

Profil Proliferasi Sel Limfosit Benalu Batu (*Begonia medicinalis*) Asal Kabupaten Morowali Utara Provinsi Sulawesi Tengah (Lymphocyte Cell Proliferation Profile of *Begonia medicinalis* from North Morowali Regency Central Sulawesi Province)

AKHMAD KHUMAIDI^{1*}, AGUSTINUS WIDODO¹, ARSA WAHYU NUGRAHANI¹, EDIATI SASMITO², NANANG FAKHRUDIN³

¹Jurusan Farmasi, FMIPA Universitas Tadulako, Palu, 94118, Indonesia

²Bagian Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta 55281, Indonesia

³Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta 55281, Indonesia

Diterima: 21 Oktober 2019, Disetujui: 17 April 2020

Abstrak: Benalu batu (*Begonia medicinalis*) asal Morowali Utara secara empiris telah digunakan sebagai obat antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil proliferasi sel limfosit ekstrak dan fraksi benalu batu serta mengukur korelasi kadar flavonoid total terhadap indeks stimulasi proliferasi sel limfosit. Ekstraksi simplisia dilakukan secara maserasi menggunakan metanol. Partisi cair-cair digunakan dalam fraksinasi dengan pelarut n-heksana, etil asetat, dan air secara berurutan. Uji proliferasi sel limfosit menggunakan metode MTT *reduction* dengan seri konsentrasi 10, 20, 50, dan 100 µg/mL. Kadar flavonoid total ekstrak dan fraksi ditetapkan berdasarkan metode kolorimetri. Indeks stimulasi digunakan dalam pengukuran aktivitas proliferasi sel limfosit. Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak metanol, fraksi n-heksana, etil asetat, dan air dapat meningkatkan proliferasi sel limfosit pada seluruh konsentrasi uji. Konsentrasi 100 µg/mL memiliki indeks stimulasi tertinggi pada setiap sampel uji dan nilai indeks stimulasi dari fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, ekstrak metanol, dan fraksi air adalah 10,12; 6,56; 4,82; dan 4,17 secara berturut-turut. Kadar flavonoid total dan indeks stimulasi memiliki korelasi yang sangat rendah ($r=0,082$) dan konsentrasi 10 µg/mL memiliki koefisien korelasi tertinggi ($r^2=0,18$). Hasil penelitian menunjukkan fraksi n-heksana dan fraksi etil asetat dapat dikembangkan sebagai bahan imunostimulansia meskipun memiliki korelasi yang sangat rendah terhadap kadar flavonoid.

Kata kunci: *Begonia medicinalis*, Morowali Utara, proliferasi sel limfosit, indeks stimulasi.

Abstract: Benalu batu (*Begonia medicinalis*) from northern Morowali is empirically used as an anticancer. This study aims to determine the lymphocyte cell proliferation profile of extract and fractions benalu batu as well as to measure the correlation of total flavonoids content against stimulation index proliferation. Maceration is done using methanol. Liquid-liquid partitions are used in fractionation with hexane, ethyl acetate, and water solvents sequentially. Lymphocyte cell proliferation test is using the MTT reduction method with concentration series 10, 20, 50, and 100 µg/mL. The total flavonoid content in extract and fractions are determined by the colorimetric method. The stimulation index is used in measuring the lymphocyte cell proliferation activity. Based on the results, all samples are increasing lymphocyte cell proliferation. The concentration of 100 µg/mL has the highest stimulation index and the stimulation index value of hexane fraction, ethyl acetate fraction, methanol extract, and water fraction are 10.12, 6.56, 4.82, and 4.17, respectively. Total flavonoids content and stimulation index have very low correlation ($r = 0.082$) and concentration of 10 µg/mL have the highest correlation coefficient ($r^2 = 0.18$). The results showed the hexane and ethyl acetate fractions can be developed as immunostimulant material.

Keywords: *Begonia medicinalis*, North Morowali, lymphocyte cell proliferation, stimulation index.

*Penulis korespondensi

E-mail: akhmadkhumaidipalu@gmail.com

PENDAHULUAN

BENALU batu (*Begonia medicinalis*) adalah spesies baru dari familia Begoniaceae (Gambar 1). Tumbuhan ini secara empiris telah digunakan oleh masyarakat suku Wana di Kabupaten Morowali Utara Provinsi Sulawesi Tengah sebagai obat antikanker⁽¹⁾. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak metanol benalu batu memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker leher rahim dan sel kanker payudara⁽²⁾. Hasil *docking* molekuler senyawa glikosida steroid, glikosida flavonoid, glikosida triterpenoid, dan senyawa alkaloid dari tumbuhan benalu batu terhadap ligan erlotinib memiliki potensi yang tinggi untuk dapat dikembangkan sebagai agen antikanker⁽³⁾.

