



**POTENSI EKSTRAK DAUN SINGKONG (*Manihot Esculenta*) TERHADAP
EKSPRESI COX-2 PADA NEUTROFIL YANG DIPAPAR LPS *Escherecia*
*Colli***

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk
meraih gelar Sarjana Kedokteran Gigi (S1) pada Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Jember

Oleh :

Dinar Prafitasari Dewi

NIM 101610101068

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS JEMBER

2016

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT atas kemudahan, rahmat dan berkah yang tiada habisnya sepanjang hidup dan kelancaran dari pembuatan skripsi ini;
2. Rasulullah Muhammad SAW, yang menjadi panutan saya baik didunia maupun di akhirat;
3. Kepada kedua orang tuaku tercinta, Bapak Mashuri dan Ibu Wiyati terima kasih atas semua doa yang selalu menyertai di setiap waktunya, serta telah mendidik, mengasihi, memberi semangat kepada saya yang tak pernah putus;
4. Kepada kedua dosen pembimbing drg. Zahara Meilawaty, M.Kes dan drg. Abdul Rochim, M.Kes, MMR yang dengan sabarnya membimbing saya sampai selesai;
5. Kepada kedua dosen penguji drg. Pudji Astuti, M.Kes dan drg. Ekiyantini yang memberikan kritik dan saran yang bermanfaat ;
6. Dosen-dosen Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang telah memberikan ilmu yang bermanfaat selama ini;
7. Guru-guruku tercinta yang telah mendidik saya untuk menjadi manusia yang berilmu dan bertakwa;
8. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember atas seluruh kesempatan menimba ilmu yang berharga ini;

MOTTO

” Barang siapa bertakwa kepada Allah maka Dia akan menjadikan jalan keluar baginya, dan memberinya rizki dari jalan yang tidak ia sangka, dan barang siapa yang bertawakkal kepada Allah maka cukuplah Allah baginya, Sesungguhnya Allah melaksanakan kehendak-Nya, Dia telah menjadikan untuk setiap sesuatu kadarnya”

*(Q.S. Ath-Thalaq: 2-3)**

*“Kejarlah akheratmu maka akan kau dapatkan duniamu” ***

**)* Mushaf Al Qur'an dan Terjemahannya Departemen Agama RI. 2010. Al Qur'an dan Terjemahan Indonesia. Bandung: Diponegoro.

***)* Dinar Prafita Sari Dewi

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Dinar Prafita Sari Dewi

NIM : 101610101068

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya tulis ilmiah yang berjudul “Potensi ekstrak daun singkong terhadap ekspresi COX-2 pada neutrofil yang dipapar LPS *E. Colli*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikao ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 17 Maret 2016
Yang menyatakan,

Dinar Prafita Sari Dewi
NIM 101610101068

SKRIPSI

**POTENSI EKSTRAK DAUN SINGKONG TERHADAP EKSPRESI COX-2
PADA NEUTROFIL YANG DIPAPAR LPS *E. Colli***

Oleh:

Dinar Prafita Sari Dewi

NIM 101610101068

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : drg. Zahara Meilawaty, M. Kes

Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Abdul Rochim, M. Kes. MMR

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Potensi ekstrak daun singkong terhadap ekspresi COX-2 pada neutrofil yang dipapar LPS *E. Colli*” telah diuji dan di sahkan pada:

hari, tanggal : 17 Maret 2016

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Tim Penguji:

Ketua

Anggota

drg. Pudji Astuti, M. Kes
NIP. 19681020196012001

drg. Ekiyantini Widyowati
NIP. 195809191993932001

Pembimbing Utama

Pembimbing Pendamping

drg. Zahara Meilawaty, M.Kes
NIP. 198005272008122002

drg. Abdul Rochim, M.Kes, M.MR
NIP. 195804301987031002

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi,

Universitas Jember,

drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes, Sp.Prof
NIP 196901121996011001

RINGKASAN

Potensi Ekstrak Daun Singkong (*Manihot Esculenta*) terhadap ekspresi COX-2 pada neutrofil yang dipapar LPS *E. coli*; Dinar Prafita Sari Dewi; 101610101068; 2016; 54 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Enzim COX-2 merupakan enzim yang terinduksi pada sel yang mengalami inflamasi oleh sitokin, endotoksin, dan faktor pertumbuhan (*growth factors*). Pada fase seluler awal proses inflamasi, sel pertama yang secara kimia tertarik ke daerah inflamasi adalah neutrofil. Inflamasi dapat terjadi disebabkan oleh bakteri yang memproduksi toksin sehingga akan menghancurkan epitel dari sel dan jaringan. Bakteri tersebut akan menghasilkan suatu endotoksin berupa lipopolisakarida (LPS).

Manihot esculenta yang biasa dikenal sebagai tanaman singkong dapat berfungsi sebagai tanaman tradisional. Daun singkong mengandung flavonoid, yang diperkirakan memiliki efek anti inflamasi dan analgesik.

Tujuan dari penelitian adalah mengetahui adanya potensi ekstrak daun singkong terhadap ekspresi COX-2 pada neutrofil yang dipapar LPS *E. Colli*. Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian adalah *the post test group design*. Penelitian dilakukan pada bulan April 2014, bertempat di Laboratorium Bioscience dan Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Pembuatan ekstrak daun singkong menggunakan metode remaserasi, kemudian diencerkan menjadi konsentrasi 12,5% dan 25%. Sampel yang digunakan dari darah vena perifer orang sehat. Penelitian dibagi menjadi 4 kelompok. Penghitungan dilakukan menggunakan mikroskop inverted perbesaran 1000x.

Data dianalisis menggunakan uji parametrik One Way Anova dan uji LSD. Data yang dihasilkan terdapat perbedaan bermakna ($\alpha > 0,05$) antar kelompok kontrol dan antara kelompok kontrol dan perlakuan, tetapi tidak terdapat perbedaan antar kelompok perlakuan. Konsentrasi ekstrak daun singkong yang paling banyak mengekspresikan COX-2 adalah 12,5%.

PRAKATA

Puji syukur diucapkan kepada Allah SWT karena berkat rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini yang berjudul “Potensi ekstrak daun singkong terhadap ekspresi COX-2 pada neutrofil yang dipapar LPS *E. Colli*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi persyaratan dalam menyelesaikan pendidikan strata satu Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan banyak pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes, Sp. Pros selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
2. drg. Zahara Meilawaty, M. Kes., selaku Dosen Pembimbing Utama dan drg. Abdul Rochim, M. Kes. MMR., selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, motivasi dan perhatiannya dalam penulisan tugas akhir ini;
3. drg. Pudji Astuti, M. Kes. dan drg. Ekiyantini sebagai Dosen Penguji yang telah sumbangan pemikiran dan saran yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
4. Kedua orang tuaku Bapak Mashuri dan Ibu Wiyati tercinta terima kasih untuk dukungan, doa, semangat, dukungan dan semua curahan kasih sayang yang tak pernah putus;
5. Mas Erwan, mbak azizah dan mbak wahyu teknisi Laboratorium Bio Science, Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
6. Mbakku Dian Rosa Dewi, Amd dan adikku Moch. Yugas Ardiansyah serta ponakan kesayanganku M. Raditya Syarif Hidayatullah yang selalu membantu menghiburku dan selalu memotivasi untuk menyelesaikan tugas ini;
7. Pendukung terbaikku Rona Novitasari, Ayu Novitasari, Ellen Putri Nuryanti, abang Andry Prabowo, Vivi Felicia, Elliza Wardhani, dan Liliani Saputri yang selalu memberi semangat dan waktu menemani saat suka dan duka.

8. Rudi Kurniawan terima kasih untuk waktu, motivasi, perhatian dan dukungannya dalam menyelesaikan skripsi ini;
9. Teman-teman angkatan 2010 yang telah sama-sama berjuang;
10. Teman-teman kos Bulgis Queen Putri, Sukma, Leli, Memei, Arin, Nana, Gea, mbak Rischa, mbak Dita, mbak Tya, mbak Chusnul, mbak Ninin, mbak Ona, dan adek Deo yang selalu memberiku support, motivasi dan bantuannya dalam menyelesaikan skripsi ini;
11. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis juga menyadari masih banyak kekurangan dan ketidaksempurnaan dalam penulisan skripsi ini. Untuk itu, kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan demi kesempurnaan karya penulis selanjutnya.

Jember, 17 Maret 2016

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Tumbuhan Singkong	5
2.1.1 Taksonomi	5
2.1.2 Habitat	5
2.1.3 Morfologi	6
2.1.4 Kandungan	9
2.1.5 Manfaat dan Khasiat	9

2.2 Siklooksigenase (COX)	12
2.3 Neutrofil	13
2.3.1 Morfologi Neutrofil	14
2.4 Lipopolisakarida	15
2.5 Kerangka Konsep	17
2.6 Hipotesis	17
BAB 3. METODE PENELITIAN	18
3.1 Jenis Penelitian	18
3.2 Rancangan Penelitian	18
3.3 Tempat dan Waktu Penelitian	18
3.3.1 Tempat Penelitian	18
3.3.2 Waktu Penelitian	18
3.4 Identitas Penelitian	18
3.4.1 Variabel Bebas	18
3.4.2 Variabel Terikat	19
3.4.3 Variabel Terkendali	19
3.5 Definisi Operasional	19
3.5.1 Ekstrak Daun Singkong	19
3.5.2 Neutrofil	19
3.5.3 Lipopolisakarida <i>E. Colli</i>	19
3.5.4 COX-2	20
3.6 Sampel	20
3.6.1 Kriteria Sampel	20
3.6.2 Jumlah Sampel	20
3.6.3 Penggolongan Sampel Penelitian	21
3.7 Alat dan Bahan Penelitian	21
3.7.1 Alat Penelitian	21
3.7.2 Bahan Penelitian	22

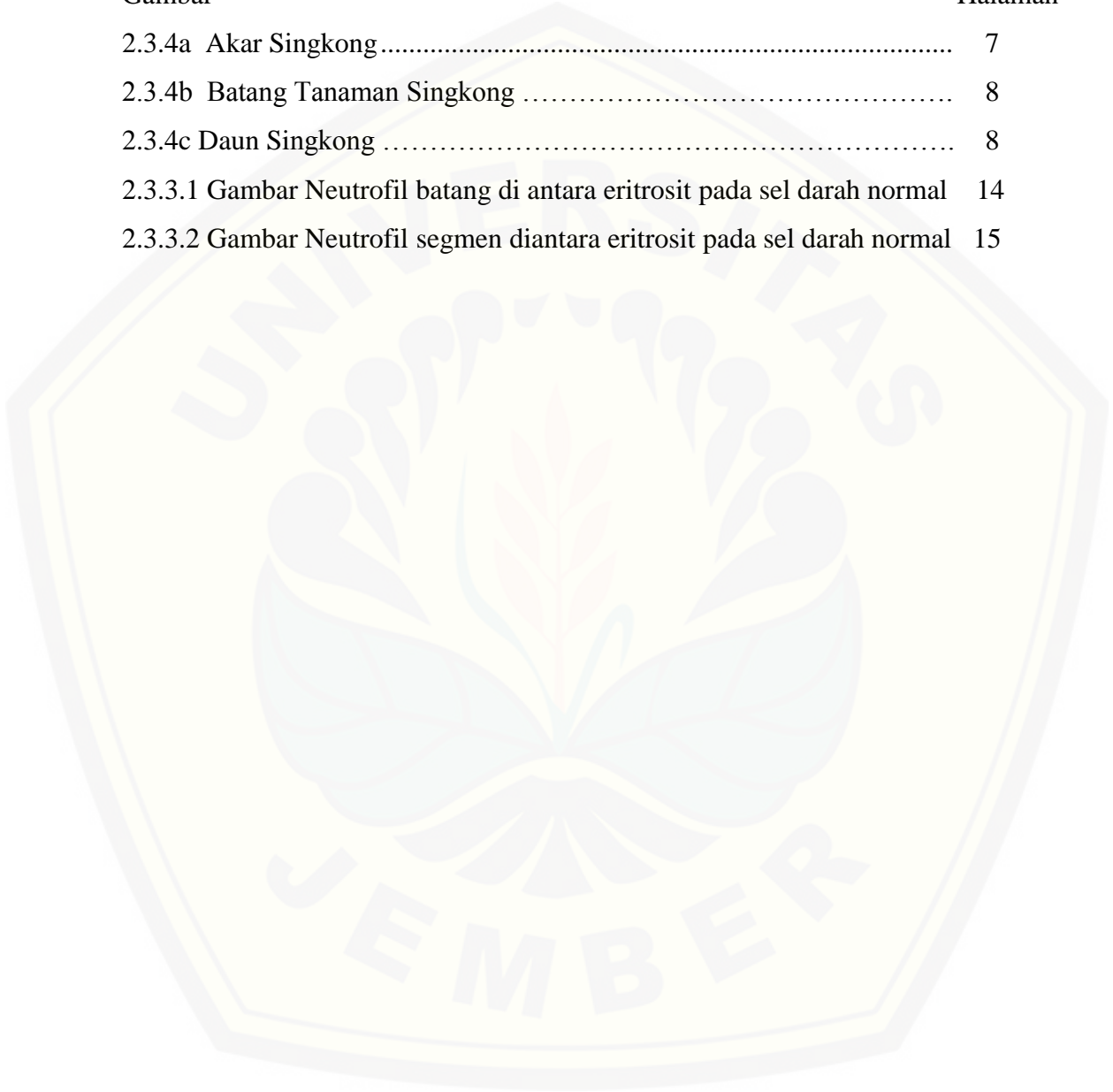
3.8 Prosedur Penelitian	22
3.8.1 Sterilisasi Alat	22
3.8.2 Persiapan Ekstrak Daun Singkong	22
3.8.3 Pembuatan RPMI dan Medium Complex	24
3.8.4 Pengambilan Sampel Darah	25
3.8.5 Isolasi Neutrofil	25
3.8.6 Inkubasi dengan Ekstrak Daun Singkong	26
3.8.7 Pemaparan LPS	27
3.8.8 Pewarnaan IHC	27
3.8.9 Penghitungan Ekspresi COX-2	28
3.8 Analisis Data	28
BAB 4. HASIL, ANALISIS DATA DAN PEMBAHASAN	29
4.1 Hasil Penelitian	29
4.2 Analisis Data Hasil Penelitian	29
4.3 Pembahasan	31
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	36
5.1 Kesimpulan	36
5.2 Saran	36
DAFTAR PUSTAKA	37
LAMPIRAN	46

