



**INHIBISI EKSTRAK DAUN BELUNTAS *Pluchea indica* (L.) Less
TERHADAP INDEKS ADHESI *Streptococcus mutans*
PADA NEUTROFIL**

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Kedokteran Gigi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran Gigi

Oleh

**Tectona Eka Ningtyas
NIM 071610101109**

**BAGIAN BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2012**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ayahanda Dr. Jati Batoro, M.Si. dan Ibunda Sri Suwanti, S. E., yang selalu menyertai dan mendoakan putri-putrinya dengan penuh kasih sayang, tulus, tanpa balasan bahkan imbalan. Semuanya ini Ananda persembahkan kepada Ayahanda dan Ibunda tersayang.
2. Adik-Adikkku Dian Apriliyani dan Agnes Arimbi Ayuwanti, yang selalu memberi tawa dan kasih sayang yang tulus dan tidak terkira.
3. Semua sahabat dan teman-temanku tercinta, yang selalu ada di saat senang maupun duka.
4. Bangsa dan Almamaterku Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang kubanggakan.

MOTO

Aku berkata kepadamu : apa saja yang kamu minta dan doakan, percayalah bahwa kamu telah menerimanya, maka hal itu akan ditambahkan kepadamu. *)

Ada 4 esensi mencapai sukses. Pilih karier yang anda cintai, berikan yang terbaik dimanapun kita berada, kejarlah peluang, dan bekerjasama dalam tim. **)

Today a thousand doors of enterprise are open to you, inviting you to useful work. ***)

*) Markus 11:2

**) Benjamin Franklin Fairless

***) Grenville Kleise

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Tectona Eka Ningtyas

NIM : 071610101109

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya tulis ilmiah yang berjudul: "Inhibisi Ekstrak Daun Beluntas *Pluchea indica* (L.) Less Terhadap Indeks Adhesi *Streptococcus mutans* Pada Neutrofil" adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali disebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap 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, 24 Januari 2012

Yang menyatakan,

Tectona Eka Ningtyas

NIM 071610101108

SKRIPSI

**INHIBISI EKSTRAK DAUN BELUNTAS *Pluchea indica* (L.) Less
TERHADAP INDEKS ADHESI *Streptococcus mutans* PADA
NEUTROFIL**

Oleh

Tectona Eka Ningtyas
NIM 071610101109

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. drg. Purwanto, M.Kes

Dosen Pembimbing Akademik : drg. Desi Sandra Sari, M.D.Sc.

PENGESAHAN

Skripsi ”Inhibisi Ekstrak Daun Beluntas *Pluchea indica* (L.) Less Terhadap Indeks Adhesi *Streptococcus mutans* Pada Neutrofil ” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember pada:

hari, tanggal : Rabu, 1 Februari 2012

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Tim Penguji

Ketua

Dr. drg. Purwanto, M. Kes
NIP 195710241986031002

Anggota 1,

Anggota 2,

drg. Desi Sandra Sari, M. DSc
NIP 197512152003122005

Dr. drg. I.D.A Susilawati, M. Kes
NIP 196805021997012002

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Jember

drg. Hj. Herniyati, M. Kes
NIP 195909061985032001

RINGKASAN

Inhibisi Ekstrak Daun Beluntas *Pluchea indica* (L.) Less Terhadap Indeks Adhesi *Streptococcus mutans* Pada Neutrofil; Tectona Eka Ningtyas, 071610101109; 2012; 72 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Obat-obat alami diakui masyarakat berperan dalam berbagai upaya pemeliharaan, peningkatan dan pemulihan kesehatan maupun pengobatan penyakit didasarkan atas pertimbangan bahwa obat-obat alami dapat mempengaruhi mekanisme pertahanan alamiah tubuh. Tanaman beluntas (*Pluchea indica* [L] Less) memiliki khasiat yang beragam. Daun beluntas mengandung flavonoid yang dikenal luas sebagai bahan antiinflamasi dan antioksidan.

Neutrofil merupakan sel darah putih yang berperan penting dalam mekanisme pertahanan tubuh terhadap invasi bakteri yang berperan pada reaksi akut terhadap suatu inflamasi. Akumulasi dan penempelan neutrofil pada permukaan endotel terjadi karena adanya molekul adhesi yang dilepaskan endotel akibat pengaruh IL-1 yang diproduksi neutrofil. *Streptococcus mutans* merupakan bakteri penyebab utama timbulnya karies gigi dan dapat menyebabkan endokarditis. Adanya trauma, misalnya ketika menyikat gigi dan mengunyah makanan, dapat mendorong *S. mutans* masuk ke dalam darah paling tidak 40% ketika menyikat gigi, 60% setelah dicabut gigi dan 88% setelah bedah periodontal. *S. mutans* merupakan bakteri yang memiliki kemampuan untuk menempel pada sel inang tergantung struktur atau molekul yang memiliki daya adhesi yang disebut adhesin. Adhesin tersebut memungkinkan organisme tersebut menempel pada reseptor, termasuk membran sel neutrofil.

Berdasarkan adanya kandungan flavonoid yang dimiliki oleh tanaman beluntas pada uraian di atas, maka peneliti ingin mengetahui bagaimana daun beluntas dapat mempengaruhi respon inflamasi dari sel radang neutrofil yang sebelumnya dipapar oleh *S. mutans* secara *in-vitro*.

