

Uji Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Etanol, Etil Asetat, dan N-heksan Tangkai Daun Kemumu (*Colocasia gigantea* Hook.f) secara in vitro terhadap Sel Makrofag Peritoneum

Devahimer Harsep Rosi¹, Abrar Hafidz Qalbi^{1*}, Tika Afriani¹

Artikel Penelitian

Abstract: Kemumu leaf stalks (*Colocasia Gigantea* Hook.F) are a plant that has many benefits for society, one of which is anti-inflammatory. Inflammation is process in the body to respond to infection or tissue damage. This study aims to test the anti-inflammatory effectiveness of ethanol extract, n-hexane, and ethyl acetate of kemumu leaf stalks in vitro. Kemumu leaf stalks contain flavonoids, alkaloid and tannin which have anti-inflammatory properties. Anti-inflammatory effectiveness testing was carried out on peritoneal macrophage cells to determine the inhibition of NO production in LPS-stimulated peritoneal macrophage cells by quantifying nitrite accumulation in the culture medium using Griess reagent. This research is an experimental study with 5 dose treatments for each extract with 3 replications. The parameters observed included NO production and the percentage of peritoneal macrophage cell inhibition. The results of statistical tests using One Way Anova showed a significant difference in NO levels between the sample group given the extract and the control sample ($p=0.000$). From the results of the percentage inhibition of NO production in peritoneal macrophage cells, it shows that ethanol extract of kemumu leaf stalks with concentrations of 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$ has the best anti-inflammatory effect, namely with NO production of 4.67 and 1.44 $\mu\text{g/ml}$ respectively, and with respective inhibition 80.32% and 89.01% respectively.

Keywords: kemumu, peritoneal macrophage cell, anti-inflammatory, Griess assay

Abstrak: Tangkai daun kemumu (*Colocasia Gigantea* Hook.F) merupakan tanaman yang memiliki banyak manfaat pada masyarakat, salah satunya sebagai antiinflamasi. Inflamasi merupakan proses dalam tubuh untuk merespon infeksi atau kerusakan jaringan. Penelitian ini bertujuan untuk menguji efektivitas antiinflamasi ekstrak etanol, n-heksan, dan etil asetat tangkai daun kemumu secara in vitro. Tangkai daun kemumu mengandung flavonoid, alkaloid, dan tannin yang berkhasiat sebagai antiinflamasi. Pengujian efektivitas antiinflamasi dilakukan pada sel makrofag peritoneum untuk mengetahui penghambatan produksi NO pada sel makrofag peritoneum yang terstimulasi LPS diuji dengan kuantifikasi akumulasi nitrit dalam medium kultur menggunakan reagen Griess. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan 5 perlakuan dosis pada setiap ekstrak dengan 3 kali replikasi. Parameter yang diamati meliputi produksi NO yang dihasilkan dan persentase inhibisi sel makrofag peritoneum. Hasil uji statistik menggunakan One Way Anova terlihat perbedaan kadar NO yang signifikan antara kelompok sampel yang diberi ekstrak dengan sampel kontrol ($p=0,000$). Dari hasil persentase inhibisi produksi NO sel makrofag peritoneum menunjukkan bahwa ekstrak etanol tangkai daun kemumu dengan konsentrasi 50 dan 100 $\mu\text{g/ml}$ memiliki efek antiinflamasi paling baik, yaitu dengan produksi NO masing-masing adalah 4,67 dan 1,44 $\mu\text{g/ml}$, dan dengan penghambatan masing-masing 80,32% dan 89,01%.

Kata kunci: kemumu, sel makrofag peritoneum, antiinflamasi, Griess Assay

¹ Faculty of Health,
Universitas Mohammad
Natsir Bukittinggi, Jl. Tan
Malaka Cangang Kayu
Ramang, Bukittinggi,
Indonesia

Korespondensi:

Abrar Hafidz Qalbi
abrarhafidzqalbi@gmail.com



Creative Commons Attribution-NonCommercial-
Share Alike 4.0 International License

Pendahuluan

Inflamasi merupakan respon sistem imun terhadap rangsangan berbahaya seperti patogen, sel rusak, senyawa toksik, atau radiasi. Respon peradangan ditandai dengan kondisi seperti rubor (kemerahan), kalor (panas), dolor (nyeri), tumor (bengkak), dan disfungsi. Pengobatan peradangan mencakup dua aspek, yaitu menghilangkan rasa sakit dan menghentikan proses kerusakan jaringan (1).

Masyarakat Indonesia secara turun temurun telah lama mengenal dan menggunakan berbagai tanaman berkhasiat untuk menanggulangi masalah kesehatan dalam kehidupan sehari-hari. Salah satu tanaman berkhasiat obat adalah kemumu (*Colocasia gigantea* Hook.f), yang umbinya digunakan sebagai obat untuk meredakan panas dalam, mengurangi masalah perut, menyembuhkan infeksi, dan luka (2).

Hasil penelitian terdahulu telah membuktikan bahwa tangkai daun dari famili *Colocasia* memiliki berbagai senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, tanin dan saponin (3). Metabolit sekunder seperti saponin, flavonoid, dan tanin memiliki efek stabilitas pada membran lisosom dan dapat menstabilkan membran eritrosit sehingga berpengaruh dalam membatasi respon inflamasi (4).

Nitrit oksida dihasilkan oleh beberapa jenis sel yang berbeda, seperti sel endotel dan makrofag. Walaupun pelepasan nitrit oksida oleh sintetase cepat, hal ini penting untuk dilatasi pembuluh darah. Konsentrasi nitrit oksida yang tinggi yang dihasilkan dalam makrofag dapat menghasilkan kerusakan oksidatif. Aktivasi makrofag yang tinggi akan menambah produksi nitrit oksida dan superoksida anion secara simultan (5).

Berdasarkan uraian kemumu mengandung senyawa yang berpotensi sebagai aktivitas antiinflamasi. Sehingga peneliti tertarik untuk melakukan pengujian aktivitas antiinflamasi ekstrak tangkai daun kemumu (*Colocasia gigantea* Hook.f) secara *in vitro* terhadap sel makrofag peritoneum.

Bahan dan Metode

Alat

BSC (Biosafety Cabinet) (SUGOLD), Oven (MEMMERT), Inkubator CO₂ 5% (Thermo Scientific), Microplate (Microplate Reader) (XMark™), Rotary Evaporator (Rotavapor R-300), Mikroskop inverted (Park FX40), Sentrifuge (DLAB), Vortex (Cole Parmer), Blender (Philips), Well plate 96 (Thermo Scientific), dan Mikropipet (Transferpette S).

