



Artikel Penelitian

Aktivitas Immunostimulan Ekstrak Metanol Biji Kurma (*Phoenix dactylifera*) secara In Silico terhadap Reseptor GIF dan COX-2 serta Uji In Vitro melalui Proliferasi Sel Limfosit Mencit

Siti Warnasih^{1*}, Tamimah Shafwatul Ishlah¹, Novitasari¹, Dianda Namira Azzahra¹, Gita Syahputra^{2*}¹Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pakuan, Bogor, Indonesia, 16144²Pusat Riset Vaksin dan Obat, Badan Riset dan Inovasi Nasional, Bogor, Indonesia, 16911**INFO ARTIKEL****ABSTRAK****Sejarah Artikel**

Diterima 24 November 2021

Direvisi 04 Juli 2022

Tersedia online 04 Januari 2023

* Penulis korespondensi:
siti.warnasih@unpak.ac.id;

Dates (Phoenix dactylifera) is one of the very useful plants, but the date palm seeds that become waste have not been widely used. Based on studies, it is known that date palm seeds contain bioactive compounds that can be suspected as antioxidants, antimicrobials, and anti-inflammatory. However, research on immunostimulants from dates, especially in silico and in vitro, has not been widely carried out. Therefore, the purpose of this research is to determine the potential of date seed bioactive compounds as immunostimulants in silico against Human Glycosylation-Inhibiting Factor (GIF) (ID: 1GIF) and Human Cyclooxygenase-2 (COX-2) (ID: 5IKR) receptors as well as in vitro through the proliferation of lymphocyte cells of male mice (Mus musculus) balb/c strains with the MTT Assay methods. The results of the in silico study showed that 5-O-caffeoylshikimic acid had the highest interaction and stability, Gibbs free energy with 1GIF and 5IKR receptors, at -6.68 kcal/mol and -8.58 kcal/mol, respectively. This value is known to be higher than that of caffeic acid as a control ligand. The results of in vitro research obtained methanol extract of date seeds at a concentration series of 6.25, 12.5, and 25 µg/mL had higher lymphocyte cell proliferation activities, which were indicated by an increasing OD value, and at a concentration of 25 µg/mL produces the highest immunostimulant activity. Therefore, date seed extract containing the compound 5-O-caffeoylshikimic acid can potentially be an immunostimulant agent.

Keywords: 5-O-caffeoylshikimic acid, date palm seeds, immunostimulant, in silico, in vitro

Kurma (*Phoenix dactylifera*) merupakan salah satu tanaman yang sangat bermanfaat, akan tetapi biji kurma yang menjadi limbah belum banyak dimanfaatkan. Berdasarkan data penelitian diketahui bahwa pada biji kurma terdapat senyawa bioaktif yang berpotensi sebagai antimikroba, antioksidan, dan antiinflamasi. Tetapi penelitian tentang imunostimulan dari biji kurma khususnya secara *in silico* dan *in vitro* belum banyak dilakukan. Maka dari itu, tujuan penelitian ini adalah menentukan potensi senyawa bioaktif biji kurma sebagai imunostimulan secara *in silico* terhadap reseptor *Human Glycosylation-Inhibiting Factor* (GIF) (ID: 1GIF) dan *Human Cyclooxygenase-2* (COX-2) (ID: 5IKR) serta *in vitro* menggunakan metode MTT Assay melalui aktivitas proliferasi sel limfosit mencit jantan (*Mus musculus*) galur balb/c. Hasil penelitian *in silico* diperoleh ligan 5-O-caffeoylshikimic acid memiliki interaksi dan kestabilan paling tinggi, energi bebas Gibbs dengan reseptor 1GIF dan 5IKR berturut-turut bernilai -6,68 kkal/mol dan -8,58 kkal/mol. Nilai tersebut diketahui lebih tinggi dari pada ligan kontrol *caffeic acid*. Hasil penelitian *in vitro* diperoleh ekstrak metanol biji kurma pada seri konsentrasi 6,25; 12,5; dan 25 µg/mL memiliki aktivitas proliferasi sel limfosit yang semakin tinggi ditandai dengan nilai OD (*Optical Density*) yang semakin meningkat, dan pada konsentrasi 25 µg/mL menghasilkan aktivitas imunostimulan

tertinggi. Dengan demikian, ekstrak biji kurma yang mengandung senyawa 5-O-*caffeoylshikimic acid* dapat berpotensi sebagai agen imunostimulan.

Kata Kunci: 5-O-*caffeoylshikimic acid*, biji kurma, imunostimulan, *in silico*, *in vitro*

1. Pendahuluan

Penyakit infeksi merupakan salah satu masalah dalam bidang kesehatan yang terus berkembang, dapat disebabkan oleh mikroorganisme patogen, seperti bakteri, virus, parasit, atau jamur. Saat ini penyakit infeksi yang sedang merebak adalah penyakit akibat *Coronavirus Disease 2019* (COVID-19). Pada tanggal 14 Maret 2020, COVID-19 diumumkan sebagai pandemi oleh *World Health Organization* (WHO) [1]. Di Indonesia kasus positif COVID-19 yang terkonfirmasi sebanyak 4.251.076 orang dengan kasus kematian sebanyak 143.670 orang [2]. Sistem kekebalan tubuh menjadi salah satu faktor yang berpengaruh dalam penyebaran mikroba seperti COVID-19. Sistem kekebalan tubuh merupakan sistem perlindungan tubuh terhadap penyakit yang disebabkan oleh mikroba. Pada kondisi normal, tubuh dapat menangkal paparan mikroba patogen karena adanya sistem kekebalan tubuh. Pada saat sistem kekebalan tubuh dalam kondisi minimal, paparan mikroba patogen dapat mengakibatkan penyakit. Oleh karena itu, perlu adanya cara agar sistem kekebalan tubuh dapat bekerja optimal dalam melawan paparan mikroba patogen [3]. Ada 2 jenis sel dalam sistem kekebalan tubuh yaitu sel limfosit B dan sel limfosit T. Sel limfosit B merupakan sel yang dihasilkan oleh sumsum tulang belakang, sedangkan sel limfosit T merupakan sel yang dihasilkan oleh timus. Adapun cara untuk merangsang aktivitas dan perkembangan sel limfosit T yaitu dengan menambahkan suatu imunomodulator [4]. Imunomodulator adalah zat yang dapat merubah aktivitas dan fungsi sistem imunitas. Terdapat tiga kelompok imunomodulator, yaitu imunostimulan yang dapat meningkatkan aktivitas dan fungsi sistem imunitas, imunoregulator yang mampu mengatur sistem imunitas, dan immunosupresan sebagai penghambat aktivitas sistem imun. Imunomodulator banyak digunakan untuk pasien dengan gangguan imunitas seperti kanker, malagizi, dan lain-lain. Penggunaan imunomodulator banyak mengakibatkan dampak negatif seperti gangguan saluran cerna, racun pada jaringan hati, dan sebagainya [3]. Oleh karena itu, diperlukan alternatif imunomodulator yang berasal dari tanaman obat yang memiliki dampak negatif yang relatif kecil terhadap tubuh.