Adapun rancangan pada penelitian ini adalah penelitian dengan kelompok kontrol *The Post Test Only Control Group Design*. Sampel dibagi dalam 5 kelompok. Kelompok (K1) adalah kelompok kontrol yang terdiri dari neutrofil murni yang diberikan media HBSS. Kemudian kelompok P (perlakuan) terdiri dari kelompok isolat neutrofil yang diberi ekstrak daun beluntas. Untuk kelompok P1 diberikan ekstrak daun beluntas 25%, berturut-turut kelompok P2 diberikan ekstrak daun beluntas 50%, kelompok P3 diberikan ekstrak daun beluntas 75% dan kelompok P4 diberikan ekstrak daun beluntas 100%. Adapun prosedur penelitian dibagi menjadi 6 bagian, yaitu preparasi ekstrak daun beluntas, preparasi subkultur *S. mutans*, pengambilan isolat neutrofil dan perlakuan uji indeks adhesi.

Dalam penelitian ini, data yang didapatkan dianalisa menggunakan uji statistik parametrik yaitu uji *kolmogorov smirnov* untuk uji normalitas dan dilakukan uji statistik parametrik, yaitu *one way anova* serta apabila terdapat perbedaan nyata ($p < 0,05$) dilanjutkan dengan uji LSD. Hasil analisis data menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna pada kelompok kontrol dimana sel neutrofil tanpa inkubasi ekstrak berbeda bermakna dengan kelompok sel neutrofil yang diinkubasi ekstrak beluntas. Secara mikroskopis menggunakan mikroskop inverted dengan pembesaran 400x menggambarkan pengaruh ekstrak daun beluntas pada indeks adhesi, dimana semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun beluntas yang diinkubasi, semakin tampak utuh membran sel neutrofil dan semakin sedikit *S. mutans* yang melekat pada sel neutrofil. Bisa dilihat bahwa pada kontrol dimana sel tidak diinkubasi dengan ekstrak daun beluntas, beberapa sel neutrofil tampak lisis dan membrannya pecah. Kemudian dilakukan inokulasi *S. mutans* di media agar BHIA. Ternyata didapatkan efek dari ekstrak beluntas selain sebagai antiinflamasi ternyata menambah kemampuan mikrobisidal neutrofil terhadap *S. mutans* yang berpengaruh besar terhadap adhesi *S. mutans* terhadap neutrofil.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak daun beluntas konsentrasi 25%, 50% 75%, dan 100% berpengaruh terhadap perbedaan indeks adhesi *S. mutans* terhadap neutrofil. Sedangkan

konsentrasi ekstrak perasan daun beluntas yang paling efektif untuk menurunkan indeks adhesi neutrofil yang dipapar *S. mutans* adalah ekstrak daun beluntas dengan konsentrasi 75%. Dengan diketahuinya senyawa flavonoid dalam daun beluntas mampu menghambat adesi *S. mutans* pada sel neutrofil, diharapkan memiliki manfaat besar dalam mengatasi infeksi dalam rongga mulut yang disebabkan bakteri.

PRAKATA

Puja dan puji syukur kepada Tuhan Yesus Kristus atas kasih dan kuasa serta rencana-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul ” Inhibisi Ekstrak Daun Beluntas *Pluchae indica* (L.) Less Terhadap Indeks Adhesi *Streptococcus mutans* Pada Neutrofil”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. drg. Hj. Herniyati, M. Kes., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
2. Dr. drg. Purwanto, M. Kes., selaku Dosen Pembimbing Utama, dan drg. Desi Sandra Sari, M.D.Sc., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah memberikan bimbingan, saran dan motivasi dengan penuh kesabaran sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
3. Dr. drg. I.D.A Susilawati, M. Kes, selaku Sekretaris Penguji yang telah memberikan saran demi kesempurnaan skripsi ini. Terimakasih juga Dok, atas bantuan dan bimbingannya saat melaksanakan penelitian.
4. drg. Lusi Hidayati, M. Kes., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberi motivasi, saran dan nasehat-nasehat selama ini.
5. Papa tercinta, Dr. Jati Batoro, M. Si. dan Mamaku tersayang Sri Suwanti, S. E , terimakasih atas untaian doa yang tulus dan tiada henti tanpa kupinta, kasih sayang dan pengorbanan yang selalu mengalir dalam hidupku, serangkaian nasehat yang selalu teruntai yang menjadikan semangat dan motivasi bagiku untuk lebih tegar dalam menghadapi tantangan kehidupan.
6. Adik-adikku Dian Apriliyani dan Agnes Arimbi Ayuwanti, yang memberikan kasih sayang yang tak bersyarat, semoga kakakmu ini bisa selalu menjadi panutan dan teladan yang baik bagi kalian.

