

Uji Sitotoksik dan Anti-Inflamasi Ekstrak Buah Bengkuang (*Pachyrizus erosus* (L.) Urb.) terhadap Sel RAW 264.7 yang Distimulasi Lipopolisakarida

Wilvia Li, Novelya Li

Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Prima Indonesia Medan, Sumatera Utara, Indonesia
Email: wilviadrg@unprimdn.ac.id

Abstract: Jicama, cultivated in Indonesia, has the potential as an anti-inflammatory agent. In this study, cytotoxic test was tested to reveal the safety of jicama's flesh extract (JFE) to cells' viability, then the safe concentration of jicama's flesh extract was tested on LPS-induced RAW 264.7 cells to imitate inflammatory process. There were three kinds of ELISA tests being done to expose the anti-inflammatory activity of jicama, as follows: prostaglandin E₂ (PGE₂), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), and interleukin 1 β (IL-1 β). The results showed that JFE was safe in concentrations of 12.5 μ g/ml, 25.0 μ g/ml, and 50.0 μ g/ml. JFE with a concentration of 75.0 μ g/ml had a significant anti-inflammatory potential, shown by the ELISA test result towards PGE₂, TNF- α , and IL-1 β . Although JFE with a concentration of 12.5 μ g/ml also showed anti-inflammatory effects on TNF- α and IL-1 β , but there was no significant difference in PGE₂ compared to the positive control. In conclusion, JFE is safe in concentrations of 12.5 μ g/ml, 25.0 μ g/ml, and 50.0 μ g/ml. Moreover, JFE with a concentration of 75.0 μ g/ml had a significant anti-inflammatory potential.

Keywords: jicama's flesh extract, *Pachyrizus erosus*, cytotoxic effect, anti-inflammatory effect

Abstrak: Salah satu tanaman yang banyak dibudidayakan di Indonesia ialah buah bengkuang yang berpeluang untuk dimanfaatkan sebagai agen anti-inflamasi. Dalam penelitian ini, ekstrak buah bengkuang (EBB) diujikan terlebih dahulu sitotoksitasnya untuk mengetahui kadar ekstrak buah bengkuang yang aman untuk keberlangsungan hidup sel. Konsentrasi EBB yang aman pada uji sitotoksik dilanjutkan dengan pengujian pada sel RAW 264.7 (sel makrofag) yang distimulasi lipopolisakarida (LPS) untuk mengimitasi proses inflamasi. Dilakukan 3 jenis uji ELISA untuk mengetahui aktivitas anti-inflamasi ekstrak buah bengkuang, yaitu: Prostaglandin E₂ (PGE₂), *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF- α), dan Interleukin 1 β (IL-1 β). Hasil penelitian menunjukkan bahwa EBB aman pada konsentrasi 12,5 μ g/ml, 25,0 μ g/ml, dan 50,0 μ g/ml. Selain itu, EBB dengan konsentrasi 75,0 μ g/ml memiliki potensi anti-inflamasi yang bermakna, ditunjukkan dengan hasil uji ELISA terhadap protein PGE₂, TNF- α , dan IL-1 β . Konsentrasi 12,5 μ g/ml dari EBB juga memiliki potensi anti-inflamasi, ditunjukkan dengan hasil uji ELISA terhadap TNF- α dan IL-1 β , namun tidak memiliki perbedaan bermakna terhadap penurunan PGE₂ bila dibandingkan dengan kontrol positif. Simpulan penelitian ini ialah EBB aman pada konsentrasi 12,5 μ g/ml, 25,0 μ g/ml, dan 50,0 μ g/ml melalui uji sitotoksik. Selain itu, EBB 75,0 μ g/ml memiliki potensi anti-inflamasi yang bermakna.

Kata kunci: ekstrak buah bengkuang; *Pachyrizus erosus*, sitotoksik, anti-inflamasi

PENDAHULUAN

Inflamasi merupakan respon sistem kekebalan tubuh terhadap infeksi dan luka. Inflamasi bertujuan untuk menghilangkan faktor penyerang dan mengembalikan struktur dan fungsi fisiologik tubuh. Proses

inflamasi dapat melibatkan berbagai mediator, antara lain prostaglandin E₂ (PGE₂). Pada proses inflamasi, PGE₂ terlibat dalam semua proses yang menyebabkan tanda-tanda inflamasi, yaitu kemerahan, pembengkakan, dan nyeri. Kemerahan dan

