

Research Report

Efek ekstrak daun singkong (*Manihot utilissima*) terhadap ekspresi COX-2 pada monosit yang dipapar LPS *E.coli*

(*The effect of Manihot utilissima extracts on COX-2 expression of monocytes induced by LPS E. coli*)

Zahara Meilawaty
Bagian Biomedik
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
Jember - Indonesia

ABSTRACT

Background: Periodontal disease is a common and widespread disease in the community. Gram negative bacteria have a role in periodontitis. These bacteria secrete a variety of products such as endotoxin lipopolysaccharide (LPS), which causes the occurrence of inflammation or infection. The body defense responses are neutrophils and mononuclear cells (monocytes and macrophages). In response to defense mechanism, the body will be expressed enzyme cyclooxygenase (COX) which functions convert arachidonic acid to prostaglandins. Cassava leaf cells known to play a role in reducing inflammation, but the mechanism for inhibiting COX-2, is not known. **Purpose:** The study was aimed to determine the effect of cassava leaf extract (*Manihot utilissima*) on expression of enzyme COX-2 in monocytes which were exposed by LPS *E. coli*. **Methods:** This study was in vitro experimental studies with the design of posttest only control group design. The sample was the cassava leaves extract (*Manihot utilissima*) at concentration of 12.5 % and 25 %. The expression of COX-2 was determined by immunocytochemistry method. Isolated monocytes were incubated in cassava leaf extract, and then exposed to LPS, after washing imunostaning procedure was performed using a monoclonal antibody (MAb) anti-human COX-2. The research data was the number of monocytes that express COX-2. **Results:** Expression of COX-2 in the group cassava leaf extract was higher than the group that induced by LPS *E. coli* only. **Conclusion:** Cassava leaf extract did not inhibit the expression of COX-2 in monocytes which were exposed by LPS *E. coli*.

Key words: LPS, monocytes, COX-2, cassava leaves, *Manihot utilissima*

ABSTRAK

Latar belakang: Penyakit periodontal merupakan penyakit umum dan tersebar luas di masyarakat. Bakteri yang banyak berperan pada periodontitis adalah Gram negatif. Bakteri ini mengeluarkan berbagai produk antara lain endotoksin lipopolisakarida (LPS) yang menyebabkan inflamasi atau infeksi. Respon pertahanan tubuh pertama adalah netrofil dan sel mononuklear (monosit dan makrofag). Pada respon pertahanan tubuh akan diekspresikan enzim siklooksigenase (COX) yang berfungsi mengubah asam arakidonat menjadi prostaglandin. Daun singkong diketahui berperan dalam menurunkan sel radang, tetapi mekanisme dalam menghambat COX-2, belum diketahui. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk meneliti ekstrak daun singkong terhadap ekspresi enzim COX-2 pada monosit yang dipapar LPS *E. coli*. **Metode:** Penelitian ini merupakan studi eksperimental in vitro dengan rancangan The posttest only control group design. Sampel adalah ekstrak daun singkong (*Manihot utilissima*) dengan dosis 12,5% dan 25%. Ekspresi COX-2 diteliti dengan metode imunositokimia. Isolat monosit diinkubasi ekstrak daun singkong, kemudian dipapar LPS, setelah pencucian kemudian dilakukan prosedur imunostaning menggunakan antibodi monoklonal (Mab) anti human COX-2. Data penelitian adalah jumlah monosit yang

mengekspresikan COX-2. **Hasil:** Ekspresi COX-2 pada kelompok ekstrak daun singkong lebih tinggi dibandingkan kelompok yang hanya diinduksi LPS *E.coli*. **Simpulan:** Ekstrak daun singkong tidak menghambat ekspresi COX-2 pada monosit yang dipapar LPS *E. coli*.

