

Aktivitas Imunomodulator Ekstrak Petroleum Eter Umbi Bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) pada Mencit Balb/c yang Diinduksi Vaksin Hepatitis B Tanti Azizah Sujono^{1,3}, Arief Nurrochmad^{1*}, Endang Lukitaningsih² dan Agung Endro Nugroho¹

¹Departemen Farmakologi dan Farmasi Klinik, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Jl. Sekip Utara, Yogyakarta, Indonesia, 55281.

²Departemen Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Jl. Sekip Utara, Yogyakarta, Indonesia, 55281.

³Departemen Farmakologi dan Farmasi Klinik, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Jl. Achmad Yani, Pabelan, Kartasura, Surakarta, Jawa Tengah, Indonesia, 57162.

*email korespondensi: ariefnr@ugm.ac.id

Received 03 November 2021, Accepted 02 June 2022, Published 15 July 2022

Abstrak: Ekstrak non polar umbi bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) mengandung senyawa fitosterol berupa β -sitosterol yang secara *in vitro* menunjukkan aktivitas imunomodulator sehingga ekstrak petroleum eter bengkoang diduga mempunyai efek imunomodulator *in vivo*. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak petroleum eter (EPE) bengkoang terhadap parameter respon imun non spesifik dan spesifik pada mencit Balb/c yang diinduksi vaksin hepatitis B. Hewan uji mencit secara acak dibagi menjadi 4 kelompok. Kelompok I sebagai kontrol negatif, kelompok II diberi perlakuan obat standard levamisol 2,5 mg/kgBB, kelompok III dan IV berturut-turut diberi EPE bengkoang dosis 100 dan 200 mg/kgBB. Perlakuan diberikan secara peroral selama 18 hari. Efek imunomodulator EPE bengkoang dievaluasi berdasarkan aktivitas fagositosis makrofag, proliferasi limfosit, produksi antibodi atau imunoglobulin G (IgG), serta produksi sitokin tumor necrosis factor- α (TNF- α) dan interleukin-10 (IL-10). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian EPE bengkoang mampu meningkatkan kapasitas dan indeks fagositosis makrofag serta proliferasi limfosit secara signifikan ($p < 0,05$). Semakin tinggi dosis EPE bengkoang, produksi IgG semakin turun ($p < 0,05$), sementara produksi TNF- α meningkat dan IL-10 turun namun perubahannya tidak signifikan ($p > 0,05$). EPE bengkoang mempunyai efek imunomodulator dengan meningkatkan respon imun non spesifik sedangkan respon imun spesifik (humoral) turun tergantung dosis.

Kata kunci: ekstrak petroleum eter; imunomodulator; *Pachyrhizus erosus*; vaksin hepatitis B

Abstract. Immunomodulatory Activity of Petroleum Ether Extract of Bengkoang Tuber (*Pachyrhizus erosus*) in Balb/c Mice Induced by Hepatitis B Vaccine. Non-polar extract of bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) tuber contains phytosterol compounds in the form of β -sitosterol which shows immunomodulatory activity *in vitro* so that the petroleum ether extract of bengkoang is thought to have an immunomodulatory effect *in vivo*. This study aimed to investigate the effect of petroleum ether extract (EPE) of bengkoang against immunomodulatory effect on non-specific and specific immune response in Balb/c mice induced by the hepatitis B vaccine. Male mice were divided randomly into 4 groups. Group I as negative control, group II was treated with standard drug of levamisole 2.5 mg/kg.BW, group III and IV were given EPE of bengkoang at doses of 100 and 200 mg/kg BW respectively. The treatment was given for 18 days. Immunomodulatory effects of EPE were evaluated based on

phagocytic activity of macrophages, lymphocyte proliferation, production of antibody or immunoglobulin G (IgG), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-10 (IL-10). This Results showed that giving EPE of bengkoang 100 and 200 mg/kg BW can increase significantly the phagocytic capacity of macrophages and lymphocyte proliferation ($p < 0.05$), the higher dose of EPE of bengkoang reduces IgG production comparing negative control ($p < 0.05$), while TNF- α and IL-10 production did not change ($p > 0.05$). EPE of bengkoang has immunomodulatory activity by increasing nonspecific immune responses, meanwhile specific immune responses (humoral immunity) decrease depending on dose.

Keywords: petroleum ether extract; immunomodulator; *Pachyrhizus erosus*; hepatitis B vaccine

1. Pendahuluan

Bengkoang merupakan tanaman yang termasuk dalam familia Fabaceae, dikenal di masyarakat sebagai buah yang sering dikonsumsi sebagai rujak dan juga sering dimanfaatkan sebagai bahan baku kosmetik untuk pemutih kulit. Umbi bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) banyak mengandung pati dan serat (*fiber*) serta kandungan air yang cukup tinggi sekitar 84%. Selain itu bengkoang juga mengandung mikro dan makronutrien. Bengkoang mengandung kadar kalori cukup rendah (39 kkal/100g) sehingga memungkinkan dikonsumsi sebagai bahan pangan yang baik (Noman *et al.*, 2007). Bengkoang juga mengandung senyawa fitosterol dan isoflavon (Lukitaningsih & Holzgrabe, 2014). Senyawa β -sitosterol dan stigmasterol (sekitar 2,76%) merupakan komponen utama fitosterol dalam ekstrak petroleum eter bengkoang dengan perbandingan β -sitosterol dan stigmasterol (65:35) (Lukitaningsih, 2012). Selain itu bengkoang juga mengandung vitamin A, vitamin C, *alpha hidroksi acid* (Widyatmoko *et al.*, 2016).

Bukti ilmiah yang mendukung pemanfaatan bengkoang dalam bidang kesehatan antara lain sebagai antioksidan, zat penghambat enzim tirosinase (Lukitaningsih & Holzgrabe, 2014), mencegah hilangnya massa tulang pada tikus yang dibuat model osteoporosis (Nurrochmad *et al.*, 2010), agen kemopreventif (Nurrochmad *et al.*, 2013), penurun kadar gula darah pada hewan uji mencit yang dibuat diabetes dengan diinduksi streptozotocin (Park & Han, 2015), ekstrak fiber bengkoang (BFE) yang bersifat polar menunjukkan aktivitas imunomodulator *in vitro* maupun *in vivo* dengan menstimulasi aktivitas fagositosis, meningkatkan produksi sitokin dan immunoglobulin (Kumalasari *et al.*, 2013). Ekstrak fiber bengkoang (BFE) dan fraksi B dari BFE yang merupakan serat larut air dapat memodulasi sistem imun dengan meningkatkan respon imun *innate* dan *adaptive* (Baroroh *et al.*, 2020). Penelitian tersebut menunjukkan bahwa bengkoang berpotensi dikembangkan sebagai tanaman yang berkhasiat sebagai imunomodulator.

Imunomodulator merupakan bahan yang dapat memodulasi sistem imun tubuh, baik bersifat imunostimulan maupun immunosupresan. Respon imun dibedakan menjadi 2 yaitu non spesifik (*innate*) dan spesifik (*adaptive*) yang meliputi respon imun seluler dan humoral (Abbas

et al., 2018). Saat ini minat masyarakat untuk menggunakan obat herbal sebagai agen yang dapat memodulasi sistem imun dalam pencegahan infeksi semakin meningkat. Hal tersebut dimungkinkan karena efek sampingnya relatif lebih kecil dibanding imunomodulator sintetik. Imunomodulator selain dapat dimanfaatkan untuk pencegahan infeksi juga dapat digunakan untuk adjuvant kemoterapi dengan cara meningkatkan atau menurunkan respon imun tertentu (Tafrihani et al., 2021).