edema merupakan hasil dari peningkatan laju darah ke daerah inflamasi melalui augmentasi yang dimediasi oleh PGE₂ pada dilatasi arteri dan meningkatnya permeabilitas mikrovaskular.^{1,2} Interleukin 1 β (IL-1 β) dapat memfasilitasi aktivitas sinapsis dan transmisi nyeri, dan berkontribusi pada perkembangan nyeri kronis. Sitokin IL-1 β merupakan mediator utama pada respon inflamasi yang dapat mengeksaserbasi kerusakan pada penyakit kronis dan luka pada jaringan. Inhibisi IL-1 β dapat dijadikan sebagai metode yang efektif untuk manajemen nyeri dan inflamasi pada berbagai kondisi.^{3,4} Selain PGE₂ dan IL-1 β , terdapat juga agen pro-inflamasi lainnya, seperti *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α). TNF- α dilepaskan sesegera mungkin setelah terjadi trauma, infeksi, atau terkspos ke lipopolisakarida (LPS) yang dibawa oleh bakteri dan sebagai salah satu mediator awal yang paling banyak pada jaringan terinflamasi. Dari berbagai fungsinya, peran terpenting TNF- α ialah mengendalikan keberlangsungan produksi sitokin pro-inflamasi. TNF- α dikenal sebagai “*master regulator*” pada produksi sitokin pro-inflamasi dan juga berperan meningkatkan mediator transduksi signal lipid seperti prostaglandin dan *platelet activating factor*. Berdasarkan peran tersebut, TNF- α merupakan pemain utama dalam pengaktifan dan perekrutan sel inflamasi dan mempunyai peran penting dalam berkembangnya berbagai penyakit inflamasi kronis.⁵

Obat yang paling sering digunakan untuk mengobati proses peradangan (inflamasi) ialah *non-steroidal anti-inflammatory drugs* (NSAIDs). Namun, NSAIDs memiliki banyak efek samping yang cukup merugikan, seperti pendarahan pada saluran cerna, hipertensi, *stroke*, dan toksisitas pada ginjal.^{6,7} Bahan alami saat ini banyak dikembangkan untuk mengatasi hal tersebut. Salah satu senyawa yang banyak digunakan dalam bidang kesehatan yaitu flavonoid. Flavonoid merupakan kelompok senyawa fenol yang banyak terdapat pada tumbuh-tumbuhan dan jamur. Sifat yang dimiliki oleh flavonoid antara lain sebagai antioksidan, antimikroba, dan anti-inflamasi. Sebagai turunan dari flavonoid, iso-

flavon juga memiliki sifat antioksidan, antikanker, antimikroba, dan anti-inflamasi. Salah satu tanaman yang banyak ditemukan di Indonesia dan mengandung isoflavon ialah bengkuang.^{8,9}

Saat ini, bengkuang telah banyak dimanfaatkan untuk peningkatan kesehatan dan juga kecantikan. Berbagai khasiat bengkuang ialah untuk mengobati batu ginjal dan empedu, memperlancar pencernaan dan mencegah terjadinya konstipasi, menghentikan diare, mengobati luka bakar, menghambat terjadinya kanker, melembabkan kulit, dan menjaga kesehatan kulit.¹⁰

Bengkuang memiliki berbagai jenis kandungan asam amino, di antaranya ialah isoleukin, leukin, lisin, metionin, sistein, fenilalanin, tirosin, treonin, triptofan, valin, histidin, arginin, alanin, asam aspartik, asam glutamik, glisin, prolin, dan serin.¹¹ Dari semua kandungan asam amino tersebut, banyak di antaranya yang dapat dikaji kegunaannya sebagai agen anti-inflamasi. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian mengenai efektivitas ekstrak buah bengkuang terhadap reaksi inflamasi yang dapat digunakan sebagai alternatif untuk mempercepat penyembuhan proses inflamasi.

METODE PENELITIAN

Pada penelitian ini dilakukan kultur sel RAW 264.7 (sel makrofag) terlebih dahulu, kemudian dilanjutkan dengan uji sitotoksik dan uji anti-inflamasi. Terdapat tiga 3 jenis uji ELISA yang dilakukan untuk mengetahui aktivitas anti-inflamasi ekstrak buah bengkuang (EBB), yaitu: prostaglandin E₂ (PGE₂), *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α), dan interleukin 1 β (IL-1 β).