Bahan

Tangkai daun kemumu, sel makrofag peritoneum, etanol (Brataco), n-heksan (Brataco), etil asetat (Brataco), kloroform (Brataco), ammonia 10% (Surya Esa Perkasa), asam sulfat (Petrokimia Gresik), reagen mayer, magnesium, asam klorida (Brataco), besi III klorida, aquadest, asam asetat anhidrat (Brataco), asam sulfat pekat, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco), penicillin-streptomycin 1% (PenStrep), trypsin, Phosphate-buffered saline (PBS), Reagen LPS (Lipopolysaccharides) dan Griess, pewarna biru Trypan 0,4% dibeli dari Gibco (Invitrogen Corporation, USA), reagen MTT (3-[4,5-dimetilthiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolium bromide), dan Dimetil Sulfoksida (DMSO) (Hsp-Pharma).

Metode

Identifikasi Tanaman

Identifikasi tanaman kemumu (*Colocasia gigantea* Hook.f) dilakukan di Herbarium ANDA Fakultas Biologi Universitas Andalas, Padang, Sumatera Barat.

Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan adalah tangkai daun kemumu (*Colocasia gigantea* Hook.f) sebanyak 40 kg yang didapatkan di Nagari Koto Baru, Kabupaten Agam. Kemudian sampel tersebut dicuci dengan air mengalir agar terhindar dari kontaminan dan dipotong kecil-kecil. Selanjutnya dilakukan pengeringan dengan cara di kering anginkan untuk menghilangkan sebagian air yang ada sehingga mikroba yang dikandungnya tidak dapat tumbuh dan senyawa aktif yang ada di dalam sampel tidak rusak. Kemudian sampel yang sudah kering, dihaluskan menggunakan blender

untuk meningkatkan luas permukaan sampel agar pelarut lebih mudah masuk ke dalam sel dan menarik senyawa aktif yang larut untuk keluar dari dalam sel sehingga mempermudah proses ekstraksi (6).

Ekstraksi Sampel

100 g simplisia diekstraksi menggunakan pelarut etanol, etil asetat, dan n-heksan. Sampel dimasukkan ke dalam bejana maserasi, kemudian direndam dengan pelarut etanol, etil asetat, n-heksan, dengan bejana maserasi yang berbeda. Bejana maserasi ditutup dan disimpan selama 3x24 jam di tempat yang terlindung sinar matahari langsung. Selanjutnya masing-masing ekstrak disaring menggunakan kertas saring dan dipisahkan antara ampas dan filtrat. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental (6).

Uji Fitokimia

Skrining fitokimia pada tangkai daun kemumu dilakukan pemeriksaan secara kualitatif pada sampel segar dan ekstrak.

Tangkai daun kemumu segar ditimbang seberat 4 gram sampel segar dipotong kecil-kecil, dihaluskan dan dimasukkan ke dalam sebuah erlenmeyer 100 mL, dididihkan dengan 25 mL etanol selama 15 menit, saring selagi panas ke dalam erlenmeyer 50 mL dan biarkan seluruh etanol menguap sampai kering. Tambahkan kloroform dan air suling (1:1) sebanyak 5 mL masing-masingnya. Kocok dengan baik, kemudian pindahkan ke dalam sebuah tabung reaksi, biarkan beberapa lama sehingga terbentuk dua lapisan kloroform-air. Lapisan kloroform di bagian bawah digunakan untuk pemeriksaan senyawa terpenoid dan steroid. Sedangkan lapisan air untuk pemeriksaan kandungan flavonoid, fenolik dan saponin. Hal yang sama dilakukan pada ekstrak etanol, etil asetat, dan n-heksan dengan cara langsung ditambahkan kloroform dan aquades pada masing-masing tabung reaksi (7).

Uji Alkaloid

Tangkai daun kemumu segar dirajang kecil-kecil lalu dimasukkan ke dalam lumpang dan digerus, kemudian tambahkan ammonia dan

kloroform. Ekstrak kloroform disaring dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan asam sulfat 2N kemudian dikocok. Lapisan asam dipisahkan ke dalam tabung reaksi lain kemudian ditambahkan beberapa tetes pereaksi Mayer. Terbentuknya endapan atau kabut putih menandakan positif kandungan alkaloid (7).

Uji Flavonoid

Lapisan air sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan asam klorida pekat dan beberapa butir bubuk magnesium, terbentuknya warna orange sampai merah menunjukkan adanya kandungan flavonoid (7).

Uji Fenolik

Lapisan air sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan pereaksi FeCl_3 . Terbentuknya warna hijau tua atau biru sampai ungu menandakan adanya kandungan senyawa fenolik (7).

Uji Saponin

Lapisan air sebanyak 1 mL dikocok kuat dalam sebuah tabung reaksi, terbentuknya busa yang tidak hilang dengan penambahan beberapa tetes HCl pekat menunjukkan adanya saponin. (7).

Uji Steroid dan Terpenoid

Lapisan kloroform diambil dengan pipet tetes dan dimasukkan ke dalam tiga buah lubang plat tetes. Satu lubang sebagai pembanding dan dua lubang lainnya ditambahkan H_2SO_4 pekat kemudian ditambahkan pereaksi Liebermann Burchard (LB). Terbentuknya warna hijau sampai hijau kebiruan menandakan adanya steroid, jika terbentuk warna merah sampai merah keunguan menandakan adanya triterpenoid (7).

Kultur Sel

Kultur sel dilakukan dengan menggunakan teknik aseptik untuk mencegah kontaminasi dari lingkungan, personel, alat atau media yang digunakan dalam kultur sel. Pengujian dilakukan dalam *microbiological safety laminar air flow* kelas II, karena laboratorium kultur sel setidaknya harus memenuhi Biosafety Level 2 (BSL-2). BSL-2 digunakan untuk menguji patogen

yang beresiko sedang yang dapat membahayakan dan menyebabkan penyakit pada manusia (8).

Sel yang akan digunakan dalam penelitian ini disimpan dengan menggunakan cairan yang disebut *freeze down* yang terdiri dari DMSO sebagai *cryoprotectant* yang dapat mencegah pembentukan kristal pada sel yang dapat mengakibatkan kematian pada sel dan terdapat FBS yang mengandung hormon, lipid, dan mineral yang berguna sebagai serum atau nutrisi bagi sel yang berperan penting dalam pertumbuhan sel. Selain itu, penisilin-streptomisin berguna sebagai antibiotik untuk mencegah adanya pertumbuhan bakteri dan dapat melindungi sel dari adanya kontaminasi (9).