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa senyawa β -sitosterol mampu meningkatkan kapasitas dan indeks fagositosis makrofag secara *in vitro* (Wahdaningsih et al., 2018). Kebaruan dari penelitian ini adalah bahwa sampai saat ini belum ada penelitian tentang aktivitas imunomodulator ekstrak petroleum eter umbi bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) secara *in vivo* pada mencit Balb/c yang diinduksi vaksin hepatitis B. Penelitian terkait aktivitas imunomodulator bengkoang yang sudah pernah dilakukan adalah pengujian aktivitas imunomodulator fiber (serat) bengkoang baik *in vitro* maupun *in vivo* (Kumalasari et al, 2013) dan fraksi dari fiber bengkoang (Baroroh et al, 2020; Baroroh et al, 2021). Fiber bengkoang bersifat larut air, sedangkan dalam penelitian ini yang diteliti adalah ekstrak petroleum eter bengkoang (mengandung senyawa yang bersifat non polar) seperti senyawa β -sitosterol yang diduga berkhasiat sebagai imunomodulator. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk menyelidiki aktivitas imunomodulator ekstrak petroleum eter umbi bengkoang dengan parameter berupa aktivitas fagositosis makrofag, produksi sitokin TNF- α , IL-10 dan imunitas humoral berupa IgG pada mencit Balb/c jantan yang diinduksi antigen berupa vaksin hepatitis B.

2. Bahan dan Metode

2.1. Bahan

Umbi bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) diambil dari Prembun Kebumen, Jawa Tengah, Indonesia pada musim kemarau. Identifikasi tanaman dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi UGM dengan nomer: UGM/FA/2254/M/03/02. Penyari untuk ekstraksi yaitu petroleum eter grade p.a (Merck; Darmstadt, Germany). Media yang digunakan untuk uji fagositosis makrofag dan proliferasi limfosit meliputi RPMI 1640 (Rosewell Park Memorial Institute) (Gibco; USA), Fungizone (Gibco; USA), FBS (Fetal Bovine Serum) (Gibco; USA), PBS (Phosphate Buffered Saline) (Gibco; USA), Pen-Strep (Penicillin-Streptomycin) (Gibco; USA), natrium bikarbonat (Sigma-Aldrich), *latex beads* polystyrene 3,0 μ m (Sigma-Aldrich), phytohemagglutinin M-form (Gibco; by life technologies), giemsa (Merck; Darmstadt, Germany), NH₄Cl (Merck; Darmstadt, Germany), *coverslips* diameter 13 mm (Thermanox plastic Nunc Rochester, USA), HCl (Merck; Darmstadt, Germany) 0,01 N, 3-

(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazoliumbromide (MTT) (Merck; Darmstadt, Germany), metanol (Merck; Darmstadt, Germany), levamisole (PT. Konimex, Solo, Indonesia), vaksin hepatitis B (Engerix-B, Glaxo Smith Kline), Reagen Griess A dan B, Mouse IgG (Immunoglobulin G) ELISA kit Fine test, Mouse IL-10 (interleukin 10) ELISA kit Fine test, Mouse TNF- α (tumor necrosis factor alpha) ELISA kit Fine test (Wuhan Fine Biotech Co., Ltd). TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck; Darmstadt, Germany), reagen Lieberman Burchard, β -Sitosterol (Santa Cruz Biotechnology, Inc), ethyl acetate (Merck; Darmstadt, Germany).

Mencit jantan galur Balb/c berumur 8-10 minggu, berat 20-30 g diperoleh dari Laboratorium Farmakologi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Protokol uji telah mendapat persetujuan dari komisi *ethical clearance* untuk penelitian praklinik dari LPPT (Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu) Universitas Gadjah Mada dengan nomer persetujuan: 00076/04/LPPT/VII/2018.

2.2. Peralatan

Peralatan yang digunakan meliputi alat untuk sokhletasi, vakum rotary evaporator (IKA RV 10 Basic, Germany), sonikator (1510 Branson), timbangan analitik (Mettler Toledo, Switzerland), freezer -80°C (Thermo Scientific), mikropipet (Eppendorf), mikropipet 8 channel 30-300 μ L (Eppendorf), laminar air flow (Labconco Purifier Class II Biosafety Cabinet), sentrifuse (Thermo Scientific Sorvall Biofuge Primo R centrifuge), sentrifuse (Sorvall Legend Micro 17 microcentrifuge), hemocytometer (Neubauer), inkubator CO₂ (Biobase), optilab, mikroskop inverted (Olympus), *microplate reader* (BIO RAD Microplate Reader Benchmark).

2.3. Metode

2.3.1. Pembuatan ekstrak petroleum eter bengkoang

Umbi bengkoang sejumlah 50 kg dibersihkan, dikupas, lalu dikeringkan di almari pengering pada suhu 40-50°C selama 2 hari kemudian dihaluskan menjadi serbuk. Serbuk seberat 4,3 kg disokhletasi menggunakan petroleum eter, selanjutnya filtrat dipekatkan menggunakan vakum rotary evaporator (Lukitaningsih, 2012).

2.3.2. Uji kromatografi lapis tipis (KLT)

Senyawa β -sitosterol yang terkandung di dalam ekstrak petroleum eter (EPE) bengkoang dibuktikan keberadaannya dengan uji kromatografi lapis tipis menggunakan fase diam Silica gel 60 F₂₅₄ dan fase gerak yaitu petroleum eter-etil asetat (8:2) v/v serta deteksi dengan sinar tampak setelah disemprot dengan reagen Lieberman Burchard (Hidayah *et al.*, 2016; Novrianto *et al.*, 2016)

2.3.3. Uji fagositosis makrofag *in vivo*

Mencit Balb/c sebanyak 20 ekor secara acak dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu kelompok I (kontrol negatif) diberi perlakuan tween-CMC 0,5%, kelompok II (kontrol positif) diberi levamisol 2,5 mg/kg BB, kelompok III dan IV masing-masing diberi perlakuan EPE bengkoang 100 dan 200 mg/kgBB. Induksi menggunakan vaksin hepatitis B mengacu kepada penelitian sebelumnya (Winanta *et al.*, 2019). Pada hari ke-7 dan 14, mencit diinduksi vaksin hepatitis B 2,6 µL/20 g BB secara intraperitoneal dan perlakuan ekstrak diberikan peroral selama 18 hari. Pada hari ke-19 mencit diambil darahnya lewat vena orbitalis mata, selanjutnya mencit dikorbankan untuk diisolasi sel makrofag peritoneal dan diambil organ limpanya. Efek imunomodulator dievaluasi berdasarkan aktivitas fagositosis makrofag, proliferasi limfosit, produksi antibodi (IgG), serta sitokin TNF-α dan IL-10.

