

**PENGARUH EKSTRAK LOMPONG (*Colocasia esculenta L. Shoot*) 30 MENIT PENGUKUSAN TERHADAP AKTIVITAS FAGOSITOSIS DAN KADAR NO (NITRIT OKSIDA) MENCIT BALB/C SEBELUM DAN SESUDAH TERINFEKSI *Listeria monocytogenes***

Artikel Penelitian

disusun sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan studi pada Program Studi Ilmu Gizi, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro



disusun oleh

ARSELA RINDANG SHOLIKHAH

22030111120009

PROGRAM STUDI ILMU GIZI FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS DIPONEGORO  
SEMARANG

2015

## HALAMAN PENGESAHAN

Artikel penelitian dengan judul “Pengaruh Ekstrak Lompong (*Colocasia Esculenta L. Schoot*) 30 Menit Pengukusan Terhadap Aktivitas Fagositosis dan Kadar NO (Nitrit Oksida) Mencit Balb/c Sebelum dan Sesudah Terinfeksi *Listeria Monocytogenes*” telah dipertahankan di hadapan penguji dan telah direvisi.

Mahasiswa yang mengajukan

Nama : Arsela Rindang Sholikhah

NIM : 22030111120009

Fakultas : Kedokteran

Program Studi : Ilmu Gizi

Universitas : Diponegoro Semarang

Judul Proposal : Pengaruh Ekstrak Lompong (*Colocasia Esculenta L. Schoot*) 30 Menit Pengukusan Terhadap Aktivitas Fagositosis dan Kadar NO (Nitrit Oksida) Mencit Balb/c Sebelum dan Sesudah Terinfeksi *Listeria monocytogenes*

Semarang, 18 Agustus 2015

Pembimbing,

dr. Hesti Murwani Rahayuningsih., M.Si, Med

NIP 198008082005012002

**PENGARUH EKSTRAK LOMPONG (*Colocasia esculenta L. Schott*) 30 MENIT PENGUKUSAN TERHADAP AKTIVITAS FAGOSITOSIS DAN KADAR NO (NITRIT OKSIDA) MENCIT BALB/C SEBELUM DAN SESUDAH TERINFEKSI *Listeria monocytogenes***

Arsela Rindang Sholikhah<sup>1</sup>, Hesti Murwani Rahayuningsih<sup>2</sup>

**ABSTRAK**

**Latar belakang:** Ekstrak daun dan batang lompong (*Colocasia esculenta (L.) Schott*) dilaporkan memiliki sifat antimikrobia karena mengandung fitokimia seperti fenol, tanin, saponin, steroid, kuinin, terpenoid, glikosida, dan alkaloid. Pengukusan merupakan metode pemasakan yang mampu mempertahankan fitokimia pada sayuran.

**Tujuan:** Menganalisis pengaruh pemberian ekstrak lompong 30 menit pengukusan dengan dosis 13 mg/20gBB terhadap aktivitas fagositosis dan kadar NO (Nitrit Oksida) makrofag pada mencit Balb/c sebelum dan sesudah terinfeksi *Listeria monocytogenes*

**Metode:** Penelitian *true experimental* dengan *post test with randomized control group design* pada 21 mencit Balb/c jantan usia 8-10 minggu yang dibagi menjadi 3 kelompok secara acak masing-masing 7 ekor. Kelompok K (Kontrol) mencit hanya mendapatkan pakan standar. Kelompok P1 (Perlakuan satu) mencit diberi ekstrak lompong 30 menit pengukusan selama tiga hari sebelum diinfeksi *Listeria monocytogenes*. Kelompok P2 (Perlakuan dua) mencit diberi ekstrak lompong 30 menit pengukusan selama tiga hari setelah diinfeksi *Listeria monocytogenes*.

**Hasil:** Tidak terdapat perbedaan bermakna pada aktivitas fagositosis dan kadar NO antara kelompok P1, P2 dibandingkan dengan kelompok K ( $p > 0,05$ ). Namun rerata aktivitas fagositosis dan kadar NO kelompok P1 lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok K dan P2.

**Kesimpulan:** Pemberian ekstrak lompong dengan 30 menit pengukusan pada mencit selama 3 hari tidak memiliki perbedaan yang signifikan terhadap aktivitas fagositosis dan kadar NO makrofag, baik sebelum infeksi *Listeria monocytogenes* maupun setelah infeksi *Listeria monocytogenes*.

**Kata kunci:** Ekstrak lompong, aktivitas fagositosis, kadar NO

---

<sup>1</sup> Mahasiswa Program Studi S-1 Ilmu Gizi, Universitas Diponegoro

<sup>2</sup> Dosen Program Studi S-1 Ilmu Gizi, Universitas Diponegoro

**THE EFFECT OF 30 MINUTES STEAMED LOMPONG (*Colocasia esculenta L. Schoot*) EXTRACT ON PHAGOCYTOSIS ACTIVITY AND NO (NITRIC OXIDE) LEVEL IN MICE BALB/C BEFORE AND AFTER INFECTED BY *Listeria monocytogenes***

Arsela Rindang Sholikhah<sup>1</sup>, Hesti Murwani Rahayuningsih<sup>2</sup>

**ABSTRACT**

**Background:** Extract of lompong's leaf and stem was reported to have antimicrobial properties because it contained phytochemicals such as phenols, tannins, saponins, steroids, quinine, trepenoid, glycosides and alkaloids. Steaming was a cooking method that able to maintain the phytochemicals in vegetables.

