

## Hasil Penelitian

### **Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Alga Cokelat (*Sargassum Sp.*) terhadap Hitung Jenis Leukosit Mencit (*Mus Musculus*) Pasca Diinduksi Stres Akut**

#### *The Effect of Ethanol Extract of Brown Algae (*Sargassum Sp.*) on the Calculation of Leukocyte Type of Mice (*Mus Musculus*) After Acute Stress Induction*

**Reski Toding Allo Lebang<sup>1</sup>, Vina Z. Latuconsina<sup>2</sup>, Halidah Rahawarin<sup>3</sup>, Ingrid Hutagalung<sup>4</sup>, Parningotan Y. Silalahi<sup>5</sup>, Samuel Maruanaya<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Pattimura

<sup>2</sup>Dosen Fakultas Kedokteran Universitas Pattimura

Corresponding author email: [rezkiallolebang1998@gmail.com](mailto:rezkiallolebang1998@gmail.com)

#### **ABSTRAK**

Glukokortikoid merupakan hormon stres yang menekan respons imun normal dengan cara memblokir sel Th1. Glukokortikoid memberikan dampak terhadap penurunan sistem imunitas tubuh dan perubahan diferensiasi leukosit. *Sargassum sp.* merupakan salah satu jenis alga cokelat yang hidup di laut. *Sargassum sp.* mengandung senyawa metabolit yang bersifat imunomodulator. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jumlah jenis leukosit mencit yang diinduksi stres akut dan diberi ekstrak etanol *Sargassum sp.* Penelitian eksperimen murni dengan desain *post test only control group design*. Mencit sebanyak tiga puluh ekor dibagi menjadi lima kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol normal (KN), kontrol negatif (K-), kontrol positif (K+), ekstrak etanol *Sargassum sp.* 35% (P1) dan 70% (P2). Pada K-, K+, P1 dan P2 diberi perlakuan stres akut dengan metode FST (*Forced Swim Test*) untuk melihat *immobility time* pada mencit. Perlakuan diberikan selama tujuh hari dan pada hari ke-8 dilakukan pengambilan darah mencit intrakardial. Pengamatan leukosit dari preparat apusan darah mencit dilakukan menggunakan mikroskop dengan pembesaran 1000x. Data hasil pengamatan dianalisis dengan ANOVA. Hasil penelitian menunjukkan kelompok P1 dapat menurunkan persentase neutrofil dan monosit tetapi meningkatkan persentase limfosit, sementara kelompok P2 menunjukkan adanya penurunan persentase neutrofil, peningkatan persentase limfosit, tetapi tidak dapat menurunkan persentase monosit dibandingkan dengan P1. Rata-rata persentase eosinofil dan basofil tidak mengalami perubahan jumlah yang signifikan, baik pada kelompok perlakuan maupun pada kelompok kontrol. Namun data statistik menunjukkan tidak ada perubahan signifikan antar kelompok. Sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol *Sargassum sp.* tidak berpengaruh signifikan terhadap rata-rata persentase monosit, limfosit, neutrofil, eosinofil dan basofil mencit pasca diinduksi stres akut.

**Kata Kunci:** Stres, *Sargassum sp.*, Leukosit.

#### **ABSTRACT**

*Glucocorticoids are stress hormones that suppress normal immune responses by blocking Th1 cells. Glucocorticoids have an impact on decreasing the body's immune system and changes in leukocyte differentiation. Sargassum sp. is one type of brown algae that lives in the sea. Sargassum sp. contains metabolite compounds that are immunomodulatory. This study aims to determine the number of types of leukocytes in mice that are induced by stress and given ethanol extract of*

*Sargassum sp.* Pure experimental research design with post test only control group design. Thirty mice were divided into five treatment groups, namely the normal control group (KN), negative control (K-), positive control (K +), ethanol extract of *Sargassum sp.* 35% (P1) and 70% (P2). At K-, K +, P1 and P2 were given stress treatment with the FST (Forced Swim Test) method to see immobility time in mice. The treatment was given for seven days and on the 8th day the intracardial mice were taken. Observation of leukocytes from the blood smear of mice was carried out using a microscope with 1000x magnification. Observation data were analyzed by ANOVA. The results showed that the P1 group could reduce the percentage of neutrophils and monocytes but increase the percentage of lymphocytes, while the P2 group showed a decrease in the percentage of neutrophils, an increase in the percentage of lymphocytes, but could not decrease the percentage of monocytes compared to P1. The mean percentage of eosinophils and basophils did not change significantly, both in the treatment group and in the control group. However, statistical data shows no significant change between groups. So it can be concluded that stress treatment given to mice does not have a significant effect on the average percentage of monocytes, lymphocytes, neutrophils, eosinophils and basophils after being induced by stress.

**Keywords:** Stress, *Sargassum sp.*, Leukocytes.

## Pendahuluan

Stres adalah respon tubuh terhadap berbagai rangsangan fisik atau rangsangan emosional yang dapat mengganggu homeostasis tubuh.<sup>1</sup> Stres dapat membuat perubahan kondisi fisiologis tubuh dan apabila berlangsung dalam waktu lama, mengakibatkan penurunan sistem imun.<sup>2</sup> Stres memicu aktivasi *hypothalamic-pituitary-adrenal* (HPA) axis yang menyebabkan peningkatan konsentrasi *corticotropin-releasing hormone* (CRH) dari *hipothalamus*. CRH merangsang kelenjar pituitari anterior untuk melepaskan *adreno-corticotropic hormone* (ACTH). Hormon ini merangsang kelenjar adrenal untuk melepaskan hormon stres, yaitu kortisol dan katekolamin yang berpengaruh terhadap perubahan kadar leukosit.<sup>1</sup>

Leukosit dihambat oleh hormon stres dari sirkulasi ke ekstraseluler, karena ketika stres, terjadi peningkatan kortisol dan

katekolamin sebagai respon tubuh terhadap stres.<sup>3,4,5</sup> Hormon kortisol dapat meningkatkan proses apoptosis pada sel limfosit dan monosit, dan meningkatkan kadar neutrofil.<sup>3,6</sup>

Dalam penelitian Hendrajid<sup>7</sup>, mencit yang diinduksi stres dengan metode *forced swimming test* selama enam menit dalam kurun waktu tujuh hari menunjukkan peningkatan kadar neutrofil dan monosit, sedangkan kadar limfosit mengalami penurunan, serta kadar basofil dan neutrofil tidak mengalami perubahan. Peningkatan kadar neutrofil disebabkan karena glukokortikoid mampu menginduksi pelepasan neutrofil dari sumsum tulang ke jaringan, sedangkan kadar monosit meningkat karena ketika stres, terjadi stres oksidatif yang dapat merusak jaringan. Kadar limfosit menurun disebabkan karena efek kortisol yang menurunkan proliferasi dan meningkatkan apoptosis pada sel limfosit.<sup>7</sup>

Ada banyak terapi yang digunakan untuk mengatasi stres, salah satunya antidepresan.<sup>8</sup>

