
20. Y MI, Malaka MH, Fristiohady A, Jabbar A. Potensi Imunomodulator Ekstrak Etanol Buah *Etlingera rubroloba* A.D Poulsen dengan Parameter CD14 Pada Tikus Jantan Galur Wistar. Pharm Sci Res. 2022;8(2):25-31.
21. Jabbar A, Sahidin I, Monstavevi SA, Malaka MH, Malik F, Ilyas YM. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity of Ethanol Extract Stem of *Etlingera rubroloba* A.D. Poulsen. Pakistan J Biol Sci. 2022;25(10):885-91.
22. Jabbar A, Sahidin I, Malik F, Ilyas MY, Rusli N, Apriyanto, et al. Evaluation of xanthine oxidase inhibitory activity of sinapyl alcohol diacetate and stigmastrol compounds and phytochemical screening stem of *Etlingera*. Food Res. 2023;7(8):101-5.
23. Yusuf MI, Wahyuni, Susanty S, Ruslan, Fawwaz M. Antioxidant and antidiabetic potential of galing stem extract (*Cayratia trifolia* Domin). Pharmacogn J. 2018;10(4).
24. Y MI, Saehu MS, Ertin, Irma, Nurhikma. Efek Antiinflamasi Fraksi Dari Ekstrak Etanol Batang Galing (*Cayratia trifolia* L. Domin) secara In Vitro. J Farm Sains dan Prakt. 2021;7(3):80-8.
25. Harborne, J.B. Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan Terbitan ke-2, Cetakan ke-4, Bandung: ITB Press; 1996.
26. Jabbar A, Wahyuni, Leorita M, Yusuf MI, Salsabila H, Sahidin I. Aktivitas Antihiperurisemia Ekstrak Etanol Batang Galing (*Cayratia trifolia* Domin) pada Mencit Balb/CP. Pharmauho J Farm Sains, dan Kesehat 2. 2022;8(2):17-20.
27. Wahyuni W, Malaka MH, Fristiohady A, Yusuf MI, Sahidin. Potensi Imunomodulator Ekstrak Etanol Buah *Kecombrang* (*Etlingera elatior* (Jack) R.M.Smith) Terhadap Aktivitas Fagositosis Makrofag Mencit Jantan Galur BALB/c. Pharmacon. 2017;6(3):350-5.
28. Y MI, Montana C, Malik F, Susanty S. Penurunan Kadar Trigliserida Tikus Putih Wistar Jantan (*Rattus norvegicus*) Hiperlipidemik Yang Diberi Ekstrak Terpurifikasi Batang Galing (*Cayratia trifolia* L.Domin). Med Sains. 2020;4(2):79-86.
29. Fristiohady A, Wahyuni, Sadarun B, Bafadal M, Andriani R, Malik F, et al. Pharmacological activity of compounds isolated from methanolic extract marine sponge *xestospongia* sp. Against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. J Phys Conf Ser. 2021;1899(1).
30. Fristiohady A, Leorita M, Malik F, Thamrin ASW, Ilyas MY, Purnama LOMJ, et al. Pancreatic Histological Profile on the Efficacy of Extract of *Etlingera calophrys* (K. Schum) A.D. Poulsen Stem against Streptozotocin-Induced Diabetes in Diabetic Model Rats. Biointerface Res Appl Chem. 2020;11:9209-17.
31. Imran, Wahyuni, Fristiohady A, Leorita M, Malaka MH, Ilyas MY, et al. Radical Scavenger and Anti-diabetic Potencies of *Etlingera elatior* Fruits growing in South East Sulawesi-Indonesia. Res J Pharm Technol. 2022;15(May):52711.
32. Y. MI, Diantini A, Ghazali M, Sahidin I. Aktivitas Imunostimulator Ekstrak Etanol Buah *Etlingera rubroloba* A.D. Poulsen Terhadap Kadar CD8 Model In Vivo (Immunostimulatory Activity Of *Etlingera rubroloba* A. D. Poulsen Fruit Ethanol Extract Against CD8 Levels In Vivo Model. Med Sains. 2021;6(2):123-32.
33. Mahgoub EO. The development and application of an indirect ELISA test for the detection of antibodies to bovine respiratory syncytial virus in blood serum. Vet Med (Praha). 2014;4:316-31.
34. Parbuntari H, Prestica Y, Gunawan R, Nurman MN, Adella F. Preliminary Phytochemical Screening (Qualitative Analysis) of Cacao Leaves (*Theobroma cacao* L.). EKSAKTA. 2018;19(2):40-5.
35. Ramadhani MA, Hati AK, Lukitasari NF, Jusman AH. Skrining Fitokimia Dan Penetapan Kadar Flavonoid Total Serta Fenolik Total Ekstrak Daun Insulin (*Tithonia diversifolia*) Dengan Maserasi Menggunakan Pelarut Etanol 96 %. Indones J Pharm Nat Prod. 2020;3(1).
36. Pandey A, Tripathi S. Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. J Pharmacogn Phytochem. 2014;2(5):115-9.
37. Ratnawati H, G YH, Purba LH. Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lam.) terhadap Aktivitas Fagositosis Makrofag. JKM. 2007;7:1-14.