**Objective:** To analyze the effect of lompong extract 30 minutes of steaming with 13 mg/20gBW doses towards phagocytosis activity and NO (nitric oxide) level of macrophages in mice Balb/c before and after infected by *Listeria monocytogenes*

**Method:** True experimental research with post-test with randomized control group design in 21 male Balb/c mice aged 8-10 weeks were divided randomly into 3 groups with 7 mice each group. K Group (control) mice only received standard feed. P1 group (First treatment) mice was given 30 minutes steamed lompong extract for three days before infected by *Listeria monocytogenes*. P2 group (Second treatment) mice was given 30 minutes steamed lompong extract for three days after infected by *Listeria monocytogenes*.

**Result:** The K group compared to group P1, P2 showed no significant differences. However, P1 group has higher average of phagocytosis and NO level than others group.

**Conclusion:** Lompong extract with 30 minutes of steaming do not show any significant difference to the phagocytic activity and NO level of macrophages for both group, before and after infection.

**Keyword:** lompong extract, phagocytosis activity, nitric oxide levels

---

<sup>1</sup>Undergraduate student of Nutrition Science Medical Faculty, Diponegoro University, Semarang

<sup>2</sup>Lecture of Nutrition Science Medical Faculty, Diponegoro University, Semarang

## PENDAHULUAN

Lompong memiliki nama ilmiah *Colocasia esculenta (L.) Schott* atau yang lebih dikenal dengan tanaman lompong merupakan salah satu tanaman jenis umbi-umbian. Lompong mudah ditemui di sekitar lingkungan yang lembab seperti sepanjang sungai dan tepi danau. Tanaman ini dianggap sebagai tanaman yang agresif karena pertumbuhannya yang cepat. Masyarakat biasa memanfaatkan tanaman ini untuk diolah daun dan batangnya menjadi sayur.<sup>1,2</sup>Selain dikonsumsi sebagai sayur, daun lompong juga sering dimanfaatkan sebagai penurun panas oleh masyarakat.<sup>3</sup>

Berdasarkan penelitian pendahulu, lompong dilaporkan memiliki kandungan vitamin C, oksalat yang tinggi, dan fitokimia seperti fenol, tanin, saponin, steroid, kuinin, terpenoid, glikosida, dan alkaloid. Semua bagian lompong, baik daun, batang, dan umbi dilaporkan memiliki sifat antimikrobial, antioksidan, dan antikanker. Sifat antimikrobial ekstrak daun lompong ditunjukkan dengan efektivitasnya melawan bakteri patogen penyebab penyakit seperti tifoid, pneumonia, infeksi saluran kemih, dan diare.<sup>4-6</sup> Sifat antioksidan yang dimiliki lompong mampu meningkatkan efektivitas hepatoprotektif dan antihepatotoksik. Bagian batang menunjukkan aktivitas antioksidan tertinggi dibandingkan pada daun dan umbi.<sup>5,7</sup>

Sayuran biasanya dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia dalam bentuk lalapan ataupun melalui proses pemasakan terlebih dahulu. Pemasakan merupakan salah satu proses pengolahan menggunakan panas. Salah satu proses pengolahan panas yang biasa digunakan untuk mengolah sayuran adalah pengukusan.<sup>8</sup> Beberapa penelitian menunjukkan bahwa pengukusan lebih baik dibandingkan dengan perebusan dan penumisan dalam hal mempertahankan fitokimia dan aktivitas antioksidan pada sayuran.<sup>9-11</sup> Pemanasan ternyata memiliki peran yang penting dalam meningkatkan aktivitas antioksidan senyawa polifenol dan flavonoid. Aktivitas antioksidan akan naik dengan pemanasan pada 100°C selama 20-30 menit.<sup>12</sup>

Senyawa yang berperan sebagai antioksidan pada lompong adalah flavonoid dan alkaloid. Alkaloid berperan dalam peningkatan respon imun. Mekanisme flavonoid

dan alkaloid sebagai imunomodulator dengan meningkatkan aktivitas IL-2 (interleukin 2) dan proliferasi limfosit. Sel Th1 (*T helper 1*) yang teraktivasi akan mempengaruhi SMAF (*Specific Macrophag Arming Factor*), yaitu molekul-molekul termasuk IFN $\gamma$  (interferon gamma) yang dapat mengaktifkan makrofag. Jika terdapat antigen yang masuk ke tubuh, misalnya bakteri, maka limfosit T dan makrofag saling bekerja sama untuk membunuh bakteri tersebut. Makrofag akan memfagosit bakteri dan limfosit T berdiferensiasi menjadi CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup>. Sel CD4<sup>+</sup> berdiferensiasi menjadi Th1 yang kemudian menghasilkan sitokin IFN $\gamma$  dan TNF $\alpha$  serta memacu sel *Natural Killer*. Sel CD8<sup>+</sup> pun menghasilkan sitokin IFN $\gamma$ . Sitokin tersebut akan mengaktifkan makrofag untuk menghasilkan senyawa salah satunya nitrit oksida yang berguna membunuh bakteri.<sup>13,14</sup> Infeksi dalam tubuh manusia bisa disebabkan karena bakteri, virus maupun jamur. *Listeria monocytogenes* adalah bakteri yang biasa digunakan untuk memperelajari penyakit infeksi.<sup>15</sup> Bakteri ini mampu menginduksi respon imun seluler yang dilakukan oleh makrofag dengan proses *T-cell mediated immunity*.<sup>16</sup>