7. Kepada Mas Erwin Prakosa, S. Tp. yang menjadi sahabat dan kakak laki-lakiku. Terimakasih buat kesabarannya dalam mendengarkan segala keluh kesahku serta selalu mendoakan dan memberi semangat dari jauh.
8. Sahabatku Mbak Tya terimakasih buat segala kebersamaannya, baik tangis, canda maupun tawa. Semoga kita bisa terus bersemangat menghadapi setiap lika-liku kehidupan.
9. Kepada sobat-sobat '*pajamas*'ku Tifani, Ninin, Ajeng dan Nahdiya yang selalu memberikan keceriaan dan motivasi. Terimakasih buat persahabatan yang dibina semenjak PK2 sampai sekarang.
10. Kepada sahabat-sahabat 2007 tercintaku Si Kembar Nisa-Lia, Listy, Mashuda, Shofa, Gita, Yano, Tata, Rissa, Anggi Mak, Anggi Kwok, Riska, Cece, Fitri, Ane, Dhenok, Suher, Yola dan seluruh rekan seperjuangan 2007 yang tidak bisa disebutkan satu persatu, ayo tetap semangat dalam menjalani kehidupan di FKG. Semoga tetap kompak dan segera memiliki gelar drg. di depan nama kita semua.
11. Keluarga kosku, semua mbak-mbak kos dan adik-adik kosku Mastrip III 3 34A. Termakasih buat kebersamaan dan semangatnya. Beban dan galau rasanya luruh saat pulang ke kosan dan mendapati kalian semua.
12. Teman-teman penelitianku. Lia Kembar, Ulfa, Tiwi, Yasinta, Ardi, Yoland dan Lila. Terimakasih atas bantuan dan kerjasamanya serta semangat perjuangan yang kalian kobarkan, senangnya akhirnya kita bisa menyelesaikan penelitian meski harus di laboratorium sampai malam.
13. Teman-teman KKNku, Dita, Maya, Mbak Devi, Mas Rizal dan Vindy terimakasih buat persabatan dan dukungannya sampai sekarang. Meski kebersamaan kita begitu singkat, tetapi dukungan dari kalian tetap ada sampai sekarang.
14. Teman-teman SENAT MAHASISWA, PSM Gema Swara Denta, UKS Pers Caninus, rekan-rekan UKS Lisma dan UKS PMKK FKG UNEJ terimakasih atas kerjasama dan pengalaman yang berharga. Semoga pengalaman menjadi guru yang paling berharga bagi kita dan semoga perjuangan tidak hanya berkobar di saat bangku S1. Hidup Mahasiswa!

15. Seluruh staf pengajar dan karyawan FKG yang tidak bisa disebutkan satu persatu.
16. Staf laboratorium Biomedik Pak Pin dan staf laboratorium *Bio science* RSGM Mas Bagus, Mbak Azizah dan Mas Erwan yang telah membantu penelitian ini.
17. Semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu per satu yang terlibat baik langsung maupun tidak langsung yang membantu dalam penyelesaian skripsi ini.

Penulis menyadari masih ada ketidaksempurnaan dan kekurangan dalam penulisan skripsi ini, untuk itu kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan demi kesempurnaan penulisan selanjutnya. Akhir kata penulis berharap semoga skripsi ini bermanfaat. Amin.

Jember, 24 Januari 2012

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBING	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR SINGKATAN	xvi
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xxi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Beluntas (<i>Pluchea indica</i> [L.] Less)	6
2.1.1 Klasifikasi Beluntas	6
2.1.2 Morfologi Beluntas	6

2.1.3 Habitat Beluntas	7
2.1.4 Kandungan Kimia Beluntas	8
2.1.5 Manfaat Beluntas Pada Proses Inflamasi	8
2.2 Indeks Adhesi	9
2.3 Neutrofil	10
2.3.1 Morfologi Neutrofil	10
2.3.2 Membran Sel Neutrofil	12
2.3.3 Mekanisme Neutrofil dalam Pertahanan Tubuh	13
2.4 Streptococcus mutans	16
2.4.1 Taksonomi <i>S. mutans</i>	16
2.4.2 Morfologi dan Habitat <i>S. mutans</i>	17
2.4.3 Patogenitas <i>S. mutans</i>	19
2.4.4 <i>S. mutans</i> Dalam Darah	22
2.5 Hipotesis	23
BAB 3. METODE PENELITIAN	24
3.1 Jenis Penelitian	24
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian	24
3.2.1 Waktu Penelitian	24
3.2.2 Tempat Penelitian	24
3.3 Identifikasi Variabel Penelitian	24
3.3.1 Variabel Bebas	24
3.3.2 Variabel Terikat	25
3.3.3 Variabel Kendali	25
3.4 Definisi Operasional	25
3.4.1 Ekstrak Daun Beluntas	25
3.4.2 Neutrofil	25
3.4.3 <i>Streptococcus mutans</i>	25
3.4.4 Indeks Adhesi	26

3.5 Sampel Penelitian	26
3.6 Bahan dan Alat Penelitian	26
3.6.1 Bahan Penelitian	26
3.6.2 Alat Penelitian	27
3.7 Prosedur Penelitian	27
3.7.1 Preparasi Ekstrak Daun Beluntas	27
3.7.2 Preparasi <i>S. mutans</i>	28
3.7.4 Uji Indeks Adhesi	29
3.7.5 Uji Aktivitas Mikrobisidal Neutrofil	30
3.8 Analisis Data	30
3.9 Alur Penelitian	31
BAB.4 HASIL DAN PEMBAHASAN	32
4.1 Hasil	32
4.1.1 Isolasi Neutrofil dan Subkultur <i>S. mutans</i>	32
4.1.2 Indeks Adhesi <i>S. mutans</i> terhadap neutrofil	33
4.1.3 Mikrobisidal Neutrofil	37
4.1.4 Hasil Analisis Data	40
4.2 Pembahasan	42
BAB. 5 KESIMPULAN DAN SARAN	49
5.1 Kesimpulan	49
5.2 Saran	49
DAFTAR BACAAN	50
LAMPIRAN	58