Salah satu tanaman yang dikenal sebagai tanaman obat adalah kurma (*Phoenix dactylifera* L.) yang merupakan salah satu tanaman tertua yang banyak tumbuh di daerah Timur Tengah dan Afrika Utara [5]. Penganut agama Islam meyakini bahwa kurma bermanfaat bagi kesehatan. Pada tahun 2020, Indonesia yang mayoritas penduduknya muslim menjadi salah satu negara pengimpor kurma terbesar kelima di dunia [6]. Selain bisa dikonsumsi langsung, kurma dijadikan bahan baku industri sari kurma dengan limbah berupa biji, limbah biji kurma yang dihasilkan dari berbagai proses industri bisa mencapai 6,10–11,47% [7]. Biji kurma banyak mengandung senyawa aktif seperti saponin, antrakuinon, fenolik, dan flavonoid yang bermanfaat sebagai antioksidan, antiinflamasi, antimikroba, dan antiplasmodial [8, 9, 10]. Golongan asam fenolat yang termasuk dalam senyawa fenolik pada biji kurma yaitu asam ferulat, asam m-koumarat, asam p-hidroksibenzoat, asam galat, dan asam o-koumarat [11]. Berdasarkan penelitian sebelumnya diketahui bahwa ekstrak etanol biji kurma yang mengandung senyawa aktif yaitu asam 3,4-dihidroksifenil asetat, asam sinamat, asam o-koumarat, asam celidonat, asam p-koumarat, asam p-hidroksibenzoat, dan pirogalol mampu menghambat enzim α -glukosidase dan terbukti secara *in silico* dan *in vitro* berpotensi sebagai antibakteri [12, 13]. Selain itu biji kurma dapat menjadi inhibitor enzim alosterik secara campur [14]. Ekstrak aseton biji kurma mampu menghambat infeksi *Pseudomonas phage* ATCC 14209-B1 pada sel inang *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25668 [15].

Biji kurma yang mengandung senyawa metabolit sekunder seperti *caffeic acid*, *ferulic acid*, *o-coumaric acid*, *p-coumaric acid*, *cholesterol*, *5-O-caffeoylshikimic acid*, dan lain-lain [16] diketahui belum banyak dikaji terkait penelitian dengan menggunakan metode *in silico* dan *in vitro* khususnya potensinya sebagai imunostimulan. Metode *in silico* merupakan suatu pengujian yang dilakukan dengan metode simulasi komputer untuk memprediksi, memberi hipotesis, dan penemuan baru dalam suatu pengobatan [17]. Uji *in silico* yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan dua reseptor berupa protein yang ditambahkan dengan senyawa aktif dari biji kurma, yaitu *Human Glycosylation-Inhibiting Factor* (GIF) (ID: 1GIF) dan *Human Cyclooxygenase-2* (COX-2) (ID: 5IKR). Reseptor 1GIF memiliki aktivitas pengaturan fungsi makrofag dalam pertahanan sel inang melalui efek antiinflamasi glukokortikoid, sedangkan reseptor 5 IKR merupakan suatu enzim yang mampu mengkatalisis pembentukan prostaglandin sebagai mediator dalam jalur inflamasi [18, 19]. Pada uji *in vitro*, aktivitas imunostimulan ekstrak metanol biji kurma terhadap proliferasi sel limfosit dilakukan dengan metode MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide) Assay. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan aktivitas imunostimulan senyawa bioaktif yang terdapat pada ekstrak metanol biji kurma secara *in silico* terhadap protein GIF dan COX-2 serta aktivitas imunostimulan secara *in vitro* dengan metode MTT Assay melalui proliferasi sel limfosit mencit jantan (*Mus musculus*) galur balb/c.

2. Bahan dan Metode

2.1. Bahan

Biji kurma yang digunakan berasal dari pabrik sari kurma di Kota Bogor, Jawa Barat, Indonesia. Bahan kimia yang digunakan adalah metanol teknis, mencit jantan (*Mus musculus*) galur balb/c usia 8-10 minggu, medium *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (Gibco), 20% (v/v) RPMI 1640 media komplit + FBS (*Fetal Bovine Serum*) (Caisson), *Phosphate Buffered Saline* (PBS) (Gibco), 2% Giemsa (v/v) (Merck), *imboost*® (SOHO), penicillin 100 U/mL dan streptomycin 100 ug/mL (Gibco), *stopper* 10% SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*), DMSO (Dimetil Sulfoksida) (Merck), MMT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromida] (Sigma), dan etanol p.a (Merck).

Pada analisis *in silico* secara komputasi menggunakan perangkat lunak dan perangkat keras yang terlibat dalam persiapan senyawa, *docking* molekuler, dan analisis. Persiapan senyawa untuk molekul ligan menggunakan database *PubChem* dan database *Bank Data Protein* (PDB) untuk protein. Tahap persiapan untuk menghilangkan molekul air, menambahkan atom hidrogen, dan menentukan lokasi *docking* ligan-reseptor menggunakan perangkat lunak *AutoDock Tools* (ADT) 1.5.6. *Molecular docking* dilakukan menggunakan *AutoDock Vina*, dan hasilnya divisualisasikan menggunakan *Discovery Studio 2021* dan *Ligplot* [20].

2.2. Metode

2.2.1. Analisis In Silico

2.2.1.1. Persiapan Ligan dan Reseptor

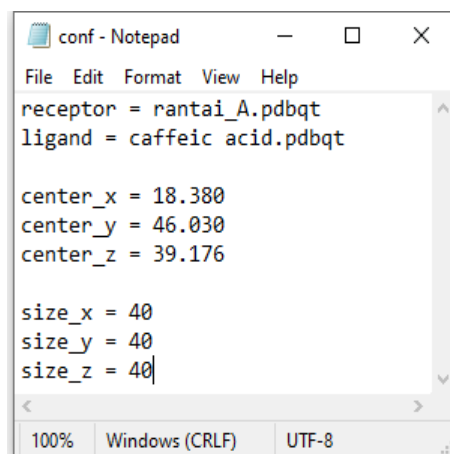
Virtual screening senyawa aktif biji kurma sebagai ligan melalui situs *IJAH Analytics* (<http://ijah.apps.cs.ipb.ac.id/>). Sebanyak 10 senyawa aktif biji kurma dan 1 senyawa kontrol diunduh dari *website PubChem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), piranti lunak *MarvinSketch* digunakan untuk menggambar struktur 2 dimensi (2D) dan 3 dimensi (3D) dari ligan. Molekul reseptor/protein *Human Glycosylation-Inhibiting Factor* (GIF) dan *Human Cyclooxygenase-2* (COX-2) diunduh melalui *Protein Data Bank* (PDB) (<https://www.rcsb.org>) dengan kode ID: 1GIF dan ID: 5IKR. Program *Discovery Studio* digunakan untuk memisahkan reseptor dari ligan atau residu non standar dan pelarut. Hasil pemisahan disimpan dalam format .pdb. yang kemudian digunakan untuk analisis *docking*. Sebelum analisis *docking* dilakukan, data struktur molekul ligan dan reseptor serta data lainnya disimpan pada satu folder dalam satu direktori kerja. Ligan yang digunakan juga dianalisis untuk toksisitas dan kelarutan menggunakan aturan *Lipinski* menggunakan *Protox II* (https://tox-new.charite.de/protox_II/), serta analisis toksisitas menggunakan *SwissADME* (<http://www.swissadme.ch/>) [21].

2.2.1.2. Molecular Docking

Persiapan *docking* antara ligan dan reseptor dilakukan dengan program ADT 1.5.6 dan *AutoDock Vina* 4.2. *Docking* molekuler dapat membantu dalam *skrining virtual* dengan menghasilkan energi bebas Gibbs (ΔG). Ligan dengan berpotensi maksimal akan mempunyai nilai ΔG paling negatif. *Discovery Studio* digunakan untuk memvisualisasikan *docking* molekuler antara ligan dan reseptor.