Tumbuhan talas diduga berpotensi sebagai imunomodulator karena kandungan kimia yang ada didalamnya, sehingga untuk memperoleh kandungan kimia tersebut maka diperlukan penyarian zat-zat aktif dari bagian tumbuhan talas tersebut yaitu ekstraksi. Penyarian zat-zat aktif tumbuhan dengan metode ekstraksi dapat dilakukan dengan beberapa cara, yaitu maserasi, perlokasi, refluks, sokletasi, digesti, infus, dan dekok. Banyaknya jumlah senyawa aktif yang diperoleh dapat dipengaruhi oleh pemilihan metode ekstraksi. Metode ekstraksi sokletasi adalah metode yang tepat karena menghasilkan jumlah senyawa aktif yang banyak. Hal ini dikarenakan dalam prosesnya digunakan panas yang sesuai dengan titik didih pelarut untuk mempercepat kelarutan senyawa aktif dalam suatu bahan tersebut.<sup>17,18</sup>

Berdasarkan uraian di atas peneliti tertarik pada tanaman ini terkait manfaatnya terhadap kesehatan, khususnya pengaruh terhadap respon imun. Respon imun tubuh dapat dilihat dari aktivitas fagositosis dan kadar NO (Nitrit Oksida) makrofag sebelum atau setelah infeksi. Peneliti ingin menganalisis bahwa ekstrak sayur lompong yang sebelumnya diolah dengan 30 menit pengukusan mampu meningkatkan aktivitas

fagositosis makrofag dan kadar NO makrofag. Perlakuan berupa pemberian ekstrak lompong 30 menit pengukusan dibagi menjadi dua kelompok perlakuan, yaitu kelompok perlakuan pertama pemberian ekstrak diberikan sebelum mencit diinduksi *Listeria monocytogenes* dan kelompok perlakuan kedua pemberian ekstrak diberikan setelah mencit diinduksi *Listeria monocytogenes*. Pemberian ekstrak lompong sebelum diinduksi bakteri dimaksudkan sebagai tindakan preventif sedangkan pemberian ekstrak lompong setelah diinduksi bakteri dimaksudkan sebagai tindakan kuratif.

## **METODE PENELITIAN**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Ruang lingkup keilmuan penelitian ini yaitu teknologi pangan, imunologi gizi, dan gizi biomedik. Jenis penelitian ini merupakan penelitian *true experimental* dengan *post test with randomized control group design*. Sampel dari penelitian ini adalah mencit Balb/c jantan yang diberikan perlakuan berupa pemberian ekstrak lompong (*Colocasia esculenta l. schoot*) 30 menit pengukusansebelum dan sesudah diinduksi *Listeria monocytogenes*.

Sampel diambil dari mencit yang secara genetic sifatnya sama, maka pengambilan sampel dilakukan secara random. Pengelompokan sampel dilakukan secara acak dan dilakukan penimbangan mencit sebelum dan sesudah perlakuan. Hal ini dilakukan untuk menghindari bias karena faktor umur dan berat badan dimana kriteria sampel yang diambil yaitu mencit jantan galur balb/c yang dalam keadaan sehat, memiliki berat badan 20-30 gram dan umur 8-10 minggu. Mencit diadaptasikan terlebih dahulu selama 1 minggu sebelum diberi perlakuan. Mencit diberi makan dan minum secara *ad libithum* selama dalam pemeliharaan. Mencit yang telah mengalami adaptasi, kemudian dibagi menjadi 3 kelompok secara acak yang masing-masing 7 ekor yaitu kelompok K (Kontrol), P1 (Perlakuan satu) dan P2 (Perlakuan dua).

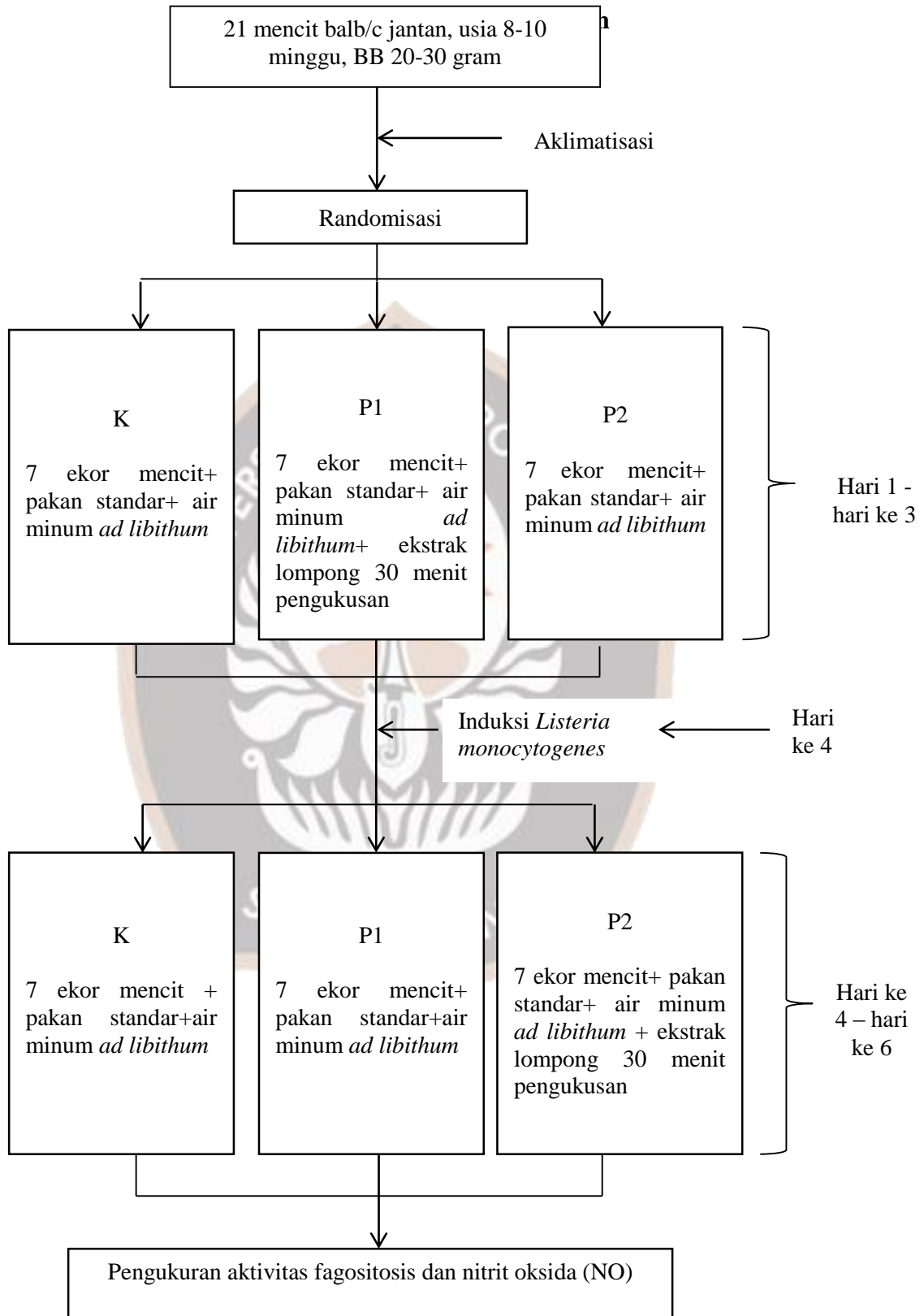
Kelompok pertama yaitu kelompok K sebagai pembanding, dimana mencit hanya mendapatkan pakan standar. Kelompok P1 adalah kelompok perlakuan dimana mencit diberi ekstrak lompong 30 menit pengukusan dengan dosis 13 mg/20gBB sebelum

