

**Pengaruh Ekstrak Lompong Mentah (*Colocasia esculenta L
Shoot*) 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

Ria Purnawian Sulistiani

22030111130058

PROGRAM STUDI ILMU GIZI FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS DIPONEGORO

SEMARANG

2015

HALAMAN PENGESAHAN

Artikel penelitian dengan judul “Pengaruh Ekstrak Lompong Mentah (*Colocasia esculenta* L Schoot) terhadap Aktivitas Fagositosis dan Kadar NO (Nitrit Oksida) Mencit Balb/c Sebelum dan Sesudah Terinfeksi *Listeria monocytogenes*” telah dipertahankan di hadapan reviewer dan telah direvisi.

Mahasiswa yang mengajukan

Nama : Ria Purnawian Sulistiani
NIM : 22030111130058
Fakultas : Kedokteran
Program Studi : Ilmu Gizi
Universitas : Diponegoro Semarang
Judul Proposal : Pengaruh Ekstrak Lompong Mentah (*Colocasia esculenta* L Schoot) 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

The Effect of Raw Lompong (*Colocasia esculenta L. Schoot*) Extract on Phagocytic Activity and NO Level (Nitric Oxide) Mice Balb / C Before and After Infected *Listeria monocytogenes*
Ria Purnawian Sulistiani¹. Hesti Murwani Rahayuningsih²

ABSTRACT

Background: The leaves and stems of lompong (*Colocasia esculenta L. Schoot*) have been proven to have health benefits. Raw lompong extract provides protection and recovery from infection. Flavonoid contained in raw lompong extract potentially acts as immunomodulatory in preventive and curative actions.

Objective: To analyze the effect of raw lompong extract on phagocytic activity and NO (nitric oxide) level before and after infected *Listeria monocytogenes*.

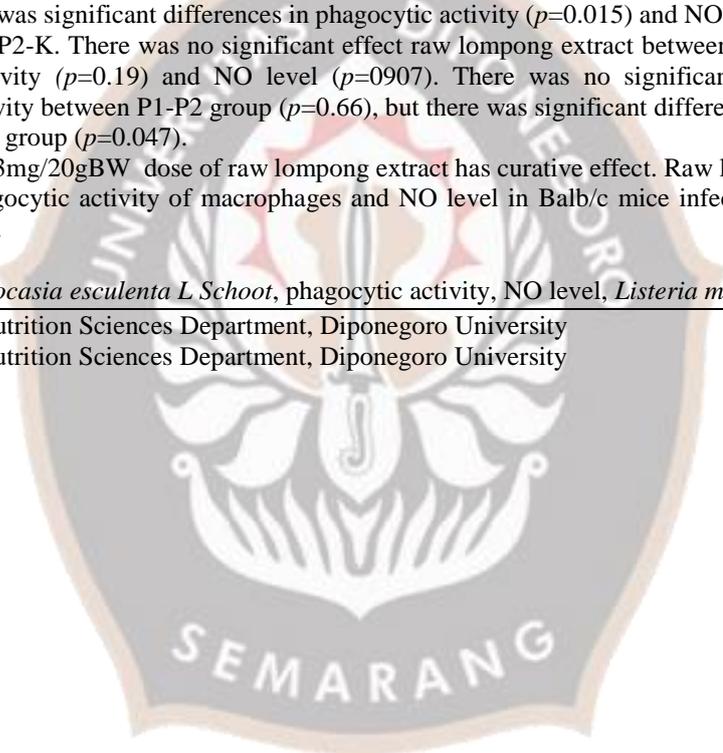
Methods: This study was *true experimental* with *post-test only group design*. The subjects of this study were 21 male Balb/c mice. Based on *simple random sampling*, they were divided into three groups: a control group (induced *Listeria*); P1 (treatment 1); P2 (treatment 2). *Listeria* was induced on the fourth day. The data were analyzed with the *Independent t test*.

Results: There was significant differences in phagocytic activity ($p=0.015$) and NO level ($p=0.041$) between group P2-K. There was no significant effect raw lompong extract between group P1-K in phagocytic activity ($p=0.19$) and NO level ($p=0.907$). There was no significant difference in phagocytic activity between P1-P2 group ($p=0.66$), but there was significant difference in NO level between P1- P2 group ($p=0.047$).

Conclusion: 13mg/20gBW dose of raw lompong extract has curative effect. Raw lompong extract affects the phagocytic activity of macrophages and NO level in Balb/c mice infected by *Listeria monocytogenes*.

Keywords : *Colocasia esculenta L. Schoot*, phagocytic activity, NO level, *Listeria monocytogenes*.

1. Student of Nutrition Sciences Department, Diponegoro University
2. Lecture of Nutrition Sciences Department, Diponegoro University



Pengaruh Ekstrak Lompong Mentah (*Colocasia esculenta L. Schoot*) terhadap Aktivitas Fagositosis dan Kadar NO (Nitrit Oksida) Mencit Balb/C Sebelum dan Sesudah Terinfeksi *Listeria monocytogenes*

Ria Purnawian Sulistiani*. Hesti Murwani Rahayuningsih**

ABSTRAK

Latar belakang : Daun dan batang lompong (*Colocasia esculenta L.Schoot*) terbukti memiliki manfaat terhadap kesehatan. Ekstrak lompong mentah dapat memberikan perlindungan dan pemulihan dari infeksi. Flavonoid yang terdapat pada ekstrak lompong mentah berpotensi sebagai immunomodulator baik pada tindakan preventif maupun kuratif.

Tujuan : Menganalisis pengaruh ekstrak lompong mentah terhadap aktivitas fagositosis dan kadar NO (Nitrit Oksida) sebelum dan sesudah terinfeksi *Listeria monocytogenes*.

Metode : Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental* dengan *post test only group design*. Subyek penelitian ini adalah 21 ekor mencit Balb/c jantan. Secara *simple random sampling* dibagi menjadi tiga kelompok: kelompok kontrol (diinduksi *Listeria monocytogenes*); P1 (Perlakuan sebelum terinfeksi); P2 (Perlakuan sesudah terinfeksi). *Listeria* diinduksipada hari keempat. Data dianalisis dengan *Independent t test*.