Kata kunci: LPS, monosit, COX-2, daun singkong, *Manihot utilissima*

Korespondensi (*correspondence*): Zahara Meilawaty, Bagian Biomedik, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Jl. Kalimantan No. 37 Jember 68121, Indonesia. E-mail: zhr_mel@yahoo.com

PENDAHULUAN

Penyakit periodontal merupakan penyakit umum dan tersebar luas di masyarakat, bisa menyerang anak-anak, orang dewasa maupun orang tua. Salah satu bentuk penyakit periodontal adalah peradangan yang menyerang jaringan periodontal, dapat hanya mengenai gingiva yang disebut dengan gingivitis atau mengenai jaringan periodontal yang lebih luas yaitu ligamen periodontal, sementum dan tulang alveolar.¹ Bakteri yang paling banyak berperan terhadap timbulnya periodontitis adalah bakteri Gram negatif, diantaranya yaitu *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, dan *Bacteriodes forsythus*. Bakteri gram negatif anaerob ini, mengeluarkan berbagai produk antara lain endotoksin biologi aktif atau lipopolisakarida (LPS) yang menyebabkan aktivitas biologis sehingga terjadinya keradangan.^{2,3}

Lipopolisakarida adalah salah satu penyebab kelainan periodontal. Bahan ini merupakan struktur utama dinding sel bakteri gram negatif anaerob yang berfungsi untuk integritas struktur bakteri dan melindungi bakteri dari sistem pertahanan imun *hospes*.⁴ Lipopolisakarida mampu menimbulkan stimulasi pada berbagai sel imun, baik *in vitro* maupun *in vivo*, substansi ini mempunyai relevansi klinis yang penting karena berperan langsung dalam patogenesis infeksi bakteri gram negatif. Infeksi yang diakibatkan aktivitas bakteri dapat menimbulkan respon pertahanan didalam tubuh berupa respon imun spesifik maupun non spesifik. Respon imun yang berperan sebagai garis pertahanan pertama terhadap invasi bakteri adalah netrofil dan sel mononuklear (monosit dan makrofag).⁵

Sel darah yang berfungsi sebagai sistem kekebalan bagi tubuh adalah leukosit. Leukosit bergerak bebas dalam darah sebagai organisme selular bebas pada sistem kekebalan tubuh. Leukosit terdiri dari fagosit makrofag, neutrofil, sel dendritik, sel *mast*, eosinofil, basofil dan sel pembunuh alami yang merupakan mediator penting pada sistem kekebalan adaptif. Monosit merupakan jenis leukosit yang membentuk makrofag. Peran monosit ketika terjadi infeksi adalah meninggalkan aliran darah dan bergerak ke dalam jaringan untuk mengidentifikasi dan membunuh patogen dengan menyerang patogen yang lebih besar melalui kontak langsung kemudian membunuh mikroorganisme. Monosit bertindak sebagai fagosit yang berperan dalam merespon adanya bakteri patogen, sehingga viabilitas monosit menjadi faktor penting pada sistem kekebalan tubuh.⁶

Enzim siklooksigenase (COX) merupakan target utama obat antiinflamasi nonsteroid, COX merupakan enzim yang berperan dalam merubah asam arakidonat menjadi prostaglandin yang bertanggungjawab terhadap inflamasi, rasa sakit, proliferasi sel dan respon biologis lainnya. COX-2 dapat diinduksi oleh sitokin, *growth factor*, dan stimulus lainnya berdasarkan respon inflamasi. COX-2 biasanya diekspresikan bila terjadi inflamasi atau pada keadaan patologis lainnya, COX-2 juga diekspresikan di saraf otak dan ginjal. Secara farmakologi, penghambatan COX dapat digunakan sebagai *relief of pain* dari gejala inflamasi. Semua obat AINS, salah satunya ibuprofen bekerja sebagai antiinflamasi dengan menghambat sintesis prostaglandin dengan cara menghambat enzim COX yang mengkatalis reaksi asam arakidonat menjadi senyawa endoperoxidase. Obat ini diindikasikan untuk luka pada jaringan lunak, fraktur, ekstraksi gigi, vasktomi, pasca melahirkan, pasca operasi; dapat menekan terjadinya inflamasi. Tetapi, penggunaan obat AINS dapat menimbulkan efek samping, diantaranya dapat menyebabkan terjadinya perdarahan gastrointestinal, memperlama waktu perdarahan, serta dapat merusak fungsi ginjal.^{7,8}