Berdasarkan hal tersebut, ekstrak atau senyawa aktif dari benalu batu memiliki potensi untuk dapat dikembangkan menjadi sediaan farmasi dalam pengobatan penyakit kanker. Namun di sisi lain, penggunaan ekstrak dalam suatu pengobatan dapat memberikan risiko menurunkan sistem imunitas tubuh⁽⁴⁾. Efek ekstrak dalam menurunkan sistem imunitas tubuh merupakan efek yang tidak diharapkan dalam pengobatan penyakit kanker^(5,6).

Hasil-hasil studi menyatakan bahwa penggunaan ekstrak atau fraksi dari suatu tumbuhan dapat mempengaruhi mekanisme pertahanan atau sistem imunitas tubuh baik berupa imunitas spesifik maupun non spesifik. Pengaruh tersebut dapat bersifat meningkatkan respons imun (menstimulasi) atau bersifat menurunkan (mensupresi) respons imun⁽⁷⁾. Hal ini juga didukung oleh penelitian yang menunjukkan bahwa subfraksi-subfraksi yang berasal dari ekstrak bahan alam yang sama (ekstrak etil asetat) dapat bersifat imunostimulator sedangkan subfraksi yang lainnya bersifat immunosupresor⁽⁸⁾. Oleh sebab itu, banyak penelitian saat ini difokuskan pada tumbuhan yang memiliki efek dapat memodulasi respons imun yang jelas yang selanjutnya dapat digunakan untuk



Gambar 1. *Begonia medicinalis*.

mengurangi resiko berbagai penyakit antara lain mengurangi reaksi inflamasi sampai kanker⁽⁹⁾.

Berdasarkan hal itu, sangatlah penting untuk mengetahui secara pasti bagaimana pengaruh pemberian suatu ekstrak/fraksi dari bahan alam terhadap respons imunitas tubuh melalui aktivitas proliferasi sel limfosit. Oleh karenanya penelitian ini bertujuan untuk melakukan eksplorasi aktivitas proliferasi sel limfosit dari ekstrak dan fraksi benalu batu secara *in vitro* serta mengukur korelasi kadar flavonoid total terhadap indeks stimulasi proliferasi sel limfosit.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Media RPMI-1640 (Gibco, Amerika Serikat), hepes (N-2- hidroksietilpiperazin - N'-2 - etansulfonat) (Sigma-Aldrich, Jerman), natrium bikarbonat (Sigma-Aldrich, Jerman), *fetal bovine serum* (FBS) (Gibco, Amerika Serikat), penstrep (Sigma-Aldrich, Jerman), fungison (Gibco, Amerika Serikat), *sodium dodecyl sulfate* (SDS) (Merck, Jerman), Tween 80 (Merck, Jerman), MTT (3 - (4,5 - dimetiltiazol - 2 - il) - 2,5 - difeniltetrazolium bromida) (Merck, Jerman), vaksin hepatitis B (Havrix® Glaxo Smith Kline, Inggris), dapar tris amonium klorida (Merck, Jerman).

Hewan Uji. Hewan uji yang digunakan adalah mencit jantan galur BALB/c usia 8-12 minggu dengan berat 20-30 g yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.

METODE. Pembuatan Ekstrak Metanol. Sampel benalu batu asal Morowali Utara terlebih dahulu dilakukan pencucian dan perajangan lalu dikeringkan. Selanjutnya rajangan simplisia kering benalu batu dengan berat 168,84 g dimaserasi dengan pelarut metanol sebanyak 9 liter selama 3 x 24 jam dan dilakukan remaserasi satu kali. Sari metanol yang diperoleh diuapkan dengan *rotary evaporator*; kemudian ekstrak dikeringkan.

Partisi Ekstrak Metanol. Ekstrak metanol benalu batu (15 g) dibuat menjadi fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air dengan metode partisi cair-cair. Fraksi n-heksana dibuat dengan cara ekstrak metanol dilarutkan dengan metanol 70% lalu dimasukkan ke dalam corong pisah. Selanjutnya dilakukan partisi cair-cair menggunakan n-heksana dengan perbandingan 1 : 1 dengan cara dikocok secara terus menerus ± 10 menit, lalu didiamkan sampai terpisah sempurna antar kedua pelarut. Bagian n-heksana ditampung dalam cawan porselin dan bagian metanol dipartisi lagi dengan n-heksana secara berulang kali

sampai pada bagian n-heksana terlihat bening dan tidak menunjukkan sisa ketika diuapkan. Bagian yang larut n-heksana diuapkan hingga n-heksana menguap seluruhnya dan bagian ini disebut sebagai fraksi n-heksana. Partisi selanjutnya dilakukan dengan menggunakan pelarut etil asetat yang selanjutnya akan menyisakan (menghasilkan) fraksi air.