Sebelum dilakukan *molecular docking*, validasi dilakukan dengan cara minimalisasi energi, penentuan fleksibilitas ligan, dan penentuan *grid box* pada reseptor. Tiap ligan yang digunakan kemudian dilakukan pengecekan dan penentuan titik fleksibilitas dengan menggunakan *Autodock Tools*, yaitu berupa pengaturan *number of active torsion*. Adapun, untuk reseptor dilakukan pengecekan *grid box* tempat penambatan molekul, adapun *grid box* yang digunakan sebesar (40 x 40 x 40) Å dengan nilai koordinat x, y, z berturut-turut adalah: 18,380; 46,030; dan 39,176 untuk reseptor 1GIF, sedangkan untuk reseptor 5 IKR *grid box* yang digunakan sebesar (72 x 60 x 68) Å dengan nilai koordinat x, y, z berturut-turut adalah: 33,291; 9,217; dan 58,073. Selain itu, pada reseptor hasil pemisahan juga dilakukan penambahan atom hidrogen. Hasil optimasi ligan dan reseptor disimpan dengan format .pdbqt. kemudian disalin pada folder *Vina*. Pada notepad, diketik konfigurasi file *Vina*, lalu disimpan menggunakan nama 'conf.txt' *Vina*, kemudian dijalankan melalui *Command Prompt*

Gambar 1.



```

conf - Notepad
File Edit Format View Help
receptor = rantai_A.pdbqt
ligand = caffeic acid.pdbqt

center_x = 18.380
center_y = 46.030
center_z = 39.176

size_x = 40
size_y = 40
size_z = 40
100% Windows (CRLF) UTF-8

```

Gambar 1. Konfigurasi file Vina

Hasil analisis *docking* dapat dilihat melalui *output* dalam format *notepad*. Pemilihan konformasi ligan dengan ΔG terendah digunakan untuk penentuan konformasi ligan hasil *docking*. Perangkat lunak *Discovery Studio 2021* dan *Ligplot* digunakan untuk memvisualisasikan posisi dan orientasi ligan pada reseptor serta asam-asam amino yang terikat pada ligan.

2.2.2. Pembuatan Simplisia Biji Kurma

Biji kurma dibersihkan dari kotoran yang masih menempel dengan air, dilakukan sortasi dari biji kurma yang kualitasnya tidak baik, kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 50oC. Biji kurma yang telah kering digiling dengan mesin penggiling sampai halus dan disimpan pada plastik kedap air.

2.2.3. Ekstraksi Simplisia Biji Kurma

Simplisia biji kurma sebanyak 2 kg diekstraksi dengan pelarut metanol 1:1 dengan maserasi selama 4 x 24 jam, kemudian filtrat disaring dan dikentalkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50oC hingga didapatkan ekstrak kental berwarna coklat pekat.

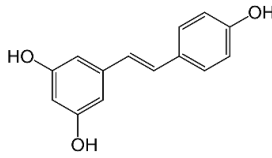
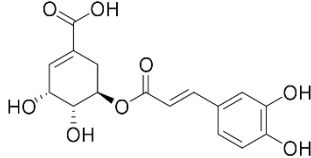
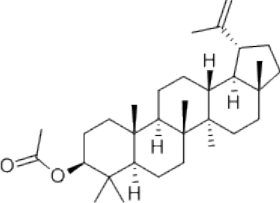
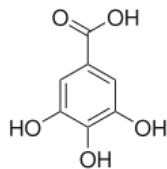
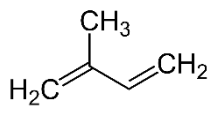
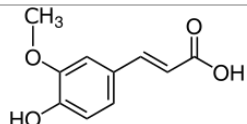
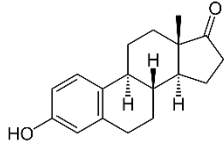
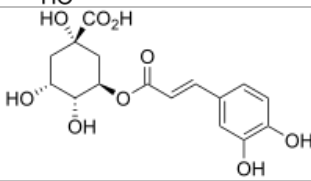
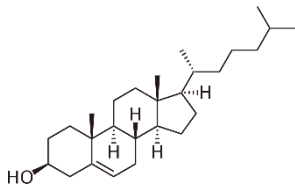
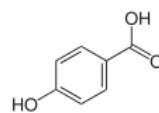
2.2.4. Uji Aktivitas Imunostimulan secara *In Vitro*

Isolasi sel limfosit dari organ limpa mencit dilakukan sesuai dengan metode Ernis *et al.* dengan modifikasi. Sel limfosit hasil isolasi kemudian dikultur pada suhu inkubator 37°C, kemudian ditentukan aktivitasnya. Sel limfosit ditumbuhkan dengan jumlah 50.000 sel dalam 100 µl media penumbuh (RPMI 1640, FBS 20%, *penicillin* 100 U/mL, dan *streptomycin* 100 µg/mL). Larutan uji diambil dari ekstrak metanol biji kurma dan *imboost* sebagai kontrol dengan konsentrasi 6,25; 12,5; 25; 50 dan 100 µg/mL, masing-masing ditambahkan setelah sel diinkubasi 3 jam pada suhu 37°C dan CO₂ 5%. Setelah inkubasi selama 48 jam kemudian dilakukan uji MTT Assay dengan cara menambahkan MTT (5 mg/mL) sebanyak 10 µl ke dalam tiap sumur, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam. Kristal formazan yang terbentuk dilarutkan dengan penambahan 100 µl etanol per sumur. Pembacaan nilai absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 595 nm. Analisis dilakukan masing-masing sebanyak 3 kali ulangan [22].

3. Hasil dan Pembahasan

Senyawa aktif yang ada pada tanaman kurma (*Phoenix dactylifera*) yang digunakan dalam penelitian ini memiliki aplikasi farmasi yang potensial. **Tabel 1** merangkum berbagai kelas senyawa yang telah ditemukan, seperti terpena, steroid, lipid, dan fenol yang didapat dari situs *IJAH Analytics* (<http://ijah.apps.cs.ipb.ac.id/>).

Tabel 1. Senyawa aktif pada tanaman kurma

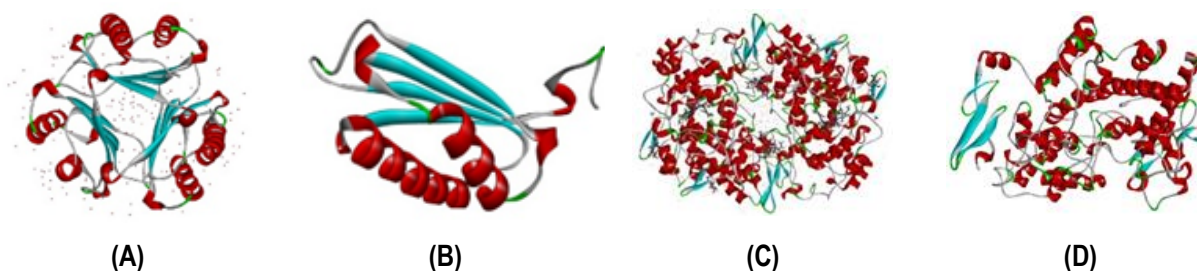
Nama Senyawa	Struktur Kimia	Nama Senyawa	Struktur Kimia
Resveratrol		5-O-caffeoylshikimic acid	
Lupeol acetate		Gallic acid	
Isoprene		Ferulic acid	
Estrone		Chlorogenic acid	
Cholesterol		4-hydroxy benzoic acid	

Beberapa penelitian terdahulu telah menyatakan bahwa kurma mengandung berbagai senyawa metabolit sekunder yang mempunyai efek farmakologi. Asam fenolat yang terdeteksi pada biji kurma, seperti asam galat, asam p-hidroksibenzoat, asam ferulat, asam o-koumarat, dan asam m-koumarat [11] dapat berpotensi sebagai antioksidan, antiinflamasi, antibakteri, dan lain-lain.