Antidepresan terdiri dari beberapa macam golongan, yaitu trisiklik (TCAs), *Selective Serotonin Reuptake Inhibitor* (SSRI), *Serotonin-Norepinefrin Reuptake Inhibitors* (SNRIs), *Mono Amin Oksidase Inhibitor* (MOAI), 5-HT<sub>2</sub> reseptor antagonis dan heterosiklik.<sup>9</sup> Sertralin merupakan obat antidepresan golongan *Selective Serotonin Reuptake Inhibitor* (SSRI). Obat golongan SSRI memiliki efek samping seperti mual, muntah dan gelisah.<sup>10</sup>

Salah satu bahan alam yang dapat mengatasi stres yaitu alga.<sup>11</sup> Indonesia memiliki lima jenis alga yang bernilai ekonomis tinggi dan dikonsumsi domestik yaitu: *Eucheuma sp.*, *Glacillaria sp.*, *Gelidium sp.*, *Sargassum sp.* dan *Hypnea sp.*<sup>12</sup>

*Sargassum sp* merupakan kelompok alga cokelat (phaeophyceae) dan genus terbesar dari famili *Sargassaceae*.<sup>13</sup> Alga jenis ini banyak dibudidayakan di Provinsi Maluku khususnya di Kota Ambon dan Kabupaten Maluku Tenggara Barat.<sup>12</sup> Di daerah Kabupaten Maluku Barat Daya (MBD) khususnya di pulau Letti, masyarakat setempat sering mengkonsumsi alga dalam bentuk mentah dan mengolahnya menjadi sayuran, gubahan atau colo-colo.<sup>14</sup> Senyawa aktif di dalam *Sargassum sp.* dapat dimanfaatkan sebagai obat herbal, yaitu *fucoidan* yang memiliki bioaktivitas sebagai antikanker, antiaterosklerosis, antiinflamasi, antikoagulan, imunomodulator dan antioksidan.<sup>15</sup> Selain itu, *Sargassum sp.* juga

memiliki senyawa aktif seperti steroid, fenol, alkaloid, flavonoid, dan lain-lain.

Penelitian pada *Sargassum sp.* telah diteliti pada hewan coba, seperti penyembuhan luka pada mukosa bibir tikus<sup>16</sup>, *hepatoprotective*<sup>17</sup>, anti hiperglikemi<sup>18</sup>, dan diteliti secara in vitro sebagai anti kanker.<sup>19</sup> Hasil penelitian Hervidea dkk<sup>20</sup>, menunjukkan penurunan kadar leukosit mencit pada kelompok yang diberi ekstrak methanol *Sargassum sp.* setelah diinduksi benzo(α)piren yang merupakan senyawa karsinogenik.

Penulis belum pernah membaca suatu jurnal mengenai *Sargassum sp.* sebagai antidepresan yang dapat mempengaruhi hitung jenis leukosit, sehingga penulis merasa tertarik untuk melakukan penelitian tentang pengaruh pemberian ekstrak etanol alga cokelat (*Sargassum sp*) terhadap hitung jenis leukosit mencit pasca diinduksi stres.

## Metode penelitian

### Desain Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan eksperimen murni (*true experimental research*) dan rancangan yang dipakai adalah *post test only control group design*, yaitu membandingkan hasil observasi pada kelompok kontrol dan perlakuan.

### Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Pattimura Ambon. Proses ekstraksi pada laboratorium Kimia Dasar

Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Pattimura Ambon pada bulan November – Desember 2020.

### **Sampel Penelitian**

Sampel dalam penelitian ini menggunakan hewan uji yaitu mencit jantan dewasa strain balb/c dengan berat badan (BB) berkisar 20-30 gram yang diperoleh dari Laboratorium Farmasi Universitas Hassanudin Kota Makassar.

### **Kriteria Subjek Penelitian**

#### **a. Kriteria Inklusi**

1. Mencit jantan (*Mus musculus*)
2. Berat badan antara 20-30 gram
3. Mencit dalam kondisi sehat

#### **b. Kriteria Eksklusi**

Kriteria eksklusi adalah keadaan yang menyebabkan subyek yang memenuhi kriteria inklusi tidak dapat diikutsertakan kedalam penelitian.<sup>26</sup> Kriteria eksklusi dalam penelitian ini yaitu, mencit mati selama penelitian berlangsung.

### **Instrumen Penelitian**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang mencit, tabung FST, blender, saringan, spatula, Erlenmeyer, rotary evaporator, gelas kimia, pipet ukur, jarum sonde, dissecting set, tabung EDTA, pipet, alat EPM, *Hematology Analyzer*, gunting, botol minum, timbangan digital dan spidol permanen.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah pakan AD2, sekam padi, aquades, obat alprazolam, pita, eter, selotif, kertas label,

*Sargassum sp.*, etanol, antiseptik, sarung tangan, handuk dan masker.

### **Prosedur Penelitian**

#### **Aklimatisasi Mencit**

Aklimatisasi adalah adaptasi hewan coba dengan tujuan adaptasi terhadap lingkungan baru. Aklimatisasi dilakukan di laboratorium biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Pattimura Ambon selama satu minggu.

#### **Pemeliharaan Mencit Uji**

Sebanyak 30 ekor mencit jantan diletakkan di dalam kandang berbentuk persegi. Tiap kandang berisi satu ekor mencit. Dasar kandang dilapisi dengan sekam padi setebal 0,5-1 cm dan diganti setiap tiga hari untuk mencegah infeksi yang terjadi akibat kotoran. Makanan yang diberikan pada mencit adalah pakan AD2 dan minuman yang diberikan adalah air keran yang diletakkan dalam botol. Makanan dan minuman diberikan secukupnya dalam wadah terpisah dan diganti setiap hari.

#### **Preparasi Sampel**

Sampel *Sargassum sp.* diambil dari perairan pantai Desa Hutumuri, Pulau Ambon. Sampel dikeringkan di bawah sinar matahari selama  $\pm 4$  hari. Sampel yang telah kering dipotong-potong kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender hingga menjadi serbuk simplisia kering dan dimasukkan ke dalam gelas Erlenmeyer.<sup>27</sup>

### **Ekstraksi Dengan Pelarut Etanol**

Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi. *Sargassum sp.* di timbang sebanyak 500 gram yang dibasahi dengan pelarut etanol hingga basah sekitar 2000 ml, (1 : 4 ) yang didiamkan  $\pm 3$  hari dalam wadah tertutup dan dibuka setiap dua jam untuk di lakukan pengadukan. Setelah tiga hari ekstrak disaring menggunakan kertas whatmen no 45. Kemudian hasil saringan diuapkan dalam cawan sekitar  $\pm 14$  hari dengan suhu lebih kurang  $40^{\circ}\text{C}$  hingga diperoleh pasta.<sup>28</sup>

### **Pembuatan Konsentrasi *Sargassum sp.***

#### **a. Ekstrak Etanol *Sargassum sp.* Dengan Konsentrasi 35%**

Dibuat dengan cara melarutkan ekstrak etanol *Sargassum sp.* 100% ke dalam aquades. Sebanyak 35 ml *Sargassum sp.* 100% ditambahkan aquades hingga volumenya mencapai 100 ml.

#### **b. Ekstrak Etanol *Sargassum Sp.* Dengan Konsentrasi 70%**

Dibuat dengan cara melarutkan ekstrak etanol *Sargassum sp.* 100% ke dalam aquades. Sebanyak 70 ml ekstrak *Sargassum sp.* 100% ditambahkan aquades hingga volumenya mencapai 100 ml.