Pengujian Aktivitas Imunomodulator (in vitro). Kultur sel dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada. Metode isolasi sel limfosit serta uji proliferasi sel limfosit menggunakan metode MTT *reduction*^(8,10).

Suspensi Sampel Uji. Pembuatan suspensi induk dibuat dengan cara sebanyak 2 mg masing-masing sampel ditambahkan 1 mL larutan 0,5% Tween 80 (dilakukan sentrifugasi panas dengan suhu 40-60°C). Selanjutnya diaduk sampai homogen kemudian ditambahkan 1 mL (1 mg/mL) dengan larutan RPMI komplit (mengandung FBS 10% v/v) dan divortex sampai homogen. Diperoleh konsentrasi suspensi 1 µg/µL, disebut sebagai suspensi induk. Kemudian dibuat suspensi dengan dosis 10, 20, 50 dan 100 µg/mL.

Isolasi Sel Limfosit. Mencit yang dianestesi dengan ketamin : xylasin (10 : 1) secara intraperitoneal sebanyak 100 µL, selanjutnya dilakukan dislokasi bagian leher (Rekomendasi Persetujuan Etik Nomor : 103/SR/KEPK/UA-FK/V/2017 oleh Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Alkhairaat). Selanjutnya kulit bagian perut dibuka dan dibersihkan selubung peritoneumnya dengan alkohol 70%. Limpa diambil dan diletakkan dalam cawan petri diameter 50 mm yang berisi 10 mL media RPMI. Media RPMI dipompakan ke dalam limpa sehingga limfosit ikut keluar bersama media. Suspensi sel dimasukkan dalam tabung sentrifus 10 mL dan disentrifus pada 1.500 rpm 4 °C selama 10 menit.

Pelet yang diperoleh disuspensikan dalam 5 mL dapar tris amonium klorida untuk melisis eritrosit. Sel dicampur hingga homogen dan didiamkan pada suhu ruang selama 15 menit atau sampai warnanya berubah menjadi agak kekuningan. Selanjutnya ditambahkan media RPMI hingga 10 mL, disentrifugasi pada 1.500 rpm 4°C selama 10 menit, kemudian supernatan dibuang. Pelet yang didapat dicuci 2 kali dengan media RPMI untuk menghilangkan eritrosit yang ada sehingga diperoleh pelet yang berwarna putih. Setelah itu, pelet yang mengandung sel limfosit disuspensikan dengan media RPMI komplit. Sel dihitung dengan hemositometer sehingga diperoleh 1,5x10⁶ sel/mL. Sel limfosit siap untuk diuji aktivitasnya dan dikultur dalam inkubator CO₂ suhu 37 °C.

Uji Proliferasi Sel Limfosit dengan Metode MTT Reduction. Sebanyak 100 µL sel limfosit (1,5 x10⁶/mL) didistribusikan ke dalam sumuran mikroplat 96-wells sesuai dengan kelompok perlakuan, kemudian ditambahkan vaksin hepatitis B sebanyak 10 µL/sumuran dan diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO₂ dengan aliran 5% CO₂ pada suhu 37°C. Setelah inkubasi ditambahkan sampel uji sebanyak 10 µL/sumuran dengan masing-masing konsentrasi, diinkubasi lagi selama 48 jam dalam inkubator dengan aliran 5% CO₂ pada suhu 37 °C. Setelah inkubasi 48 jam, setiap sumuran ditambahkan larutan 10 µL MTT 5 mg/mL. Selanjutnya diinkubasi lagi 4 jam pada suhu 37 °C. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk kristal formazan. Reaksi dengan MTT dihentikan dengan menambah larutan SDS 10 % dalam asam klorida 0,01 N sebanyak 50 µL pada tiap sumuran. Selanjutnya diukur absorbansinya dengan mikroplat *reader* dengan panjang gelombang 550 nm. Data absorbansi kemudian dikonversi menjadi data indeks stimulasi (IS) proliferasi sel limfosit menurut persamaan berikut⁽¹¹⁾:

$$IS \text{ proliferasi} = \frac{\text{Absorbansi (Sampel - Kontrol Medium)}}{\text{Absorbansi (Kontrol Normal - Kontrol Medium)}}$$

Kadar Flavonoid Total dan Korelasinya dengan Indeks Stimulasi. Total flavonoid dari ekstrak/fraksi dihitung berdasarkan metode kolorimetri⁽¹²⁾. Kuersetin digunakan untuk membuat kurva kalibrasi. Dari larutan kuersetin induk (dalam metanol) dibuat seri konsentrasi 5, 10, 20, 40, dan 80 ppm. Larutan standar kuersetin selanjutnya diambil 1 mL lalu ditambahkan 3 mL metanol; 0,1 mL AlCl₃ 10%; 0,1 mL kalium asetat; dan 2,8 mL akuadestilata. Larutan kemudian disimpan 30 menit pada tempat gelap dengan suasana suhu kamar, absorbansinya diukur pada spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum (430 nm). Metode yang sama digunakan untuk menentukan kadar flavonoid total ekstrak/fraksi. Total flavonoid sampel dihitung ekuivalen dengan gram kuersetin/100 gram sampel. Data dibuat tiga kali replikasi. Korelasi antara kadar flavonoid total dengan indeks stimulasi proliferasi sel limfosit dianalisis dengan menggunakan korelasi Pearson dan regresi⁽¹³⁾.