Hasil : Terdapat perbedaan yang bermakna aktivitas fagositosis ($p=0.015$) dan kadar NO ($p=0.041$) antara kelompok P2-K. Tidak terdapat pengaruh ekstrak lompong mentah yang bermakna pada kelompok P1-K terhadap aktivitas fagositosis ($p=0.19$) dan kadar NO ($p=0.907$). Tidak terdapat perbedaan bermakna pada aktivitas fagositosis antara kelompok P1-P2 ($p=0.66$) namun terdapat perbedaan yang bermakna antara kadar NO pada kelompok P1-P2 ($p=0.047$).

Simpulan : Ekstrak lompong mentah dengan dosis 13mg/20gBB memiliki efek kuratif. Ekstrak lompong mentah dapat mempengaruhi aktivitas fagositosis makrofag dan kadar NO pada mencit Balb/c yang diinfeksi *Listeria monocytogenes*.

Kata kunci: *Colocasia esculenta L. Schoot*, Aktivitas Fagositosis, Kadar NO, *Listeria monocytogenes*.

*Mahasiswa Program Studi S-1 Ilmu Gizi, Universitas Diponegoro

**Dosen Program Studi S-1 Ilmu Gizi, Universitas Diponegoro

PENDAHULUAN

Ekstrak lompong (*Colocasia esculenta* L. Schoot) mentah memiliki aktivitas *antimicrobial*, *antihepatotoxic*, dan *antiinflammatory*. Penelitian sebelumnya, ekstrak etanol daun dan batang lompong telah terbukti sebagai antidiabetes pada tikus yang diinduksi aloksan. Ekstrak lompong menurunkan gula darah melalui sekresi insulin pankreas maupun melalui peningkatan penyerapan glukosa.¹

Manfaat kesehatan ekstrak lompong mentah karena kandungan senyawa fitokimia yang terdapat didalamnya. Senyawa fitokimia tersebut diantaranya yaitu senyawa flavonoid berupa *orientin*, *isorientin*, *isovitexin*, *vicenin-2*, *orientin 7-O-glucoside*, *leteolin 7-O-glucoside*. Ekstrak lompong juga mengandung senyawa *terpenoid* dan *anthocyanins* seperti *cyanidin-3-glucoside*, *pelargonidin-3-glucoside* dan *cyanidin-3-rhamnoside* yang terbukti memiliki aktivitas antioksidan. Saponin dan tanin juga terdapat pada ekstrak lompong mentah.²⁻⁵

Peneliti ingin membuktikan potensi immunomodulator ekstrak lompong mentah dalam memicu respon imun tubuh. Respon imun tubuh akan muncul ketika ada infeksi yang bisa disebabkan dari bakteri, virus maupun jamur. Bakteri yang digunakan untuk memicu respon imun seluler yaitu bakteri intraseluler. Salah satu bakteri intraseluler yang sifatnya telah diketahui dengan baik salah satunya adalah *Listeria monocytogenes*.⁶ Makrofag akan bekerja sama dengan limfosit T untuk membunuh bakteri *Listeria*. Makrofag akan memfagosit bakteri *Listeria* melalui proses fagositosis, dan limfosit T akan menghasilkan sitokin IFN- γ , TNF- α dan memacu sel NK (*Natural Killer*). Sitokin-sitokin tersebut akan mengaktifasi makrofag untuk mensekresikan NOS (*Nitric Oxide Synthase*) sehingga akan terbentuk NO (Nitrit Oksida). NO (Nitrit Oksida) kemudian akan melisis bakteri *Listeria*. Salah satu respon imun tubuh dapat dilihat dari aktivitas fagositosis dan kadar NO.⁷ Isolasi makrofag dilakukan pada bagian cairan peritonium karena pada bagian tersebut terdapat makrofag dalam jumlah yang besar.⁸ Berdasarkan hal tersebut, aktivitas fagositosis dan kadar NO dipilih peneliti untuk menilai respon

imun. Penetapan besar dosis menggunakan dosis maksimal yang bisa dikonsumsi manusia dalam sehari kemudian dikonversi ke mencit, sehingga mendapatkan dosis sebesar 13 mg/20gBB. Perlakuan kelompok dibedakan sebelum dan sesudah infeksi bertujuan untuk mengetahui kemampuan ekstrak lompong sebagai upaya preventif dan kuratif.

METODE PENELITIAN

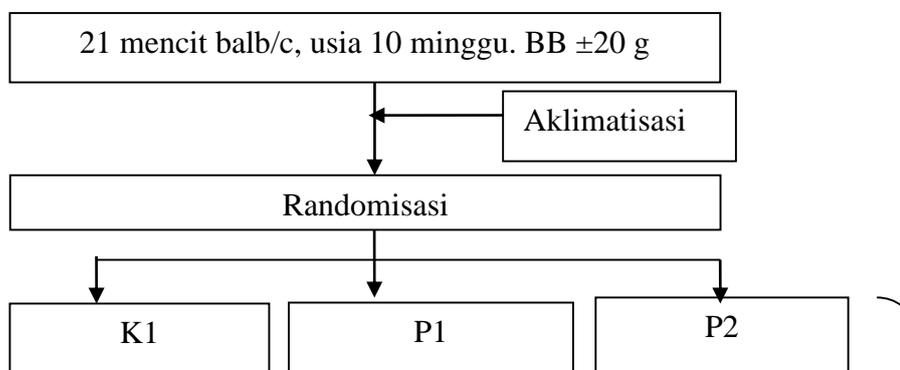
Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang. Pengujian dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Penelitian dilakukan dalam kurun waktu 2 bulan. Jenis penelitian merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan *true experimental* dengan *post test only control group design*. Sampel penelitian 21 ekor mencit dengan kriteria inklusi adalah mencit strain Balb/c, umur 10 minggu, berat badan 20-30 gram, jantan dan sehat, sedangkan kriteria eksklusinya adalah mencit sakit selama masa adaptasi dan mencit yang mati selama perlakuan.