3.1. Analisis In Silico

3.1.1. Struktur dan Stabilitas Reseptor

Reseptor hasil pengunduhan dari *Protein Data Bank* yaitu *Human Glycosylation-Inhibiting Factor* dengan PDB ID 1GIF mempunyai resolusi 1,9 Å dengan 115 sekuen asam amino, protein *Human Cyclooxygenase-2* dengan PDB ID 5IKR mempunyai resolusi 2,34 Å dengan 551 sekuen asam amino. Reseptor-reseptor tersebut masih terikat dengan molekul lain seperti molekul air, ligan, ataupun residu non standar lainnya. Residu-residu tersebut harus dikeluarkan dari reseptor agar tidak mengganggu analisis *docking*. Sisi aktif reseptor yang mengandung ligan mengakibatkan ligan lain sulit untuk berikatan dengan reseptor, selain itu molekul air terdapat di sekeliling reseptor akan menghambat ikatan pada analisis *docking* seperti terjadinya ikatan hidrogen antara ligan dengan molekul air. Protein reseptor 1GIF dan 5IKR memiliki sub unit lebih dari 1, 1GIF memiliki 3 subunit yaitu A, B, dan C, sedangkan 5IKR memiliki 2 subunit yaitu A dan B, masing-masing sub unit dari kedua protein tersebut memiliki struktur dan komposisi asam amino yang sama. Oleh karena itu dilakukan pemotongan dengan menggunakan *Discovery Studio* sehingga didapatkan hasil murni untuk kedua protein tersebut yaitu subunit A yang digunakan untuk simulasi *docking* [23, 24]. Struktur protein 1GIF, 5IKR, dan hasil pemotongannya ditampilkan pada **Gambar 2**.



Gambar 2. Struktur protein reseptor: (A) 1GIF, (B) 1GIF-A, (C) 5IKR, (D) 5IKR-A

3.1.2. Kelarutan dan Analisis Lipinski pada Ligan

Semua ligan yang akan dilakukan *molecular docking* strukturnya dioptimalkan dengan *Marvin Sketch 20.12*, optimasi geometri dilakukan pada semua ligan untuk memperoleh konformasi molekul yang stabil dan mempunyai energi potensial rendah, kemudian dilakukan analisis kelarutan dan permeabilitas. Sifat fisika kimia struktur ligan dapat menggambarkan kelarutan dan permeabilitas dari kandidat obat. Telah dilaporkan bahwa ada lima aturan *Lipinski* yang dapat memprediksi kelarutan dan permeabilitas ligan, yaitu: 1) ligan tidak boleh memiliki lebih dari lima donor ikatan hidrogen, 2) ligan tidak memiliki lebih dari 10 akseptor ikatan hidrogen, 3) ligan tidak memiliki berat molekul lebih dari 500 Da, 4) ligan seharusnya tidak memiliki nilai log P kurang dari lima, 5) ligan seharusnya tidak memiliki *polar surface area* (PSA) lebih dari 140 Å dengan ikatan rotasi ligan kurang dari 10-30. Studi ini menggunakan empat parameter: berat molekul, donor H, akseptor H, dan log P seperti yang ditampilkan pada **Tabel 2**.

Tabel 2. Sifat ligan berdasarkan aturan Lipinski

Nama Struktur	Berat Molekul (Da)	Log P	Jumlah Donor Ikatan Hidrogen	Jumlah Akseptor Ikatan Hidrogen	Lipinski
<i>Resveratrol</i>	228,24	2,48	3	3	Ya
<i>Lupeol acetate</i>	468,75	4,15	0	2	Ya
<i>Isoprene</i>	68,12	1,83	0	0	Ya
<i>Estrone</i>	270,37	3,33	1	2	Ya
<i>Cholesterol</i>	386,65	4,15	1	1	Ya
<i>5-O-caffeoylshikimic acid</i>	336,29	0,03	5	8	Ya
<i>Gallic acid</i>	170,12	0,21	4	5	Ya
<i>Ferulic acid</i>	194,18	1,36	2	4	Ya
<i>Chlorogenic acid</i>	354,31	-0,38	6	9	Tidak
<i>4-hidroxy benzoic acid</i>	138,12	1,05	2	3	Ya
<i>Caffeic acid (kontrol)</i>	180,16	0,93	3	4	Ya

Berdasarkan analisis fisika kimia ligan sebagai kandidat imunostimulan, diketahui berat molekul teringan yaitu 68,12 Da dan yang terberat yaitu 468,75 Da. Senyawa yang memiliki berat molekul kurang dari 500 Da akan lebih mudah untuk dijadikan kandidat obat karena lebih stabil. Nilai log P berkisar antara -4 dan 5, jumlah donor ikatan hidrogen berada diantara 0 sampai 6, dan untuk jumlah akseptor ikatan hidrogen berada diantara 0 sampai 9. Maka berdasarkan analisis ligan dengan aturan *Lipinski* didapatkan 1 ligan yang tidak memenuhi aturan *Lipinski* yaitu *chlorogenic acid* yang memiliki jumlah donor ikatan hidrogen lebih dari 5.

3.1.3. Analisis Toksisitas pada Ligan

Analisis toksisitas ligan dengan menggunakan *protox II* bertujuan untuk menentukan tingkat toksisitas dari ligan. Tingkat toksisitas dinyatakan dengan nilai *Lethal Dose 50* (LD50) pada satuan mg/kg berat badan. LD50 merupakan rata-rata dosis yang dapat menyebabkan kematian yaitu dosis dimana subjek tes mengalami kematian sebanyak 50% setelah paparan zat. *Globally Harmonized System* (GHS) mengklasifikasikan bahan kimia menjadi enam kategori dengan tingkat toksisitas yang berbeda. Keenam kategori toksisitas tersebut adalah kelas I (LD50 ≤ 5 mg/kg) dengan kategori sangat fatal jika tertelan, kelas II (5 mg/kg < LD50 ≤ 50 mg/kg) dengan kategori fatal jika tertelan, kelas III (50 mg/kg < LD50 ≤ 300 mg/kg) dengan kategori beracun jika tertelan, kelas IV (300 mg/kg < LD50 ≤ 2000 mg/kg) dengan kategori berbahaya jika ditelan, kelas V (2000 mg/kg < LD50 ≤ 5000 mg/kg) dengan kategori mungkin berbahaya jika tertelan, dan kelas VI (LD50 > 5000 mg/kg) dengan kategori tidak beracun.