Pada kultur sel RAW 264.7, sel-sel tersebut diambil dari tangki nitrogen cair dan dicairkan dalam *ultrasonic cleaner* dengan suhu 37°C selama 2 menit. Sel-sel kemudian dimasukkan ke dalam *centrifuge tube* yang sudah berisi medium kultur sel dan disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 1600 rpm. Supernatan dibuang dan pelet diresuspensi dengan 4 ml medium kultur. Suspensi sel dimasukkan pada *flask* dan diinkubasi dalam inkubator 5% CO₂ bersuhu 37°C. Sel-sel yang telah tumbuh pada *flask*

diamati di bawah mikroskop *inverted* hingga tinggi *confluent* sekitar 70-80%. Medium kultur dibuang kemudian dibilas dengan *phosphate-buffered saline* (PBS), ditambahkan 2 ml medium kultur baru dan sel yang menempel dilepaskan dengan bantuan *scraper*. Untuk memastikan sel sudah benar-benar terlepas dari dasar *flask*, digunakan mikroskop *inverted*. Sel-sel dimasukkan ke dalam *centrifuge tube* dan disentrifugasi. Supernatan dibuang dan pelet diresuspensi dengan 1 ml medium kultur, kemudian suspensi sel dibagi ke dalam 2 buah *flask* dan diinkubasi. Selama perawatan sel, medium pertumbuhan diganti atau ditambah setiap 2-3 hari sekali.

Pada uji sitotoksik, sel-sel dihitung dengan menggunakan *hemocytometer*. Sel-sel ditanam dengan kepadatan 5×10^3 sel *well* pada 96 *well plate*, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, 5% CO₂. Medium kultur diganti dengan yang baru sebanyak 180 µl dan ditambahkan sampel EBB sebanyak 20 µl pada setiap *well*. Konsentrasi sampel EBB yang digunakan dalam uji ini ialah 12,5 µg/mL, 25,0 µg/mL, 50,0 µg/mL, dan 100,0 µg/mL. Selanjutnya sel diinkubasi selama 24 jam, kemudian ditambahkan 20 µl MTS pada tiap *well*, dan diinkubasi selama 3 jam. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometri yang dibaca pada panjang gelombang 490 nm.

Pada uji anti-inflamasi, sel-sel dihitung dengan menggunakan *hemocytometer*. Sel-sel ditanam dengan kepadatan 1×10^6 sel/*well* pada 6 *well plate*, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu inkubator 37°C, 5% CO₂. Medium kultur diganti dengan yang baru sebanyak 1600 ul dan ditambahkan sampel EBB 200 ul pada setiap *well*. Konsentrasi sampel EBB yang digunakan dalam uji ini ialah 12,5 µg/mL dan 75,0 µg/mL. Sel selanjutnya diinkubasi selama 1-2 jam. Tambahkan 200 ul LPS 1 ug/ml dan diinkubasi selama 24 jam. *Conditioned medium* (CM) dikumpulkan masing-masing ke dalam tube 1,5 ml dan disimpan pada suhu -80°C untuk digunakan selanjutnya. CM yang akan digunakan untuk pengujian terlebih dahulu disentrifugasi dengan kecepatan 2000 xg selama 10 menit untuk

memperoleh supernatan tanpa sel. Larutan standar dimasukkan ke dalam *well* masing-masing dua kali sebanyak 100 µL, kemudian ditutup dengan *seal* dan diinkubasi selama 90 menit. Larutan dibuang dan ditambahkan larutan *biotinylated detection Ab* dan ditutup kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Kemudian larutan dibuang lalu dicuci dengan *wash buffer*, ditunggu 1-2 menit lalu dibuang. Prosedur tersebut diulangi sebanyak tiga kali. Setelah bersih, ditambahkan 100 µL/*well* *HRP conjugate* lalu *plate* ditutup dan diinkubasi selama 30 menit. *Plate* dicuci sebanyak lima kali lalu ditambahkan 90 µL/*well* substrat lalu diinkubasi 15 menit dan ditunggu sampai terjadi perubahan warna. Jika belum berubah, ditambahkan waktu inkubasi tetapi tidak sampai 30 menit. Selanjutnya ditambahkan 50 µL/*well* *stop solution* pada setiap *well* dan diukur *Optical Density* (OD) pada 450 nm menggunakan spektrofotometer.

HASIL PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan uji sitotoksik ekstrak buah bengkuang (EBB) pada sel RAW 264.7 dengan lima kelompok konsentrasi EBB yang berbeda, yaitu kelompok kontrol (tidak diberi EBB), EBB 12,5 µg/mL, EBB 25,0 µg/mL, EBB 50,0 µg/mL, dan EBB 100,0 µg/mL. Pengamatan pada kelima kelompok tersebut dilakukan menggunakan mikroskop *inverted* (Olympus CKX41-F32FL) dengan perbesaran 40x. Gambar 1 memperlihatkan sel RAW 264.7 normal (kelompok kontrol). Gambar 2, 3, dan 4 memperlihatkan kelompok EBB 12,5 µg/mL, EBB 25 µg/mL, dan EBB 50 µg/mL secara berurutan dengan adanya penambahan jumlah sel RAW 264.7. Berbeda halnya dengan Gambar 5 yang memperlihatkan terdapatnya kematian sel.