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Karakteristik siklooksigenase-1 dan -2	12
4.1 Rerata jumlah sel neutrofil yang mengekspresikan COX-2 pada kelompok kontrol dan perlakuan	29
4.2 Hasil uji <i>Kolmogorov-Smirnov</i>	30
4.3 Hasil uji <i>Levene</i>	30
4.4 Hasil uji <i>One Way Anova</i>	30
4.5 Hasil uji <i>LSD</i>	31

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.3.4a Akar Singkong.....	7
2.3.4b Batang Tanaman Singkong	8
2.3.4c Daun Singkong	8
2.3.3.1 Gambar Neutrofil batang di antara eritrosit pada sel darah normal	14
2.3.3.2 Gambar Neutrofil segmen diantara eritrosit pada sel darah normal	15



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Informed Consent	44
B. Data Hasil Penghitungan Jumlah Ekspresi COX-2	45
C. Hasil Analisis Data Statistik	46
D. Foto Hasil Penelitian	48
E. Diagram Batang Rata-rata Jumlah Ekspresi COX-2.....	50
F. Foto Alat dan Bahan Penelitian.....	51

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Enzim siklooksigenase (COX) merupakan enzim yang mengkatalisi pembentukan prostaglandin, suatu mediator inflamasi, dan produk metabolisme asam arakidonat. Prostaglandin adalah suatu senyawa kimia yang diproduksi oleh sel tubuh yang mengakibatkan rasa nyeri, panas badan, peradangan, berperan dalam proses pembekuan darah dan melindungi lambung dari asam. Pada saat proses pembentukannya, prostaglandin membutuhkan suatu enzim yang dinamakan enzim siklooksigenase (COX). Enzim siklooksigenase ini terdiri dari 2 tipe, yakni COX-1 dan COX-2. Kedua tipe enzim ini berperan menghasilkan prostaglandin yang memiliki fungsi tertentu. Enzim COX-1 banyak terdapat di perut contohnya pada lambung; berfungsi mengontrol produksi prostaglandin yang bertugas melindungi lambung dari asam. Selain itu, enzim COX-1 juga bersifat konstitusif untuk memelihara fisiologi normal dan homeostatis. Enzim COX-2 merupakan enzim yang terinduksi pada sel yang mengalami inflamasi oleh sitokin, endotoksin, dan faktor pertumbuhan (growth factors). COX-2 juga berperan dalam proliferasi sel kanker. Ekspresi berlebihan COX-2 juga ditemukan pada kebanyakan tumor (Sadikin, 2002; Zullies, Agung dan Widyah, 2006).

Inflamasi atau radang adalah reaksi jaringan hidup terhadap semua bentuk jejas. Pada fase seluler awal proses inflamasi, sel pertama yang secara kimia tertarik kedaerah inflamasi adalah neutrofil. Banyaknya neutrofil tersebut disebabkan adanya peningkatan permeabilitas vaskular dan vasodilatasi pada proses inflamasi (Robbins dan Kumar, 2007). Peningkatan permeabilitas vaskular, vasodilatasi, pembentukan edema dan rasa nyeri pada proses inflamasi ini disebabkan adanya pengaruh prostaglandin sebagai mediator radang (Thomson, 1997). Walaupun proses inflamasi mengeliminir mikro organisme yang patogen, namun inflamasi yang berlebihan juga dapat menimbulkan kerusakan jaringan (Robbins dan Kumar, 2007).

Inflamasi dapat terjadi disebabkan oleh banyak faktor, salah satu penyebabnya adalah bakteri yang memproduksi toksin sehingga akan menghancurkan epitel dari sel dan jaringan (Kimura, 2002). Bakteri tersebut akan menghasilkan suatu endotoksin berupa lipopolisakarida (LPS) yang merupakan sebuah molekul berukuran besar yang mengandung lipid dan karbohidrat. Lipopolisakarida menjadi pemicu sel host untuk mensekresi sel inflamasi seperti makrofag dan limfosit yang akan memproduksi berbagai macam sitokin proinflamasi diantaranya *interleukin-1-beta (IL-1 β)*. Peningkatan respon sistem imun tubuh yang terbentuk terhadap paparan lipopolisakarida menyebabkan aktivasi sel mast, makrofag dan neutrofil untuk melepaskan mediator proinflamasi (Yamamoto, 2010). Lipopolisakarida juga mengikat reseptor *CD14/ toll like reseptor-4 (TLR4)* sehingga merangsang pelepasan berbagai sitokin berperan sebagai mediator dan mengatur reaksi imun dan inflamasi (Indahyani dkk, 2007).

Oleh sebab itu diperlukan adanya anti inflamasi. Anti inflamasi merupakan bahan kimia yang digunakan untuk mengurangi respons inflamasi dengan menghambat mikroorganisme yang menjadi penyebab infeksi pada jaringan hidup (Hartanto, 2011; Shabella, 2011).

Penggunaan obat anti inflamasi nonsteroid (AINS) sangat efektif untuk menghambat sintesis prostaglandin dengan cara menghambat enzim COX yang mengkatalis reaksi asam arakidonat menjadi senyawa endoperoxidase. Tetapi, penggunaan obat tersebut dapat menimbulkan efek samping, diantaranya dapat menyebabkan pendarahan *gastrointestinal*, memperlama waktu pendarahan, serta dapat merusak fungsi ginjal (Smith, dkk., 1998; Tripathi, 2003; Lee, dkk., 2005; Vardar, 2005). Oleh karena itu, masih perlu dicari bahan alami atau bahan lain sebagai obat anti inflamasi dengan efek samping yang minimal.

Penggunaan bahan alam sebagai obat tradisional di Indonesia telah dilakukan oleh nenek moyang kita sejak berabad – abad yang lalu. *Manihot esculenta*, dikenal sebagai singkong juga merupakan salah satu tanaman dengan berbagai sifat obat. *Manihot esculenta* adalah tanaman semak berkayu dari keluarga *Euphorbiaceae* yang ditemukan pertama kali di Amerika Selatan yang kemudian secara luas dibudidayakan sebagai tanaman tahunan di daerah tropis

dan subtropis untuk dimakan tepungnya & tuberous akar yang merupakan sumber utama (Claude Fauquet and Denis Fargatte, 1990). Tanaman *Manihot esculenta* terdiri daun, umbi dan batang. Di Nigeria daun dari tanaman ini sering digunakan untuk pengobatan kurap, tumor, konjungtivitis, luka dan abses. Daun singkong juga telah digunakan untuk melawan berbagai gangguan, seperti rematik, demam, sakit kepala, diare dan kehilangan nafsu makan. Selain itu, juga telah dilaporkan dapat menunjukkan *antihemorrhoid*, anti inflamasi dan aktivitas antimikroba. Daun singkong kaya akan makro dan mikro nutrisi (Chavez, 2000). Daun singkong kaya akan senyawa antioksidan yaitu β -karoten (sekitar 23 – 86 mg/100 g), vitamin C (sekitar 1.7 – 419 mg/100g), vitamin A, antocyanin (flavonoid), saponin, steroid, dan glikosida (Depkes RI, 2005; Fasuyi, 2005; Okeke, 2007). (Sastroamidjojo, 2001; Popola, 2007; Yuniarti, 2008; Okpuzor, 2009).

Kandungan utama daun singkong adalah flavonoid yang merupakan glikosida kuersetin dengan disakarida yang terdiri dari glukosa dan rhamnosa. Kandungan flavonoid tanaman ini diperkirakan memiliki efek anti inflamasi dan analgesik. Studi yang dilakukan oleh Caesar N. Tsumbu mengungkapkan bahwa ekstrak tanaman *Manihot Esculenta* memiliki sifat antioksidan dan anti radikal dalam penelitian pada peroksidasi lipid pada ekstrak sebanyak 1 gram yang direbus selama 5 menit di 10 mL metanol pada 60 ° C (Sukrasno, 2009; Tsumbu, 2011).

Berdasarkan uraian diatas, peneliti ingin mengetahui potensi ekstrak daun singkong terhadap ekspresi COX-2 pada neutrofil yang dipapar *LPS E. Colli*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian diatas dapat dirumuskan permasalahannya, yakni bagaimanakan potensi ekstrak daun singkong terhadap ekspresi COX-2 pada neutrofil yang dipapar *LPS E. Colli*.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui adanya potensi ekstrak daun singkong terhadap ekspresi COX-2 pada neutrofil yang dipapar *LPS E. Colli*.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi ilmiah tentang pemanfaatan daun singkong sebagai tanaman obat tradisional.
2. Memberikan informasi tentang kegunaan daun singkong sebagai agen anti inflamasi, khususnya terhadap penurunan jumlah sel neutrofil saat dipapar *LPS E. Colli*.
3. Memberikan informasi untuk penelitian lebih lanjut tentang daun singkong.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tumbuhan Singkong (*Manihot Esculenta*)

2.1.1 Taksonomi

Beberapa pakar botani telah melakukan penelusuran dan hasilnya menunjukkan bahwa tanaman singkong berasal dari kawasan benua Amerika yang beriklim tropis tepatnya di Brazil, Amerika Selatan. Tanaman singkong mulai dikenal sekitar tahun 1852 dan mulai dikenal pada tahun 1914-1918, hingga akhirnya Indonesia menjadi penghasil singkong nomor lima di dunia pada tahun 1968 (Rukmana, 2002).

Dalam taksonomi tumbuhan, tanaman singkong diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Divisi	: <i>Spermathophyta</i>
Subdivisi	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Dicotyledonae</i>
Ordo	: <i>Euphorbiales</i>
Famili	: <i>Euphorbiaceae</i>
Subfamili	: <i>Crotonoideae</i>
Suku	: <i>Manihoteae</i>
Genus	: <i>Manihot</i>
Spesies	: <i>Manihot Utilissima Pohl. dan Manihot Escullenta sin.</i>

(Bahekar & Kale, 2013).

2.1.2 Habitat

Singkong merupakan tanaman pangan yang berasal dari benua Amerika berupa perdu, memiliki nama lain ubi kayu, singkong, kasepe, dan dalam bahasa inggris cassava. Singkong termasuk famili Euphorbiaceae yang mudah tumbuh sekalipun pada tanah kering serta tahan terhadap serangan penyakit maupun

tumbuhan pengganggu (gulma). Cara pembudidayaan tumbuhan singkong sangat mudah, umumnya dibudidayakan dengan cara stek batang dan dapat ditanam di kebun maupun halaman rumah serta dapat juga dijadikan pagar pembatas rumah atau kebun. Manfaat dari daun singkong dalam bidang pengobatan telah banyak dikenal terutama pada negara Nigeria dan India (Lidiasari et al., 2006).

Dalam pengembangan selanjutnya, tanaman singkong juga telah menyebar di berbagai negara di dunia yang terletak diantara 30° LU dan 30° LS. Namun, pertumbuhan terbaik untuk tanaman ini ada pada wilayah antara lintang 15° LU dan 15° LS dengan suhu rata-rata 25-27° C dan akan mati pada suhu 10° C. Tanaman ini tumbuh baik di daerah dataran rendah. Tanaman ini dapat tumbuh pada curah hujan 500-5000 mm. Setelah turun hujan, tanaman ini akan dengan cepat menghasilkan daun baru. Walaupun demikian, tanaman ini toleran terhadap periode kekeringan yang panjang dan keadaan pH tanah 4-8. Tanaman ini juga toleran terhadap kadar kalsium rendah dan ketersediaan alumunium dan mangan yang tinggi, kondisi yang umum pada daerah yang bercurah hujan tinggi, serta kondisi tanah tropika yang terlalu asam dan tidak dapat ditolerir oleh sebagian besar tanaman. Tanaman singkong ini biasanya dijadikan tanaman terakhir yang ditanam sebelum lahan ditinggalkan karena kemampuannya bertahan dan memproduksi dengan baik pada tanah yang kehabisan hara (Rubatzky et al., 1999).

2.1.3 Morfologi

Tanaman singkong termasuk tanaman dikotil berumah satu (monoecus) dan proses penyerbukan bersifat silang. Tanaman singkong terdiri dari akar, batang, dan daun (Rukmana, 2002). Singkong merupakan umbi atau akar pohon yang panjang dengan fisik rata-rata berdiameter 2-5 cm dan panjang 50-80 cm. Namun, panjang dan diameter tersebut beragam, tergantung dari varietas singkong yang ditanam. Daging umbinya berwarna putih kekuning-kuningan. Umbi singkong tidak tahan disimpan lama meskipun didalam lemari pendingin. Gejala kerusakannya ditandai dengan keluarnya warna biru gelap akibat terbentuknya asam sianida yang bersifat racun bagi manusia. Umbi singkong merupakan sumber energi yang kaya akan karbohidrat, namun miskin protein.

Sumber protein terbesarnya pada daunnya yang mengandung asam amina dan metionil (Kusumastuti, 2007).

a. Akar

Tanaman singkong mempunyai sistem perakaran serabut, panjang akar 30-50 cm dengan diameter 2-5cm, termasuk tumbuhan dikotil, akar mengembung berisi cadangan makanan yang dapat digunakan sebagai sumber karbohidrat. Akar dapat tumbuh bercabang 4-8 di dasar batang. Akar ditutupi dengan lapisan berwarna coklat berserat atau bisa disebut kulit ari dan dapat hilang ketika dikupas. Bagian dalamnya (daging) berwarna putih /kekuning-kuningan bergetah dan bentuknya lebih keras daripada kentang namun tetap sama berisi kadar pati yang tinggi (Richardo, 2012).



Gambar 2.3.4a Akar Singkong (Richardo, 2012)

b. Batang

Batang tanaman singkong berkayu berlubang dan berisi empulur berwarna putih lunak dengan struktur seperti gabus memiliki warna batang bervariasi, ketika umur masih muda berwarna hijau dan setelah tua menjadi keputih-putihan, kelabu, atau hijau kelabu, dalam batang berwarna putih kekuning-kuningan, memiliki panjang setinggi 3 m dengan diameter setebal 2-4 cm dengan bentuk batang beruas-ruas (Tjitrosoepomo, 2005).



Gambar 2.3.4b Batang tanaman singkong (Ariyanto, 2013)

c. Daun

Permukaan daun rata, tulang daun menjari bercabang 5-9, jenis daun tunggal, berwarna hijau (berklorofil), tangkai daun berwarna merah, ujung daun lancip dengan tangkai panjang dan berwarna kemerahan. Daun singkong dapat digunakan sebagai obat tradisional karena kandungan kimianya (Richardo, 2012).



Gambar 2.3.4c Daun Singkong (Aryanto, 2013).