Mencit diadaptasikan selama 1 minggu kemudian dibagi secara acak menjadi 3 kelompok. Kelompok K, mencit yang diinokulasi *Listeria monocytogenes* dan tidak mendapat ekstrak lompong mentah. Kelompok P1, mencit yang diinokulasi *Listeria monocytogenes* dan diberi ekstrak lompong mentah sebelum terinfeksi. Kelompok P2, mencit yang diinokulasi *Listeria monocytogenes* dan diberi ekstrak lompong mentah setelah terinfeksi.

Inokulasi *Listeria monocytogenes* dilakukan pada hari keempat dengan dosis 1×10^5 CFU. Kelompok P1 diberi ekstrak lompong mentah pada hari pertama sampai hari ketiga, kelompok P2 hanya diberi pakan standar. Setelah inokulasi, kelompok P1 hanya diberi pakan standar, dan kelompok P2 diberi ekstrak lompong hingga hari keenam. Pada hari ketujuh mencit dibunuh dan dilakukan pemeriksaan sampel, mencit dinarkose menggunakan kloroform. Bagian mencit yang diambil adalah cairan intraperitoneal, yang dicuci dengan larutan RPMI sebanyak 3 kali untuk mendapatkan makrofag.⁹

Pemeriksaan aktivitas fagositosis menggunakan partikel latex serta pemeriksaan NO menggunakan reagens Griess.^{10,11} Pemeriksaan NO, makrofag dikultur pada *mikroplate well* 96 sebanyak $2,5 \times 10^6$ sel/ml dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dengan kadar CO_2 5%. Supernatan yang didapat dari hasil pengkulturan makrofag diperiksa kadar nitrit oksidanya menggunakan alat *ELISA Reader* dengan metode Griess.¹¹

Data yang dikumpulkan adalah data primer dari perhitungan jumlah partikel latex yang difagosit makrofag, serta kadar NO didapat dari pembacaan hasil kadar nitrit oksida makrofag. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak lompong mentah dengan dosis yang digunakan 13 mg/20gBB dan induksi bakteri *Listeria monocytogenes* 1×10^5 CFU. Variabel tergantung berupa aktivitas fagositosis (jumlah partikel latex yang difagosit makrofag) dan kadar nitrit oksida yang diproduksi oleh makrofag dalam pengkulturan. Data yang didapatkan diuji normalitasnya menggunakan *Uji Saphiro Wilk*, data terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan *Independet t test*.





Gambar 1. Alur Kerja Penelitian

HASIL & PEMBAHASAN

Penelitian tentang pengaruh ekstrak lompong mentah terhadap aktivitas fagositosis dan kadar nitrit oksida makrofag pada mencit Balb/c sebelum dan setelah terinfeksi *Listeria monocytogenes* telah dilakukan. Hasil penelitian berupa kemampuan fagositosis dengan menghitung indeks fagositosis makrofag dan kadar nitrit oksida dengan menggunakan metode Gries yang hasil reaksinya dibaca dengan menggunakan *ELISA reader*.

Data diuji normalitasnya dengan *Shapiro-Wilk*, dan didapatkan distribusi data yang tidak normal ($p < 0,05$). Dilakukan proses transformasi data agar data tersebut berdistribusi normal, kemudian dilakukan *Independent t test*.

Tabel 1. Rerata aktivitas fagositosis dan Kadar NO

n	Aktivitas Fagositosis		Kadar NO
	Rerata (\pm SD)		Rerata (\pm SD) (μ M)
K	7	2.43 (\pm 0.23)	106.28(\pm 54.39)
P1	7	3.15 (\pm 1.29)	102.43(\pm 66.41)
P2	7	3.25 (\pm 0.69) ^a	183.71(\pm 71.04) ^b

a= berbeda bermakna dengan kelompok kontrol ($p < 0.05$, $p = 0.015$)

b= berbeda bermakna dengan kelompok kontrol ($p < 0.05$, $p = 0.041$)

Tabel diatas menunjukkan bahwa terjadi peningkatan rerata aktivitas fagositosis pada seluruh kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol. Terjadinya peningkatan aktivitas fagositosis dipicu oleh senyawa fitokimia yang terdapat dalam ekstrak lompong mentah. Senyawa fitokimia pada ekstrak lompong mentah diantara lain flavonoid, tanin, saponin dan *phenol*.³

Kelompok perlakuan dua lebih efektif meningkatkan aktivitas fagositosis daripada kelompok perlakuan satu. Dilihat dari jumlah rerata, rerata kelompok perlakuan dua juga memiliki jumlah rerata lebih tinggi. Ekstrak lompong mentah lebih efektif diberikan sesudah infeksi daripada sebelum terinfeksi. Pemberian ekstrak lompong mentah dengan dosis 13mg/20gBB memiliki efek kuratif dapat mempengaruhi aktivitas fagositosis sehingga dapat dimanfaatkan untuk membantu pemulihan penyakit infeksi.

Pemberian ekstrak lompong mentah dengan dosis yang sama selama 3 hari secara statistik ternyata belum memiliki efek preventif namun tetap dapat meningkatkan aktivitas fagositosis dibanding kelompok kontrol. Peningkatan rerata indeks fagositosis pada semua kelompok perlakuan dibanding kelompok kontrol membuktikan bahwa ekstrak lompong mentah sebagai immunomodulator dapat merangsang kinerja makrofag.