2.3.4. Isolasi sel makrofag dan uji fagositosis makrofag

Mencit Balb/c dikorbankan, kulit pada bagian perut dibersihkan dengan alkohol 70% dan bagian peritoneumnya dibuka. Sepuluh mL medium RPMI 1640 dingin disuntikkan ke rongga peritoneum, kemudian ditekan-tekan perlahan sekitar 3 menit. Selanjutnya cairan peritoneum diambil dengan spuit injeksi. Cairan peritoneum disentrifuse dengan kecepatan 2.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C, lalu bagian supernatan dibuang, pada bagian pelet ditambahkan 3 mL medium komplit (berisi RPMI, penicillin-streptomycin 2%, fungizone (amphotericin B) 0,5% dan FBS 10%). Setelah kepadatan sel dihitung, selanjutnya diresuspensikan dengan medium komplit hingga diperoleh kepadatan $2,5 \times 10^6$ sel/mL. Suspensi sel dikultur pada *plate* 24 *well* yang sudah diberi *coverslips*. Setiap *well* diberi suspensi sel 200 µL (5×10^5 sel). Selanjutnya diinkubasi pada inkubator suhu 37°C dalam 5% CO₂ semalam. Media dibuang hingga tinggal makrofag dalam *coverslips*, selanjutnya dicuci sekali dengan media RPMI, ditambah 1 mL medium komplit lalu diinkubasi 1 jam. Sebanyak 300 µL suspensi *latex beads* dalam medium komplit (kepadatan $2,5 \times 10^7$ sel/mL) ditambahkan ke tiap *well* lalu diinkubasi dalam inkubator CO₂ selama 60 menit, selanjutnya media dibuang dan *coverslips* dicuci PBS sebanyak 3 kali lalu dikeringkan pada temperatur kamar. Fiksasi dengan metanol dilakukan selama 30 detik, kemudian metanol dibuang. Pewarnaan dengan giemsa 20% v/v dilakukan selama 30 menit kemudian dicuci menggunakan aquadest 4-5 kali dan dibiarkan kering pada temperatur kamar. Selanjutnya *coverslips* dilihat di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali dan dihitung indeks fagositosis serta kapasitas fagositosisnya. Kapasitas fagositosis yaitu perbandingan jumlah makrofag yang memfagositosis *latex beads* terhadap jumlah makrofag yang dihitung (100 makrofag) dikalikan 100% (Beandrade, 2018). Indeks fagositosis yaitu jumlah *latex beads* yang difagositosis makrofag dibandingkan dengan jumlah makrofag yang aktif (Lestari *et al.*, 2012).

2.3.5. Produksi nitrit oksid dari makrofag peritoneal

Sel peritoneal dengan kepadatan 1×10^6 sel/mL dikultur dalam *plate 24 well* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator CO_2 5%, selanjutnya diambil supernatannya. Larutan stok NaNO_2 dengan kadar $2000 \mu\text{M}$ dibuat dengan menimbang $69,0 \text{ mg NaNO}_2$ kemudian dilarutkan dalam 100 mL aqua bidestilata. Sebagai standar dibuat kurva baku NaNO_2 dengan konsentrasi $0\text{-}100 \mu\text{M}$. Sebanyak $100 \mu\text{L}$ supernatan dan seri larutan standar NaNO_2 dimasukkan dalam *microplate 96 well* dengan 3 kali replikasi. Reagen Griess (campuran Griess A dan B dengan perbandingan 1:1) sebanyak $100 \mu\text{L}$ ditambahkan dalam tiap *well* dan diinkubasi selama 15 menit pada temperatur kamar dan terlindung dari cahaya. Absorbansi diukur menggunakan ELISA *microplate reader* pada lambda 550 nm . Data absorbansi larutan standar NaNO_2 digunakan untuk membuat persamaan yang berfungsi untuk menghitung kadar nitrit oksid (μM) yang terdapat dalam supernatan. Pengujian nitrit oksid mengacu pada metode Griess (Green *et al.*, 1982).

2.3.6. Isolasi limfosit dan uji proliferasi

Jaringan limpa diisolasi secara aseptik dari mencit, setelah itu dimasukkan ke dalam cawan petri steril yang mengandung RPMI 1640 untuk mendapatkan suspensi limfosit dalam medium, kemudian disentrifuse 2000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C . Supernatan dibuang dan pelet dilarutkan dalam buffer Ammonium Chloride (NH_4Cl) untuk melisiskan eritrosit dan dibiarkan pada temperatur kamar selama 5 menit. Selanjutnya disentrifuse kembali selama 10 menit dan supernatan dibuang. Pelet ditambah medium komplit (yang mengandung fetal bovine serum) hingga kepadatan $1,5 \times 10^6$ sel/mL kemudian dikultur dengan volume $100 \mu\text{L/well}$ ke dalam *96-well microplate*. Sebanyak $2 \mu\text{L}$ Phytohaemagglutinin (PHA) ditambahkan ke tiap *well* pada kelompok kontrol dan perlakuan, dan diinkubasi dalam inkubator CO_2 pada suhu 37°C selama 48 jam. Selanjutnya setiap *well* ditambah 10 uL MTT 5 mg/mL lalu diinkubasi kembali dalam inkubator CO_2 pada 37°C selama 4 jam. Kristal formazan akan terbentuk dari reaksi antara MTT dengan sel yang hidup. Seratus μL reagen stopper (10% SDS) dalam $50 \mu\text{L}$ $0,01 \text{ N}$ HCl ditambahkan ke setiap *well*, lalu diinkubasi semalam. Proliferasi limfosit diukur dari *optical density* (OD) dengan ELISA *microplate reader* pada 550 nm (Senas & Linawati, 2012).

2.3.7. Analisis produksi antibodi (IgG) dan sitokin

Darah (sekitar 1 mL) diambil dari pleksus retroorbital mencit pada hari ke-19. Sampel darah dibiarkan selama 1 jam pada temperatur kamar. Darah disentrifuse 4000 rpm selama 10 menit, dan supernatan (serum) disimpan pada suhu -80°C sampai digunakan. Kadar IgG, $\text{TNF-}\alpha$, IL-10 dalam serum ditentukan dengan metode sandwich ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*). *Optical density* diukur menggunakan ELISA *microplate reader* pada

panjang gelombang 450 nm (mengacu kepada prosedur Fine test mouse ELISA kit). Data *Optical Density* (OD) larutan standar yang dibuat 7 seri konsentrasi dipakai untuk membuat kurva baku sehingga dihasilkan persamaan yang berfungsi untuk menghitung kadar sitokin dan antibodi (pg/mL) yang terdapat dalam serum.

2.3.8. Analisis data

Data disajikan dalam *mean ± standar error mean* (SEM). Normalitas data dianalisis dengan uji Saphiro Wilk dan homogenitas data dianalisis dengan Levene test. Selanjutnya data yang terdistribusi normal ($p > 0,05$) dan homogen ($p > 0,05$) dianalisis menggunakan Anova satu jalan dengan taraf kepercayaan 95% untuk membandingkan antar kelompok perlakuan. Apabila berbeda signifikan ($p < 0,05$) dilanjutkan uji post hoc *Least Significance different* (LSD) dengan taraf kepercayaan 95%. Sedangkan untuk data yang terdistribusi tidak normal atau tidak homogen diuji statistik menggunakan Kruskal Wallis, jika terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) dilanjutkan dengan uji Mann Whitney dengan taraf kepercayaan 95%.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Hasil uji kromatografi lapis tipis (KLT)