diinduksi *Listeria monocytogenes*. Kelompok P2 adalah mencit diberi ekstrak lompong 30 menit pengukusan dengan dosis 13 mg/20gBB setelah diinduksi *Listeria monocytogenes*.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak lompong (*Colocasia esculenta L. Schoot*) 30 menit pengukusan dengan dosis 13 mg/20gBB dan induksi bakteri *Listeria monocytogenes* dengan dosis  $1 \times 10^5$  CFU. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas fagositosis dan kadar NO (Nitrit Oksida). Galur mencit hewan coba, jenis kelamin, umur mencit, pakan mencit, kandang, sistem perkandangan dan waktu penginduksian bakteri *Listeria monocytogenes* menjadi variabel terkontrol pada penelitian ini.

Data yang dikumpulkan yaitu aktivitas fagositosis dan kadar NO. Kemampuan fagositosis makrofag dinilai menggunakan partikel *latex bead* yang dinyatakan dalam indeks fagositosis, sedangkan kadar NO makrofag diukur menggunakan reagen Griess dan diukur absorbansinya pada 550 nm menggunakan *automated microplate reader* (*ELISA reader*). Data yang telah didapatkan kemudian diolah dengan komputer. Analisis data digunakan untuk menganalisis perbedaan aktivitas fagositosis dan kadar NO pada kelompok K dengan kelompok P1 dan P2. Analisis data diawali dengan uji kenormalan data dengan uji *Shapiro-Wilk*. Uji beda aktivitas fagositosis dan kadar NO antara kelompok perlakuan menggunakan *independent t-test* pada data berdistribusi normal dan uji *Mann Whitney* pada data berdistribusi tidak normal.





## HASIL DAN PEMBAHASAN

Keseluruhan sampel memenuhi syarat penelitian. Total sampel berjumlah 21 ekor mencit Balb/c jantan berusia 8-10 minggu dengan berat badan 20-30 gram yang diperoleh dari laboratorium Biologi Fakultas MIPA Unnes. Populasi sampel kemudian dibagi secara *random sampling* menjadi 3 kelompok yaitu P1, P2 dan K yang masing-masing berjumlah 7 ekor.

Kemampuan fagositosis sel makrofag peritoneum mencit diukur dan dinyatakan dengan indeks fagositosis. Kadar NO diukur absorbansinya menggunakan *automated microplate reader (ELISA reader)* dan dinyatakan dengan  $\mu\text{M}$ . Berdasarkan uji normalitas data, data kemampuan fagositosis makrofag berdistribusi normal sedangkan data kadar NO makrofag berdistribusi tidak normal. Sehingga data kadar NO diupayakan memiliki distribusi normal dengan cara ditransformasi. Namun setelah dilakukan upaya transformasi data masih berdistribusi tidak normal.

Berdasarkan hasil uji beda, data aktivitas fagositosis tidak menunjukkan perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hasil uji beda data kadar NO juga tidak menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Walaupun data aktivitas fagositosis dan kadar NO tidak bermakna secara statistik, namun nilai rerata menunjukkan adanya perbedaan yang dapat dilihat pada tabel 1.

**Tabel 1. Nilai rerata indeks fagositosis makrofag dan Kadar NO**

Kelompok	n	Rerata $\pm$ sb	
		Aktivitas fagositosis	Kadar NO
P1	7	3,07 $\pm$ 0,72	106,8 $\pm$ 74,4
P2	7	2,5 $\pm$ 0,29	94,7 $\pm$ 43,1
K	7	2,43 $\pm$ 0,23	106,29 $\pm$ 54,3

Indeks fagositosis makrofag pada kelompok sebelum diinfeksi memiliki rerata lebih tinggi dibandingkan kelompok setelah diinfeksi dan kelompok K. Kelompok K memiliki rerata jumlah frekuensi *latex beads* terfagosit lebih rendah diantara kelompok lainnya.