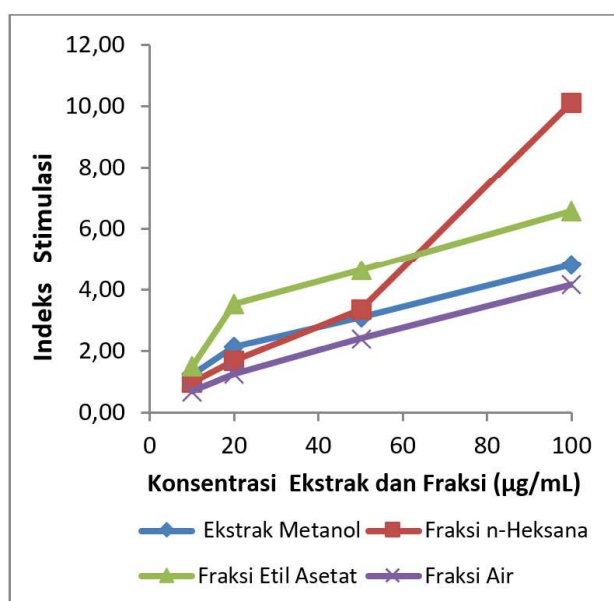
HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi dan Fraksinasi. Hasil maserasi simplisia benalu batu asal Morowali Utara yang telah teridentifikasi sebagai *Begonia* spesies baru diperoleh ekstrak metanol seberat 22,77 g dengan persen rendemen sebesar 13,49%. Hasil partisi (ekstraksi cair-cair menggunakan corong pisah) ekstrak metanol

yang disuspensikan dengan metanol 70 % diperoleh fraksi n-heksana seberat 9,47 g dengan persen rendemen 63,13%, fraksi etil asetat seberat 3,69 g dengan persen rendemen 24,6%, dan fraksi air seberat 1,47 g dengan persen rendemen 9,8%.

Hasil perlakuan dengan menggunakan corong pisah tersebut diperoleh persen *recovery* sebesar 97,53%. Hal ini menunjukkan bahwa hanya sedikit senyawa yang hilang dari proses partisi yang dapat dimungkinkan dari masih adanya pelarut ekstrak metanol tersisa dari ekstrak metanol yang dipartisi. Dari persen rendemen yang diperoleh dapat diketahui bahwa kecenderungan senyawa yang dikandung oleh *Begonia medicinalis* lebih larut ke dalam pelarut n-heksana. Ini menggambarkan *Begonia medicinalis* lebih banyak mengandung senyawa-senyawa yang bersifat nonpolar daripada yang polar. Hasil partisi dengan menggunakan pelarut n-butanol yang telah dilakukan (sebelumnya) menghasilkan sangat sedikit fraksi n-butanol sehingga akan menyulitkan dalam proses pengujian, maka fraksi tersebut digabung dengan fraksi yang larut ke dalam pelarut air.

Proliferasi Sel Limfosit. Profil aktivitas proliferasi masing-masing sampel uji dapat dilihat pada grafik (Gambar 2). Grafik indeks stimulasi proliferasi sel limfosit tersebut memberikan gambaran bahwa dengan menambahkan ekstrak metanol maupun fraksi n-heksana, etil asetat, dan fraksi air dapat memicu aktivitas proliferasi sel limfosit dengan r^2 masing-masing 0,979; 0,962; 0,898; dan 0,996 secara berurutan. Semua aktivitas yang dihasilkan bersifat meningkatkan proliferasi sel

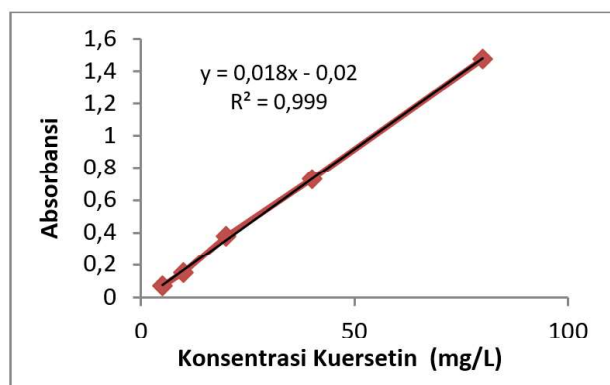


Gambar 2. Grafik hubungan konsentrasi sampel uji dengan indeks stimulasi.