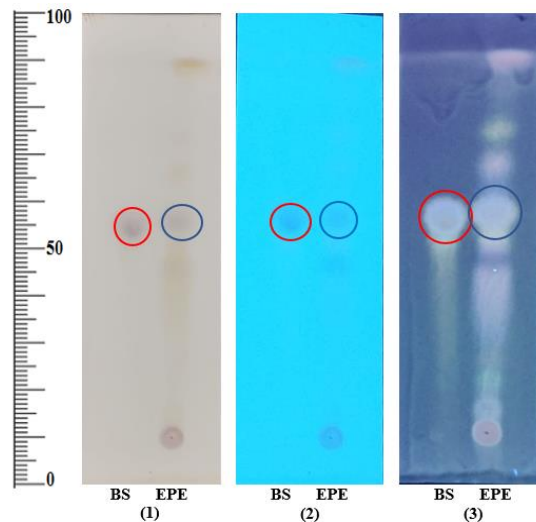
Ekstraksi serbuk bengkoang menggunakan metode sokhletasi menghasilkan ekstrak petroleum eter (EPE) bengkoang sebanyak 22gram dengan persen rendemen sebesar 0,51%. Hasil uji KLT ekstrak petroleum eter (EPE) bengkoang menggunakan fase gerak petroleum eter-etil asetat (8:2) v/v dan disemprot dengan pereaksi Lieberman Burchard (LB), menunjukkan bahwa EPE bengkoang mengandung senyawa β -sitosterol yang ditandai dengan terbentuknya warna agak ungu (dilihat pada sinar tampak) dan Rf yang sama dengan pembanding β -sitosterol yaitu Rf 0,58 (Gambar 1). Hasil ini sejalan dengan penelitian terdahulu yang menyatakan bahwa ekstrak petroleum eter bengkoang mengandung senyawa fitosterol yang berupa β -sitosterol (Lukitaningsih, 2012).

Sinar UV₃₆₆ nm setelah disemprot LB.

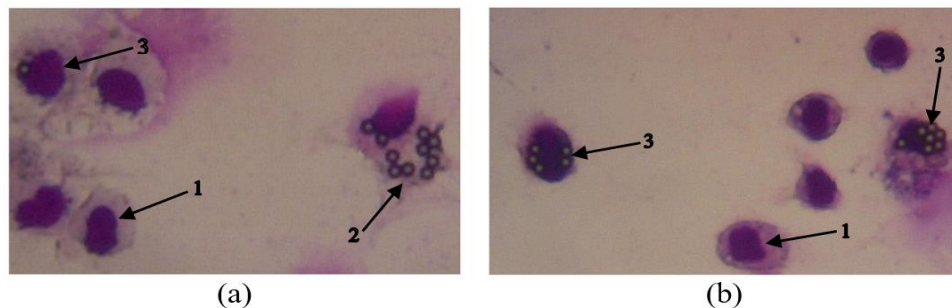
3.2. Aktivitas imunomodulator *in vivo*

3.2.1. Peningkatan aktivitas fagositosis makrofag

Aktivitas makrofag bisa diukur berdasarkan kemampuannya dalam memfagosit partikel *latex beads* dan memproduksi nitrit oksid (NO). Pada uji ini menggunakan metode *latex beads* seperti terlihat pada Gambar 2. Penggunaan latex beads ukuran 3 μ m sebagai model uji fagositosis karena ukuran *latex beads* hampir sama dengan bakteri yaitu antara 1-10 μ m serta menyesuaikan ukuran makrofag yakni antara 100-225 μ m. *Latex beads* tidak terwarnai oleh giemsa, sehingga mudah diamati di bawah mikroskop cahaya (Champion *et al.*, 2008; Desjardins & Griffiths, 2003).



Gambar 1. Hasil uji KLT ekstrak petroleum eter (EPE) bengkoang dan β -sitosterol (BS). Keterangan: Sampel : EPE bengkoang 1% (v/v) dalam metanol sebanyak 5 totolan, Perbandingan: β -sitosterol 1% (v/v) dalam etil asetat sebanyak 2 totolan; Fase diam : Silica gel 60 F₂₅₄; Fase gerak : Petroleum eter-etil asetat (8:2) v/v, jarak elusi 8 cm; Deteksi dengan disemprot reagen Liebermann Burchard (LB), dipanaskan 100°C selama 5 menit; (1). Sinar tampak setelah disemprot LB; (2). Sinar UV₂₅₄ nm setelah disemprot LB; (3).



Gambar 2. Uji fagositosis makrofag pada kelompok kontrol (a) dan kelompok perlakuan ekstrak petroleum eter bengkoang (b). Keterangan: (1) makrofag, (2) *latex beads*, dan (3) makrofag yang makan *latex beads*.

Makrofag mempunyai peran penting dalam imunitas nonspesifik melalui aksi fagositosis mikroba. Mikroba yang masuk ke badan (inang) akan berikatan dengan reseptor sel fagosit, lalu membran sel fagosit akan mengelilingi mikroba tersebut dan mencerna mikroba di dalam fagosom. Proses selanjutnya terjadi fusi antara fagosom dan lisosom, hal ini menyebabkan aktivasi fagosit membentuk fagolisosom (mikroba dimusnahkan oleh enzim lisosom di dalam fagosit) (Abbas *et al.*, 2018; Baratawidjaja & Rengganis, 2016).

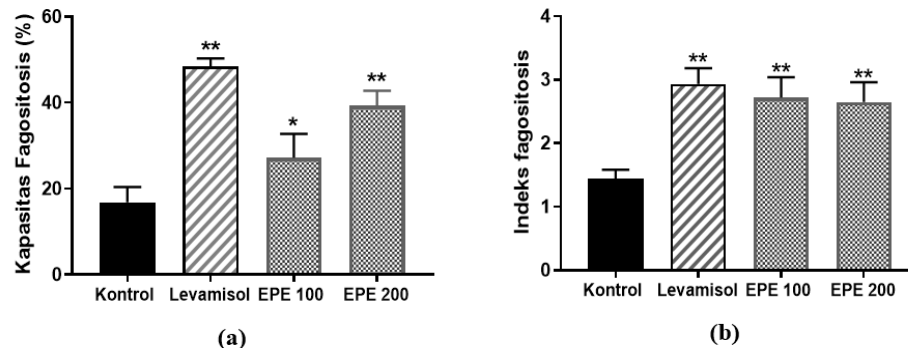
Ekstrak petroleum eter bengkoang dosis 100 dan 200 mg/kg BB mampu meningkatkan indeks fagositosis dan kapasitas fagositosis secara bermakna bila dibandingkan kontrol negatif ($p < 0,05$) sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 3. Peningkatan kapasitas fagositosis akibat perlakuan EPE 100 mg/kgBB lebih kecil (berbeda signifikan) jika dibandingkan kontrol positif (levamisol), sedangkan peningkatan kapasitas fagositosis kelompok EPE 200 mg/kgBB setara

dengan kontrol positif ($p > 0,05$). Peningkatan indeks fagositosis pada ekstrak petroleum eter dosis 100 dan 200 mg/kgBB menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna ($p > 0,05$) dibanding kontrol positif (levamisol). Pada penelitian ini hanya menggunakan 2 variasi dosis untuk melihat efek imunomodulator dari ekstrak petroleum eter bengkoang, belum sampai mencari dosis yang efektif karena masih memerlukan penelitian lebih lanjut. Peningkatan kapasitas fagositosis ini diduga karena kandungan β -sitosterol dalam ekstrak petroleum eter bengkoang. Dalam penelitian pendahuluan *in vitro*, menunjukkan bahwa β -sitosterol konsentrasi 12,5-50 $\mu\text{g/mL}$ mampu memodulasi makrofag dengan meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag. Indeks fagositosis (IF) setelah pemberian β -sitosterol meningkat menjadi sekitar 2,8 sementara IF kelompok kontrol sel 1,5 dan kapasitas fagositosisnya (KF) meningkat menjadi 40-45% sedangkan KF kelompok kontrol sel sebesar 19% (Sujono *et al.*, 2021).