Adanya pengaruh ekstrak lompong mentah terhadap aktivitas fagositosis disebabkan karena kandungan yang terdapat pada ekstrak lompong mentah. Sesuai dengan penelitian sebelumnya ekstrak lompong mentah mengandung flavonoid.¹² Ekstrak lompong mentah mengandung 0.198% *phenol*, 0.261% tanin dan 0.88% flavonoid. Flavonoid memiliki efek anti tumor, antioksidan, *immunostimulant*, anti radang, analgesik, anti virus, anti jamur dan anti bakteri. Senyawa flavonoid telah terbukti dapat meningkatkan IL-2 dan proliferasi limfosit.¹³ Proliferasi limfosit akan mempengaruhi sel CD4+, yang akan menyebabkan sel Th1 teraktivasi.¹⁴ Sel Th1 yang telah teraktivasi akan mempengaruhi SMAF (*Specific Makrofag Activating Factor*). SMAF (*Specific Makrofag Activating Factor*) merupakan molekul-molekul multipel, salah satunya adalah IFN- γ . IFN- γ (Interferon- γ) akan mengaktifkan makrofag, sehingga makrofag akan mengalami peningkatan aktivitas fagositosis. Hal ini akan menyebabkan makrofag dapat membunuh bakteri lebih cepat.¹⁵ Flavonoid juga memiliki mekanisme kerja dengan cara mengaktifkan sel NK untuk merangsang produksi IFN- γ . IFN- γ (Interferon- γ) merupakan sitokin utama MAC (*Macrophage Activating Cytokine*) yang akan mengaktifkan makrofag dan memacu peningkatan aktivitas fagositosis.¹⁶

Makrofag dan neutrofil yang teraktivasi akan menghasilkan beberapa enzim proteolitik di *phagolysosome* yang berfungsi untuk menghancurkan bakteri. Enzim tersebut diantaranya yaitu *elastase* dan *cathepsin G*. Beberapa reseptor seperti TLRs (*Toll-like Receptors*), *G protein-coupled receptors*, *antibody Fc*, *complement C3* dan sitokin IFN- γ bekerjasama membunuh mikroba.⁷ Makrofag dan neutrofil akan mengkonversi molekul oksigen ke dalam ROS (*Reactive Oxygen Species*), dibantu dengan enzim IFN- γ dan TLRs akan menghancurkan mikroba.

Makrofag juga menghasilkan RNI (*Reactive Nitrogen Intermediate*) dibantu oleh enzim iNOS (*inducible NO sintase*) akan menghasilkan NO (*Nitric Oxide*).⁷

Meningkatnya respon imun selain dapat dilihat dari meningkatnya aktivitas fagositosis, juga dapat dilihat dari meningkatnya kadar NO (Nitrit Oksida). Kadar NO adalah jumlah NO yang terdapat pada supernatan kultur makrofag *peritoneum*.¹¹ Hasil kadar NO menunjukkan rerata kadar NO pada kelompok perlakuan satu lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol, sedangkan pada kelompok perlakuan dua lebih tinggi dibanding kelompok kontrol. Kadar NO pada kelompok perlakuan lebih rendah karena nitrit oksida bisa bersifat menjadi prooksidan.⁷

Hasil penelitian ini, didapatkan hasil bahwa ekstrak lompong mentah lebih efektif dimanfaatkan sebagai upaya kuratif daripada upaya preventif. Hasil ini sesuai dengan hipotesis penelitian karena pemberian ekstrak lompong mentah dengan dosis 13mg/20gBB memiliki efek kuratif dapat mempengaruhi kadar NO. Hasil ini sesuai dengan penelitian sebelumnya, bahwa ekstrak lompong mentah dapat dimanfaatkan untuk membantu pemulihan penyakit infeksi. Namun, pemberian ekstrak dengan dosis yang sama selama 3 hari ternyata tidak memiliki efek preventif.

Kandungan ekstrak lompong mentah sebagai immunomodulator dapat meningkatkan respon imun. Respon imun tubuh yang diperlukan untuk melawan bakteri intraseluler adalah respon imun seluler. Salah satu respon imun seluler berupa produksi Nitrit Oksida (NO) oleh makrofag.¹² Makrofag dapat diaktivasi oleh LPS (lipopolisakarida) bakteri, sel tubuh yang rusak, maupun oleh IFN- γ (*interferon gamma*). Makrofag yang telah teraktivasi tersebut akan memakan bakteri intraseluler kemudian akan memproduksi, nitrit oksida (NO), lisosim, komplemen, *hidrogen peroksida elastase* dan *kolagenase*, IL-1, IL-12, IL-10, protrombin.¹² Jika makrofag teraktivasi maka transkripsi gen yang menginduksi iNOS akan meningkat, sehingga akan menghasilkan NO dalam jumlah yang lebih banyak. NO akan berperan sebagai immunoregulator dan immunosupresif.¹⁷

Induksi *Listeria* pada kelompok yang diberi ekstrak lompong mentah setelah terinfeksi menunjukkan adanya peningkatan kadar NO dibandingkan kelompok kontrol. Induksi bakteri mengaktifkan sistem imun seluler menciit. Makrofag dan limfosit T saling bekerja sama untuk melawan bakteri *Listeria*. Limfosit T akan menghasilkan sitokin IFN- γ , TNF- α dan memacu sel NK (*Natural Killer*). Sitokin-sitokin tersebut akan mengaktifasi makrofag untuk mensekresikan NOS (*Nitrit Oxyde Syntase*) sehingga akan terbentuk NO (Nitrit Oksida). NO (Nitrit Oksida) kemudian akan melisis bakteri *Listeria*.⁷ Pemberian ekstrak lompong mentah dengan dosis 13mg/20gBB mempengaruhi kadar NO. Hal ini juga menunjukkan bahwa kemampuan aktivitas makrofag dalam proses membunuh bakteri intraseluler juga meningkat sehingga ekstrak lompong mentah dapat digunakan sebagai upaya kuratif dalam melawan bakteri.