Untuk mendapatkan sel tanpa campuran, dilakukan pemisahan dengan metode sentrifugasi. Prinsip pemisahan dengan sentrifugasi adalah memisahkan suatu campuran berdasarkan bobot jenis molekul dengan bantuan gaya sentrifugal sehingga substansi dengan berat yang lebih kecil akan berada di atas dan begitu pula sebaliknya (9). Setelah terjadi pemisahan antara endapan sel dan supernatant, sel akan disuspensikan kembali menggunakan media. Suspensi sel akan dipindahkan ke dalam flask untuk dikultur. Sel diinkubasi pada inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°, suhu 37° C digunakan karena merupakan suhu normal tubuh manusia dan 5% CO₂ merupakan kadar CO₂ yang diperlukan sel untuk mengubah makanan yang didapat dari medium menjadi energi untuk sel bertumbuh dan memperbanyak diri (8).

Kondisi sel di dalam flask dipantau menggunakan mikroskop *inverted*. Tidak lupa untuk selalu mengganti media pertumbuhan sel sekali dalam dua hari agar tetap optimal untuk pertumbuhan sel. Saat jumlah sel di dalam flask sudah mencapai 70-85%, maka harus dilakukan subkultur. Karena ketika jumlah sel melebihi dari angka tersebut, maka berisiko terjadinya kematian terhadap sel-sel tersebut karena media yang ada tidak dapat menyediakan nutrisi yang cukup untuk sel yang terlalu banyak (10).

Subkultur merupakan kegiatan membuang media lama, lalu memindahkan sel dari kultur yang lama ke flask dengan media baru yang masih segar. Subkultur perlu dilakukan untuk menjaga kepadatan sel di dalam flask dan memenuhi kebutuhan media sel agar tetap optimal. Untuk memulai subkultur, diawali dengan pembuangan

media pertumbuhan yang lama, selanjutnya sel dicuci menggunakan PBS, lalu ditambahkan tripsin-EDTA. Tripsin EDTA digunakan sebagai agen disintegrasi untuk memisahkan sel yang bersifat melekat dengan dasar flask. Inkubasi selama beberapa menit (11). Kemudian lihat di bawah mikroskop apakah sel sudah terpisah dari koloninya dan melayang. Jika sudah, dilanjutkan dengan sentrifugasi. Setelah itu suspensikan plat sel dengan media pertumbuhan. Maka sel siap untuk dipindahkan ke flask yang baru lalu diinkubasi.

Media pertumbuhan sel yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium komplet *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM). Medium ini disebut komplet karena didalamnya juga terkandung bahan tambahan yang bermanfaat seperti serum dan antibiotik. Medium DMEM merupakan salah satu medium yang sering digunakan dalam kultur sel ataupun kultur jaringan. Medium DMEM ini mengandung fosfat dalam jumlah besar dan diformulasi untuk digunakan dalam lingkungan atmosfer dengan 5% CO₂. Dengan penambahan serum, medium DMEM menjadi lebih baik untuk menumbuhkan sel (11). Dalam membuat medium komplet DMEM ini, peneliti menggunakan serum *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%. Walaupun sebagian besar kultur sel menambahkan serum sebagai suplemen pada medium yang digunakan, tetapi apabila medium kultur telah mengandung nutrisi dan hormonal yang dianggap cukup memenuhi kebutuhan untuk pertumbuhan sel, maka penggunaan serum dapat ditiadakan. Penambahan antibiotika ke dalam media kultur bertujuan untuk meminimalisir risiko kontaminasi selama bekerja dengan kultur sel. Secara umum antibiotik yang digunakan adalah penisilin dan streptomisin (9). Dalam penelitian ini, digunakan larutan antibiotik penisilin-streptomisin 1%. Hal tersebut dikarenakan kedua antibiotik tersebut dianggap dapat mencegah pertumbuhan bakteri gram positif maupun gram negatif.

Uji Sitotoksik

Viabilitas sel makrofag peritoneum dinilai dengan MTT menurut metode Mosmann. Eksperimen ini dilakukan untuk menguraikan interval konsentrasi ekstrak kental kemumu yang

tidak memberikan efek toksik pada sel. Sel makrofag peritoneum dikultur pada *well plate* 96 dengan kepadatan 2×10^5 sel/*well* dan ditumbuhkan pada suhu 37°C , 5% CO_2 . Supernatan dibuang, dan media lengkap yang mengandung berbagai konsentrasi larutan ekstrak kental kemumu dalam DMSO kemudian ditambahkan (3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; dan 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ke dalam setiap *well*. *well plate* diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C , 5% CO_2 . Supernatan dibuang, dan sel kemudian dicuci 2 kali dengan PBS. 20 μl larutan stok MTT (5 mg / ml PBS) ditambahkan ke setiap *well*, dan selanjutnya diinkubasi selama 4 jam pada suhu 37°C , 5% CO_2 . 100 μl DMSO ditambahkan ke masing-masing *well* untuk melarutkan kristal formazan ungu yang tidak larut dalam air. Setelah dibiarkan 1 jam, kemudian daya serap masing-masing *well* diukur dengan *microplate reader* (TECAN) pada panjang gelombang 570 nm (12). Setelah nilai absorbansi didapat, kemudian dihitung % viabilitas sel dengan rumus:

$$\% \text{ viabilitas} = (a - b) / (c - b) \times 100\%$$

a: Rata-rata absorbansi sel uji

b: Rata-rata absorbansi blanko

c: Rata-rata absorbansi kontrol

Pembuatan Larutan Referensi Natrium Nitrit (NaNO_2)

Pembuatan larutan referensi natrium nitrit (NaNO_2) dengan cara mengambil 25 μl larutan NaNO_2 dari masing-masing konsentrasi 100, 50, 25, 12,5, 6,25, dan 3,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dicampur dengan 25 μl pereaksi Griess (40 mg/ml) dan didiamkan pada suhu kamar selama 10 menit. Absorbansi larutan diukur menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang λ 560 nm. Data konsentrasi dan serapan larutan standar nitrit diolah dengan Software Microsoft Excel sehingga diperoleh kurva kalibrasi larutan nitrit sebagai acuan dalam pengujian aktivitas antiinflamasi (12).