### **Pembuatan Larutan Alprazolam**

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

### **Pengujian Pada Mencit**

Mencit sebanyak 30 ekor dibagi menjadi lima kelompok perlakuan yaitu KN (Kelompok mencit yang tidak diberi perlakuan stres akut (kontrol normal)), K- (Kelompok mencit yang diberi perlakuan stres akut dan diberi aquades (kontrol negatif)), K+ (Kelompok mencit yang diberi perlakuan stres akut dan diberi obat alprazolam, (kontrol positif)), P1 (Kelompok mencit yang diberi perlakuan stres akut dan diberi ekstrak etanol *Sargassum sp.* dengan konsentrasi 35%) dan P2 (Kelompok mencit yang diberi perlakuan stres akut dan diberi ekstrak etanol *Sargassum sp.* dengan konsentrasi 70%).

### **Prosedur Pembedahan Mencit**

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

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

## Pengambilan Darah

Pengambil darah sebanyak 1 cc diambil melalui jantung (*intra cardial*) dengan cara mencit dibedah. Darah yang telah diambil, kemudian dimasukkan ke dalam tabung darah yang sudah diberi antikoagulan EDTA sebelumnya.

## Pembuatan Preparat Apusan Darah Tepi

Darah pada tabung vakum EDTA harus dicampur segera dengan cara inversi (dibolak-balik) agar plasma darah bercampur dengan sel-sel darah. Kemudian darah diambil menggunakan pipet tetes dan ditetaskan pada kaca objek. Selanjutnya kaca objek diletakkan pada sudut 25° - 30° pada tetesan darah, kemudian ditarik lurus sampai ujung preparat.<sup>29</sup>

Pewarnaan preparat apus darah tepi dengan giemsa 10% dilakukan dengan cara sebagai berikut:<sup>29</sup>

- Meneteskan metanol ke atas preparat dan dibiarkan selama lima menit. Lalu sisa metanol dibuang
- Meneteskan larutan giemsa 10% (sampai semua apusan tergenangi) dan dibiarkan selama 15 menit.
- Preparat dibilas dengan air kemudian dikeringkan di udara.
- Preparat di periksa di bawah mikroskop setelah ditetesi dengan minyak imersi (pembesaran 1000x).

## Perhitungan Diferensial Leukosit

Pengamatan leukosit dari preparat apusan darah dilakukan menggunakan

mikroskop dengan pembesaran 1000x. Preparat tersebut ditetesi dengan minyak emersi untuk memperjelas pengamatan.<sup>30</sup>

Pemeriksaan ini dilakukan pada bagian sediaan yang cukup tipis dengan penyebaran leukosit yang merata, pemeriksaan dimulai dari pinggir atas sediaan dan berpindah ke arah pinggir bawah dengan menggunakan micromanipulator mikroskop.<sup>31</sup> Setelah mencapai bagian pinggir bawah sediaan, digeser lapangan pandang ke arah kanan, kemudian ke arah pinggir atas lagi dan seterusnya sampai seratus sel leukosit terhitung menurut jenisnya.

## Analisis Data

Hasil perhitungan terhadap jumlah leukosit selanjutnya dilakukan analisis statistik. Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) dengan uji statistik *Analysis of Variance One Way* (ANOVA). Jika terdapat perbedaan yang signifikan maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf signifikan 95%.

## Hasil dan pembahasan

### Hasil Penelitian

Hasil perhitungan terhadap rata-rata jenis dan jumlah leukosit kelompok mencit kontrol normal (KN), mencit yang diberi perlakuan stres akut dengan metode *Forced Swimming Test* (FST) selama 6 menit dalam kurun waktu 7 hari pada kelompok mencit



kontrol negatif (K-), kelompok mencit kontrol positif (K+), kelompok mencit yang diinduksi stres akut dan diberi ekstrak etanol *sargassum sp.* konsentrasi 35% (P1) dan konsentrasi 70% (P2) dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Rata-rata persentase dan jenis leukosit mencit

Kelompok perlakuan	Jumlah sampel	Jenis dan Jenis Leukosit (Jumlah ± SD)				
		Monosit	Linfosit	Neutrofil	Eosinofil	Basofil
KN	6	21,86±18,81	44,67±17,74	12,50±18,31	0,17±0,49	0,80±0,80
K+	6	26,84±14,71	57,67±17,14	12,16±8,07	0,17±0,49	0,80±0,80
K-	6	34,87±14,08	71,00±9,54	12,16±8,07	0,17±0,49	0,80±0,80
P1	6	18,33±12,84	72,60±16,77	9,20±5,15	0,17±0,49	0,80±0,80
P2	6	25,80±14,20	67,67±14,30	7,17±2,52	0,00±0,00	0,80±0,80

Hasil pada table 4.1 terlihat bahwa rata-rata persentase monosit tertinggi pada kelompok K-, sedangkan persentase monosit terendah pada kelompok K+. Rata-rata persentase limfosit tertinggi pada kelompok K+, sedangkan persentase limfosit terendah pada kelompok K-. Rata-rata persentase neutrofil tertinggi pada kelompok K-, sedangkan terendah pada kelompok P2. Rata-rata persentase eosinofil dan basofil terhadap diferensiasi selnya tidak mengalami perubahan jumlah yang signifikan, baik pada kelompok perlakuan maupun pada kelompok kontrol.

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

Jenis Leukosit	F hitung	Sig
Persentase monosit	1,344	0,281
Persentase limfosit	1,123	0,368
Persentase neutrofil	0,536	0,711
Persentase eosinofil	0,250	0,907

Berdasarkan hasil ANOVA menunjukkan nilai f hitung monosit yaitu 1,344 dengan nilai sig>0,05, nilai f hitung limfosit yaitu 1,123 dengan nilai sig >0,05, nilai f hitung neutrofil yaitu 0,536 dengan nilai sig>0,05 dan nilai f hitung eosinofil yaitu 0,250 dengan nilai sig>0,05. Dari hasil ANOVA tersebut terlihat bahwa nilai sig>0,05 yang berarti bahwa ekstrak etanol *Sargassum sp.* yang diberikan tidak berpengaruh signifikan terhadap rata-rata persentase monosit, limfosit, neutrofil, eosinofil dan basofil.