Listeria akan memicu produksi IL-2 serta akan akan mestimulasi sel NK dan CD8⁺ CTLs (*Cytotoxic T Lymphocytes*).¹⁸ IL-2 (*Interleukin-2*) merupakan sitokin yang biasa disebut hormon leukositotropik yang berfungsi sebagai stimulan proliferasi sel B dan sel T. Sel CD8⁺CTLs merupakan sel T yang dapat mengenali peptida antigen dan mampu menginduksi kerusakan pada sel yang terinfeksi. Ketiganya akan mensekresikan IFN- γ sehingga akan mengaktifkan makrofag. Makrofag tersebut kemudian memproduksi [oksigen](#) reaktif, menstimulasi produksi antibodi, dan mengopsonisasi bakteri.¹⁸

Sesuai dengan penelitian sebelumnya telah diketahui bahwa flavonoid meningkatkan produksi NO.¹⁹ Flavonoid selain memiliki efek immunostimulan juga memiliki efek immunosupresan, hal ini memungkinkan adanya penurunan kadar NO pada kelompok perlakuan.²⁰ Flavonoid dapat meningkatkan stamina tubuh dengan cara meningkatkan sekresi *endetol Nitrit Oksida Sintase* (eNOS). Sekresi *endetol Nitrit Oksida Sintase* (eNOS) maka kadar NO akan meningkat juga.¹⁹ Tingginya kadar NO dapat berfungsi sebagai bakterisidal dan memiliki efek anti apoptosis.¹⁶ Mekanisme NO dalam meningkatkan imunitas seluler yaitu dengan meningkatkan kemampuannya sebagai zat sitotoksik dalam proses fagositosis. NO akan menggabungkan diri dengan H₂O₂ (*hidrogen peroxide*) atau

superoxide sehingga membentuk radikal peroksinitrit yang sangat reaktif membunuh mikroba.⁷

Ekstrak lompong mentah dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan respon imun dan ekstrak lompong yang mengalami proses pemasakan pun juga memiliki manfaat yang sama. Ekstrak lompong dengan pengukusan 30 menit dan 45 menit memiliki nilai rerata indeks fagositosis dan kadar NO lebih tinggi dibanding kelompok kontrol. Kandungan *phenol*, tanin dan flavonoid, ekstrak lompong justru meningkat setelah mengalami proses pengukusan.^{21,22}

Tabel 2. Kandungan Ekstrak Lompong

Ekstrak	Hasil Analisa		
	<i>Phenol</i> %	Tanin %	Flavonoid %
Lompong mentah	0.198	0.261	0.088
Lompong dengan pengukusan 30 menit	0.219	0.293	0.105
Lompong dengan pengukusan 45 menit	0.222	0.310	0.140

Diketahui bahwa ekstrak lompong mentah dengan pengukusan 45 menit memiliki persentase kandungan *phenol*, tanin dan flavonoid tertinggi dibanding ekstrak lompong mentah dan ekstrak lompong dengan pengukusan 30 menit.^{21,22} Kandungan senyawa fitokimia tersebut sebagai immunomodulator dapat memodulasi sistem imun tubuh dengan cara meningkatkan respon imun/ meningkatkan mekanisme pertahanan tubuh baik *innate* maupun *adaptive* serta dapat memberikan perlindungan terhadap patogen. Meningkatnya respon imun ditandai dengan meningkatnya kinerja makrofag dalam proses membunuh bakteri.⁷

Makrofag berfungsi memusnahkan bakteri/benda asing yang masuk ke dalam tubuh. Makrofag berperan dalam memfagositosis patogen dan menstimulasi limfosit dan sel imun untuk merespon patogen. Makrofag yang teraktivasi dapat diukur melalui aktivitas fagositosis dan kadar NO.¹² Kinerja makrofag yang mengalami peningkatan akan disertai dengan peningkatan fagositosis. Pada fagositosis, fagosit yang aktif (makrofag dan neutrofil) akan mensekresikan nitrit oksida (NO). NO (Nitrit Oksida) juga bisa menyerang sel yang memproduksi dan

sel yang berada disekitarnya sehingga memungkinkan terjadinya penurunan kadar NO meskipun aktivitas fagositosisnya tinggi.⁷

Listeria monocytogenes merupakan salah satu bakteri patogen intraseluler fakultatif sehingga tubuh membutuhkan mekanisme imunitas *innate* dan *adaptive*. *Listeria* akan mengaktifkan sel-sel NK dengan menstimulasi sel dendritik dan makrofag yang kemudian akan memproduksi IL-12. Sel-sel NK akan menghasilkan IFN- γ , IFN- γ akan mengaktifkan makrofag dan memfagositosis bakteri. Sistem imun *innate* merupakan pertahanan awal terhadap bakteri, selanjutnya diperlukan mekanisme imunitas *adaptive* (*T cell mediated immunity*)/ imunitas seluler.⁶ Sel CD4⁺ T dan sel CD8⁺T akan bekerja sama memberikan perlindungan terhadap bakteri intraseluler. Sel CD4⁺ akan menanggapi antigen melalui MHC II (*Major Histocompatibility Complex II*) dan berdiferensiasi menjadi *effector* T_h1. Sel T_h akan meningkatkan kemampuan fagosit dalam membunuh bakteri. Sel T akan mengekspresikan CD40 dan mensekresikan IFN- γ . Sel CD4⁺ Th1 mengaktifkan makrofag melalui sinyal yang diperantai interaksi CD40L-CD40 yang dilakukan oleh sitokin IFN- γ .²² Akibat dari sinyal CD40 dan IFN- γ menyebabkan beberapa protein dalam makrofag meningkat. Sinyal CD40 akan mengaktifkan faktor transkripsi *Nuclear Factor* κ B (NF- κ B) dan *Activation Protein-1* (AP-1). IFN- γ akan mengaktifkan faktor transkripsi STAT 1 (*Signal Transducers and Activator of Transcription*) dan IRF-1 (*Interferon Response Factor-1*). Sinyal tersebut akan meningkatkan jumlah protein yang bertanggung jawab sebagai efektor di CMI (*Cell Mediated Immunity*) sehingga makrofag akan memproduksi beberapa zat *microbicidal*, seperti ROS (*Reactive Oxygen Species*), NO dan enzim lisosom.²³ Sel CD4⁺T helper akan mensekresikan sitokin IL-2. Di sisi lain CD8⁺T menanggapi antigen melalui MHC I dan akan bekerja jika bakteri yang terdapat pada fagolisosom masuk ke dalam sitosol, maka CD8⁺T akan berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi CTLs untuk melisis bakteri intraseluler di sitoplasma. Terdapat dua mekanisme CTLs dalam melisis bakteri. Mekanisme pertama, CTLs akan mengeluarkan enzim *granzyme* dan *perforin* kemudian menginduksi apoptosis. Mekanisme yang kedua yaitu CTLs akan mengekspresikan FasL (*Fas*