Uji Aktivitas Antiinflamasi

Akumulasi nitrit digunakan sebagai indikator produksi NO dalam medium. Melepaskan NO (*Nitrous oxide*) ke media diuji dengan sedikit modifikasi. Sel makrofag peritoneum dimasukkan dalam *well plate* 96 hingga kepadatannya 2×10^5

sel/*well*. Supernatan dibuang dan 100 μl media yang mengandung berbagai konsentrasi ekstrak kental kemumu (1, 5, 25, 50, dan 100 μM) ditambahkan ke dalam sel. Sel-sel dibiarkan istirahat selama 1 jam dan kemudian diinkubasi dengan LPS (1 g/ml) selama 15 jam pada suhu 37°C dalam atmosfer lembab yang mengandung 5% CO_2 . Kemudian 25 μl supernatan dari setiap *well* dipindahkan ke dalam *well plate* 96 baru dan dicampur dengan 25 μl pereaksi Griess (0,2% *naphthylethylenediamine dihydrochloride* dan 2% *sulfanilamide* dalam 5% asam fosfat), didiamkan pada suhu kamar selama 10 menit, dan kemudian, serapan masing-masing larutan diukur dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 560 nm. Absorbansi terukur dihitung menggunakan persamaan regresi larutan standar NaNO_2 untuk mendapatkan data konsentrasi produksi nitrit (12). Setelah nilai absorbansi didapat, kemudian dihitung % inhibisi sel dengan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = (a - b) / a \times 100\%$$

a: absorbansi kontrol

b: absorbansi sel uji

Analisis Data

Semua percobaan diulang 3 kali ($N=3$). Semua data eksperimen diperlakukan dengan program SPSS (SPSS versi 21, SPSS Institute, Chicago, IL, USA). ANOVA satu arah dan diikuti dengan uji *post hoc Bonferroni* digunakan untuk menguji perbedaan antar kelompok. Namun, sebelum memulai analisis ANOVA satu arah, perlu dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas data. Hal tersebut dikarenakan data yang telah homogen dan terdistribusi normal baru dikatakan layak untuk dilakukan uji ANOVA satu arah. $P < 0,05$ dianggap signifikan secara statistik (12).

Hasil dan Diskusi

Identifikasi Tanaman

Tanaman yang digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini telah diidentifikasi di Herbarium ANDA Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Universitas Andalas, Padang. Hasil identifikasi menyatakan bahwa tanaman yang digunakan sebagai sampel penelitian ini adalah

Colocasia gigantea (Blume) Hook.f, Famili Araceae.

Ekstraksi Sampel

Dari 40 kg sampel tangkai daun kemumu segar didapatkan 824 gram serbuk kering. Kemudian 100 g simplisia diekstraksi dengan menggunakan pelarut yang berbeda. Dari ekstraksi tersebut didapatkan ekstrak kental etanol, ekstrak etil asetat dan ekstrak n-heksan secara berturut-turut adalah 15,8 g, 10,4 g, dan 12,5 g. Persentase rendemen ekstrak dapat dilihat pada tabel berikut.

Syarat rendemen ekstrak kental yaitu nilainya tidak kurang dari 10% (13). Pada **Tabel 1** menunjukkan bahwa persentase rendemen pada ekstrak etanol, etil asetat, dan n-heksan lebih dari

10% yaitu 15,8%, 10,4%, dan 12,5%. Rendemen ekstrak etanol memiliki persentase yang paling tinggi dengan persentase rendemen 15,8%.

Uji Fitokimia

Uji fitokimia dilakukan pada 3 ekstrak tangkai daun kemumu dan tangkai daun kemumu segar sebagai acuan kandungan yang terkandung dalam tangkai daun kemumu. Hasil dari uji fitokimia kemumu dapat dilihat pada tabel berikut.

Pada **Tabel 2** menunjukkan bahwa senyawa metabolit sekunder pada ekstrak etanol lebih banyak dibandingkan dengan ekstrak etil asetat dan n-heksan dikarenakan etanol merupakan pelarut polar yang dapat melarutkan hampir semua senyawa organik pada sampel.

Tabel 1. Hasil rendemen ekstrak tangkai daun kemumu

Ekstrak	Berat ekstrak (g)	Rendemen (%)
Etanol	15,8 gram	15,8
Etil asetat	10,4 gram	10,4
n-Heksan	12,5 gram	12,5

Tabel 2. Hasil skrining fitokimia ekstrak tangkai daun kemumu

Uji	Hasil Positif Berdasarkan Teori	Sampel Segar	Ekstrak Etanol	Ekstrak Etil Asetat	Ekstrak N-Heksan
Alkaloid	Pereaksi mayer membentuk adanya endapan putih	+	+	-	+
Flavonoid	Terbentuknya warna orange sampai merah	+	+	+	-
Fenolik	Terbentuk warna hijau tua atau biru	+	+	+	-
Saponin	Terbentuknya busa yang tidak hilang selama 5 menit	+	-	+	-
Steroid	Terbentuknya warna merah atau ungu	-	+	-	-
Terpenoid	Terbentuk cincin merah atau merah ungu dan hijau atau hijau biru	+	+	+	+

Kultur Sel

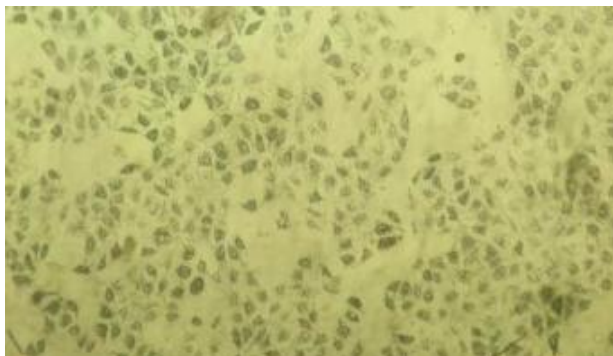
Sel yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas. Sel makrofag peritoneum merupakan sel yang diisolasi dari rongga perut mencit dengan galur wistar. Makrofag peritoneum yang diisolasi dari rongga peritoneum adalah sumber umum makrofag untuk berbagai pengujian *in vitro* (14).