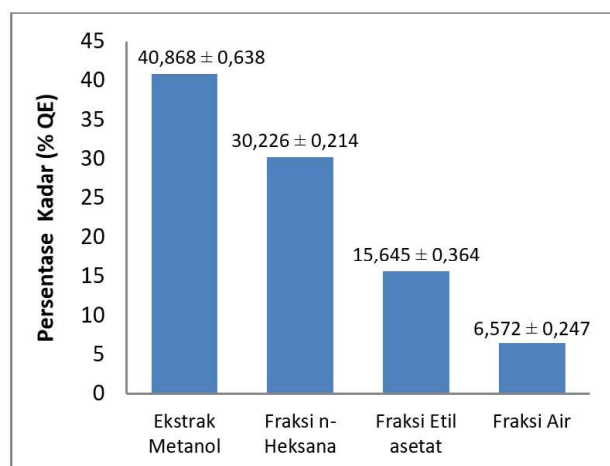
limfosit (imunostimulator) dan tidak ada yang bersifat mensupresi sel limfosit.

Melalui grafik pada Gambar 2, diketahui pada konsentrasi 10, 20, hingga 50 µg/mL fraksi etil asetat lebih cenderung memberikan stimulasi tertinggi pada sel limfosit jika dibandingkan sampel uji yang lainnya. Namun, pada konsentrasi 100 µg/mL fraksi n-heksana memberikan indeks stimulasi tertinggi diantara semua sampel uji. Hal ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi tertentu (konsentrasi relatif lebih besar) memberikan stimulasi yang lebih baik yang dapat dikaitkan dengan semakin tingginya konsentrasi senyawa yang memberikan kontribusi terhadap aktivitas proliferasi sel limfosit, maka aktivitas peningkatan proliferasi juga semakin tinggi.

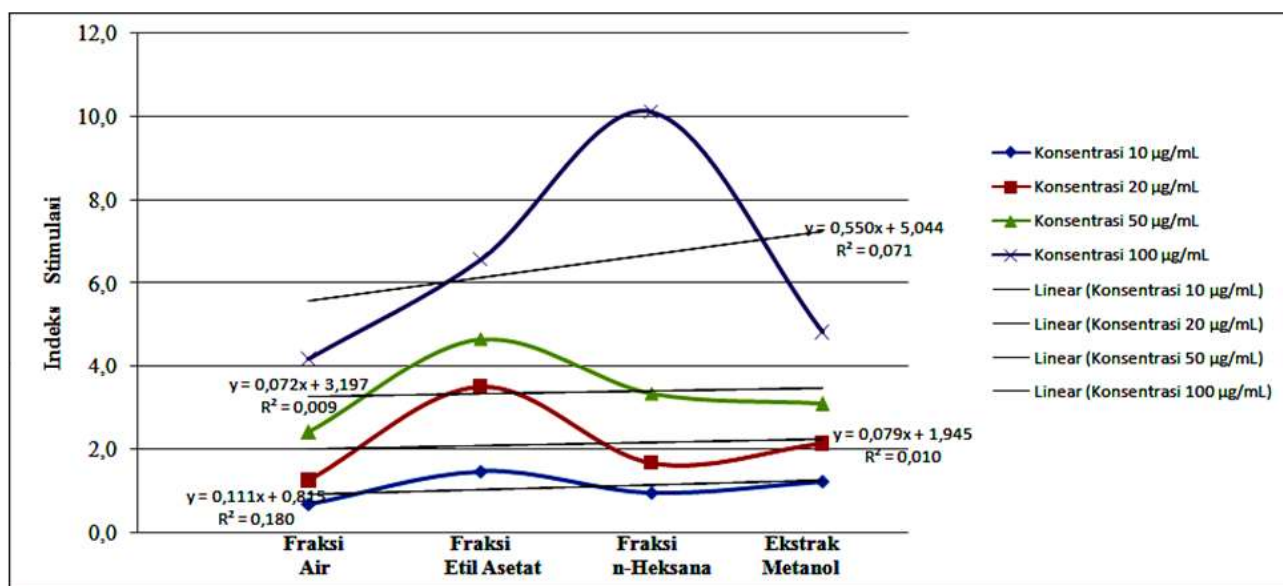
Kadar Flavonoid Total dan Korelasinya dengan Indeks Stimulasi. Penentuan kadar flavonoid total sampel (ekstrak/fraksi) benalu batu mengikuti persamaan pada Gambar 3. Berdasarkan kurva kalibrasi tersebut, diperoleh kadar flavonoid ekstrak dan fraksi benalu batu seperti pada Gambar 4. Berdasarkan Gambar 4, diketahui bahwa ekstrak metanol sebagai *crude* ekstrak memiliki kadar



Gambar 3. Kurva kalibrasi kuersetin.