Selama ini, masyarakat hanya mengenal daun singkong sebagai sayuran dan bahan makanan. Masyarakat kurang mengetahui bahwa daun singkong memiliki banyak manfaat di dunia kesehatan karena memiliki kandungan vitamin C yang cukup tinggi (sekitar 27,5%), senyawa organik flavonoid, triterpenoid, tanin serta saponin. Konsumsi vitamin C sangat bermanfaat dalam proses penyembuhan luka karena dapat mempengaruhi tingkat keparahan respon inflamasi dan kualitas penyembuhan.^{6,9} Penelitian lain juga telah membuktikan bahwa vitamin C dapat menurunkan jumlah neutrofil pada proses penyembuhan luka tikus Wistar jantan.¹⁰

Flavonoid dan saponin sejak lama diketahui memiliki aktivitas antimikroba dan antivirus. Demikian juga triterpenoid yang sering ditemukan pada banyak tanaman obat dan diketahui memiliki aktivitas antivirus dan antibakteri, serta dapat mengobati kerusakan pada kulit.¹¹ Flavonoid yang diisolasi dari daun singkong sebesar 100-200 µg/ml dapat mengurangi degranulasi sel mast yang diinduksi senyawa 48,80 albumin pada sebuah penelitian *in vitro*. Flavonoid diyakini dapat menghambat prostaglandin.¹² Ekstrak daun singkong juga diketahui berpotensi dalam menurunkan jumlah neutrofil pada proses penyembuhan luka tikus Wistar jantan.¹³ Tetapi mekanisme kerja ekstrak daun singkong itu sendiri terhadap ekspresi

enzim COX-2, yaitu enzim yang berperan dalam merubah asam arakidonat menjadi prostaglandin pada inflamasi sampai saat ini belum diketahui. Berdasarkan uraian di atas, timbul suatu permasalahan bagaimana potensi ekstrak daun singkong terhadap ekspresi COX-2 pada model inflamasi. Tujuan penelitian ini adalah meneliti ekstrak daun singkong (*Manihot utilissima*) terhadap ekspresi enzim COX-2 pada monosit yang dipapar LPS *E. coli*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan studi eksperimental *in vitro* dengan rancangan *the posttest only control group design*. Variabel bebas adalah ekstrak daun singkong (*Manihot utilissima*) dengan dosis 12,5% dan 25%. Variabel tergantung adalah ekspresi COX-2 pada monosit. Variabel terkontrol adalah jenis dan konsentrasi monosit dan LPS *E. coli* serta prosedur penelitian.

Daun singkong (*Manihot utilissima*) yang digunakan didapatkan dari daerah Tempurejo, Kecamatan Tempurejo Jember. Daun yang diambil adalah daun yang masih hijau, utuh dan berada di bagian tengah pohon untuk menghindari kandungan sianida yang berlebihan pada daun yang terlalu muda. Daun singkong terlebih dahulu diidentifikasi di Herbarium Jemberense, Laboratorium Botani dan Kultur Jaringan, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA Universitas Jember. Untuk pembuatan ekstrak, daun singkong dicuci bersih, dipotong kecil-kecil dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan selama 24 jam di dalam ruangan dengan suhu ruang, yang tidak terkena sinar matahari secara langsung, kemudian dioven selama 3 jam dalam suhu 45 °C. Setelah itu, daun yang kering tersebut digiling menggunakan blender, diayak dengan ayakan 50 *mesh* sehingga didapatkan serbuk halus sebanyak total 400 gram serbuk daun. Setelah itu, serbuk daun dimaserasi dengan etanol 95% selama 2 hari dan dilakukan pengadukan setiap hari. Selanjutnya, larutan tersebut dipekatkan dengan rotavapor (*rotary evaporator*) dengan suhu 50°C dan putaran 90 rpm menjadi ekstrak daun singkong dengan konsentrasi 100%. Penyimpanan ekstrak 100% ini diletakkan dalam kulkas.

