

Pengaruh Ekstrak Lompong (*Colocasia esculenta L. Schoot*) 45 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
MUBAYINAH
22030111130078

PROGRAM STUDI ILMU GIZI FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2015

HALAMAN PENGESAHAN

Artikel penelitian dengan judul “Pengaruh Ekstrak Lompong (*Colocasia esculenta L. Schoot*) 45 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 : Mubayinah
NIM : 22030111130078
Fakultas : Kedokteran
Program Studi : Ilmu Gizi
Universitas : Diponegoro Semarang
Judul Proposal : Pengaruh Ekstrak Lompong (*Colocasia esculenta L. Schoot*) 45 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

The Effect of 45 Minutes Steamed Lompong (*Colocasia esculenta L. Shoot*) Extract on Phagocytic Activity and NO (Nitric Oxide) Level of Mice Balb/c Before and After Infected by *Listeria monocytogenes*

Mubayinah¹, Hesti Murwani Rahayuningsih²

ABSTRACT

Background: The leaves and stems of lompong (*Colocasia esculenta L. Shoot*) consumed as a vegetables. Lompong extract contained flavonoids, saponins, tannins, and triterpenoids. Flavonoids increased cellular immune response. The immune response seen from phagocytic activity and NO level.

Objective: Analyze the effect of 45 minutes steamed lompong extract 13mg/20gBW on phagocytic activity and NO level of macrophages before and after infected by *Listeria monocytogenes* 10⁵ CFU.

Method: This study was a *true experimental with the post-test with randomized control group design*. The subject of the study were 21 male Balb/c mice and 10 weeks old, 15-20 grams. They were divided into 3 groups: K group received standart diet; P1 group received 45 minutes steamed lompong extract before infected by *Listeria monocytogenes* and P2 group received 45 minutes steamed lompong extract after infected by *Listeria monocytogenes*. K, P1, and P2 groups induced by *Listeria monocytogenes* on the fourth day. The data were analyzed by *independent t-test*.

Result: There was significant difference of phagocytic activity between P1-K ($p=0,001$) group but there was no significant difference between P2-K ($p>0,05$) group. There were no significant differences of NO level between P1-K and P2-K groups. There was an increase in the average of phagocytic activity and NO level on before infected group. After infected group only there was increase on the average of phagocytic activity.

Conclusion: 45 minutes steamed lompong extract increases macrophages phagocytic activity and NO level in before infected Balb/c mice group which is as preventive function.

Keywords: Lompong (*Colocasia esculenta L. Shoot*), phagocytic macrophage, nitric oxide

¹ Student of Nutrition Science Medical Faculty Diponegoro University, Semarang

² Lecture of Nutrition Science Medical Faculty Diponegoro University, Semarang

Pengaruh Ekstrak Lompong (*Colocasia esculenta L. Shoot*) 45 Menit Pengukusan terhadap Aktivitas Fagositosis dan Kadar NO (Nitrit Oksida) Mencit Balb/c Sebelum dan Sesudah Terinfeksi *Listeria monocytogenes*

Mubayinah¹, Hesti Murwani Rahayuningsih²

ABSTRAK

Latar belakang: Batang dan daun lompong (*Colocasia esculenta l. shoot*) dapat dikonsumsi sebagai sayuran. Ekstrak lompong mengandung senyawa flavonoid, saponin, tanin, dan triterpenoid. Kandungan flavonoids dapat meningkatkan respon imun selluler. Respon imun dapat dilihat dari aktivitas fagositosis dan kadar NO (Nitrit Oksida).

Tujuan: Menganalisis pengaruh ekstrak lompong 45 menit pengukusan sebanyak 0,13mg/20gBB terhadap aktivitas fagositosis dan kadar NO makrofag sebelum dan sesudah terinfeksi *Listeria monocytogenes* 10⁵ CFU.

Metoda: Jenis penelitian *true experimental* dengan *the post test with randomized control group design*. Sampel penelitian 21 ekor mencit Balb/c jantan dan berumur 10 minggu dengan berat badan 15-20 gram. Mencit dibagi menjadi 3 kelompok yaitu kelompok K mendapatkan pakan standar; kelompok P1 mendapatkan ekstrak lompong 45 menit pengukusan sebelum diinfeksi *Listeria monocytogenes* dan kelompok P2 mendapatkan ekstrak lompong 45 menit pengukusan setelah diinfeksi *Listeria monocytogenes*. Kelompok K, P1, dan P2 diinduksi *Listeria monocytogenes* pada hari keempat. Uji beda menggunakan uji *independent t test*.

Hasil: Terdapat perbedaan aktivitas fagositosis yang signifikan antara kelompok P1-K ($p=0,001$) tetapi tidak terdapat perbedaan antara kelompok P2-K ($p>0,05$). Tidak ada perbedaan yang signifikan kadar NO antara kelompok P1-K dan P2-K. Terdapat peningkatan rerata indeks fagositosis dan kadar NO pada kelompok perlakuan sebelum diinfeksi. Kelompok perlakuan setelah diinfeksi hanya terdapat peningkatan rerata indeks fagositosis.