2.1.4 Kandungan

Kandungan gizi tanaman singkong terutama selain umbinya yang bisa dimanfaatkan untuk bahan pangan adalah bagian daunnya, bagian daunnya menyimpan berbagai macam protein yang cukup tinggi, dapat digunakan sebagai sumber energi yang setara dengan karbohidrat yakni dalam 100 gram daun singkong mengandung 73 kalori, 6,8 gram protein, 1,2 gram lemak, 13 gram karbohidrat, 165 mg kalsium, 54 mg fosfor, 2mg zat besi, 11.000 SI vitamin A, 0,12 mg vitamin B, 275 mg vitamin C, 77,2 gr air (Rukamana, 2002; Hariana, 2006). Serta kandungan mineral yaitu berupa kalsium 165mg, zat besi 2,8 mg, *thiamin* 0,16mg, *riboflavin* 0,32 mg, *beta-caroten* 0,08mg, *niacin* 1,8mg, dan asam askorbin 82 mg (Ayu, 2002).

Selain itu, tanaman ini juga mengandung senyawa organik berupa flavonoid, triterpenoid, dan saponin yang berperan banyak sebagai antiinflamasi (DepKes RI, 2000; Okeke, 2007). Selain senyawa kimia yang bermanfaat, daun singkong juga mengandung *phyton*, dan tanin (Fasuyi, 2005).

2.1.5 Manfaat dan Khasiat

Daun singkong banyak dimanfaatkan sebagai tanaman obat tradisional, antara lain sebagai anti kanker, mencegah kontipasi dan anemia, serta meningkatkan daya tahan tubuh. Kandungan vitamin dan mineralnya rata-rata lebih tinggi dibandingkan dengan sayuran daun lain. Kandungan vitamin A dan C pada daun singkong berperan sebagai antioksidan yang mencegah proses penuaan dan meningkatkan daya tahan tubuh terhadap serangan penyakit. Kandungan kalsium yang tinggi sangat baik untuk mencegah penyakit tulang seperti rematik dan asam urat (Anonim, 2011).

Dari berbagai analisis disebutkan, daun singkong dapat membantu mengubah karbohidrat menjadi energi, membantu pemulihan kulit dan tulang, meningkatkan daya ingat, kinerja otak dan metabolisme asam amino lain. Dalam setiap 100 gram daun singkong mengandung 3.300 RE vitamin A yang baik untuk kesehatan mata dan vitamin C sebanyak 275 mg yang baik untuk mencegah sariawan, dan meningkatkan kekebalan tubuh, membantu menangkal radikal

bebas, mengurangi rasa sakit, mempercepat penyembuhan, anti bakteri dan melindungi sel dari kerusakan oksidasi. Kandungan serat pada daun singkong yang cukup tinggi dapat membantu melancarkan buang air besar (Anonim, 2010).

Secara terperinci, kandungan daun singkong yang dapat berkhasiat adalah sebagai berikut:

a. Vitamin C

Vitamin C atau asam askorbat bersifat larut dalam air, berwarna putih dan membentuk kristal. Struktur vitamin C mirip dengan glukosan dan tidak dapat dibentuk oleh tubuh sehingga manusia perlu mengkonsumsi makanan, minuman maupun suplemen untuk mencukupi kebutuhan vitamin C (Yendriwati, 2006). Dosis yang dianjurkan untuk mencegah defisiensi vitamin C adalah 10mg perhari atau lebih, disesuaikan dengan kebutuhan khusus setiap individu (Gaman dan Sherrington, 1994).

b. Protein

Daun singkong memiliki kandungan protein yang sangat tinggi, yaitu 14 – 40% dalam keadaan kering. Selain itu, terdapat pula beberapa mineral vitamin B1 & B2, vitamin C dan karoten. Daun singkong juga memiliki kandungan sianida, tanin dan *pythin*. Namun kandungan tersebut sangat rendah dan dapat hilang dengan pengeringan dan pengolahan sebelum dimasak sehingga tidak berbahaya ketika dikonsumsi (Fasuyi, 2005).

c. Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa bahan alam yang digambarkan sebagai deretan senyawa karbon yang terdiri atas dua gugus C6 yang disambungkan oleh rantai alifatik C3. Flavonoid mencakup banyak pigmen yang paling umum dan terdapat pada seluruh dunia tumbuhan dari fungus hingga golongan *angiospermae*. Fungsi flavonoid bagi tumbuhan adalah sebagai pengatur pertumbuhan, mengatur fotosintesis, antimikroba dan antivirus (Robinson, 1995).

Flavonoid berfungsi sebagai anti radang dengan cara menghambat enzim siklooksigenase dan lipoksigenase dapat memberi harapan untuk pengobatan gejala peradangan dan alergi. Mekanisme flavonoid dalam menghambat terjadinya radang melalui dua cara, yaitu menghambat metabolisme asam arakhidonat melalui jalur lipoksigenase, dan sekresi enzim lisosom dari sel endothelial sehingga menghambat fase proliferasi dan fase eksudasi dari proses radang (Robinson, 1995).

d. Triterpenoid

Triterpenoid adalah salah satu senyawa terapan, yaitu suatu golongan hidrokarbon yang dihasilkan oleh tumbuhan yang terutama terkandung dalam getah dan vakuola selnya. Triterpenoid memiliki atom C₃₀. Triterpenoid tersebar luas dalam damar, gabus dan kutin tumbuhan. Senyawa ini ditemukan paling umum pada tumbuhan berbiji. Triterpenoid non-glikosida juga sering ditemukan sebagai ekskresi dan dalam kutikula yang berfungsi sebagai pelindung atau menimbulkan ketahanan terhadap air. Bagi tumbuhan, senyawa triterpenoid berfungsi sebagai anti fungus, insektisida, dan anti pemangsa. Senyawa triterpenadiol berada bersama-sama dengan karotenoid, dan triterpena asam berada bersama flavonoid (Robinson, 1995).

e. Saponin

Saponin adalah senyawa aktif permukaan yang kuat, sifatnya menyerupai sabun, dapat menimbulkan busa bila dikocok, dan pada konsentrasi rendah dapat menyebabkan hemolisis sel darah merah. Saponin juga diketahui dapat bekerja sebagai antimikroba. Senyawa ini mampu menghambat dehidrogenase jalur prostaglandin. Saponin tertentu dapat diperoleh dari beberapa tumbuhan (Robinson, 1995).

f. Tanin

Tannin bisa ditemukan pada tumbuhan yang bersifat fenol yang mempunyai rasa sepat. Tannin berupa senyawa amorf dan higroskopis. Kadar tanin yang tinggi berfungsi sebagai pertahanan bagi tumbuhan dan membantu mengusir hewan pemangsa. Tanin memiliki aktivitas

antioksidan, menghambat pertumbuhan tumor dan menghambat enzim seperti *reverse transcriptase* dan DNA *topoisomerase* (Robinson, 1995)

2.2 Siklooksigenase (COX)

Awal tahun 90-an ditemukan bahwa enzim siklooksigenase terdapat dalam dua bentuk (isoform), yaitu siklooksigenase-1 (COX-1) dan siklooksigenase-2 (COX-2) (Dannhardt & Laufer, 2000; Meyer-Kirchrath & Schor, 2002). Kedua isoform berbeda distribusinya pada jaringan dan juga memiliki fungsi regulasi yang berbeda. COX-1 merupakan enzim konstitutif yang mengkatalisis pembentukan prostanoide regulatoris pada berbagai jaringan, terutama pada selaput lendir traktus gastrointestinal, ginjal, platelet dan epitel pembuluh darah. COX-1 hampir seluruhnya diekspresikan dalam kebanyakan sel dan jaringan. Secara umum, telah diketahui bahwa COX-2 biasanya tidak terdeteksi, tetapi cepat diinduksi apabila sel menerima stimulus inflamasi. COX-2 juga bertindak terutama ditempat yang terjadi reaksi inflamasi (Dubois, 1998; Stables dan Gilroy, 2010; Park et al, 2011).

Karakteristika siklooksigenase-1 dan -2 (Dannhardt dan Laufer, 2000)

Parameter	Siklooksigenase-1	Siklooksigenase-2
Ukuran gen	22 kb	8,3 kb
Ekson	11	10
Kromosom	9q32 – q33,3	1q25,2 – q25,3
mRNA	2,8 kb	4,1 kb
Regulasi mRNA	konstitusi	indusibel
Induktor	-	Sitokin, LPS
Jumlah asam amino	599	604
Lokasi	Membran inti	Membran inti
Kofaktor	1 mol Heme	1 mol Heme
Tempat pengikatan asam asetil salisilat	Serin-529	Serin-516
Spesifisitas substrat	Asam arasidonoat, asam linoleat	Asam arasidonoat, asam linoleat, asam eikosapentenoat
Aktivitas	23 mmol asam arasidonoat/mg/menit	11 mmol asam arasidonoat/mg/menit

2.3 Neutrofil

Neutrofil (bahasa Inggris: *neutrophil*, *polymorphonuclear neutrophilic leukocyte*) adalah bagian sel darah putih dari kelompok granulosit. Menurut Dorland (2002) Neutrofil adalah leukosit granular matur polimorfonuklear, memiliki daya lekat dengan kompleks imun, dan kemampuan fagositosis. Sel ini berdiameter 12-15 μm memiliki inti yang khas padat terdiri atas sitoplasma pucat diantara 2-5 lobus dengan rangka tidak teratur dan mengandung banyak granula merah jambu (azuropilik). Granula terbagi menjadi granula primer yang muncul pada stadium promielosit, dan sekunder yang muncul pada stadium mielosit dan terbanyak pada neutrofil matang. Kedua granula berasal dari lisosom, yang primer mengandung *mieloperoksidase*, *fosfatase* asam dan *hidrolase* asam lain, yang sekunder mengandung *fosfatase* lindi dan *lisosim* (Hoffbrand, 1996).

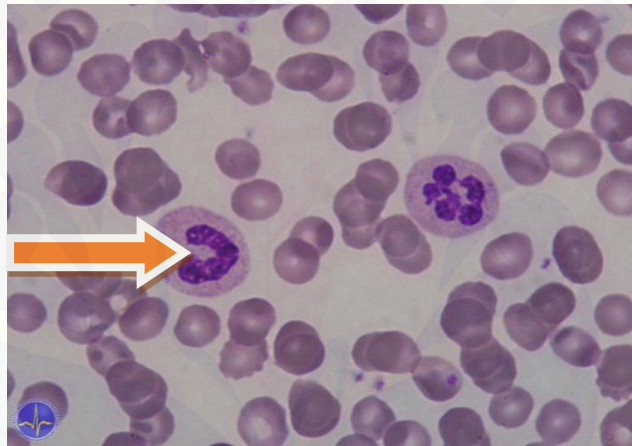
Bersama dengan dua sel granulosit lain: eosinofil dan basofil yang mempunyai granula pada sitoplasma, disebut juga *polymorphonuclear* karena bentuk inti sel mereka yang aneh. Granula neutrofil berwarna merah kebiruan dengan 3 inti sel. Neutrofil merupakan sel yang bergerak aktif dan dalam waktu singkat dapat berkumpul dalam jumlah banyak ditempat jaringan yang rusak. Proses Bergeraknya sel sebagai respon terhadap rangsangan spesifik disebut kemotaksis. Selain bersifat kemotaksis, neutrofil mempunyai kemampuan untuk melakukan fagositosis yaitu menelan dan memakan benda atau sel asing dengan cara menjulurkan sitoplasma yang mampu melakukan gerak mengelilingi benda asing tersebut (Sadikin, 2002).

Neutrofil berhubungan dengan pertahanan tubuh terhadap infeksi bakteri dan proses peradangan kecil lainnya, serta menjadi sel yang pertama hadir ketika terjadi infeksi di suatu tempat. Dengan sifat fagositik yang mirip dengan makrofag, neutrofil menyerang patogen dengan serangan respiratori menggunakan berbagai macam substansi beracun yang mengandung bahan pengoksidasi kuat, termasuk hidrogen peroksida, oksigen radikal bebas, dan hipoklorit (Dacie and Lewis, 2001).

2.3.1 Morfologi Neutrofil

2.3.1.1 Neutrofil batang/ stab

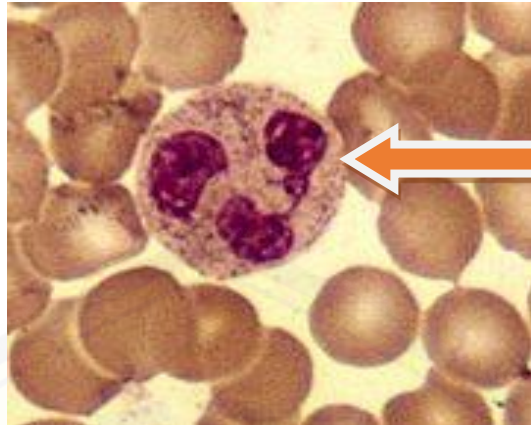
- a. Ukuran rata-rata 12 μm
- b. Sitoplasma tidak berwarna penuh dengan granula-granula yang sangat kecil dan berwarna coklat kemerahan sampai merah muda
- c. Kira-kira 2/3 nya merupakan granula spesifik sedangkan yang 1/3 nya merupakan granula azurofilik (merah biru-ungu)
- d. Nukleus lebih tebal, berbentuk huruf U dengan kromatin kasar dan rongga parakromatin yang agak jelas batasnya
- e. Jumlahnya 0-6% dari leukosit total (0-0,7 x 10⁹/L).



Gambar 2.3.3.1 Gambaran Neutrofil batang

2.3.1.2 Neutrofil tangkai/segmen

- a. Ukuran rata-rata 12 μm
- b. Sitoplasma dan granula sama dengan neutrofil batang
- c. Nukleus gelap, berbentuk seperti huruf E, Z atau S yang terpisah menjadi segmen-segmen/lobus-lobus yang dihubungkan oleh filament-filamen yang halus. Banyaknya lobus pada neutrofil normal berkisar antara 2-5 lobus, dengan rata-rata tiga lobus
- e. Jumlahnya 40-54% dari leukosit total (1,3-7,0 x 10⁹/L)



Gambar 2.3.3.2 Gambaran Neutrofil segmen
(Gandasoebrata, 2001)

Manusia dewasa mempunyai sekitar 7000 sel darah putih per mikroliter darah (dibandingkan dengan sel darah merah yang berjumlah 5 juta). Presentase normal dari neutrofil polimorfonuklear dari jumlah total sel darah putih kira-kira 62%. Jumlah ini merupakan jumlah yang terbanyak (Guyton and Hall, 2007).

