

IDENTIFIKASI SENYAWA BIOAKTIF TANAMAN *Syzygium aromaticum* SEBAGAI IMUNOSTIMULAN MELALUI TOLL-LIKE RECEPTOR SIGNALING PATHWAY BERDASARKAN INTERAKSI SENYAWA-PROTEIN SECARA *IN SILICO*

Saharani SM^{1*}, Yuniastuti A¹, R. Susanti¹, Nugrahaningsih WH¹

¹Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Semarang
Jl. Raya Sekaran, Gunungpati, Semarang 50229.

*Email: maulidiyy11@students.unnes.ac.id

Abstrak

Penurunan sistem imun pada tubuh dapat meningkatkan risiko terjangkitnya virus SARS-CoV-2. Hal ini dapat dicegah dengan cara meningkatkan sistem imun menggunakan imunostimulan. Salah satu tanaman yang dapat digunakan sebagai imunostimulan adalah tanaman cengkih. Tanaman cengkih mengandung senyawa bioaktif yang berpotensi sebagai imunostimulan yang dapat berperan dalam meningkatkan aktivitas komponen sistem imun tubuh. Tujuan penelitian ini untuk menganalisis penambatan molekuler senyawa bioaktif tanaman cengkih dengan protein target pada jalur pensinyalan imunostimulan secara in silico. Metode penelitian ini deskriptif eksploratif dengan menggunakan software berbasis database online Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases, PubChem, PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) Online, SEA (Similarity Ensemble Approach), Swiss Target Prediction, dan STRING. Tanaman cengkih memiliki 9 senyawa yang berpotensi sebagai imunostimulan yaitu beta sitosterol glucoside, campesterol-3-o-beta-d-glucoside, daucusterol, stigmasterol-3-o-beta-d-glucoside, astragalin, beta sitosterol, strictinin, tannins, dan xylose. Hasil skrining diperoleh jalur pensinyalan imunostimulan melalui KEGG pathway TLR (Toll-like receptor) signaling pathway terdapat 5 protein target yang berperan dalam jalur pensinyalan tersebut yakni MAPK8 (Mitogen-activated protein kinase 8), MAPK9 (Mitogen-activated protein kinase 9), MAPK14 (Mitogen-activated protein kinase 14), MAP2K1 (Mitogen-activated protein kinase kinase 1), dan TNF (Tumor Necrosis Factor), serta terdapat 4 senyawa bioaktif yakni beta sitosterol glucoside, daucusterol, stigmasterol-3-o-beta-d-glucoside, dan astragalin yang memiliki interaksi dengan protein target.

Kata kunci: Cengkih, Imunostimulan, In silico, TLR signaling pathway

1. PENDAHULUAN

Pandemi coronavirus (COVID-19) merupakan penyakit yang disebabkan oleh sindrom pernapasan akut coronavirus 2 (SARS-CoV-2) (Muniyappa dan Gubbi, 2020). COVID-19 perlu diwaspadai karena penularan yang relatif cepat dan memiliki tingkat mortalitas yang tidak dapat diabaikan. Sistem imun tubuh penting untuk di jaga, sehingga diperlukan upaya peningkatan sistem imun tubuh mengingat virus dapat masuk ke dalam tubuh manusia pada saat imun mengalami penurunan (Nurlila dan La Fua, 2020). Menjaga sistem imunitas tubuh sangat penting karena risiko adanya peningkatan kasus corona dapat disebabkan oleh menurunnya imunitas tubuh serta riwayat penyakit lain yang dapat melemahkan tubuh. Sistem imun dapat ditingkatkan dengan mengatur sistem imunitas tubuh dengan menggunakan imunostimulan. Dalam sistem imun terdapat imunostimulan yang bekerja dalam mengaktifkan berbagai elemen dan mekanisme. (Amalia dkk., 2020)

Menurut Martinus dkk. (2019) Imunostimulan atau imunostimulator adalah substansi yang dapat meningkatkan kemampuan sistem imun untuk melawan infeksi dan penyakit dengan meningkatkan aktivitas komponen sistem imun. Mekanisme umum dari imunostimulan yaitu memperbaiki ketidakseimbangan sistem imun dengan meningkatkan imunitas spesifik maupun non spesifik. Sel-sel yang terlibat dalam sistem imun adalah sel T dan sel B. Pada proses perkembangan sel-sel tersebut dapat dilakukan stimulasi dengan suatu imunostimulan (Listiani dan Susilawati, 2013).