DAFTAR SINGKATAN

ATCC	:	<i>American Type Culture Collection</i>
ANOVA	:	<i>Analysis of Variant</i>
BHIA	:	<i>Brain Heart Infusion Agar</i>
HBSS	:	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
LSD	:	<i>Least Significant Difference</i>
RPMI	:	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
TYC	:	<i>Trypticase Yeast Casein</i>

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Hasil Rata-Rata Penghitungan Indeks Adhesi <i>S. mutans</i> terhadap Neutrofil Pada Masing-Masing Kelompok	36
Tabel 4.2 Hasil Uji LSD pada indeks adhesi <i>S. mutans</i> terhadap neutrofil kelompok kontrol dan semua kelompok perlakuan	41
Tabel 4.3 Hasil Uji LSD pada indeks adhesi <i>S. mutans</i> terhadap neutrofil antar kelompok perlakuan	41

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Batang dan daun beluntas	7
2.2 Beluntas sebagai tanaman pagar	7
2.3 Deret neutrofil	11
2.4 Gambaran mikroskopis neutrofil	12
2.5 Gambaran membran neutrofil	13
2.6 Neutrofil pada radang akut	16
2.7 Gambaran koloni <i>S. mutans</i> pada epitel lidah	17
2.8 Gambaran mikroskopis koloni <i>S. mutans</i>	19
4.1 Preparat hasil isolasi neutrofil menunjukkan sel neutrofil yang berwarna pink keunguan (pengecatan Giemza, pembesaran 400x) (a). Tampak neutrofil dan lobusnya yang terdiri atas 2-5 lobus (pengecatan Giemza, pembesaran 1000x)(b)	32
4.2 Sediaan <i>S. mutans</i> terlihat berwarna ungu pada pemeriksaan mikroskopik sesuai dengan sifat <i>Streptococcus</i> , yaitu gram positif berbentuk kokus berpasangan atau berantai (Pengecatan Gram, pembesaran 1000x)	33
4.3 Sel neutrofil yang dipapar <i>S. mutans</i> tanpa diinkubasi dengan ekstrak daun beluntas (kelompok kontrol) menunjukkan bahwa membran neutrofil sebagian besar tampak banyak yang rusak atau lisis. Adhesi <i>S. mutans</i> ditunjukkan pada panah (2) (Pengecatan Giemza, pembesaran 400x)	34

4.4	Sel neutrofil yang dipapar <i>S. mutans</i> yang diinkubasi dengan ekstrak daun beluntas 25% (kelompok P1) tampak membran sel neutrofil rusak (1). Jumlah bakteri yang cukup banyak tersebar melekat pada sel neutrofil (2) (Pengecatan Giemza, pembesaran 400x)	34
4.5	Sel neutrofil yang dipapar <i>S. mutans</i> yang diinkubasi dengan ekstrak 50% (kelompok P2). Tampak bakteri menempel pada membran neutrofil yang ditunjuk oleh panah (Pengecatan Giemza, pembesaran 400x)	35
4.6	Gambar 4.6 Sel neutrofil yang dipapar <i>S. mutans</i> yang diinkubasi dengan ekstrak 75% (kelompok P3) memiliki indeks adhesi yang rendah (Pengecatan Giemza, pembesaran 400x)	35
4.7	Sel neutrofil yang dipapar <i>S. mutans</i> dengan diinkubasi ekstrak 100% (kelompok P4) dimana <i>S. mutans</i> yang melekat pada neutrofil memiliki jumlah yang hampir sama dengan inkubasi ekstrak 100% (Pengecatan Giemza, pembesaran 400x)	36
4.8	Indeks adhesi <i>S. mutans</i> pada neutrofil	37
4.9	Tanpa inkubasi ekstrak daun beluntas (K), <i>S. mutans</i> tumbuh subur pada media agar BHIA. Hanya sedikit area pada agar yang tidak ditumbuhi <i>S. mutans</i> seperti yang ditunjukkan pada panah	38
4.10	Dengan inkubasi ekstrak daun beluntas 25% (P1), <i>S. mutans</i> tumbuh menyebar di media BHIA, meskipun penyebaran tidak merata, pertumbuhan bakteri banyak memenuhi permukaan agar. Panah menunjukkan daerah agar yang ditumbuhi cukup padat koloni <i>S. mutans</i>	38
4.11	Dengan inkubasi ekstrak daun beluntas 50% (P2), <i>S. mutans</i> tumbuh, namun pertumbuhan koloni <i>S. mutans</i> sedikit di media BHIA seperti yang ditunjukkan pada panah	39
4.12	Dengan inkubasi ekstrak daun beluntas 75% (P3), <i>S. mutans</i> tumbuh sangat sedikit di media BHIA. Tampak hanya pertumbuhan <i>S. mutans</i> berukuran kecil di atas media agar	39

- 4.13 Dengan inkubasi ekstrak daun beluntas 100% (P4), *S. mutans* tumbuh paling sedikit di media BHIA. Tampak hampir tidak ada *S. mutans* yang tumbuh di media..... 40

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran A Tabulasi Data	58
Lampiran B Uji Statistik	59
Lampiran C Foto Hasil Penelitian.....	61

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Akhir-akhir ini dunia barat mulai memalingkan kembali perhatiannya ke alam yang terkenal dengan semboyan *back to nature*. Upaya tersebut mengikuti jejak masyarakat Asia yang sampai saat ini masih tetap memanfaatkan obat-obat tradisional dalam upaya pelayanan kesehatan di samping obat-obat farmasetik. Kembalinya perhatian dunia barat ke obat-obat alami tidak lain disebabkan oleh kembali tumbuhnya kepercayaan masyarakat barat bahwa obat-obat alami termasuk obat-obat nabati, dapat memberikan peranan dalam upaya pemeliharaan, peningkatan dan pemulihan kesehatan serta pengobatan penyakit. Di samping itu diyakini pula bahwa obat-obat alami kurang memberikan efek samping jika dibandingkan dengan obat-obat farmasetik.