Pemberian ekstrak lompong 30 menit pengukusan belum efektif dalam meningkatkan aktivitas fagositosis. Hal ini bisa disebabkan oleh beberapa faktor. Faktor pertama yang bisa mempengaruhi yaitu dosis. Dosis yang diberikan belum efektif dalam meningkatkan kemampuan fagositosis. Hal tersebut ditunjukkan dengan adanya perbedaan rerata indeks fagositosis antara kelompok sebelum diinfeksi dan kelompok kontrol. Semakin banyak jumlah partikel lateks intrasel menunjukkan semakin tinggi kemampuan fagositosis makrofag. Indeks fagositosis kelompok sebelum diinfeksi lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok sebelum diinfeksi memiliki kemampuan fagositosis makrofag lebih baik.

Kadar NO makrofag pada kelompok sebelum diinfeksi memiliki rerata lebih tinggi dibanding kelompok kontrol. Kelompok setelah diinfeksi memiliki rerata kadar NO lebih rendah diantara kelompok lainnya. Hal ini bisa disebabkan oleh kandungan flavonoid pada ekstrak lompong 30 menit pengukusan. Senyawa flavonoid selain mempunyai efek imunostimulan juga memiliki efek immunosupresan. Salah satu senyawa flavonoid yang bersifat immunosupresan yaitu genistein. Genistein bersifat immunosupresan dengan cara menghambat pembentukan NO dan induksi iNOS pada makrofag mencit.<sup>19</sup> Selain itu dosis pemberian ekstrak lompong 30 menit pengukusan juga belum efektif dalam meningkatkan produksi NO.

Kelompok perlakuan sebelum diinfeksi memiliki nilai rerata indeks fagositosis dan kadar NO yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok setelah diinfeksi. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak lompong 30 menit pengukusan sebagai tindakan preventif lebih baik dibandingkan dengan pemberian ekstrak lompong 30 menit pengukusan sebagai tindakan kuratif.

Berdasarkan uji kuantitatif, ekstrak lompong 30 menit pengukusan mengandung fenol 0,219%, tanin 0,292% dan flavonoid 0,106%. Kandungan flavonoid pada lompong tersebut dipengaruhi oleh jenis lompong dan pembudidayaannya. Lompong yang ditanam di lahan yang kering terbukti mengandung fenol yang tinggi.<sup>20</sup> Hal ini yang memungkinkan pemberian ekstrak lompong 30 menit pengukusan belum efektif

dalam meningkatkan kemampuan fagositosis dan kadar NO makrofag karena jenis lompong yang digunakan adalah jenis lompong yang mengandung sedikit fenol.

**Tabel 2. Hasil Uji Kuantitatif Ekstrak Lompong**

Ekstrak	Hasil Analisa		
	Fenol (%)	Tanin (%)	Flavonoid (%)
Mentah <sup>21</sup>	0,198	0,261	0,088
Pengukusan 30 menit	0,219	0,293	0,105
Pengukusan 45 menit <sup>22</sup>	0,222	0,310	0,140

Selain itu proses pengukusan juga berpengaruh terhadap kadar fitokimia pada ekstrak sayur lompong. Sayur lompong yang dikukus selama 30 menit secara kuantitatif memiliki kadar fenol, tanin, dan flavonoid lebih tinggi dibandingkan dengan sayur lompong yang mentah. Namun sayur lompong yang dikukus selama 30 menit mengandung fenol, tanin, dan flavonoid sedikit lebih rendah dibandingkan dengan sayur lompong yang dikukus selama 45 menit. Hal ini menunjukkan bahwa proses pemasakan dengan cara dikukus mampu meningkatkan kadar fitokimia didalamnya.

Kandungan fitokimia ekstrak lompong yang dikukus lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak lompong mentah bisa disebabkan oleh serat-serat yang terdapat pada sayur lompong menjadi lebih lunak saat proses pengukusan. Hal ini diduga menyebabkan serat-serat yang lebih lunak memudahkan komponen bioaktif yang terdapat pada ekstrak lompong lebih mudah larut pada pelarutnya.

Kandungan ekstrak lompong dengan 45 menit pengukusan yang lebih tinggi juga berpengaruh terhadap aktivitas fagositosis dan kadar NO pada kelompok sebelum diinfeksi. Hal ini menunjukkan bahwa lamanya pengukusan akan mempengaruhi kandungan fitokimia pada ekstrak lompong serta mempengaruhi peningkatan aktivitas fagositosis dan kadar NO makrofag.<sup>22</sup>

## **SIMPULAN**

Pemberian ekstrak lompong dengan 30 menit pengukusan pada mencit selama 3 hari tidak memiliki perbedaan yang signifikan terhadap aktivitas fagositosis dan kadar NO makrofag secara statistik, baik sebelum infeksi *Listeria monocytogenes* maupun setelah infeksi *Listeria monocytogenes*. Hal ini mungkin dikarenakan pemberian ekstrak lompong yang kurang lama yaitu hanya 3 hari dan dosis ekstrak yang kurang optimal.

## **SARAN**

Durasi pemberian ekstrak lompong perlu diperpanjang, untuk dapat memberikan pengaruh yang signifikan terhadap respon imun. Pengujian dosis bertingkat untuk penelitian selanjutnya diperlukan agar mendapatkan dosis yang lebih efektif.