Isolasi monosit dilakukan dengan metode *ficoll hypaque centrifugation*.¹⁴ Sebanyak 12 cc darah (*heparinized whole blood*) dibagi menjadi dua, sentrifuse 600 rpm selama 10 menit pada suhu ruang. Serum yang mengandung platelet dipisahkan, sisa darah diencerkan dengan HBSS sehingga menjadi 9 cc. Setelah itu menyiapkan dua tabung falcon, masing-masing diisi dengan 3 cc *ficol*. Selanjutnya melapiskan darah (secara berhati-hati) di atas lapisan *ficol* dengan mikropipet. Darah yang telah dilapiskan disentrifuse selama 30 menit, 1400 rpm, sehingga terbentuk 4 lapisan dari atas ke bawah adalah (plasma, mononuklear, *ficol* dan polinuklear+RBC). Lapisan mononuklear (*interface plasma-ficol*) yang mengandung limfosit dan monosit dipisahkan dan dimasukkan dalam tabung falcon. Kemudian dicuci dengan HBSS dan disentrifuse

600 rpm, 10 menit, sebanyak 2 kali untuk menghilangkan kontaminan platelet. Hasil pencucian diresuspensi dalam HBSS sebanyak 2500 µl, kemudian dilakukan pipeting. Suspensi sel mononuklear kemudian dilapiskan pada *plastic microplate (24 well)* yang didasarnya telah diberi *cover slip* sebanyak 100 µl tiap *well*, kemudian diinkubasi selama 1 jam, 37 °C. Medium inkubasi yang mengandung limfosit dibuang, sisanya yang mengandung monosit dicuci 3 x dengan HBSS. Hasil pencucian pelet monosit diresuspensi dengan RPMI sebanyak 1000 µl tiap *well*. Kemudian tambahkan penstrep (5 µl dan fungison 5 µl) pada tiap *well*, pipeting medium secara hati-hati, monosit siap untuk diinkubasi dengan daun singkong.

Suspensi isolat monosit, masing-masing dibagi menjadi 4 kelompok uji (masing-masing terdiri dari 3 *well*) yaitu: (1) K = kontrol, tidak diinkubasi EDS, tetapi ditambahkan RPMI 1000 µl; (2) P1 = tidak diinkubasi EDS, tetapi ditambahkan RPMI 1000 µl; (3) P2 = diinkubasi EDS 12,5% (sebanyak 200 µl); (4) P3 = diinkubasi EDS 25% (sebanyak 200 µl). Inkubasi dilakukan dalam inkubator *shaker* dengan 5% CO₂, 37 °C selama 18 jam. Setelah 18 jam, isolat monosit pada kelompok 2, 3 dan 4 kemudian dipapar dengan LPS *E.coli* sebanyak 5 µl tiap *well* kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C dan 5% CO₂.

Setelah inkubasi pemaparan LPS selama 1 jam, dilakukan pencucian. Kemudian dilakukan prosedur imunostaining menggunakan antibodi monoklonal (Mab) *anti human COX-2*. Ekspresi COX-2 dianalisis dengan metode imunositokimia. Ekspresi COX-2 ditunjukkan oleh monosit yang membran selnya berwarna coklat, pengamatan dilakukan di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali. Data penelitian adalah jumlah rata-rata monosit yang mengekspresikan COX-2 dihitung per 100 sel.

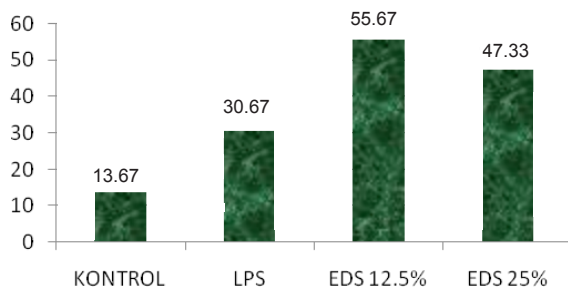
Data penelitian diuji normalitasnya menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan homogenitasnya menggunakan uji *Levene*. Selanjutnya dilakukan uji parametrik menggunakan uji *one way ANOVA* untuk mengetahui perbedaan ekspresi COX-2 dan dilanjutkan dengan uji LSD untuk membandingkan ekspresi COX-2 monosit antar kelompok percobaan.