Tabel 3. Toksisitas ligan menggunakan Protok II

Nama struktur	LD50 (mg/kg)	Kelas	Kategori
<i>Resveratrol</i>	1560	4	Berbahaya
<i>Lupeol acetate</i>	5000	5	Mungkin berbahaya
<i>Isoprene</i>	1800	4	Berbahaya
<i>Estrone</i>	5000	5	Mungkin berbahaya
<i>Cholesterol</i>	890	4	Berbahaya
<i>5-O-caffeoylshikimic acid</i>	3800	5	Mungkin berbahaya
<i>Gallic acid</i>	2000	4	Berbahaya
<i>Ferulic acid</i>	1772	4	Berbahaya
<i>Chlorogenic acid</i>	5000	5	Mungkin berbahaya
<i>4-hidroxy benzoic acid</i>	2200	5	Mungkin berbahaya
<i>Caffeic acid</i> (kontrol)	2980	5	Mungkin berbahaya

Pada penelitian ini diketahui tingkat toksisitas setiap ligan berada di kelas 4 dan 5, yaitu sebagai senyawa tingkat toksisitas berbahaya dan mungkin berbahaya jika tertelan (**Tabel 3**). Berdasarkan hasil penelitian didapatkan nilai LD50 paling tinggi yaitu dimiliki oleh ligan *lupeol acetate*, *estrone*, *chlorogenic acid*, *5-O-caffeoylshikimic acid*, dan *4-hidroxy benzoic acid* yang termasuk kategori mungkin berbahaya jika tertelan, sedangkan yang memiliki LD50 terendah adalah *cholesterol* yang termasuk berbahaya jika tertelan. Berdasarkan kajian ini diketahui bahwa senyawa-senyawa yang ada pada tanaman kurma mempunyai tingkat toksisitas yang berbeda, sehingga diharapkan kajian ini dapat digunakan sebagai dasar ilmiah ketika akan melakukan formulasi dari senyawa-senyawa tersebut jika ingin digunakan sebagai obat.

3.1.4. Analisis Energi Bebas Gibbs

Parameter yang digunakan untuk menganalisis hasil *docking* adalah nilai ΔG , *Root Mean Square Deviation* (RMSD), dan interaksi antara ligan-residu reseptor. Nilai ΔG diperingkatkan dari nilai terkecil sampai nilai terbesar, nilai ini menunjukkan konformasi dari masing-masing ligan hasil *docking*. Pada penelitian ini terdapat 11 ligan yang ditambahkan pada reseptor, dimana dari 11 ligan tersebut akan menghasilkan masing-masing 9 konformasi ligan dengan nilai ΔG yang berbeda-beda yang diperingkatkan berdasarkan yang terendah. Konformasi yang dipilih adalah konformasi peringkat paling atas dengan nilai ΔG dan RMSD yang paling rendah (terbaik). RMSD merupakan parameter penting dalam melakukan validasi program *docking*, nilai RMSD menjadi penentu dalam memprediksi keberhasilan modus ikatan yang terjadi di antara ligan dan reseptor. Nilai RMSD dikatakan baik jika $\leq 2 \text{ \AA}$. Besarnya nilai RMSD ini menunjukkan keakuratan perhitungan, nilai RMSD $< 2 \text{ \AA}$ dapat diartikan bahwa kesalahan dari hasil perhitungan semakin kecil yang menunjukkan perhitungan lebih akurat, sedangkan nilai RMSD $> 2 \text{ \AA}$ dapat diartikan bahwa penyimpangan/kesalahan dari hasil perhitungan lebih besar. Hal ini menyebabkan terjadinya kesalahan yang semakin besar pula dalam memprediksi interaksi antara ligan dengan reseptor [25].

Ulangan yang dilakukan pada penelitian ini dalam sekali *docking* adalah sebanyak 6 kali *running*. Proses *running* yang dilakukan berulang-ulang akan berpengaruh pada nilai ΔG , sehingga pada penelitian ini diperoleh 6 pose ligan dengan ΔG yang berbeda-beda. Energi bebas Gibbs pada interaksi antara ligan dan reseptor menunjukkan energi yang diperlukan untuk terjadinya ikatan antara reseptor dengan ligan. Ikatan kompleks antara reseptor-ligan akan semakin stabil ketika energi yang diperlukan semakin kecil [26]. Berdasarkan hasil simulasi *docking*, ligan dengan nilai ΔG paling kecil (negatif) terhadap dua reseptor 1GIF dan 5 IKR adalah *5-O-caffeoylshikimic acid*, *chlorogenic acid*, *lupeol acetate*, *estrone*, dan *cholesterol* dengan *caffeic acid* sebagai kontrol yang digunakan sebagai komparator (**Tabel 4**). Senyawa *caffeic acid* merupakan ligan alami pada reseptor yang terdapat pada *database*, selain itu juga pada penelitian sebelumnya dinyatakan bahwa senyawa tersebut menunjukkan efek imunomodulator karena aktivitas antioksidannya [27].

Parameter lain yang diamati dari hasil *docking* adalah interaksi yang terbentuk diantara residu pada reseptor dengan ligan. Berdasarkan analisis interaksi antara reseptor dan ligan bahwa terbentuknya beberapa ikatan diantara keduanya, seperti ikatan hidrofobik, ikatan van der Waals, dan ikatan hidrogen. Banyaknya interaksi yang terbentuk antara reseptor dan ligan seperti adanya interaksi hidrofobik dan ikatan hidrogen akan berpengaruh terhadap aktivitas. Terbentuknya ikatan hidrogen pada interaksi antara reseptor dan ligan akan berkontribusi pada stabilitas struktur kompleks, jumlah ikatan hidrogen yang semakin banyak akan menyebabkan struktur yang terbentuk di antara reseptor dan ligan akan semakin kompleks [28]. Selain itu, ikatan hidrofobik dan ikatan hidrogen akan mempengaruhi kestabilan ikatan antara ligan dan target. Banyaknya ikatan hidrogen dan terbentuknya interaksi hidrofobik akan menghasilkan interaksi yang cukup kuat diantara kedua molekul [29].

Tabel 4. Nilai energi bebas Gibbs (kkal/mol)

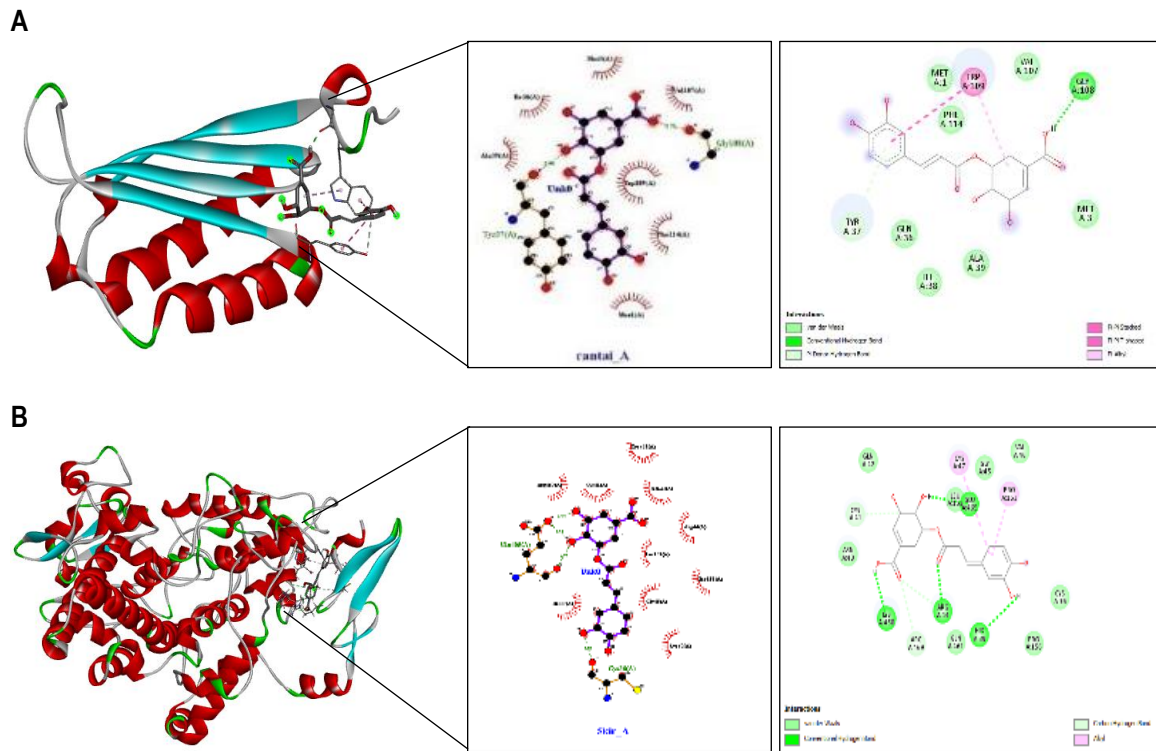
Ligan	ΔG (kkal/mol)	
	Reseptor 1GIF	Reseptor 5IKR
<i>5-O-caffeoylshikimic acid</i>	-6,68	-8,58
<i>Chlorogenic acid</i>	-6,66	-8,14
<i>Lupeol acetate</i>	-6,22	-8,02
<i>Estrone</i>	-6,08	-7,98
<i>Cholesterol</i>	-5,90	-7,52
<i>Resveratrol</i>	-5,82	-6,46
<i>Ferulic acid</i>	-5,24	-6,46
<i>Gallic acid</i>	-4,64	-6,24
<i>4-hidroxy benzoic acid</i>	-4,52	-6,18
<i>Isoprene</i>	-3,70	-3,94
<i>Caffeic acid (Kontrol)</i>	-5,22	-6,18