## **UCAPAN TERIMA KASIH**

Terima kasih peneliti sampaikan kepada pembimbing dan penguji atas bimbingan, saran dan masukan yang membangun untuk karya tulis ini. Terima kasih kepada orang tua dan keluarga yang selalu mendokan, dan semua pihak yang telah memotivasi dan mendukung sehingga penelitian ini dapat diselesaikan.

## **DAFTAR PUSTAKA**

1. Gomez-Beloz A, Rivero T. An Edible Aroid of the Warao. *Ethnobot. Res.* 2006;4:103–11.
2. Matthews PJ, Agoo EMG, Madulid DA, Tandang D. *Ethnobotany and Ecology of Wild Taro ( Colocasia esculenta ) in the Philippines : Implications for Domestication and Dispersal.* *Senri Ethnol.* 2012;78:307–40.

3. Husin PH, Pontianak K, Usman FH, Yusro F, Tavita GE, Sisillia L, et al. Identifikasi Jenis - Jenis Tumbuhan Berkhasiat Obat di Jalan Parit H. Husin 2 Kecamatan Pontianak Tenggara. 2007;1–12.
4. Mcewan R. Anti-Nutritional Constituent Of Colocasia Esculenta ( Amadumbe ) A Traditional Crop Food In Kwazulu-Natal [Ph.D Thesis]. University of Zululand; 2008.
5. Wei LS, Wee W, Siong JYF, Syamsumir DF. Antimicrobial, antioxidant, anticancer property and chemical composition of different parts (corm, stem and leave) of Colocasia esculenta extract. Sect. DDD. 2011;24(3):1–8.
6. Dhanraj N, Kadam MS, Patil KN, Mane VS. Phytochemical screening and Antibacterial Activity of Western Region wild leaf Colocasia esculenta. Int. Res. J. Biol. Sci. 2013;2(10):18–21.
7. Patil BR, Ageely HM. Antihepatotoxic Activity Of Colocasia esculenta Leaf Juice. Int. J. Adv. Bioteknol. Res. 2011;2(2):296–304.
8. Aisyah Y, Rasdiansyah, Muhaimin. Pengaruh Pemanasan Terhadap Aktivitas Antioksidan pada Beberapa Jenis Sayuran. Teknol. dan Ind. Pertan. Indones. 2014;6(2):2–7.
9. Lemos MA, Aliyu MMM, Kynoch G, Joseph LR, Hungerford G. Effect of cooking on the levels of bioactive compounds in Purple Majesty Potato. Insid. Food Symp. Belgium: InsideFood Symposium; 2013. p. 1–6.
10. Porter Y. Antioxidant properties of green broccoli and purple-sprouting broccoli under different cooking conditions. Biosci. Horizons. 2012;5:1–11.
11. Saikia S, Mahanta CL. Effect of Steaming, Boiling and Microwave Cooking on The Total Phenolics, Flavonoids and Antioxidant Properties of Different Vegetable of Assam, India. Int. J. Food Nutr. Sci. 2013;2(3).
12. Santoso U, Setyaningsih E, Cahyanto MN. Pengaruh Pemanasan pada Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Beberapa Varietas Ubi Jalar. Angitech. 2006;26(4):163–8.

13. Ukhrowi U. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Umbi Bidara Upas (*Merremia mammosa*) terhadap Fagositosis Makrofag dan Produksi Nitrit Oksida (NO) Makrofag [Thesis]. Universitas Diponegoro; 2011.
14. Abbas, Lichtmann, Pillai. *Cellular and Molecular Immunology*. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2007. p. 358–60.
15. Munasir Z. Respons Imun Terhadap Infeksi Bakteri. *Sari Pediatr*. 2001;2(4):193–7.
16. Sulisty B. Kemampuan Fagositosis Makrofag Mencit Balb / C Yang Diberi Diet Omega-3 Dan Diinfeksi *Listeria Monocytogenes* [Skripsi]. Universitas Diponegoro; 2008.
17. Istiqomah. Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi Dan Sokletasi Terhadap Kadar Piperin Buah Cabe Jawa (*Piperis retrofracti fructus*) [Skripsi]. [Jakarta]: UIN Syarif Hidayatullah; 2013.
18. Sinambela AN. Uji Fitokimia Ekstrak Daun Ranti (*Solanum nigrum L.*) yang Berpotensi sebagai Immunostimulan [Skripsi]. [Medan]: Universitas Negeri Medan; 2012.
19. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells : Implications for Inflammation , Heart Disease ,and Cancer. *Pharmacol. Rev.* 2000;52(4):673–751.
20. Gonçalves RF, Silva AMS, Silva AM, Valentão P, Ferreres F, Gil-Izquierdo A, et al. Influence of taro (*Colocasia esculenta L. Shott*) growth conditions on the phenolic composition and biological properties. *Food Chem.* [Internet]. 2013 Dec 15 [cited 2015 Jul 6];141(4):3480–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23993510>
21. Sulistiani RP. Pengaruh Ekstrak Lompong Mentah (*Colocasia Esculenta L. Schoot*) Terhadap Aktivitas Fagositosis dan Kadar NO (NitritOksida) Mencit Balb/c Sebelum dan Sesudah Terinfeksi *Listeria monocytogenes* [Draft]. [Semarang]: Universitas Diponegoro; 2015

22. Mubayinah. Pengaruh Ekstrak Lompong (*Colocasia esculenta* L. Schoot) 30 menit Pengukusan Terhadap Aktivitas Fagositosis dan Kadar NO (NitritOksida) Mencit Balb/c Sebelum dan Sesudah Terinfeksi *Listeria monocytogenes* [Draft]. [Semarang]: Universitas Diponegoro; 2015





