



**POTENSI REBUSAN DAUN MIMBA (*Azadirachta indica*)
PADA ADHESI SEL NEUTROFIL TERHADAP
*Candida albicans***

SKRIPSI

Oleh :

Amalia Hayudiarti

NIM 111610101039

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2019**



**POTENSI REBUSAN DAUN MIMBA (*Azadirachta indica*)
PADA ADHESI SEL NEUTROFIL TERHADAP
*Candida albicans***

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 :

Amalia Hayudiarti

NIM 111610101039

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2019**

PERSEMBAHAN

Dengan setulus hati skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Agama, Bangsa dan Negaraku yang kujunjung tinggi serta almamaterku yang akan selalu kujaga nama baiknya.
2. Kedua orang tuaku, Ayahanda **Adi Nugroho** dan Ibunda **Dwiarti Listyowati**. Terimakasih yang tak terhingga atas usaha, jerih payah, cinta, kasih sayang, dorongan semangat dan nasehat yang selalu diberikan demi keberhasilan, kesuksesan dan kebahagiaan saya. Ayah dan ibu selama ini selalu menjadi sumber inspirasi, motivator dan keteladanan bagi saya. Kerja keras, perjuangan dan segala pengorbanan ayah dan ibu membuat saya semangat menjalani hidup dan mewujudkan cita-cita.
3. Adik-adikku tercinta, **Sofie Rahmadianti**, **Haninditya Bintari** dan semua yang terkasih. Terima kasih telah menjadi sumber semangat dan motivasi untuk segera mewujudkan cita-cita.
4. Sahabat-sahabatku yang selalu memberikan dukungan, semangat, bantuan dan motivasi.

MOTTO

Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan. Maka apabila kamu telah selesai (dari suatu urusan). Kerjakanlah dengan sungguh-sungguh (urusan) yang lain. Dan hanya Kepada Tuhanmulah hendaknya kamu berharap. (terjemahan Q.S.

Al-Insyirah : 6-8) *)

It does not matter how slowly you go as long as you do not stop (Confucius)

Kebanggaan kita yang terbesar adalah bukan tidak pernah gagal, tetapi bangkit kembali setiap kali kita jatuh (Confucius)

Jangan melihat masa lalu dengan penyesalan, jangan pula melihat masa depan dengan ketakutan, tapi lihatlah sekitarmu dengan penuh kesadaran (James Thurber)

*)Departemen Agama Republik Indonesia. 2005. Al Qur'an dan Terjemahannya *Special of Women*. Jakarta: Yayasan Penterjemah/Penafsir Al-Qur'an.

PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan dibawah ini :

Nama : Amalia Hayudiarti

NIM : 111610101039

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi saya yang berjudul “Potensi Rebusan Daun Mimba (*Azadirachta indica*) Pada Adhesi Sel Neutrofil Terhadap *C. albicans*” adalah benar-benar hasil karya saya 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 sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi. Dengan demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, Januari 2019
Yang menyatakan,

Amalia Hayudiarti
NIM 111610101039

SKRIPSI

**POTENSI REBUSAN DAUN MIMBA (*Azadirachta indica*)
PADA ADHESI SEL NEUTROFIL TERHADAP
*Candida albicans***

Oleh :

Amalia Hayudiarti

111610101039

Dosen Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Prof. Dr. drg. IDA Ratna Dewanti M.Si

Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Tantin Ermawati, M.Kes

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Potensi Rebusan Daun Mimba (*Azadirachta indica*) Pada Adhesi Sel Neutrofil Terhadap *C. albicans*” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember pada :

Hari, tanggal : 10 Desember 2018

Tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Penguji Utama

Penguji Anggota

drg. Roedy Budirahardjo, M.Kes, Sp.KGA
NIP. 196407132000121001

drg. Rudy Joelijanto, M.Biomed
NIP. 197207151998021001

Pembimbing Utama

Pembimbing Anggota

Prof. Dr. drg. IDA Ratna Dewanti, M.Si
NIP. 196705021997022001

drg. Tantin Ermawati, M.Kes
NIP. 198003222008122003

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Jember,

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

RINGKASAN

Potensi Rebusan Daun Mimba (*Azadirachta indica*) Pada Adhesi Sel Neutrofil Terhadap *C. albicans*; Amalia Hayudiarti, 111610101039, 2019; 67 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Mengatasi berbagai macam penyakit dapat lebih ditujukan pada respon imun tubuh penderita, dengan cara memberikan bahan imunomodulator dari tanaman obat. Mimba (*Azadirachta indica*) merupakan salah satu tanaman obat yang dapat memodulasi imunitas alami dan adaptif karena memiliki senyawa yang bersifat imunomodulator yang dapat memodulasi respon imun terhadap infeksi. Infeksi rongga mulut salah satunya kandidiasis mulut dengan penyebab utama *C. albicans*. Daya tahan tubuh yang rendah dapat menyebabkan *C. Albicans* menjadi patogen dan dibutuhkan obat yang mempunyai efek antijamur sekaligus imunomodulasi. Proses fagositosis yang diawali dengan adhesi atau perlekatan terjadi di sel neutrofil dalam mengeliminasi *C. albicans*. Rebusan daun mimba dapat berperan sebagai imunomodulator dengan meningkatkan adhesi sel neutrofil terhadap *C. albicans*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi rebusan daun mimba (*Azadirachta indica*) pada adhesi sel neutrofil terhadap *C. Albicans* dan konsentrasi yang paling efektif.

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris *in vitro*, dengan rancangan *the post test only control group design*. Penelitian dilakukan di Laboratorium Bioscience Rumah Sakit Gigi dan Mulut Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember pada bulan April 2018. Neutrofil sebagai sampel penelitian dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu: kelompok kontrol (tanpa rebusan daun mimba), kelompok perlakuan 1 (rebusan daun mimba 3,125%), kelompok perlakuan 2 (rebusan daun mimba 6,25%), kelompok perlakuan 3 (rebusan daun mimba 12,5%), dan kelompok perlakuan 4 (rebusan daun mimba 25%). Setelah diberi rebusan, sampel dipapar dengan *C. albicans*. Kemudian dilakukan pewarnaan Giemsa dan dilakukan penghitungan indeks adhesi.

Rata-rata indeks adhesi pada kelompok K didapat sebesar 0,31, kelompok P1 sebesar 0,19, kelompok P2 sebesar 0,20, kelompok P3 sebesar 0,37, dan kelompok P4 sebesar 0,66. Data tersebut kemudian diuji normalitas (*Saphiro-*

Wilk) dan homogenitas (*Levene Test*). Hasil uji normalitas dan homogenitas diperoleh nilai signifikansi ($p < 0,05$) yang artinya data terdistribusi normal dan bersifat homogen. Selanjutnya data dilakukan uji *One Way Anova* dan didapatkan hasil ($p < 0,05$) yang artinya terdapat perbedaan bermakna pada data tersebut. Selanjutnya dilakukan uji LSD untuk mengetahui perbedaan antar kelompok, dari hasil uji LSD diketahui tidak semua kelompok terdapat perbedaan yang bermakna, sedangkan terdapat perbedaan yang bermakna pada kelompok P4 terhadap kelompok yang lain, dan antara kelompok P3 dengan P1 dan P2.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rebusan daun mimba mempunyai potensi dalam meningkatkan adhesi sel neutrofil terhadap *C. albicans*, dan adhesi sel neutrofil terhadap *C. albicans* pada kelompok P4 yang diberikan rebusan daun mimba dengan konsentrasi 25% memiliki rata-rata paling tinggi dibandingkan dengan kelompok lainnya, sehingga konsentrasi 25% merupakan konsentrasi yang efektif dalam meningkatkan adhesi sel neutrofil terhadap *C. albicans*.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Potensi Rebusan Daun Mimba (*Azadirachta indica*) Pada Adhesi Sel Neutrofil Terhadap *C. albicans*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

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

1. Allah S.W.T yang telah memberikan pencerahan serta pertolongan;
2. Kedua orang tuaku Ayahanda, Adi Nugroho dan Ibunda Dwiarti Listyowati yang telah membantu baik moral dan materiil, mendoakan, mendidik dan member kasih sayang serta pengorbanan yang tidak terhingga selama ini;
3. Adik-adikku yang terkasih Sofie Rahmadiani dan Haninditya Bintari serta keluarga besar Prawirohardjono dan Mangoendihardjo yang telah memberikan banyak dukungan, motivasi dan kebersamaan yang membahagiakan selama ini;
4. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Pros. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
5. DR. drg. IDA Susilawati, M.Kes selaku Pembantu Dekan I Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
6. DR. drg. Sri Hernawati, M.Kes selaku Pembantu Dekan II Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
7. drg. Izzata Barid, M.Kes selaku Pembantu Dekan III Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
8. Prof. Dr. drg. IDA Ratna Dewanti, M.Si selaku Dosen Pembimbing Utama dan drg. Tantin Ermawati, M.Kes selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang telah meluangkan waktu, pikiran dan perhatian dalam penyusunan skripsi ini;

9. drg. Roedy Budirahardjo, M.Kes., Sp. KGA selaku Dosen Penguji Utama dan drg. Rudy Joelijanto, M.Biomed selaku Dosen Penguji Anggota yang telah memberikan banyak masukan demi kesempurnaan skripsi ini;
10. drg. Rudy Joelijanto, M.Biomed selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing penulis selama kuliah;
11. Staf Laboratorium *Bioscience* Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yaitu mas Erwan dan mbak Azizah yang banyak membantu selama jalannya penelitian;
12. Teman-teman Terbaik di FKG, Lulu Rosima Putri, Dewi Martinda Hartono, dan Sheila Dian Pradipta yang selalu memotivasi dan memberi dukungan sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini;
13. Teman-teman seperjuangan skripsi, Nico Natanael Hendrata, Muhammad Sandy Irianto, Indah Putri Arifiana Dewi, Fadylla Nuansa Citra Bening, Yuliandari Amilia Putri, dan Nila Khurin'in serta adik-adik angkatan 2014 yang telah membantu dan saling memotivasi;
14. Teman-teman seperjuangan FKG UJ 2011 yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu, terimakasih atas kebersamaannya, semoga kita semua bisa meraih cita-cita dan menjadi kebanggaan almamater;
15. Semua pihak yang telah membantu dalam penulisan karya serta laporan skripsi ini.

Semoga skripsi ini dapat member manfaat dalam mengembangkan ilmu pengetahuan khususnya untuk disiplin ilmu kedokteran gigi. Kritik dan saran diharapkan terus mengalir untuk lebih menyempurnakan skripsi ini dan diharapkan dapat dikembangkan untuk penelitian-penelitian selanjutnya.

Jember, Januari 2019

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBING	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN.....	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR SINGKATAN	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Mimba.....	5
2.1.1 Taksonomi Mimba	5
2.1.2 Daun Mimba	6
2.1.3 Kandungan Daun Mimba	6
2.1.4 Manfaat Kandungan Senyawa Mimba	11
2.1.5 Efek Immunomodulator Mimba	12
2.2 Candida albicans	12
2.2.1 Pengertian <i>C. albicans</i>	12
2.2.2 Klasifikasi Pengertian <i>C. albicans</i>	13

2.2.3 Habitat dan Morfologi <i>C. albicans</i>	13
2.2.4 Adhesi P <i>C. albicans</i>	14
2.3 Neutrofil	17
2.3.1 Morfologi Neutrofil.....	17
2.3.2 Fungsi Neutrofil	18
2.3.3 Adhesi Neutrofil.....	18
2.4 Kerangka Konseptual	20
2.4.1 Penjelasan Kerangka Konseptual.....	21
2.5 Hipotesis	21
BAB 3. METODE PENELITIAN	22
3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	22
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	22
3.2.1 Tempat Penelitian	22
3.2.2 Waktu Penelitian	22
3.3 Identifikasi Variabel Penelitian	22
3.3.1 Variabel Bebas	22
3.3.2 Variabel Terikat	22
3.3.3 Variabel Terkendali.....	22
3.4 Definisi Operasional	23
3.4.1 Rebusan Daun Mimba	23
3.4.2 <i>C. albicans</i>	23
3.4.3 Neutrofil	23
3.4.4 Indeks Adhesi	23
3.5 Sampel Penelitian	24
3.5.1 Kriteria Isolat Neutrofil	24
3.5.2 Kriteria Daun Mimba	24
3.5.3 Jumlah Sampel	24
3.5.4 Penggolongan Sampel Penelitian.....	25
3.6 Alat dan Bahan	25
3.6.1 Alat	25
3.6.2 Bahan.....	25

3.7 Prosedur Penelitian	26
3.7.1 <i>Ethical Clearance</i>	26
3.7.2 Persiapan dan Sterilisasi Alat	26
3.7.3 Persiapan Rebusan Daun Mimba	26
3.7.4 Pengenceran Rebusan Daun Mimba	26
3.7.5 Persiapan Biakan <i>C. albicans</i>	27
3.7.6 Isolasi Neutrofil	28
3.7.7 Perlakuan Uji Indeks Adhesi	28
3.8 Analisis Data	29
3.9 Alur Penelitian	30
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	31
4.1 Hasil Penelitian	31
4.1.1 Hasil Isolasi Neutrofil	31
4.1.2 Hasil Uji Adhesi	31
4.2 Analisis Data Penelitian	33
4.2.1 Uji Normalitas dan Uji Homogenitas	33
4.3 Pembahasan	34
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	41
5.1 Kesimpulan	41
5.2 Saran	41
DAFTAR PUSTAKA	42
LAMPIRAN	47

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Pohon (A) dan daun mimba (B).....	6
2.2 Komponen bioaktif tanaman mimba.....	10
2.3 <i>C. albicans</i>	13
2.4 Adhesi <i>C. albicans</i> pada membran sel epitel	16
2.5 Adhesi dan fagositosis sel neutrofil terhadap <i>C. albicans</i>	17
2.6 Neutrofil	18
2.7 Bagan kerangka konsep	20
3.1 Bagan alur penelitian	30
4.1 Preparat hasil isolasi neutrofil	31
4.2 Adhesi sel neutrofil terhadap <i>C. albicans</i>	31
4.3 Diagram batang rata-rata indeks adhesi.....	32

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Jumlah protein, fiber dan lemak daun mimba	7
2.2 Kadar vitamin daun mimba	7
2.3 Kadar mineral daun mimba	8
2.4 Komposisi fitokimia daun mimba	8
2.5 Manfaat kandungan senyawa mimba.....	11
2.6 Reseptor yang dapat mendeteksi jamur	19
4.1 Nilai rata-rata indeks adhesi sel neutrofil terhadap <i>C. albicans</i>	32
4.2 Hasil uji <i>One Way Anova</i>	33
4.3 Hasil uji LSD (<i>Least Significance Difference</i>).....	34

DAFTAR SINGKATAN

Singkatan	Istilah
CD4	: Cluster of Differentiation 4
CD8	: Cluster of Differentiation 8
CLRs	: C-type Lectin Receptors
DC-SIGN	: Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
DNA	: Deoxyribo Nucleic Acid
Gla	: Gamma Linolenic Acid
IFN- γ	: Interferon Gamma
IgG	: Immunoglobulin G
IgM	: Immunoglobulin M
IL-1 β	: Interleukin 1 Beta
MHC	: Major Histocompatibility Complex
MINCLE	: Macrophage-Inducible C-type Lectin
mRNA	: Messenger Ribonucleic Acid
NETs	: Neutrofil Extracellular Traps
NLRs	: NOD-Like Receptors
OPC	: Oligomeric Proanthcyanidins
PMN	: Polimorfonuclear
POL	: Palmito Oleo Linolein
SOL	: Solubilization LDL-C assay
Th 1	: T Helper Cells
TLRs	: Toll Like Receptors
TNF- α	: Tumor Necrosis Factor Alpha

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran A. Foto alat dan bahan penelitian	47
Lampiran B. Prosedur isolasi neutrofil	51
Lampiran C. Prosedur uji adhesi	55
Lampiran D. Hasil pengamatan	58
Lampiran E. Hasil penghitungan adhesi	60
Lampiran F. Analisis data penelitian	62
Lampiran G. Surat keterangan <i>Ethical Clearance</i>	64
Lampiran H. Surat keterangan identifikasi daun mimba	65
Lampiran I. Surat keterangan identifikasi jamur	66
Lampiran J. <i>Informed Consent</i>	67

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Dewasa ini dalam mengatasi berbagai macam penyakit, dapat lebih ditujukan pada respon imun tubuh penderitanya. Cara ini dapat dilakukan dengan memberikan bahan imunomodulator, yang dapat diperoleh dengan memberikan bahan imunogenik dari tanaman obat. Efek samping obat-obatan kimia yang sering kali menimbulkan masalah baru yang tak kalah berat, menjadi salah satu yang mendorong berkembangnya pengobatan tradisional (Thomas, 2012). Salah satu tanaman obat yang sudah dikenal masyarakat luas adalah tanaman mimba. Nama lain mimba adalah *Azadirachta indica*. Mimba telah digunakan secara luas oleh masyarakat untuk mengobati berbagai jenis penyakit bahkan sebelum ada catatan tertulis yang mencatat awal sejarah (Kumar, 2013).