Ligan) kemudian menginduksi apoptosis. Sel CD4⁺T dan CD8⁺T bekerjasama untuk memberikan perlindungan terhadap bakteri *Listeria monocytogenes*.^{6,18}

Respon imun selain dipengaruhi oleh infeksi (bakteri, jamur, virus), juga dipengaruhi oleh usia, asupan/status gizi, faktor stress dan sistem endokrin.²⁴ Faktor-faktor tersebut pada penelitian ini dikendalikan, hanya saja untuk asupan tidak dilakukan pemantauan jumlah asupan per subjek tiap harinya. Data penelitian ini hanya terbatas pada pengukuran berat badan untuk menentukan dosis intervensi.

SIMPULAN

Pemberian ekstrak lompong (*Colocasia esculenta* L Schoot) mentah pada mencit Balb/c sebelum diinfeksi *Listeria monocytogenes* dapat meningkatkan rerata indeks fagositosis namun tidak berpengaruh secara bermakna terhadap aktivitas fagositosis makrofag. Pemberian ekstrak lompong mentah sesudah diinfeksi *Listeria monocytogenes* dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag. Pengaruh ekstrak lompong mentah terhadap aktivitas fagositosis lebih efektif apabila ekstrak lompong mentah diberikan sesudah terinfeksi, dimanfaatkan sebagai upaya kuratif.

Pemberian ekstrak lompong mentah sebelum diinfeksi *Listeria monocytogenes* memiliki rerata kadar NO (Nitrit Oksida) lebih rendah dibanding kelompok kontrol karena NO bersifat prooksidan. Pemberian ekstrak lompong mentah sesudah diinfeksi *Listeria monocytogenes* dapat meningkatkan kadar NO. Pengaruh ekstrak lompong mentah terhadap kadar NO lebih efektif apabila ekstrak lompong mentah diberikan sesudah terinfeksi, dimanfaatkan sebagai upaya kuratif.

SARAN

Dilakukan penelitian dengan menggunakan dosis ekstrak lompong mentah dengan dosis bertingkat dan jangka waktu intervensi yang lebih bervariasi untuk mengetahui pengaruh preventif ekstrak lompong mentah.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih penulis ucapkan kepada dr.Hesti Murwani Rahayuningsih,M.Si,Med atas bimbingan materi, selain itu ucapan terimakasih penulis sampaikan juga kepada para reviewer atas masukan untuk penelitian ini sehingga dapat terlaksana hingga akhir.



DAFTAR PUSTAKA

1. Saha S, Rahmatullah M. Antihyperglycemic and Antinociceptive Activities Of Methanolic Extract of *Colocasia esculenta* (L.) Schott Stems: a preliminary study. *Advanced in Natural and Applied Sciences*.2013.7(3);232-237.
2. Pereira PR, Aguila EMD, Verricimo MA, Zingali RB, Paschoalin VMF, Silva JT. Purification and Characterization of the Lectin from Taro (*Colocasia esculenta*) and its Effect on Mouse Splenocyte Proliferation In Vitro and In Vivo. *Protein J. Springer*. 2014;33: 92-99.
3. Halligudi N. Pharmacological Potential of *Colocasia* an Edible Plant. *Journal of Drug Discovery and Therapeutics*. 2013; 1 (2):05-09
4. Agyarea C, Asaseb A, Lechtenberg M, Niehuesc M, Detersc A, Hensele A. An Ethnopharmacological Survey And In Vitro Confirmation Of Ethnopharmacological Use Of Medicinal Plants Used For Wound Healing In Bosomtwi–Atwima–Kwanwoma Area, Ghana. *Journal Of Ethnopharmacology*.2009: 125, 393–403.
5. Goncalves. Influence of Taro (*Colocasia Esculenta* L. Shott) Growth Conditions On The Phenolic Composition and Biological Properties. Elsevier. *Food Chemistry*. 2013; 141: 3480–3485.
6. Abbas AK, Lichtman AH, Shiv Pillai. *Cellular And Molecular Immunology*. 6th edition. Saunders elsevier; 2009: 355-360
7. Abbas AK, Lichtman AH, Shiv Pillai. *Cellular And Molecular Immunology*. 6th edition. Saunders elsevier; 2009 : 35-37
8. Vincent JL , Zhang J, Sza bo C, Preiser JC. Effect of Nitric Oxide in Septic Shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;16(1):1781-85.
9. Lewis JG. Isolation of Alveolar Macrophages, Peritoneal Macrophages and Kupffer cells. In: *methods in immunotoxicology*.Vol 2. Editor: Burleson GR, Dean JH, Munson AE. New York. A John Wiley Liss & sons Inc Publ.1995;15-26.
10. Leijh PCJ, Furh RV, dan Zwet TLV. In Vitro Determination of Phagocyte and Intracellular Killing by Polymorphonuclear and