## LAMPIRAN

### Uji Normalitas Data Aktivitas Fagositosis dan Kadar NO

#### Tests of Normality

	sampel	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Fagositosis	P1	,218	7	,200 <sup>*</sup>	,922	7	,483
	P2	,226	7	,200 <sup>*</sup>	,885	7	,250
	K	,176	7	,200 <sup>*</sup>	,957	7	,794
kadar_NO	P1	,298	7	,060	,773	7	,022
	P2	,230	7	,200 <sup>*</sup>	,926	7	,515
	K	,205	7	,200 <sup>*</sup>	,895	7	,301

\*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

## AKTIVITAS FAGOSITOSIS

Nilai *p* Aktivitas fagositosis Kelompok P1 terhadap Kelompok Kontrol

#### Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Fagositosis P1vs K	Equal variances assumed	8,228	,014	2,233	12	,045	,64000	,28664	,01547	1,26453
	<b>Equal variances not assumed</b>			2,233	7,283	<b>,059</b>	,64000	,28664	-,03248	1,31248

Nilai *p* Aktivitas fagositosis Kelompok P2 terhadap Kelompok Kontrol

**Independent Samples Test**

	Levene's Test for Equality of Variances	t-test for Equality of Means								
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Fagositosis P2 vs K	Equal variances assumed	,359	,560	,486	12	,636	,07000	,14407	-,24390	,38390
	<b>Equal variances not assumed</b>			,486	11,411	<b>,636</b>	,07000	,14407	-,24571	,38571

Nilai *p* Aktivitas fagositosis Kelompok P1 terhadap Kelompok P2

**Independent Samples Test**

	Levene's Test for Equality of Variances	t-test for Equality of Means								
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
fagositosis P1 vs P2	Equal variances assumed	5,952	,031	1,934	12	,077	,57000	,29475	-,07220	1,21220
	<b>Equal variances not assumed</b>			1,934	8,002	<b>,089</b>	,57000	,29475	-,10965	1,24965

## KADAR NO

Nilai  $p$  Kadar NO Kelompok P1 terhadap Kelompok Kontrol

Ranks					Test Statistics <sup>a</sup>	
	sampel	N	Mean Rank	Sum of Ranks		kadar_NO
	P1	7	6,71	47,00	Mann-Whitney U	19,000
kadar_NO	K	7	8,29	58,00	Wilcoxon W	47,000
	Total	14			Z	-,703
					<b>Asymp. Sig. (2-tailed)</b>	<b>,482</b>
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,535 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: sampel

b. Not corrected for ties.

Nilai  $p$  Kadar NO Kelompok P2 terhadap Kelompok Kontrol

Ranks					Test Statistics <sup>a</sup>	
	sampel	N	Mean Rank	Sum of Ranks		kadar_NO
	P2	7	7,29	51,00	Mann-Whitney U	23,000
kadar_NO	K	7	7,71	54,00	Wilcoxon W	51,000
	Total	14			Z	-,192
					<b>Asymp. Sig. (2-tailed)</b>	<b>,848</b>
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,902 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: sampel

b. Not corrected for ties.

Nilai  $p$  Kadar NO Kelompok P1 terhadap Kelompok P2

Ranks					Test Statistics <sup>a</sup>	
	sampel	N	Mean Rank	Sum of Ranks		kadar_NO
	P1	7	7,29	51,00	Mann-Whitney U	23,000
kadar_NO	P2	7	7,71	54,00	Wilcoxon W	51,000
	Total	14			Z	-,192
					<b>Asymp. Sig. (2-tailed)</b>	<b>,848</b>
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,902 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: sampel

b. Not corrected for ties.

### Berat badan mencit

Kelompok	Berat Badan (g)
P1.1	27,7
P1.2	27,5
P1.3	26,3
P1.4	27,5
P1.5	27,6
P1.6	24,9
P1.7	25,4
P2.1	24,6
P2.2	26
P2.3	27,2
P2.4	24,1
P2.5	26
P2.6	26,4
P2.7	25,8
K.1	26
K.2	27,4
K.3	24,1
K.4	25,4
K.5	27,4
K.6	26,9
K.7	29,3

### **Prosedur Isolasi Makrofag Peritoneal Mencit**

Untuk mendapatkan  $1-3 \times 10^6$  sel/ml dibutuhkan alat dan bahan sebagai berikut : gunting, pinset, semprit 10 ml steril dengan jarum ukuran 18 atau 20 gauge, tabung sentrifus 50 ml steril, pipet pasteur steril, tabung berlapis silikon, hemacytometer, laminar *flow hood* dan *refrigerated centrifuge*. Bahan atau reagen yang dibutuhkan yaitu sodium pentobarbitol, 50 mg/ml ; ethanol, 70% (v/v); *free Hank's balanced salt solution* (CMF-HBSS), mengandung  $Ca^{2+}$  dan  $Mg^{2+}$ (GIBCO); Asam acetat 3 % (v/v) + crystal violet 1 mg/100 ml; *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI)-1640 (GIBCO); *Fetal Bovine Serum*, FBS ; Glutamin (GIBCO); *Penicillin-Sterptomycin* (GIBCO).