Simpulan: Ekstrak lompong 45 menit pengukusan dapat meningkatkan rerata indeks fagositosis dan kadar NO makrofag pada mencit Balb/c kelompok perlakuan sebelum diinfeksi yang berfungsi sebagai preventif.

Kata Kunci: Lompong (*Colocasia esculenta l. shoot*), fagositosis makrofag, Nitrit Oksida

¹Mahasiswa, Program Studi Ilmu Gizi Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro Semarang.

²Dosen, Program Studi Ilmu Gizi Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro Semarang

PENDAHULUAN

Lompong (*Colocasia esculenta* L. Schoot) merupakan tanaman yang dapat dikonsumsi sebagai makanan pokok karena umbi yang dihasilkan, daun dan batang yang dapat digunakan sebagai sayuran. Lompong termasuk dalam *family Araceae*.¹ Di Indonesia, lompong dapat dijumpai hampir di seluruh kepulauan baik tumbuh liar maupun dibudidayakan.²

Kandungan senyawa aktif yang ada dalam ekstrak daun lompong adalah alkaloid, saponin, tanin, flavonoid dan polifenol. Flavonoid yang ada di ekstrak daun lompong antara lain orientin, isoorientin, isovitexin, vicienin-2, orientin 7-O-glukosida, isovitexin 3-O-glukosida, vitexin X-Oglukosida, leteolin 7-O-glukosida. Ekstrak daun lompong juga menunjukkan senyawa anthosianin seperti sianidin-3-glukosida, pelargonidin-3-glukosida dan sianidin-3-rhamnosida yang memiliki aktifitas sebagai antioksidan.³

Lompong biasanya dikonsumsi setelah mengalami proses pengukusan, perebusan, penggorengan, *blanching*, dan *pressure cooking*. Proses pemasakan efektif untuk meningkatkan penyerapan zat gizi dan mengurangi kadar oksalat.⁴ Kadar oksalat ini dapat menyebabkan gatal-gatal dan iritasi pada kulit setelah dikonsumsi.^{1,4} Proses perebusan pada suhu 90°C selama 45 menit dapat mereduksi kalsium oksalat rata-rata 70%.⁵ Penelitian ini menggunakan proses pengukusan daripada proses perebusan karena untuk meminimalkan zat gizi yang hilang saat proses pemasakan.⁵

Ekstraksi dilakukan setelah lompong dikukus yang bertujuan untuk memperoleh zat aktif dari sari serbuk lompong. Proses ekstraksi menggunakan metode sokletasi dengan pelarut etanol.⁶ Etanol digunakan sebagai pelarut polar yang dapat melarutkan senyawa yang bersifat polar seperti flavonoid.⁷

Kandungan senyawa flavonoid yang ada dalam lompong dapat meningkatkan respon imun. Respon imun tubuh dapat dilihat dari aktivitas makrofag yang termasuk sistem seluler dan produksi Nitrit Oksida (NO) sebelum atau setelah infeksi. Infeksi dalam tubuh dapat disebabkan karena bakteri, jamur, dan virus.⁸

Bakteri yang digunakan untuk merespon imun seluler alamiah adalah bakteri intraseluler.⁹ *Listeria monocytogenes* merupakan bakteri intraseluler yang biasanya digunakan untuk mengetahui respon imun seluler.^{9,10} *Listeria monocytogenes* dapat hidup di dalam makrofag dan dapat menghindari mekanisme bakterisidal makrofag.¹⁰ Bakteri intraseluler menstimulasi makrofag mensekresikan IL-12 yang mengaktifkan sel *Natural Killer* (NK), menstimulasi perkembangan sel Th-1 dan mengaktifasi sel T CD8⁺. Ketiga sel yang teraktifkan tersebut mensekresikan *interferon gamma* (IFN- γ) yang akan mengaktifkan makrofag sehingga makrofag tersebut dapat membunuh bakteri intraseluler.⁹

Kemampuan makrofag dalam membunuh bakteri tergantung pada senyawa *oxygen dependent* (*hydrogen peroxidase, singlet oxygen, hydroxy radicals*) dan senyawa *oxygen independent* (*lisosome, lactoferin, cationic protein*). Makrofag juga bertanggung jawab terhadap produksi NO.⁹ Produksi nitrit oksida diawali dari terpaparnya makrofag oleh lipopolisakarida dari bakteri sehingga jalur produksi *Reactive Nitrogen Intermediat* (RNI) terinduksi. Senyawa RNI yang dihasilkan melalui jalur produksi tersebut dapat merubah senyawa-senyawa amin menjadi bentuk *N-nitroso compounds* (NOC) yang bersifat sitotoksik. Meningkatnya kadar NO makrofag menunjukkan adanya peningkatan aktivitas makrofag dalam proses *killing* bakteri intraseluler.⁸

Konsumsi sayur lompong untuk manusia dewasa dengan berat badan 70 kg yaitu sekitar 150 g/hari yang digunakan sebagai dasar dosis pemberian ekstrak lompong untuk mencit dengan berat badan 20 gram. Dosis tersebut dikonversikan dengan dosis untuk mencit sehingga dosis pemberian ekstrak lompong sebesar 13mg/20gBB/hari.