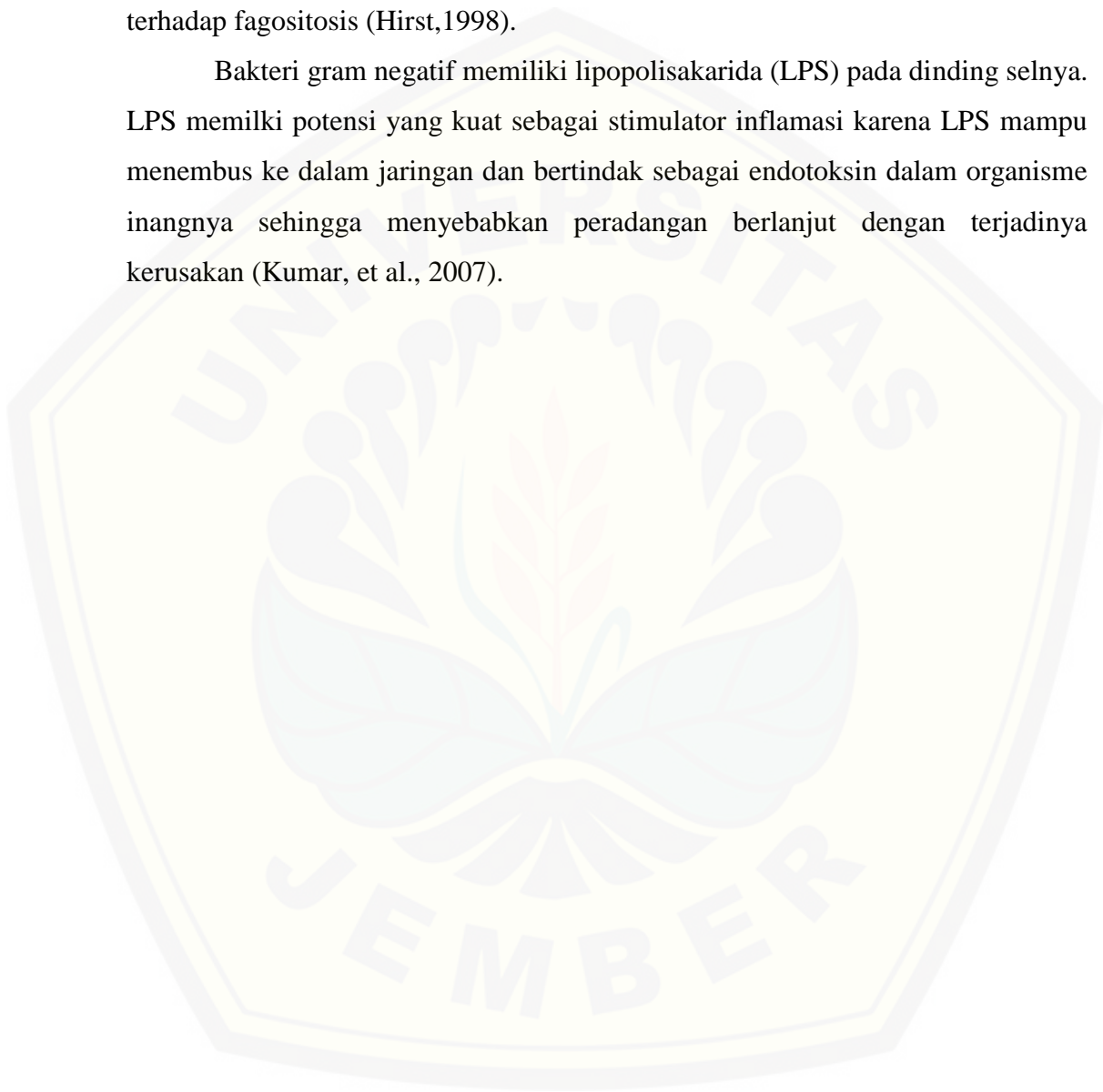
Neutrofil merupakan sel inflamasi dengan oksidatif poten dan potensial proteolitik yang berfungsi sebagai pertahanan pertama terhadap patogen (Oberholzer et al., 2001). Neutrofil dalam sirkulasi normalnya memiliki masa hidup yang singkat sekitar 24 jam (Remick, 2007).

2.4 Lipopolisakarida (LPS)

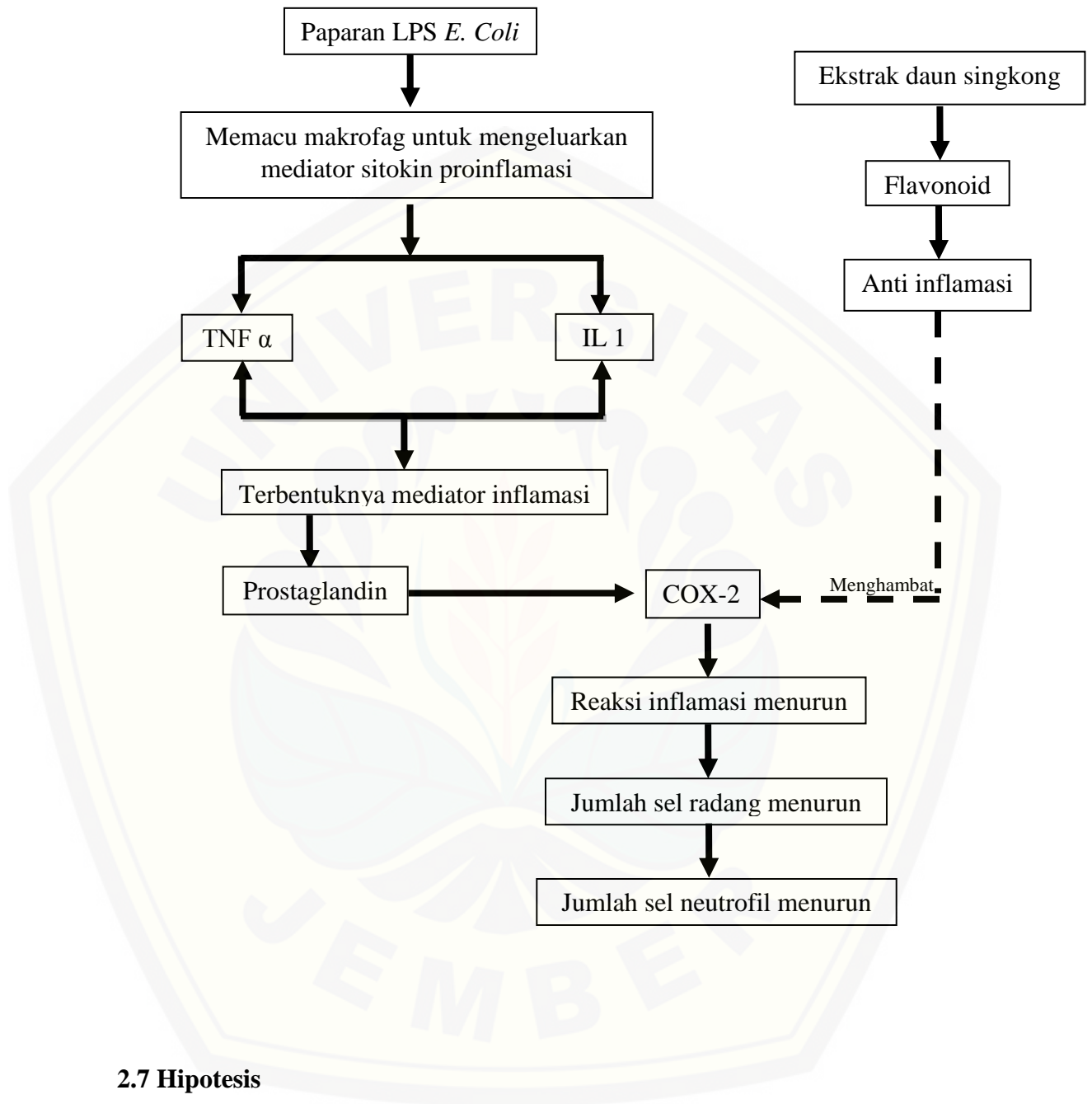
Lipopolisakarida (LPS) merupakan salah satu stimulan yang potensial berasal dari dinding sel bakteri Gram negatif. Berdasarkan penjelasan, dinding sel bakteri Gram negatif terdiri dari: *lipopolysaccharide* (LPS), *outer membrane protein* (OMP A), *pore protein* (PP), lipoprotein (LP), *nutrient binding protein* (BP), *periplasmic space* (PPS), *peptidoglycan* (PG), *carier protein* (CP), dan *cytoplasmic membrane* (CM). LPS terdiri dari tiga bagian yaitu lipid A, polisakarida inti, dan polisakarida O. Bagian paling dalam dari LPS adalah lipid A yang menghubungkan LPS dengan OMP. Lipid A mengandung N-asetilglukosamin, disakarida yang berikatan dengan asam lemak, seperti β -hidroksimirista, kaproik dan asam laurat. Lipid A merupakan bagian LPS yang sangat toksik. Bagian LPS yang terletak diluar lipid A adalah polisakarida inti,

yang menghubungkan lipid A dibagian dalam dengan polisakarida O dibagian luar. Sifat antigenik ditemukan oleh lipopolisakarida terutama oleh polisakarida O yang menonjol keluar sel (antigen O). Rantai O ini dimiliki oleh semua bakteri yang bersifat patogen, adanya struktur ini menyebabkan bakteri lebih tahan terhadap fagositosis (Hirst,1998).

Bakteri gram negatif memiliki lipopolisakarida (LPS) pada dinding selnya. LPS memiliki potensi yang kuat sebagai stimulator inflamasi karena LPS mampu menembus ke dalam jaringan dan bertindak sebagai endotoksin dalam organisme inangnya sehingga menyebabkan peradangan berlanjut dengan terjadinya kerusakan (Kumar, et al., 2007).



2.5 Kerangka Konseptual Penelitian



2.7 Hipotesis

Berdasarkan penjelasan tersebut dapat diajukan suatu hipotesis, yaitu bahwa pemberian ekstrak daun singkong dapat menghambat ekspresi COX-2 pada neutrofil yang dipapar *LPS E. coli*.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah jenis penelitian eksperimental laboratoris *invitro*. Pada penelitian eksperimental peneliti melakukan perlakuan terhadap neutrofil berupa paparan *LPS E. Colli* yang kemudian diinkubasi dengan ekstrak daun singkong. Penelitian ini diteliti dan dilakukan di laboratorium (Notoadmodjo, 2010).

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini adalah penelitian dengan kelompok kontrol *The Post Test Only Control Group Design*, yaitu dilakukan pengukuran terhadap variabel yang diteliti setelah diberikan perlakuan, kemudian dibandingkan dengan kelompok kontrol (Notoatmodjo, 2010).

3.3 Waktu dan Tempat Penelitian

3.3.1 Waktu Penelitian

Pelaksanaan penelitian dilakukan pada bulan April 2014.

3.3.2 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bioscience Rumah Sakit Gigi dan Mulut Universitas Jember dan Laboratorium Biomedik bagian Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

3.4 Identifikasi Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak daun singkong (*Manihot Esculenta*).

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah jumlah ekspresi COX-2 pada neutrofil yang dipapar LPS *E. coli*.

3.4.3 Variabel Terkendali

Variable terkendali pada penelitian ini sebagai berikut:

- a. Konsentrasi ekstrak ekstrak daun singkong (*Manihot Esculenta*).
- b. Isolat neutrofil.

3.5 Definisi Operasional Penelitian

3.5.1 Ekstrak Daun Singkong

Ekstrak daun singkong adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari daun singkong menggunakan pelarut etanol. Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode remaserasi, yang dilakukan dengan cara pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama (Depkes RI, 1986). Kemudian pelarut diuapkan dan didapatkan ekstrak pekat dengan konsentrasi 100%. Ekstrak pekat daun singkong konsentrasi 100% lalu diencerkan dengan *aquadest* steril hingga diperoleh konsentrasi yang digunakan dalam penelitian yaitu 12,5% dan 25%.

3.5.2 Neutrofil

Neutrofil diambil dari darah vena perifer/ vena tepi orang sehat atau yang tidak memiliki kelainan maupun riwayat penyakit sistemik, dengan kriteria laki-laki dewasa. Isolasi neutrofil dilakukan dengan menggunakan teknik *gradient density* menggunakan bahan *Ficoll Hypaque Centrifugation*.

3.5.3 Lipopolisakarida *E. Colli*

LPS *E. Colli* digunakan sebagai pencetus reaksi radang. Lipopolisakarida merupakan endotoksin yang ada pada membran terluar bakteri Gram negatif dan dilepaskan bakteri tersebut ketika mengalami lisis maupun saat penggandaan bakteri (Prescott, Harley dan Klein, 2002; Levinson, 2008). LPS *E. Colli* yang digunakan adalah berlabel produksi sigma.

3.5.4 COX-2

COX-2 merupakan enzim yang terinduksi pada sel yang mengalami inflamasi). Sel yang mengekspresikan protein COX-2 akan memberikan warna coklat/gelap, sedangkan yang tidak akan memberikan warna ungu/ biru (Leahy et al., 2000).

3.6 Sampel Penelitian

3.6.1 Kriteria Sampel

Penelitian ini menggunakan sampel berupa isolat neutrofil yang diambil dari vena perifer/ vena tepi orang sehat, dengan kriteria laki-laki dewasa, tidak memiliki penyakit sistemik, kelainan darah, dan kebiasaan merokok.

3.6.2 Jumlah Sampel

Jumlah sampel yang digunakan menurut Daniel (2005) untuk setiap kelompok dalam penelitian ini adalah empat sampel yang didasarkan pada penghitungan sebagai berikut:

$$n = \frac{Z^2 \cdot \sigma^2}{d^2}$$

Keterangan: n = besar sampel tiap kelompok

σ = standar deviasi sampel

d = kesalahan yang masih dapat di tolerir, $\sigma = d$

Z = nilai pada tingkat tertentu jika $\alpha = 0,05$, maka $Z = 1,96$

Sehingga diperoleh besar sampel sebesar:

$$n = \frac{Z^2 \cdot \sigma^2}{d^2}$$

$$n = 1,96^2 = 3,84 \approx 4$$

Berdasarkan hasil perhitungan diatas diperoleh jumlah sampel yang digunakan pada penelitian ini 4. Peneliti menggunakan 4 (empat) sampel untuk setiap perlakuan.