- Mononuclear Phagocyte. In: Weir DM Ed, Cellular Immunology. London: Blackwell Scientific Publication; 1986; 46.1- 46.21.
11. Dietert RR, Hotchkiss JH, Austic RE, Sung Y. Production of Reactive Nitrogen Intermediates by Macrophages. In: Methodes in Immunotoxicology. Volume 2. editor : Burleson GR, Dean JH, Munson AE. A John Wilye Liss & sons Inc Publ. New York. 1995; 99-1117
 12. Tripathi AK, Kohli S. Phytochemical Screening And Evaluation Of Antidiabetic Activity Of *Colocasia Esculenta* (L)Leaves On Stz Induced Diabetic Rats. Adv. Pharmacol. Toxicol. 2013;14 (2):1-12 ISSN - 0973 – 2381
 13. Nopitasari DA. Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah *Phaleria papuana* terhadap Aktivitas Fagositosis Makrofag Mencit Balb/C.(Skripsi). Universitas Diponegoro; 2006.
 14. Ukhrowi U. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Umbi Bidara Upas (*Merremia mammosa*) terhadap Fagositosis Makrofag dan Produksi Nitrit Oksida (NO) Makrofag Studi pada Mencit Balb/C yang Diinfeksi Salmonella Typhimurium.(Tesis). Universitas Diponegoro; 2011.
 15. Baratawidjaja KGB. Iris Rengganis. Imunologi Dasar Edisi Ke 8. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia :2009.
 16. Susilo J, Erwiyani AR, Awwalia N. Aktivitas Imunomodulator Ekstrak Etanol Daun Jamblang (*Syzygium cumini* (L) Skeel) Terhadap Respon Imun Non Spesifik Pada Mencit Jantan Galur Balb/c.(Skripsi). STIKES Ngudi Waluyo Ungaran; 2013.
 17. Sahat D. Pengaruh Pemberian Ekstrak *Hedyotis Corymbosa* Dosis Bertingkat terhadap Produksi Nitric Oxide Makrofag Mencit Balb/C yang Diinfeksi Dengan *Salmonella typhimurium*.(Skripsi).Universitas Diponegoro; 2006
 18. Abbas AK, Lichtman AH, Shiv Pillai. Cellular And Molecular Immunology. 6th edition. Saunders elsevier; 2009: 11-16

19. Joefrie GH. Uji Kemanfaatan Ekstrak Etanol Biji Mahoni (*Swietenia mahagoni jacq*) terhadap Stamina Tubuh Mencit Jantan Strain Balb/C .(Skripsi). Universitas Jember; 2012.
20. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*. 2000;52 (4): 673-751
21. Mubayinah. Pengaruh Ekstrak Lompong (*Colocasia Esculenta L Schoot*) 30 Menit Pengukusan Terhadap Aktivitas Fagositosis dan Kadar NO (Nitrit Oksida) pada Mencit Sebelum Dan Sesudah Terinfeksi *Listeria monocytogenes*.(Draft Skripsi).Universitas Diponegoro; 2015
22. Sholikhah AR. Pengaruh Ekstrak Lompong (*Colocasia Esculenta L Schoot*) 30 Menit Pengukusan Terhadap Aktivitas Fagositosis dan Kadar NO (Nitrit Oksida) pada Mencit Sebelum Dan Sesudah Terinfeksi *Listeria monocytogenes*.(Draft Skripsi).Universitas Diponegoro; 2015
23. Abbas AK, Lichtman AH, Shiv Pillai. *Cellular And Molecular Immunology*. 6th edition. Saunders elsevier; 2009: 311-312
24. Subowo. *Imunologi Klinik*. Edisi ke-2. Jakarta : Sagung Soto; 2010:413-463.

1. LAMPIRAN 1
Hasil Statistika

Tabel.5 Data Indeks Fagositosis dan Kadar NO

Kelompok	Indeks Fagositosis	Kadar NO
P1	2.52	58
P1	2.28	39
P1	2.71	72
P1	5.58	83
P1	2.19	167
P1	2.48	222
P1	4.31	76
P2	4.08	256
P2	3.91	101
P2	3.9	222
P2	2.99	278
P2	2.37	185
P2	2.59	133
P2	2.94	111
K	2.75	133
K	2.5	65
K	2.32	52
K	2.38	63
K	2.05	104
K	2.34	119
K	2.68	208

Tabel 6. Hasil Uji Normalitas

sampel	Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	
Akt_fagositosis	p1	.764	7	.018
	p2	.878	7	.216
	K	.957	7	.794
Kadar NO	p1	.834	7	.088
	p2	.919	7	.459
	K	.895	7	.301

Tabel 7. Hasil Uji Normalitas Setelah Transformasi

sampel	Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	
Akt_fagositosis	p1	.810	7	.052
	p2	.889	7	.267
	K	.952	7	.750
Kadar NO	p1	.834	7	.088
	p2	.919	7	.459
	K	.895	7	.301

Tabel 8. Uji beda fagositosis

	n	Rerata (\pm SD)	Perbedaan rerata (IK 95%)	<i>p</i>
P1 K	7	3.15 (\pm 1.29)	0.88(0.23-0.56)	0.19
	7	2.43 (\pm 0.23)		
P2 K	7	3.25 (\pm 0.69)	0.12 (0.20-0.30)	0.015*
	7	2.43 (\pm 0.23)		

Tabel 9. Uji beda kadar NO

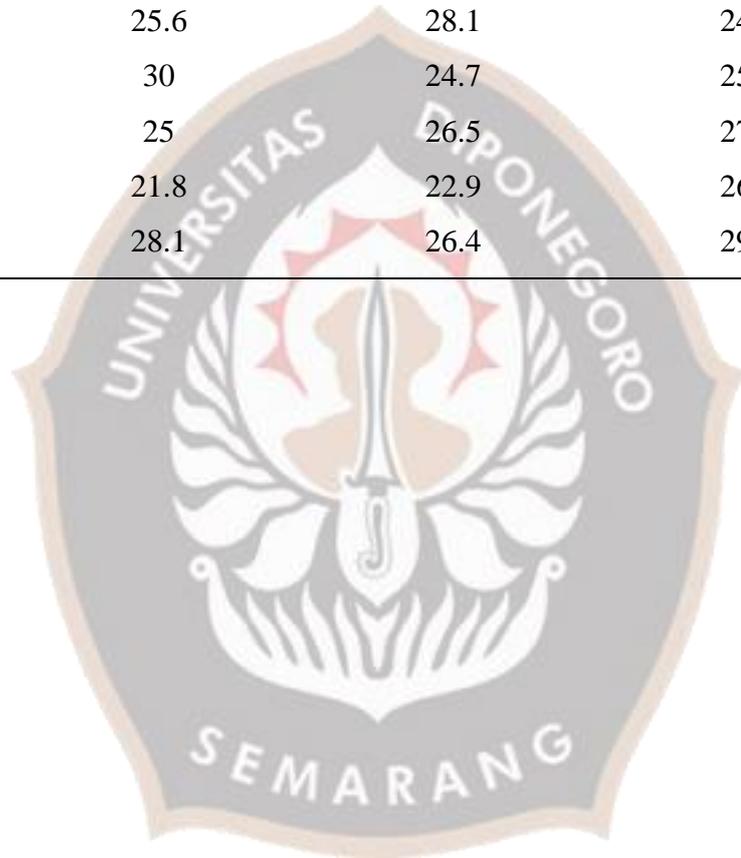
	n	Rerata (\pm SD)	Perbedaan rerata (IK 95%)	<i>p</i>
P1 K	7	102.43(\pm 66.41)	3.86(66.83-74.55)	0.907
	7	106.28(\pm 54.39)		
P2 K	7	183.71(\pm 71.04)	77.43(3.74-151.11)	0.041*
	7	106.28(\pm 54.39)		