Berdasarkan uraian di atas, peneliti ingin membuktikan potensi ekstrak lompong dengan pengukusan 45 menit dalam meningkatkan respon imun yang dilihat dari aktivitas fagositosis dan kadar NO makrofag sebelum dan sesudah diinduksi *Listeria monocytogenes*. Pemberian perlakuan ekstrak lompong 45 menit sebelum dan sesudah terinfeksi bertujuan untuk mengetahui kemampuan ekstrak lompong sebagai upaya preventif dan kuratif bagi penderita infeksi yang diakibatkan oleh bakteri intraseluler.

METODE PENELITIAN

Jenis penelitian ini merupakan penelitian *true experimental* dengan rancangan *the post test with randomized control group design*. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT), Universitas Gajah Mada. Pelaksanaan penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro melalui terbitnya *Ethical Clearance* (EC).

Subjek penelitian ini adalah mencit galur balb/c jantan dengan berat badan 20-30 gram pada usia 10 minggu dan dalam keadaan sehat yang diperoleh dari laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Negeri Semarang. Kriteria eksklusi penelitian ini adalah mencit sakit selama penelitian, mengalami perubahan perilaku (tidak lincah, tidak makan), dan tikus mati selama perlakuan. Pemilihan galur balb/c karena galur ini pada umur 6-12 minggu telah dilaporkan dapat menimbulkan respon imun selluler apabila mencit diinduksi dengan bakteri *Listeria monocytogenes*.

Berdasarkan *Research Guidelines for Evaluation the Safety and Efficacy of Herbal Medicines dari WHO* besar sampel untuk setiap kelompok minimal 5 ekor.¹¹ Kemudian untuk mengantisipasi adanya *drop out*, maka masing-masing kelompok terdiri dari 7 ekor. Total sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 21 ekor. Sampel diambil sesuai dengan kriteria inklusi dan dilakukan secara acak. Sampel dikelompokkan menjadi 3 kelompok yaitu kelompok kontrol (K), kelompok perlakuan 1 (P1) dan kelompok perlakuan 2 (P2). Kelompok K digunakan sebagai pembanding sehingga mencit hanya mendapatkan pakan standar dan diinduksi *Listeria monocytogenes* dosis 1×10^5 CFU. Kelompok P1, mencit mendapatkan ekstrak lompong 45 menit pengukusan dosis 13 mg/20gBB sebelum diinduksi *Listeria monocytogenes* dosis 1×10^5 CFU. Kelompok P2, mencit mendapatkan ekstrak lompong 45 menit pengukusan dosis 13 mg/20gBB setelah diinduksi *Listeria monocytogenes* dosis 1×10^5 CFU.

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pemberian ekstrak lompong (*Colocasia esculenta L. Schoot*) 45 menit pengukusan dengan dosis 13 mg/20gBB