Tabel 1 memperlihatkan hasil uji sitotoksik dari EBB pada sel RAW 264.7. Terlihat bahwa kelompok EBB konsentrasi 12,5 µg/mL, 25,0 µg/mL, dan 50,0 µg/mL memiliki rerata viabilitas sel di atas 100%, namun pada kelompok dengan konsentrasi 100 µg/mL, rerata viabilitas sel mengalami penurunan menjadi 85,96%.

Tabel 1. Hasil uji sitotoksik ekstrak buah bengkuang (EBB) pada sel RAW 264.7

Sampel	Rerata viabilitas sel (%) ± SD
Kontrol sel	100,00 ± 2,45
EBB 12,5 µg/mL	111,58 ± 3,15
EBB 25,0 µg/mL	109,51 ± 1,78
EBB 50,0 µg/mL	106,69 ± 5,03
EBB 100,0 µg/mL	85,96 ± 4,57



Gambar 1. Sel RAW 264.7 normal dengan pembesaran 40x (kelompok kontrol)



Gambar 2. Sel RAW 264.7 diberikan EBB 12,5 µg/mL dengan pembesaran 40x



Gambar 3. Sel RAW 264.7 diberikan EBB 25,0 µg/mL dengan pembesaran 40x



Gambar 4. Sel RAW 264.7 diberikan EBB 50,0 µg/mL dengan pembesaran 40x



Gambar 5. Sel RAW 264.7 diberikan EBB 100,0 µg/mL dengan pembesaran 40x

Tabel 2 memperlihatkan hasil uji ELISA PGE₂. Terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$) dari konsentrasi protein PGE₂ pada sel RAW 264.7 setelah diinduksi EBB 75 µg/mL bila dibandingkan dengan kontrol positif (sel yang telah diinduksi LPS, tanpa diberi ekstrak), namun, induksi EBB 12,5 µg/mL tidak menunjukkan perbedaan bermakna terhadap kontrol positif.

Tabel 3 memperlihatkan hasil uji ELISA TNF- α pada sel RAW 264.7 setelah diinduksi dengan EBB. Hasil analisis statistik mendapatkan bahwa baik kelompok EBB 75 µg/ml maupun kelompok EBB 12,5

µg/ml memiliki perbedaan bermakna terhadap kelompok kontrol positif, yang berarti kedua kelompok tersebut efektif untuk menurunkan konsentrasi protein TNF- α , tetapi apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif, tidak terdapat perbedaan bermakna pada kelompok EBB 75 µg/ml. Hal ini menunjukkan bahwa EBB 75 µg/ml sangat efektif untuk menurunkan protein TNF- α hingga mendekati kelompok kontrol negatif (sel-sel yang tidak diinduksi dengan LPS).

Tabel 4 memperlihatkan hasil uji ELISA IL-1 β pada sel RAW 264.7 setelah

diinduksi dengan EBB. Terlihat bahwa EBB 75 µg/ml memiliki nilai rerata konsentrasi IL-1β yang lebih rendah bila dibandingkan dengan EBB 12,5 µg/ml dan kontrol positif, tetapi tidak terdapat perbedaan bermakna antara kelompok EBB 75 µg/ml dengan kelompok kontrol negatif. Hal ini berarti EBB 75 µg/ml sangat efektif untuk menurunkan IL-1β. Kelompok EBB 12,5 µg/ml juga memiliki perbedaan bermakna terhadap kelompok kontrol positif. Secara keseluruhan, seluruh kelompok yang diberi ekstrak buah bengkuang memiliki perbedaan bermakna terhadap kelompok kontrol positif, yang berarti bahwa semua kelompok tersebut memberikan efek terhadap penurunan konsentrasi IL-1β.

Pengamatan sel secara mikroskopik

dilakukan dengan menggunakan mikroskop *inverted* (Olympus CKX41-F32FL) perbesaran 40x. Gambar 6 memperlihatkan sel RAW 264.7 yang tidak diinduksi dengan LPS (kontrol negatif) sedangkan Gambar 7 memperlihatkan sel RAW 264.7 yang diinduksi oleh LPS untuk menciptakan situasi inflamasi (kontrol positif). Gambar 8 memperlihatkan kelompok sel RAW 264.7 yang diinduksi LPS dan diberikan EBB 12,5 µg/ml; tampak sel RAW 264.7 yang lebih padat bila dibandingkan dengan kelompok positif. Gambar 9 memperlihatkan kelompok sel RAW 264.7 yang diinduksi LPS dan diberikan EBB 75 µg/ml; tampak bahwa pada kelompok tersebut memiliki kepadatan sel yang hampir menyerupai kelompok kontrol negatif.