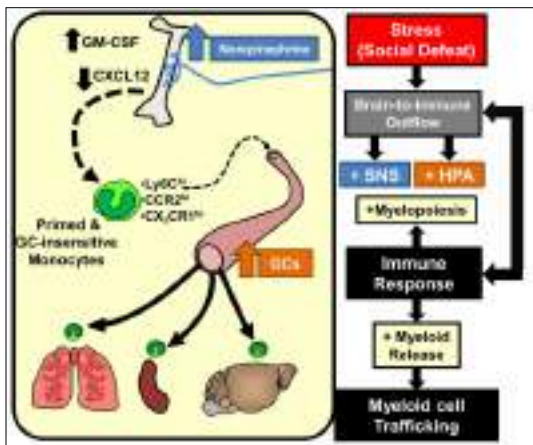
## Pembahasan

### Persentase Monosit

Pada kelompok mencit K-, rata-rata persentase jumlah sel monosit lebih tinggi jika dibandingkan dengan kelompok KN (Tabel 4.1.). Peningkatan persentase monosit dalam penelitian ini disebabkan karena respon imun sekunder akibat stres. Stres akibat aktifitas fisik dengan intensitas berat dapat menyebabkan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS), Produksi ROS yang berlebihan akan mengakibatkan stres oksidatif yang dapat merusak jaringan.<sup>32, 33</sup>

Jaringan yang rusak akan melepas molekul endogenous yang disebut *Damaged-Associated Molecular Patterns* (DAMPs) sebagai pengenalan produk sel yang rusak. Sel monosit memiliki reseptor seluler yang dapat mengikat DAMPs disebut *Pattern Recognition*

Receptor (PRRs). Pengenalan DAMPs oleh PRRs sangat penting untuk terjadinya respon inflamasi. Sitokin pro inflamasi dapat mengaktifkan dan menarik sel-sel inflamasi seperti monosit dari sirkulasi menuju lokasi dimana DAMPs berada, sehingga menyebabkan peningkatan sel monosit di jaringan yang mengalami kerusakan.<sup>34,35</sup> Pada penelitian Hendrajid dkk, terjadi peningkatan sel monosit pada mencit yang diinduksi stres dengan metode *forced swim test* (FST).<sup>36</sup>

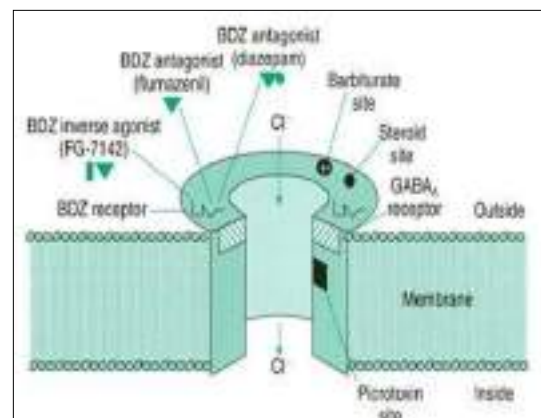


**Gambar 1.** Stres menginduksi otak untuk mengaktifasi sistem imun.<sup>37</sup>

Pada gambar 1 Paparan stres yang berulang menyebabkan sensitisasi neuroimun dan pelepasan monosit yang belum matang di limpa.<sup>37</sup> Setelah stres akut, terjadi aktivasi axis *hypothalamic-pituitary-adrenal* (HPA) dan *sympathetic nervous system* (SNS). Aktivasi sistem saraf simpatis menyebabkan peningkatan pelepasan katekolamin di sirkulasi (epinefrin) dan di dalam jaringan (norepinefrin). Sel imun perifer mengekspresikan reseptor untuk norepinefrin (NE) dan stimulasi reseptor ini mempengaruhi

perkembangan dan kapasitas migrasi sel imun perifer. Peningkatan aktifitas SNS yang berkepanjangan atau berulang, menyebabkan peningkatan NE di sumsum tulang sehingga mendorong produksi dan pelepasan sel myeloid, termasuk monosit dan granulosit.<sup>37</sup>

Pada kelompok K+, persentase jumlah sel monosit cenderung lebih rendah dibandingkan kelompok KN, K-, P1 dan P2. Hal ini disebabkan karena Alprazolam bekerja pada kompleks reseptor GABA<sub>A</sub>-Benzodiazepine. Sistem kimiawi dan reseptor GABA menghasilkan inhibisi atau efek menenangkan pada sistem saraf pusat. Benzodiazepine, khususnya alprazolam menyebabkan supresi yang nyata pada aksis hipotalamik-pituitari-adrenal.<sup>38</sup>



**Gambar 2.** GABA merupakan neurotransmitter inhibisi utama.<sup>38</sup>

Pada kelompok P1, persentase jumlah sel monosit cenderung lebih rendah dibandingkan kelompok K-. Hal ini disebabkan karena senyawa flavonoid yang terdapat pada ekstrak etanol *sargassum sp.*<sup>15</sup>



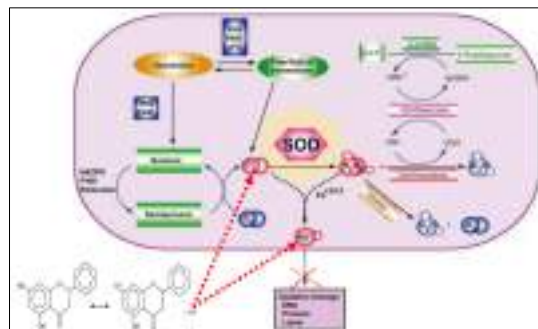
Flavonoid merupakan senyawa yang berperan sebagai antioksidan.<sup>39</sup> Mekanisme antioksidan dari flavonoid adalah menangkap *reactive oxygen species* (ROS) secara langsung, mencegah regenerasi ROS dan secara tidak langsung dapat meningkatkan aktivitas enzim antioksidan seluler. Flavonoid mencegah terbentuknya ROS dengan beberapa cara, yaitu menghambat kerja enzim *xantin oksidase* dan *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate* (NADPH) *oksidase*, serta mengkelat logam ( $Fe^{2+}$  dan  $Cu^{2+}$ ) sehingga dapat mencegah reaksi redoks yang dapat menghasilkan radikal bebas.<sup>39</sup>



**Gambar 3.** Mekanisme pengaruh flavonoid terhadap ROS.<sup>40</sup>

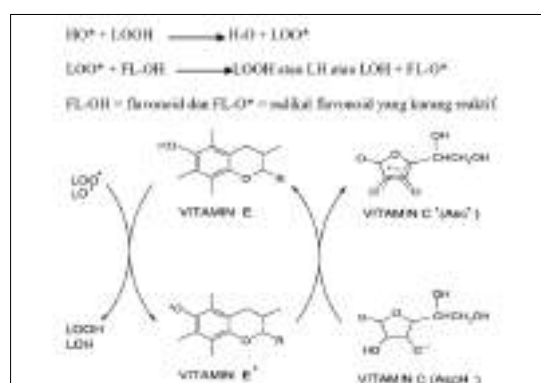
Flavonoid dapat memberi efek antioksidan dengan mencegah generasi ROS, langsung menangkap ROS atau secara tidak langsung terjadi peningkatan enzim. Flavonoid dapat menangkap secara langsung superoksida dan peroxynitrite. Melalui penangkapan superoksida, flavonoid meningkatkan bioavailabilitas NO dan menghambat pembentukan peroxynitrite. Flavonoid juga dapat menangkap peroxynitrite yang merusak vasorelaxation endotelium dan mengganggu endotelium, sehingga pada

akhirnya sirkulasi darah yang lebih baik dalam arteri coroner.<sup>40</sup>



**Gambar 4.** Mekanisme kerja flavonoid dalam menangkap ROS

Flavonoid, Vitamin C dan Vitamin E yang diisolasi dari alam dapat melindungi membran phospholipid PUFA (*Poly Unsaturated Fatty Acid*) dengan menyumbangkan atau memberikan salah satu ion Hidrogennya ( $H^+$ ) kepada peroksid lipid radikal ( $LOO^{\cdot}$ ).<sup>69</sup>  $LOO^{\cdot}$  merupakan hasil reaksi  $OH^{\cdot}$  pada proses peroksidasi lipid rekasi serangan  $OH^{\cdot}$  terhadap PUFA. Pemberian  $H^+$  oleh suatu antioksidan dapat menghentikan reaksi-reaksi radikal selanjutnya, seperti pada gambar 5.