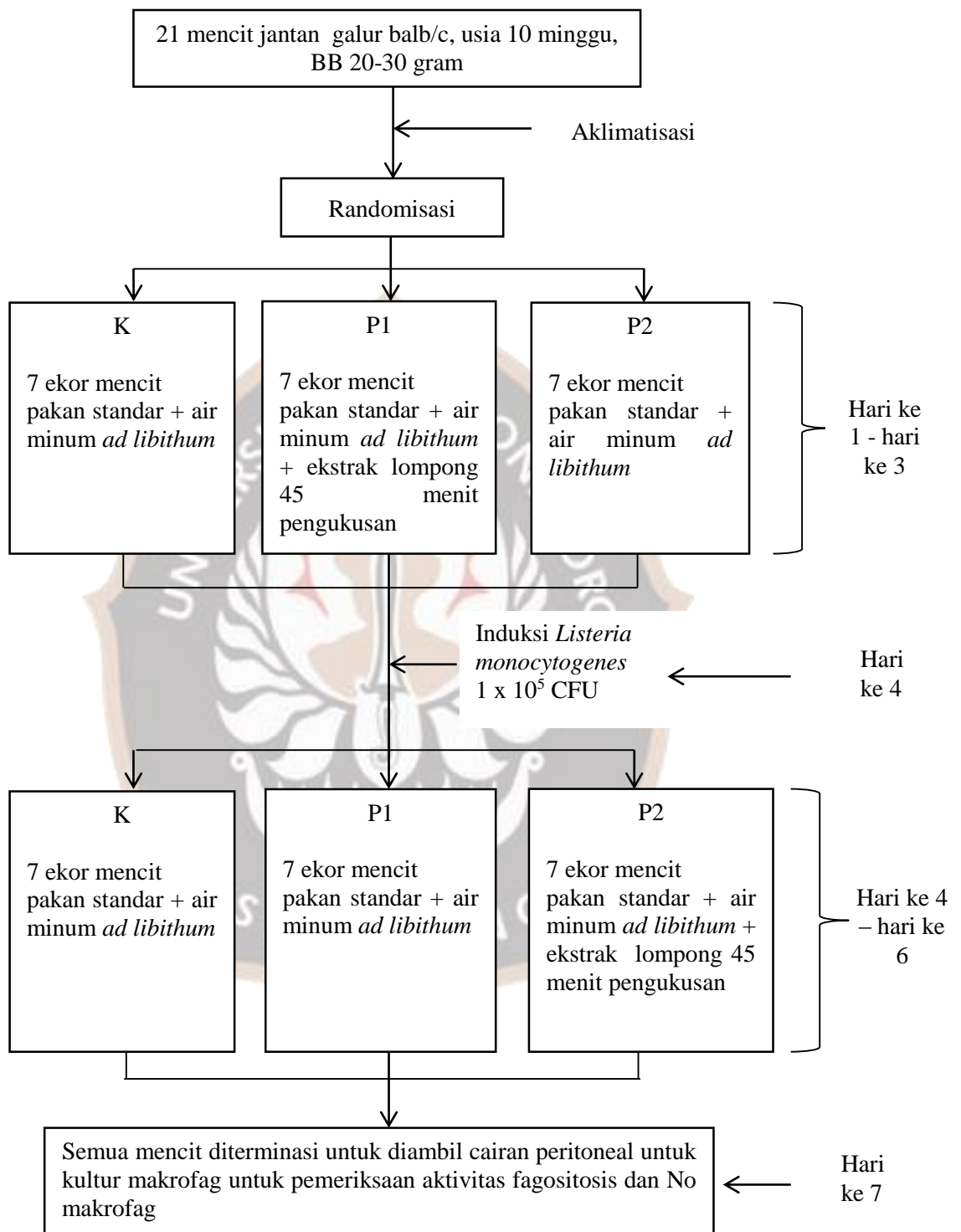
dan induksi *Listeria monocytogenes* dosis 1×10^5 CFU. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas fagositosis dan kadar Nitrit Oksida (NO) makrofag.

Pembuatan ekstrak lompong 45 menit pengukusan dilakukan di laboratorium Kimia Organik Fakultas MIPA Universitas Diponegoro dengan metode ekstraksi sokletasi dengan menggunakan pelarut etanol.

Prosedur penelitian dalam penelitian ini adalah mencit jantan balb/c yang berumur 10 minggu dengan berat badan 20-30 gram sebanyak 21 ekor diadaptasikan selama 7 hari di laboratorium Parasitologi Universitas Diponegoro. Selama masa adaptasi mencit hanya mendapatkan pakan standar dan minum yang sama *ad libitum*. Pemberian ekstrak lompong 45 menit pengukusan diberikan dengan cara sonde pada hari pertama sampai hari ketiga untuk kelompok P1 dan hari keempat sampai hari keenam untuk kelompok P2. Penginduksian bakteri *Listeria monocytogenes* dilakukan secara intraperitoneal inokulum dengan dosis 10^5 CFU. Setelah inokulasi bakteri hari ketujuh selama perlakuan, semua mencit diterminasi untuk diambil cairan peritoneal untuk pemeriksaan aktivitas fagositosis dan NO makrofag.

Pemeriksaan aktivitas fagositosis makrofag dinyatakan dengan indeks fagositik yaitu berupa presentase sel yang memfagosit latex yang dihitung pada 100 sel makrofag kali jumlah rata-rata partikel latex pada sel makrofag yang positif.¹² Sedangkan kadar NO adalah jumlah NO yang terdapat pada supernatan kultur makrofag peritoneum yang diukur dengan menggunakan Metode Griess. Kemudian hasilnya dibaca absorbansinya menggunakan *automated microplate reader (Elisa reader)* pada panjang gelombang 550 nm.¹³

Data yang telah terkumpul dianalisis dengan uji statistik. Semua data dilakukan uji normalitas terlebih dahulu dengan *Shaphiro-Wilks* karena jumlah sampel keseluruhan 21 ekor. Data berdistribusi normal, maka data dianalisis dengan *independent t test*.