Pada analisis ikatan hidrogen menunjukkan bahwa reseptor 1GIF memiliki interaksi antara ligan dan beberapa residu asam amino, seperti Tyr37 dan Met1, sedangkan untuk residu asam amino Arg44, Gly45, Glu465, dan Tyr385 sebagian besar berinteraksi dengan ligan pada reseptor 5IKR (**Tabel 5**). Ikatan hidrogen terpanjang terdeteksi untuk Tyr385 pada reseptor 5IKR dengan panjang 3,25 Å dan terpendek untuk Gly108 pada reseptor 1GIF dengan panjang 2,71 Å.

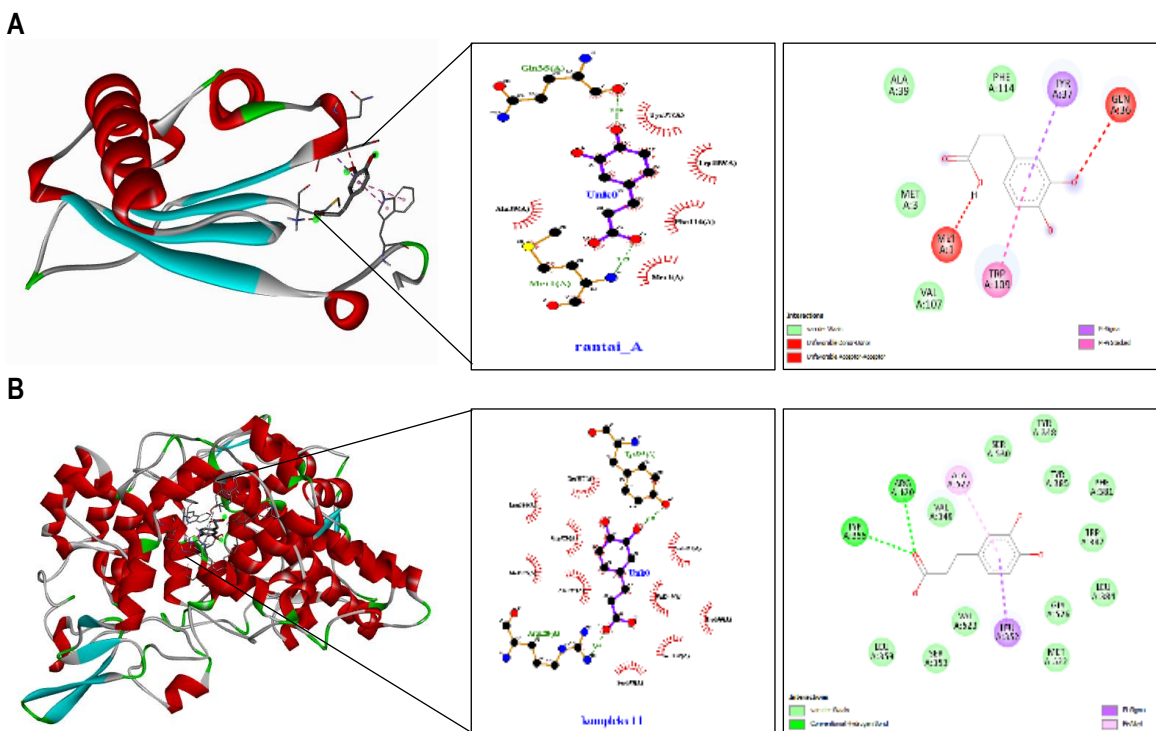
Tabel 5. Interaksi reseptor dengan ligan berdasarkan analisis ikatan hidrogen

Ligan	Reseptor	
	1GIF	5IKR
<i>Resveratrol</i>	Pro2 (3,10)	Cys41 (2,91) Arg44 (3,04) Gly45 (3,17)
<i>Cholesterol</i>	Asn73 (3,13)	-
<i>Estrone</i>	-	Glu524 (2,79)
<i>5-O-caffeoylshikimic acid</i>	Tyr37 (3,00) Gly108 (2,71)	Glu465 (2,73), (2,90), (2,94) Cys36 (2,88)
<i>Gallic acid</i>	Tyr37 (2,99) Met1 (3,18)	His388 (3,06)
<i>Ferulic acid</i>	-	Tyr385 (2,91) Arg120 (2,97) Tyr355 (2,99), (3,10) Arg44 (3,15), (2,92)
<i>Chlorogenic acid</i>	Ser77 (2,89), (2,99) Ile97 (2,88), (3,22)	Glu465 (3,12) Gly45 (3,01) Cys47 (2,84)
<i>4-hidroxy benzoic acid</i>	Met1 (3,20) Tyr37 (3,23)	-
<i>Caffeic acid (kontrol)</i>	Gln36 (3,06) Met1 (3,23)	Arg20 (2,96) Tyr385 (3,25)

Berdasarkan analisis yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa senyawa *5-O-caffeoylshikimic acid* adalah senyawa yang paling berpotensi sebagai kandidat imunostimulan. Senyawa tersebut berhasil tertambat pada *binding site* protein reseptor dengan nilai energi Gibbs dan konformasi paling baik serta pada titik yang tepat. Senyawa *5-O-caffeoylshikimic acid* termasuk dalam senyawa fenolik yang ditemukan pada tumbuhan *palmae* seperti kurma [30]. Senyawa fenolik diketahui dapat meningkatkan proliferasi sel limfosit dan aktivasi makrofag [8, 9], sehingga dapat disimpulkan bahwa senyawa fenolik berpotensi sebagai imunostimulan. Konformasi, interaksi, dan orientasi *5-O-caffeoylshikimic* dan *caffeic acid* (kontrol) diilustrasikan pada **Gambar 3 dan 4**.