Tabel 2. Konsentrasi protein PGE₂ pada sel RAW 264.7 setelah diberikan EBB

Sampel	Konsentrasi PGE-2 (pg/mL) ± SD	% Inhibisi terhadap Kontrol positif ± SD
Kontrol Positif	872,72 ± 36,4 ^a	0,00 ± 4,18 ^a
Kontrol Negatif	408,54 ± 14,54 ^b	53,19 ± 1,67 ^b
EBB 12,5 µg/mL	859,02 ± 45,18 ^a	1,57 ± 5,12 ^a
EBB 75 µg/mL	584,09 ± 18,29 ^c	33,07 ± 2,10 ^c

* Data disajikan dalam rerata ± SD. Tanda superskrip yang berbeda (a, b, c, d) menunjukkan perbedaan bermakna (p<0,05) Tukey HSD post hoc test

Tabel 3. Konsentrasi protein TNF-α pada sel RAW 264.7 setelah diberikan EBB

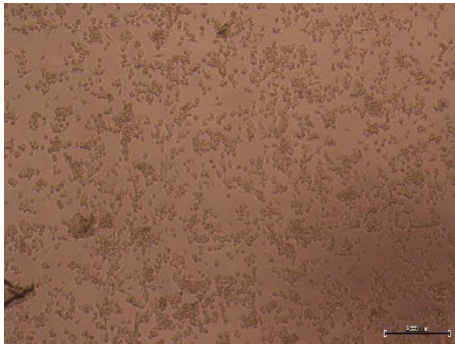
Sampel	Konsentrasi TNF-α (pg/mL) ± SD	% Inhibisi terhadap Kontrol positif ± SD
Kontrol Positif	580,02 ± 16,85 ^a	0,00 ± 2,91 ^a
Kontrol Negatif	244,38 ± 2,60 ^b	57,87 ± 0,45 ^b
EBB 12,5 µg/mL	447,33 ± 58,45 ^c	22,87 ± 10,08 ^c
EBB 75 µg/mL	281,31 ± 46,98 ^b	51,50 ± 8,10 ^b

* Data disajikan dalam rerata ± SD. Tanda superskrip yang berbeda (a, b, c, d) menunjukkan perbedaan bermakna (p<0,05) Tukey HSD post hoc test

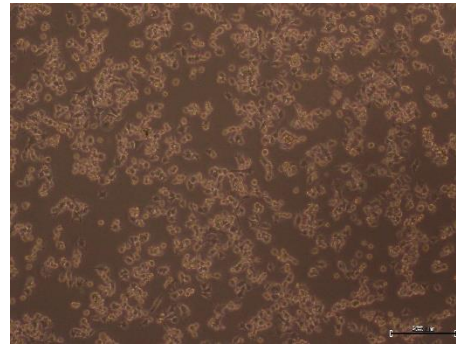
Tabel 4. Konsentrasi protein IL-1β pada sel RAW 264.7 setelah diberikan EBB

Sampel	Konsentrasi IL-1β (pg/mL) ± SD	% Inhibisi terhadap Kontrol positif ± SD
Kontrol Positif	580,02 ± 16,85 ^a	0,00 ± 2,91 ^a
Kontrol Negatif	244,38 ± 2,60 ^b	57,87 ± 0,45 ^b
EBB 12,5 µg/mL	447,33 ± 58,45 ^c	22,87 ± 10,08 ^c
EBB 75 µg/mL	281,31 ± 46,98 ^b	51,50 ± 8,10 ^b

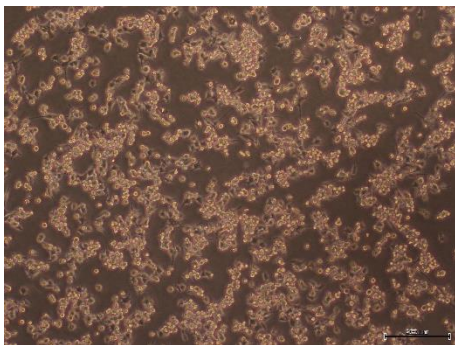
* Data disajikan dalam rerata ± SD. Tanda superskrip yang berbeda (a, b, c, d) menunjukkan perbedaan bermakna (p<0,05) Tukey HSD post hoc test