Perkembangan genomik, proteomik, bioinformatika, dan teknologi yang efisien atau metode *in silico* mengiringi perkembangan obat-obatan saat ini. Metode *in silico* mampu melakukan skrining koleksi senyawa dan kalkulasi ikatan terkuat antara senyawa bioaktif pada suatu tanaman

dengan protein target dengan berbagai cara skoring. Cara ini digunakan untuk mengeksplorasi suatu senyawa sebagai kandidat obat dan suatu protein tertentu dalam target molekuler. Senyawa bioaktif berperan sebagai ligan yang akan berikatan pada reseptor suatu protein.

Tanaman cengkih (*Syzygium aromaticum*) mengandung eugenol yang digunakan dokter gigi untuk menenangkan saraf gigi. Senyawa dalam minyak cengkih antara lain *eugenol*, *caryophyllene*, *eugenol acetate* dan *alpha humulene* (Rahmawati, 2016). Minyak atsiri dari cengkih mempunyai sifat kimiawi dan efek farmakologis yang berfungsi sebagai anestetik, antimikrobia, antiseptik, antioksidan, dan imunomodulator (Wael dkk., 2018). Sebuah penelitian membuktikan bahwa senyawa *flavonoid* dapat meningkatkan proliferasi limfosit, produksi IL-2 dan aktivasi makrofag. IL-2 merupakan faktor pertumbuhan untuk sel T yang dirangsang dengan adanya antigen dan berperan pada ekspansi klon sel T. Sel T CD4+ kemudian akan berdiferensiasi menjadi Th1 dan Th2. IL-2 juga meningkatkan proliferasi dan diferensiasi sel NK dan sel B (Gunawan, 2013). Berdasarkan hasil penelitian Wael dkk. (2018) menunjukkan bahwa bahan aktif dalam ekstrak daun cengkih berpotensi untuk meningkatkan aktivitas makrofag. Makrofag berperan penting dalam respon imun dalam fagositosis dan sebagai *antigen presenting cell* (APC).

Potensi berbagai macam kandungan senyawa bioaktif dan manfaat tanaman cengkih menjadikan tanaman ini banyak diteliti dan dimanfaatkan untuk pengembangan obat herbal. Belum banyak diteliti, potensi berbagai macam kandungan senyawa bioaktif tanaman cengkih sebagai imunostimulan. Oleh karena itu akan dilakukan penelitian untuk mengetahui aktivitas senyawa bioaktif cengkih sebagai imunostimulan. Pada penelitian ini akan dilakukan uji aktivitas imunostimulan secara *in silico*, karena lebih selektif langsung diuji pada reseptor atau sel target dan akurat (Faridah dkk., 2019).

Tujuan penelitian ini untuk menganalisis penambatan molekuler senyawa bioaktif tanaman cengkih dengan protein target pada jalur pensinyalan imunostimulan secara *in silico*.

2. METODOLOGI

Penelitian ini menggunakan metode penelitian deskriptif eksploratif. Penelitian deskriptif bertujuan untuk menggambarkan keadaan suatu fenomena atau suatu permasalahan dengan jelas. Sedangkan penelitian eksploratif bertujuan untuk memecahkan suatu permasalahan yang belum dipahami sebelumnya. Penelitian deskriptif eksploratif digunakan untuk menemukan sebuah data yang dapat memberikan penjelasan terkait konsep atau pola dalam penelitian.

2.1 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi hardware berupa laptop ASUS A407 M serta *software* berbasis database online yakni *Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases*, PubChem, PASS (*Prediction of Activity Spectra for Substances*) Online, SEA (*Similarity Ensemble Approach*), *Swiss Target Prediction*, dan STRING. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini berupa senyawa bioaktif tanaman cengkih (*Syzygium aromaticum*) yang diperoleh dari database online.