Daerah asal mimba belum jelas diketahui, beberapa ahli memperkirakan mimba berasal dari Birma dan Assam. Ahli yang lain menyatakan bahwa mimba merupakan tanaman asli India. Mimba tersebar di berbagai negara tropis seperti Vietnam, Bangladesh, Pakistan, Srilanka, Myanmar, dan Indonesia, selain itu juga ditemukan di Amerika, Australia, Afrika, dan Arab Saudi. Populasi tanaman mimba terbanyak di India yaitu mencapai 14-16 juta pohon. Di Indonesia mimba banyak tumbuh di Lombok, Jawa Barat, Jawa Timur, Jawa Tengah, Nusa Tenggara Barat, dan paling banyak di Bali, oleh sebab itu mimba memiliki banyak nama daerah, antara lain: nimba (Pasundan), intaran (Bali dan Nusa Tenggara), membha/mempheuh (Madura) dan sebagainya (Ambarwati, 2011).

Kusum *et al.*, (2013) menyatakan bahwa mimba (*Azadirachta Indica*) telah dikenal dan dimanfaatkan masyarakat untuk mengatasi berbagai macam penyakit, seperti: cacangan, kudis, malaria, infeksi jamur, mengatasi tumor, dan alergi. Beberapa penelitian membuktikan mimba memodulasi imunitas alami dan adaptif (Tewari, 2018; Sulistina, 2016; Gupta, 2016). Fenomena ini menunjukkan bahwa mimba mengandung komponen imunomodulator yang dapat memodulasi respon imun, terutama terhadap infeksi.

Infeksi rongga mulut yang paling umum dijumpai adalah kandidiasis mulut (80%) dengan penyebab utama *C. albicans*. Insidensi infeksi jamur mengalami peningkatan selama lebih dari 10 tahun terakhir (Tortora *et al.*, 2010). *C. albicans* merupakan mikroorganisme oportunistik, yang merupakan flora normal di rongga mulut, namun jika terjadi perubahan pada sistem pertahanan rongga mulut maka akan menjadi patogen, sehingga dikatakan bahwa faktor predisposisi utama yang menyebabkan perubahan *C. albicans* yang bersifat komensal menjadi patogen adalah rendahnya daya tahan tubuh sehingga menyebabkan kandidiasis (Jawetz *et al.*, 2016). Pengobatan untuk kandidiasis mulut biasanya dengan memberikan anti jamur, namun kandidiasis akan mudah kambuh kembali. Dibutuhkan obat yang mempunyai efek anti jamur sekaligus imunomodulasi, sedangkan imunitas yang penting peranannya dalam merespon *C. albicans* adalah proses fagositosis.

Ekstrak cair daun mimba terbukti mempunyai efek anti mikroba terhadap *C. albicans* secara *in vitro* (Prashar, 2012). Rebusan daun mimba dapat menghambat pertumbuhan *C. albicans* secara *in vitro* (Dewanti, 2011). Tewari, (2018) membuktikan mimba menyebabkan peningkatan TNF- α , sehingga diduga dapat meningkatkan aktivitas fagositosis, namun sampai saat ini mekanisme peningkatan aktivitas fagositosis rebusan daun mimba terhadap *C. albicans* belum jelas.

Urban *et al.*, (2009) menyebutkan imunitas alami (fagositosis) terutama neutrofil berperan penting dalam melawan *C. albicans*. *C. albicans* juga mengeluarkan mikotoksin, diantaranya gliotoksin yang mampu menghambat aktivitas fagositosis dan menekan sistem imun lokal (Jawetz *et al.*, 2016). Fagositosis merupakan proses penghancuran benda asing oleh sel fagosit, seperti neutrofil dan makrofag. Proses ini diawali dengan perlekatan (adhesi) mikroba melalui reseptor fagositik, selanjutnya mikroorganisme masuk ke dalam sel fagosit dan terbentuk vesikel yang mengandung mikroba atau disebut fagosom yang akan bergabung dengan lisosom dan membentuk fagolisosom. Fagosit memiliki protein antibakterial yang disimpan di dalam granula lisosom yang toksik terhadap sel fagosit itu sendiri dan jaringan sekitarnya. Fusi antara fagosom

dan granul lisosom menyebabkan dilepaskannya protein antibakterial (Abbas *et al.*, 2015).

Berdasarkan penjelasan di atas dapat dikatakan bahwa adhesi merupakan hal yang penting untuk terjadinya fagositosis. Adhesi adalah perlekatan antara dua zat yang memiliki perbedaan jenis dan struktur (Amanda, 2010). Adhesi melibatkan interaksi antara *ligand* dan reseptor pada sel inang. Sel neutrofil merupakan sel fagosit paling potensial terhadap *C. albicans* disaat makrofag tidak mampu memfagosit *C. albicans* (Uguccioni *et al.*, 2017; Moyes and Naglik, 2011).

Neutrofil merupakan sel yang sangat penting khususnya untuk mengeliminasi *C. albicans* dalam sistem kekebalan tubuh. Neutrofil efektif melawan bakteri dan jamur dan merupakan sel leukosit yang paling utama dikaitkan dengan fagositosis dan respon inflamasi lokal (Turgeon, 2014). Neutrofil juga akan memberikan sinyal bagi sel imun lainnya mengenai keberadaan benda asing (Uguccioni *et al.*, 2017). Reseptor pada neutrofil yang berperan dalam adhesi *C. albicans* yaitu *Dectin-1*, *Toll-like receptors (TLR) 2*, dan *TLR4* yang bisa mengenali khamir jamur. *Dectin-1* menginduksi terjadinya fagositosis dan aktivasi dari *TLR2* menginduksi produksi sitokin (Bergter, 2016).

Berdasarkan latar belakang di atas, penulis ingin melakukan penelitian tentang potensi rebusan daun mimba pada adhesi sel neutrofil terhadap *C. albicans* dengan menggunakan konsentrasi rebusan 3,125%, 6,25%, 12,5%, dan 25%. Konsentrasi ini berdasarkan penelitian bahwa konsentrasi di atas 50% bersifat toksik sehingga menyebabkan banyak sel yang mati (Ermawati, 2014).

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana potensi rebusan daun mimba (*Azadirachta indica*) pada adhesi sel neutrofil terhadap *C. albicans*?
2. Berapa konsentrasi rebusan daun mimba (*Azadirachta indica*) yang efektif mempengaruhi daya adhesi sel neutrofil *C. albicans*.

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui potensi rebusan daun mimba (*Azadirachta indica*) pada adhesi sel neutrofil terhadap *C. albicans*.
2. Mengetahui konsentrasi rebusan daun mimba (*Azadirachta indica*) yang efektif mempengaruhi daya adhesi sel neutrofil *C. albicans*.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi mengenai manfaat tanaman obat tradisional khususnya mimba pada aktivitas sel neutrofil terhadap *C. albicans*.
2. Memberikan informasi mengenai konsentrasi daun mimba yang paling kuat dalam mempengaruhi adhesi neutrofil terhadap *C. albicans*.
3. Sebagai dasar penelitian lebih lanjut tentang potensi imunomodulasi rebusan daun mimba, sehingga nantinya dapat digunakan sebagai dasar pembuatan obat yang dapat mengatasi kandidiasis mulut.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mimba

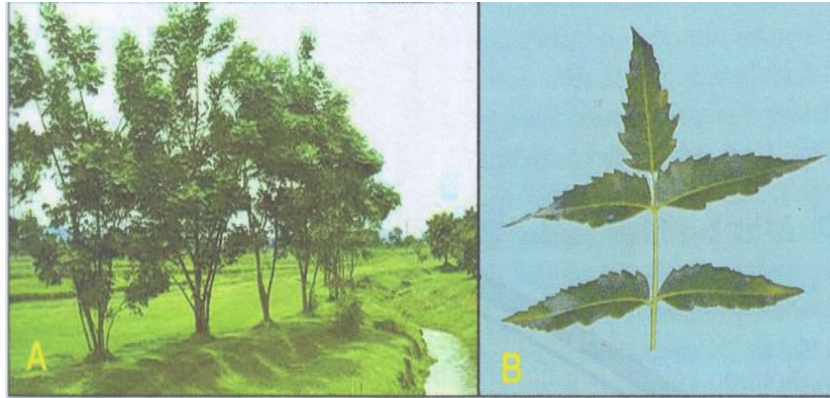
Mimba (*Azadirachta Indica Juss*) merupakan tanaman obat yang dapat dijumpai di seluruh tanah air. Tanaman ini berbentuk pohon dengan ketinggian hingga 20 meter dan dapat tumbuh di daerah tropik dan subtropik khususnya di tanah masam. Tanaman mimba telah dimanfaatkan sebagai obat berbagai macam penyakit, antara lain sebagai obat cacing, obat kudis, anti alergi, obat malaria, pembangkit selera makan, obat lambung, anti jamur, dan anti kanker (Sithisarn, 2017).

Mimba (*Azadirachta indica*) merupakan tanaman dengan batang tegak dan didukung oleh akar tunggang. Permukaan batangnya kasar, berkayu, dan memiliki kulit kayu yang tebal. Tinggi tanaman mimba bisa mencapai 30 meter dengan diameter batang mencapai 2-5 meter dan diameter kanopi mencapai 10 meter. Tanaman mimba tumbuh tahunan dan selalu hijau sepanjang tahun. Mimba tumbuh baik di daerah panas, di ketinggian 1-700 meter dari permukaan laut dan tahan tekanan air (Kardinan, 2011).

2.1.1 Taksonomi Mimba (*Azadirachta Indica Juss*)

Berdasarkan ilmu taksonomi tumbuhan mimba dikelompokkan sebagai berikut (Ambarwati, 2011) :

Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Subdivisi	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Dicotyledonae</i>
Bangsa	: <i>Rutales</i>
Suku	: <i>Meliaceae</i>
Marga	: <i>Azadirachta</i>
Jenis	: <i>Azadirachta Indica Juss</i>



Gambar 2.1 Pohon (A) dan daun mimba (B) (Ambarwati, 2011)

2.1.2 Daun Mimba (*Azadirachta Indica Juss*)

Daun mimba merupakan daun majemuk, letak berhadapan, berbentuk lonjong, tepi bergerigi, ujung lancip, pangkal meruncing, pertulangan menyirip, panjang 5-7 cm, lebar 3-4 cm, tangkai daun panjangnya 8-20 cm, jumlah anak daun 7-17 helai, dan berwarna hijau. Pohon dengan tinggi 7,5 meter memberikan sekitar 360 kg daun. Daun tua gugur pada bulan Februari dan Maret. Daun mimba tersusun spiralis, mengumpul di ujung rantai, merupakan daun majemuk menyirip genap. Anak daun berjumlah genap di ujung tangkai dengan jumlah helaian 8-16 tepi daun bergerigi, bergigi, beringgit, dan helaian daun tipis seperti kulit. Bangun anak daun memanjang sampai setengah lancet, pangkal anak daun runcing, ujung anak daun runcing dan setengah meruncing, gandel atau sedikit berambut, dan panjang anak daun 3-10,5 cm (Puri, 2008).

2.1.3 Kandungan Daun Mimba

Mimba mengandung berbagai komponen yang dapat bermanfaat bagi kesehatan. Biji mimba dengan berat rata-rata 0,28 gr dengan 50,89% dari inti dan 49,11% dari kulit biji, mengandung $29,27 \pm 0,06\%$ lipid, $12,10 \pm 0,32\%$ protein dan $43,98 \pm 2,67\%$ konstituen parietal (selulosa, hemiselulosam dan lignin) dengan $30,33 \pm 1,12\%$ selulosa yang mengandung 68,96% serat. Studi tentang konstituen (s) distribusi menunjukkan bahwa 96,82% lipid dan 92,20% dari protein dilokalisasi di biji, sedangkan 92,22% dari konstituen parietal dilokalisasi di kulit biji. *Azadirachtin* yang terlokalisir di biji (99,35%). Biji mimba juga mengandung $14,99 \pm 0,37\%$ dari *hydrosoluble*, $0,11 \pm 0,05\%$ polifenol dan 0,76% minyak esensial. Komposisi protein mengungkapkan 17 asam amino dengan

senyawa dominan menjadi asam glutamat (23,65%). Asam lemak minyak adalah asam oleat ($41,91 \pm 0,69\%$), asam linoleat ($19,59 \pm 0,44\%$), asam stearat ($18,71 \pm 0,46\%$), dan asam palmitat ($15,59 \pm 0,27\%$). Minyak, terutama terdiri dari asam lemak tak jenuh (63% dalam komposisi asam lemak), minyak ini yang utama terdiri dari trigliserida (97,69%). Ini adalah sebagian besar terdiri dari SOL (52,93%) dan POL (36,61%). Sterol yang hadir di 2.04 g.kg^{-1} dalam minyak terutama terdiridari β -sitosterol, yang mewakili 61,08% dari total sterol. Kandungan tokoferol total $33,87 \text{ mg. } 100\text{g}^{-1}$ dan γ -tokoferol adalah senyawa utama dengan 68,69% dari total tokoferol (Djibril *et al.*, 2015). Sedangkan daun mimba mempunyai kandungan serat ($20,11 \pm 0,45\%$) memiliki komposisi protein ($13,42 \pm 0,12\%$) (Atangwho, 2009). Sedangkan Subathra dan Jeevitha (2012) menyebutkan komposisi daun segar mimba adalah protein 7,1%, lemak 1%, fiber 6,2%, karbohidrat 22,9%, mineral 3,4%, dan pelembab 59,4%.