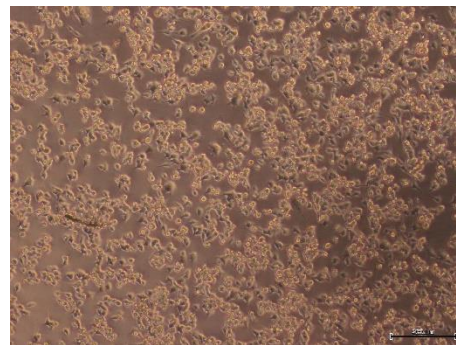
Gambar 6. Kontrol negatif sel RAW 264.7 yang tidak diinduksi LPS (perbesaran 40x)



Gambar 7. Kontrol positif sel RAW 264.7 setelah diinduksi LPS (perbesaran 40x)



Gambar 8. Sel RAW 264.7 setelah diinduksi LPS dan ditambahkan EBB 12,5 µg/mL (perbesaran 40x)



Gambar 9. Sel RAW 264.7 setelah diinduksi LPS dan ditambahkan EBB 75 µg/mL (perbesaran 40x)

BAHASAN

Sitotoksitas merupakan salah satu indikator penting untuk evaluasi penelitian *in vitro*.¹² Tingkat viabilitas sel dan/atau laju proliferasi sel merupakan indikator untuk melihat kesehatan sel. Agen mekanik dan kimiawi dapat memengaruhi kesehatan sel dan metabolisme. Agen tersebut dapat menyebabkan toksisitas pada sel melalui berbagai mekanisme yang berbeda-beda, seperti kerusakan membran sel, mencegah sintesis protein, ikatan ireversibel pada reseptor, inhibisi elongasi polideoksinukleotid, dan reaksi enzimatik.¹³

Substrat yang menunjukkan sifat non-toksik ditunjukkan oleh uji sitotoksitas MTS, yang mencatat nilai viabilitas sel di atas 90%.¹⁴ Pada hasil penelitian, kelompok kontrol, EBB 12,5 µg/mL, EBB 25,0 µg/mL, dan EBB 50,0 µg/mL memiliki nilai viabilitas sel di atas 90%, yang berarti EBB dengan ketiga konsentrasi tersebut aman untuk keberlangsungan hidup sel. Namun pada kelompok EBB 100,0 µg/mL, nilai

viabilitasnya berada di bawah 90%, yaitu 85,96%. Berdasarkan analisis regresi polinomial orde 2, konsentrasi ekstrak baik pada kulit maupun buah bengkuang sebesar 75 µg/mL menunjukkan viabilitas yang tinggi (>90%). Oleh karena itu, konsentrasi yang digunakan untuk penelitian selanjutnya ialah 12,5 µg/mL sebagai konsentrasi terendah dengan viabilitas yang tinggi dan 75 µg/mL sebagai konsentrasi yang tertinggi dengan viabilitas yang tinggi.

PGE₂ dapat berperan sebagai pro-inflamasi maupun anti-inflamasi. Sebagai agen pro-inflamasi, PGE₂ dapat berfungsi pada tingkatan seluler maupun molekuler. Pada tingkat seluler, PGE₂ dapat menekan fungsi neutrofil, mereprogram makrofag teraktivasi secara klasik (M1) menjadi makrofag teraktivasi secara alternatif, dan mengubah arah diferensiasi monosit-ke-makrofag menjadi M2. Pada tingkat molekuler, PGE₂ dapat meregulasi inflamasi melalui penghambatan ekspresi CCL5 pada makrofag teraktivasi, menekan makrofag

dan ekspresi *synovial fibroblast* TFN- α , serta menghambat aktivasi NF-kB.² Dari hasil penelitian yang dilakukan dapat terlihat bahwa EBB 12,5 $\mu\text{g/mL}$ tidak menunjukkan perbedaan bermakna bila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Namun, EBB konsentrasi 75 $\mu\text{g/mL}$ memiliki perbedaan bermakna terhadap kelompok kontrol positif, kontrol negatif, maupun EBB 12,5 $\mu\text{g/mL}$. Hal ini menunjukkan bahwa EBB 12,5 $\mu\text{g/mL}$ tidak efektif untuk menurunkan kadar PGE₂, namun pada konsentrasi 75,0 $\mu\text{g/mL}$, EBB dapat digunakan untuk menurunkan kadar PGE₂.