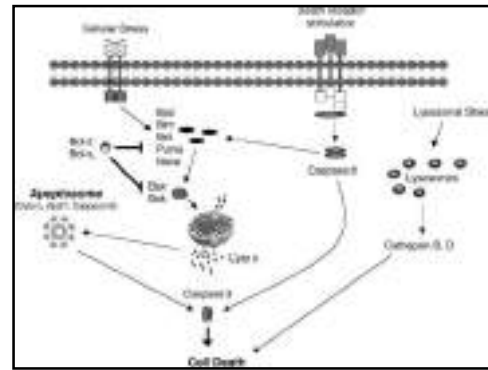
**Gambar 5.** Mekanisme peran Vit.E dan Vit. C dalam melindungi lipida.<sup>40</sup>

Pada kelompok P2, persentase jumlah sel monosit cenderung lebih tinggi dibandingkan kelompok P1. Hal ini disebabkan karena adanya perbedaan konsentrasi yang mempengaruhi hasil ekstraksi.<sup>41</sup> Perbedaan konsentrasi etanol dapat mengakibatkan perubahan polaritas pelarut sehingga mempengaruhi kelarutan senyawa bioaktif. Menurut Noviyanti<sup>42</sup>, konsentrasi pelarut dapat mempengaruhi aktifitas antioksidan yang didapatkan. Konsentrasi pelarut organik yang besar belum tentu meningkatkan aktivitas antioksidan. Sehingga ekstrak etanol *Sargassum sp.* 70% belum memberikan aktivitas antioksidan dan alkaloid yang optimal.

### Persentase Limfosit

Hasil pada Tabel 1. terlihat pada kelompok K-, rata-rata persentase jumlah sel limfosit lebih rendah jika dibandingkan dengan rata-rata persentase jumlah sel limfosit pada kelompok mencit KN, K+, P1 dan P2. Hal ini disebabkan karena ketika stres, hipotalamus akan mensekresikan *corticotropin releasing hormone* (CRH) dalam upaya berespon terhadap stressor. CRH menstimulasi kelenjar pituitari anterior untuk memproduksi *adrenocorticotrophic hormone* (ACTH) yang akan menstimulasi korteks adrenal untuk mensekresikan glukokortikoid, seperti kortisol.<sup>22</sup> Peningkatan kortisol sebagai respon stres, akan menghambat sistem imun dengan cara menurunkan jumlah leukosit yang beredar di dalam tubuh, menghambat pembelahan sel

leukosit, menurunkan jumlah sel penghasil antibodi, dan menghambat produksi antibodi. Kortisol juga menurunkan proses proliferasi dan meningkatkan apoptosis pada sel limfosit.<sup>4,23</sup>

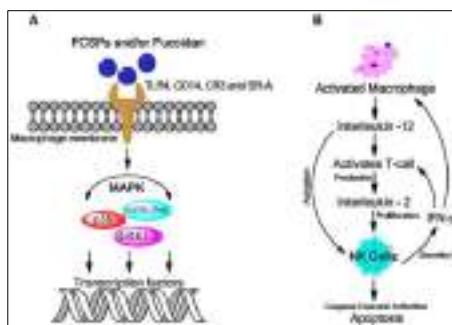


Gambar 6. Jalur apoptosis pada sel limfosit.<sup>43</sup>

Pada saat terjadi stres, kortisol akan disekresi secara berlebih yang menyebabkan aktivasi dari protein pro-apoptosis Bax/Bak. Protein pro apoptosis Bax/Bak akan merusak membran mitokondria sel limfosit yang akan menyebabkan sitokrom c dan protein pro apoptosis yang lain keluar dari mitokondria. Hal ini mengakibatkan teraktivasi caspase 9 yang kemudian akan mengaktifasi caspase 3 dan terjadi apoptosis. Kortisol yang berlebih juga dapat mengubah ekspresi gen pada sitokin sehingga produksi sitokin IL-2 yang merupakan stimulator proliferasi sel limfosit, dan IFN- $\gamma$  akan ditekan oleh kortisol, sehingga mengakibatkan proliferasi pada sel limfosit menurun.<sup>23</sup>

Pada kelompok P1 dan P2, persentase jumlah sel limfosit cenderung lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok KN dalam penelitian ini. Hal ini disebabkan karena

adanya senyawa *fucoidan* yang merupakan senyawa imunomodulator dalam ekstrak etanol *Sargassum sp.*<sup>15</sup> *Fucoidan* dapat memicu THP-1 dengan meningkatnya kadar IFN- $\gamma$ , p53, Bax, TNF $\alpha$ , IL-12. *Fucoidan* juga menginduksi produksi dari interleukin-1 (IL-1) dan IFN- $\gamma$  secara in vitro, peningkatan fungsi dari Limfosit T, sel B, makrofag dan sel NK serta memberikan respon antibodi utama di *Sheep Red Blood Cells* (SRBC) secara in vivo.<sup>15</sup>



**Gambar 7.** Mekanisme bioaktivitas fukoidan.<sup>44</sup>

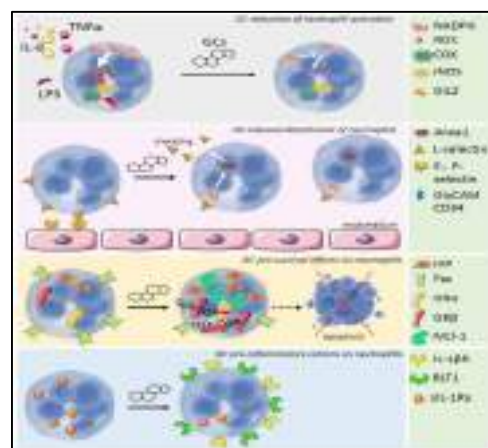
Pada gambar 7. Aktivasi makrofag yang dimediasi oleh fucoidan melalui aktivasi reseptor membran spesifik yaitu TLR-4, CD14, CR-3 dan SR yang menginduksi pensinyalan intraseluler melalui mitogen-activation protein kinase (MAPKs). Aktivasi makrofag mengarah pada produksi sitokin seperti IL- 12, IL- 2 dan IFN-  $\gamma$  yang dapat meningkatkan produksi sel-T.