Gambar 3. Analisis konformasi dan interaksi ikatan hidrogen antara ligan dan reseptor dengan jarak <math>< 5 \text{ \AA}</math>. A. 1GIF-5-O-caffeoylshikimic acid; B. 5IKR-5-O-caffeoylshikimic acid



Gambar 4. Analisis konformasi dan interaksi ikatan hidrogen antara ligan dan reseptor dengan jarak <math>< 5 \text{ \AA}</math>. A. 1GIF-caffeic acid; B. 5IKR-caffeic acid

3.2. Aktivitas Immunostimulan secara In Vitro

Aktivitas immunostimulan ekstrak metanol biji kurma secara in vitro dilakukan dengan mengamati proliferasi sel limfosit mencit dengan menggunakan metode *MTT* Assay. Prinsip metode ini merupakan terjadinya reaksi redoks di dalam sel, di dalam mitokondria sel hidup diketahui mengandung enzim suksinat dehidrogenase yang akan mereduksi *MTT*

menjadi garam formazan, kemudian senyawa tersebut dianalisis menggunakan ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) reader menghasilkan data absorbansi (*Optical Density (OD)*). Semakin tinggi nilai OD maka semakin banyak sel limfosit yang hidup [22] yang menunjukkan bahwa aktivitas imunostimulannya semakin baik. Sel limfosit merupakan sel yang berperan dalam respon imun tubuh yang dapat melindungi tubuh dari paparan mikroba dan tumor melalui sistem imunitas spesifik [31]. Nilai OD dari aktivitas proliferasi sel limfosit mencit dengan pemberian ekstrak metanol biji kurma dan *imboost* (kontrol) dengan berbagai konsentrasi ditampilkan pada **Tabel 6**.

Tabel 6. Nilai OD dari proliferasi sel limfosit mencit dengan pemberian ekstrak metanol biji kurma dan *imboost* pada berbagai konsentrasi

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Sampel	
	Ekstrak Metanol Biji Kurma	<i>Imboost</i> (kK control)
6,25	0,108	0,232
12,5	0,126	0,191
25	0,132	0,263
50	0,062	0,196
100	0,111	0,135

Berdasarkan **Tabel 6** diketahui bahwa nilai *Optical Density (OD)* mengalami peningkatan seiring bertambahnya konsentrasi hingga mencapai konsentrasi 25 $\mu\text{g/mL}$. Pada produk imunostimulan (*imboost*) sebagai kontrol diketahui pula memiliki nilai OD paling tinggi pada pemberian konsentrasi 25 $\mu\text{g/mL}$. Konsentrasi 25 $\mu\text{g/mL}$ sel limfosit mencit mempunyai aktivitas proliferasi paling tinggi jika dibandingkan dengan konsentrasi lainnya. Adanya peningkatan aktivitas proliferasi sel limfosit pada pemberian sampel hingga variasi 6,25; 12,5; dan 25 $\mu\text{g/mL}$ menunjukkan bahwa sampel ekstrak metanol biji kurma memiliki aktivitas sebagai imunostimulan. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya pada uji in vivo bahwa kurma mempunyai aktivitas imunostimulan karena pemberian ekstrak kurma menyebabkan jumlah limfosit dan leukosit total pada mencit jantan (*Mus musculus*) galur balb/c mengalami peningkatan [32].

Kandungan senyawa kimia yang terdapat dalam ekstrak dapat mempengaruhi aktivitas proliferasi sel limfosit dari sampel uji. Pada penelitian sebelumnya telah dideteksi bahwa dalam ekstrak metanol biji kurma mengandung senyawa golongan asam fenolat, flavonoid, karotenoid, dan sterol. Senyawa-senyawa tersebut diantaranya adalah *caffeic acid*, *ferulic acid*, *p-coumaric acid*, *5-O-caffeoylshikimic acid*, *o-coumaric acid*, dan *cholesterol* [16]. Ekstrak *echinacea purpurea* yang terdapat pada *imboost* juga mengandung senyawa turunan *caffeic acid* yang termasuk golongan asam fenolat dan dapat berfungsi sebagai imunostimulan serta mempunyai aktivitas antiinflamasi [33]. Menurut Cholakova *et al.* (2002), senyawa terpenoid dan flavonoid juga dapat meningkatkan proliferasi sel limfosit [34].

4. Kesimpulan

Skrining virtual telah berhasil dilakukan pada 10 senyawa metabolit sekunder terhadap dua reseptor penting yang berperan dalam sistem imun yaitu *Human Glycosylation-Inhibiting Factor* (1GIF) dan *Human Cyclooxygenase-2* (5IKR) melalui *docking* molekuler, toksisitas, ADME, dan *Lipinski*. Hasil analisis diperoleh bahwa ligan terbaik yang dapat dijadikan sebagai kandidat obat imunostimulan adalah *5-O-caffeoylshikimic acid* yang merupakan senyawa golongan asam fenolat. Hasil ini diperkuat juga oleh uji in vitro yang membuktikan bahwa pemberian ekstrak metanol biji kurma sampai konsentrasi 25 $\mu\text{g/mL}$ dapat meningkatkan aktivitas proliferasi sel limfosit. Oleh karena itu, kami merekomendasikan untuk dilakukan penelitian lebih lanjut terkait potensi biji kurma sebagai imunostimulan.

Ucapan Terima Kasih

Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan yang memberikan pendanaan melalui Program Kreativitas Mahasiswa (PKM) Riset 2021 dan Yayasan Pakuan Siliwangi melalui Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (LPPM) Universitas Pakuan.

Daftar Pustaka

- [1] World Health Organization. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 – March 11 th 2020. Available: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-generals-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>. (Diakses 16 November 2021)
- [2] Badan Nasional Penanggulangan Bencana. Available: <https://covid19.go.id/> (Diakses 16 November 2021)