Konsentrasi TNF- α pada sel RAW 264.7 setelah diberikan EBB, baik dengan konsentrasi 12,5 $\mu\text{g/mL}$ maupun 75,0 $\mu\text{g/mL}$ memiliki perbedaan bermakna terhadap kelompok kontrol positif yang menunjukkan bahwa kedua kelompok EBB tersebut memiliki potensi untuk menurunkan kadar TNF- α . Namun, kelompok EBB 75,0 $\mu\text{g/mL}$ tidak memiliki perbedaan bermakna terhadap kelompok kontrol negatif, yang artinya kelompok tersebut sangat efektif menurunkan kadar TNF- α hingga menyerupai keadaan tanpa inflamasi (tidak diinduksi oleh LPS). Apabila terjadi penurunan pada TNF- α , maka respon inflamasi juga akan semakin menurun. TNF- α merupakan sitokin yang mengoordinasi proses inflamasi dengan meningkatkan regulasi sitokin pro-inflamasi lainnya, seperti IL-6 dan IL-1, menginduksi angiogenesis, mengaktifasi transkripsi faktor NF-kB, dan menstimulasi produksi NO. Oleh karena itu, TNF- α sering digunakan sebagai target dari agen anti-inflamasi.^{15,16}

Sebagian besar IL-1 β disintesis oleh makrofag dan memiliki aktivitas serta efek pada inflamasi. IL-1 β dapat menginisiasi dan meningkatkan respon inflamasi terhadap infeksi mikrobial, selain itu dapat menginduksi terjadinya demam.¹⁵ Pada penelitian ini, didapatkan hasil bahwa kelompok EBB 12,5 $\mu\text{g/mL}$ dan 75,0 $\mu\text{g/mL}$ yang diinduksikan ke sel RAW 264.7 yang telah diinduksi LPS memiliki perbedaan bermakna terhadap kelompok kontrol positif, yang berarti bahwa kedua kelompok tersebut efektif untuk menurunkan kadar IL-1 β . Bila kedua

kelompok tersebut dibandingkan, kelompok EBB 75,0 $\mu\text{g/mL}$ dapat menghasilkan kadar IL-1 β yang lebih rendah daripada kelompok EBB 12,5 $\mu\text{g/mL}$. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok EBB 75,0 $\mu\text{g/mL}$ lebih efektif untuk menekan kadar IL-1 β .

Dari keseluruhan hasil penelitian uji anti-inflamasi yang telah dilakukan, terlihat bahwa EBB, terutama kelompok EBB konsentrasi 75,0 $\mu\text{g/mL}$ dapat bertindak sebagai agen anti-inflamasi dengan cara menurunkan kadar PGE₂, TNF- α , dan IL-1 β . Hal ini didukung dengan penelitian yang menyatakan bahwa buah bengkuang mengandung asam askorbat yang melimpah.¹⁷ Asam askorbat, atau yang sering dikenal dengan vitamin C memiliki sifat anti-inflamasi dan menstimulasi perbaikan jaringan dengan memodulasi pelepasan sitokin inflamasi, kemotaksis sel imun, dan aktivasi fagositosis.^{18,19}

Selain itu, buah bengkuang juga mengandung tiamin, riboflavin, piridoksin, niasin, dan asam folat.¹⁷ Tiamin (vitamin B1), riboflavin (vitamin B2), dan piridoksin (vitamin B6) dapat mengeksaserbasi aktivitas anti-inflamasi serta menekan sitokin pro-inflamasi TNF- α dan IL-6.^{20,21} Vitamin B3 (niasin) juga memiliki efek anti-inflamasi dengan menekan adhesi dan akumulasi monosit/makrofag.²²

SIMPULAN

Hasil uji sitotoksik menunjukkan bahwa EBB aman pada konsentrasi 12,5 $\mu\text{g/mL}$, 25,0 $\mu\text{g/mL}$, dan 50,0 $\mu\text{g/mL}$. Selain itu, EBB 75,0 $\mu\text{g/mL}$ memiliki potensi anti-inflamasi yang bermakna, ditunjukkan dengan adanya penghambatan aktivitas protein PGE₂, TNF- α , dan IL-1 β . Walaupun EBB 12,5 $\mu\text{g/mL}$ juga memiliki efek anti-inflamasi yang bermakna pada penurunan TNF- α dan IL-1 β , tetapi tidak terdapat penurunan bermakna terhadap PGE₂.

Ucapan terima kasih

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat, Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi

Republik Indonesia atas bantuan dana hibah untuk penelitian dosen pemula.