Gambar 1. Kerangka Kerja Penelitian

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan uji normalitas diperoleh nilai $p > 0,05$ maka dapat disimpulkan bahwa data berdistribusi normal. Berikut ini merupakan hasil rerata indeks fagositosis dan kadar NO makrofag:

Tabel 1. Hasil Rerata Indeks Fagositosis dan Kadar NO Makrofag

Kelompok	n	Rerata	
		Indeks Fagositosis	Kadar NO
P1	7	3,42 ± 0,54 ^{a,b}	109,71 ± 40,7 ^c
P2	7	2,51 ± 0,56	101,71 ± 45,03
K	7	2,43 ± 0,24	106,29 ± 54,39

Keterangan:

- a = terdapat perbedaan bermakna antara kelompok sebelum diinfeksi *Listeria monocytogenes* dengan kelompok kontrol
- b = rerata indeks fagositosis tertinggi pada kelompok sebelum diinfeksi *Listeria monocytogenes*
- c = rerata kadar NO tertinggi pada kelompok perlakuan sebelum diinfeksi *Listeria monocytogenes*

Tabel 1 menunjukkan bahwa rerata indeks fagositosis kelompok perlakuan sebelum diinfeksi *Listeria monocytogenes* memiliki rerata lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok perlakuan setelah diinfeksi dan kelompok kontrol yaitu $3,42 \pm 0,54$. Kelompok perlakuan kontrol memiliki rerata indeks fagositosis paling rendah yaitu $2,43 \pm 0,24$.

Rerata kadar NO pada tabel 1 menunjukkan bahwa rerata kadar NO tertinggi pada kelompok perlakuan sebelum diinfeksi jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan setelah diinfeksi dan kelompok kontrol yaitu $109,71 \pm 54,39 \mu\text{M}$. Rerata kadar NO kelompok perlakuan setelah diinfeksi memiliki rerata kadar NO paling rendah yaitu $101,71 \pm 45,03 \mu\text{M}$.

Aktivitas Fagositosis Makrofag

Kelompok perlakuan sebelum diinfeksi dengan kelompok kontrol menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna yaitu nilai $p = 0,001$ ($p < 0,05$). Tidak terdapat perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan setelah diinfeksi dengan kelompok kontrol yaitu nilai $p = 0,725$ ($p > 0,05$).

Peningkatkan aktivitas fagositosis pada kelompok perlakuan sebelum diinfeksi dengan kelompok kontrol sesuai dengan hipotesis penelitian. Hal ini dikarenakan ekstrak lompong 45 menit pengukusan mengandung senyawa alkaloid,

saponin, tanin, flavonoid dan polifenol. Flavonoid dalam ekstrak lompong 45 menit pengukusan bermanfaat sebagai antiseptik, antikanker dan antioksidan.¹⁴ Senyawa flavonoid juga dapat meningkatkan respon imun.

Mencit Balb/c yang diinfeksi *Listeria monocytogenes* juga mempunyai usaha untuk pertahanan tubuh dengan mengaktifkan sel *Natural Killer* (NK) untuk memproduksi *Interferon- γ* (IFN- γ) sehingga dapat meningkatkan aktifitas bakterisidal makrofag dalam melawan bakteri.¹⁵ Pemberian ekstrak lompong 45 menit pengukusan mampu mengaktifasi makrofag. Flavonoid meningkatkan aktivitas IL-12 yang mengaktifkan sel NK, menstimulasi perkembangan sel Th-1 dan mengaktifkan sel T CD8⁺. Ketiga sel yang teraktivasi tersebut akan mempengaruhi *Spesific Makrofag Activating factor* (SMAF) yaitu molekul-molekul termasuk IFN- γ yang dapat mengaktifkan makrofag sehingga makrofag mengalami peningkatan metabolik, motilitas dan aktivitas fagositosis dalam membunuh bakteri atau mikroorganisme patogen lainnya.¹⁶

Indeks fagositosis makrofag antara kelompok perlakuan setelah diinfeksi dengan kelompok kontrol tidak mengalami peningkatan secara statistik, tetapi jika dibandingkan dari rerata indeks fagositosis masing-masing kelompok maka antara kelompok perlakuan setelah diinfeksi dengan kelompok kontrol mengalami kenaikan. Hal ini dikarenakan pemberian ekstrak lompong 45 menit setelah diinfeksi bakteri *Listeria monocytogenes* kurang efektif jika hanya diberikan selama 3 hari atau pada hari keempat sampai hari keenam perlakuan setelah diinduksi *Listeria monocytogenes*. Selain mempunyai efek sebagai imunostimulan, flavonoid juga mempunyai efek sebagai immunosupresan yang dapat memungkinkan terjadinya hambatan aktivitas fagositosis makrofag.¹⁶

Kadar Nitrit Oksida

Kelompok perlakuan sebelum diinfeksi dengan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan setelah diinfeksi dengan kelompok kontrol menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna peningkatan kadar NO.

Pemberian ekstrak lompong 45 menit pengukusan tidak meningkatkan kadar NO secara signifikan, hal ini tidak sesuai dengan hipotesis penelitian.

Perlawanan sistem imun teraktivasi karena bakteri intraselluler. Makrofag dan limfosit T saling bekerja sama untuk membunuh *Listeria monocytogenes*. Makrofag akan memfagosit bakteri dan limfosit T berdiferensiasi menjadi CD4 dan CD8. CD4 berdiferensiasi menjadi Th-1 yang kemudian menghasilkan sitokin IFN- γ . Sitokin tersebut akan mengaktifkan makrofag untuk menghasilkan senyawa salah satunya NO yang berperan membunuh bakteri.⁸

Hubungan antara Indeks Fagositosis dan Kadar Nitrit Oksida (NO)

Pemberian ekstrak lompong 45 menit pengukusan dengan perlakuan sebelum diinfeksi memiliki rerata indeks fagositosis dan kadar NO makrofag lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok perlakuan setelah diinfeksi dan kelompok kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak lompong 45 menit pengukusan lebih efektif ditujukan sebagai usaha preventif.