- [3] K. Baratawidjaja, and I. Rengganis, I, *Imunologi Dasar* (10th ed), Jakarta: Badan Penerbit FK UI, 2012.
- [4] A. E. Sukmayadi, S. A. Sumiwi, M. I. Barliana, and A. D. Aryanti, "The Immunomodulatory Activity of Ethanol Extract of Tempuyung Leaves (*Sonchus arvensis* Linn.)", *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, vol. 1, no. 2, 65–72, 2014. <https://doi.org/10.15416/ijpst.v1i2.7515>
- [5] A. Rahmadi, *Kurma*, Samarinda: Food Technologist, Neurobiologist, and Pharmacologist, pp. 1-10, 2010.
- [6] M. A. Rizaty, "Indonesia Masuk Daftar Negara Pengimpor Kurma Terbesar", 2022. Available: <https://databoks.katadata.co.id/datapublish/2022/05/05/indonesia-masuk-daftar-negara-pengimpor-kurma-terbesar>. (Diakses 14 Juni 2022)
- [7] H. Habib, W. Ibrahim, "Nutritional quality evaluation of eighteen date pit varieties", *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, vol. 60, no. 1, 99–111, 2009.
- [8] K. Bone, and S. Mills, *Principles and Practice of Phytotherapy: Modern Herbal Medicine*, USA: Elsevier, 2013.
- [9] M. R. Takaeidi, A. Jahangiri, M. J. Khodayar, A. Siahpoosh, H. Yaghooti, S. Rezaei, *et al.*, "The Effect of Date Seed (*Phoenix dactylifera*) Extract on Paraoxonase and Arylesterase Activities in Hypercholesterolemic Rats", *Jundishapur Journal National Pharmacology*, vol. 9, no. 1, 30-34, 2014.
- [10] M. Abiola, Adeosun, O. Sarah, M. Osasenaga, H. D. Okikiola, M. O. Omotayo MO, "Phytochemical, minerals, and free radical scavenging profiles of *Phoenix dactylifera* L. seed extract", *Journal of Taibah University Medical Science*, pp. 1-6, 2015.
- [11] Afiq, M. J. Abdul, R. Abdul Rahman, Y. B. Che Man, H. A. Al-Kahtani, and T. S.T. Mansor, "Date seed and date seed oil", *International Food Research Journal*, vol. 20, no. 5, pp. 2036-2037, 2013.
- [12] L. Giovanny, L. Ambarsari, S. Warnasih, "Potensi ekstrak etanol biji kurma (*Phoenix dactylifera* L.) sebagai antidiabetes dengan parameter kinetika inhibisi α -glukosidase" *Current Biochemistry*, vol. 6, no. 2, pp 1-10, 2019.
- [13] A. K. Astari, "Potensi Ekstrak Etanol Biji Kurma (*Phoenix dactylifera* L.) sebagai Antibakteri Secara In Silico dan In Vitro", *Skripsi*, Departemen Biokimia, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Bogor, 2020.
- [14] H. Ding, X. Hu, X. Xu, G. Zhang, D. Gong, "Inhibitory mechanism of two allosteric inhibitors, oleanic acid, and ursolic acid on α -glucosidase", *International Journal of Biological Macromolecules*, pp. 1-12, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.040>.
- [15] S. A. A. Jassim, and M. A. Najji, "In vitro Evaluation of the Antiviral Activity of an Extract of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Pits on a *Pseudomonas Phage*", *eCAM*, vol. 7, no. 1, pp 57–62, 2010. doi:10.1093/ecam/nem160
- [16] S. Warnasih, S. Salam, U. Hasanah, L. Ambarsari, P. Sugita, "Total Phenolic, flavonoid content and metabolite profiling of methanol extract of date (*Phoenix dactylifera*) seeds by LC-QTOF-MS", *AIP Conference Proceedings*, vol. 2243, No. 030029, 2020. Available: <https://doi.org/10.1063/5.0001436>.
- [17] S. Hardjono, "Sintesis dan Uji Aktivitas Antikanker Senyawa 1-(2-Klorobenzoiloksi) Urea dan 1-(4-Klorobenzoiloksi) Urea", *Berkala Ilmiah Kimia Farmasi*, vol. 2, no. 1, pp. 1, 2013.
- [18] Biosource, "MIF active protein: Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Active Protein", 2006. Available: <https://www.mybiosource.com/active-protein/macrophage-migration-inhibitory-factor-if/2105112>. (Diakses tanggal 23 Agustus 2021)
- [19] Y. Loganathan, M. Jain, S. Thiyagarajan, S. Shanmuganathan, S. K. Mariappan, M. P. J. Kizhakedathil, and T. Saravanakumar, "An In Silico evaluation of phytocompounds from *Albizia amara* and *Phyla nodiflora* as cyclooxygenase-2 enzyme inhibitors" *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2021.
- [20] O. Trott, A. J. Olson, "AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading", *Journal of Computational Chemistry*, vol. 31, no. 2, pp 455–461, 2010. Available: <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- [21] C. A. Lipinski, "Lead- and Drug-Like Compounds: The Rule-of-Five Revolution", *Drug Discovery Today: Technol*, vol. 1, no. 4, pp. 337–341, 2004. Available: <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.007>
- [22] G. Ernis, D. Notriawan, D. Fitriani, E. Yunita, I. Cantika, "Uji in vitro aktivitas imunomodulator minyak atsiri serai dapur (*Cymbopogon citratus*) terhadap proliferasi sel limfosit mencit", *Bioedusains*, vol. 4, no. 2, pp. 129-135, 2021.

- [23] Y. Kato, T. Muto, T. Tomura, H. Tsumura, H. Watarai, T. Mikayama, K. Ishizaka, R. Kuroki, "The crystal structure of human glycosylation-inhibiting factor is a trimeric barrel with a three 6-stranded beta-sheets", *PNAS*, vol. 93, no. 7, pp. 3007-3010, 1996. Available: <https://doi.org/10.1073/pnas.93.7.3007>
- [24] B. J. Orlando, M. G. Malkowski, "Substrate-selective Inhibition of Cyclooxygenase-2 by Fenamic Acid Derivatives Is Dependent on Peroxide Tone", *J Biol Chem*, vol. 291, no. 29, pp. 15069-81, 2016.
- [25] S. Ferwadi, R. Gunawan, dan W. Astuti, "Studi docking molekular senyawa asam sinamat dan derivatnya sebagai inhibitor protein 1j4x pada sel kanker serviks", *Jurnal Kimia Mulawarman*, vol. 14, no. 2, pp. 84-90, 2017.
- [26] T. Joshi, P. Sharma, T. Joshi, and S. Chandra, "In Silico Screening of Anti-inflammatory Compounds from Lichen by Targeting Cyclooxygenase-2", *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, vol. 38, no. 12, pp. 3544-3562, 2019.
- [27] S. Kilani-Jaziri, I. Mokdad-Bzeouich, M. Krifa, N. Nasr, K. Ghedira & L. Chekir-Ghedira, "Immunomodulatory and cellular antioxidant activities of caffeic, ferulic, and *p*-coumaric phenolic acids: a structure-activity relationship study", *Drug and Chemical Toxicology*, 40(4), 416-424, 2017. Available: DOI: [10.1080/01480545.2016.1252919](https://doi.org/10.1080/01480545.2016.1252919)
- [28] W. F. de Azevedo Jr., *Docking Screens for Drug Discovery*, New York: Humana Press, 2019.
- [29] R. Patil, S. Das, A. Stanley, L. Yadav, A. Sudhakar, and A. K. Varma, "Optimized Hydrophobic Interactions and Hydrogen Bonding at the Target-Ligand Interface Leads the Pathways of Drug-Designing", *Plos One*, vol. 5, no. 8, e12029, 2010.
- [30] A. Mansouri, G. Embarek, E. Kokkalou, and P. Kefalas, "Phenolic Profile and Antioxidant Activity of the Algerian Ripe Date Palm Fruit (*Phoenix dactylifera*)", *Food Chemistry*, vol. 89, no. 3, pp. 411 – 420, 2005. Available: doi:10.1016/j.foodchem.2004.02.051.
- [31] F. R. S. Prakoeswa, "Peranan Sel Limfosit Dalam Imunologi: Artikel Review", *J. Sains Kes.*, vol. 2, no. 4, pp. 525-537, 2020.
- [32] Rosnizar, K. Eriani, I. M. Ramli, and F. Muliani, "Uji Efek Immunostimulan Buah Kurma (*Phoenix dactylifera*) Pada Mencit Jantan (*Mus musculus*) Galur Balb/c", *Prosiding Seminar Nasional Biotik*, pp. 292–297, 2015.
- [33] A. Manayi, M. Vazirian, S. Saeidnia, "*Echinacea purpurea*: Pharmacology, phytochemistry and analysis methods", *Pharmacogn Rev*, vol. 9, no. 17, pp. 63–72, 2015. Available: DOI: [10.4103/0973-7847.156353](https://doi.org/10.4103/0973-7847.156353)
- [34] M. Cholakova, V. Christov, D. Dimitrova, L. Evstatieva, R. Alexandrova, E. Nikolova, "Flavonoid and terpenoid isolated from *Loranthus europaeus* with stimulatory effect on the lymphocyte proliferation", *Experimental Pathology and Parasitology*, vol. 5, no. 9, pp. 45-8, 2002.