2. LAMPIRAN 2

Berat badan mencit

Tabel 11. Berat badan mencit

Mencit	Berat Badan (g)		
	P1	P2	K
1.	25.9	26.3	26
2.	27.2	27.8	27.4
3.	25.6	28.1	24.1
4.	30	24.7	25.4
5.	25	26.5	27.4
6.	21.8	22.9	26.9
7.	28.1	26.4	29.3



3. LAMPIRAN 3

Prosedur Isolasi Makrofag Peritoneal Mencit⁹

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 untuk mengisolasi makrofag peritoneal mencit :

1. Mencit diterminasi dengan dislokasi cervix atau inhalasi dengan sodium pentobarbitol atau CO₂, dibaringkan telentang dan seluruh permukaan ventral disiram ethanol 70%
2. 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.
3. Injeksikan 2-3 ml CMF-HBSS dalam rongga peritoneum menggunakan semprit 10ml dg jarum No 18 atau 20 (lebih baik pakai No 26). 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 pd lubang jarum sehingga cairan tidak keluar selama pemijatan. Peritoneum dipijat pelan kemudian disemprot lagi dengan ethanol 70%.
4. Injeksikan 7-8 ml HBSS. Sedot kembali cairan dalam rongga peritoneum sampai habis dengan (dg 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.

5. Cairan disentrifus 800 xg pada suhu 20° C selama 5 menit. Bila cairan terkontaminasi darah, maka cuci sel-sel tersebut 2x menggunakan CMF-HBSS.
6. Tambahkan medium komplit yang terdiri dari RPMI 1640 mengandung penisilin (50 U/ml), streptomycin (50 g/ml), glutamine (20 mM) dan 10% FBS
7. Hitung sel-sel dengan Hemacytometer setelah dilarutkan dalam 3% asam acetat untuk melisiskan sel darah merah.
8. Kultur sel dalam medium komplit dengan kepadatan 5×10^5 sel/ml selama 2 jam dalam CO₂ inkubator pada suhu 37°C.
9. Cuci sel-sel tersebut dengan HBSS sebanyak 3 kali, kemudian tambahkan 1 ml medium komplit untuk selanjutnya dikultur dalam CO₂ inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.



4.LAMPIRAN 4

Uji Aktivitas fagositosis ¹⁰

Untuk mengukur kemampuan fagositosis makrofag peritoneum menggunakan latex bead diameter 3Em (Sigma Chem.Co). Latex bead diresuspensikan dalam PBS sehingga didapat konsentrasi $2,5 \times 10^7$ /ml. Setelah makrofag peritoneum dikultur selama sehari (24 jam), kemudian dicuci 2 kali dengan RPMI, selanjutnya ditambahkan suspensi latex 200 El/sumuran, dan diinkubasikan selama 60 menit pada suhu 37°C, CO2 5%. Kultur dikeluarkan dari inkubator kemudian dicuci dengan PBS 3 kali untuk menghilangkan partikel yang tidak difagositosis, dan kemudian dikeringkan pada suhu ruangan dan difiksasi dengan methanol absolute selama 30 detik, selanjutnya methanol dibuang dan dikeringkan pada suhu kamar. Setelah preparat kering, dilakukan pengecatan dengan Giemsa 20% selama 30 menit.

Selanjutnya hasil pengecatan dicuci dengan aquades, dan setelah kering cover slips diangkat dari sumuran kultur dan dikeringkan pada suhu kamar. Setelah kering ditaruh pada obyek gelas untuk dilihat di bawah mikroskop cahaya. Aktivitas fagositosis makrofag dinilai dari persentase makrofag yang memfagositosis partikel latex, dihitung dari 100 makrofag yang terlihat di bawah mikroskop cahaya, dan rerata jumlah partikel latex yang difagositosis oleh setiap makrofag. Rerata jumlah partikel latex yang difagositosis oleh setiap makrofag dihitung dengan cara membagi jumlah partikel latex yang difagositosis dengan jumlah makrofag yang memfagositosis partikel latex. Sebagai contoh, bila pada saat membaca persentase makrofag yang memfagositosis partikel latex (yang dihitung dari 100 makrofag) terdapat 10 sel yang memfagositosis partikel latex dan jumlah partikel latex yang difagositosis sebanyak 30 partikel, maka rerata jumlah partikel latex yang difagositosis oleh tiap makrofag adalah $30:10 = 3$ partikel.

5.LAMPIRAN 5

Prosedur Pengukuran Kadar NO Makrofag (Metode Griess)¹¹

Bahan :

Reagen

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 NaNO₂ 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.

Cara Kerja :

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

- 1) Memasukkan 100 ul 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.
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.

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.

c. Standard Nitrit : Melarutkan 69 mg NaNO_2 dalam 500 ml air suling (2mM stok), kemudian dibuat pengenceran bertingkat dari 0 – 200 μM dengan cara melarutkan larutan stok menggunakan medium yang dipakai untuk kultur makrofag.