Senyawa fenolik yang ada di ekstrak lompong 45 menit pengukusan dapat mengaktifkan makrofag karena dapat menstimulasi pelepasan IL-12 dan IFN- γ . Makrofag yang teraktivasi mengalami peningkatan aktivitas fagosit.¹⁷ NO adalah produk yang dihasilkan oleh makrofag teraktivasi untuk membunuh patogen intrasel melalui jalur *Reactive Nitric Intermediate* (RNI). Peningkatan aktivitas fagosit makrofag juga akan mempengaruhi peningkatan kadar NO. Stimulasi makrofag oleh IFN- γ , TNF- α , *Interleukin*, *Lipopolysaccharide* (LPS) akan memacu transkripsi gen yang menyebabkan peningkatan kadar *Nitric Oxide Synthase* (NOS). Sekresi NO akan meningkat mengikuti peningkatan NOS.¹⁸ Hal ini didukung dari hasil analisis uji kuantitatif ekstrak lompong 45 menit pengukusan yaitu phenol 0,222%, tanin 0,310%, dan flavonoid 0,140%.

Hasil analisis uji kuantitatif, ekstrak lompong (*Colocasia esculenta* L. *Schoot*) mentah, 30 menit pengukusan dan 45 menit pengukusan sebagai berikut:

Tabel 2. Hasil Uji Kuantitatif Ekstrak Lompong Mentah, 30 menit Pengukusan dan 45 Menit Pengukusan

Sampel	Hasil Analisa		
	Phenol (%)	Tanin (%)	Flavonoid (%)
Mentah ²⁰	0,198	0,261	0,088
30 menit pengukusan ²¹	0,219	0,293	0,105
45 menit pengukusan	0,222	0,310	0,140

Berdasarkan analisis uji kuantitatif, ekstrak lompong 45 menit pengukusan mempunyai kandungan fitokimia (phenol, tanin, dan flavonoid) lebih tinggi jika dibandingkan dengan ekstrak lompong mentah dan ekstrak lompong 30 menit pengukusan. Proses pengukusan mempengaruhi nilai kandungan fitokimia ekstrak lompong, semakin lama pengukusan semakin tinggi nilai kandungan fitokimia.²²

Ekstrak lompong 30 menit pengukusan mempunyai kandungan fitokimia lebih tinggi daripada ekstrak lompong mentah. Proses pengukusan menyebabkan serat-serat yang terdapat pada ekstrak lompong menjadi lunak sehingga kelarutan komponen fitokimia juga berbeda. Hal ini menyebabkan serat-serat yang lebih lunak memudahkan komponen bioaktif yang terdapat pada ekstrak lompong mudah larut pada pelarutnya.²²

Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan, ekstrak lompong 45 menit pengukusan lebih efektif digunakan sebagai tindakan preventif yaitu perlakuan sebelum diinfeksi dengan *Listeria monocytogenes*. Ekstrak lompong mentah lebih efektif digunakan sebagai tindakan kuratif yaitu perlakuan setelah diinfeksi dengan *Listeria monocytogenes*.²⁰ Sedangkan ekstrak lompong 30 menit pengukusan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut.²¹

SIMPULAN

Pemberian ekstrak lompong (*Colocasia esculenta* L. Schoot) 45 menit pengukusan lebih efektif ditujukan sebagai usaha preventif yaitu pemberian ekstrak lompong 45 menit pengukusan sebelum diinfeksi dengan *Listeria monocytogenes* dalam meningkatkan aktivitas fagositosis dan kadar NO makrofag mencit Balb/c dibandingkan untuk kuratif yang diberikan setelah diinfeksi *Listeria monocytogenes*.

SARAN

Pemberian ekstrak lompong (*Colocasia esculenta* L. Schoot) 45 menit pengukusan dapat memberikan solusi alternatif sebagai tindakan preventif bagi penderita infeksi yang diakibatkan oleh bakteri intraselluler.