Konflik Kepentingan

Penulis menyatakan tidak terdapat konflik kepentingan dalam studi ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ricciotti E, Fitzgerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(5):986-1000.
2. Frolov A, Yang L, Dong H, Hammock BD, Crofford LJ. Anti-inflammatory properties of prostaglandin E2: Deletion of microsomal prostaglandin E synthase-1 exacerbates non-immune inflammatory arthritis in mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids.* 2013;89(5):351-8.
3. Ren K, Torres R. Role of interleukin-1 β during pain and inflammation. *Brain Res Rev* [Internet]. 2009;60(1):57-64. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
4. Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. 2011;22(4):189-95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.10.001>
5. Parameswaran N, Patial S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2010;20(2):87-103.
6. Wongrakpanich S, Wongrakpanich A, Melhado K, Rangaswami. A comprehensive review of non-steroidal anti-inflammatory drug use in the elderly. *Aging Dis.* 2018;9(1):143-50.
7. Cluett J. Best anti-inflammatory medication [Internet]. 2020. Available from: <https://www.verywellhealth.com/best-anti-inflammatory-medication-2548734>
8. Lukitaningsih E. Bioactive compounds in bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) as antioxidant and tyrosinase inhibiting agents. *Indones J Pharm.* 2014;25(2):68.
9. Yu J, Bi X, Yu B, Chen D. Isoflavones: Anti-inflammatory benefit and possible caveats. *Nutrients.* 2016;8(6):1-16.
10. Wongsowijoyo HS. Umbi-Umbi Berkhasiat Obat. Yogyakarta: LeutikaPrio, 2014.
11. Kisambira A, Muyonga JH, Byaruhanga YB, Tukamuhabwa P, Tumwegamire S, Gruenberg W. Physicochemical characteristics of yam bean (*Pachyrhizus erosus*) seed proteins. *J Food Res.* 2014; 3(6):168.
12. Aslanturk OS. In vitro cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages. In: Larramendy ML, Soloneski S, editors. *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World.* IntechOpen, 2018.
13. Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ueno K. A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol Pharm Bull.* 1996;19(11):1518-20.
14. Laksmiawati DR, Prasanti AP, Larasinta N, Syauta GA, Hilda R, Ramadaniati HU, et al. Anti-inflammatory potential of gandarusa (*Gendarussa vulgaris nees*) and sour-soup (*Annona muricata L*) extracts in LPS stimulated-macrophage cell (RAW264.7). *J Nat Remedies.* 2016;16(2):73-81.
15. Novilla A, Djamhuri DS, Nurhayati B, Rihibiha DD, Afifah E, Widowati W. Anti-inflammatory properties of oolong tea (*Camellia sinensis*) ethanol extract and epigallocatechin gallate in LPS-induced RAW 264.7 cells. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2017;7(11):1005-9.
16. Dewi K, Widyarto B, Erawijantari P, Widowati W. In vitro study of *Myristica fragrans* seed (Nutmeg) ethanolic extract and quercetin compound as anti-inflammatory agent. *Int J Res Med Sci.* 2015;3(9):2303-10.
17. Noman ASM, Hoque MA, Haque MM, Pervin F, Karim MR. Nutritional and anti-nutritional components in *Pachyrhizus erosus L. tuber.* *Food Chem.* 2007; 102(4):1112-8.
18. Ströhle A, Wolters M, Hahn A. Micro-nutrients at the interface between inflammation and infection - ascorbic acid and calciferol. part 1: General overview with a focus on ascorbic acid. *Inflamm Allergy - Drug Targets.* 2011;10(1):5463.
19. Yussif NM, Abdul Aziz MA, Abdel Rahman AR. Evaluation of the anti-inflammatory effect of locally delivered Vitamin C in the treatment of persistent gingival inflammation: Clinical and histopathological study. *J Nutr Metab.* 2016;2016(Figure 1).
20. Menezes RR, Godin AM, Rodrigues FF, Coura GME, Melo ISF, Brito AMS, et al. Thiamine and riboflavin inhibit production of cytokines and increase the anti-

- inflammatory activity of a corticosteroid in a chronic model of inflammation induced by complete Freund's adjuvant. *Pharmacol Reports*. 2017;69:1036-43.
21. Huang S-C, Wei JC-C, Wu DJ, Huang Y-C. Vitamin B6 supplementation improves pro-inflammatory responses in patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Clin Nutr*. 2010;64:1007-13.
22. Si Y, Zhang Y, Zhao J, Guo S, Zhai L, Yao S, et al. Niacin inhibits vascular inflammation via downregulating nuclear transcription factor- κ B signaling pathway. *Mediators Inflamm*. 2014;2014.