Gambar 4. Diagram kadar flavonoid total sampel (QE : Quercetin Equivalent).



Gambar 5. Diagram hubungan kadar flavonoid total sampel vs indeks stimulasi.

flavonoid total yang lebih besar jika dibandingkan dengan hasil fraksinasi. Kadar flavonoid total fraksi n-heksana menunjukkan kadar flavonoid total yang lebih besar jika dibandingkan dengan fraksi etil asetat dan fraksi air. Fakta ini menunjukkan adanya pengaruh pelarut metanol 70% dalam membantu melarutkan senyawa flavonoid yang ada pada *crude* ekstrak⁽¹⁴⁾. Meskipun hasil ini berbeda dengan hasil fraksinasi yang umumnya lebih banyak pada fraksi etil asetat⁽¹⁵⁾.

Korelasi antara kadar flavonoid total dan indeks stimulasi untuk setiap konsentrasi uji dapat dilihat pada Gambar 5. Berdasarkan analisis, nilai korelasi Pearson yang diperoleh memiliki korelasi positif yang ditunjukkan dengan nilai r sebesar 0,082. Nilai ini menggambarkan korelasinya masuk dalam kategori yang sangat rendah atau bahkan cenderung dapat diabaikan^(16,17). Hasil analisis regresi pada konsentrasi 10 µg/mL memiliki koefisien korelasi 0,18. Hal ini menunjukkan bahwa 18% aktivitas proliferasi sel limfosit adalah hasil kontribusi dari senyawa flavonoid, sedangkan 82% lainnya hasil kontribusi dari senyawa lain selain flavonoid⁽¹⁸⁾.

Koefisien-koefisien korelasi pada konsentrasi 20, 50, dan 100 µg/mL adalah sebesar 1%; 0,9%; dan 7,1% secara berturut-turut. Hasil ini sejalan dengan penelitian Chiang *et al.* (2003), senyawa flavonoid dengan konsentrasi di bawah 20 µg/mL dapat memberikan efek meningkatkan proliferasi sel limfosit⁽¹⁹⁾. Hal ini berbeda dengan Ilina *et al.* (2019) yang menyatakan bahwa ekstrak dengan kandungan flavonoid tertinggi memberikan aktivitas yang tinggi terhadap proliferasi sel limfosit⁽²⁰⁾.

Aktivitas proliferasi sel limfosit dari sampel uji dipengaruhi oleh kandungan kimia yang terdapat dalam setiap sampel (ekstrak/fraksi). Pada fraksi n-heksana hasil uji komponen kimia secara kromatografi lapis tipis menunjukkan hasil yang positif mengandung golongan senyawa steroid dan flavonoid (data KLT tidak ditampilkan), sedangkan pada fraksi etil asetat dengan cara yang sama, positif mengandung senyawa terpenoid dan flavonoid (data KLT tidak ditampilkan). Senyawa triterpenoid pentasiklik seperti asam oleanolat (asam 3-hidroksi, 12(13)-en, 28-oleanolat) dengan rumus molekul $C_{30}H_{48}O_3$ dapat menstimulasi peningkatan proliferasi sel limfosit^(21,22). Selain itu, hasil penelitian Cholakova *et al.* (2002) menyatakan bahwa senyawa terpenoid dan flavonoid dapat meningkatkan proliferasi sel limfosit⁽²³⁾.

Disisi lain, terdapat golongan senyawa triterpen yang memiliki aktivitas yang kuat dalam menghambat proliferasi sel limfosit manusia serta mengurangi pertumbuhan kanker pada manusia^(3,24,25). Fakta ini mengindikasikan secara kuat untuk mempelajari lebih lanjut mengenai aktivitas subfraksi (hasil fraksinasi lanjutan dari fraksi) dan isolat yang berasal dari *Begonia medicinalis* guna mengidentifikasi senyawa yang memiliki efek toksik pada sel kanker dan efek sitoprotektif dalam sel normal serta yang bertanggung jawab terhadap stimulasi proliferasi sel limfosit yang ditunjukkan pada hasil penelitian ini.

Berdasarkan kajian literatur, senyawa flavonoid baicalin dan baicalein dapat memberikan efek meningkatkan proliferasi sel limfosit, namun senyawa flavonoid lain seperti luteolin justru bersifat menghambat proliferasi sel limfosit⁽²⁶⁾. Flavonoid

dapat mempengaruhi aktivitas protein tirosin kinase, tetapi protein tirosin kinase dari sumber seluler yang berbeda tidak secara seragam dipengaruhi oleh berbagai flavonoid⁽²⁷⁾. Selain itu, senyawa flavonoid dapat menekan aktivitas mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) dalam sel Th (sel T *helper*) dengan cara menginduksi sel Treg sehingga justru dapat menekan respons imun.