HASIL

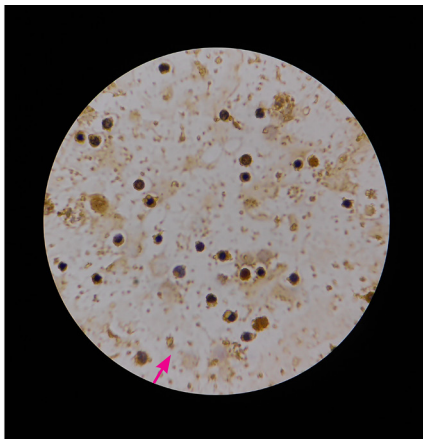
Ekspresi COX-2 dilihat menggunakan mikroskop dengan pembesaran 400 kali. Data penelitian adalah jumlah rerata monosit yang mengekspresikan COX-2 dihitung per 100 sel. Rerata dan simpangan baku ekspresi COX-2 pada masing-masing kelompok dapat dilihat pada Gambar 1.

Rerata ekspresi COX-2 tertinggi terdapat pada kelompok ekstrak daun singkong 12,5% sebesar 55,67, kemudian kelompok ekstrak daun singkong 25% sebesar 47,33; setelah itu kelompok yang hanya diberi LPS *E. coli* sebesar 30,67; dan ekspresi COX-2 terendah terdapat pada kelompok kontrol sebesar 13,67 (Gambar 1).

Data yang didapat diuji normalitasnya terlebih dahulu menggunakan uji *Shapiro-Wilk* sebelum dianalisis menggunakan uji parametrik. Hasil uji normalitas



Gambar 1. Grafik batang rerata ekspresi COX-2 berdasarkan kelompok perlakuan.



Gambar 2. Gambaran mikroskopis ekspresi COX-2, pembesaran 1000x. Tanda panah warna hitam menunjukkan monosit yang mengekspresikan COX-2, tanda panah merah menunjukkan monosit yang tidak mengekspresikan COX-2. Sel yang mengekspresikan COX-2 terlihat berwarna coklat, dan yang tidak mengekspresikan COX-2 berwarna biru. Counterstain menggunakan Mayer's hematoxylin.

menunjukkan bahwa data yang diuji mempunyai nilai sig 0,344 ($p > 0,05$), ini berarti data terdistribusi secara normal sehingga memenuhi syarat untuk dilakukan uji parametrik. Oleh karena itu, selanjutnya diuji dengan menggunakan uji parametrik *One-way Anova* yang rangkumannya dapat dilihat pada Tabel 1.

Ekspresi COX-2 pada masing-masing perlakuan mempunyai perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) dapat dilihat pada Tabel 1, selanjutnya untuk mengetahui perbedaan ekspresi COX-2 antara masing-masing kelompok dilakukan uji *LSD*.

Terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) antara kelompok kontrol dengan kelompok ekstrak daun singkong 12,5%; kelompok kontrol dengan kelompok ekstrak daun singkong 25%; kelompok LPS *E. coli* dengan kelompok ekstrak daun singkong 12,5% (Tabel 2). Gambaran mikroskopis ekspresi COX-2 dengan pembesaran 1000x dapat dilihat pada Gambar 2.