Tabel 2.1 Jumlah protein, fiber, lemak dari daun mimba (*A. indica*), *V. amygdalina*, *G. latifolium*

Medicinal plant	Crude protein (%)**	Crude fibre (%)**	Fat (%)**
<i>A. indica</i>	$13,42 \pm 0,12$	$20,11 \pm 0,45$	$5,17 \pm 0,09$
<i>V. amygdalina</i>	$23,25 \pm 0,12$	$16,05 \pm 0,19$	$3,53 \pm 0,09$
<i>G. latifolium</i>	$25,55 \pm 0,35$	$13,69 \pm 0,25$	$6,13 \pm 0,03$

Sumber : Atangwho *et al.*, 2009

Tabel 2.2 Kadar vitamin daun mimba (*A. indica*), *V. amygdalina*, *G. latifolium*

Medicinal plant	Vit. A, (IU/100g)**	Vit. E, (IU/100g)**	Vit. C, (IU/100g)**	Riboflav in (%)	Thiamine (%)	Niacin (%)**
<i>A. indica</i>	$330,20 \pm 0,05$	$33,60 \pm 0,39$	$396,00 \pm 2,54$	$0,95 \pm 0,03$	$0,18 \pm 0,00$	$0,58 \pm 0,00$
<i>V. amygdalina</i>	$348,57 \pm 0,39$	$37,37 \pm 0,39$	$202,40 \pm 5,08$	$1,00 \pm 0,00$	$0,18 \pm 0,00$	$0,48 \pm 0,00$
<i>G. latifolium</i>	$393,00 \pm 0,38$	$44,03 \pm 0,13$	$299,20 \pm 0,51$	$0,96 \pm 0,00$	$0,18 \pm 0,00$	$0,81 \pm 0,00$

Sumber : Atangwho *et al.*, 2009

Tabel 2.3 Kadar mineral dari daun mimba (*A. indica*), *V. amygdalina*, *G. latifolium*

	Medicinalplant		
	<i>A. indica</i>	<i>V. amygdalina</i>	<i>G. latifolium</i>
Mn(mg/100 g)	0,06 ± 0,03	0,07 ± 0,03	0,04 ± 0,00*
Se(mg/100 g)	0,02 ± 0,03	0,01 ± 0,00	Trace
Zn(mg/100 g)	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,04
Fe(mg/100 g)	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,28 ± 0,07
Cu(mg/100 g)	0,06 ± 0,01*	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00
Mg (%)**	0,69 ± 0,01	0,43 ± 0,00	1,06 ± 0,01
Cr(mg/100 g)	0,58 ± 0,00*	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01

Sumber : Atangwho *et al.*, 2009

Tabel 2.4 Komposisi Fitokimia Daun Mimba (*A. indica*), *V. amygdalina*, *G. latifolium*

	Medicinalplant		
	<i>A. indica</i>	<i>V. amygdalina</i>	<i>G. latifolium</i>
Flavoids(%)**	0,39 ± 0,02	0,87 ± 0,02	0,54 ± 0,02
Tannins(%)**	0,63 ± 0,01	0,37 ± 0,03	2,04 ± 0,02*
Saponins(%)	0,56 ± 0,01	2,15 ± 0,01*	0,66 ± 0,03
Polyphenol(%)**	0,35 ± 0,00	0,42 ± 0,00	0,33 ± 0,00
Alkaloids(%)**	2,84 ± 0,03	2,13 ± 0,04	1,97 ± 0,04
HCN (%)**	19,89 ± 0,02	13,87 ± 0,04	13,20 ± 0,02

Sumber : Atangwho *et al.*, 2009

Keterangan :

Hasil dinyatakan sebagai mean tiga penentuan ± SEM. * p <0,05 dibandingkan dengan yang lain 2 kelompok. ** Setiap dua dari 3 kelompok dibandingkan berbeda secara signifikan pada p <0,05.

Daun mimba mengandung senyawa aktif antara lain *azadirachtin*, *alanine*, *meliantrirole*, *nimbin*, *nimbolide*, *gedunine*, *mahmodine*, *gallic acid*, *catechin*, *epicatechin*, *margolone*, *margolonone*, *isomargolonone*, *cyclotrisulphide*, *cyclotetrasulphide*, dan polisakarida, meskipun kandungan tersebut untuk semua bagian tentunya tidak sama (Dewanti, 2008). Berikut ini uraian tentang komponen bioaktif tanaman mimba:

a. *Azadirachtin*

Senyawa ini paling banyak dijumpai pada biji mimba. Dalam satu gram biji mimba kira-kira terdapat 2 – 4 mg *azadirachtin*, namun ada juga yang sampai 9 mg. Selama proses pematangan kandungan *azadirachtin* dalam biji relatif tidak berubah. Kandungan ini disimpan selama 4 minggu tidak berubah jika tidak terjadi

pembusukan. Pembusukan dapat terjadi karena peran mikroorganisme seperti bakteri dan jamur. Kondisi lingkungan yang sesuai seperti terlalu lembab akan mempercepat proses pembusukan.

b. *Meliantriol*

Senyawa ini diketahui berfungsi sebagai insektisida, sedangkan fungsi lainnya belum diketahui.

c. *Salanin*

Senyawa yang juga termasuk kelompok triterpen ini diketahui sebagai insektisida.

d. *Nimbin*

Senyawa ini dilaporkan mempunyai daya kerja sebagai antivirus, sehingga mempunyai potensi untuk digunakan sebagai pengendali virus.

e. *Nimbolide*

Nimbolide paling banyak dijumpai pada minyak yang berasal dari biji mimba. Komponen ini dapat berfungsi sebagai antibakteri terutama *Streptococcus aereus* dan *Streptococcus coagulase*.

f. *Gedunin*

Gedunin dapat diisolasi dari tanaman mimba yang telah dilaporkan berfungsi sebagai antijamur dan antimalaria.

g. *Mahmodin*

Mahmodin dapat diisolasi dari tanaman mimba yang telah dibuktikan sebagai antibakteri dan beberapa strain bakteri patogen pada manusia.

h. *Galic acid, Epicatechin, Catechin*

Galic acid, epicatechin, catechin merupakan kelompok polifenol dan golongan *Oligomeric Proanthcyanidins* (OPC) yang dapat diisolasi dari tanaman mimba dan berfungsi sebagai antiinflamasi dan imunomodulasi. Fungsi komponen ini dapat mempengaruhi proses replikasi DNA, memberikan respon terhadap PMN neutrofil, memodulasi *oxidative burst* dalam mitokondria, meningkatkan transkripsi mRNA pada nukleus yang dihubungkan dengan protein pada mitokondria, meningkatkan migrasi makrofag dan *phagocytosis uptake*. Komponen ini dapat diabsorpsi dengan cepat dalam mukosa membran usus dan

dengan cepat diedarkan dalam darah, mempunyai *half life* dalam plasma 5 jam dan dengan cepat pula diabsorpsi dalam jaringan. Peningkatan darah kapiler dapat terjadi sekitar 6 jam, kemudian mengalami penurunan. Komponen ini berperan selama proses inflamasi, juga pada kerusakan jaringan akibat inflamasi tersebut.

i. *Margolone, Margolonone, Isomargolone*

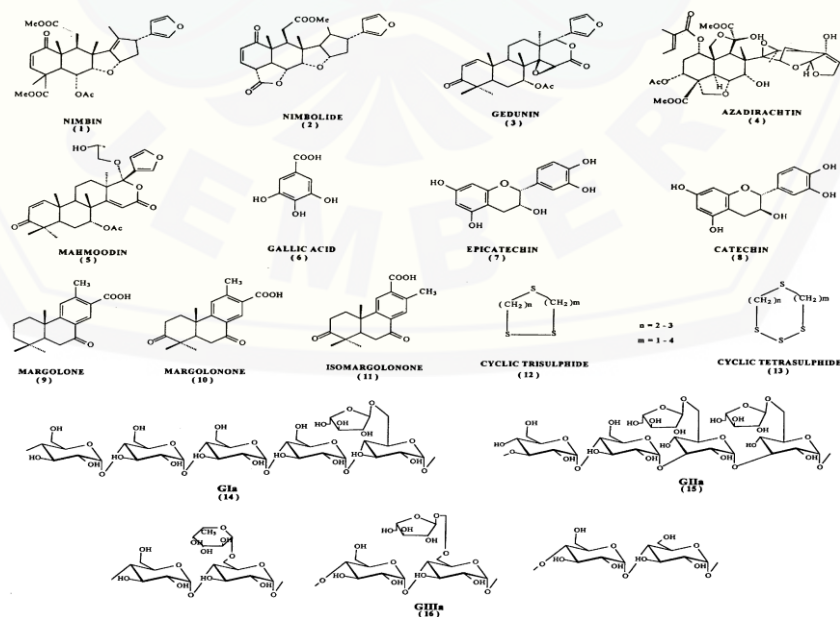
Margolone, margolonone, isomargolone diisolasi dari tanaman mimba, dimana terbanyak dijumpai pada kulit batang yang mempunyai aktivitas sebagai antibakteri terhadap spesies *klebsiella*, *Staphylococcus*, dan *serratia*.

j. *Cyclic trisulphide dan Cyclic tetrasulphide*

Cyclic trisulphide dan cyclic tetrasulphide diisolasi dari distilasi daun mimba yang segar, matang, dan dapat berperan sebagai antijamur.

k. Polisakarida

Beberapa polisakarida seperti polisakarida Gla, Glb dapat diekstrak dari kulit batang mimba dan berfungsi sebagai antiinflamasi, antitumor yang kuat. Hal ini dibuktikan pada mencit yang diberi konsumsi mimba 50mg/kg selama 4 hari dan pada 24 jam setelah diinokulasi subkutan dengan sel sarcoma-180, dua polisakarida Gla dan Glb juga menunjukkan efek antiinflamasi. Dua polimer yang diisolasi dari kulit batang berfungsi sebagai antikomplemen. Disamping itu isolasi dari biji mimba dapat berfungsi sebagai antiulser lambung.



Gambar 2.2 Komponen bioaktif tanaman mimba (Dewanti, 2008)

2.1.4 Manfaat Kandungan Senyawa Mimba

Tabel 2.5 Manfaat Kandungan Senyawa Mimba

Komponen	Sumber	Aktivitas Biologis
Nimbidin	Daun, kulit batang, biji	Antiinflamasi, Antiartritik, Antipiretik, Hipoglikemik, Antigastrik ulser, Spermisidal, Antijamur, Antibakteri, Diuretik
Sodium nimbidate	Kulit batang, biji	Antiinflamasi
Nimbin	Minyak biji	Spermisidal
Nimboldid	Minyak biji	Antibakteri, Antimalaria
Gedunin	Minyak biji	Antijamur, Antimalaria
Azadirachtin	Biji	Antimalaria
Mahmodin	Minyak biji	Antibakteri
<i>Galic acid, Epicatechin, Catechin</i>	Kulit batang, daun	Antiinflamasi dan Imunomodulator
Margolon, margolonone, isomargolon	Kulit batang	Antibakteri
<i>Cyclic trishulphide dan cyclic tetrasulphide</i>	Kulit batang, daun	Antijamur
Polisakarida	Kulit batang	Antiinflamasi
Polisakarida Gla, Glb	Kulit batang	Antitumor
Polisakarida Glla, Gllla	Kulit batang	Antiinflamasi
NB-II Pepidoglikan	Kulit batang	Imunomodulator

(Dewanti, 2008)

Komponen biologis aktif yang diisolasi dari bagian yang berbeda dari tanaman meliputi: *azadirachtin*, *meliacin*, *gedunin*, *salanin*, *nimbin*, *valassin*, dan banyak turunan lainnya. *Meliacin* memberikan rasa pahit pada minyak biji mimba. Biji juga mengandung Asam *tignic* (*asam 5-metil-2-butanic*) yang bertanggung jawab atas bau khas minyak. Senyawa ini milik produk alami yang disebut *triterpenoid* (limonoid). Ciri khas komponen aktif ini sedikit hidrofilik, tapi lipofilik bebas dan sangat larut dalam organik pelarut seperti hidrofilik, alkohol, keton, dan esters. *Nimbidin*, komponen mayor yang memberikan rasa pahit pada minyak biji mimba. Di samping itu kandungan *tetranortriterpenes*, *nimbin*, *nimbinin*, *nimbidinin*, *nimbolide*, dan *nimbidic acid* telah diisolasi. *Nimbidin* dan *sodium nimbidate* terbukti secara signifikan sebagai antiinflamasi tergantung dosis terhadap *carrageenin* yang diinduksikan pada kaki tikus dan menyebabkan oedema dan diinduksi *formalinarthritis* (Pankaj *et al.*, 2011).

2.1.5 Efek Imunomodulator Mimba

Mimba diketahui dapat memodulasi PMN, makrofag, limfosit dalam mempengaruhi aktivitas fagositosis, TNF- α , IFN- γ , aktivitas makrofag, dan produksi immunoglobulin. Dari hal tersebut dapat dimengerti bahwa mimba memodulasi imunitas alami, seluler, dan humoral (Tewari, 2018; Sulistina, 2016; Gupta, 2016). Beberapa penelitian yang membuktikan efek imunomodulator mimba antara lain oleh (Tewari, 2018) yang menyebutkan bahwa mimba dapat memodulasi respon imun seluler dan humoral meliputi peningkatan level IgG, IgM. Shakti *et al.*, (2013) telah membuktikan tentang potensi imunomodulator ekstrak daun mimba terhadap CD4, CD8, Th 1, TNF- α , IFN- γ , dan aktivitas sel makrofag pada tikus dan kera. Potensi daun mimba sebagai imunostimulator dibuktikan beberapa peneliti meliputi respons imun humoral dan seluler, antara lain: fagositosis, ekspresi MHC (*Major Histocompatibility Complex*) klas I dan II, produksi IFN- γ , CD4, CD8, Th 1, TNF- α , IL-1 β (Tewari, 2018; Sulistina, 2016; Gupta, 2016).

2.2 *C. albicans*

2.2.1 Pengertian *C. albicans*

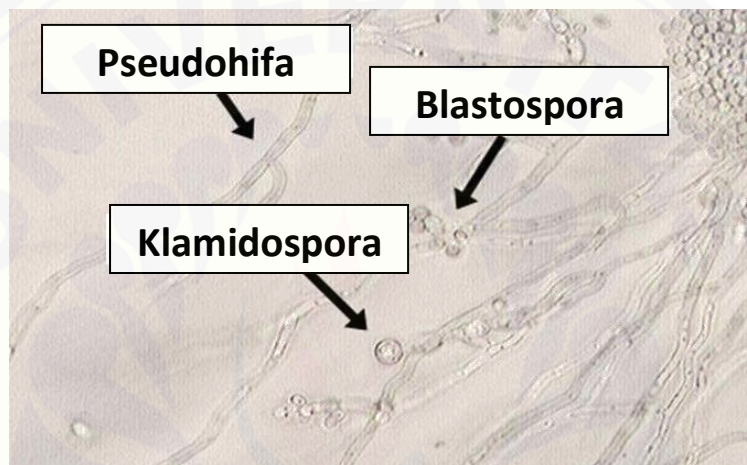
C. albicans adalah suatu ragi lonjong, bertunas yang menghasilkan *pseudomiselium* dalam biakan maupun dalam jaringan dan eksudat. Ragi ini adalah anggota normal selaput mukosa saluran pernafasan dan genitalia wanita. Di tempat-tempat ini, ragi dapat menjadi dominan dan patologik. *C. albicans* lebih sering menimbulkan penyakit dibandingkan spesies *Candida* yang lain dalam menyebabkan penyakit meliputi *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, dan *Torulopsis glabrata* (Jawetz *et al.*, 2016).

C. albicans dikenal sebagai fungi dimorfik yang secara normal ada pada saluran pencernaan, saluran pernafasan bagian atas dan mukosa genital pada mamalia (Willems *et al.*, 2017), akan tetapi populasi yang meningkat dapat menimbulkan masalah. Beberapa spesies *Candida* yang dikenal banyak menimbulkan penyakit baik pada manusia maupun hewan adalah *C. albicans* (Nett *et al.*, 2010).

2.2.2 Klasifikasi *C. albicans*

Taksonomi *C. albicans* dalam nomenklatur (Vincent, 2012) adalah sebagai berikut:

Spesies : *Candida albicans*
Genus : *Candida*
Family : *Cryptococcaceae*
Ordo : *Cryptococcales*
Kelas : *Blastomycetes*



Gambar 2.3 *C. albicans*

(Sumber: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Candida_albicans_tr.jpg)

2.2.3 Habitat dan Morfologi *C. albicans*

C. albicans dapat tumbuh pada suhu 37°C dalam kondisi aerob atau anaerob. Pada kondisi anaerob, *C. albicans* mempunyai waktu generasi yang lebih panjang yaitu 248 menit dibandingkan dengan kondisi pertumbuhan aerob yang hanya 98 menit. Walaupun *C. albicans* tumbuh baik pada media padat tetapi kecepatan pertumbuhan lebih tinggi pada media cair dengan digoyang pada suhu 37°C. Pertumbuhan juga lebih cepat pada kondisi asam dibandingkan dengan pH normal atau alkali (Fox *et al.*, 2014).