Sel makrofag peritoneum dapat dilihat pada **Gambar 1** Media pertumbuhan sel yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium komplit *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM). Medium ini disebut komplit karena didalamnya juga terkandung bahan tambahan yang bermanfaat seperti serum dan antibiotik. Medium DMEM merupakan salah satu medium yang sering digunakan dalam kultur sel ataupun kultur jaringan. Medium DMEM ini mengandung fosfat dalam jumlah besar dan diformulasi untuk digunakan dalam lingkungan atmosfer dengan

5% CO₂. Dengan penambahan serum, medium DMEM menjadi lebih baik untuk menumbuhkan sel (11). Dalam membuat medium komplit DMEM ini, peneliti menggunakan serum *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%.

Dalam penelitian ini, digunakan larutan antibiotik penisilin-streptomisin 1%. Hal tersebut dikarenakan kedua antibiotik tersebut dianggap dapat mencegah pertumbuhan bakteri gram positif maupun gram negatif. Sel diinkubasi pada inkubator CO₂ 5% pada suhu 37^o, suhu 37^o C digunakan karena merupakan suhu normal tubuh manusia dan 5% CO₂ merupakan kadar CO₂ yang diperlukan sel untuk mengubah makanan yang didapat dari medium menjadi energi untuk sel bertumbuh dan memperbanyak diri (8).

Perhitungan jumlah dihitung dengan menggunakan *cell counter* dengan grid yang dimilikinya, banyak sel yang didapatkan yaitu 2,11 X 10⁶ cell/ml.



Gambar 1. Sel Makrofag Peritoneum (Dokumentasi Pribadi)

Uji Sitotoksik

Uji sitotoksik menggunakan metode MTT pada plat 96 sumur membutuhkan suspensi sel masing-masing 2 x 10⁵ sel/sumur. Sel dihitung dengan menggunakan *cell counter* dengan grid yang dimilikinya, dan pembacaan hasilnya dibantu dengan mikroskop. Namun sebelum itu, suspensi sel dengan media 1 ml diencerkan dengan bantuan PBS dan trypan blue untuk mendapatkan 10 µL suspensi sel. PBS digunakan karena memiliki sifat yang tidak toksik dan mencegah sel agar tidak pecah/mengkerut karena osmosis, *trypan blue* digunakan sebagai pewarna sel untuk membedakan antara sel yang masih hidup dan yang sudah mati, dikarenakan trypan blue dapat melewati atau menembus membran sel berpori dan masuk ke dalam

sitoplasma sedangkan pada sel yang hidup *trypan blue* tidak dapat menembus membran sel dikarenakan masih utuh dan selektif. Jika sel menyerap trypan blue maka mereka dianggap sudah mati (11). Untuk memudahkan dalam perhitungan digunakan *cell counter*. Suspensi sel akan diencerkan dengan media sampai mendapatkan konsentrasi sel dalam media sesuai yang diharapkan.

Suspensi sel yang telah siap untuk digunakan akan dipindahkan ke dalam plat sesuai kebutuhan. Proses *plating* sel ke dalam 57 *well plate* sebagai tempat untuk melakukan uji MTT. Sebelum ekstrak diujikan terhadap sel, sebanyak 2 mg masing-masing ekstrak etanol, etil asetat, dan n-heksan tangkai daun kemumu dilarutkan

dalam DMSO untuk membuat larutan stok. DMSO merupakan pelarut aprotik polar yang bisa melarutkan senyawa polar dan non polar, dan memiliki kemampuan melarutkan yang baik dalam pengujian dengan menggunakan sel konsentrasi Sampel dilarutkan dengan 2 μ l DMSO dalam *cryotube* sehingga didapatkan larutan induk dengan konsentrasi 1.000 μ g/ml.

Pengujian aktivitas sitotoksik ekstrak etanol, etil asetat, dan n-heksan tangkai daun kemumu dilakukan dengan replikasi sebanyak tiga kali yang bertujuan untuk memastikan bahwa hasil yang diperoleh akurat. Ekstrak yang digunakan dibuat pada beberapa konsentrasi yaitu 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50, dan 100 μ g/ml, karena konsentrasi tersebut digunakan untuk melihat pada konsentrasi manakah ekstrak tangkai daun kemumu menghasilkan aktivitas sitotoksik pada sel makrofag peritoneum.

Berdasarkan nilai absorbansi yang diperoleh seperti yang terlihat pada **Tabel 3**, **Tabel 4**, dan **Tabel 5** menunjukkan bahwa persentase viabilitas sel pada ekstrak etanol, etil asetat, dan n-heksan yaitu 33,69%, 39,32%, dan 18,51% pada konsentrasi ekstrak 100 μ g/ml. Persentase viabilitas sel yang paling tinggi adalah ekstrak etil asetat dengan persentase viabilitas sel 39,32%. Nilai persentase di setiap pengulangan didapatkan lebih rendah di dibandingkan dengan rata-rata kontrol di setiap pengulangan menandakan bahwa jumlah sel yang hidup pada konsentrasi tersebut sudah berkurang sehingga pemberian ekstrak tangkai daun kemumu pada konsentrasi tersebut berpengaruh terhadap pertumbuhan sel. Nilai persentase viabilitas sel didapatkan dari pengolahan data nilai absorbansi, apabila semakin rendah nilai persentase viabilitas yang diperoleh maka semakin rendah jumlah sel yang hidup (11).

Tabel 3. Rata-rata persentase viabilitas sel Ekstrak Etanol

Konsentrasi (μ g/ml)	Absorbansi (μ g/ml)			Average	%Viabilitas
	1	2	3		
100	0.18	0.189	0.15	0.173	33.69
50	0.194	0.175	0.173	0.18	41.30
25	0.188	0.189	0.172	0.183	44.56
12.5	0.202	0.186	0.174	0.187	48.91
6.25	0.217	0.198	0.164	0.193	55.43
3.125	0.242	0.199	0.19	0.21	73.91
Kontrol	0.24	0.24	0.223	0.234	
Blanko	0.141	0.144	0.141	0.142	

Tabel 4. Rata-rata persentase viabilitas sel Ekstrak Etil-Asetat

Konsentrasi (μ g/ml)	Absorbansi (μ g/ml)			Average	%Viabilitas
	1	2	3		
100	0.204	0.231	0.235	0.223	39.32
50	0.226	0.235	0.235	0.232	43.68
25	0.232	0.24	0.25	0.24	47.57
12.5	0.255	0.237	0.239	0.243	49.02
6.25	0.253	0.255	0.285	0.264	59.22
3.125	0.317	0.219	0.383	0.306	79.61
Kontrol	0.357	0.37	0.317	0.348	
Blanko	0.141	0.144	0.141	0.142	