Tabel 1. Rangkuman hasil uji *one way ANOVA* potensi ekstrak daun singkong (*Manihot utilissima*) dalam memodulasi COX-2 pada monosit yang dipapar LPS *E. coli*

	F	Sig.
Between group	12,255	0,002

Tabel 2. Rangkuman hasil uji *LSD* potensi ekstrak daun singkong (*Manihot utilissima*) dalam memodulasi COX-2 pada monosit yang dipapar LPS *E. coli*

	Kontrol	LPS	EDS 12,5%	EDS 25%
Kontrol	-	.054	.001*	.002*
LPS		-	.010*	.058
EDS 12,5%			-	.300
EDS 25%				-

PEMBAHASAN

Penelitian ini adalah penelitian *in vitro* yang menggunakan sel monosit. Hasil penelitian yang terlihat pada Gambar 1 menunjukkan bahwa rerata ekspresi COX-2 pada kelompok yang diinduksi LPS *E. coli* dan ekstrak daun singkong menunjukkan kecenderungan yang lebih banyak dibandingkan kelompok yang hanya diberi LPS *E. coli* ataupun kelompok kontrol. Hal ini juga menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun singkong 12,5% dan 25% mempunyai pengaruh yang bermakna terhadap peningkatan ekspresi COX-2, bahwa ekstrak daun singkong 12,5% dan 25% tidak menghambat ekspresi COX-2 pada sel monosit yang diinduksi LPS *E. coli*. Hasil ini tidak sesuai dengan hipotesis, bahwa pemberian ekstrak daun singkong dapat menghambat ekspresi COX-2 pada sel monosit yang diinduksi LPS *E. coli*.

Pada penelitian ini, didapatkan ekspresi COX-2 pada kelompok kontrol sangat sedikit atau paling rendah. Hal ini disebabkan pada kelompok kontrol tidak diinduksi LPS *E. coli* sehingga seharusnya sel monosit tidak mengekspresikan COX-2. COX-2 secara normal ditemukan dalam jumlah yang tidak signifikan tetapi dapat diinduksi oleh sitokin atau *growth factor*, tetapi akan lebih banyak diekspresikan pada keadaan inflamasi atau keadaan patologis lainnya.⁸

Lipopolisakarida bersifat endotoksik karena LPS mengikat reseptor CD14/ *Toll-like receptor-4* (TLR4) yang mengakibatkan sekresi sitokin proinflamasi dari beberapa tipe sel. CD14 merupakan reseptor permukaan sel pada makrofag dan monosit untuk karbohidrat. Makrofag yang berikatan dengan bakteri oleh karena adanya CD14, akan mensekresi sitokin [interleukin-1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL16, *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) dan *mediator lipid inflammation* yaitu prostaglandin (PGE₂)].⁴ Keadaan inflamasi membuat ekspresi COX akan meningkat, baik

COX 1 maupun COX-2. COX 1 merupakan enzim yang ditemukan di banyak sel dan jaringan normal, berperan pada fungsi fisiologis seperti sekresi mukus untuk melindungi mukosa pencernaan, hemostasis, penyembuhan luka, ovulasi, dan untuk memelihara fungsi ginjal. COX-2 baru akan terbentuk setelah diinduksi oleh sitokin dan mediator inflamasi lainnya di daerah inflamasi atau pada keadaan patologis lainnya.^{8,15,16}

Pada kelompok yang diinduksi LPS *E. coli* seharusnya paling banyak mengekspresikan COX-2. LPS *E. coli* bisa menginduksi inflamasi atau peradangan, kondisi inflamasi ini bisa menginduksikan ekspresi COX-2. Tetapi pada hasil penelitian ini, ekspresi COX-2 hanya sedikit, secara statistik tidak berbeda bermakna dengan kelompok kontrol. Hal ini diduga karena LPS *E. coli* akan menstimulasi monosit untuk menghasilkan mediator inflamasi, apabila mediator inflamasi tersebut dikeluarkan dalam jumlah berlebihan akan menyebabkan kerusakan jaringan dan akhirnya dapat membuat monosit lisis.¹⁷ Hasil ini diperkuat dengan hasil uji viabilitas yang sudah dilakukan penulis sebelumnya yang menunjukkan nilai viabilitas 24,56 %; berarti hanya ada sekitar 25 sel monosit yang hidup dari 100 sel monosit yang diamati pada kelompok yang diberi LPS. Sel yang lisis atau mati tidak dapat merespon antibodi COX-2 dan tidak dapat mengekspresikan COX-2, sehingga pada penelitian ini hasil ekspresi COX-2 pada kelompok yang hanya diinduksi LPS *E. coli* lebih rendah daripada kelompok yang diberi ekstrak daun singkong.