### Persentase neutrofil

Hasil pada Tabel 1. terlihat pada kelompok KN, rata-rata persentase jumlah sel neutrofil lebih tinggi jika dibandingkan dengan rata-rata persentase jumlah sel neutrofil pada kelompok mencit K-, K+, P1 dan P2 namun

masih dalam batas normal. Nilai normal sel neutrofil pada mencit yaitu 6-40%.<sup>26</sup>

Peningkatan jumlah sel neutrofil berhubungan dengan kondisi stres. Dalam kondisi stres, terjadi aktivasi HPA axis, dimana pada daerah *preventricular nucleus* (PVN) di *hypothalamus* melepaskan *corticotropin releasing hormone* (CRH) yang memberi sinyal ke hipofisis anterior untuk mengeluarkan *adrenocorticotrophic hormone* (ACTH) ke dalam aliran darah. ACTH merangsang kelenjar adrenal untuk melepaskan hormon kortisol yang mampu menginduksi mobilisasi sel neutrofil dari sumsum tulang ke dalam jaringan dan menghambat apoptosis sel neutrofil. Kondisi ini yang menyebabkan terjadinya neutrofilia pada kasus induksi stres secara akut atau subakut.<sup>7,45</sup>



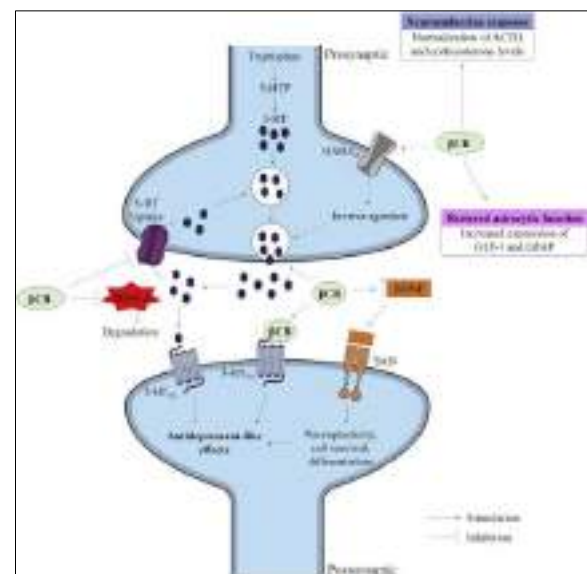
**Gambar 8.** Berbagai efek glukokortikoid pada neutrofil.<sup>24</sup>

Glukokortikoid endogen merupakan salah satu faktor yang mendorong pematangan di sumsum tulang dan mendukung mobilisasi neutrofil dari sumsum tulang ke sirkulasi,

sehingga pelepasan glukokortikoid yang berlebihan seperti pada keadaan stres dapat menyebabkan neutrofilia.<sup>24</sup> Glukokortikoid juga dapat melawan efek ini dengan mengatur distribusi neutrofil secara ketat untuk mencegah akumulasi neutrofil yang tidak tepat. Mekanisme molekuler yang mendasari kontrol ini melibatkan penurunan ekspresi L-selektin (CD62L) di permukaan neutrofil. L-selektin merupakan salah satu dari tiga molekul adhesi yang di ekspresikan paling banyak pada sel leukosit di sirkulasi. L-selektin berfungsi untuk mengatur pelepasan neutrofil ke tempat inflamasi.<sup>25</sup> Efek ini dapat diblok oleh inhibitor p38 *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK), yang penting dalam mekanisme intraselular. Faktor lain yang terlibat dalam mekanisme ini adalah Annexin A1 (Anxa1) yang dikenal sebagai protein antiinflamasi yang diinduksi glukokortikoid, yang terbukti mengurangi ekspresi L-selektin pada neutrofil di sirkulasi perifer.<sup>24</sup>

Pada kelompok P1 dan P2, persentase jumlah sel neutrofil cenderung lebih rendah jika dibandingkan dengan rata-rata persentase sel neutrofil pada kelompok mencit KN, K- dan K+. Hal ini disebabkan karena di dalam *Sargassum sp.* terdapat senyawa alkaloid yang memiliki efek antidepresan.<sup>15</sup> Senyawa alkaloid dapat menghambat produksi kortisol dengan menurunkan sekresi hormon adrenokortikotropik (ACTH), akibatnya ACTH tidak dapat memberikan signaling yang besar untuk perangsangan produksi dan sekresi

dari hormon kortisol.<sup>46</sup> Pada penelitian Puspitasari<sup>46</sup>, pemberian ekstrak etanol daun pandan wangi 10% pada kelompok mencit yang diberikan perlakuan stres, mampu memberikan efek penurunan kadar kortisol. Hal ini disebabkan karena pada ekstrak etanol daun pandan wangi 10% terdapat senyawa alkaloid yang memiliki efek antidepresan.



**Gambar 9.** Mekanisme efek antidepresan β-karbolin (βCB).<sup>47</sup>

Alkaloid β-carboline memiliki potensi sebagai antidepresan karena aksinya pada monoamine neurotransmisi, terutama sistem serotoninergik. β-carboline adalah kelompok besar alkaloid indol alami yang menyajikan cincin *tricyclic pyrido-3,4-* mirip dengan struktur *tryptamine*.<sup>47,48</sup>

Hipotesis mengenai monoamin merupakan teori biokimia utama dari gangguan depresi, dimana depresi sebagai konsekuensi dari perubahan kadar monoamine, termasuk serotonin (5-HT),



dopamine (DA) dan noradrenalin (NA).<sup>47</sup> Sistem saraf pusat mengandung sejumlah besar noradrenergik, serotoninergik dan dopaminergik. Secara umum NA memodulasi fungsi korteks prefrontal, pemrosesan memori, perilaku dan perhatian. 5-HT merupakan sistem neurotransmitter kohesif terbesar di otak, yang berperan penting dalam mengatur suasana hati, emosi dan aktivitas motorik. Dopamin memodulasi fungsi koordinasi motorik, memori dan perhatian. Dalam pengertian ini, disfungsi sistem monoaminergik dapat bertanggung jawab atas banyak gejala perilaku depresi, seperti suasana hati yang rendah, motivasi berkurang, kelelahan dan gangguan konsentrasi. Dengan alasan ini, kebanyakan obat antidepresan bekerja dengan meningkatkan kadar monoamin di celah sinaptik dan memodulasi sistem neurotransmisi.<sup>47</sup>

Alkaloid  $\beta$ -karbolin dapat meningkatkan monoamin di daerah otak melalui penghambatan *monoamine oxidase* (MAO) dan penghambatan reuptake 5-HT.<sup>47</sup> MAO termasuk dalam famili amina yang mengandung *flavin oksidoreduktase*, biasanya terletak di luar membran mitokondria, dan mengkatalisis deaminasi oksidatif monoamina. Ada dua isoform MAO, MAO-A dan B. MAO-A memetabolisme secara khusus molekul 5-HT, sedangkan MAO-B memiliki afinitas utama dengan *phenylethylamine* dan *benzylamine*. DA dan NA biasanya dimetabolisme oleh kedua isoform tersebut.<sup>47</sup>

$\beta$ -karbolin juga berinteraksi dengan reseptor GABA<sub>A</sub>, selain reseptor serotoninergik dengan mengurangi penghambatan sinyal pasca-sinaptik dan akibatnya memodulasi efek seperti antidepresan dari monoamina.<sup>47</sup>  $\beta$ -karbolin meningkatkan kadar 5-HT, karena secara khusus menghambat MAO-A dan mampu berinteraksi dengan beberapa reseptor permukaan sel, termasuk reseptor 5-HT<sub>2A</sub> yang berhubungan dengan antidepresan farmakoterapi. 5-HT<sub>2A</sub> adalah reseptor berpasangan Gq-protein yang ada di berbagai bagian otak yang terlibat dalam emosi, seperti amigdala, hipokampus, talamus dan area kortikal. Setelah diaktifkan, reseptor ini dapat mengontrol rangsangan saraf di sebagian besar jaringan yang terlibat depresi melalui modulasi neuron postsynaptic glutamatergic dan GABAergic, yang mengarah ke efek antidepresan.  $\beta$ -karbolin juga memiliki efek seperti antidepresan melalui respon neuroendokrin dan perlindungan fungsi astrositik. Mereka mampu menormalkan ACTH dan kadar kortikosteron, dua hormon penting yang terlibat dalam kondisi stres.<sup>47</sup>