Obat-obat alami diakui masyarakat berperan dalam berbagai upaya pemeliharaan, peningkatan dan pemulihan kesehatan maupun pengobatan penyakit didasarkan atas pertimbangan bahwa obat-obat alami dapat mempengaruhi mekanisme pertahanan alamiah tubuh. Mekanisme pertahanan alami tubuh itu meliputi reaksi-reaksi spesifik maupun reaksi nonspesifik yang berperan dalam proses eliminasi penyebab penyakit khususnya mikroba.

Tanaman beluntas (*Pluchea indica* [L] Less) dikenal sebagai salah satu obat tradisional. Penggunaan berbagai khasiat pada beluntas umumnya adalah pada daunnya, baik yang masih segar ataupun dikeringkan. Daun beluntas berbau khas (aromatis) dan memiliki rasa getir. Daun beluntas berkhasiat untuk meningkatkan nafsu makan (stomakik), membantu pencernaan, peluruh keringat (diaforetik), pereda demam (antipiretik), dan penyegar (*demulcent*) (Ardiansyah, 2005).

Di Indonesia secara tradisional daun beluntas digunakan sebagai obat untuk memperbaiki fungsi lambung, merangsang pengeluaran air susu ibu dan obat batuk. Jus dari remukan daun yang dicampur dengan jus dari tanaman lain merupakan obat disentri. Campuran daun beluntas dengan bahan lain dibuat menjadi obat yang dapat

mengurangi nyeri otot yang efektif, untuk mengatasi rasa lemas setelah diare dan mengatasi tukak dan luka (Susanti, 2000).

Tanaman beluntas mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, minyak atsiri, asam klorogenik, natrium, aluminium, kalsium, magnesium dan fosfor. Sedangkan akarnya mengandung flavonoid dan tanin. Gabor juga mengatakan bahwa flavonoid juga dapat digunakan sebagai obat antiinflamasi, antikanker, anti-fertilitas, antiviral, antidiabetes, antidepresan, dan diuretik (Ferdian, 2008). Flavonoid di bidang kedokteran gigi dikenal sebagai bahan antiinflamasi atau antiradang (Sabir, 2003). Flavonoid menghambat kerja lipooksigenase, enzim yang merubah asam arakhidonat menjadi leukotrien yang berperan pada migrasi leukosit (Wilmana, 2002). Akibatnya proses radangpun mampu dipersingkat.

Radang atau inflamasi merupakan respon protektif setempat yang ditimbulkan oleh cedera atau kerusakan jaringan, yang berfungsi menghancurkan, mengurangi, dan mengurung baik agen pencedera maupun jaringan yang cedera (Dorland, 2002). Inflamasi bertujuan untuk mengisolasi, menghancurkan, dan menonaktifkan benda asing yang masuk. Selain itu, inflamasi berfungsi sebagai tempat pembuangan jaringan mati atau benda asing, perbaikan jaringan dan penyembuhan penyakit.

Neutrofil berperan penting dalam mekanisme pertahanan tubuh terhadap invasi bakteri yang berperan pada reaksi inflamasi akut terhadap suatu inflamasi. Dengan proses kemotaksis sel ini akan bermigrasi sebagai fagosit yang mengontrol kontaminasi lokal dan mencegah infeksi (Firman, 2007). Neutrofil dengan proses kemotaksis akan bermigrasi untuk berfungsi sebagai fagosit yang mengontrol kontaminasi lokal dan mencegah infeksi. Neutrofil akan bereaksi terhadap inflamasi dengan berakumulasi mendekati sel endotel dinding venula. Proses ini disebut marginasi. Akumulasi dan penempelan neutrofil pada permukaan endotel terjadi karena adanya molekul adhesi yang dilepaskan endotel akibat pengaruh Interleukin (IL-1) yang diproduksi neutrofil (Rasuna, 2007).

Streptococcus mutans merupakan salah satu bakteri penting yang dijumpai di rongga mulut. Jenis bakteri ini merupakan bakteri penyebab utama timbulnya karies

gigi (Tarigan, 1990). Karies gigi merupakan infeksi kronis enamel atau dentin akibat *S. mutans* yang biasanya ditemukan di dalam mulut. *S. mutans* memecah gula dalam air liur dan menghasilkan asam yang merusak enamel gigi dan akhirnya membentuk rongga pada permukaan gigi. Jika tidak ditangani, kerusakan dapat mencapai dentin dan pulpa. Jika pulpa terinfeksi, gigi mungkin mengalami nekrosis, dan ada peningkatan risiko pengembangan abses periapikal. Komplikasi termasuk pulpitis, dentoalveolar abses dan dapat menyebabkan endokarditis akut pada beberapa kasus.