Potensi flavonoid dalam menekan inflamasi adalah dengan jalan memblokir siklus siklooksigenase (COX) dan lipoksigenase, sehingga sel radang yang bermigrasi terbatas dan tanda-tanda klinis peradangan berkurang. Flavonoid juga dapat bertindak melindungi lipid membran terhadap agen yang merusak.¹¹ Diduga aksi ini yang menjaga membran sel tidak mudah dirusak bakteri dan tetap berfungsi dengan baik.

Saponin selama ini diketahui dapat bekerja sebagai antibakteri. Ketika berinteraksi dengan sel bakteri, saponin dapat meningkatkan permeabilitas membran sel bakteri sehingga terjadi hemolisis sel bakteri. Saponin juga memiliki efek antiinflamasi yang hampir sama dengan flavonoid, memblokir jalur prostaglandin sebagai penghambat aktifasinya, namun tidak berpengaruh terhadap sintesisnya. Dengan dihambatnya pelepasan prostaglandin maka keluarannya sel radang dapat ditekan.¹¹ Adanya saponin dalam ekstrak daun singkong diduga dapat mendukung proses penyembuhan luka lebih cepat dengan meminimalisir kontaminasi bakteri sehingga epitel dapat bermitosis dan berproliferasi dengan baik.

Tannin dan triterpenoid diketahui memiliki aktivitas antioksidan pada beberapa tanaman obat.¹² Antioksidan berperan menangkap radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan membran sel. Cedera pada membran sel tersebut kemudian mengaktifkan histamin yang nantinya menjadi mediator sel radang.¹⁸ Antioksidan di dalam tannin dan triterpenoid diduga dapat mengurangi adanya radikal bebas yang dapat merusak membran sel dan mengurangi pelepasan mediator sel radang.

Pada penelitian ini, ekspresi COX-2 pada kelompok yang diberi ekstrak daun singkong lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol dan kelompok yang diinduksi LPS *E. coli*. Hal ini diduga karena sel monosit yang telah diberi ekstrak daun singkong lebih tahan terhadap induksi LPS *E. coli* sehingga banyak sel monosit yang hidup. Ekspresi COX-2 paling tinggi terdapat pada kelompok yang diberi ekstrak daun singkong 12,5% dibanding kelompok yang diberi ekstrak daun singkong 25%. Hal ini kemungkinan karena ekstrak daun singkong 25% mempunyai toksisitas yang lebih tinggi. Konsentrasi obat atau bahan alami yang besar dapat menyebabkan toksisitas yang besar pula, sehingga dapat melisis sel monosit. Semakin tinggi dosis saponin pada *Colocynth* (*Citrullus colocynthis*) yang diberikan pada tikus, maka kematian tikus semakin tinggi, dosis saponin 100 mg/kg berat badan bersifat toksik.¹⁹ Hal tersebut juga mungkin yang terjadi pada hasil penelitian ini, pemberian ekstrak dengan konsentrasi lebih tinggi menyebabkan turunnya viabilitas. Viabilitas monosit yang diinkubasi ekstrak daun singkong 25% lebih kecil jika dibandingkan dengan viabilitas monosit yang diinkubasi dengan ekstrak daun singkong 12,5%. Viabilitas sel monosit pada kelompok yang diberi ekstrak daun singkong 12,5% yaitu sebesar 62,65%, sedangkan viabilitas sel monosit yang diberi ekstrak daun singkong 25% hanya sebesar 43,44%. Pada penelitian *in vitro* ini sel monosit yang sudah lisis tidak dapat meregenerasi selnya kembali, dan juga karena waktu hidup monosit yang pendek disirkulasi darah hanya 8 jam, sehingga sel monosit yang lisis tersebut tidak dapat mengekspresikan COX-2.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak daun singkong (*Manihot utilissima*) tidak menghambat ekspresi enzim COX-2 pada monosit yang dipapar LPS *E. coli*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada Rektor dan Ketua Lembaga Penelitian Universitas Jember atas dana DIPA Universitas Jember tahun 2013 sehingga penelitian ini terlaksana.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kurniawati A. Hubungan kehamilan dan kesehatan periodontal. *J Biomed Unej* 2005; II(2): 43-51.
2. Djais AI. Periodontitis sebagai faktor resiko jantung koroner aterosklerosis. *J PDGI*. 2006; 56(2): 53-9.
3. Fitria E. Kadar IL-1B dan IL-8 sebagai penanda periodontitis, faktor resiko kelahiran prematur. *J PDGI* 2006; 56(2): 60-4.
4. Indahyani DE, Santoso AS, Utoro T. Pengaruh induksi lipopolisakarida (LPS) terhadap osteopontin tulang alveolaris tikus pada masa erupsi gigi. *Ind J Dent* 2007; 14(1): 2-7.
5. Susilowati H, Haniastuti T, Santoso AS. Produksi nitrat oksida dan aktivitas fagositosis makrofag mencit setelah stimulasi dengan lipopolisakarida. *Maj Ked Gigi* 2009; 16(1): 19-24.
6. Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. *Basic pathology*. 7th ed. Philadelphia: WB. Saunders Company; 2003. p. 33-78.
7. Tripathi KD. *Essentials of medical pharmacology*. 5th ed. New Delhi: Jaypee Brothers; 2003. p. 156-84.