Umbi bengkoang mengandung polisakarida, fiber dan pektin yang telah terbukti sebagai imunomodulator (Baroroh *et al.*, 2020, Baroroh *et al.*, 2021; Kumalasari *et al.*, 2014). Baik polisakarida, fiber dan pektin merupakan senyawa yang bersifat polar. Penelitian ini menggunakan ekstrak petroleum eter yang mengandung senyawa-senyawa yang bersifat nonpolar. Berdasarkan studi literatur, dalam ekstrak petroleum eter bengkoang dilaporkan mengandung senyawa β -sitosterol, stigmasterol, 9,12-tricosandiene, trilinolein, palmitic acid, hexadecyl pentanoate (Lukitaningsih, 2009). Berbagai senyawa tersebut yang terkandung dalam ekstrak petroleum eter, beberapa penelitian (publikasi) melaporkan bahwa senyawa β -sitosterol menunjukkan aktivitas sebagai imunomodulator. β -sitosterol mampu meningkatkan kapasitas fagositosis *in vitro* (Wahdaningsih *et al.*, 2021), meningkatkan aktivitas fagositik dari sel U937 (Boukes & Venter, 2016), dapat memodulasi fungsi makrofag (Liu *et al.*, 2019). β -sitosterol juga meningkatkan respon imun pada hewan uji ayam broiler dan babi (Cheng *et al.*, 2020; Fraile *et al.*, 2012). Oleh karena itu dalam penelitian ini dilakukan KLT dengan pembandingan β -sitosterol untuk membuktikan bahwa ekstrak petroleum eter bengkoang mengandung senyawa tersebut, sehingga β -sitosterol mempunyai potensi sebagai salah satu parameter mutu ekstrak.

Mikroba bisa dibunuh melalui produksi *respiratory burst* yaitu proses yang menghasilkan ROI (*reactive oxygen intermediates*). Bersamaan dengan terbentuknya fagolisosom, reseptor fagosit yang mengikat mikroba akan mengirim sinyal untuk mengaktifkan beberapa enzim dalam fagolisosom diantaranya adalah enzim oksidase fagosit yang terbentuk karena adanya pengaruh mediator inflamasi seperti TNF (*tumor necrosis factor*), LTB4 (leukotrien A4), dan PAF (*platelet activating factor*). Adanya enzim tersebut akan mengubah molekul oksigen menjadi anion superoksid, radikal bebas serta H_2O_2 yang merupakan bahan oksidatif poten

terhadap mikroba. Bahan-bahan tersebut disebut ROI yang sangat toksik bagi bakteri dan jaringan, namun bersifat sangat tidak stabil, dalam waktu singkat dipecah menjadi H_2O_2 yang akhirnya dipecah katalase. Selain itu ada enzim lain yakni iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) yang merupakan katalase dalam pengubahan arginin menjadi NO (nitrit oksid) yang juga bersifat bakterisidal (Baratawidjaja & Rengganis, 2016).



Gambar 3. Efek ekstrak petroleum eter umbi bengkoang terhadap kapasitas fagositosis makrofag (a) dan indeks fagositosis (b) $n = 5$. * $p < 0,05$ dan ** $p < 0,01$.

Vaksin hepatitis B (yang mengandung antigen virus hepatitis B) diinduksikan secara intraperitoneal pada mencit sebanyak 2 kali pada hari ke-7 dan 14. Vaksin hepatitis B di sini sebagai antigen yang digunakan untuk menstimulasi/mengaktivasi makrofag. Proses selanjutnya makrofag yang sudah teraktivasi akan menstimulasi produksi nitrit oksid (NO) yakni suatu radikal bebas yang bersifat toksik bagi agen asing yang bersifat patogenik (bakterisidal) (Lestari *et al.*, 2012). Nitrit oksid mempunyai peranan yang penting dalam regulasi respon imun (Kim *et al.*, 2011). Produksi NO pada kelompok yang diberi perlakuan EPE bengkoang dosis 100 dan 200 mg/kgBB menunjukkan peningkatan tetapi tidak berbeda signifikan dibanding kontrol (Tabel 1). Adanya peningkatan dosis ekstrak petroleum eter (EPE) bengkoang (100 dan 200 mg/kgBB) menunjukkan peningkatan kapasitas fagositosis (persentase sel makrofag yang memfagosit *latex beads*) secara signifikan ($p < 0,05$). Peningkatan dosis ekstrak petroleum eter tidak menyebabkan perubahan indeks fagositosis yang signifikan ($p > 0,05$). Berdasarkan hal ini menunjukkan bahwa adanya peningkatan dosis EPE meningkatkan kapasitas fagositosis namun tidak mempengaruhi indeks fagositosisnya jika dibanding EPE dosis 100 mg/kgBB. Peningkatan dosis EPE akan meningkatkan produksi NO namun perubahannya tidak signifikan dibanding dosis 100 mg/kgBB ($p > 0,05$). Menurut Hirayama *et al.*, (2018) peningkatan aktivitas makrofag menunjukkan adanya peningkatan respon imun terhadap bakteri, virus dan antigen lainnya.

3.2.2. Aktivitas proliferasi limfosit

Sel limfosit diisolasi secara aseptis dari spleen (limpa) hewan uji mencit. Penggunaan limpa sebagai sumber limfosit karena limpa merupakan organ limfoid sekunder yang berisi sel T dan B (Abbas *et al.*, 2018; Baratawidjaja & Rengganis, 2016). Limfosit merupakan bagian dari respon imun adaptif dan penting bagi fungsi imun normal.

Peningkatan absorbansi atau *optical density* (OD) pada kelompok yang diberi perlakuan kontrol positif (levamisol 2,5 mg/kgBB) dan EPE bengkoang dosis 100 dan 200 mg/kgBB dibandingkan terhadap kontrol negatif dapat dilihat pada tabel 1. Hal ini menunjukkan bahwa kontrol positif dan EPE bengkoang dosis 100 dan 200 mg/kgBB mampu meningkatkan proliferasi sel limfosit mencit yang sebelumnya sudah diinduksi antigen berupa vaksin hepatitis B. Adanya peningkatan proliferasi sel limfosit bisa diukur dari peningkatan nilai absorbansi (OD), dimana semakin banyak sel limfosit yang berproliferasi (sel hidup) maka pada pengujian MTT lebih banyak terbentuk kristal formazan (perubahan warna ungu menjadi lebih pekat). Jumlah sel limfosit yang berproliferasi sebanding dengan intensitas warna (absorbansi) yang terbaca pada panjang gelombang 550 nm (Khusnawati *et al.*, 2015). Adanya peningkatan proliferasi limfosit ini mengindikasikan adanya peningkatan pada respon imun spesifik, namun diperlukan pengujian lebih lanjut terkait aktivitasnya pada imunitas seluler atau humoral.