S. mutans dapat menginfeksi karena memiliki enzim yang sifatnya destruktif, salah satunya adalah enzim hialuronidase. Enzim ini merusak jembatan antar sel yang terbuat dari jaringan ikat hialin. Jembatan antar sel memiliki fungsi penting sebagai transpor nutrisi antar sel, sebagai jalur komunikasi antar sel, sebagai unsur penyusun, dan penguat jaringan. Jika jembatan ini rusak dalam jumlah besar, maka dapat diperkirakan kelangsungan hidup jaringan dapat terancam nekrosis (Rasuna, 2007).

Tahap awal dari infeksi bakteri adalah proses adhesi berupa perlekatan bakteri pada sel inang. Proses adhesi berperan penting dalam keberhasilan suatu bakteri patogen berkolonisasi pada permukaan sel inang, untuk kemudian menyebabkan suatu penyakit. *S. mutans* merupakan bakteri yang memiliki kemampuan untuk menempel pada sel inang tergantung struktur atau molekul yang memiliki daya adhesi yang disebut *adhesin*. *Adhesin* tersebut memungkinkan organisme tersebut menempel pada reseptor yang terdapat pada sel inang (Jacques dan Paradis, 1990). *Adhesin* mengikat reseptor spesifik pada membran permukaan sel (Bellanti, 1993). Protein adhesi mempunyai peranan penting dalam proses perlekatan bakteri pada sel inang dan merupakan faktor virulensi bakteri yang berpotensi imunogenik (Giannasca, 1996).

Berdasarkan uraian di atas, dengan semakin banyaknya *S. mutans* yang melekat pada neutrofil sebagai sel inang maka besar kemungkinan neutrofil untuk lisis dan mengeluarkan enzim-enzim lisosom yang menyebabkan rusaknya jaringan akibat enzim proteolitik, pepsin, dan *cathepsin*. Berdasarkan adanya kandungan flavonoid yang dimiliki oleh tanaman beluntas pada uraian di atas, perlu diketahui bagaimana daun beluntas dapat mempengaruhi respon inflamasi dari sel radang neutrofil yang

sebelumnya dipapar *S. mutans* secara *in-vitro*. Pada penelitian ini digunakan pengukuran indeks adhesi yang merupakan tahap awal adanya infeksi *S. mutans* dengan pemberian daun beluntas sebagai bahan antiinflamasi. Adapun ekstrak daun beluntas yang digunakan menurut beberapa penelitian digunakan konsentrasi 100%, 50% dan 25% (Fajrin, 2009; Fikril, 2009).

Berdasarkan penelitian terdahulu, telah dibuktikan bahwa ekstrak daun beluntas dengan konsentrasi 25%, 50% dan 100% dapat mengurangi jumlah sel radang neutrofil yang telah dipapar oleh *Staphylococcus aureus*. Oleh karena itu dalam penelitian ini digunakan konsentrasi ekstrak 75% untuk mengurangi kemungkinan bias pada indeks adhesi *S. mutans* yang dipaparkan pada sel neutrofil.

1.2 Rumusan Masalah

- a. Apakah ada pengaruh pemberian ekstrak daun beluntas konsentrasi 25%, 50% 75%, dan 100% terhadap perbedaan indeks adhesi setelah neutrofil dipapar dengan *S. mutans*?
- b. Berapakah konsentrasi ekstrak perasan daun beluntas yang efektif untuk menurunkan indeks adhesi neutrofil yang dipapar *S. mutans*?

1.3 Tujuan Penelitian

- a. Mengetahui pengaruh ekstrak daun beluntas konsentrasi 25%, 50% 75%, dan 100% terhadap inhibisi indeks adhesi setelah neutrofil dipapar dengan *S. mutans*.
- b. Mengetahui konsentrasi ekstrak perasan daun beluntas yang efektif dalam inhibisi indeks adesi neutrofil yang dipapar *S. mutans*.

1.4 Manfaat Penelitian

- a. Dapat memberikan masukan terhadap ilmu pengetahuan tentang adanya inhibisi indeks adhesi ekstrak daun beluntas terhadap neutrofil yang dipapar *S. mutans* .

- b. Menginformasikan kepada masyarakat agar memanfaatkan ekstrak daun beluntas sebagai pengobatan alternatif secara tradisional.
- c. Dapat digunakan sebagai acuan untuk studi intervensi selanjutnya dalam memaksimalkan peran ekstrak daun beluntas apabila penelitian ini terbukti berperan dalam inhibisi indeks adhesi neutrofil yang dipapar *S. mutans*.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Beluntas (*Pluchea indica* [L.] Less)

2.1.1 Klasifikasi Beluntas

Menurut Pujowati (2006) klasifikasi dari tanaman beluntas sebagai berikut:

Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Bangsa	: Asterales
Suku	: Asteraceae
Marga	: <i>Pluchea</i>
Spesies	: <i>Pluchea indica</i> [L.] Less

2.1.2 Morfologi Beluntas

Beluntas adalah tanaman perdu kecil, tumbuh tegak, tinggi mencapai 0,5-2 meter dan kadang-kadang lebih. Percabangannya banyak, berusuk halus, berambut lembut, daun bertangkai pendek dan letak berseling, helaian daun bulat telur sungsang, ujung bulat melancip, tepi bergerigi, berkelenjar, panjang 2,5-9 meter, lebar 1-1,5 meter, warnanya hijau terang, dan bila diremas baunya harum. Bunganya majemuk, keluar dari ketiak daun dan ujung tangkai, cabang-cabang perbungaannya banyak, bunga bentuk bogol bergagang atau duduk serta berwarna putih kekuningan sampai ungu. Beluntas memiliki buah seperti bentuk gasing, kecil, keras, cokelat, sudut-sudut putih. Bijinya kecil dan berwarna coklat keputihan (Dalimartha, 1999).