8. Cicconetti A, Bartoli A, Ripari F, Ripari A. COX-2 selective inhibitors: a literature review of analgesic efficacy and safety in oral-maxillofacial surgery. *J Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97(2): 139-46.
9. Yendriwati. Kebutuhan vitamin C dan pengaruhnya terhadap kesehatan tubuh dan rongga mulut. *Dentika Dental Journal* 2006; II(1): 78-83.
10. Isgianto WA. Pengaruh vitamin C terhadap jumlah neutrofil PMN pada proses penyembuhan luka pada gingiva tikus (*Rattus norvegicus*). Skripsi. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember; 2005.
11. Robinson T. 1991. Kandungan organik tumbuhan tinggi. Edisi 6. Padmawinata K, editor. Bandung: ITB; 1995. h. 154, 191-3.
12. Adi LT. Tanaman obat dan jus untuk asam urat dan rematik. Jakarta: Agromedia Pustaka; 2006. h. 30-3.
13. Nurdiana AR. Potensi ekstrak daun singkong (*Manihot Esculanta*) terhadap jumlah neutrofil pada proses penyembuhan luka tikus wistar (*Rattus norvegicus*). Skripsi. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember; 2013.
14. Purwanto. Peran *Streptococcus mutans* dan monosit pada degradasi kolagen tipe IV dan agregasi platelet. Disertasi. Malang: Universitas Brawijaya; 2010.
15. Isbagio H. Peranan obat antiinflamasi non steroid terhadap nyeri dan inflamasi pada penyakit reumatik. *Cermin Dunia Kedokteran* 1992; No 78: 32-35
16. Goodman, Gilman. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 10th ed. Toronto: Mc Graw Hill; 2001. p. 687-71.
17. Newman MG, Carranza FA, Takei HH, Klokkevold PR. *Carranza's clinical periodontology*. 10th ed. Philadelphia: Saunders; 2006. p. 133-47.
18. Price SA, Wilson LM. 1995. Patofisiologi: konsep klinis proses-proses penyakit. Edisi 6. Pendi BU, editor. Jakarta: EGC; 2005. h. 35-46.
19. Diwan FH, Abdel-Hasan IA, Mohammed ST. Effect of saponin on mortality and histopathological changes in mice. *Eastern Mediterranean Health J* 2000; 6(2-3): 345-51.