Secara umum senyawa flavonoid dapat memodulasi respons imun, meskipun mekanisme molekuler yang tepat yang terlibat dalam perubahan ini belum dipahami dengan baik^(28,29). Peran yang berbeda juga ditunjukkan oleh senyawa steroid seperti cucurbitacin yang lebih bersifat immunosupresif baik secara *in vitro* maupun *in vivo*, namun mekanisme yang mendasarinya belum sepenuhnya dipahami^(30,31).

SIMPULAN

Ekstrak metanol, fraksi n-heksana, etil asetat, dan air *Begonia medicinalis* memberikan peningkatan terhadap proliferasi sel limfosit (imunostimulator) dan tidak ada yang bersifat mensupresi sel limfosit. Ekstrak dan fraksi pada konsentrasi 100 µg/mL memberikan indeks stimulasi tertinggi. Kadar flavonoid total dan indeks stimulasi memiliki korelasi yang sangat rendah ($r=0,082$) dan konsentrasi 10 µg/mL memiliki koefisien korelasi tertinggi ($r^2=0,18$).

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami ucapkan kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi atas pendanaan penelitian ini dan Pimpinan/Staf Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada tempat dilaksanakannya penelitian serta Bapak Wisnu Handoyo Ardi pada Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya LIPI atas identifikasi tumbuhan yang digunakan pada penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Ardi WH, Zubair SM, Ramadanil & Thomas DC. *Begonia medicinalis* (Begoniaceae), a new species from Sulawesi, Indonesia. *Phytotaxa*. 2019;423(1):041-5. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.423.1.5>.
- Anam S, Yuliet, Ritna A, Dwimurti F, Rismayanti D, Zubair, MS. Aktivitas sitotoksik ekstrak metanol benalu batu (*Begonia* sp.) : ethnomedicine Suku Wana Sulawesi Tengah. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 2014;12(1):10-6. <http://jifi.farmasi.univpancasila.ac.id/index.php/jifi/article/view/176>.
- Zubair MS, Anam S, Khumaidi A, Susanto Y, Hidayat M, & Ridhay A. Molecular docking approach to identify potential anticancer compounds from *Begonia* (*Begonia* sp). *AIP Conference Proceedings*. 2016; 1755(1):1-7. <https://doi.org/10.1063/1.4958513>.
- Venkatesha SH, Astry B, Nanjundiah SM, Kim HR, Rajaiah R, Yang Y, Tong L, Yu H, Berman BM, Moudgil KD. Review : Control of autoimmune arthritis by herbal extracts and their bioactive components. *Asian Journal of Pharmaceutical Science*. 2016;11(2):301-7. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2016.02.003>.
- Zhang H, Chen J. Current status and future directions of cancer immunotherapy. *Journal of Cancer*. 2018; 9(10):1773-81. doi: 10.7150/jca.24577.
- Ménétrier-Caux C, Ray-Coquard I, Blay JY & Caux C. Lymphopenia in cancer patients and its effects on response to immunotherapy: an opportunity for combination with cytokines?. *Journal for Immuno Therapy of Cancer*. 2019;7(1):1-15. <http://dx.doi.org/10.1186/s40425-019-0549-5>.
- Mikhaeil BR, Badria FA, Maatooq GT, & Ameer MA. Antioxidant and immunomodulatory constituents of henna leaves. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences*. 2004;59(7-8):468-76. <http://doi.org/10.1515/znc-2004-7-803>.
- Khumaidi A, Hertiani T, & Sasmito E. Analisis korelasi antara efek proliferasi limfosit dengan kandungan fenolik dan flavonoid subfraksi etil asetat *Myrmecodia tuberosa* (Non Jack) Bl. secara *in vitro* pada mencit BALB/c. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 2015; 13(1): 102-7. <http://jifi.farmasi.univpancasila.ac.id/index.php/jifi/article/view/132>.
- Huang CF, Lin SS, Liao PH, Young SC, & Yang CC. The immunopharmaceutical effects and mechanism on herb medicine. *Cellular & Molecular Immunology*. 2008;5(1):23-31. <http://www.cmi.ustc.edu.cn/5/1/23.pdf>.
- Hertiani T, Sasmito E, Sumardi, & Ulfah M. Preliminary studi on immunomodulatory effect of sarang semut tubers *Myrmecodia tuberosa* and *Myrmecodia pendens*. *On Line Journal of Biological Sciences*. 2010;10(3):136-41. doi : 10.3844/ojbsci.2010.136.141. <https://thescipub.com/abstract/10.3844/ojbsci.2010.136.141>.
- Saraphanchotiwitthaya A, Ingkaninan K, & Sripalakit P. 2007. Immunomodulating activity of thai rejuvenating plants. *Naresuan University Journal*. 2007;15(3):149-57.
- Chang CC, Yang MH, Wen HM, & Chern JC. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2002;10(3):178-82.
- Munawaroh R, Siswadi, Setyowati EP, Murwanti R, & Hertiani T. Correlation between total flavonoid contents and macrophage phagocytosis activity of