Tabel 1. Efek ekstrak petroleum eter umbi bengkoang terhadap proliferasi limfosit, produksi nitrit oksid, sitokin (IL-10 dan TNF- α) pada mencit yang diinduksi vaksin hepatitis B. Keterangan : OD (*optical density*), data disajikan dalam bentuk *mean* \pm SEM (*standard error mean*) dengan n=5; untuk nitrit oksid n=4, EPE (ekstrak petroleum eter); TNF- α (tumor necrosis factor- α), IL-10 (interleukin-10), ^ap<0,01, ^bp<0,05, berbeda signifikan dibanding kelompok kontrol

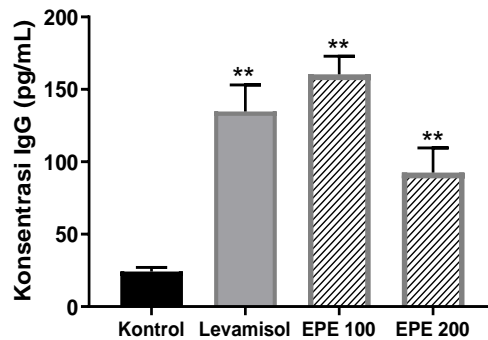
Perlakuan	Proliferasi limfosit (OD)	Nitrit oksid (μ M)	TNF- α (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)
Kontrol	0,116 \pm 0,006	0,84 \pm 0,36	353,80 \pm 33,67	74,04 \pm 10,60
Levamisol 2,5 mg/kgBB	0,164 \pm 0,008 ^a	2,45 \pm 0,26 ^a	448,40 \pm 21,93	60,80 \pm 7,91
EPE bengkoang 100 mg/kgBB	0,132 \pm 0,003 ^a	1,38 \pm 0,36	332,00 \pm 33,43	94,06 \pm 21,56
EPE bengkoang 200 mg/kgBB	0,147 \pm 0,003 ^a	1,77 \pm 0,42	484,00 \pm 41,62 ^b	59,42 \pm 8,12

3.2.3. Produksi sitokin dan imunoglobulin

TNF- α merupakan sitokin yang bersumber dari makrofag dan sel T. Sitokin ini berperan penting pada inflamasi akut (proinflamasi) terhadap mikrobia atau antigen. Pada konsentrasi yang rendah TNF bekerja pada leukosit dan endotel untuk menstimulasi terjadinya inflamasi (peradangan) akut, sedangkan pada konsentrasi yang *moderate* berperan pada inflamasi yang sistemik, dan jika kadarnya sangat tinggi dapat menyebabkan gangguan patologik syok sepsis. Interleukin-10 (IL-10) diproduksi oleh makrofag yang aktif, yang merupakan sitokin antiinflamasi, dimana IL-10 ini berperan sebagai inhibitor makrofag dan sel dendritik dalam mengontrol reaksi imun non spesifik dan imun seluler (Baratawidjaja & Rengganis, 2016).

Tabel 1 menunjukkan bahwa pemberian EPE bengkoang dosis 200 mg/kgBB meningkatkan kadar TNF- α dan menurunkan IL-10 dibandingkan pada dosis 100 mg/kgBB, walaupun perubahannya tidak bermakna bila dibandingkan kontrol negatif ($P>0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa pada dosis yang lebih besar, EPE bengkoang menunjukkan efek inflamasi. Hasil ini agak berbeda dengan beberapa penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa β -sitosterol bersifat antiinflamasi (menghambat produksi sitokin proinflamatori) dengan menurunkan ekspresi mediator inflamasi yang diinduksi Lipopolisakarida (LPS) yakni IL-6, iNOS, TNF- α , COX-2. Analisis jalur pensinyalan terkait menunjukkan bahwa perlakuan dengan β -sitosterol dapat menghambat aktivasi jalur p38, ERK, dan NF- κ B yang diinduksi LPS (Sun *et al.*, 2020). Selain itu, sejumlah studi pada hewan juga menunjukkan bahwa β -sitosterol mengurangi sekresi sitokin proinflamatori seperti pada keadaan edema dan meningkatkan sitokin antiinflamatori (Sayeed *et al.*, 2016). Senyawa β -sitosterol memodulasi polarisasi makrofag dan mengurangi inflamasi rheumatoid pada mencit. Pada studi yang lain yang dilakukan secara *in vivo* dengan pemberian injeksi β -sitosterol dosis 20 dan 50 mg/kgBB setiap 2 hari setelah booster imunisasi *collagen-induced arthritis* (CIA), menunjukkan bahwa pada dosis 50 mg/kgBB mampu menurunkan produksi TNF- α secara signifikan dibanding dosis 20 mg/kgBB (Liu *et al.*, 2019). Adanya perbedaan hasil penelitian ini dibanding dengan penelitian sebelumnya dimungkinkan karena pada penelitian sebelumnya yang digunakan adalah senyawa standard β -sitosterol, sementara yang digunakan dalam penelitian ini masih berupa ekstrak non polar yang mengandung beberapa senyawa seperti 9,12 tricosandiene, palmitic acid, β -sitosterol, stigmasterol, trilinolein, hexadecyl pentanoate (Lukitaningsih, 2009).

Vaksin hepatitis B sebagai antigen diberikan pada hari ke-7 dan 14 setelah perlakuan ekstrak. Tujuan pemberian vaksin 2 kali dimaksudkan agar sistem imun dalam tubuh mampu mengenal kembali atau mempunyai memori yang sudah terbentuk selama perlakuan. Kadar antibodi (imunoglobulin) diukur pada hari ke-19 karena fase lag dari respon imun primer, yaitu munculnya IgM biasanya muncul 5-10 hari setelah masuknya antigen, sedangkan IgG mencapai puncaknya pada hari ke 10 sampai hari ke 14 (Abbas *et al.*, 2018). Ketika terjadi pengulangan masuknya antigen, lag fase muncul biasanya pada hari ke 1-3 setelah infeksi ulangan (Ademokun & Dunn-Walters, 2010; Male *et al.*, 2013). Respon sekunder jika dibandingkan terhadap respon primer, produksi antibodinya lebih besar dan puncak level antibodi tercapai lebih cepat (sekitar 2-3 hari dibandingkan jika tanpa booster sekitar 7 hari), isotip utama adalah IgG dibanding IgM dan afinitas antibodi menjadi lebih besar (Descotes, 2014).



Gambar 4. Konsentrasi IgG setelah pemberian ekstrak petroleum eter (EPE) bengkoang pada mencit yang diinduksi vaksin hepatitis B (*mean ± SEM*, n=5) **p<0,01 berbeda signifikan terhadap kontrol.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis EPE bengkoang, kadar immunoglobulin semakin kecil (Gambar 4), hal ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yakni model imunisasi *collagen-induced arthritis* (CIA) yang dikarakterisasi oleh antigen spesifik yang poten terhadap respon imun humoral. Hasil menunjukkan bahwa treatment β -sitosterol secara signifikan menghambat produksi collagen-specific IgG ($p<0.05$), hal ini menunjukkan bahwa β -sitosterol mengurangi respon imun humoral (Liu *et al.*, 2019).