2.2 Prosedur Penelitian

2.2.1 Koleksi Senyawa Bioaktif Cengkih

Senyawa bioaktif yang terdapat pada tanaman cengkih dikoleksi dari database berbasis online yaitu *Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases* dengan menggunakan kata kunci "*Syzygium aromaticum*".

2.2.2 Unifikasi Senyawa Bioaktif Cengkih

Senyawa bioaktif cengkih yang telah dikoleksi dari *Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases* kemudian diunifikasi dengan mengoleksi SMILE masing-masing senyawa menggunakan PubChem.

2.2.3 Uji PASS (*Prediction of Activity Spectra for Substances*) Online

Uji PASS dilakukan untuk mengetahui potensi aktivitas Imunostimulan dari senyawa bioaktif tanaman cengkih yang sudah didapatkan dari prosedur sebelumnya berdasarkan hubungan

antara struktur suatu senyawa dengan aktivitas biologinya. Uji PASS dilakukan dengan memasukkan SMILE senyawa bioaktif.

2.2.4 Prediksi Protein Target

Prediksi protein target dilakukan menggunakan *Swiss Target Prediction* dan SEA, software ini merupakan software berbasis web yang dapat menentukan target dari suatu senyawa berdasarkan kemiripan struktur 2D dan 3D.

2.2.5 Desain Jaringan Interaksi Protein dan Senyawa Bioaktif Cengkih

Pembuatan jejaring interaksi protein dan senyawa bioaktif cengkih bertujuan untuk mengetahui hubungan antar protein target dari senyawa-senyawa tersebut dan menganalisis pathway biologi imunostimulan yang dipengaruhi oleh protein-protein tersebut. Prosedur ini dilakukan menggunakan STRING.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Koleksi senyawa bioaktif pada suatu tanaman menggunakan database berbasis online yang di dalamnya tersedia data terkait tanaman obat, fitokimia dan etnobotani dari berbagai negara di dunia. Database yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases*. Mengoleksi senyawa bioaktif pada tanaman cengkih dengan menggunakan kata kunci “*Syzygium aromaticum*” di laman website <https://phytochem.nal.usda.gov/phytochem/search>. Hasil koleksi senyawa bioaktif pada tanaman cengkih diperoleh sejumlah 22 senyawa yang dapat diunduh dalam bentuk CSV, Excel, atau PDF. Setelah dikoleksi, selanjutnya dilakukan unifikasi untuk memperoleh canonical SMILE yang akan digunakan untuk proses skrining memprediksi potensi senyawa bioaktif. Canonical SMILE diperoleh menggunakan database PubChem dan disajikan dalam tabel berikut (Tabel 1).

Tabel 1. Koleksi dan Unifikasi Senyawa Bioaktif Cengkih (*Syzygium aromaticum*)