3.6.3 Penggolongan Sampel Penelitian

Sampel dibagi kedalam 4 kelompok, yaitu:

Kelompok I : sel neutrofil tanpa perlakuan.

Kelompok II : sel neutrofil dipapar dengan *LPS E. Colli*.

Kelompok III : sel neutrofil dipapar dengan *LPS E. Colli* dan di inkubasi dengan ekstrak daun singkong 25%

Kelompok IV : sel neutrofil dipapar dengan *LPS E. Colli* dan diinkubasi dengan ekstrak daun singkong 12,5%.

3.7 Alat dan Bahan

3.7.1 Alat

- a. *Autoclave*
- b. *Centrifuge*
- c. *Coverslip poli L-lysine*
- d. Gelas ukur
- e. *Hemositometer*
- f. *Humaroller*
- g. *Incubator Shaker*
- h. *Laminar Flow Cabinet*
- i. Lampu spirtus
- j. *Microplate cell*
- k. Mikroskop *inverted*
- l. *Object glass*
- m. Oven
- n. Pipet mikro
- o. Rak Tabung
- p. *Syringe 5ml*
- q. Tabung *ependorf*
- r. Tabung *Falcon*
- s. Tabung heparin
- t. Timbangan

u. *Vortex*

3.7.2 Bahan

- a. LPS *E. Colli* (Sigma)
- b. Etanol Steril
- c. Darah vena kapiler
- d. *Ficoll Hypaque Gradient*
- e. Ekstrak Daun singkong
- f. HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*)
- g. RPMI (*Rosewel Park Memorial Institute Media*)
- h. Medium complex
- i. *Methanol Absolute*

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Sterilisasi Alat

Semua alat dicuci bersih kemudian disterilkan. Khusus untuk peralatan yang terbuat dari bahan kaca dan logam seperti tabung *falcon*, gelas ukur dan lain-lain disterilkan dalam *autoclave* dengan suhu 121° C selama 15 menit dan alat yang terbuat dari bahan yang tidak tahan panas disterilisasi menggunakan alkohol agar terbebas dari invasi bakteri.

3.8.2 Persiapan ekstrak daun singkong

Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode remaserasi. Remaserasi merupakan metode ekstraksi yang terjadi pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, dan seterusnya. Pelarut kedua ditambahkan sebanyak penambahan pelarut pertama (Depkes, 2000). Prosedur pembuatan ekstrak adalah sebagai berikut. Daun singkong dicuci dengan air dan dipotong kecil-kecil kemudian tiriskan sambil diangin-anginkan. Kemudian masukkan ke dalam oven selama 5 jam dalam suhu 40° C. Daun yang kering dan mudah rapuh tersebut dihaluskan dengan menggunakan blender sampai menjadi serbuk (Vongsak, dkk. 2012). Serbuk tersebut kemudian diayak dengan *shiever*

shaker dengan saringan berukuran 50 mesh. Kemudian ditimbang sebanyak 250 gr dan dimasukkan ke dalam maserator, lalu ditambah etanol sebagai pelarut dengan perbandingan 1:10 kali simplisa yaitu 2500 ml kemudian dilakukan pengadukan sampai homogen. Campuran serbuk daun singkong dan etanol dibiarkan termaserasi selama 24 jam dalam maserator tertutup dengan pengadukan menggunakan batang pengaduk setiap 6 jam. Setelah itu maserat disaring dari ampasnya dengan menggunakan kertas saring yang diletakkan diatas corong *Buchneri* dan hasilnya ditampung dalam tabung *erlenmeyer*. Karena menggunakan metode remaserasi, maka endapan yang tersisa dalam maserator dimaserasi kembali. Endapan simplisa daun singkong dicampur kembali dengan etanol dengan perbandingan 1:10 kemudian diaduk setiap 6 jam sekali hingga 24 jam, kemudian disaring. Filtrat dari hasil maserasi pertama dan kedua dicampur lalu disiapkan pada tabung rotavapour pada suhu 45-50° C dengan tekanan rendah (± 15 mmHg) untuk menguapkan seluruh etanol, kemudian diuapkan kembali pada waterbath sehingga diperoleh sediaan pekat (konsentrasi 100%).

Untuk mendapatkan berbagai konsentrasi yang diinginkan, maka pengenceran dilakukan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

Keterangan: M1 = kadar konsentrasi awal

M2 = kadar konsentrasi akhir

V1 = volume awal

V2 = volume akhir

Cara pengencerannya:

Untuk memperoleh ekstrak daun singkong 25% sebanyak 4 ml:

$$100\% \times V1 = 25\% \times 4$$

$$4 \times V1 = 4$$

$$V1 = 1 \text{ ml}$$

Jadi ekstrak daun singkong 100% harus diencerkan dengan menambahkan *aquadest* sebanyak 3 ml dalam 1 ml ekstrak daun singkong 100%.

Untuk memperoleh ekstrak daun singkong 12,5% sebanyak 4 ml:

$$100\% \times V1 = 12,5\% \times 4$$

$$8 \times V1 = 4$$

$$V1 = 0,5 \text{ ml}$$

Jadi ekstrak daun singkong 100% harus diencerkan dengan menambahkan *aquadest* sebanyak 3,5 ml dalam 0,5 ml ekstrak daun singkong 100%.

Setelah didapatkan pengenceran pertama disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm dengan suhu 20° C selama 10 menit. Akan terbentuk endapan dan cairan. Pisahkan cairan ke tabung *falcon*. Sentrifuse lagi cairan dan pisahkan kembali. Lakukan sampai cairan bening dan hanya terdapat sedikit endapan. Sesudah didapatkan cairan bening ekstrak tutup *falcon* dengan aluminium foil simpan ke dalam lemari es.

3.8.3 Pembuatan RPMI dan Medium Complex.

Pembuatan RPMI dari sediaan bubuk ke cair (dalam 150ml *aquadest* steril)

$$\frac{10,4}{1000} \times 150 = 1,56 \text{ gr (jadi, dalam 150 ml } \textit{aquadest} \text{ steril ditambahkan 1,56 gr serbuk RPMI)}$$

Pembuatan Medium Complek M199 (dalam 200ml *aquadest* steril)

$$\frac{9,5}{1000} \times 200 = 1,9 \text{ gr (jadi, dalam 200 ml } \textit{aquadest} \text{ steril ditambahkan 1,9gr serbuk medium complex M199)}$$

3.8.4 Pengambilan Sampel Darah

Pengambilan darah (*whole blood*) sebanyak 6 cc dari darah perifer orang sehat dengan menggunakan *disposable syringe* secara intravena, kemudian darah tersebut dibagi dalam dua tabung heparin (antikoagulan).

3.8.5 Isolasi Neutrofil

a. Isolasi neutrofil diawali dengan pengambilan darah dari vena perifer orang sehat (tidak mempunyai riwayat kelainan darah) sebanyak 6 cc, pengambilan darah vena menggunakan *disposable syringe* secara intravena. Kemudian

dibagi dalam dua tabung heparin masing-masing 3 cc. Kemudian tabung digoyang-goyangkan agar tidak menggumpal lalu dipindahkan kedalam tabung *falcon*.

- b. tabung *falcon* disentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 600 rpm pada suhu 37° C, hasilnya akan terbentuk 2 lapisan yaitu sel darah dan serum.
- c. Serum pada lapisan teratas diambil dengan pipet mikro, lalu dipindahkan ketabung *falcon* lainnya. Sel darah yang sudah dipisahkan dari serum diencerkan dengan HBSS dengan perbandingan 1:2. Apabila sel darah 3 cc maka HBSS yang ditambahkan 6 cc setelah itu dilakukan pipetting agar tercampur rata. Kemudian digetarkan menggunakan *vortex* agar campuran HBSS dan sel darah homogen.
- d. Isolasi neutrofil dilakukan dengan menggunakan teknik *gradient density*. Siapkan tabung *falcon* yang berisi *hystopaque* sebanyak 3cc dan 3 cc larutan *ficoll*. Darah yang sudah diencerkan dengan HBSS dialirkan melalui dinding tabung yang telah berisi cairan *hystopaque* dan *ficoll* dengan cara menempelkan ujung pipet mikro dan disemprot secara perlahan agar *ficoll* tidak pecah, sehingga sel-sel darah yang mempunyai gradient lebih tinggi dari *ficoll* akan turun kebawah.
- e. Tabung ditutup dan disentrifuge selama 30 menit dengan tekanan 1900 rpm pada suhu 20° C, sehingga terbentuk empat lapisan berturut-turut dari bawah ke atas. Eritrosit dan neutrofil, *ficoll*, limfosit, dan cairan plasma. Kemudian, cairan plasma, limfosit, dan *ficoll* dipisahkan dengan mikro pipet secara hati-hati.
- f. Lapisan terbawah yang mengandung eritrosit dan neutrofil diresuspeni dengan HBSS sebanyak 6 cc, eritrosit dan neutrofil dipisahkan menggunakan dekstran 6% sebanyak 1 cc yang disiapkan dalam tabung *falcon* lain. Darah yang sudah diresuspensi dialirkan ke dalam tabung berisi dekstran dan dilakukan pipetting, lalu dibiarkan selama 60 menit hingga terjadi pengendapan eritrosit pada dasar tabung.

- g. Supranatan mengandung neutrofil pada lapisan teratas diaspirasi, kemudian ditambah dengan HBSS sebanyak 1 cc dilakukan pipetting agar homogen lalu disentrifuse dengan kecepatan 1700 rpm selama 10 menit pada suhu 20° C.
- h. Setelah disentrifuse HBSS pada lapisan teratas dibuang dengan mikro pipet.
- i. Siapkan whell plate dan cover slip yang mengandung *poly L-lysine*. Kemudian melapiskan neutrofil sebanyak 100 µl jangan sampai melebar melebihi cover slip agar neutrophil menempel dan pada saat pencucian tidak terbang. Kemudian tambahkan fungizone 5µL dan penstrep 20µL.
- j. Inkubasi dengan suhu 37° C selama 15 menit.
- k. Setelah inkubasi tetesi RPMI sebanyak 1000µL sebelum di inkubasi lagi cek di bawah mikroskop inverted. Apabila tidak terdapat kontaminasi tambahkan penstrep 20 µL dan fungizone 5 µL. inkubasi kembali selama 30 menit.
- l. Setelah diinkubasi cuci dengan RPMI sebanyak 1000 µL sebanyak 2x. Buang dan tambahkan M199 sebanyak 1000 µL. Kemudian cek dibawah mikroskop inverted terjadi kontaminasi atau tidak. Jika tidak terjadi kontaminasi tambahkan penstrep 20 µL dan 5 µL kedalam wheel kelompok kontrol.
(Romanelli, dkk. 1999).

3.7.3 Inkubasi neutrofil Dengan Ekstrak Daun Singkong

Isolat neutrofil dalam microplate inkubasi menggunakan *shaker incubator* selama 15 menit agar neutrofil melekat pada suhu 37° C dan 5% CO₂ dengan menggunakan gas generating kit, kemudian dilakukan pengecekan dibawah mikroskop inverted. Setelah itu neutrofil diresuspensi dengan 1000µl RPMI, kemudian buang. Tambahkan perlakuan sesuai kelompok. Pada kelompok kontrol 1 dan 2 (K1 dan K2) neutrofil hanya diberi RPMI. Pada kelompok perlakuan 1 (P1) ditambahkan 200µl ekstrak daun singkong dengan konsentrasi 25%. Pada kelompok perlakuan 2 (P2) ditambahkan ekstrak daun singkong dengan konsentrasi 12,5%. Setiap kelompok perlakuan terdiri dari 4 sampel. Lalu dilakukan pipetting sampai neutrofil dan ekstrak homogen lalu diinkubasi selama 6 jam pada suhu 37° C dan 5% CO₂. Setelah 6 jam dilakukan pengamatan

dibawah mikroskop untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun singkong terhadap neutrofil. Selanjutnya, cuci dengan M199 sebanyak 1000 μ L kemudian buang.

3.8.7 Pemaparan Lipopolisakarida E. Colli

Pada setiap kelompok perlakuan secara perlahan ditambahkan LPS E. Colli lalu dilakukan pipetting dan diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37° C dan 5% CO₂. Diamati perubahan dan perkembangan neutrofil setiap jam selama waktu inkubasi dengan LPS. Pada akhir pengamatan dilakukan pencucian dengan HBSS sebanyak dua kali. Setelah diinkubasi selama 2 jam, lalu difiksasi dengan menggunakan metanol absolut selama \pm 1 menit.

3.8.8 Pewarnaan IHC

Plate yang sudah difiksasi dicuci menggunakan *aquadest* dan didiamkan selama 10 menit. Kemudian buang *aquadest* dengan pipet lalu cuci dengan PBS dan diamkan selama 10 menit. Buang PBS dan teteskan H₂O₂ 3% selama 10 menit. Buang H₂O₂ 3% dan cuci kembali dengan PBS 3 kali bergantian selama 5 menit. Buang rendaman terakhir dan teteskan Ab Primer sebanyak 5 μ dan diamkan selama semalaman atau minimal 18 jam dengan suhu 4° C.

Setelah didiamkan semalaman atau minimal 18 jam plate dicuci kembali dengan PBS sebanyak 3 kali secara bergantian selama 5 menit. Buang rendaman PBS terakhir kemudian tambahkan *Conjugated Streptavidin* dan diamkan selama 30 menit. Kemudian cuci dengan PBS sebanyak 3 kali masing-masing diamkan selama 5 menit. Teteskan chromogen dan diamkan selama 20 menit. Cuci kembali dengan PBS sebanyak 3x masing-masing diamkan selama 5 menit. Setelah itu teteskan HE pada tiap plate dan diamkan selama 50 detik. Lalu buang cairan HE dan cuci dengan *aquadest* selama 10 detik. Buang *aquadest* dalam plate diangin-anginkan sampai preparat kering. Lakukan mounting untuk pembacaan ekspresi COX-2.

3.8.9 Penghitungan Ekspresi COX-2

Ekspresi COX-2 diamati menggunakan mikroskop inverted. Sel yang mengekspresikan COX-2 akan memberikan warna coklat/gelap. Jumlah sel dihitung pada luasan tertentu. Setelah itu dianalisis.

3.8 Analisis Data

Pada penelitian ini, data yang didapatkan dianalisis menggunakan uji *Kolmogrov Smirnov* untuk uji normalitas dan uji *Levene* untuk uji homogenitas. Data yang dihasilkan terdistribusi normal dan homogen, maka dilakukan uji statistik parametrik, yaitu *One Way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji LSD. Semua uji menggunakan tingkat kemaknaan 95% ($\alpha=0,05$) (Notoadmodjo, 2005).