### **Prosedur Isolasi Makrofag Peritoneal Mencit**

Untuk mendapatkan  $1-3 \times 10^6$  sel/ml

Alat :

1. Gunting dan pinset
2. Semprit 10 ml steril dengan jarum ukuran 18 atau 20 gauge
3. Tabung sentrifus 50 ml steril
4. Pipet Pasteur steril
5. Tabung berlapis silikon
6. Hemacytometer
7. Laminar *flow hood*
8. *Refrigerated centrifuge*

Bahan/reagen :

1. Sodium pentobarbitol, 50 mg/ml
2. Ethanol, 70% (v/v)
3. *Free Hank's balanced salt solution* (CMF-HBSS), mengandung  $Ca^{2+}$  dan  $Mg^{2+}$ (GIBCO)
4. Asam acetat 3 % (v/v) + *crystal violet* 1 mg/100 ml
5. *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI)-1640 (GIBCO)
6. *Fetal Bovine Serum*, FBS

7. Glutamin (GIBCO)

8. Penicillin-Sterptomycin (GIBCO)

Prosedur :

1. Mencit dibunuh dengan dislokasi cervix atau inhalasi dengan sodium
2. Pentobarbitol atau CO<sub>2</sub>, dibaringkan telentang dan seluruh permukaan ventral disiram ethanol 70%
3. Buat irisan kecil pada kulit menggunakan gunting pada medial abdomen. Robek kulit menggunakan 2 pinset ke arah kepala dan ekor mencit, sehingga kulit terkelupas, dan tampak peritoneum. Basahi peritoneum dengan ethanol 70% untuk menyingkirkan bulu-bulu yang rontok.
4. Injeksikan 2-3 ml CMF-HBSS dalam rongga peritoneum menggunakan semprit 10ml dengan jarum No 18 atau 20 (lebih baik pakai No 26)
5. Injeksi dilakukan di bagian perut bawah dimana lemak berada di sekitar kandung kemih. Lokasi ini dipilih karena setelah penyuntikan jarum akan ditarik dan abdomen/peritoneum dipijat, lemak akan melekat pada lubang jarum sehingga cairan tdk keluar selama pemijatan. , peritoneum dipijat pelan kemudian disemprot lagi dengan ethanol 70%.
6. Injeksikan 7-8 ml HBSS. Sedot kembali cairan dalam rongga peritoneum sampai habis dengan (dengan jarum 18 / 20 ujung jarum menghadap ke atas/ventral), bila masih ada sisa cairan dihisap menggunakan pipet Pasteur steril. Masukkan cairan ke dalam tabung sentrifuse steril.
7. Cairan disentrifus 800 xg pada suhu 20° C selama 5 menit. Bila cairan terkontaminasi darah, maka cuci sel-sel tersebut 2 x menggunakan CMF-HBSS.
8. Tambahkan medium komplet yang terdiri dari RPMI 1640 mengandung penicilin ((50 U/ml), streptomycin (50 □g/ml), glutamine (20 mM) dan 10% FBS
9. Hitung sel-sel dengan Hemacytometer setelah dilarutkan dalam 3% asam acetat untuk melisiskan sel darah merah.

10. Kultur sel dalam medium komplit dengan kepadatan  $5 \times 10^5$  sel/ml selama 2 jam dalam CO<sub>2</sub> inkubator pada suhu 37°C
11. Cuci sel-sel tersebut dengan HBSS sebanyak 3 kali, kemudian tambahkan 1 ml medium komplit untuk selanjutnya dikultur dalam CO<sub>2</sub> inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.

### **Prosedur Pengukuran Produksi NO Makrofag**

Bahan :

- a. Reagen 1 : N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride = NED (Sigma): 0,1g dilarutkan dalam 100 ml *distilled water*
- b. Reagen 2 : Sulfanilamide (Sigma): 1 g dilarutkan dalam 100 ml 5% phosphoric acid. Nitrit standard : Larutkan 69 mg NaNO<sub>2</sub> dalam 500 ml *distilled water* (2 mM stock), kemudian buat pengenceran bertingkat dari 0 – 200 μM dengan cara melarutkan larutan stok menggunakan medium yg dipakai untuk kultur makrofag.
- c. Supernatan Kultur Makrofag peritoneal

Cara Kerja :

Menggunakan *microplate* 96 wells dengan dasar rata, memasukkan 100 μl reagen Griess (*reagen chromogenic*) dalam tiap sumuran.

1. Memasukkan 100 μl supernatan kultur makrofag peritoneal yang akan dites dan nitrit standard ke dalam sumuran (*duplo*), menggunakan medium kontrol sebagai blanko.
2. Menunggu 5 menit pada suhu kamar untuk perubahan warna dan stabilisasi.
3. Mengukur absorbansinya pada 550 nm menggunakan *automated microplate reader* (ELISA reader).
4. Membuat kurva standard menggunakan analisis regresi linier sederhana dari pembacaan nitrit standard, kemudian menghitung konsentrasi nitrit dalam sampel berdasarkan kurva standard atau formula regresi.

Cara membuat reagen *chromogenic* dan standard nitrit, sebagai berikut :

- a. Reagen1: *N*-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride = NED (Sigma): 0,1 gram dilarutkan dalam 100 ml air suling.
- b. Reagen 2: Sulfanilamide (Sigma): 1 gram dilarutkan dalam 100 ml HCl 4 N.
- c. Reagen 1 dan reagen 2 harus disimpan dalam almari pendingin dalam botol gelap dan dapat digunakan dalam 6 minggu atau selama tidak berubah warna menjadi lebih gelap.
- d. Reagen *Chromogenic* (Reagen Griess) : mencampur dengan volume sama banyak antara reagen 1 dan reagen 2 setiap akan digunakan. Reagen ini siap digunakan dalam 1 jam setelah pencampuran.
- a. Standard Nitrit : Melarutkan 69 mg NaNO<sub>2</sub> dalam 500 ml air suling ( 2μM stok),kemudian dibuat pengenceran bertingkat dari 0 – 200 μM dengan cara melarutkan larutan stok menggunakan medium yang dipakai untuk kultur makrofag.