Penelitian ini menggunakan levamisol sebagai kontrol positif yakni suatu obat golongan imidazothiazol. Dalam penggunaan klinis levamisol digunakan sebagai anthelmentik dan juga imunostimulan. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa levamisol mampu meningkatkan fagositosis makrofag, produksi nitrit oksid, proliferasi limfosit serta menstimulasi produksi antibodi (IgG) dan sitokin TNF- α . Hal ini sesuai dengan beberapa penelitian yang menyatakan bahwa levamisol meningkatkan fagositosis makrofag, antibodi (IgM, dan IgG), kadar IL-5, IFN- γ , TNF- α (Mohamed *et al.*, 2016). Levamisol mampu meningkatkan respon proliferasi limfosit (Chandy *et al.*, 2016).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa EPE bengkoang mempunyai efek imunostimulan terhadap parameter fagositosis makrofag, yaitu mampu meningkatkan fagositosis makrofag (baik kapasitas maupun indeks fagositosis). Namun semakin tinggi dosis menyebabkan penurunan nilai immunoglobulin G (IgG). Sedangkan produksi TNF- α pada kelompok yang diberi perlakuan EPE bengkoang dosis 200 mg/kgBB menunjukkan peningkatan produksi TNF- α , sedangkan dengan dosis yang sama produksi sitokin antiinflamasi IL-10 mengalami penurunan namun perubahannya tidak signifikan dibanding kontrol.

Penelitian lebih lanjut dengan rentang variasi dosis yang lebih besar dari dosis terendah sampai dosis tertinggi perlu dilakukan untuk mengetahui apakah terdapat dosis optimum EPE bengkoang sebagai imunomodulator. Hal ini sejalan dengan beberapa penelitian sebelumnya yakni ekstrak petroleum eter daun Ara (*Ficus racemosa* Linn.) pada dosis kecil menunjukkan

efek imunostimulan sedangkan pada dosis yang lebih besar menunjukkan efek immunosupresan dengan parameter indeks fagositosis mencit (Trihastuty *et al.*, 2019). Penelitian lain yang sejenis (aktivitas immunomodulator menggunakan ekstrak bersifat non polar dengan tanaman yang berbeda) yang dilakukan oleh Bafna & Mishra, (2007) menunjukkan pola yang hampir sama seperti ekstrak petroleum eter bunga *Sphaeranthus indicus* yang diberikan dengan dosis bertingkat yaitu 50, 100, 200, 300, 400 mg/kgBB menunjukkan bahwa semakin besar dosis indeks fagositiknya meningkat. Dosis 200 mg/kgBB merupakan dosis optimum dalam meningkatkan IgG, pada dosis yang lebih besar menunjukkan penurunan aktivitas. Salah satu senyawa yang terkandung dalam ekstrak petroleum eter bunga *S. indicus* adalah β -sitosterol. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak petroleum eter bengkoang dosis 100 dan 200 mg/kgBB mempunyai efek imunostimulan terhadap respon imun non spesifik (fagositosis makrofag), namun pada dosis 200 mg/kgBB terjadi penurunan respon imun spesifik (IgG), sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut untuk membuktikan apakah dengan peningkatan dosis EPE justru menurunkan respon imun (immunosupresan).

4. Kesimpulan

Ekstrak petroleum eter bengkoang dosis 100 dan 200 mg/kgBB mempunyai aktivitas immunomodulator *in vivo*. Peningkatan dosis ekstrak petroleum eter mempengaruhi respon imun non spesifik berupa peningkatan aktivitas fagositosis makrofag dan produksi NO, selain itu juga terjadi peningkatan produksi TNF- α dan penurunan IL-10. Respon imun spesifik yang berupa proliferasi limfosit juga meningkat, namun pada dosis yang lebih tinggi yakni 200 mg/kgBB terjadi penurunan respon imun humoral (IgG).

Ucapan Terimakasih

Kami mengucapkan terima kasih kepada Fakultas Farmasi UGM yang telah mendanai penelitian ini melalui penelitian kolaboratif antara dosen dan mahasiswa tahun 2019.

Deklarasi Konflik Kepentingan

Semua penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan terhadap naskah ini.

Daftar Pustaka

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., dan Pillai, S. (2018). *Cellular and molecular immunology e-Book* (Ninth). Philadelphia: Elsevier.
- Ademokun, A. A., dan Dunn-Walters, D. (2010). Immune Responses: Primary and Secondary. *Encyclopedia of Life Sciences, September*, 1–9.
- Bafna, A. R., dan Mishra, S. H. (2007). Immunomodulatory activity of petroleum ether extract of flower heads of *Sphaeranthus indicus* linn. *Journal of Herbal Pharmacotherapy*, 7(1), 25–37.
- Baratawidjaja, K. G., dan Rengganis, I. (2016). *Imunologi Dasar* (11 ed.). Jakarta: Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Baroroh, H. N., Nugroho, A. E., Lukitaningsih, E., dan Nurrochmad, A. (2020). Water-soluble fiber from bengkoang (*Pachyrhizus erosus* (L.) Urban) tuber modulates immune system

- activity in male mice. *Scientia Pharmaceutica*, 88(0034), 1–12.
- Baroroh, H. N., Nugroho, A. E., Lukitaningsih, E., dan Nurrochmad, A. (2021). Immune-enhancing effect of bengkoang (*Pachyrhizus erosus* (L.) Urban) fiber fractions on mouse peritoneal macrophages, lymphocytes, and cytokines. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, 12(1), 84–91.
- Beandrade, M. U. (2018). Formulasi dan Karakterisasi SNEDDS Ekstrak Jinten Hitam (*Nigella Sativa*) dengan Fase Minyak Ikan Hiu Cucut Botol (*Centrophorus* Sp) serta Uji Aktivitas Immunostimulan. *JPSCR : Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*, 3(1), 50–61.
- Boukes, G. J., dan Venter, V. de. M. (2016). In vitro modulation of the innate immune response and phagocytosis by three *Hypoxis* spp. and their phytosterols. *South African Journal of Botany*, 102, 120–126.
- Champion, J. A., Walker, A., dan Mitragotri, S. (2008). Role of particle size in phagocytosis of polymeric microspheres. *Pharmaceutical Research*, 25(8), 1815–1821.
- Chandy, M. L., Soman, C., Kumar, S. P., Kurup, S., dan Jose, R. (2016). Understanding molecular mechanisms in multivariant actions of levamisole as an anti-helminthic, anti-inflammatory, antioxidant, anti-neoplastic and immunomodulatory drug. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology*, 28(4), 354–357.
- Cheng, Y., Chen, Y., Li, J., Qu, H., Zhao, Y., Wen, C., dan Zhou, Y. (2020). Dietary β -sitosterol regulates serum lipid level and improves immune function, antioxidant status, and intestinal morphology in broilers. *Poultry Science*, 99(3), 1400–1408.
- Descotes, J. (2014). Immune System. In *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition* (Third Edit, Vol. 2). France: Elsevier.
- Desjardins, M., dan Griffiths, G. (2003). Phagocytosis: Latex leads the way. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(4), 498–503.
- Fraile, L., Crisci, E., Córdoba, L., Navarro, M. A., Osada, J., dan Montoya, M. (2012). Immunomodulatory properties of Beta-sitosterol in pig immune responses. *International Immunopharmacology*, 13(3), 316–321.
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., dan Tannenbaum, S. R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, dan [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, 126(1), 131–138.
- Hidayah, W. W., Kusriani, D., dan Fachriyah, E. (2016). Isolasi, Identifikasi Senyawa Steroid dari Daun Getih-Getihan (*Rivina humilis* L.) dan Uji Aktivitas sebagai Antibakteri. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, 19(1), 32.
- Hirayama, D., Iida, T., dan Nakase, H. (2018). The phagocytic function of macrophage-enforcing innate immunity and tissue homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1).
- Khusnawati, N. N., Pramono, S., dan Sasmito, E. (2015). Pengaruh Ekstrak Etanolik 50% Herba Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) terhadap Peningkatan Proliferasi Sel Limfosit Mencit Jantan Galur Balb/c yang Diinduksi Vaksin Hepatitis B. *Traditional Medicine*, 20(3), 164–169.
- Kim, J.-K., Cho, M. L., Karnjanapratum, S., Shin, I. S., dan You, S. G. (2011). In vitro and in vivo immunomodulatory activity of sulfated polysaccharides from *Enteromorpha prolifera*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49(5), 1051–1058.
- Kumalasari, I. D., Nishi, K., Harmayani, E., Raharjo, S., dan Sugahara, T. (2013). Effect of bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) fiber extract on murine macrophage-like J774.1 cells and mouse peritoneal macrophages. *Journal of Functional Foods*, 5(2), 582–589.
- Kumalasari, I. D., Nishi, K., Harmayani, E., Raharjo, S., dan Sugahara, T. (2014). Immunomodulatory activity of Bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) fiber extract in vitro and in vivo. *Cytotechnology*, 66(1), 75–85.
- Lestari, L. A., Soesatyo, M. H. N. E., Irvati, S., dan Harmayani, E. (2012). Peningkatan