Tabel 5. Rata-rata persentase viabilitas sel Ekstrak n-Hexan

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi ($\mu\text{g/ml}$)			Average	%Viabilitas
	1	2	3		
100	0.178	0.168	0.186	0.177	18.51
50	0.175	0.168	0.203	0.182	21.16
25	0.197	0.206	0.218	0.207	34.39
12.5	0.209	0.218	0.223	0.216	39.15
6.25	0.196	0.225	0.235	0.218	40.21
3.125	0.25	0.223	0.23	0.234	48.67
Kontrol	0.298	0.335	0.361	0.331	
Blanko	0.141	0.144	0.141	0.142	

Terlihat pada rata-rata persentase viabilitas sel semakin menurun seiring dengan peningkatan konsentrasi. Namun nilai persentase viabilitas pada ekstrak n-Hexan konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ memiliki nilai 18,51% , Etil-Asetat 39,32% dan Ethanol 33,69% yang berarti ekstrak n-Hexan dapat membunuh 50% dari jumlah sel. Maka disimpulkan bahwa ekstrak n-Hexan memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel makrofag peritoneum dikarenakan nilai LC50 dari n-heksan adalah 2.74 $\mu\text{g/mL}$. Semakin rendah nilai LC50 maka suatu senyawa semakin toksik.

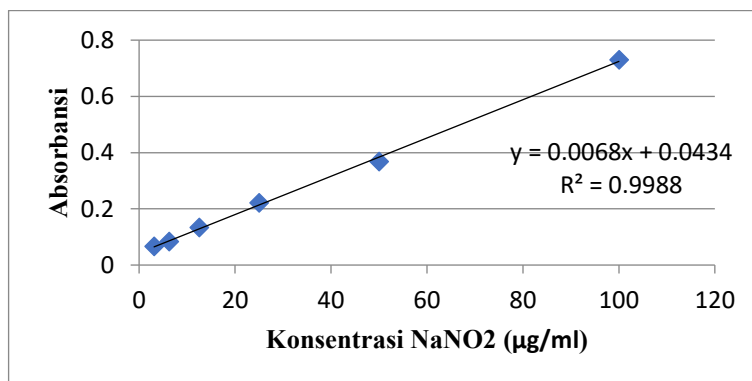
Nilai *Lethal Concentration* 50 (LC50) yang disebabkan ekstrak tangkai daun kemumu dapat dilihat pada **Tabel 6**.

Maka disimpulkan bahwa ekstrak n-Hexan memiliki aktivitas sitotoksik paling tinggi terhadap sel makrofag peritoneum dikarenakan nilai LC50 dari n-heksan adalah 2.74 $\mu\text{g/mL}$.

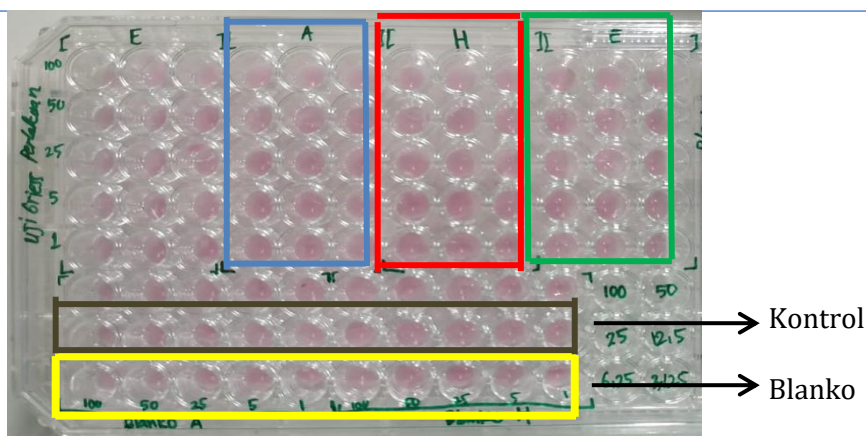
Pembuatan Larutan Referensi Natrium Nitrit (NaNO_2)

Pembuatan larutan referensi natrium nitrit (NaNO_2) dengan cara mengambil 25 μl larutan NaNO_2 dari masing-masing konsentrasi 100, 50, 25, 12,5, 6,25, dan 3,125 $\mu\text{g/mL}$ dicampur dengan 25 μl pereaksi Griess (40 mg/ml) dan didiamkan pada suhu kamar selama 10 menit. Absorbensi larutan diukur menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang λ 560 nm. Data konsentrasi dan serapan percobaan disajikan pada **Tabel 7**.

Data konsentrasi dan serapan larutan standar nitrit diolah dengan Software Microsoft Excel sehingga diperoleh kurva kalibrasi larutan nitrit **Gambar 2** dengan persamaan regresi $y = 0,0068x + 0,0434$ + 0,0434. Hal ini menunjukkan adanya korelasi linier antara larutan nitrit pada interval konsentrasi 3,25–100 $\mu\text{g/mL}$ dengan serapannya, dengan koefisien korelasi, $R^2 = 0,9988$.



Gambar 2. kurva kalibrasi larutan nitrit



Gambar 3. Hasil uji griess assay terhadap sel Makrofag Peritoneum(Dokumentasi Pribadi)

Tabel 6. Hasil sitotoksik (Lc50 dalam $\mu\text{g/ml}$) ekstrak etanol, etil-asetat dan n-hexan tangkai daun kemumu

Ekstrak	Lc50 ($\mu\text{g/ml}$)
Etanol	17.66 $\mu\text{g/ml}$
Etil Asetat	23.82 $\mu\text{g/ml}$
N-Heksan	2.74 $\mu\text{g/ml}$

Tabel 7. Hasil uji larutan referensi natrium nitrit (NaNO_2)

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi ($\mu\text{g/ml}$)			Rata-rata
	1	2	3	
3.125	0.066	0.068	0.064	0.066
6.25	0.08	0.083	0.086	0.083
12.5	0.13	0.136	0.133	0.133
25	0.22	0.215	0.228	0.221
50	0.364	0.374	0.366	0.368
100	0.705	0.79	0.695	0.73

Tabel 8. Hasil uji produksi NO ekstrak etanol

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi ($\mu\text{g/ml}$)			Rata-rata	Kadar NO ($\mu\text{g/ml}$)	% Inhibisi
	1	2	3			
100	0.051	0.053	0.069	0.057	1.44	89.01
50	0.089	0.077	0.069	0.078	4.67	80.32
25	0.101	0.124	0.149	0.125	11.91	75.91
5	0.208	0.195	0.075	0.159	17.13	69.36
1	0.065	0.226	0.253	0.181	20.52	65.12
Kontrol	0.515	0.554	0.523	0.519	72.52	