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian tentang potensi ekstrak daun singkong terhadap ekspresi COX-2 pada neutrofil yang dipapar LPS E. Colli dapat disimpulkan bahwa daun singkong membuktikan dapat berperan sebagai anti inflamasi. Ini dibuktikan dengan terlihatnya sel neutrofil pada kelompok kontrol yang selnya masih utuh dan tidak lisis setelah dipapar LPS e. colli. Daun singkong juga dapat berpotensi dalam menghambat ekspresi COX-2.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, saran yang dapat diberikan penulis sebagai berikut:

1. Perlu adanya penelitian lebih lanjut tentang manfaat lain dari ekstrak daun singkong.
2. Perlu adanya penelitian lebih lanjut tentang kandungan aktif daun singkong sebagai agen anti inflamasi, khususnya terhadap penurunan jumlah sel neutrofil saat dipapar LPS E. Colli.

DAFTAR PUSTAKA

- Aryanto, B. 2013. Situs Online (diakses 29 Mei 2014)
<http://tanamsingkong.blogspot.co.id/p/panduan-menanam-singkong.html>
- Anonim. 2010. *Daun Ubi Kayu* (diakses 29 Mei 2014)
<http://repository.upi.edu/chapter2.pdf>
- Anonim. 2011. *Botani Daun Singkong* (diakses 29 Mei 2014)
<http://repository.usu.ac.id/Chapter20II.pdf>
- Cavalieri, S.J., I.D. Rankin., R.J. Harbeck., R.S. Sautter., Y.S. Carter., S.E. Sharp., J.H. Ortez., and C.A. Spiegel. 2005. *Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing*. American Society for Microbiology. USA
- Chavez, AL. 2000. Iron, carotene, and ascorbic acid in cassava roots and leaves. *Food Nutr Bull* 21: 410–413.
- Dacie and Lewis S. M. 2001. *Miscellaneous tests*. In: Lewis S. M., Bain B. J., Bates I., editors: *Dacie and lewis practical haematology*. 9th ed. London: Harcourt Publisher Limited.
- Daniel, W.W. 2005. *Biostatic: A Foundation for Analysis in The Health Sciences*. Eight Edition. Georgia Wiley.
- Dannhardt, G., dan Laufer, S., 2000. Structural approach to explain the selectivity of COX-2 inhibitors: Is there a common pharmacophore ?. *Curr. Med. Chem* 7: 1101–1112.
- Depkes. (1986). *Sediaan Galenik*. Jakarta : Departemen Kesehatan RI. Halaman 13.
- DepKes R.I. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. Edisi I*. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. Direktorat Pengawasan Obat Tradisional. Jakarta.
- DepKes R.I. 2005. *Parameter Standart Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, Direktorat Jendral Pengawasan Obat Tradisional. Jakarta, 4-13.

- Desmiaty, Y.; Ratih H.; Dewi M.A.; Agustin R. 2008. *Penentuan Jumlah Tanin Total pada Daun Jati Belanda (Guazuma ulmifolia Lamk) dan Daun Sambang Darah (Excoecaria bicolor Hassk.) Secara Kolorimetri dengan Pereaksi Biru Prusia*. *Ortocarpus*. 8, 106-109.
- Doorland, W. A. Newman. 2002. *Kamus kedokteran DORLAND Edisi 29*. Jakarta: EGC Press.
- Fasuyi, Ayodeji O. (2005). Nutrient Composition and Processing Effects on Cassava Leaf (*Manihot esculenta*, Crantz) Antinutrients. *Pakistan Journal of Nutrition*, 4 (1) : 37-42, diakses November 2013.
- Fauquet, Claude and Fargette, Denis .1990. African Cassava Mosaic Virus: Etiology, Epidemiology, and Control. *Plant Disease* Vol. 74(6): 404–11, diakses 17 Oktober 2013.
- Fitzgerald, G.A., Patrono, C. 2001. The Coxibs, Selective Inhibitors of Cyclooxygenase-2. *N Eng J Med*; 345 (6): 433-442.
- Gaman, P. M dan K.B. Sherrington. 1994. *Ilmu Pangan: Pengantar Ilmu Pangan Nutrisi dan Mikrobiologi*. Edisi Kedua. Alih bahasa oleh Murdijati Gardjito, et al. Yogyakarta. Gadjah Mada University Press.
- Gaw, Mc. 2002. Periodontal Disease and Preterm Delivery of Low Birth Weight Infants. *J Can Dent Assoc*. Vol. 68(3): 165-9
- Goodman, Gilman. 2001. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th ed, *Mc Graw Hill, Toronto*, 687-71
- Guyton, A,C. dan Hall, J.E. 2007. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Edisi 11 Cetakan III. Terjemahan Irawan S, K. A Tragedi dan A. Santos. Jakarta: EGC.
- Hagerman, A. E. 2002. *Tannin Handbook*. Department of Chemistry and Biochemistry, Miami University.
- Harborne, J.B. 2006. *Metode Fitokimia*. ITB; Bandung
- Hariana, Arief. 2006. *Tumbuhan Obat dan Khasiatnya Seri 3*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Hartanto, B.S. 2011. *Mengobati Kanker Dengan Manggis*. Yogyakarta: Penerbit Second Hope. Halaman 19,24-25,30,50-51.

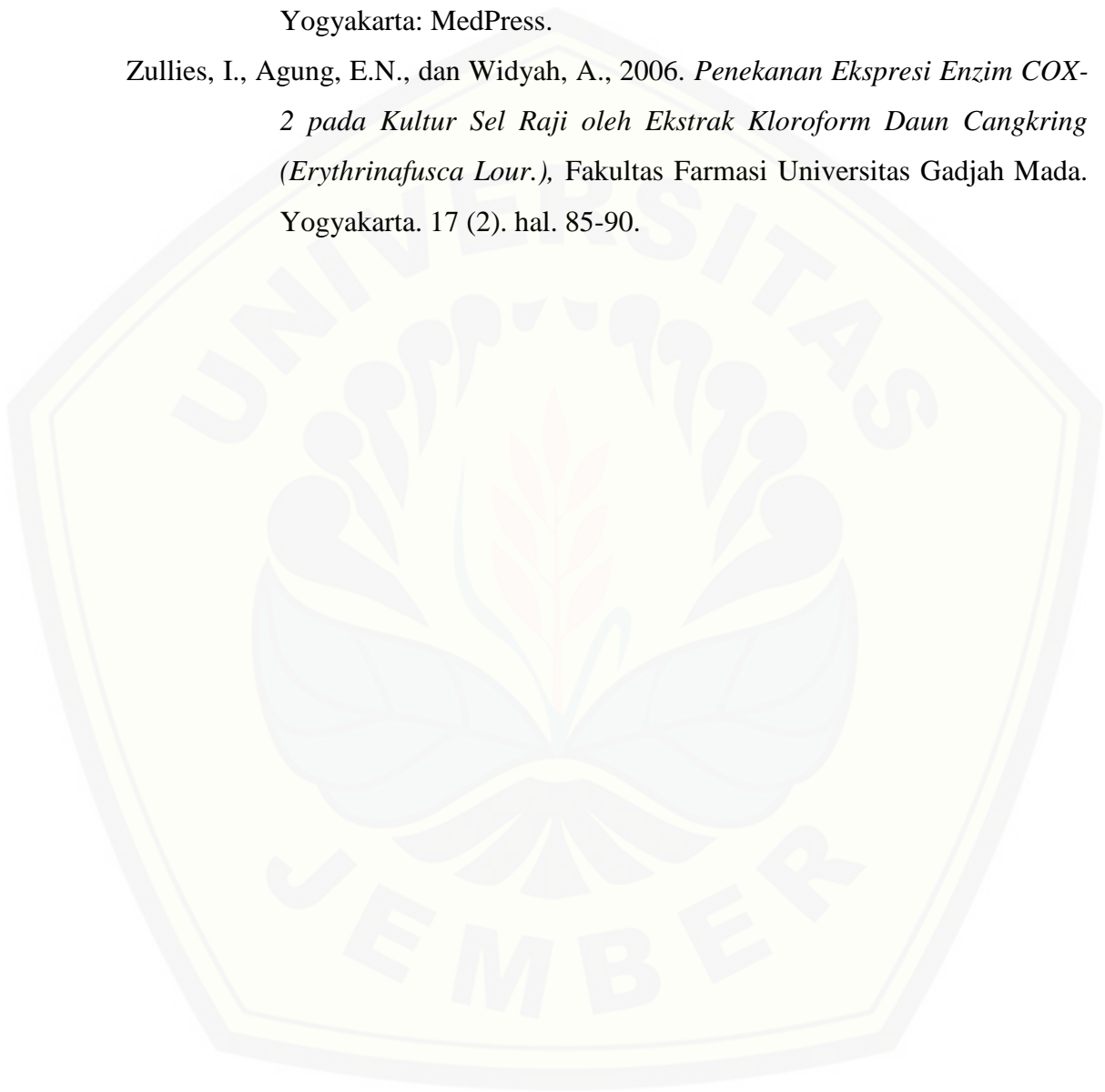
- Hoffbrand, A.V. 1996. *Kapita Selekta "Haematologi (Essential Haematology)* Edisi 2. Jakarta: EGC
- Indahyani, D. E. Santoso, A. S., Utoro, T., Sosesatyo, M. H. N. E. 2007. Pengaruh Induksi Lipopolisakarida (LPS) Terhadap Osteopontin Tulang Alveolaris Tikus Pada Masa Erupsi Gigi. *Indonesian Journal of Dentistry*. 14(1) : 2-7.
- Kimura M, et al. 2002. Formation of a carboxy-terminal domain phosphatase (Fcp1)/TFIIF/RNA polymerase II (pol II) complex in *Schizosaccharomyces pombe* involves direct interaction between Fcp1 and the Rpb4 subunit of pol II. *Mol Cell Biol* 22 (5) :1577-88
- Kusumastuti, S. 2007. Isoflavon Kedelai dan Potensinya Sebagai Penangkap Radikal Bebas. *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian*. Vol. 13: 128-129.
- Lay, Bibiana W. dan Hastowo, Sugyo. 2002. *Mikrobiologi*. Rajawali Press: Jakarta.
- Leahy, K.M., Ornberg, R.L., Wang, Y., Zweifel, B.S., Koki, A.T., dan Masferrer, J.L.2000. *Cyclooxygenase-2 Inhibition by Celecoxib Reduces Proliferation and Induces Apoptosis in Angiogenic Endothelial Cells in Vivo*, *Cancer Res.*, 62, 625–631
- Lee YL, Hsiue TR, Lee YC, Lin YC, Guo YL. 2005; The Association Between Glutathione STransferase P1, M1 Polymorphisms and Asthma in Taiwanese Schoolchildren. *Chest*. 128: 1156-62.
- Levinson W. 2008. Review of medical microbiology and immunology. 10th ed. *McGraw-Hill Companies*. p366-49.
- Lidiasari, dkk. 2006. Influence of Drying Temperature Difference on Physical and Chemical Qualities of Partially Fermented Cassava Flour. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia* Vol. 8.
- Madduluri, Suresh. Rao, K.Babu. Sitaram, B. In Vitro Evaluation of Antibacterial Activity of Five Indegenous Plants Extract Against Five Bacterial Pathogens of Human. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2013:5(4): 679-684.

- Markham, K.R. 1998. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Alih bahasa oleh Padmawinata, Kosasih. Bandung: ITB.
- Martel-Pelletier, J., Lajeunesse, D., Reboul, P., Pelletier, J.-P., 2003. Therapeutic Role of Dual Inhibitors of 5-LOX and COX, Selective and Non-Selective Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Ann. Rheum. Dis.*, 62, 501-509
- Meyer-Kirchrath J., Schrör K. 2002. Cyclooxygenase-2 Inhibition and Side Effects of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs in the Gastrointestinal Tract. *Curr. Med. Chem.*, 7, 1121-1129.
- Mitchell, R.N. & Cotran, R.S. (2003). *Acute and chronic inflammation*. Dalam S. L. Robbins & V. Kumar, Robbins Basic Pathology (7th ed.) (pp33-59). Philadelphia: Elsevier Saunders.
- Notoatmodjo, Soekidjo. 2005. *Metodelogi Penelitian Kesehatan*. Jakarta: PT. Rineka Cipta
- Oberholzer C, Oberholzer A, Clare-salzler M, Moldawer LL. Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration. *The FASEB Journal* 2001;15:879-92.
- Okeke, Adentuji. 2007. Antibacterial Activities of Ageratum Cn extracts on Selected Bacterial Pathogens. *The Internet Journal of Microbiology*. 4, (1), diakses November 2013.
- Okpuzor, J. 2009. Peroxidase activity of germinating Sorghum bicolor grains: Effect of some cations. *Journal Science of Food Agriculture*, 82, 1881-1885.
- Popola, OM. 2007. Effect of Cassava Effluent on the Hatching and Survival of African Catfish, *Clarias gariepinus* Larvae. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*
- Prescott, L.M., J.P. Harley. & D.A. Klein. 2002. *Microbiology* 4th ed. Mc-Graw Hill Comp, Inc. New York. USA.
- Price, S & Wilson, L, 2005. *Patofisiologi: Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit*. Edisi 6. EGC, Jakarta.