- aktivitas fagositosis dan produksi nitrit oksida pada makrofag peritoneum tikus *Sprague Dawley* yang diberi *Lactobacillus plantarum* Mut7 dan ekstrak serat ubi jalar. *Jurnal Gizi Klinik Indonesia*, 9(2), 64–72.
- Liu, R., Hao, D., Xu, W., Li, J., Li, X., Shen, D., Sheng, K., Zhao, L., Xu, W., Gao, Z., Zhao, X., Liu, Q., dan Zhang, Y. (2019). β -Sitosterol modulates macrophage polarization and attenuates rheumatoid inflammation in mice. *Pharmaceutical Biology*, 57(1), 161–168.
- Lukitaningsih, E. (2009). The exploration of whitening and sun screening compounds in bengkoang roots (*Pachyrhizus erosus*). *Doctoral dissertation*. Universität Würzburg.
- Lukitaningsih, E. (2012). Phytosterol Content in Bengkoang (*Pachyrhizus erosus*). *Pharmacon*, 13(2), 47–54.
- Lukitaningsih, E., dan Holzgrabe, U. (2014). Bioactive Compounds in Bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) as Antioxidant and Tyrosinase Inhibiting Agents. *Indonesian Journal of Pharmacy*, 25(2), 68.
- Male, D., Brostoff, J., Roth, D. B., dan Roitt, I. (2013). *Immunology* (Eighth (ed.); Nomor 1). London: Elsevier.
- Mohamed, E. H., Abdel-Aziz Baiomy, A., Ibrahim, Z. S., dan Soliman, M. M. (2016). Modulatory effects of levamisole and garlic oil on the immune response of Wistar rats: Biochemical, immunohistochemical, molecular and immunological study. *Molecular Medicine Reports*, 14(3), 2755–2763.
- Noman, A. S. M., Hoque, M. A., Haque, M. M., Pervin, F., dan Karim, M. R. (2007). *Food chemistry nutritional and anti-nutritional components in Pachyrhizus erosus L. tuber*. 102, 1112–1118.
- Novrianto, M. A., Wibowo, M. A., dan Ardiningsih, P. (2016). Karakterisasi senyawa fitosterol dari ekstrak daun Soma (*Ploiarium alternifolium* Melch) dengan Metode H-NMR. *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, 6(4), 69–74.
- Nurrochmad, A., Leviana, F., Wulancarsari, C. G., dan Lukitaningsih, E. (2010). Phytoestrogens of *Pachyrhizus erosus* prevent bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *International Journal of Phytomedicine*, 2(4), 363–372.
- Nurrochmad, A., Lukitaningsih, E., Monikawati, A., Septhea, D. B., dan Meiyanto, E. (2013). Combination of low-concentration of novel phytoestrogen (8,9)-furanly-pterocarpan-3-ol from *Pachyrhizus erosus* attenuated tamoxifen-associated growth inhibition on breast cancer T47D cells. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(11), 847–852.
- Park, C. J., dan Han, J. S. (2015). Hypoglycemic effect of jicama (*Pachyrhizus erosus*) extract on streptozotocin-induced diabetic mice. *Preventive Nutrition and Food Science*, 20(2), 88–93.
- Sayeed, B. M., Karim, S., Sharmin, T., dan Morshed, M. (2016). Critical Analysis on Characterization, Systemic Effect, and Therapeutic Potential of Beta-Sitosterol: A Plant-Derived Orphan Phytosterol. *Medicines*, 3(29), 1–25.
- Senas, K. S., dan Linawati, Y. (2012). Pengaruh Pemberian Madu Hutan Terhadap Proliferasi Limfosit pada Hewan Uji Tikus Jantan Galur Wistar. *Jurnal Farmasi Sains dan Komunitas*, 9(2), 85–90.
- Sujono, T. A., Nurrochmad, A., Lukitaningsih, E., dan Nugroho, A. E. (2021). Immunomodulatory Effect of Petroleum Ether Extract and Ethyl Acetate Fraction of Bengkoang (*Pachyrhizus erosus* (L.) Urban) in vitro. *Indonesian Journal of Pharmacy*, 32(4), 454–463.
- Sun, Y., Gao, L., Hou, W., dan Wu, J. (2020). β -Sitosterol Alleviates Inflammatory Response via Inhibiting the Activation of ERK / p38 and NF- κ B Pathways in LPS-exposed BV2 cells. *BioMed Research International*, 2020, 1–10.
- Tafrihani, A. S., Gono, C. M. P., Natasia, N., dan Ikawati, M. (2021). Potensi Biji Duwet (*Syzygium cumini* L. (Skeels.)) Sebagai Imunomodulator Pendamping Kemoterapi: Sebuah Ulasan. *JPSCR: Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*, 6(2),

216–227.

- Trihastuty, A., Aini, S. R., dan Hamdin, C. D. (2019). Efek Ekstrak Petroleum Eter Daun Ara (*Ficus racemosa* Linn.) pada Indeks Fagositosis Mencit (*Mus musculus*). *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 17(2), 169–174.
- Wahdaningsih, S., Wahyuono, S., Riyanto, S., dan Murwanti, R. (2018). Antioxidant activity of red dragon fruit peel (*Hylocereus polyrhizus* (F.A.C. weber) britton and rose) isolates using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 11(1), 124–128.
- Wahdaningsih, S., Wahyuono, S., Riyanto, S., dan Murwanti, R. (2021). B-Sitosterol of Red Dragon Fruit (*Hylocereus polyrhizus*) and Its Response to Macrophage And Nitric Oxide. *Indonesian Journal of Pharmacy*, 32(3), 399–407.
- Widyatmoko, A., Hastutik, D., Sudarmanto, A., dan Lukitaningsih, E. (2016). Vitamin C, Vitamin A and Apha Hydroxy Acid in Bengkoang (*Pachyrhizus erosus*). *Trad. Med. J.*, 21(1), 48–54.
- Winanta, A., Hertiani, T., Purwantiningsih, dan Siswadi. (2019). In vivo immunomodulatory activity of faloak bark extract (*Sterculia quadrifida* R.Br). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 22(12), 590–596.



© 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International (CC BY-SA 4.0) license (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>).