UCAPAN TERIMAKASIH

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan kemudahan yang telah diberikan-Nya. Ucapan terimakasih penulis ucapkan kepada pembimbing dr. Hesti Murwani Rahayuningsih, M.Si, Med atas bimbingan materi, para reviewer atas masukan untuk penelitian ini hingga dapat terlaksana sampai akhir, selain itu ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada orang tua dan teman-teman yang telah memberi dukungan dan motivasi dalam penyusunan karya tulis ilmiah ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Savage GP, Mårtensson L, Sedcole JR. Composition Of Oxalates In Baked Taro (*Colocasia Esculenta* Var. *Schott*) Leaves Cooked Alone Or With Additions Of Cows Milk Or Coconut Milk. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2009;22(1):83–86.
Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889157508001397>.
2. Amiruddin. Perubahan Sifat Fisik Talas (*Colocasia esculenta* L. *Schoot*) Selama Pengeringan Lapis Tipis [Skripsi]. Makassar: Universitas Hasanuddin. 2013.
3. Halligudi N. Pharmacological Potential of Calocasia an Edible Plant. *Journal of drug Discovery and Therapeutics*. 2013;1(2):5–9.
4. Lewu MN, Adebola PO, Afolayan AJ. Effect Of Cooking On The Proximate Composition Of The Leaves Of Some Accessions Of *Colocasia Esculenta* (L.) *Schott* In Kwazulu-Natal Province Of South Africa. *African Journal of Biotechnology*. 2009;8(8):1619–1622.
5. Chotimah S, Fajarini DT. Reduksi Kalsium Oksalat dengan Perebusan Menggunakan Larutan NaCl dan Penepungan untuk Meningkatkan Kualitas Sente (*Alocasia marcorrhiza*) sebagai Bahan Pangan. *Jurnal Teknologi Kimia dan Industri*. 2013;2(2):76–83.
6. Istiqomah. Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi dan Sokletasi terhadap Kadar Piperin Buah Cabe Jawa (*Piperis retrofracti fructus*) [Skripsi]. Jakarta: Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah. 2013.

7. Sagala RJ. Uji Imunomodulator Kombinasi Ekstrak Etanol Herba Meniran (*Phyllanthus niruri* Linn.), Umbi Keladi Tikus (*Thyphonium flagelliforme*)(L.odd.) Blume, dan Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) terhadap Fagositosis Makrofag secara In Vitro [Skripsi]. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada. 2013.
8. 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]. Semarang: Universitas Diponegoro. 2011.
9. Purnawati RD, Susilaningsih N, Ngestiningsih D. Aktifitas Fagositosis dan Produksi Nitrit Oksida Makrofag dari Mencit yang Diimunisasi *Listeria Monocytogenes* pada Pemberian *Ganoderma Lucidum*. Semarang: Universitas Diponegoro. 2002.
10. Munawaroh F, Sudarsono, Yuswanto. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanolik Daun Sembung (*Blumeae Folium*) terhadap Fagositosis Makrofag pada Mencit Jantan yang Diinfeksi dengan *Listeria monocytogenes*. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada.
11. World Health Organization. Research Guidelines Evaluating the Safety and Efficacy Herbal Medicines. 1993.
12. 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.
13. Dietert RR, Hotchkiss JH, Austic RE, Sung Y. Production of Reactive Nitrogen Intermediates by Macrophages. In: Methods in Immunotoxicology. Volume 2. editor : Burleson GR, Dean JH, Munson AE. A John Wilye Liss & sons Inc Publ. New York. 1995; 99-1117
14. Putri D. Pengaruh Pemberian Ekstrak Lidah Buaya (*Aloe vera*) terhadap Proliferasi Limfosit pada Mencit Balb/c yang Diinfeksi *Salmonella Typhimurium* [Artikel Penelitian]. Semarang: Universitas Diponegoro. 2007.

15. Damayanti. Pengaruh Ekstrak *Hedyotis corymbosa* terhadap Aktivitas Fagositosis Makrofag Mencit Balb/c yang Diinfeksi *Salmonella typhimurium* [Artikel Penelitian]. Semarang: Universitas Diponegoro. 2005.
16. Dyah AN. Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah *Phaleria papuana* terhadap Aktivitas Fagositosis Makrofag Mencit Balb/c [Artikel Penelitian]. Semarang: Universitas Diponegoro. 2006.
17. Surati. Pengaruh Ekstrak Daun Salam (*Syzygium Polyanthum*) terhadap Aktivitas Makrofag pada Mencit Balb/c yang Diinfeksi *Salmonella Typhimurium* [Tesis]. Semarang: Universitas Diponegoro. 2012
18. Adeputri TI. Pengaruh Pemberian Polifenol Teh Hijau Terhadap Sekresi Nitrit Oksida (NO) Sel Fagosit. [Proposal Penelitian]. Semarang: Universitas Diponegoro. 2006
19. Lewis JG. Isolation of Alveolar Macrophages, Peritoneal Macrophages, and Kupffer Cells. In: Methods in Immunotoxicology. Vol 2. Editor: Bureson GR, Dea n JH, Munson AE. New York. A John Wilye Liss & sons Inc Publ. 1995;15-26
20. Sulistiani RP. Pengaruh Ekstrak Lompong Mentah (*Colocasia esculenta L. Schoot*) terhadap Aktivitas Fagositosis dan Kadar NO (Nitrit Oksida) Mencit Balb/c Sebelum dan Setelah Terinfeksi *Listeria monocytogenes* [Skripsi]. Semarang: Universitas Diponegoro. 2015
21. Sholikhah AR. Pengaruh Ekstrak Lompong (*Colocasia esculenta L. Schoot*) 30 Menit Pengukusan terhadap Aktivitas Fagositosis dan Kadar NO (Nitrit Oksida) Mencit Balb/c Sebelum dan Setelah Terinfeksi *Listeria monocytogenes* [Skripsi]. Semarang: Universitas Diponegoro. 2015
22. Nurjanah, Agoes MJ, Roni N, Marisa P, Tri KAS. Perubahan Komposisi Kimia, Aktivitas Antioksidan, Vitamin C dan Mineral Tanaman Genjer (*Limnocharis flava*) Akibat Pengukusan. September 2014;3(3)185-195