- fractions from faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br.) barks ethanolic extract in vitro. *Traditional Medicine Journal*. 2018;23(1):47-55. <https://doi.org/10.22146/mot.30882>.
14. Do QD, Angkawijaya AE, Tran-Nguyen PL, Huynh LH, Soetaredjo FE, Ismadji S, & Ju Y. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2014;22(3):296-302. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001>.
 15. Nastiti K, Sudarsono, & Nugroho AE. Evaluation of in vitro immunomodulatory effect of fractions of *Ficus septica* Burm. F. and their total flavonoid and phenolic contents. *International Food Research Journal*. 2014;21(5):1981-7.
 16. Schober P, Boer C, & Schwarte LA. Correlation coefficients: appropriate use and interpretation. *Anesthesia & Analgesia*. 2018;126(5):1763-8. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000002864>.
 17. Akoglu H. User's guide to correlation coefficients. *Turkish Journal of Emergency Medicine*. 2018;18(3):91-3. <https://doi.org/10.1016/j.tjem.2018.08.001>.
 18. Rohman A, Riyanto S, & Hidayati NK. Aktivitas antioksidan, kadar fenolik total, dan flavonoid total daun mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). *Agritech*. 2007;27(4):147- 51.
 19. Chiang LC, Ng LT, Chiang W, Chang MY, & Lin CC. Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of plantago species. *Planta Med*. 2003;69(7):600-4.
 20. Ilina T, Kashpur N, Granica S, Bazytko A, Shinkovenko I, Kovalyova A, Goryacha O, & Koshovyi O. Phytochemical profiles and in vitro immunomodulatory activity of ethanolic extracts from *Galium aparine* L. *Plants*. 2019;8(12):541-53. <https://doi.org/10.3390/plants8120541>.
 21. Ayatollahi AM, Ghanadian M, Afsharypour S, Abdella OM, Mirzai M, & Askari G. Pentacyclic triterpenes in *Euphorbia microsciadia* with their T-cell proliferation activity. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2011;10(2): 287-94.
 22. Rios JL. Effect of triterpenes on the immune system. *Journal of Ethnopharmacology*. 2010;128(1):1-14. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.12.045>.
 23. Cholakova M, Christov V, Dimitrova D, Evstatieva L, Alexandrova R, Nikolova E. Flavonoid and terpenoid isolated from *Loranthus europaeus* with stimulatory effect on lymphocyte proliferation. *Experimental Pathology and Parasitology*. 2002;5(9):45-8.
 24. Moiteiro C, Justino F, Tavares R, Marcelo Curto MJ, Florencio MH, Nascimento M, Pedro M, Cerqueira F, Pinto MM. Synthetic secofriedelane and friedelane derivatives as inhibitor of human lymphocyte proliferation and growth of human cancer cell lines in vitro. *Journal of Natural Products*. 2001;64(10): 1273-7.
 25. Arokiyaraj S, Perinbam K, Agastian P, Balaraju K. Immunosuppressive effect of medicinal plants of kolli hills on mitogen-stimulated proliferation of the human peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Indian Journal of Pharmacology*. 2007;39(4):180-3. doi: 10.4103/0253-7613.36535.
 26. Chiang LC, Ng LT, Chiang W, Chang MY, & Lin CC. Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of plantago species. *Planta Med*. 2003;69(7):600-4. <https://doi.org/10.1055/s-2003-41113>.
 27. Middleton JRE, Kandaswami C, & Theoharides TC. Review : the effect of plant flavonoids on mammalian cells : implication for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*. 2000;52(4):673-751.
 28. Hosseinzade A, Sadeghi O, Biregani AN, Soukhtehzari S, Brandt GS, & Esmailzadeh A. Immunomodulatory effects of flavonoids: possible induction of T CD4+ regulatory cells through suppression of mTOR pathway signaling activity. *Frontiers in Immunology*. 2019;10(51):1-12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00051>.
 29. Saxton RA, & Sabatini DM. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell*. 2017;168(6): 960-76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004>.
 30. Wang L, Li C, Lin Q, Zhang X, Pan H, Xu L, Shi Z, Ouyang D, & He X. Cucurbitacin E suppresses cytokine expression in human Jurkat T cells through down-regulating the NF-κB signaling. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2015;47(6): 459–65. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmv030>.
 31. Rasheed A, & Qasim M. A review of natural steroids and their applications. *International Journal of Pharmaceutical Science and Research*. 2013;4(2): 520-31. [http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.4\(2\).520-31](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.4(2).520-31).