### **Persentase eosinofil dan basofil**

Rata-rata persentase eosinofil dan basofil terhadap diferensiasi selnya tidak mengalami perubahan jumlah yang signifikan, baik pada kelompok perlakuan maupun pada kelompok kontrol. Hal ini disebabkan karena eosinofil lebih berperan aktif dalam melawan infeksi parasit, mengatur reaksi alergi akut dan



membentuk kompleks antigen-antibodi.<sup>48,49</sup> Sel basofil lebih berperan pada reaksi alergi pada kulit, saluran pernapasan, saluran pencernaan serta reaksi anafilaksis.<sup>50</sup>

## KESIMPULAN

Dari hasil dan pembahasan, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Ekstrak etanol *Sargassum sp.* yang diberikan pada mencit tidak berpengaruh signifikan terhadap rata-rata persentase monosit, limfosit, neutrofil, eosinofil dan basofil.
2. Pada kelompok mencit yang diberi perlakuan stres akut dan ekstrak etanol *sargassum sp.* dengan konsentrasi 35% (P1) dapat menurunkan persentase jumlah sel monosit dan neutrofil serta meningkatkan persentase jumlah sel limfosit.
3. Pada kelompok mencit yang diberi perlakuan stres akut dan ekstrak etanol *sargassum sp.* dengan konsentrasi 70% (P2) dapat menurunkan persentase jumlah sel monosit dan neutrofil serta meningkatkan persentase jumlah sel limfosit.

## SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh ekstrak etanol *sargassum sp.* sebagai anti depresan dengan menggunakan kortisol sebagai indikator stres.

2. Dilakukan kontrol keadaan lingkungan seperti memperhatikan kebersihan laboratorium, kondisi kandang mencit, lingkungan yang kedap suara serta tempat pemeliharaan mencit dan tempat perlakuan berada berdekatan agar tidak bias dan mempengaruhi hasil karena keadaan lingkungan merupakan salah satu faktor eksternal yang dapat mengubah jumlah jenis sel leukosit di dalam tubuh.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Larasati R. Pengaruh stres pada kesehatan jaringan periodontal. Skala Husada. 2016;13(1):81–9.
2. Mushidah, Muliawati R. Perubahan jumlah leukosit akibat aktivitas fisik berat pada mencit jantan balb/c. Kesehatan Masy Indones. 2019;14(1):11–4.
3. Wardhana M. Psikoneuroimunologi di bidang dermatologi. MDVI. 2011;38(4):175–80.
4. Mushidah, Nasihun T, Husaana A. Effect of Strenuous Physical Activity on Cortisol and Leukocyte in Mice. Sains Med. 2016;7(2):59–63.
5. Rasyid A. Mekanisme imunodepresi pascastroke. Neurona. 2019;36(3):217–25.
6. Titisari N, Asri K, Fauzi A, Masnur I, Kurniawan I. Kadar Hormon Kortisol dan Rasio Neutrofil/Limfosit (N/L) Satwa Lutung Jawa pada Saat di Kandang Perawatan dan Kandang Karantina di Hutan Coban Talun, Batu. TERNAK Trop J Trop Anim Prod. 2019;20(1):29–37.
7. Hendrajid Z. Jenis leukosit mencit (mus musculus) dengan perlakuan ekstrak etanol biji pala (*myristica fragrans*

- houth) pasca stres akut. Program studi pendidikan dokter fakultas kedokteran universitas pattimura. Universitas Pattimura; 2020.
8. Rachmani S, Mayasari D. Kombinasi Farmakoterapi dan Psikoterapi Pada Pengobatan Episode Depresif Sedang Dengan Gejala Somatis Combination Of Pharmacotherapy And Psychotherapy On The Treatment Of Moderate Depressive Episode With Somatic Symptoms. *J medula unila*. 2017;7(2):133–9.
  9. Faizah AK, Andhiarto Y, Wijayanti N. Uji Aktivitas Minyak Ikan sebagai Antidepresan pada Depresi Kronik secara In Vivo. *J Said Med*. 2018;10(2):56–8.
  10. Jasmadi RN. Saffron (*Crocus sativus*) Sebagai Alternatif Obat Anti Depresi Rima. *J Kesehat dan Sains Terap STIKes Merangin*. 2019;5(2):1–8.
  11. Sari BL, Susanti N, Sutanto S. Skrining Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Fraksi Etanol Alga Merah *Eucheuma spinosum*. *Pharm Sci Res*. 2015;2(2):59–68.
  12. Sormin RBD, Soukotta D, Saiful, Risambessy A, Ferdinandus SJ. Sifat fisiko-kimia semi refined carrageenan dari kota ambon dan kabupaten maluku tenggara barat. *JPHPI*. 2018;21(1):92–8.
  13. Pakidi CS, Suswati E. Potensi dan Pemanfaatan Bahan Aktif Alga Cokelat *Sargassum sp.* *Octopus*. 2017;6(1):551–62.
  14. Radiena MSY. Analisis kandungan gizi alga hijau silpau (*Dictyosphaeria versluysii*). *Maj BIAM*. 2018;14(1):8–13.
  15. Satyarsa ABS. Studi Pustaka: Potensi Fucoidan dari Rumput Laut Coklat (*Sargassum sp.*) sebagai Inovasi Terapi pada Kanker Payudara. *J Med Heal*. 2019;2(3):909–19.
  16. Arwidasari AR, Cevanti TA, Soewondo IK. Effectiveness of *Sargassum sp.* ethanolic extract on traumatic ulcers healing in the labial mucosa of Wistar strain (*Rattus norvegicus*). *Padjadjaran J Dent*. 2019;31(1):73.
  17. Altinok-Yipel F, Tekeli IO, Ozsoy SY, Guvenc M, Sayin S, Yipel M. Investigation of hepatoprotective effect of some algae species on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *Arch Physiol Biochem*. 2019;1(1):1–5.
  18. Faricha F, Firdaus M. The effect of phlorotannin *Sargassum sp.* extract on colon profile of diabetic rats. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci*. 2020;493(1):1–8.
  19. Karthick V, Akhila C, Kumar VG, Subashini D, Dhas TS, Govindaraju K, et al. In vitro anticancer activity of *Sargassum sp.* Polysaccharides against MCF-7 cell lines. *Indian J Geo-Marine Sci*. 2019;48(8):1267–73.
  20. Hervidea R, Widiastuti EL, Nurcahyani E, Sutyarso, Susanto GN. Efek Ekstrak Metanol Makroalga Cokelat (*Sargassum sp.*), Merah (*Gracillaria sp.*) dan Taurin Terhadap Gambaran Histopatologi Hepar Mencit Jantan (*Mus musculus*) yang Diinduksi Benzo( $\alpha$ )Piren. *J Biol Indones*. 2018;14(1):123–31.
  21. Fitri E. Respon Stres Pada Pasien Kritis. *J Keperawatan Sriwij*. 2014;1(1):86–93.
  22. Kantasa VD, Kusumawardani B, Herniyati. Efek Stresor Rasa Sakit Renjatan Listrik terhadap Limfosit dan Makrofag pada Gingiva Tikus Sprague Dawley (The Effect of Electrical Shock Stressor on Lymphocytes and Macrophages in Gingival Tissue of