Senyawa	Rumus Molekul	Canonical SMILES
<i>1,2,3,4,6-penta-o-galloyl-beta-d-glucose</i>	C41H32O26	<chem>C1=C(C=C(C(=C1O)O)O)C(=O)OCC2C(C(C(C(O)2)OC(=O)C3=CC(=C(C(=C3)O)O)O)OC(=O)C4=C(C(=C(C(=C4)O)O)O)OC(=O)C5=CC(=C(C(=C5)O)O)O)OC(=O)C6=CC(=C(C(=C6)O)O)O</chem>
<i>2-heptanol</i>	C7H16O	<chem>CCCCC(C)O</chem>
<i>2-heptyl-acetate</i>	C9H18O2	<chem>CCCCC(C)OC(=O)C</chem>
<i>2-nonanol</i>	C9H20O	<chem>CCCCCCC(C)O</chem>
<i>2-nonyl-acetate</i>	C11H22O2	<chem>CCCCCCC(C)OC(=O)C</chem>
<i>Ascorbic-acid</i>	C6H8O6	<chem>C(C(C1C(=C(C(=O)O1)O)O)O)O</chem>
<i>Astragalin</i>	C21H20O11	<chem>C1=CC(=CC=C1C2=C(C(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)OC4C(C(C(C(O4)CO)O)O)O)O</chem>
<i>Beta-sitosterol</i>	C29H50O	<chem>CCC(CCC(C)C1CCC2C1(CCC3C2CC=C4C3(CCC(C4)O)C)C)C</chem>
<i>Beta-sitosterol-glucoside</i>	C61H110O7	<chem>CCC(CCC(C)C1CCC2C1(CCC3C2CC=C4C3(CCC(C4)OC5C(C(C(C(O5)CO)O)O)O)C)C)C</chem>
<i>Campesterol-3-o-beta-d-glucoside</i>	C34H58O6	<chem>CC(C)C(C)CCC(C)C1CCC2C1(CCC3C2CC=C4C3(CCC(C4)OC5C(C(C(C(O5)CO)O)O)O)O)C</chem>
<i>Crataegolic-acid</i>	C30H48O4	<chem>CC1(CCC2(CCC3(C(=CCC4C3(CCC5C4(CC(C(C5(C)C)O)O)C)C)C2C1)C)C(=O)O)C</chem>
<i>Daucosterol</i>	C35H60O6	<chem>CCC(CCC(C)C1CCC2C1(CCC3C2CC=C4C3(CCC(C4)OC5C(C(C(C(O5)CO)O)O)O)C)C)C</chem>
<i>Fat</i>	C16H32O2	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)O</chem>
<i>Hyperoside</i>	C21H20O12	<chem>C1=CC(=C(C=C1C2=C(C(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)OC4C(C(C(C(O4)CO)O)O)O)O)O</chem>
<i>Isoquercitrin</i>	C21H20O12	<chem>C1=CC(=C(C=C1C2=C(C(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)OC4C(C(C(C(O4)CO)O)O)O)O)O</chem>

<i>Maslic-acid</i>	C30H48O4	<chem>CC1(CCC2(CCC3(C(=CCC4C3(CCC5C4(CC(C(C5(C)C)O)C)C)C2C1)C)C(=O)O)C</chem>
<i>Quercetin-3,4'-di-o-beta-d-glucoside</i>	C27H30O17	<chem>C1=CC(=C(C=C1C2=C(C(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)OC4C(C(C(C(O4)CO)O)O)O)OC5C(C(C(C(O5)CO)O)O)O</chem>
<i>Stigmasterol-3-o-beta-d-glucoside</i>	C35H58O6	<chem>CCC(C=CC(C)C1CCC2C1(CCC3C2CC=C4C3(CC(C4)OC5C(C(C(C(O5)CO)O)O)C)C)C</chem>
<i>Strictinin</i>	C27H22O18	<chem>C1C2C(C(C(C(O2)OC(=O)C3=CC(=C(C(=C3)O)O)O)O)OC(=O)C4=CC(=C(C(=C4C5=C(C(=C(C=C5C(=O)O1)O)O)O)O)O)O</chem>
<i>Syzyginin-B</i>	C33H24O21	<chem>C1C2C(C(C(C(O2)O)O)OC(=O)C3=CC(=C(C(=C3)O)O)O)OC(=O)C4=CC(=C(C(=C4C5=C6C(=C(C=C5C(=O)O1)O)OC7=C(O6)C=C(C(=C7O)O)O)O)O</chem>
<i>Tannins</i>	C27H24O18	<chem>C1=C(C=C(C(=C1O)O)O)C(=O)OCC2C(C(C(C(O2)OC(=O)C3=CC(=C(C(=C3)O)O)O)O)OC(=O)C4=C(C(=C(C(=C4O)O)O)O)O</chem>
<i>Xylose</i>	C5H10O5	<chem>C1C(C(C(C(O1)O)O)O)O</chem>