Tabel 9. Hasil uji produksi NO ekstrak etil asetat

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi ($\mu\text{g/ml}$)			Rata-rata	Kadar NO ($\mu\text{g/ml}$)	% Inhibisi
	1	2	3			
100	0.11	0.082	0.108	0.1	8.06	80.73
50	0.097	0.166	0.052	0.105	8.83	79.76
25	0.151	0.127	0.137	0.138	13.9	73.41
5	0.067	0.124	0.294	0.162	17.6	68.78
1	0.217	0.471	0.269	0.319	41.75	38.53
Kontrol	0.515	0.554	0.523	0.519	72.52	

Tabel 10. Hasil uji produksi NO ekstrak n-heksan

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi ($\mu\text{g/ml}$)			Rata-rata	Kadar NO ($\mu\text{g/ml}$)	% Inhibisi
	1	2	3			
100	0.059	0.111	0.081	0.083	5.45	84.01
50	0.084	0.119	0.201	0.134	13.29	74.18
25	0.073	0.278	0.066	0.139	14.06	73.21
5	0.12	0.202	0.289	0.203	23.91	60.88
1	0.081	0.378	0.21	0.223	26.98	57.03
Kontrol	0.515	0.554	0.523	0.519	72.52	

Uji Aktivitas Antiinflamasi

Pembacaan absorbansi sampel dihitung menggunakan persamaan regresi standar larutan nitrit yang memberikan korelasi linier antara konsentrasi larutan nitrit dengan absorbansi pewarna azo merah-ungu yang dihasilkan, untuk mendapatkan konsentrasi nitrit pada medium sampel dan medium kontrol.

Sel makrofag peritoneum yang distimulasi LPS dan diberi ekstrak kemumu digunakan sebagai kontrol positif sedangkan sel makrofag peritoneum yang distimulasi dengan LPS dan tidak diberi ekstrak kemumu digunakan sebagai kontrol negatif. Eksperimen ini menemukan bahwa perlakuan konsentrasi ekstrak kemumu 1, 5, 25, 50, dan 100 $\mu\text{g/mL}$ terhadap sel makrofag peritoneum yang terstimulasi LPS dan diberi ekstrak kemumu dengan sel makrofag peritoneum yang terstimulasi LPS namun tidak diberi ekstrak kemumu menghasilkan konsentrasi produksi NO yang dapat dilihat pada **Gambar 3, Table 8, Tabel 9, dan Tabel 10** menunjukkan bahwa hasil uji produksi NO pada ekstrak etanol, etil asetat, dan n-heksan pada konsentrasi ekstrak 100 $\mu\text{g/ml}$ yaitu 1.44, 8.06,

dan 5.45 $\mu\text{g/ml}$. Ekstrak etanol memiliki kadar NO yang paling sedikit dengan kadar 1.44 $\mu\text{g/ml}$ dan persentase inhibisi 89.01%.

Analisis Data

Untuk mengolah data kadar NO sel makrofag peritoneum ini, dilakukan analisis menggunakan metode ANOVA satu arah dengan bantuan *software* SPSS. Peneliti memilih ANOVA satu arah karena dalam penelitian ini terdapat satu variabel bebas dan satu variabel terikat yang akan dilihat bagaimana pengaruhnya terhadap kadar NO yang dihasilkan sel. Namun, sebelum memulai analisis ANOVA satu arah, perlu dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas data. Hal tersebut dikarenakan data yang telah homogen dan terdistribusi normal baru dikatakan layak untuk dilakukan uji ANOVA satu arah. Untuk menguji homogenitas data, digunakan *Levene's test*. Data dapat dikatakan homogen jika memiliki nilai $p > 0.05$. Dari uji homogenitas yang dilakukan pada **Tabel 11** didapatkan hasil nilai p yaitu 0,058 yang menandakan bahwa data yang didapatkan peneliti telah homogen. Serta juga dilakukan uji normalitas data dengan uji *Shapiro-Wilk* pada **Tabel 12** Uji normalitas memiliki ketentuan yang

sama dengan uji homogenitas. Hasil nilai p yang didapatkan dari uji normalitas tersebut adalah 0,703, 0,062 dan 0,662 yang menandakan bahwa data peneliti juga terdistribusi secara normal. Dikarenakan syarat uji anova satu arah sudah terpenuhi, maka data peneliti dapat dianalisis dengan uji ANOVA satu arah dapat dilihat pada **Tabel 13** Dalam uji ANOVA satu arah, juga akan didapatkan nilai p yang akan mewakili nilai

signifikansi. Nilai p yang dianggap signifikan adalah kecil dari $p < 0,05$, sementara itu hasil yang diperoleh dari uji ANOVA satu arah ini adalah 0.000 Hal ini menandakan bahwa kedua variabel bebas dan terikat yaitu konsentrasi senyawa uji terhadap kadar NO yang dihasilkan berpengaruh secara signifikan terhadap sel makrofag peritoneum.

Tabel 11. Hasil Uji Homogenitas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.073	3	16	.058

Tabel 12. Hasil Uji Normalitas

Ekstrak		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Kadar NO	Etanol	.188	5	.200*	.945	5	.703
	EtilAsetat	.312	5	.125	.786	5	.062
	NHeksan	.221	5	.200*	.940	5	.667

Tabel 13. Hasil Uji one -way ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	12412.308	3	4137.436	49.881	.000
Within Groups	1327.145	16	82.947		
Total	13739.453	19			

Tabel 14. Hasil Uji Post Hoc Bonferroni

(I) Ekstrak	(J) Ekstrak	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Etanol	EtilAsetat	-6.89400	5.76009	.637	-23.3737	9.5857
	NHeksan	-5.60400	5.76009	.766	-22.0837	10.8757
	Kontrol	-61.38600*	5.76009	.000	-77.8657	-44.9063
EtilAsetat	Etanol	6.89400	5.76009	.637	-9.5857	23.3737
	NHeksan	1.29000	5.76009	.996	-15.1897	17.7697
	Kontrol	-54.49200*	5.76009	.000	-70.9717	-38.0123
NHeksan	Etanol	5.60400	5.76009	.766	-10.8757	22.0837
	EtilAsetat	-1.29000	5.76009	.996	-17.7697	15.1897
	Kontrol	-55.78200*	5.76009	.000	-72.2617	-39.3023
Kontrol	Etanol	61.38600*	5.76009	.000	44.9063	77.8657
	EtilAsetat	54.49200*	5.76009	.000	38.0123	70.9717
	NHeksan	55.78200*	5.76009	.000	39.3023	72.2617