- Remick DG. 2007. Biological Perspectives, Pathophysiology of Sepsis. *American Journal of Pathology*. 1435-43
- Richardo, 2012. *Kandungan Organik Tanaman Singkong*. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Robbins, S. RS., dan Kumar, V. 2007. “*Basic Patology*”. Disadur Staf Pengajar Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Buku Ajar Patologi. Edisi 7. Jakarta: EGC.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Bandung: ITB.
- Romanelli R, Mancini S, Laschinger C, Overall CM, Sodek J, McCulloch CAG. *Activation of neutrophil collagenase in periodontitis*. 1999. *Infection and Immunity*. 69(5): 2319-2326.
- Rubatzky *et al.* 1999. *Sayuran Dunia: Prinsip Produksi dan Gizi*, Jilid 3 (diterjemahkan dari: *World Vegetables: Principle, Production and Nutritive Values*, penerjemah: C. Herison). Bandung: ITB.
- Rukmana, Rahmat. 2002. *Budi Daya Tanaman Singkong*. Kaninus: Yogyakarta.
- Sabir, A, (2003). *Aktivitas Antibakteri Flavonoid Propolis Trigona sp Terhadap Bakteri Streptococcus mutans (in vitro)*. Surabaya : Majalah Kedokteran Gigi (Dent.J.), Vol.38, No.3, Hal : 135-141
- Sadikin, M. 2002. *Biokimia Enzim*. Jakarta : Widya Medika
- Sastrohamidjojo, Hardjono. 2001. *Spektroskopi*. Yogyakarta: Liberty.
- Shabella, R. 2011. *Terapi Kulit Manggis*. Klaten : Galmas Publisher.
- Sukandar E Y, Tren dan Paradigma Dunia Farmasi, Industri-Klinik Teknologi Kesehatan, disampaikan dalam orasi ilmiah Dies Natalis ITB http://itb.ac.id/focus/focus_file/orasi-ilmiah-dies-45.pdf (diakses Oktober 2013)
- Sukrasno, 2009, “*Efek imunomodulator ekstrak air temulawak (Curcuma xanthorrhiza Roxb)*”. Forum Obat Herbal Indonesia, 2006.
- Sunarno. 2007. *Efek Phyllanthus niruri L. pada Prosentase Neutrofil, Koloni Bakteri Limpa, dan Histopatologi Hepar Mencit Balb/C yang Diinfeksi Salmonella typhimurium*. Tesis. Semarang: Universitas Diponegoro. Hal. 19

- Thomson, A. D, R. E. Cotton. 1997. *Catatan kuliah patologi*. Jakarta :EGC.
- Sabiston, Dvid C, Jr., M. D. 1994. Buku ajar bedah. Jakarta : EGC.
- Tjitrosoepomo. 2005. Pemanfaatan Bagian Tanaman Singkong. *Jurnal Teknologi Pertanian*. Vol 8: 1-15.
- Tripathi, K.D., 2003. *Essentials of Medical Pharmacology*. 5th ed. New Delhi: Jaypee Brothers.
- Tsumbu, Caesar N. 2011. Antioxidant and antiradical activities of Manihot esculenta Crantz (Euphorbiaceae) leaves and other selected tropical green vegetables investigated on lipoperoxidation and PMA activated monocytes. *Journal of Nutrients*. diakses Maret 2013
- Vardar, Saynur. 2005. Administration of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors in Dentistry. *Journal of Academic* Vol 11.
- Vongsak, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchote, S., Wongkrajang, Y., Gritsanapan, W. 2012. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of Moringa oleifera leaf extract by the appropriate extraction method. *Journal of Crops and Products*.
- Weinblatt, M.E. 2003. *Anti-Inflammatory Drugs: NSAIDs, COX-2 Selective Inhibitors, Glucocorticoids and Anti-Cytokine Agents*. Harvard - MIT Division of Health Sciences and Technology.
- Wirasutisna, K.R., Iwo, M.I., 2009, "Xanthine oxidase inhibitory and immunomodulatory activities of fifteen grades Indonesia orthodox black tea", *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6 (5), pp. 39-42.
- Ya-Di L., Frenz C. M., Mian-Hua C., Yu-Rong W., Feng-Juan L., Cheng L., Ning L., Bohlin L., Chang-Lu W., 2011, Primary Virtual and in vitro Bioassay of Natural Inhibitors from Flavonoids against COX-2, *Chinese Journal of Natural Medicines*, 9, 156-160.

- Yendriwati. 2006. Kebutuhan Vitamin C dan Pengaruhnya terhadap Kesehatan Tubuh dan Rongga Mulut. *Dentika Dental Journal*, Vol 11, No. 1: 78-83.
- Yuniarti, T. 2008. *Ensiklopedia Tanaman Obat Tradisional*. Cetakan Pertama. Yogyakarta: MedPress.
- Zullies, I., Agung, E.N., dan Widyah, A., 2006. *Penekanan Ekspresi Enzim COX-2 pada Kultur Sel Raji oleh Ekstrak Kloroform Daun Cangkring (Erythrina fusca Lour.)*, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. 17 (2). hal. 85-90.



LAMPIRAN

Lampiran A Inform Consent

SURAT PERNYATAAN
INFORMED CONSENT

SAYA YANG BERTANDA TANGAN DIBAWAH INI:

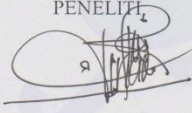
NAMA : SIMON YONANDA
NIM : 1016101010
UMUR : 22 TAHUN
JENIS KELAMIN : LAKI-LAKI
ALAMAT : BATURADEN II NO. 007

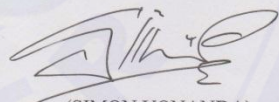
MENYATAKAN BERSEDIA MENJADI SAMPEL DARI:

NAMA : DINAR PRAFITA SARI DEWI
NIM : 101610101068
FAKULTAS : KEDOKTERAN GIGI
ALAMAT : MASTRIP 1 NO. 61 JEMBER

DALAM RANGKAIAN PROSES PEMBUATANN TUGAS AKHIR DENGAN JUDUL
"POTENSI EKSTRAK DAUN SINGKONG TERHADAP EKSPRESI COX-2 PADA
NEUTROFIL YANG DIPAPAR LPS *E. Colli*.

JEMBER,

PENELITI,

(DINAR PRAFITA)

YANG MENYATAKAN

(SIMON YONANDA)

Lampiran B Data Hasil Penghitungan Jumlah Ekspresi COX-2

Jumlah neutrofil yang mengekspresikan COX-2 kontrol negatif

Lapang Pandang →	1	2	3	4	5	Rata-rata
Sampel 1	4	3	3	1	2	2,6
Sampel 2	2	0	0	2	1	1
Sampel 3	1	4	2	3	3	2,6
Sampel 4	2	2	0	1	2	1,4

Jumlah neutrofil yang mengekspresikan COX-2 kontrol positif

Lapang Pandang →	1	2	3	4	5	Rata-rata
Sampel 1	3	6	4	11	2	5,2
Sampel 2	6	3	1	2	2	2,8
Sampel 3	6	3	4	3	5	4,2
Sampel 4	3	1	2	3	2	2,4

Jumlah neutrofil yang mengekspresikan COX-2 konsentrasi 12,5%

Lapang Pandang →	1	2	3	4	5	Rata-rata
Sampel 1	44	43	25	46	34	38,4
Sampel 2	24	26	24	33	24	26,2
Sampel 3	42	76	63	88	68	67,4
Sampel 4	61	49	43	32	48	46,6

Jumlah neutrofil yang mengekspresikan COX-2 konsentrasi 25%

Lapang Pandang →	1	2	3	4	5	Rata-rata
Sampel 1	6	12	14	14	9	11
Sampel 2	30	40	31	42	30	34,6
Sampel 3	44	27	24	22	45	32,4
Sampel 4	31	32	38	43	45	37,8

Lampiran C Hasil Analisis Data Statistik

Uji Normalitas Kolmogrov-Smirnov

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Kontrol (-)	Kontrol (+)	Konsentrasi 12,5%	Konsentrasi 25,5%
N		4	4	4	4
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	1,9000	3,6000	44,6500	28,9500
	Std. Deviation	,82462	1,3565	17,32849	12,17032
Most Extreme Differences	Absolute	,302	,222	,205	,362
	Positive	,228	,222	,205	,234
	Negative	-,302	-,171	-,155	-,362
Kolmogorov-Smirnov Z		,604	,445	,410	,723
Asymp. Sig. (2-tailed)		,859	,989	,996	,672

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Rerata
N		16
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	19,7750
	Std. Deviation	20,79921
Most Extreme Differences	Absolute	,258
	Positive	,258
	Negative	-,183
Kolmogorov-Smirnov Z		1,033
Asymp. Sig. (2-tailed)		,236

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Uji Homogenitas Levene

Test of Homogeneity of Variances

Rerata

Levene Statistic	df 1	df 2	Sig.
2,910	3	12	,078

Uji One Way ANOVA

Descriptives

Rerata

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol (-)	4	1,900	,825	,412	,588	3,212	1,00	2,60
Kontrol (+)	4	3,600	1,356	,678	1,442	5,758	2,20	5,20
Konsentrasi 12,5%	4	44,650	17,328	8,664	17,077	72,223	26,20	67,40
Konsentrasi 25,0%	4	28,950	12,170	6,085	9,584	48,316	11,00	37,80
Total	16	19,775	20,799	5,200	8,692	30,858	1,00	67,40

ANOVA

Rerata

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5136,370	3	1712,123	15,188	,000
Within Groups	1352,740	12	112,728		
Total	6489,110	15			

Uji LSD

Multiple Comparisons

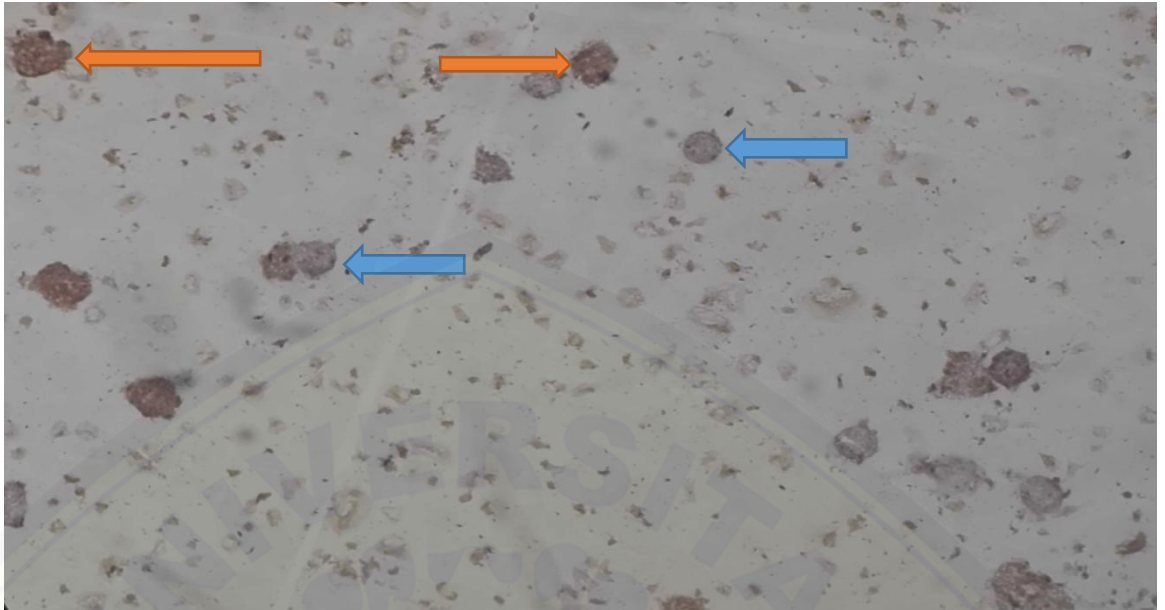
Dependent Variable: Rerata

LSD

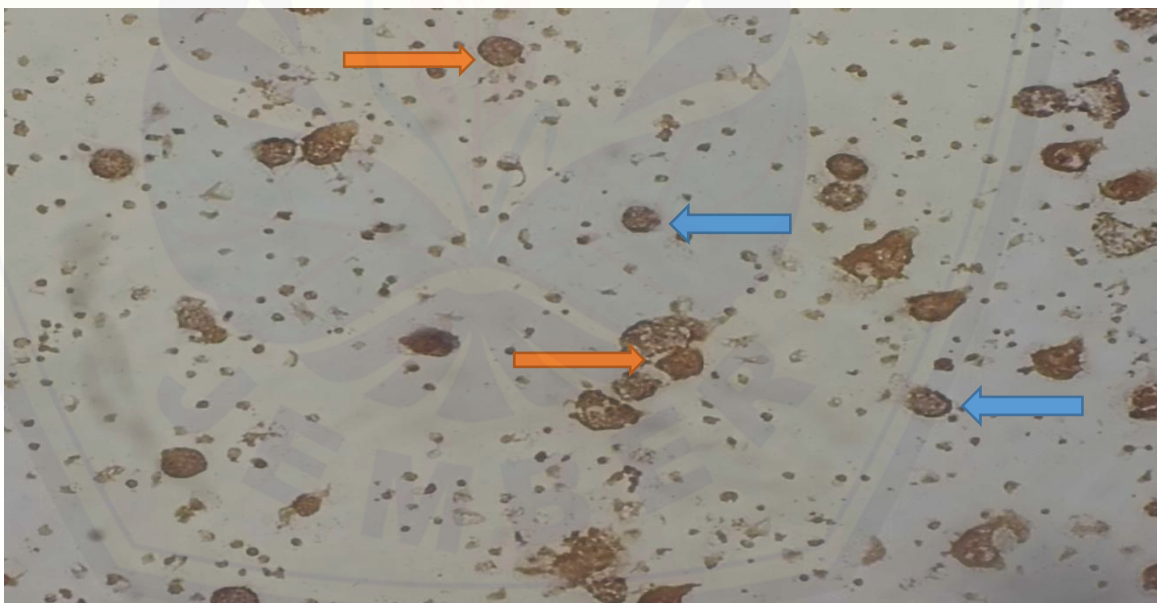
(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol (-)	Kontrol (+)	-1,700	7,508	,825	-18,058	14,658
	Konsentrasi 12,5%	-42,750*	7,508	,000	-59,108	-26,392
	Konsentrasi 25,0%	-27,050*	7,508	,004	-43,408	-10,692
Kontrol (+)	Kontrol (-)	1,700	7,508	,825	-14,658	18,058
	Konsentrasi 12,5%	-41,050*	7,508	,000	-57,408	-24,692
	Konsentrasi 25,0%	-25,350*	7,508	,006	-41,708	-8,992
Konsentrasi 12,5%	Kontrol (-)	42,750*	7,508	,000	26,392	59,108
	Kontrol (+)	41,050*	7,508	,000	24,692	57,408
	Konsentrasi 25,0%	15,700	7,508	,058	-,658	32,058
Konsentrasi 25,0%	Kontrol (-)	27,050*	7,508	,004	10,692	43,408
	Kontrol (+)	25,350*	7,508	,006	8,992	41,708
	Konsentrasi 12,5%	-15,700	7,508	,058	-32,058	,658

*. The mean difference is significant at the .05 level.