Pada media *sabouraud dextrose agar* atau *glucose yeast extract peptone water*, *C. albicans* berbentuk bulat atau oval yang biasa disebut dengan bentuk khamir dengan ukuran (3,5-6) x (6-10) µm. Koloni berwarna krem pada media agar. *C. albicans* mempunyai dua morfologi. Pada keadaan normal, *C. albicans* berada dalam bentuk ragi, yang merupakan sel tunggal. Dalam bentuk ini, *C.*

albicans bereproduksi dengan membentuk *blastospora*, yaitu *spora* yang dibentuk dengan pembentukan tunas. Pada kondisi tertentu, termasuk pada saat menginfeksi, organisme ini dapat mengalami perubahan morfologi menjadi lebih bersifat invasif, yaitu bentuk *hifa* atau *miselial* atau *filamentous*. Dalam bentuk *miselial*, *C. albicans* membentuk *hifa* dan *pseudohifa*. Transisi morfologi ini merupakan bentuk adaptasi *C. albicans* terhadap lingkungan sekitarnya (Mutiawati, 2016).

2.2.4 Adhesi *C. albicans*

a. Adhesi *C. albicans* dengan Sel Inang

Kata adhesi berasal dari bahasa latin *adhaere* yang berarti melekat. Secara terminologi adhesi berarti gaya tarik menarik atau daya mengumpul antara molekul-molekul dari zat-zat yang tidak sejenis. Gaya ini menyebabkan antara zat yang satu dengan yang lain dapat menempel dengan baik karena molekulnya saling tarik menarik atau merekat, atau juga bisa dikatakan bahwa adhesi adalah perlekatan antara dua zat yang memiliki perbedaan jenis dan struktur (Amanda, 2010).

Dinding sel adalah mediator utama interaksi antara sel jamur dan substrat hospes. Interaksi ini mengakibatkan terjadinya proses adhesi ke jaringan hospes dan diperkirakan sebagai salah satu faktor virulensi penting dalam perkembangannya menjadi organisme patogen. Dinding sel *C. albicans* terdiri dari enam lapisan dari luar ke dalam adalah *fibrillar layer*, *mannoprotein*, β -*glucan*, β -*glucan-chitin*, *mannoprotein*, dan membran plasma. Perlekatan lapisan dinding sel dengan sel inang terjadi karena mekanisme kombinasi spesifik (interaksi antara *ligand* dan reseptor) dan nonspesifik (kutub elektrostatik dan ikatan *van der Waals*) yang kemudian menyebabkan serangan *C. albicans* ke berbagai jenis permukaan jaringan (Biasoli *et al.*, 2010). Faktor lain yang mempengaruhi interaksi *C. albicans* dengan sel inang adalah hidrofobisitas pada awal perlekatan. Diduga protein pada dinding sel terlibat dalam perubahan hidrofobisitas permukaan sel dengan melepaskan *glukanase digestion* dalam jumlah tertentu (Curvelo *et al.*, 2014).

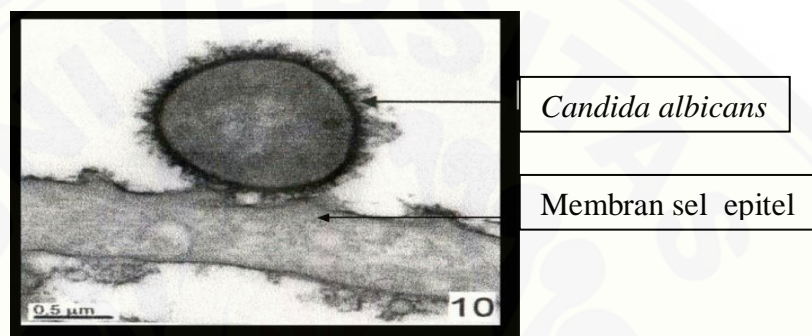
Interaksi sel *C. albicans* dengan sel inang juga melibatkan fisikomekanik, fisikokimia dan enzimatis materi mikroba serta interaksi mikro yang mengarah pada kolonisasi dan infeksi seperti perubahan medan magnet pada permukaan sel yang berinteraksi yang menyebabkan sel-sel saling melekat (Zhu and Filler, 2010; Bandyopadhyay, 2013). Menurut Kusumaningtyas (2014) ada tiga macam interaksi yang mungkin terjadi antara sel *Candida* dan sel epitel inang yaitu interaksi protein-protein (i) interaksi *lectin-like* (ii) dan interaksi yang belum diketahui (iii). Interaksi protein-protein terjadi ketika protein pada permukaan *C. albicans* mengenali *ligand* protein atau peptida pada sel epitelium atau endothelium. Interaksi *lectin-like* adalah interaksi ketika protein pada permukaan *C. albicans* mengenali karbohidrat pada sel epitelium atau endothelium. Interaksi yang ketiga adalah ketika komponen *C. albicans* menyerang *ligand* permukaan epitelium atau endothelium tetapi komponen dan mekanismenya belum diketahui dengan pasti.

b. Proses Adhesi dan Invasi *C. albicans*

Kemampuan *C. albicans* untuk tumbuh baik pada suhu 37°C memungkinkannya untuk tumbuh pada sel hewan dan manusia. Faktor yang berpengaruh pada patogenitas dan proses infeksi adalah adhesi, perubahan dari bentuk khamir ke bentuk filamen dan produksi enzim ekstraselular (Moyes and Naglik *et al.*, 2011). Adhesi atau kemampuan melekat pada sel inang merupakan tahap penting dalam kolonisasi dan penyerangan (invasi) ke sel inang. Adhesi melibatkan interaksi antara *ligand* dan reseptor pada sel inang dan proses melekatnya miseliumnya sel *C. albicans* ke sel inang. Bagian pertama dari *C. albicans* yang berinteraksi dengan sel inang adalah dinding sel (Biasoli *et al.*, 2010).

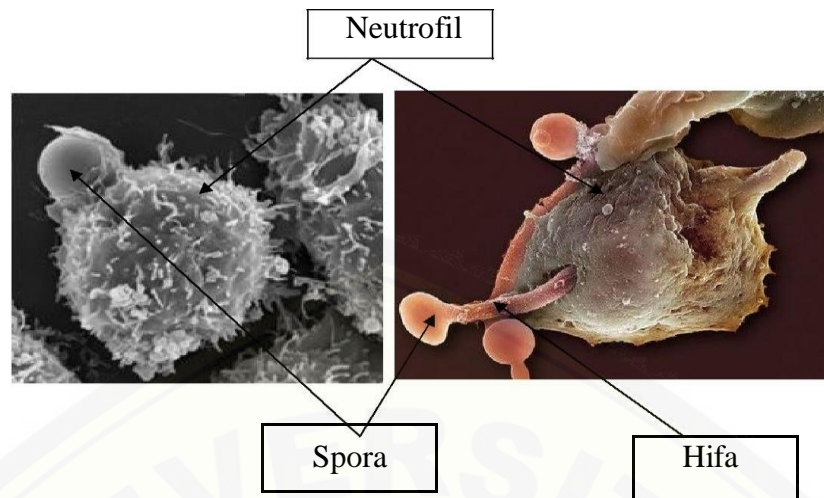
Dinding sel *C. albicans* terdiri dari beberapa lapisan. Komponen utamanya yaitu *glucans*, kitin, dan manoprotein yaitu manan yang berikatan dengan protein. Protein pada permukaan dinding sel *C. albicans* juga berperan penting dalam interaksi sel dengan lingkungan, termasuk proses adhesi. Proses adhesi berhubungan dengan hidrofobisitas suatu permukaan. Penempelan *C. albicans* pada sel epitel mukosa diperantarai oleh interaksi antara glikoprotein

pada permukaan dinding sel *C. albicans* Struktur yang berperan dalam penempelan sel *C. albicans* yaitu adhesin, fimbria, kitin dan molekul yang menyerupai integrin. Bentuk miselium (ragi) lebih bersifat adhesif dan mensekresi enzim hidrolitik dalam jumlah yang lebih banyak. Lapisan luar dinding sel dapat membentuk fimbria, yang terutama tersusun atas glikoprotein. Fimbria terdapat pada bentuk ragi dan hifa atau miselium. Fimbria dapat menjadi perantara dalam adhesi *C. albicans* pada reseptor glikosfingolipid di permukaan sel manusia (Mutiawati, 2016).



Gambar 2.4 Adhesi *C. albicans* pada membran sel epitel yang diperantari fimbria (Vitkov *et al.*, 2002)

Adhesi *C. albicans* pada sel epitel menyebabkan aktivasi respons sitokin oleh sel host. Sitokin akan mengaktivasi dan mengumpulkan sel-sel limfoid dan myeloid pada lapisan mukosa. Sekresi sitokin dalam merespons invasi *C. albicans* akan menghasilkan diferensiasi dan aktivasi berbagai sel kekebalan tubuh, salah satunya adalah sel neutrofil. Peran neutrofil sebagai anti jamur dalam imunitas mukosa tampaknya menjadi dua kali lipat. Neutrofil dapat melakukan perlindungan terhadap infeksi *C. albicans* melalui upregulasi TLR4 (Richardson *et al.*, 2018). Neutrofil juga dapat langsung membunuh sel *Candida* melalui penelanan dan pembunuhan, degranulasi atau melalui *Neutrofil extracellular Traps* (NETs). NETs dapat digambarkan sebagai bentuk khusus dari sel neutrofil yang mati dan terdiri dari kumpulan kromatin atau *fiber* yang dilapisi dengan *protease serine*, protein-protein antimikrobal dan kandungan-kandungan neutrofil lainnya yang dapat menangkap dan membunuh *C. albicans* pada berbagai permukaan (Urban *et al.*, 2009).

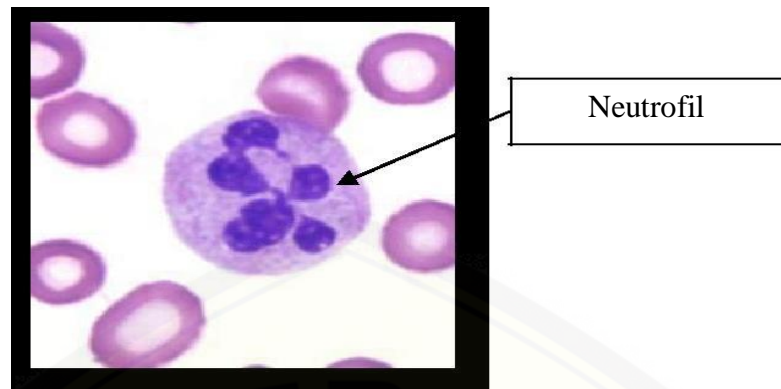


Gambar 2.5 Adhesi (gambar kiri) dan Fagositosis (gambar kanan) neutrofil terhadap *C. albicans* (Sumber: <http://sciencephotolibrary.tumblr.com/page/38>)

2.3 Neutrofil

2.3.1 Morfologi Neutrofil

Neutrofil termasuk dalam leukosit granular yang dalam keadaan segar berdiameter 7 sampai 9 μm dan dalam hapusan darah kering 10-12 μm . Dalam darah manusia neutrofil berjumlah paling banyak dan merupakan 65 sampai 75 persen dari jumlah seluruh leukosit. Inti umumnya terdiri dari 3 sampai 5 lobus berbentuk lonjong yang tak teratur, yang saling dihubungkan oleh benang-benang kromatin yang halus. Jumlah lobus bertambah sesuai dengan bertambahnya umur sel. Anak inti tidak dapat dilihat. Sitoplasma yang berlimpah diisi oleh granula yang halus. Granula terutama merupakan lisosom tipe khusus yang terutama mengandung enzim hidrolitik. Enzim dapat dilepaskan setelah neutrofil menelan benda seperti karbon, bakteri, dan mikroorganisme lain. Disamping granula neutrofil spesifik, sitoplasma mengandung granula azurofil. Granula neutrofil ini pada mikrograf elektron tampak relatif padat dan mengandung enzim lisosom dan enzim peroksida (Gartner *et al.*, 2014).



Gambar 2.6 Neutrofil dengan inti berjumlah 5 lobus yang dihubungkan benang kromatin (Sumber: <http://biologimediacentre.com>)

2.3.2 Fungsi Neutrofil

Neutrofil merupakan sel fagosit pertama yang berperan pada reaksi akut terhadap suatu inflamasi dan mampu memfagositosis 3 – 20 bakteri (Pratiwi, 2012). Sel ini dengan proses kemotaksis akan bermigrasi untuk berfungsi sebagai fagosit yang mengontrol kontaminasi lokal dan mencegah infeksi. Neutrofil sebagai bagian dari leukosit yang berbentuk polimorfonuklear, atau lazim juga disebut neutrofil polimorfonuklear, berperan penting dalam mekanisme pertahanan tubuh terhadap invasi bakteri (Playfair and Chain (2009); Baratawidjaja, 2014). Neutrofil polimorfonuklear sebagai sistem imun non spesifik, adalah pertahanan tubuh terdepan dalam menghadapi berbagai serangan mikroorganisme, oleh karena dapat memberikan respons langsung. Neutrofil disebut sistem imun non spesifik karena tidak ditujukan terhadap mikroorganisme tertentu (Baratawidjaja, 2014).

2.3.3 Adhesi neutrofil

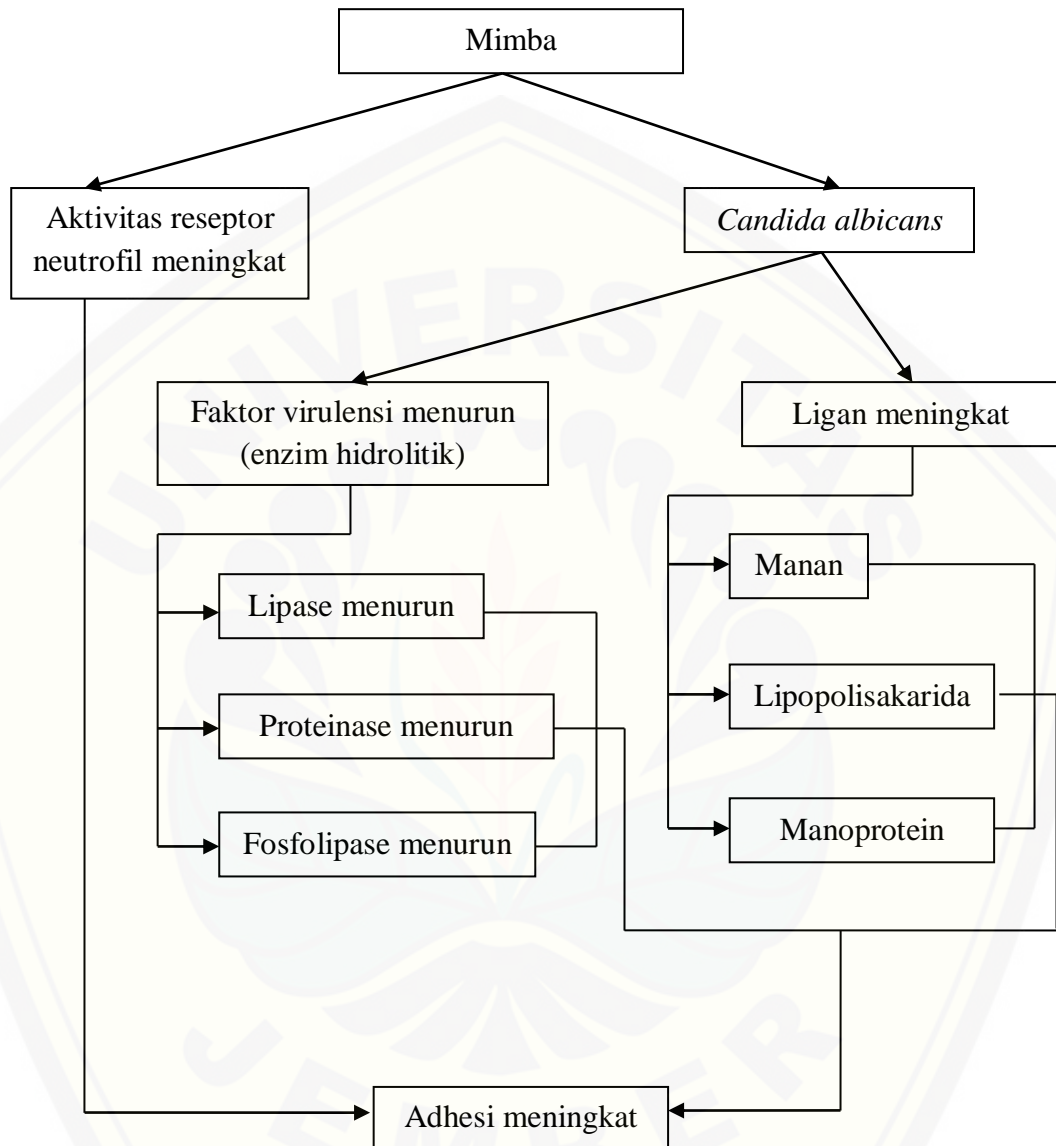
Pada kasus jamur seperti *C. albicans*, sel imun yang paling dominan dalam melawan infeksi mukosa adalah neutrofil. Reseptor utama pada neutrofil yang diketahui memiliki kemampuan dalam mendeteksi *C. albicans* adalah *TLRs* dan *C-type lectin receptors (CLRs)*. Tabel 2.6 menjelaskan mengenai macam-macam reseptor yang dapat mengenali jamur (Dennehy *et al.*, 2009; Bergter, 2016).