- Sprague Dawley Rats ). Pustaka Kesehatan. 2016;4(1):48–54.
23. Ronchetti S, Ricci E, Migliorati G, Gentili M, Riccardi C. How glucocorticoids affect the neutrophil life. *Int J Mol Sci.* 2018;19(12):1–12.
24. Ivetic A, Louise H, Green H, Hart SJ. L-selectin : A Major Regulator of Leukocyte Adhesion , Migration and Signaling. *Front Immunol.* 2019;10(1):1–22.
25. Herlambang, Fitri AD, Djauhari HA. Buku pedoman penulisan skripsi. Djauhari HA, Lina, editors. Jambi: Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Jambi; 2017. 17 p.
26. Na'mah NU. Pengaruh murottal al-quran terhadap kadar leukosit mencit (*mus musculus*) jantan yang mengalami stres. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim; 2020.
27. Gazali M, Nurjanah N, Zamani NP. Eksplorasi Senyawa Bioaktif Alga Cokelat *Sargassum* sp. Agardh sebagai Antioksidan dari Pesisir Barat Aceh. *J Pengolah Has Perikan Indones.* 2018;21(1):167–78.
28. Naina Y, Wulandari R, Said T, Yuni N, Rika W, Tengku RIS. Skrining Komponen Bioaktif Ethanol 96 % *Sargassum* sp . sebagai Antibakteri Terhadap *Vibrio Harveyi*. *Intek Akuakultur.* 2019;3(2):22–33.
29. Ardina R, Rosalinda S. Morfologi eosinofil pada apusan darah tepi menggunakan pewarnaan giemsa, wright, dan kombinasi wright-giemsa. *J Surya Med.* 2018;3(2):5–12.
30. Fitri ZE. Klasifikasi trombosit pada citra hapusan darah tepi berdasarkan gray level co- occurrence matrix menggunakan backpropagation. Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya; 2017.
31. Bakhri S. Analisis Jumlah Leukosit Dan Jenis Leukosit Pada Individu Yang Tidur Dengan Lampu Menyala Dan Yang Dipadamkan. *J Media Anal Kesehat.* 2018;1(1):83–91.
32. Berawi KN, Agverianti T. Efek Aktivitas Fisik pada Proses Pembentukan Radikal Bebas sebagai Faktor Risiko Aterosklerosis. *J Major [Internet].* 2017;6(2):86–91. Available from: <http://juke.kedokteran.unila.ac.id/index.php/majority/article/view/1019>
33. Tarigan AP, Harahap NS, Marpaung DR. Pengaruh Pemberian Jus Buah Naga Merah Setelah Latihan Fisik Intensitas Berat Terhadap Jumlah Leukosit. *J Keolahragaan.* 2020;8(2):140–7.
34. Wahid S, Miskad UA. Immunologi lebih mudah dipahami. 1st ed. Wijaya A, editor. Makassar: Brillian Internasional Surabaya; 2016. 13–17 p.
35. Yudhawati R, Prasetyo YD. Immunopatogenesis Penyakit Paru Obstruktif Kronik. *J Respirasi.* 2019;4(1):19–25.
36. Hendrajid Z, Taihuttu YMJ, Laura BS, Latuconsina VZ. Jenis leukosit mencit (*mus musculus*) pasca stres akut dengan perlakuan ekstrak etanol biji pala (*myristica fragrans houtt* ). *Pattimura Med Rev.* 2020;2(2):103–16.
37. Wohleb ES, Mckim DB, Sheridan JF, Jonathan P, Anisman H. Monocyte trafficking to the brain with stress and inflammation : a novel axis of immune-to-brain communication that influences mood and behavior. *Front Neurosci.* 2015;8(January):1–17.
38. Amri F. Farmakologi alprazolam dalam mengatasi gangguan panik. *J Kedokt Syiah Kuala.* 2012;12(3):187–90.

39. Hardiningtyas SD, Purwaningsih S, Handharyani E. Antioxidant activity and hepatoprotective effect of green mangrove leaves. *JPHPI*. 2014;17(1):80–91.
40. Parwata IMO. Flavonoid [Internet]. Universitas Udayana; 2016. Available from: [https://simdos.unud.ac.id/uploads/file\\_pendidikan\\_1\\_dir/c0c585d54a388056ea08899533164330.pdf](https://simdos.unud.ac.id/uploads/file_pendidikan_1_dir/c0c585d54a388056ea08899533164330.pdf)
41. Suhendra CP, Widarta IWR, Wiadnyani S. Pengaruh konsentrasi etanol terhadap aktivitas antioksidan ekstrak rimpang ilalang (*imperata cylindrica* (L) Beauv.) Pada ekstraksi menggunakan gelombang. *J Ilmu dan Teknol Pangan*. 2019;8(1):27–35.
42. Noviyanti. Antioksidan ekstrak etanol daun jambu Brazil batu (*Psidium guineense* L.) Dengan metode DPPH. *J Farm Bahari*. 2016;7(1):29–35.
43. Herold MJ, McPherson KG, Reichardt HM. Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. *Cell Mol Life Sci*. 2006;63(1):60–72.
44. Collins KG, Fitzgerald GF, Stanton C, Ross RP. Looking Beyond the Terrestrial: The Potential of Seaweed Derived Bioactives to Treat Non-Communicable Diseases. *Mar Drugs*. 2016;14(60):1–31.
45. Frankiensztajn LM, Elliott E, Koren O. ScienceDirect The microbiota and the hypothalamus-pituitary-adrenocortical (HPA) axis, implications for anxiety and stress disorders. *Curr Opin Neurobiol* [Internet]. 2020;62(1):76–82. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.12.003>
46. Puspitasari L. Ekstrak etanol daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* R.) 10% menurunkan immobility time dan kadar kortisol tikus jantan galur wistar yang depresi. *Intisari Sains Medis*. 2017;8(1):24–30.
47. Adrielly C, Ferraz A, Gonçalves R, Júnior DO, Picot L, Roberto J, et al. Pre-clinical investigations of  $\beta$ -carboline alkaloids as antidepressant agents: A systematic review. *Fitoterapia* [Internet]. 2019;137(1):1–14. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.10.4196>
48. Primasari N. Gambaran morfologi sel eosinofil dan limfosit pada sediaan apusan darah tipis dalam pewarnaan Giemsa yang diencerkan menggunakan NaCl fisiologis dan aquadest. *Politeknik Kesehatan Kendari*; 2018.
49. Aulia R, Hasan M, Karmil TF. The Number Of Leukocyte And Leukocyte Differential In Broilers That Infected With *Eimeria tenella* And Given Neem Leaf Extract And Jaloh Extract. *J Med Vet*. 2017;11(2):93–9.
50. Karasuyama H, Miyake K, Yoshikawa S, Yamanishi Y. Multifaceted roles of basophils in health and disease. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2018;142(2):370–80. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.10.042>