Gambar 2.1 Batang dan daun beluntas (Direktorat Jenderal Tanaman Pangan dan Hortikultura, 1994)

2.1.3 Habitat Beluntas

Plucea indica [L] Less pada umumnya di Indonesia dikenal dengan nama beluntas, khususnya bagi masyarakat Sumatra, Jawa, dan Madura. Sedangkan di Sulawesi disebut *lamutasa* dan di Timor disebut *lenabou*. Dalam pengobatan Cina dikenal dengan *luan yi* dan di Eropa dikenal dengan *marsh heabane* (Hariana, 2005).

Beluntas umumnya tumbuh liar di daerah kering pada tanah yang keras atau berbatu atau ditanam sebagai tanaman pagar. Tumbuhan ini memerlukan cukup cahaya matahari atau sedikit naungan, banyak ditemukan pada daerah pantai dekat laut, terdapat sampai 1000 m di atas permukaan laut (Ardiansyah, 2005).



Gambar 2.2 Beluntas sebagai tanaman pagar (Edo, 2010)

2.1.4 Kandungan Kimia Beluntas

Menurut Maya (2010) beluntas mengandung amino (leusin, isoleusin, triptofan, treonin), lemak, kalsium, fosfor, besi, vitamin A dan C. Daun dan bunga tanaman mengandung alkaloid, flavonoid, tanin, minyak atsiri, asam klorogenik, natrium, aluminium, magnesium dan fosfor. Sedangkan akarnya mengandung flavonoid dan tanin (Ardiansyah, 2005). Berdasarkan penelitian Rasmeuli (1986), tanaman beluntas juga mengandung *benzyl asetat*, *benzyl alcohol*, serta eugenol.

2.1.5 Manfaat Beluntas pada Proses Inflamasi

Biren, dkk. (2007) menyatakan bahwa aktifitas antiinflamasi daun beluntas diperankan oleh alkaloid, flavonoid, *xantone* dan sterol yang terkandung di dalamnya. Roslinda (2008) juga melaporkan bahwa ekstrak etanol beluntas juga menunjukkan anti inflamasi dan anti *nociceptif* pada mencit dan tikus.

Beluntas mengandung flavonoid yang menghambat terjadinya peradangan. Penelitian *in-vivo* maupun *in-vitro* menunjukkan bahwa flavonoid memiliki efek antiradang, antibakteri, antioksidan, antikarsinogen dan melindungi pembuluh darah. Ladolfi, dkk. (1984) melaporkan bahwa konsentrasi tinggi dari senyawa flavonoid dalam menghambat pelepasan asam arakhidonat dan sekresi enzim lisosom dari sel neutrofil dengan memblok jalur siklooksigenase dan lipooksidase. Terhambatnya kedua jalur tersebut menyebabkan berkurangnya jumlah prostaglandin prostasiklin, endoperoksida tromboksan satu sisi dan asam hidroperoksida leukotrien di sisi lainnya (Sabir, 2003). Flavonoid juga bertindak sebagai radikal hidroksi dan superoksid yang mampu melindungi lipid membran terhadap reaksi yang merusak. Similarin dan silibium marianum merupakan senyawa dalam flavonoid yang diyakini mampu melindungi membran sehat dan menghambat prostaglandin (Robinson, 1995).

2.2 Inhibisi Indeks Adhesi

Kata *adhesif* berasal dari bahasa latin *adhaerere* yang berarti melekat. Secara terminologi, adhesi adalah suatu proses interaksi zat padat maupun cair dari suatu bahan atau *adherent* dengan bahan yang lain atau *adherend* pada sebuah *interface* atau penghubung. Adhesi berarti gaya tarik menarik atau daya mengumpul antara molekul-molekul dari zat-zat yang tidak sejenis atau adhesi adalah perlekatan antara dua zat yang memiliki perbedaan jenis dan struktur (Amanda, 2010).

Adapun bakteri dapat melekat ke permukaan gigi diperantarai oleh reseptor berupa lapisan tipis protein saliva dan glikoprotein yang menutupi, misalnya permukaan gigi yang sering dikenal dengan pelikel. Pelikel dan matriks plak merupakan hasil dari host dan produk bakteri yang terdiri dari beberapa komponen meliputi albumin, lisozim, amilase, imunoglobulin A, prolin yang kaya protein dan *mucins*. Lapisan pelikel pada permukaan gigi dikolonisasi oleh bakteri Gram positif seperti *S. sanguis*, *S. mutans* dan *A. viscosus* (Jamilah, 2010).

Komponen bakteri seperti *glukosyltransferase* dan *glucans* juga dapat ditemukan dalam pelikel dan memainkan peran yang sangat signifikan dalam hal perlekatan. Suatu ikatan antara adsorpsi dan desorpsi molekul saliva terjadi 90-120 menit setelah menyikat gigi. Setelah 2 jam pelikel pada permukaan lingual terbentuk setebal 20-80 nm sedangkan pelikel di daerah bukal bisa mencapai 200-700 nm. Ketebalan pelikel bisa berubah sewaktu-waktu tergantung pada tempat melekatnya. Pada saat molekul protein saliva berikatan dengan permukaan gigi protein dapat mengalami perubahan. Hal ini merupakan petunjuk adanya reseptor baru untuk perlekatan dimana terjadi aktivitas *glukosyltransferase* dan menghasilkan *glucans* dengan struktur yang dimodifikasi. Komposisi molekul dan kimia fisik pelikel merupakan hal yang sangat menentukan bentuk kolonisasi mikroba (Jamilah, 2010).