Tabel 2.6 Reseptor yang dapat mendeteksi jamur

Famili	Reseptor	PAMP
<i>TLRs</i>	<i>TLR2</i>	<i>Phospholipomannan</i>
	<i>TLR3</i>	<i>Double-stranded RNA</i>
		<i>Mannan</i>
	<i>TLR4</i>	<i>O-linked Mannan Residues</i>
<i>CLRs</i>	<i>TLR9</i>	<i>CpG DNA</i>
	<i>Dectin-1</i>	<i>β-1,3-glucan</i>
	<i>Dectin-2</i>	<i>High-mannose structures</i>
		<i>α-mannans</i>
	<i>Mannose receptor</i>	<i>Mannan</i>
	<i>MINCLE</i>	<i>Unknown</i>
	<i>Galectin-3</i>	<i>β-1,2-Mannosides</i>
	<i>High-mannose structures</i>	
<i>NLRs</i>	<i>NLRP3</i>	<i>Unknown</i>
<i>Others</i>	<i>Cdw17</i>	<i>Unknown</i>

Sumber : Moyes & Naglik (2011)

2.4 Kerangka Konseptual



Gambar 2.7 Bagan Kerangka Konseptual

2.4.1 Penjelasan Kerangka Konsep

Mimba diduga dapat mempengaruhi peningkatan aktivitas reseptor sel neutrofil yang menyebabkan sel neutrofil dapat lebih mudah mengenali *C. albicans*. Di sisi lain, mimba juga diduga dapat mempengaruhi *C. albicans* dengan 2 cara, yaitu; yang pertama menurunkan aktivitas enzim hidrolitik (lipase, proteinase, dan fosfolipase) dimana enzim-enzim tersebut menentukan virulensi *C. albicans*. Yang kedua, meningkatkan aktivitas ligan pada *C. albicans* seperti manoprotein, lipopolisakarida, dan manan. Semua aktivitas tersebut dapat menyebabkan terjadinya peningkatan adhesi *C. albicans* pada sel neutrofil.

2.5 Hipotesis

1. Rebusan daun mimba (*Azadirachta indica*) meningkatkan adhesi sel neutrofil terhadap *C. albicans*
2. Rebusan daun mimba (*Azadirachta indica*) dengan konsentrasi yang efektif mempengaruhi daya adhesi sel neutrofil *C. albicans*.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris *in vitro*, yaitu penelitian yang dilakukan dengan memberi perlakuan terhadap variabel yang diteliti serta dilakukan di laboratorium dengan rancangan *the post test only control group design*, yaitu dilakukan pengukuran terhadap variabel yang diteliti setelah diberikan perlakuan, kemudian dibandingkan dengan kelompok kontrol (Notoatmodjo, 2012).

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium *Bio Science* Rumah Sakit Gigi dan Mulut Universitas Jember dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

3.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April 2018 – selesai

3.3 Identifikasi Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah rebusan daun mimba.

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah adhesi neutrofil terhadap *C. albicans*.

3.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini sebagai berikut:

- a. Waktu inkubasi
- b. Suhu inkubasi
- c. Konsentrasi rebusan daun mimba
- d. Isolat neutrofil

3.4 Definisi Operasional

3.4.1 Rebusan daun mimba

Rebusan daun mimba adalah rebusan yang dibuat dengan merebus 2 g (kurang lebih 5 lembar) daun mimba ke dalam aquades sebanyak 200 ml selama 30 menit, sehingga didapatkan konsentrasi 100%, selanjutnya dilakukan pengenceran untuk mendapatkan konsentrasi 25%, 12,5%, 6,25%, dan 3,125%. Daun mimba dipilih secara acak dari pohon yang sama, lalu dibersihkan dengan air yang mengalir.

3.4.2 *Candida albicans*

Jamur dari genus *Candida*. Jamur yang digunakan pada penelitian ini didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang telah dilakukan identifikasi terlebih dahulu menggunakan uji *germ tube* di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Kemudian dibuat suspensi *C. albicans* dengan menggunakan standar 1 McFarland.

3.4.3 Neutrofil

Neutrofil diambil dari darah vena perifer/vena cubiti orang sehat atau tidak memiliki kelainan maupun riwayat penyakit sistemik, dengan kriteria laki-laki dewasa, dicurigai tidak memiliki penyakit sistemik, dan tidak merokok. Isolasi neutrofil dilakukan dengan teknik *gradientdensity* menggunakan *Histopaque-1077*.

3.4.4 Indeks Adhesi

Indeks adhesi adalah banyaknya sel yang dilekati bakteri dan dibuat rata-ratanya. Pada penelitian ini digunakan penghitungan indeks adhesi yaitu banyaknya sel neutrofil yang dilekati pada *C. albicans*, baik neutrofil pada kelompok kontrol maupun neutrofil pada kelompok yang diberi perlakuan, kemudian dibandingkan.

3.5 Sampel Penelitian

3.5.1 Kriteria Isolat Neutrofil

Neutrofil yang digunakan adalah neutrofil yang diisolasi dari neutrofil darah orang sehat (tidak memiliki penyakit sistemik) dan telah mengisi *informed consent*. Isolat neutrofil yang digunakan diambil dari darah subyek, yaitu orang sehat dengan kriteria laki-laki dewasa, dicurigai tidak memiliki riwayat penyakit sistemik, kelainan darah dan kebiasaan merokok, serta bersedia mengisi *informed consent* sebagai tanda persetujuan bahwa darah yang diambil akan dijadikan sampel penelitian (Rakhmawati, 2012).

3.5.2 Kriteria Daun Mimba

Rebusan daun mimba yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun mimba yang didapatkan di sekitar Universitas Jember, Jember, Jawa Timur yang diambil secara acak dari satu pohon yang sama, berwarna hijau, tidak ada penyakit daun, dan terlebih dahulu dilakukan identifikasi di Fakultas Pertanian Politeknik Negeri Jember.

3.5.3 Jumlah Sampel

Jumlah sampel yang digunakan menurut Hardjito (2012) 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 penghitungan diatas diperoleh jumlah sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 4 (empat). Peneliti menggunakan 4 (empat) sampel untuk setiap perlakuan.

3.5.4 Penggolongan Sampel Penelitian

Sampel dibagi menjadi 5 kelompok:

- a. Kelompok kontrol (K), sel neutrofil yang diberi *C. albicans* tanpa perlakuan.
- b. Kelompok perlakuan 1 (P1), sel neutrofil yang diberi rebusan daun mimba sebesar 3,125% sebanyak 200 μ L dan diinduksi *C. albicans*.
- c. Kelompok perlakuan 2 (P2), sel neutrofil yang diberi rebusan daun mimba sebesar 6,25% sebanyak 200 μ L dan diinduksi *C. albicans*.
- d. Kelompok perlakuan 3 (P3), sel neutrofil yang diberi rebusan daun mimba sebesar 12,5% sebanyak 200 μ L dan diinduksi *C. albicans*.
- e. Kelompok perlakuan 4 (P4), sel neutrofil yang diberi rebusan daun mimba sebesar 25% sebanyak 200 μ L dan diinduksi *C. albicans*.

3.6 Alat dan Bahan Penelitian

3.6.1 Alat Penelitian

Microplate 24 well, Coverslip (Duran, Germany), Tabung EDTA (Vaculab), Timbangan (Boeco Germany), Tabung reaksi, Centrifuge (Hettich, Germany), Laminar flow (Dwyer Markzz, Human Lab), Inkubator (Labtech), Autoclave, Lampu spiritus, Kaca obyek (Citoglass), Mikroskop (Olympus), Densicheck (PtT Ensefal Medik Prima), Vortex (Labinco), Filter (Corning, USA), Micropipet (Huma Pette), Corong, Pisau/gunting, Syringe (Trumo syringe), Filter Syringe, Tabung falcon, Centrifuge 5810 R

3.6.2 Bahan Penelitian

Suspensi C. albicans, Aquades steril (Otsu-WI), Rebusan daun mimba, Darah vena perifer, Ficoll hypaque gradient, Penstripe, Fungizone (Gibco), Histopaque-1119 (Sigma), RPMI 1640 (Gibco), Media complete M199 (Gibco), Alkohol, Minyak emersi, HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) (Gibco), Methanol absolut, Giemsa

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 *Ethical Clearance*

Sebelum dilakukan penelitian, mengurus perizinan pelaksanaan penelitian yang berupa *ethical clearance* ke Komisi Etik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

3.7.2 Persiapan dan Sterilisasi Alat

Mempersiapkan peralatan yang digunakan saat penelitian. Semua alat yang terbuat dari kaca disterilkan selama 15 menit dalam *autoclave* dengan suhu 121°C. Sedangkan alat yang berbahan plastik dicuci bersih dan dikeringkan, kemudian diulas dengan alkohol 70 %. Setelah itu melakukan prosedur *coverslip* dengan cara memotong *coverslip* sesuai dengan kebutuhan/diameter *well culture*. Rendam dalam *aquades* lalu disterilkan selama 15 menit dalam *autoclave* dengan suhu 121°C.

3.7.3 Persiapan Rebusan Daun Mimba

Daun mimba segar yang diambil langsung dari pohonnya. Daun mimba dipilih yang memiliki warna hijau tua dan sehat (tidak ada penyakit daun). Rebusan daun mimba konsentrasi 100% didapatkan dengan cara merebus 2 gr (kurang lebih 5 lembar) daun mimba ke dalam 200 ml *aquades* mendidih kemudian dibiarkan pada suhu 90°C selama 30 menit kemudian disaring (Oktavianto, 2011).

3.7.4 Pengenceran Rebusan Daun Mimba

Untuk mendapatkan berbagai konsentrasi yang diinginkan, maka pengenceran dilakukan menggunakan rumus sebagai berikut (Rohaya, 2014):

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

Keterangan :

M1 = Kadar konsentrasi awal V1 = Volume awal
M2 = Kadar konsentrasi akhir V2 = Volume akhir

Adapun cara pengencerannya yaitu :

- a. Untuk memperoleh rebusan daun mimba 3,125% sebanyak 4ml :

$$100\% \times V1 = 3,125\% \times 4$$

$$V1 = \frac{3,125 \times 4}{100}$$

$$V1 = 0,125 \text{ ml}$$

Jadi rebusan daun mimba 100% harus diencerkan dengan menambahkan 3,875 ml akuades steril ke dalam 0,125 ml rebusan daun mimba 100%.

- b. Untuk memperoleh rebusan daun mimba 6,25% sebanyak 4ml :

$$100\% \times V1 = 6,25\% \times 4$$

$$V1 = \frac{6,25 \times 4}{100}$$

$$V1 = 0,25 \text{ ml}$$

Jadi rebusan daun mimba 100% harus diencerkan dengan menambahkan 3,75 ml akuades steril ke dalam 0,25 ml rebusan daun mimba 100%.

- c. Untuk memperoleh rebusan daun mimba 12,5% sebanyak 4 ml :

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

$$V1 = \frac{12,5 \times 4}{100}$$

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

Jadi rebusan daun mimba 100% harus diencerkan dengan menambahkan 3,5 ml akuades steril ke dalam 0,5 ml rebusan daun mimba 100%.

- d. Untuk memperoleh rebusan daun mimba 25 % sebanyak 4ml :

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

$$V1 = \frac{25 \times 4}{100}$$

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

Jadi rebusan daun mimba 100% harus diencerkan dengan menambahkan 3 ml akuades steril ke dalam 1 ml rebusan daun mimba 100%.

3.7.5 Persiapan biakan *C. albicans*

C. albicans dibiakkan dalam media SDB (*Saborund Dextrose Broth*) dan diinkubasi selama 2x24 jam. Biakan *C. albicans* kemudian dibuat suspensi dengan standar 1 McFarland dengan menggunakan *media complete* M199.

3.7.6 Isolasi neutrofil

- a. Pengambilan darah vena pada subjek sebesar 12 cc lalu dibagi menjadi 4 tabung dengan jumlah masing-masing 3 cc pada tiap tabung EDTA.
- b. Sampel darah dalam tabung EDTA kemudian digoyang-goyangkan agar tidak menggumpal.
- c. Siapkan filter. Ambil 3 cc filter 1119 (*hystopaque*), 3 cc 1077 (*limpoprep*) dan 3 cc darah EDTA per tabung *falcon*.
- d. Sentrifugasi darah 2100 rpm selama 30 menit pada suhu 20°C, kemudian serum dibuang.
- e. Terbentuk 6 lapisan, paling atas yaitu plasma darah, kemudian PBMC, 1077 (*limpoprep*), neutrofil, 1119 (*hystopaque*), dan sel darah merah. Neutrofil berada pada lapisan ke 4 yaitu lapisan paling jernih
- f. Membuang lapisan atas. Ambil lapisan yang mengandung neutrofil kemudian letakkan pada tabung steril.
- g. Tambahkan HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) (2:1), dipipeting lalu dihomogenkan menggunakan *centrifuge* 1700 rpm selama 10 menit.

3.7.7 Perlakuan Uji Indeks Adhesi

Tahapan uji indeks adhesi adalah sebagai berikut:

- a. Siapkan 24 *coverslip* yang telah dibersihkan dan diletakkan di dalam *well*.
- b. Neutrofil dipipeting pada masing-masing *coverslip* (@100 µL) kemudian diinkubasi selama 20 menit dengan suhu 37°C di dalam inkubator.
- c. Ditambahkan RPMI 1 cc, *fungizone* 5 µL, dan *penstripe* 5 µL pada tiap *well*.
- d. Inkubasi selama 30 menit.
- e. Dilakukan pencucian kira-kira sebanyak 2-3x hingga tidak ada kontaminasi. Caranya yaitu cairan diambil dengan pipet kemudian dibuang, tambahkan RPMI pada tiap *well* kemudian dicuci lagi. Kalau sudah tidak ada kontaminasi tambahkan *media complete* M199.
- f. Ditambahkan rebusan daun mimba sesuai dengan konsentrasi yang diperlukan sebanyak 200 µL. Untuk kelompok kontrol hanya diberikan *media complete*.
- g. Inkubasi selama 1 jam, kalau sudah tidak ada kontaminasi dipapar *C. albicans*

sebanyak 100 μ L.