Uji PASS Online dilakukan untuk mengetahui potensi aktivitas Imunostimulan dari senyawa bioaktif tanaman cengkih. Aplikasi berbasis web ini memprediksi spektrum aktivitas biologis suatu senyawa berdasarkan strukturnya dan bekerja berdasarkan prinsip bahwa aktivitas biologis suatu senyawa setara dengan strukturnya (Parasuraman, 2011). Uji PASS dilakukan melalui website <http://way2drug.com/PassOnline/predict.php> dengan memasukkan SMILE senyawa bioaktif dalam kolom search dan menunggu hasil running. Hasil uji PASS menunjukkan nilai Pa (*Potential Activity*) dan Pi (*Potential Inhibitory*), kemudian dilakukan analisis. Nilai Pa > 0,7 menunjukkan senyawa memiliki potensi yang tinggi untuk menjadi senyawa bioaktif di uji eksperimen *in vitro* dan atau *in vivo* dan sekaligus memiliki tingkat kemiripan yang tinggi dengan senyawa obat dengan bioaktivitas yang sama. Nilai 0,5 < Pa < 0,7 menunjukkan bahwa senyawa memiliki potensi yang tinggi untuk menjadi senyawa bioaktif di uji eksperimen *in vitro* dan atau *in vivo* dan sekaligus berpotensi dalam pengembangan senyawa obat yang baru dengan bioaktivitas sama. Dan nilai Pa < 0,5 menunjukkan bahwa senyawa memiliki potensi yang rendah untuk menjadi senyawa bioaktif di uji eksperimen *in vitro* dan atau *in vivo* dan sekaligus memiliki potensi yang rendah untuk dikembangkan menjadi senyawa obat. Pada penelitian ini dilakukan skrining senyawa yang memiliki nilai Pa < 0,5.

Berdasarkan hasil skrining senyawa bioaktif cengkih (*Syzygium aromaticum*) yang memiliki bioaktivitas imunostimulan diperoleh 22 senyawa dan terdapat 9 senyawa yang memiliki nilai Pa < 0,5. Hasil uji PASS disajikan dalam tabel berikut (Tabel 2).

Tabel 2. Nilai Hasil Skrining PASS Online

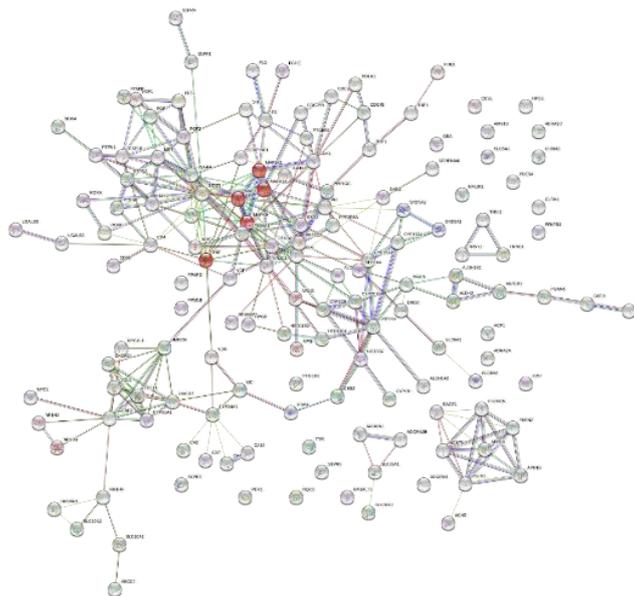
Senyawa	Pa	Aktivitas
<i>Astragalin</i>	0.626	Immunostimulant
<i>Beta-sitosterol</i>	0.615	Immunostimulant
<i>Beta-sitosterol-glucoside</i>	0.778	Immunostimulant
<i>Campesterol-3-o-beta-d-glucoside</i>	0.836	Immunostimulant
<i>Daucosterol</i>	0.778	Immunostimulant
<i>Stigmasterol-3-o-beta-d-glucoside</i>	0.711	Immunostimulant
<i>Strictinin</i>	0.622	Immunostimulant
<i>Tannins</i>	0.645	Immunostimulant
<i>Xylose</i>	0.652	Immunostimulant