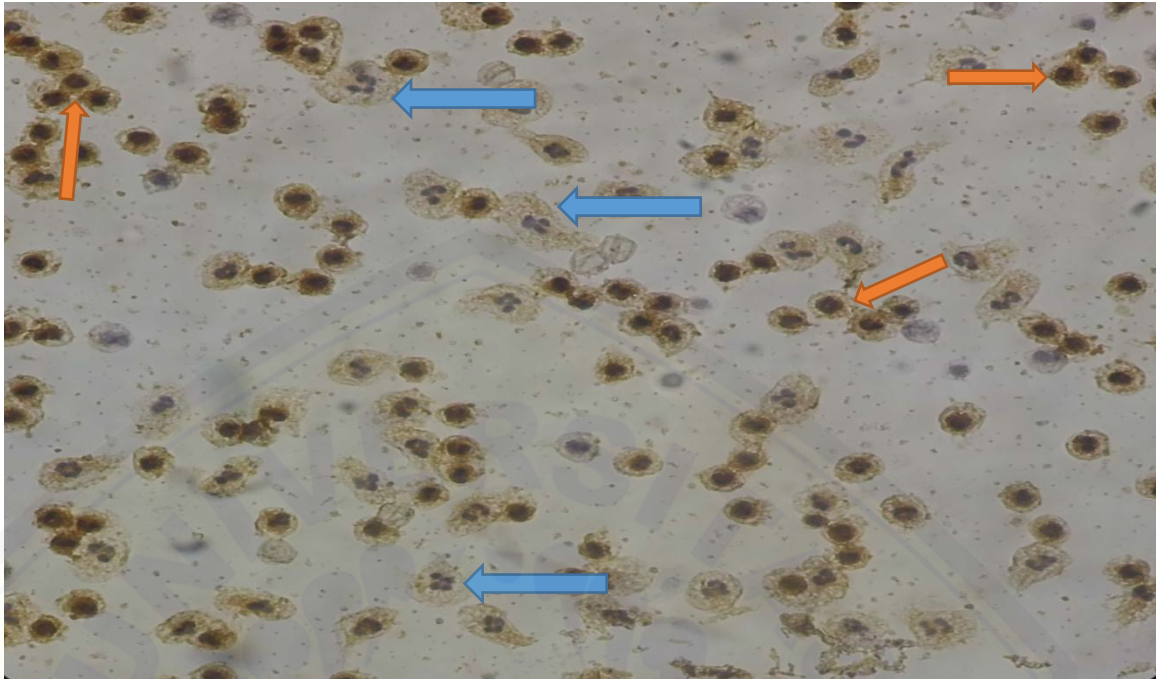
Lampiran D Foto Hasil Penelitian



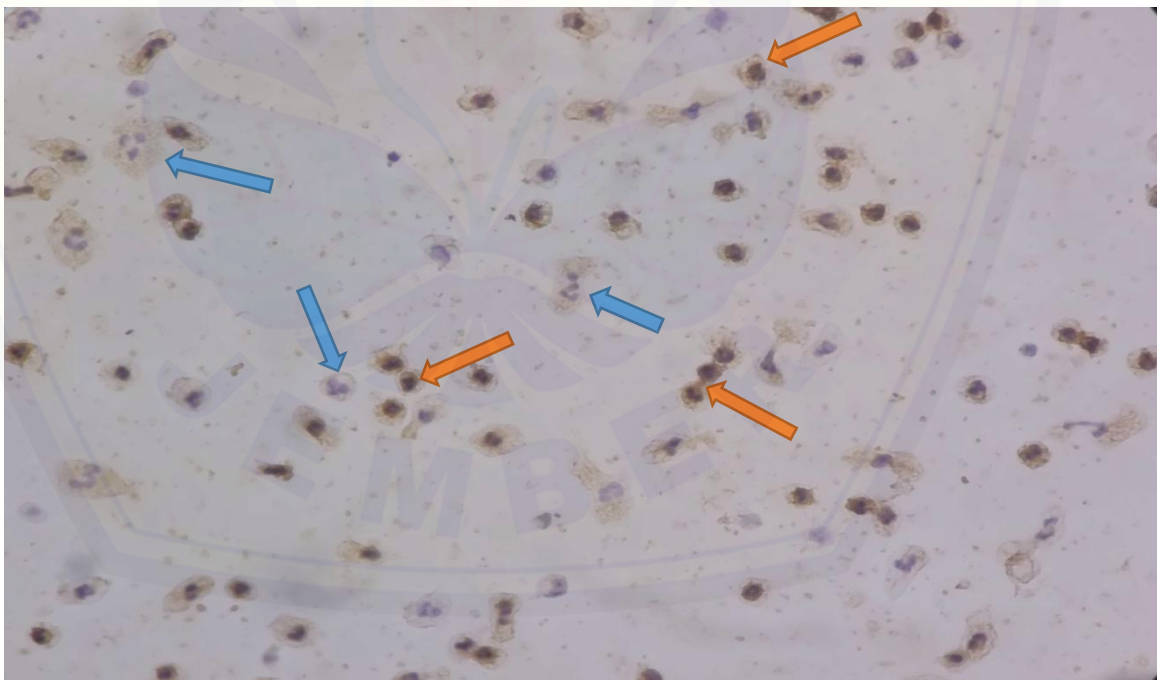
Kelompok kontrol negatif: tanda panah merah menunjukkan ekspresi COX-2 meskipun selnya lisis inti sel masih tampak. Sedangkan panah biru menunjukkan sel yang tidak mengekspresikan COX-2



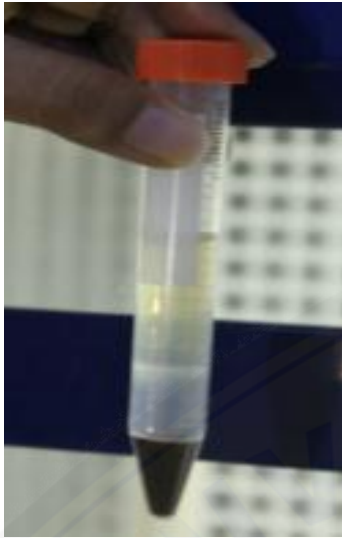
Kelompok kontrol positif: tanda panah merah menunjukkan ekspresi COX-2 meskipun selnya lisis inti sel masih tampak. Sedangkan panah biru menunjukkan sel yang tidak mengekspresikan COX-2



Kelompok konsentrasi 12.5% : tanda panah merah menunjukkan ekspresi COX-2.
Sedangkan panah biru menunjukkan sel yang tidak mengekspresikan COX-2.



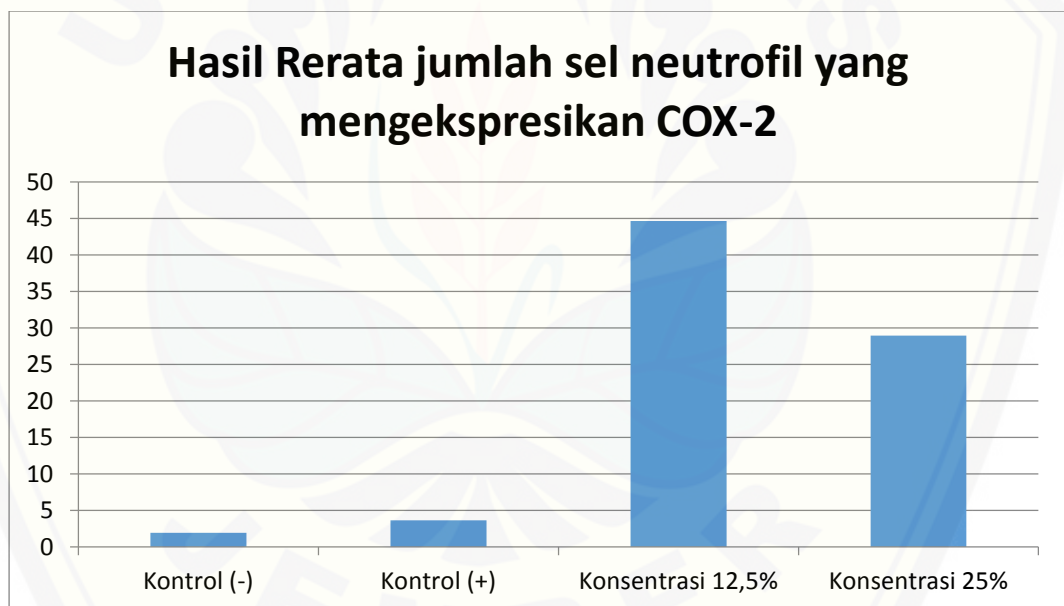
Kelompok konsentrasi 12.5% : tanda panah merah menunjukkan ekspresi COX-2.
Sedangkan panah biru menunjukkan sel yang tidak mengekspresikan COX-2.



Terbentuk 4 lapisan (urutan mulai bagian atas) :

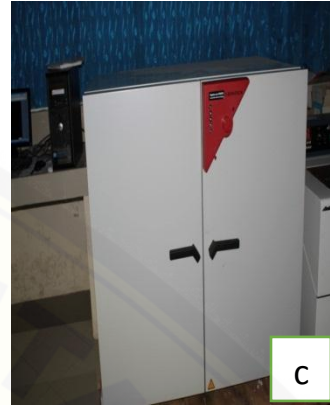
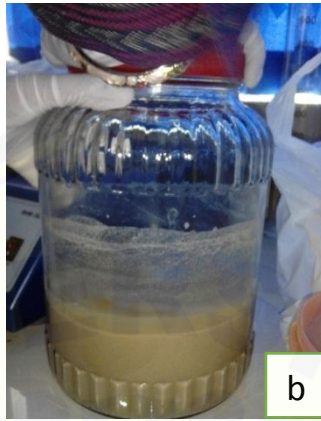
1. Eritrosit dan neutrofil
2. *Ficoll*
3. Limfosit
4. Cairan plasma

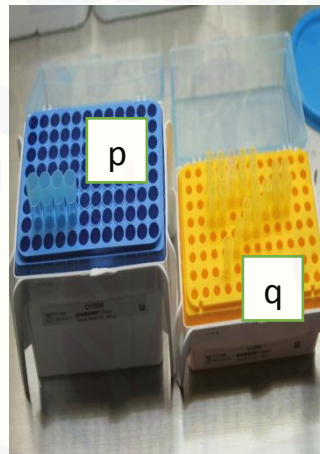
Gambar diagram batang jumlah neutrofil yang mengekspresikan COX-2



Lampiran E Alat dan Bahan Penelitian

Alat penelitian

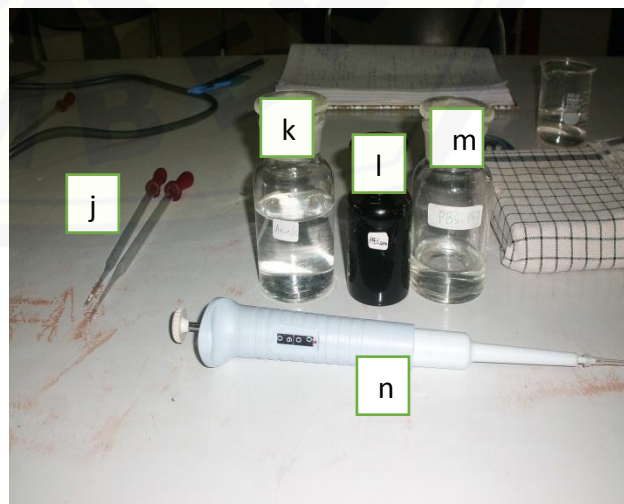
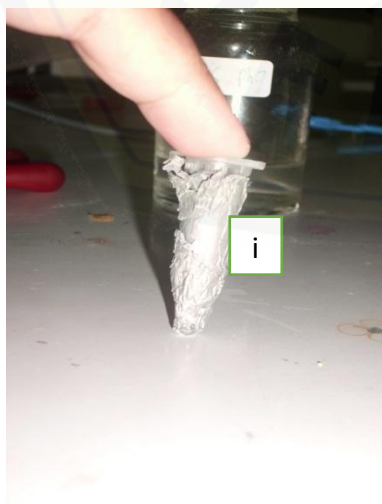
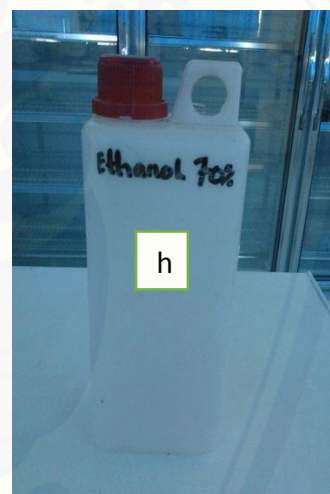
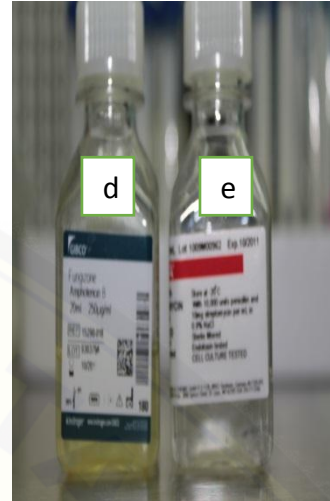
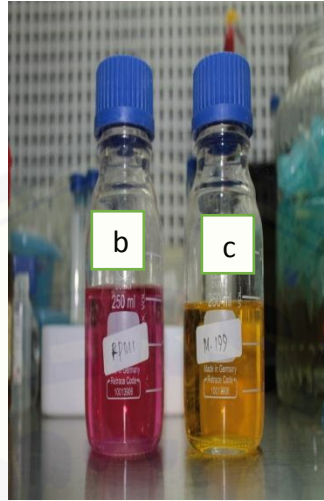




Keterangan:

- | | |
|------------------------------|--------------------------------|
| a. <i>Rotary evaporator</i> | l. <i>Laminar Flow Cabinet</i> |
| b. <i>Toples maserasi</i> | m. <i>Masker</i> |
| c. <i>Oven</i> | n. <i>Handscoon</i> |
| d. <i>Neraca digital</i> | o. <i>Syringe</i> |
| e. <i>Tabung reaksi</i> | p. <i>Blue type</i> |
| f. <i>Syringe filter</i> | q. <i>Yellow type</i> |
| g. <i>Incubator Shaker</i> | r. <i>Tabung Falcon</i> |
| h. <i>Microplate</i> | |
| i. <i>Centrifuge</i> | |
| j. <i>Mikroskop Inverted</i> | |
| k. <i>Pipet Mikro</i> | |

Bahan penelitian



Keterangan

- | | |
|-----------------------------------|-----------------------|
| a. HBSS | h. <i>Ethanol</i> 70% |
| b. RPMI | i. COX-2 |
| c. M 199 | j. Pipet |
| d. <i>Fungizone</i> | k. <i>Aquadest</i> |
| e. <i>Penicillin Streptomycin</i> | l. Cat HE |
| f. Alkohol 70% | m. PBS |
| g. Darah vena perifer | n. Pipet mikro |