- h. Inkubasi selama 2,5 jam.
- i. Dilakukan pengamatan dengan menggunakan mikroskop.
- j. Membuang medium inkubasi dengan pipeting.
- k. Fiksasi dengan metanol absolut 2-3 menit.
- l. Membuang metanol dengan mikropipet kemudian dikeringkan dengan posisi miring.
- m. Tahap selanjutnya yaitu pengecatan dengan *Giemza*: preparat dicuci dengan air mengalir, ditambahkan *buffer Giemza* dan *aquadest* (1 : 4), digoyang sampai kelihatan luntur, cuci dengan air mengalir, keringkan.
- n. Diamati dengan mikroskop hasil preparat yang sudah dicat dengan *Giemza* dengan pembesaran 400x, terlebih dahulu mengamati jumlah *C. albicans* yang menempel pada neutrofil pada perlakuan kontrol. Indeks adhesi diperoleh dengan menghitung banyaknya sel neutrofil yang dilekati jamur. Untuk neutrofil, dihitung pada 100 sel neutrofil menggunakan mikroskop *inverted* dengan pembesaran 400x, untuk kemudian dihitung rata-ratanya.

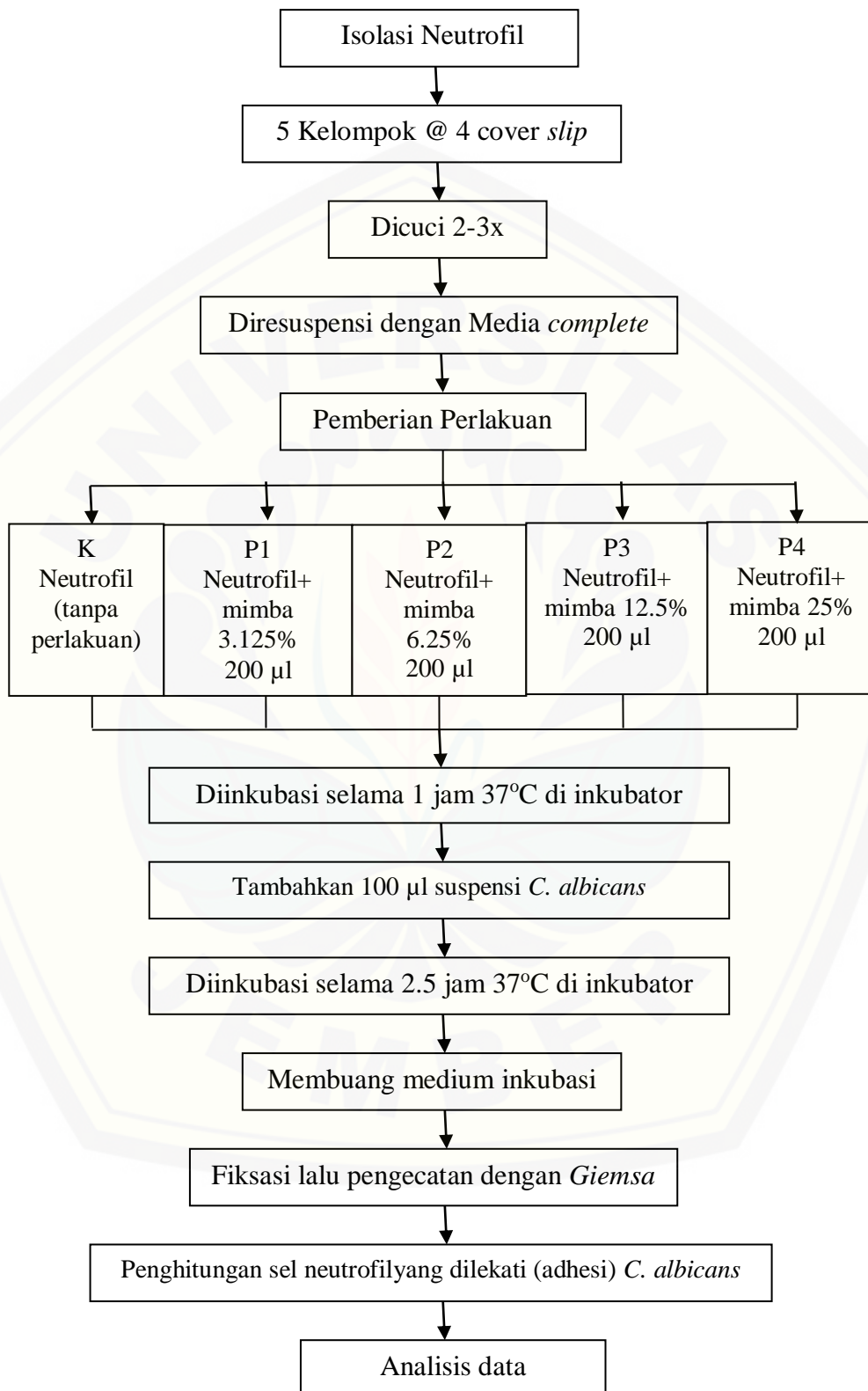
Penghitungan indeks adhesi dilakukan dengan rumus (Ningtyas, 2011):

$$\text{Indeks adhesi} = \frac{\text{Jumlah sel neutrofil yang dilekati}}{\text{Jumlah total neutrofil yang dihitung (=100)}} \times 100\%$$

3.8 Analisis Data

Data hasil penelitian adalah data kuantitatif. Data diuji normalitas dengan uji *Saphiro-Wilk* dan diuji *Levene* untuk mengetahui homogenitasnya. Selanjutnya apabila data hasil penelitian terdistribusi normal dan homogen, dilakukan uji *parametric Anova* untuk melihat perbedaaan uji adhesi neutrofil semua kelompok. Selanjutnya dengan uji *LSD (Least Significant Difference)* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok. Namun jika data yang diperoleh tidak berdistribusi normal dan atau tidak homogen, digunakan uji *non parametric Kruskal-Wallis Test* yang dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*.

3.9 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Bagan Alur Penelitian

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Rebusan daun mimba mampu berperan sebagai imunomodulator dengan meningkatkan adhesi sel neutrofil terhadap *C. albicans*
2. Rebusan daun mimba dengan konsentrasi 25% paling efektif dalam meningkatkan adhesi pada sel neutrofil terhadap *C. albicans* dibandingkan konsentrasi yang lain.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan saran yang dapat diberikan adalah sebagai berikut:

- a. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai potensi rebusan daun mimba pada daya adhesi sel neutrofil terhadap *C. albicans* dengan konsentrasi lain dibawah 50%.
- b. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai aplikasi rebusan daun mimba sebagai obat untuk infeksi rongga mulut.
- c. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai potensi rebusan daun mimba terhadap respon neutrofil pada mikroflora lain yang bersifat patogen di rongga mulut.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas A. K., Lichtman A. H., and Pober J. S. 2015. *Cellular and Molecular Immunology*, 8th Ed. W.B Saunders Company. Philadelphia.
- Amanda L. 2010. *Sistem Adhesi Kedokteran Gigi*. www.respiratory.usu.ac.id. [15 Februari 2017]
- Ambarwati. 2011. Mimba Sebagai Antibakteri, Antifungi, Dan Biopestisida. *Jurnal Kesehatan*. 4(2): 154-163
- Atangwho I. J., Ebong P. E., Eyong E. U., Williams I. O., Eteng M. U., and Egbung G. E. 2009. Comparative Chemical Composition of Leaves of Some Antidiabetic Medicinal Plants: *Azadirachta indica*, *Vernonia amygdalina* and *Gongronema latifolium*. *African Journal of Biotechnology*. 8(18): 4685-4689.
- Bandyopadhyay A, Bose S. 2013. *Characterization of Biomaterials*. Elsevier: Oxford
- Baratawidjaja K. G. 2014. *Imunologi Dasar*. Edisi 11. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Bergter E. B. 2016. Glycan Diversity in Fungi, Bacteria and Sea Organism. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 5(44): 4-5
- Biasoli M. S., Tosello M. E., Luque A. G., Magaró H. M. 2010. Adherence, colonization and dissemination of *Candida dubliniensis* and other *Candida* species. *Medical Mycology*. 48(2): 291–297
- Curvelo J. A. dR., Barreto A. L. S., Portela M. B., Alviano D. S., Holandino C., Padrón T. S., Soares R. M. dA. 2014. Effect of the secretory leucocyte proteinase inhibitor (SLPI) on *Candida albicans* biological processes: A therapeutic alternative?. *Oral Biology*. 59(2014): 928-937
- Dennehy K. M., Willment J. A., Williams D. L., and Brown G. D. 2009. Reciprocal Regulation of IL-23 and IL-12 Following Co-activation of Dectin-1 and TLR Signaling Pathways. *European Journal of Immunology*. 39(5): 1379– 1386.

- Dewanti, Ratna. 2008. Efek Ekstrak Cair Daun Mimba terhadap Fagositosis Makrofag pada Tikus yang Diinokulasi *Candida albicans*. Disertasi. Pascasarjana: Universitas Airlangga, Surabaya.
- Dewanti, Ratna. 2011. TNF- α Expression on Rats after *Candida albicans* Inoculation and Neem (*Azadirachta indica*) Extract Feeding. *Majalah Kedokteran gigi (Dental Journal)*. 44(1): 49-53
- Djibril D., Faye M., Vilarem G., Mar-Diop C. G., Sock O., Rigal L. 2015. Physical Characteristics, Chemical Composition and Distribution of Constituents of the Neem Seeds (*Azadirachta indica* A. Juss) Collected in Senegal. *Research Journal of Chemical Sciences*. 5(7): 52-58
- Ermawati, T. 2014. Potensi Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea robusta*) terhadap Ekspresi TNF- α pada Tikus Periodontitis yang Diinduksi *Porphyromonas gingivalis*. Jember: Universitas Jember
- Fox E. P., Cowley E. S., Nobile C. J., Hartooni N, Newman D. K., Johnson A. D. 2014. Anaerobic Bacteria Grow within *Candida albicans* Biofilms and Induce Biofilm Formation in Suspension Cultures. *Curr Biol*. 24(20): 2411–2416.
- Gartner L. P., Hiatt J. L. 2014. *Buku Ajar Berwarna Histologi 3rd Ed*. Elsevier: London
- Gupta R. C. 2016. *Neutraceutical Efficacy, Safety and Toxicity*. Elsevier: London
- Hardjito, K. 2012. *Pengantar Biostatistika*. Forum Ilmiah Kesehatan (Forikes): Magetan
- Jawetz, Melnick, Adelberg. 2016. *Medical Microbiology*. 27th ed. McGraw-Hill Education: United States.
- Kardinan, A. 2011. *Pestisida nabati, Ramuan dan Aplikasi*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Kumar, V. S., Navaratnam, V. 2013. Neem (*Azadirachta indica*): Prehistory to Contemporary Medicinal uses to Humankind. *Asian Pac J Trop Biomed*. 3(7): 505-514

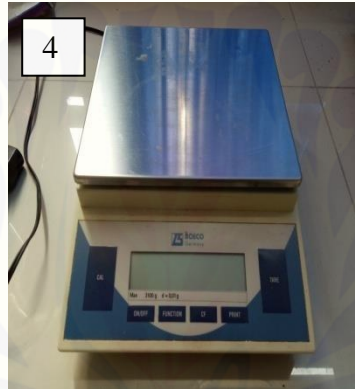
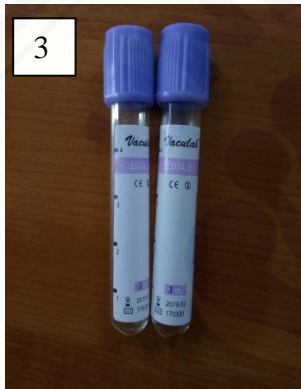
- Kusum H, Bala A, Gupta RK, Sharma R. 2013. Leaf Extract of *Azadirachta indica* (neem): a Potential Antibiofilm Agent for *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathogens and Disease*. 69(1): 62-65
- Kusumaningtyas, Eni. 2014. Mekanisme Infeksi *Candida albicans* pada Permukaan Sel. Lokakarya Nasional Penyakit Zoonosis. Balai Penelitian Veteriner, Jl RE. Martadinata No. 30, P.O. Box 151, Bogor 16114.
- Mahmoudabadi, A. Z., Zarrin M., Kiasat N. 2014. Biofilm Formation and Susceptibility to Amphotericin B and Fluconazole in *Candida albicans*. *Jundishapur J microbial*. 7(7): 1-5
- Munazah, Hayatul. 2010. *Pengaruh Air Rebusan Mengkudu terhadap Hambat Pertumbuhan Salmonella paratyphi A secara In Vitro*. Politeknik Kesehatan Banjarmasin.
- Mutiawati V. K. 2016. Pemeriksaan Mikrobiologi Pada *Candida albicans*. *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala*. 16(1): 53-63
- Moyes DL and Naglik JR. 2011. Mucosal Immunity and *Candida albicans* Infection. *Clinical and Developmental Immunology*. vol. 2011, article ID 346307, 9 pages
- Nett J. E., Marchillo K., Spiegel C. A., Andes D. R. 2010. Development and Validation of an *In Vivo Candida albicans* Biofilm Denture Model. *Infect Immun*. 78(9): 3650–3659.
- Ningtyas T. 2011. “Inhibisi Ekstrak daun Beluntas terhadap Indeks Adhesi *Streptococcus Mutans* pd Neutrofil.” Skripsi. Jember: Program Sarjana Univesits Jember.
- Notoatmodjo S. 2012. *Metodelogi Penelitian Kesehatan*. Jakarta: PT. Rineka Cipta
- Oktavianto, Ari. 2011. “Daya Antijamur Rebusan Daun Sirih Merah (*Piper croatum*) terhadap Pertumbuhan *Candida albicans* Secara In Vitro (Penelitian Eksperimental Laboratoris)”. Skripsi. Jember: Program Sarjana Universitas Jember.
- Pankaj S, Tomar L, Bachwani M, Bansal V. 2011. Review on Neem (*Azadirachta indica*): Thousand Problems One Solution. *International Research Journal of Pharmacy*. 2(12): 97-102

- Playfair J. H. L and Chain B. M. 2009. Immunology at a Glance 9th Edition. Wiley-Blackwell. United Kingdom
- Prashar P, Pruthi H, Akhlaq A . 2012. In vitro antibacterial activity of *Azadirachta indica* against pathogenic bacteria. *Journal of Pharmacy Research*. 5(1): 363-364
- Pratiwi, L. 2012. *Adhesi Porphyromonas gingivalis Pada Neutrofil Yang Diinkubasi Ekstrak Kelopak Bunga Rosella (Hibiscus sabdariffa L.)*. Jember: Universitas Jember.
- Puri H. S. 2008. *Neem: The Divine Tree Azadirachta indica*. Taylor and Francis e-Library. Netherlands
- Rakhmawati, N. Y. I. 2012. Daya Adhesi *Streptococcus Mutans* Pada Netrofil Yang Diinkubasi Ekstrak Polifenol Biji Kakao (*Theobroma Cacao L*).*Skripsi*.Jember :Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
- Richardson J. P, Ho J, Naglik J. R. 2018. Candida–Epithelial Interactions. *Journal of Fungi*. 4(1): 22
- Rohaya, S., Hariwati, L. R. W, dan H. Sujuti. 2014. Efek Pemberian Ekstrak Kulit Jeruk Keprok (*Citrus reticulata*) terhadap Cell-Cycle GI Arrest dan Apoptosis pada Sel Kultur Retinoblastoma. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 28(2): 68-73.
- Shakti N, Upadhya Y, Suman Dhawan and G. P. Talwar. 2013 Antifertility Effects of Neem (*Azadirachta indica*) Oil in Male Rats by Single Intra-Vas Administration: An Alternate Approach to Vasectomy. *Journal of Andrology*. 14(4): 275–281
- Sithisarn P, Rojsanga P. 2017. Anticancer Effects of Some Medicinal Thai Plants. *Natural Products and Cancer Drug Discovery*. (): 25-35
- Subathra K. G. C. Jeevitha, R. Deepa, 2012. Aqueous Two Phase Extraction Of Protease From Neem leaves [*Azadirachta indica*]. *International Journal of Chemical Sciences and Applications*. ISSN 0976-2590, Online ISSN 2278 – 6015. 3(3): 346-351.
- Sulistina A, Asrul dan Rosmini. 2016. Effectiveness of Neem Leaf Extract (*Azadirachta Indica* A. Juss) on The in Vitro Growth of *Alternaria porri* Colony causing Purple Blotch in Wakegi Onion (*Allium x Wakegi* Araki). *Agrotekbis*. 4(4): 419–424