Dalam analisis data untuk penelitian ini, tidak hanya selesai pada uji ANOVA satu arah, melainkan dilanjutkan dengan uji *post hoc Bonferroni* dapat dilihat pada **Tabel 14** Uji ini dilakukan untuk melihat perbedaan signifikan antar masing masing perlakuan. Dalam uji juga memperhatikan nilai *p* untuk menarik kesimpulannya, dimana nilai $p < 0,05$ dianggap memiliki nilai yang signifikan. Jika data tersebut dinyatakan signifikan, maka terdapat perbedaan yang bermakna antara dua kelompok perlakuan yang sedang dibandingkan. Pada analisis data menunjukkan perbedaan yang signifikan antara nilai data produksi NO sel makrofag peritoneum yang diberi ekstrak kemumu dan sel makrofag peritoneum kontrol yang tidak diberi ekstrak kemumu dengan $p < 0,05$ yang menunjukkan perbedaan yang signifikan antara nilai data sel makrofag peritoneum yang diberi ekstrak kemumu dan kelompok yang tidak diberi ekstrak kemumu. $p > 0,05$ menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan antara nilai data yang diberi ekstrak kemumu.

Kesimpulan

Penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak tangkai daun kemumu memiliki aktivitas antiinflamasi dikarenakan dapat menurunkan produksi NO pada sel makrofag peritoneum, dimana penghambatan yang signifikan ditunjukkan oleh ekstrak etanol pada konsentrasi 50 dan 100 µg/ml dengan produksi NO masing-masing adalah 4,67 dan 1,44 µg/ml, dan penghambatan masing-masing 80,32% dan 89,01%.

Ucapan Terima Kasih

-

Konflik Kepentingan

Tidak ada konflik kepentingan dalam tulisan ini.

Referensi

1. Fadilaturahmah, Firman, S., & Yona, A. Anti-Inflammatory Effects of Miang Bean Leaves (*Mucuna pruriens*). Journal of Tropical Pharmacy and Chemistry. 2022;6(1), p. 76-83. <https://doi.org/10.25026/jtpc.v6i1.284>
2. Asri, Rofiqah, Dewi, H., & Agus, S. Profil Fitokimia dan Pengaruh Ekstrak Tangkai Daun Talas Kemumu (*Colocasia gigantea* Hook.F) Terhadap Jumlah Leukosit Musculus. Jurnal Pendidikan dan Ilmu Kimia. 2019;3(1), hal. 48-56. <https://doi.org/10.33369/atp.v3i1.9038>
3. Harahap, Susilawati. Alkaloid and Flavonoid Phytochemical Screening on Balakka Leaves (*Phyllanthus Emblica* L.). Formosa Journal of Science and Technology (FJST). 2023;2(8), p. 2071-2084. <https://doi.org/10.55927/fjst.v2i8.5691>
4. Fitriani, Banan., Harlia., & Andi, H. A. Anti-Inflammatory Activities Of Areca (*Areca catechu* L.) Fruit Seed Extracts Using Red Blood Cell (RBCs) Membrane Stability Method. Indo. J. Pure App. Chem. 2023;6(1), p. 38-44. <https://doi.org/10.26418/indonesian.v6i1.61936>
5. Simanjuntak, Kristina. Peran Antioksidan Flavonoid dalam Meningkatkan Kesehatan. Jurnal Bina Widya. 2012;23(3), hal. 135-140.
6. Marliza, Hesti & Dita Oktaviani. Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol Daun Kemumu (*Colocasia gigantea* Hook.f) dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). Bencoolen Journal of Pharmacy. 2021;1(1), hal. 38-45.
7. Ferdinal, Norman., Bustanul, A., & Fathul, R. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Triterpenoid dari Kulit Batang Tumbuhan Kersen (*Muntingia calabura* L.). Jurnal Kimia Unand. 2016;5(2), hal. 1-6.
8. Luo, C., Wang, Y., Wei, C., Chen, Y., & Ji, Z. The anti-migration and anti-invasion effects of Bruceine D in human triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cells. Experimental and Therapeutic Medicine. 2019;19(1), p. 273-279.
9. Husni, E., Wahyuni, F. S., Fitri, H. N., & Badriyya, E. Cytotoxicity study of ethanol extract of Bintangor leaf (*Calophyllum soulattri* Burm.f) on T47D breast cancer cell line (Cytotoxicity study with MTT assay method). Pharmacognosy Journal. 2021 ;13(2), p. 362-367. <https://doi.org/10.5530/pj.2021.13.46>.

10. Luis, C., Castaño-Guerrero, Y., Soares, R., Sales, G., & Fernandes, R. Avoiding the interference of doxorubicin with mtt measurements on the mcf-7 breast cancer cell line. *Methods and Protocols*. 2019; 2(2), p. 1-5.
<https://doi.org/10.3390/mps2020029>
11. Sun, Z., Zhou, D., Yang, J., & Zhang, D. Doxorubicin promotes breast cancer cell migration and invasion via DCAF13. *FEBS Open Bio*. 2022;12(1), p. 221-230.
<https://doi.org/10.1002/2211-5463.13330>
12. Adnan, A, Z., Muhammad, T., & Tika, A. Anti-Inflammatory Activity of Tinocrisposide by Inhibiting Nitric Oxide Production in Lipopolysaccharides-Stimulated Raw 264.7 Cells. *Asian J Pharm Clin Res*. 2018;11(4), p. 149-153.
<https://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i4.23739>
13. Wardaningrum, R. Y. Perbandingan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Terpurifikasi Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea Batatas* .L) Dengan Vitamin E. *Artikel Universitas Ngudi Waluyo*. 2019; hal. 1-11.
14. Liu, T., Lei Wen Peng., Li Chang., Fang Liu., & Yong Mei Jiang. The Peritoneal Macrophages in Inflammatory Diseases and Abdominal Cancers. *Oncology Research*. 2018;26(5), p. 817-826.
<https://doi.org/10.3727/096504017X15130753659625>
<https://doi.org/10.3892/etm.2019.8187>