LAMPIRAN

Data Indeks Fagositosis dan Kadar NO

Sampel		Indeks Fagositosis	Kadar NO
P1	P1 ₁	2,89	101
	P1 ₂	2,79	145
	P1 ₃	3,39	78
	P1 ₄	4,34	139
	P1 ₅	3,15	60
	P1 ₆	3,59	78
	P1 ₇	3,80	167
P2	P2 ₁	2,24	83
	P2 ₂	3,19	51
	P2 ₃	2,82	115
	P2 ₄	3,19	167
	P2 ₅	1,83	56
	P2 ₆	2,37	152
	P2 ₇	1,96	88
K	K ₁	2,75	133
	K ₂	2,50	65
	K ₃	2,32	52
	K ₄	2,38	63
	K ₅	2,05	104
	K ₆	2,34	119
	K ₇	2,68	208

Berat Badan Mencit Balb/c

Sampel		Berat Badan (g)
P1	P1 ₁	26,2
	P1 ₂	23,7
	P1 ₃	24,9
	P1 ₄	26,8
	P1 ₅	24,1
	P1 ₆	23,7
	P1 ₇	26,5
P2	P2 ₁	23,8
	P2 ₂	24,8
	P2 ₃	24,9
	P2 ₄	25,3
	P2 ₅	25,5
	P2 ₆	23,7
	P2 ₇	21,4
K	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

LAMPIRAN

Aktivitas Fagositosis Makrofag

Uji Normalitas Indeks Fagositosis Makrofag

Tests of Normality

	sampel	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
fagositosis	P1	,123	7	,200*	,959	7	,814
	P2	,173	7	,200*	,903	7	,347
	K	,176	7	,200*	,957	7	,794

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

a. Lilliefors Significance Correction

Uji Perbedaan Kelompok P1 terhadap Kelompok K

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	Equal variances assumed	3,636	,081	4,419	12	,001	,99000	,22404	,50186	1,47814
	Equal variances not assumed			4,419	8,203	,002	,99000	,22404	,47557	1,50443

Uji Perbedaan Kelompok P2 terhadap Kelompok K

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	Equal variances assumed	8,621	,012	,361	12	,725	,08286	,22965	-,41751	,58322
	Equal variances not assumed			,361	8,085	,727	,08286	,22965	-,44575	,61146

Uji Perbedaan 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	Equal variances assumed	,147	,708	3,077	12	,010	,90714	,29477	,26489	1,54940
	Equal variances not assumed			3,077	11,990	,010	,90714	,29477	,26482	1,54946

Kadar Nitrit Oksida (NO)

Uji Normalitas Kadar Nitrit Oksida (NO)

Tests of Normality

	sampel	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
kadar_NO	P1	,211	7	,200*	,919	7	,460
	P2	,191	7	,200*	,921	7	,481
	K	,205	7	,200*	,895	7	,301

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

a. Lilliefors Significance Correction

Uji Perbedaan Kelompok P1 terhadap Kelompok K

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
kadar_NO	Equal variances assumed	,163	,694	,134	12	,896	3,42857	25,67881	-52,52075	59,37790
	Equal variances not assumed			,134	11,116	,896	3,42857	25,67881	-53,01798	59,87512

SEMARANG

Uji Perbedaan Kelompok P2 terhadap Kelompok K

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
kadar_NO	Equal variances assumed	,057	,815	-,171	12	,867	-4,57143	26,68996	-62,72385	53,58099
	Equal variances not assumed			-,171	11,596	,867	-4,57143	26,68996	-62,94931	53,80645

Uji Perbedaan 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
kadar_NO	Equal variances assumed	,041	,844	,349	12	,733	8,00000	22,94448	-41,99172	57,99172
	Equal variances not assumed			,349	11,880	,733	8,00000	22,94448	-42,04787	58,04787

LAMPIRAN

Prosedur Isolasi Makrofag Peritoneal Mencit¹⁹

Untuk mendapatkan $1-3 \times 10^6$ sel/ml, dibutuhkan alat dan bahan sebagai berikut:

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 pentobarbitol atau CO_2 , 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 tdk 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.

LAMPIRAN

Prosedur Pengukuran Produksi NO Makrofag¹³

Bahan :

Reagen

1. Reagen 1: N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride = NED (Sigma): 0,1g dilarutkan dalam 100 ml distilled water
2. 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 M 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.