- Tewari A, Tiwari S. 2018. Synthesis of medicinal agents from plants. Elsevier: Netherlands
- Thomas, A. N. S, 2012. Tanaman Obat Tradisional. Edisi 1. Cetakan ke-23. Yogyakarta: Kanisius Hal. 134
- Tortora, G. J., Funke B. R., Case, C.L. 2010. Microbiology An Introduction (10th ed.). San Francisco: *Pearson Educatin Inc.*
- Turgeon M. L. 2014. *Imunology & Serology in laboratory Medicine 5th ed.* St Louise, Missouri: Elsevier Inc.
- Uguccioni M, Teixeira M. M, Locati M and Mantovani A. 2017. *Regulation of Inflammation, Its Resolution and Therapeutic Targeting.* Frontiers Media SA.
- Urban CF, D. Ermert, M. Schmid et al., 2009. Neutrophil Extracellular Traps Contain Calprotectin, a Cytosolic Protein Complex Involved in Host Defense Against *Candida albicans*, *PLoS Pathogens*. 5(10): 1.
- Vincent, S. 2012. Origin of the Names of Species of *Candida*. <http://www.antimicrobe.org/h04c.files/history/candida-history.pdf> [21 Januari 2017]
- Willems N, Houwers D. J., Schlotter Y. M., Theelen B., Boekhout T. 2017. Disseminated Candidiasis in a Young, Previously Healthy, Dog and Review of Literature. *Mycopathologia*. 182(5): 591–596.
- Zhu W, Filler SG. 2010. Interactions of *Candida albicans* with Epithelial Cells. *PMC Cell Microbiol*. 12(3): 273–282

Lampiran A. Foto Alat dan Bahan Penelitian

A.1 Alat Penelitian



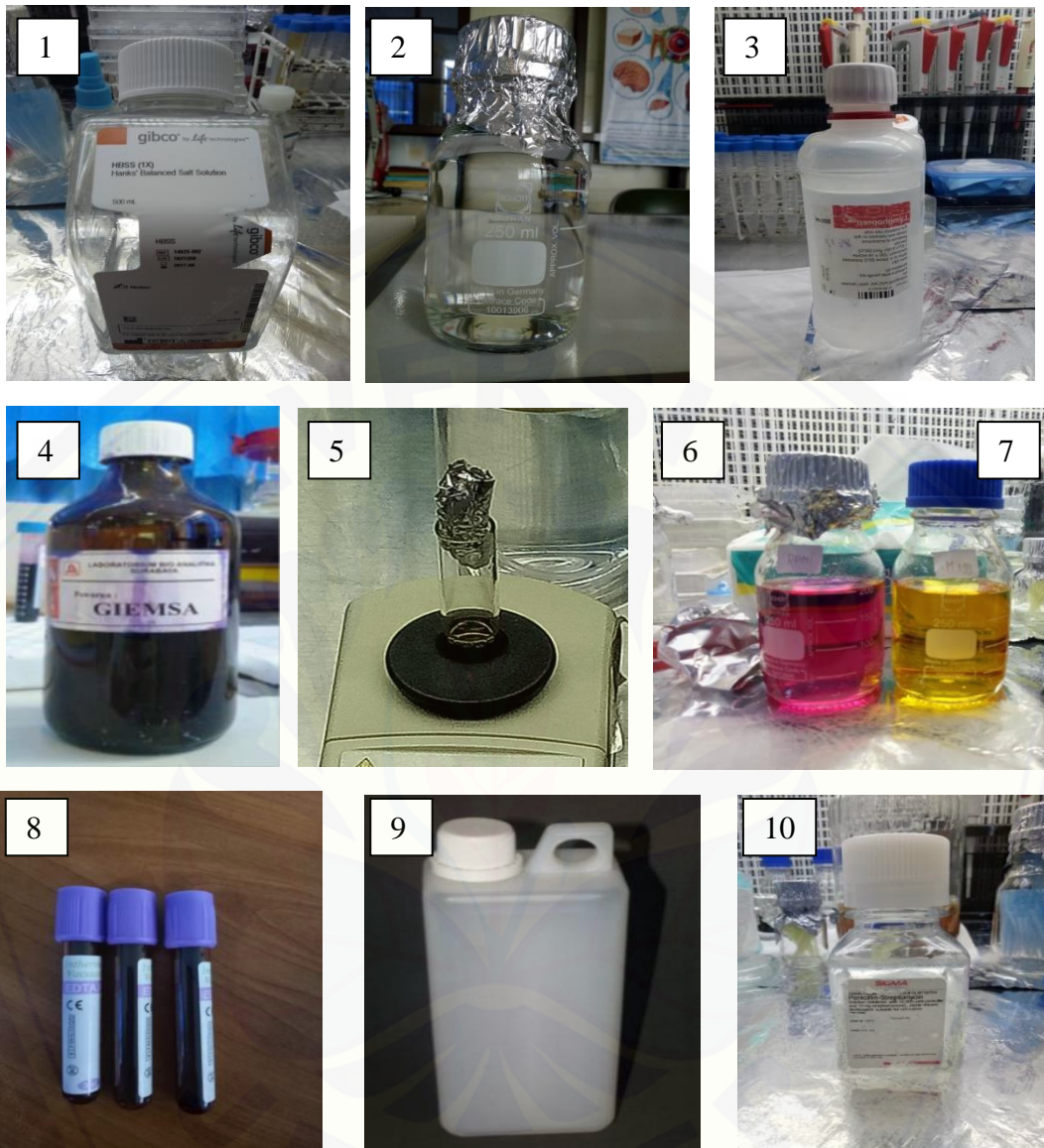




Keterangan Gambar:

- | | |
|------------------------------|---|
| 1. 24 Well plate | 14. Incubator Shaker |
| 2. Coverslip | 15. Blue tip |
| 3. Tabung edta | 16. Mikroskop <i>Inverted</i> tersambung komputer |
| 4. Timbangan | 17. Pinset dan Ose |
| 5. <i>Disposable Syringe</i> | 18. <i>Vortex</i> |
| 6. <i>Micropipet</i> | 19. Tabung <i>Falcon</i> |
| 7. <i>Eppendorf</i> | 20. Oven |
| 8. Laminar Flow | 21. Lampu Spirtus |
| 9. <i>Torniquet</i> | 22. Toples Kaca |
| 10. <i>Centrifuge</i> | 23. <i>Coverglass</i> |
| 11. <i>Filter Syringe</i> | 24. <i>Handscoon</i> , Tisu dan Masker |
| 12. <i>Yellow tip</i> | |
| 13. <i>Densicheck</i> | |



A.2 Bahan Penelitian

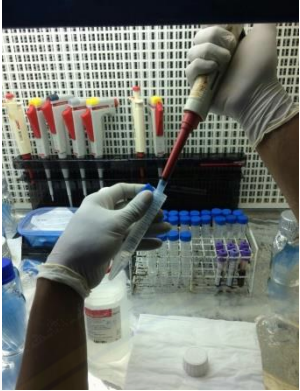
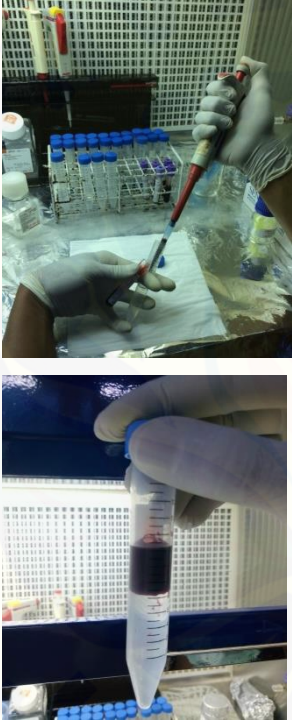
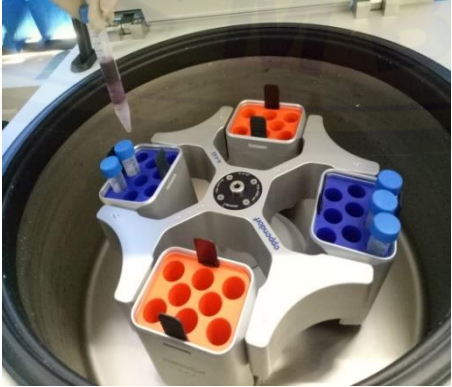


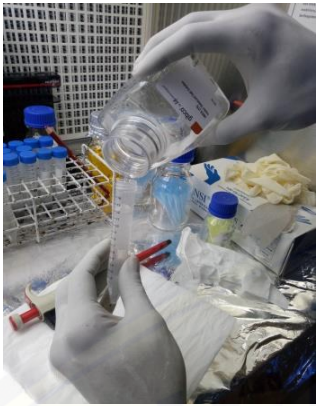

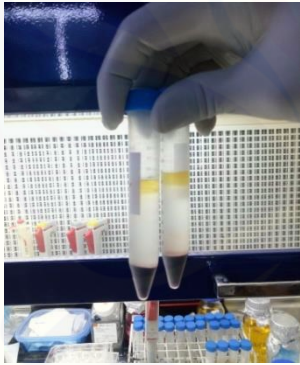
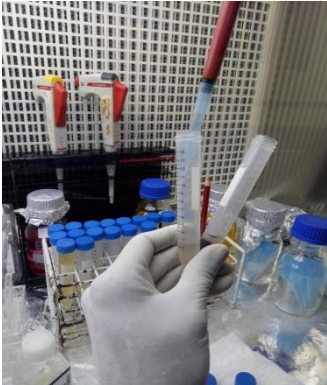
Keterangan Gambar:

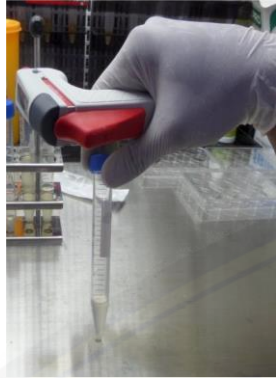

- | | |
|--|---|
| 1. <i>Hank Balance Salt Solution</i>
(HBSS) | 6. <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
(RPMI) |
| 2. Rebusan Daun Mimba | 7. M199 |
| 3. Limpoprep | 8. Darah vena perifer |
| 4. Giemsa | 9. Alkohol 70% |
| 5. Suspensi <i>Candida albicans</i> | 10. Fungizone |

Lampiran B. Prosedur Isolasi Neutrofil

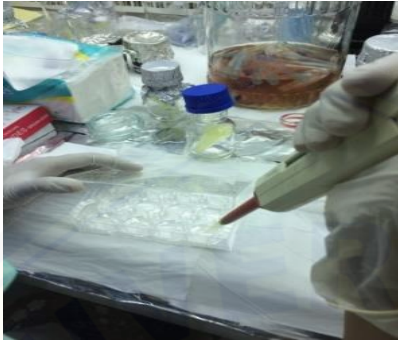

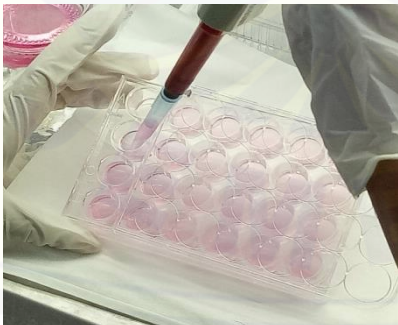
No	Gambar	Keterangan
1		Pengambilan darah vena perifer subyek sebanyak 12 cc dari menggunakan <i>dysposable syringe</i>
2		Darah dibagi menjadi 4 tabung dengan jumlah masing-masing 3 cc pada tiap tabung edta
3		Memasukkan 3 cc larutan 1119 (<i>hystopaque</i>) dalam tabung falcon


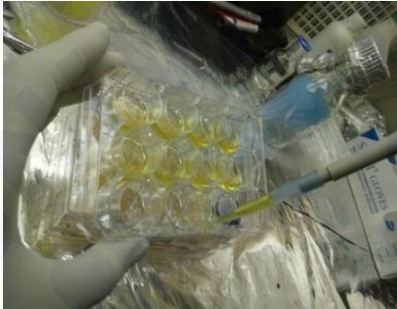


4		Menambahkan 3 cc larutan 1077 (<i>limpoprep</i>)
5		Darah dimasukkan ke dalam tabung falcon
6		Sentrifugasi dengan kecepatan 2100 rpm selama 30 menit

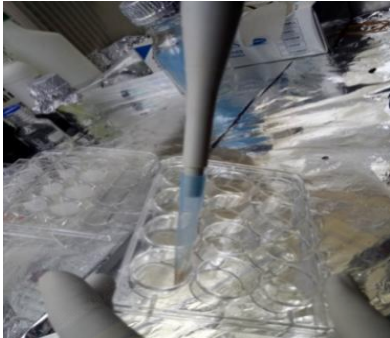

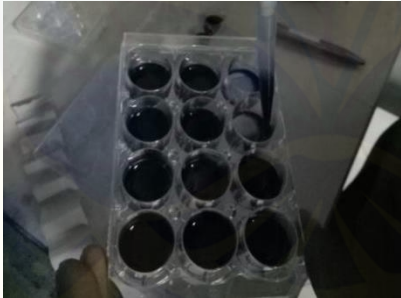
7		<p>Lapisan PMN diambil, lalu dimasukkan kedalam tabung falcon lain dan ditambahkan HBSS dan dilakukan <i>pipetting</i> sampai homogen</p>
8		<p>Sentrifugasi dengan kecepatan 1700 rpm selama 10 menit</p>
9		<p>Sentrifugasi menghasilkan 6 lapisan</p>
10		<p>Ambil lapisan yang mengandung neutrofil kemudian letakkan pada tabung falcon dan ditambahkan HBSS</p>

11		<p>Membuang lapisan atas. Ambil lapisan yang mengandung neutrofil kemudian letakkan pada tabung falcon</p>
12		<p>Ditambahkan antijamur yaitu <i>fungizone</i> sebanyak 5 μl dan antibakteri yaitu <i>penicillin-streptomycin solution stabilised</i> sebanyak 20 μl</p>

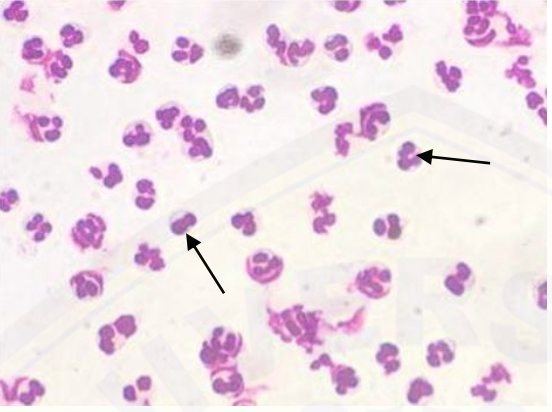
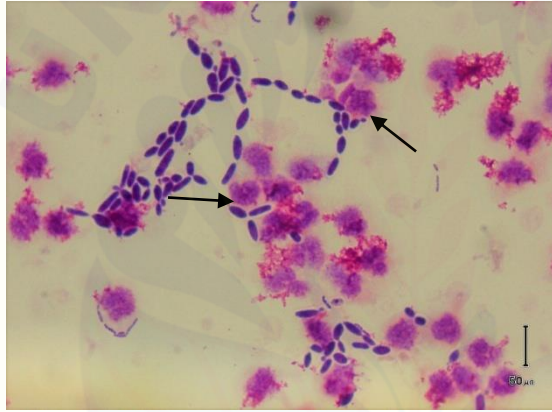
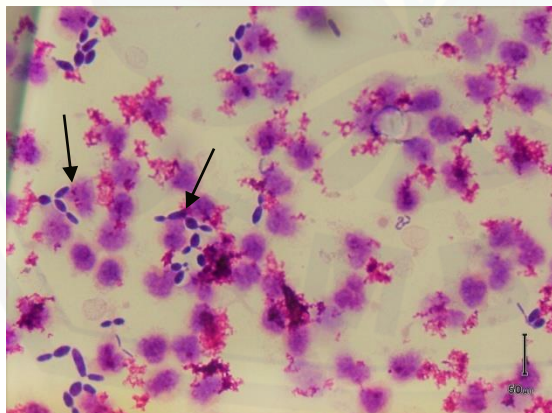
Lampiran C. Prosedur Uji Adhesi