Setelah memperoleh nilai Pa dan aktivitas imunostimulan pada senyawa tanaman cengkih, dilakukan koleksi dan prediksi protein target masing-masing senyawa bioaktif untuk mengetahui

jalur imunostimulan yang berpengaruh dengan menggunakan *Swiss Target Prediction* dan SEA, website ini dapat menentukan target dari suatu senyawa berdasarkan kemiripan struktur 2D dan 3D. Di *Swiss Target Prediction*, nilai kesamaan 2D dan kesamaan 3D dihitung terhadap satu set ligan yang diketahui (Gfeller dkk., 2014). SEA merupakan tahapan yang menghubungkan protein satu sama lain berdasarkan kesamaan kimia di antara ligan terikatnya, metode SEA telah berhasil diterapkan dalam identifikasi target baru untuk obat lama untuk prediksi efek samping dan untuk prediksi potensi anatomis (Wang dkk., 2016). *SwissTargetPrediction* dapat diakses pada laman web <http://www.swisstargetprediction.ch/> dan SEA dapat diakses pada laman web <https://sea.bkslab.org/>. Cara penggunaannya dengan memasukkan SMILE senyawa bioaktif dan hasil running-nya. Hasil prediksi protein target menggunakan SEA dibagi menjadi tiga kluster yaitu biru, hijau dan putih. Pada penelitian ini, protein target yang dipilih yang berada di kluster warna biru dan hijau karena menunjukkan ikatan paling kuat dengan senyawa bioaktif. Adapun pada *Swiss Target Prediction*, protein target paling mirip disajikan di urutan teratas hasil prediksi disertai dengan keterangan bar probabilitas berwarna hijau. Semakin tinggi probabilitas maka semakin akurat prediksi protein target. Pada penelitian ini protein target yang dipilih hanya protein yang memiliki probabilitas berwarna hijau. Protein target yang sudah dikoleksi selanjutnya dicari UNIPROT untuk analisis lebih lanjut menggunakan STRING.

Analisis STRING digunakan untuk membuat jejaring interaksi protein dan senyawa bioaktif Cengkih (*Syzygium aromaticum*) bertujuan untuk mengetahui hubungan antar protein target dari senyawa-senyawa tersebut dan menganalisis pathway biologi imunostimulan yang dipengaruhi oleh protein-protein tersebut. Penggunaan analisis dengan menggunakan STRING dalam membentuk jejaring protein dengan cara memasukkan UNIPROT dari koleksi protein target dalam kolom multiple protein dan dipilih spesies human, kemudian running.

Analisis dilakukan dengan mengubah koefisien korelasi yang digunakan pada analisis STRING menjadi 0,7 yang menunjukkan korelasi tinggi. Adapun hasil analisis pathway menggunakan KEGG pathway dan dipilih TLR (*Toll-like Receptor*) signaling pathway karena jalur pensinyalan TLR dalam imunitas bawaan berfungsi melalui induksi aktivitas antimikroba dan produksi sitokin inflamasi (Zayat dkk., 2019). Hasil yang diperoleh berupa protein yang ditandai dengan warna merah yang disajikan dalam (Gambar 1) dan (Tabel 3).



Gambar 1. Hasil Analisis STRING dengan Koefisien Korelasi 0,7

Tabel 3. Hasil Analisis STRING Senyawa Bioaktif dan Protein Target

Senyawa	Protein Target
---------	----------------

<i>Astragalin</i>	TNF
<i>Beta-sitosterol-glucoside</i>	MAPK14
<i>Daucosterol</i>	MAPK14
<i>Stigmasterol-3-o-beta-d-glucoside</i>	MAPK 8 MAPK9 MAPK14 MAP2K1

Hasil analisis STRING TLR (*Toll-like Receptor*) signaling pathway menunjukkan bahwa senyawa *astragalin* memiliki DTP (Direct Protein Target) *Tumor Necrosis Factor* (TNF), senyawa *beta-sitosterol-glucoside* dan *daucosterol* memiliki DTP (Direct Protein Target) *Mitogen Activated Protein Kinase 14* (MAPK14), dan senyawa *stigmasterol-3-o-beta-d-glucoside* memiliki protein target *Mitogen Activated Protein Kinase 8* (MAPK8), *Mitogen Activated Protein Kinase 9* (MAPK9), *Mitogen Activated Protein Kinase 14* (MAPK14), serta *Mitogen Activated Protein Kinase Kinase 1* (MAP2K1).

4. KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa *astragalin*, *beta-sitosterol-glucoside*, *daucosterol*, dan *stigmasterol-3-o-beta-d-glucoside* pada tanaman cengkih (*Syzygium aromaticum*) berpotensi untuk dijadikan senyawa ligan untuk meningkatkan sistem imun melalui aktivitas imunostimulan pada jalur pensinyalan *Toll-like Receptor Signaling pathway* dengan protein target *Tumor Necrosis Factor* (TNF), *Mitogen Activated Protein Kinase 8* (MAPK8), *Mitogen Activated Protein Kinase 9* (MAPK9), *Mitogen Activated Protein Kinase 14* (MAPK14), dan *Mitogen Activated Protein Kinase Kinase 1* (MAP2K1).

DAFTAR PUSTAKA

- Amalia, L., Irwan, and Hiola, F., (2020), Analisis Kekebalan Tubuh untuk Mencegah Penyakit COVID-19, *Jambura Journal*, 2(2).
- Faridah, F., Mumpuni, E., and Yunanto, Y. I., (2019), In-silico Analysis of Chemical Compounds in Green Tea Working on Activators PPAR- γ as Antiobesity, *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 17(2), 251.
- Gfeller, D., Grosdidier, A., Wirth, M., Daina, A., Michielin, O., and Zoete, V., (2014), SwissTargetPrediction: A Web Server for Target Prediction of Bioactive Small Molecules, *Nucleic Acids Research*, 42, pp. W32-W38.
- Gunawan, J. R., (2013), Pengaruh Pemberian Gabungan Ekstrak *Phaleria macrocarpa* dan *Phyllanthus niruri* terhadap Persentase Limfoblas Limpa pada Mencit Balb/c, *Faculty of Medicine Diponegoro University*, pp. 7–19.
- Listiani, N., and Susilawati, Y., (2013), Potensi Tumbuhan Sebagai Imunostimulan, *Farmaka*, 17(2), pp 1–15.
- Martinus, Agustin, T., Dachlan, A. S., and Halim, E., (2019), Penggunaan Imunostimulan Dalam Bidang Dermatovenerologi, *Media Dermato Venereologica Indonesiana*, 46(2), pp. 111–115.
- Muniyappa, R., and Gubbi, S., (2020), COVID-19 pandemic, coronaviruses, and diabetes mellitus, *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 318(5), pp. E736–E741.
- Nurlila, R. U., and La Fua, J., (2020), Jahe Peningkat Sistem Imun Tubuh di Era Pandemi Covid-19 di Kelurahan Kadia Kota Kendari, *Jurnal Mandala Pengabdian Masyarakat*, 1(2), pp. 54–61.
- Parasuraman, S., (2011), Prediction of Activity Spectra for Substances, *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 2(1).
- Rahmawati, F., (2016), Kajian Potensi Wedang Uwuh Sebagai Minuman Fungsional, *Wonderful Indonesia*, 282.

- Wael, S., Mahulette, F., Wilhelmus Watuguly, T., and Wahyudi, D., (2018), Pengaruh Ekstrak Daun Cengkeh (*Syzygium aromaticum*) terhadap Limfosit dan Makrofag Mencit Balb/c, *Traditional Medicine Journal*, 23(2), pp. 79–83.
- Wang, Z., Liang, L., Yin, Z., and Lin, J., (2016), Improving Chemical Similarity Ensemble Approach in Target Prediction, *J.Cheminform*, 8(20).
- Zayat, S. R. E., Sibaii, H., & Mannaa, F. A., (2019), Toll-like Receptors Activation, Signaling, and Targeting: An Overview, *Bulletin of the National Research Centre*, 43(187).