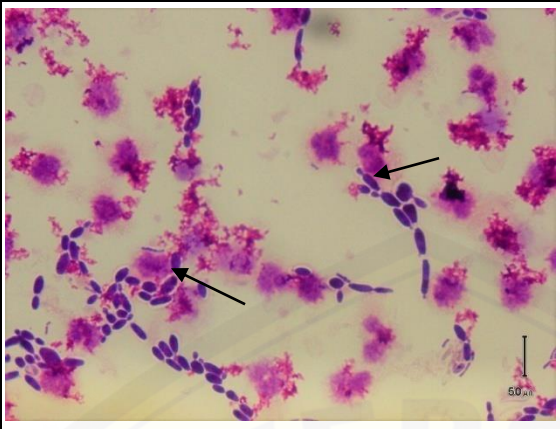
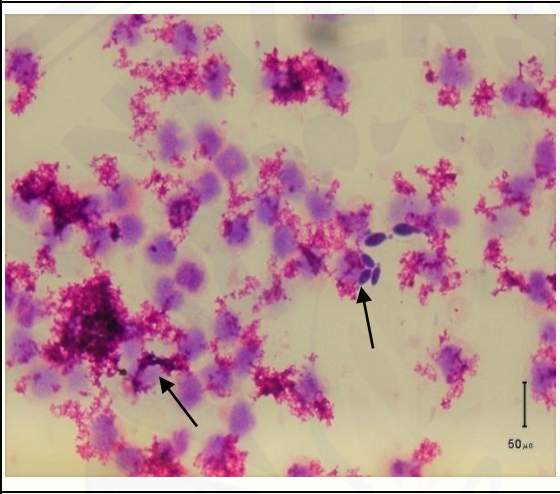
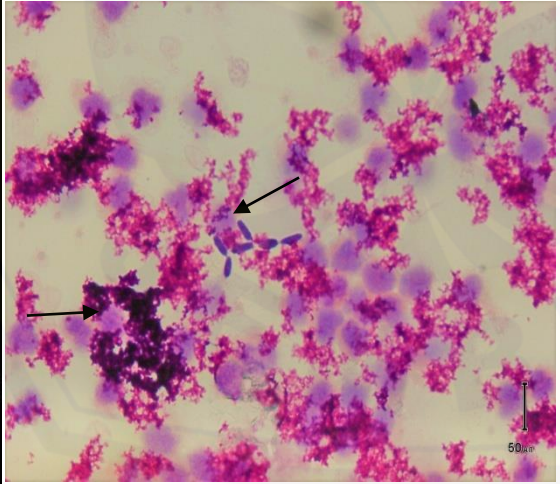
No	Gambar	Keterangan
1		Neutrofil dipipeting pada <i>coverslip</i> 100 μ l kemudian diinkubasi dalam <i>shaker incubator</i> selama 20 menit 37°C
2		Pemberian larutan RPMI 1 cc, dan <i>fungizone</i> 5 μ L pada tiap <i>well</i> kemudian inkubasi kembali selama 30 menit
3		Dilakukan pencucian kira-kira sebanyak 2-3x hingga tidak ada kontaminasi dengan cara mengambil cairan dengan pipet kemudian dibuang, tambahkan RPMI pada tiap <i>well</i> kemudian dicuci lagi.

4		<p>Larutan RPMI diambil, lalu digantikan dengan <i>media complete</i> (M199) sebanyak 1000μl</p>
5		<p>Ditambahkan rebusan daun mimba sesuai dengan konsentrasi yang diperlukan sebanyak 200 μL. Untuk kelompok kontrol hanya diberikan <i>media complete</i>.</p>
6		<p>Inkubasi selama 1 jam, setelah itu dicek terdapat kontaminasi atau tidak.</p>
7		<p>Jika sudah tidak ada kontaminasi dipapar <i>C. albicans</i> sebanyak 100 μL lalu diinkubasi selama 2,5 jam</p>

8		Dilakukan pencucian dengan HBSS dengan cara pipeting
9		Fiksasi dengan menggunakan metanol absolute selama 2-3 menit, lalu metanol dibuang kemudian dikeingkan dengan posisi miring
10		Pengecatan dengan <i>Giemsa</i> Cat <i>Giemsa</i> dibuang, dan dibilas dengan air mengalir lalu dilakukan pengeleman <i>coverslip</i> ke <i>objectglass</i>

Lampiran D. Foto Hasil Pengamatan

No	Gambar	Keterangan
1		<p>Isolat neutrofil.</p> <p>Tampak neutrofil memiliki nukleus dengan dua hingga lima lobus yang berwarna keunguan (tanda panah). Pengamatan dengan menggunakan mikroskop <i>inverted</i> (pengecatan Giemsa, perbesaran 400kali)</p>
2		<p>Neutrofil yang tidak diinkubasi rebusan daun mimba (kelompok kontrol). Tanda panah menunjukkan adhesi neutrofil terhadap <i>C. albicans</i> (Pengecatan Giemsa, perbesaran 1000 kali)</p>
3		<p>Neutrofil yang diinkubasi rebusan daun mimba 12,5% (kelompok P3). Tanda panah menunjukkan adhesi neutrofil terhadap <i>C.albicans</i> (Pengecatan Giemsa, perbesaran 1000 kali)</p>

<p>4</p>		<p>Neutrofil yang diinkubasi rebusan daun mimba 25% (kelompok P4). Tanda panah menunjukkan adhesi neutrofil terhadap <i>C.albicans</i> (Pengecatan Giemsa, perbesaran 1000 kali)</p>
<p>5</p>		<p>Neutrofil yang diinkubasi rebusan daun mimba 3,125% (kelompok P1). Tanda panah menunjukkan adhesi neutrofil terhadap <i>C.albicans</i> (Pengecatan Giemsa, perbesaran 1000 kali)</p>
<p>6</p>		<p>Neutrofil yang diinkubasi rebusan daun mimba 6,25% (kelompok P2). Tanda panah menunjukkan adhesi neutrofil terhadap <i>C.albicans</i> (Pengecatan Giemsa, perbesaran 1000 kali)</p>

Lampiran E. Hasil Penghitungan Adhesi

1. Kelompok Kontrol (K)

Sampel	Jumlah Neutrofil yang dilekati	Jumlah Neutrofil keseluruhan	Indeks Adhesi
A	39	100	0,39
B	14	100	0,14
C	40	100	0,40
D	34	100	0,34
		Rata-rata	0,31

2. Kelompok P1 (Konsentrasi 3,125%)

Sampel	Jumlah Neutrofil yang dilekati	Jumlah Neutrofil keseluruhan	Indeks Adhesi
A	24	100	0,24
B	17	100	0,17
C	21	100	0,21
D	15	100	0,15
		Rata-rata	0,19

3. Kelompok P2 (Konsentrasi 6,25%)

Sampel	Jumlah Neutrofil yang dilekati	Jumlah Neutrofil keseluruhan	Indeks Adhesi
A	20	100	0,20
B	17	100	0,17
C	22	100	0,22
D	21	100	0,21
		Rata-rata	0,20

4. Kelompok P3 (Konsentrasi 12,5%)

Sampel	Jumlah Neutrofil yang dilekati	Jumlah Neutrofil keseluruhan	Indeks Adhesi
A	42	100	0,42
B	25	100	0,25
C	41	100	0,41
D	42	100	0,42
		Rata-rata	0,37

5. Kelompok P4 (Konsentrasi 25%)

Sampel	Jumlah Neutrofil yang dilekati	Jumlah Neutrofil keseluruhan	Indeks Adhesi
A	64	100	0,64
B	56	100	0,56
C	63	100	0,63
D	83	100	0,83
		Rata-rata	0,66

Lampiran F. Analisis Data Penelitian

1. Uji Normalitas

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Adhesi	.198	20	.138	.884	20	.221
kelompok	.155	20	.200*	.896	20	.435

2. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Adhesi

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.906	4	15	.162

3. Uji *One Way Anova***ANOVA**

Adhesi

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5928.500	4	1482.125	19.966	.000
Within Groups	1113.500	15	74.233		
Total	7042.000	19			

4. Uji LSD

Multiple Comparisons

Adhesi
LSD

(I) kelompok (J) kelompok		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	konsentrasi 3,13%	12.50000	6.09234	.058	-.4855	25.4855
	konsentrasi 6,25%	11.75000	6.09234	.073	-1.2355	24.7355
	konsentrasi 12,5%	-5.75000	6.09234	.360	-18.7355	7.2355
	konsentrasi 25%	-34.75000*	6.09234	.000	-47.7355	-21.7645
konsentrasi 3,13%	kontrol	-12.50000	6.09234	.058	-25.4855	.4855
	konsentrasi 6,25%	-.75000	6.09234	.904	-13.7355	12.2355
	konsentrasi 12,5%	-18.25000*	6.09234	.009	-31.2355	-5.2645
	konsentrasi 25%	-47.25000*	6.09234	.000	-60.2355	-34.2645
konsentrasi 6,25%	kontrol	-11.75000	6.09234	.073	-24.7355	1.2355
	konsentrasi 3,13%	.75000	6.09234	.904	-12.2355	13.7355
	konsentrasi 12,5%	-17.50000*	6.09234	.012	-30.4855	-4.5145
	konsentrasi 25%	-46.50000*	6.09234	.000	-59.4855	-33.5145
konsentrasi 12,5%	kontrol	5.75000	6.09234	.360	-7.2355	18.7355
	konsentrasi 3,13%	18.25000*	6.09234	.009	5.2645	31.2355
	konsentrasi 6,25%	17.50000*	6.09234	.012	4.5145	30.4855
	konsentrasi 25%	-29.00000*	6.09234	.000	-41.9855	-16.0145
konsentrasi 25%	kontrol	34.75000*	6.09234	.000	21.7645	47.7355
	konsentrasi 3,13%	47.25000*	6.09234	.000	34.2645	60.2355
	konsentrasi 6,25%	46.50000*	6.09234	.000	33.5145	59.4855
	konsentrasi 12,5%	29.00000*	6.09234	.000	16.0145	41.9855

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran G. Surat Keterangan *Ethical Clearance*



KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK)
 FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS JEMBER
*(THE ETHICAL COMMITTEE OF MEDICAL RESEARCH
 FACULTY OF DENTISTRY UNIVERSITAS JEMBER)*

ETHIC COMMITTEE APPROVAL
No. 055/UN25.8/KEPK/DL/2018

Title of research protocol	: "Potention of Neem Leaves Infusa (<i>Azadirachta indica</i>) To Adhesion of Neutrophil Againts <i>Candida albicans</i> "
Document approved	: Research Protocol
Principal investigator	: Amalia Hayudiarti
Member of research	: 1. Prof. Dr., drg. I Dewa Ayu Ratna Dewanti, M. Si. 2. drg. Tantin Ermawati, M. Kes.
Responsible Physician	: Amalia Hayudiarti
Date of approval	: March 28 th , 2018
Place of research	: 1. Bioscience Laboratory RSGM Universitas Jember

The Research Ethic Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember states that the above protocol meets the ethical principle outlined and therefore can be carried out.

Jember, April 2nd, 2018

Dean of Faculty of Dentistry Universitas
Jember




Amalyan P. M. Kes, Sp. Pros)

Chairperson of Research Ethics Committee
Faculty of Dentistry Universitas Jember




I Dewa Ayu Ratna Dewanti, M. Si.)

Lampiran H. Surat Keterangan Identifikasi Daun Mimba

Kode Dokumen : FR-AUK-064
Revisi : 0



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
POLITEKNIK NEGERI JEMBER
JURUSAN PRODUKSI PERTANIAN

Jalan Mastrip Kotak Pos 164 Jember 68101 Telp. (0331) 333532-34; Faks. (0331) 333531
E-mail: politeknik@polije.ac.id Website: <http://Polije.ac.id/>

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN

Nomor : 017/PL17.3.1.02/PP/2018

Menindaklanjuti surat dari Wakil Dekan I Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember No: 1194/UN25.8.TL/2018 perihal Permohonan Identifikasi Tanaman dan berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke Herbarium Jemberiense, Laboratorium Tanaman, Jurusan Produksi Pertanian, Politeknik Negeri Jember oleh:

Nama : Amalia Hayudiarti
NIM : 111610101039
Jur/Fak/PT : Kedokteran Gigi/ Universitas Jember

maka dapat disampaikan hasilnya bahwa spesimen tersebut dibawah ini (terlampir) adalah:
Kingdom: Plantae; Subkingdom: Tracheobionta; Superdivisi: Angiospermae; Divisi: Spermatophyta; Kelas: Dicotyledonae; Subkelas: Dialypetaleae; Ordo: Sapindales; Famili: Meliaceae; Genus: Azadirachta; Spesies: Azadirachta Indica

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 1 Maret 2018

Ka. Laboratorium Tanaman



Ir. Lili Mastuti, MP
NIP. 195808201987032001

Lampiran I. Surat Identifikasi Jamur



LABORATORIUM MIKROBIOLOGI
BAGIAN BIOMEDIK KEDOKTERAN GIGI
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER

SURAT KETERANGAN

No. 0136 / MIKRO / S.KET / 2018

Sehubungan dengan keperluan identifikasi mikroorganisme, maka kami menerangkan bahwa mahasiswa berikut :

Nama : Amalia Hayudiarti
NIM : 111610101039
Fakultas : Kedokteran Gigi
Keperluan : Penelitian

Telah melakukan uji identifikasi terhadap isolat **Candida albicans**, dengan menggunakan uji Germ Tube dan diamati secara mikroskopis menunjukkan hasil persumtif Candida albicans.

Jember, 03 Mei 2018

Mengetahui,

Kepala Bagian Biomedik Kedokteran Gigi

Penanggung Jawab Lab. Mikrobiologi

(drg. Amandia Dewi Shita, M.Biomed)
NIP. 198006032006042002

(drg. Pujiana Endah Lestari, M.Kes)
NIP. 197608092005012002

Lampiran J. Informed Consent

LAMPIRAN SURAT PERNYATAAN

SURAT PERSETUJUAN
(INFORMED CONSENT)

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:


Nama : *Azizah Safaatin*
NIM : *1416101033*
Umur : *22* tahun
Telepon : *085749193430*
Alamat : *Jl. Mastrip Gang 2 Nomor 50 Jember*

Menyatakan bersedia untuk menjadi sampel penelitian dari:

Nama : *Amalia Hayudiarti*
NIM : *111610101039*
Alamat : *Jl. Wijayakusuma no. 46 Jember*

Dengan judul skripsi "Potensi Rebusan Daun Mimba (*Azadirachta indica*) pada Adhesi Sel Neutrofil Terhadap *Candida albicans*", dimana prosedur pelaksanaan penelitian untuk pengambilan sampel ini tidak akan menimbulkan resiko dan ketidaknyamanan subyek yang bersangkutan.

Saya telah membaca atau dibacakan prosedur penelitian yang terlampir dan telah diberi kesempatan untuk menanyakan hal-hal yang belum jelas dan diberi jawaban dengan jelas. Surat persetujuan ini saya tulis dengan sebenarnya tanpa suatu paksaan dari pihak manapun. Dengan ini saya menyatakan secara sukarela dan sanggup menjadi subyek dalam penelitian ini.

Jember, *26 April* 2018
Yang menyatakan,

AZIZAH SAFAATIN