Kemampuan bakteri untuk beradhesi pada sel inang tergantung struktur atau molekul yang dapat menempel yang disebut adhesin, yang memungkinkan organisme tersebut menempel pada reseptor yang terdapat pada sel inang (Jacques dan Paradis, 1990). Penempelan merupakan tahap yang sangat penting dalam proses infeksi.

Adhesin dapat berupa pili, fimbriae, hemagglutinin atau bahan lainnya (Soto dan Hultgren, 1999). Menurut Wizemann mencegah penempelan atau adhesi bakteri pada reseptor yang terdapat pada sel inang dan kolonisasi mungkin merupakan kiat yang paling efektif dalam mencegah terjadinya infeksi. Faktor perlekatan yang dimiliki oleh bakteri intestinal patogen, selain *outer membrane* protein adalah *fimbriae* dan lipopolisakarida (LPS) (Winarsih, 1999).

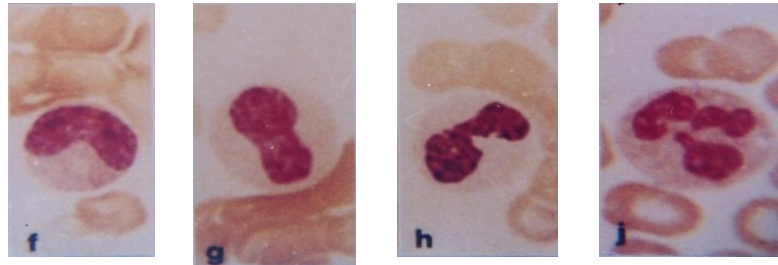
Menurut Ayudi (2008) pada penelitian uji hambat adhesi menunjukkan bahwa semakin tinggi volume antibodi yang disalutkan pada sel epitel vesika urinaria kelinci, maka semakin sedikit jumlah bakteri yang menempel sehingga indeks adhesinya semakin menurun. Berdasarkan penelitian tersebut maka dapat disimpulkan bahwa indeks adhesi adalah banyaknya bakteri yang melekat pada sel inang persatuan jumlah sel inang (Santosaningih, 2004).

2.3 Neutrofil

2.3.1 Morfologi Neutrofil

Neutrofil merupakan leukosit polimorfonuklear, bersama dengan makrofag adalah sel fagositosis utama (Jawetz, 1986). Neutrofil adalah sel-sel matang yang dapat menyerang dan menghancurkan bakteri dan virus bahkan dalam darah sirkulasi. Neutrofil dalam keadaan normal berdiameter 7-9 μm dan dalam hapusan darah kering 10-12 μm . Dalam darah manusia neutrofil berjumlah paling banyak dan merupakan 65%-75% dari jumlah seluruh leukosit (Leeson, 1985).

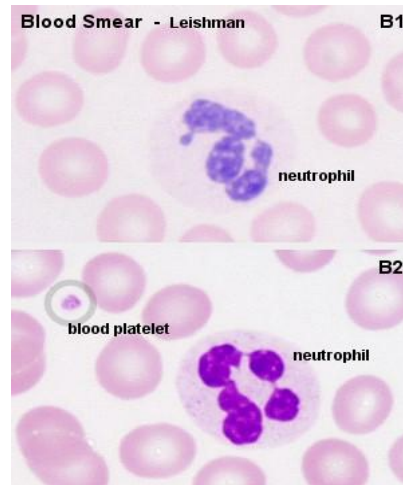
Neutrofil berumur pendek, hanya beberapa hari. Terdapat granula yang mengandung sejumlah faktor bakterisidal. Setelah 12 jam tinggal di dalam darah, PMN masuk ke jaringan (Roeslan, 1996). Fungsi neutrofil terutama adalah memberikan respon imun nonspesifik dengan melakukan fagositosis serta membunuh atau menyingkirkan mikroorganisme yang masuk (Kresno, 1984).



Gambar 2.3 Deret neutrofil. f-g menunjukkan stab neutrofil, intinya seperti batang, lurus atau bengkok, kromatinnya kasar. h-j : Segmen neutrofil khas karena intinya bersegmen-segmen, kromatinnya kasar bergumpal (Graigmyle, 1994).

Neutrofil mampu bergerak aktif seperti amoeba dan menelan berbagai zat dengan proses yang disebut fagositosis. Proses ini dibantu oleh opsonin yang melapisi obyek untuk dicernakan dan membuatnya lebih mudah dimasukkan oleh leukosit (Price, 1995). Neutrofil berkembang dalam sumsum tulang dikeluarkan dalam sirkulasi. Sel-sel ini merupakan 60-70 % dari leukosit yang beredar. Garis tengah sekitar 12 μm , satu inti dan 2-5 lobus. Sitoplasma yang banyak diisi oleh granula spesifik (0;3-0,8 μm) mendekati batas resolusi berwarna *salmon pinkoleh* campuran jenis *romanovsky*. Granul pada neutrofil ada dua yaitu (a). Azurofilik yang mengandung lisosom dan peroksidase. (b). Granul spesifik lebih kecil mengandung fosfatase alkali dan zat-zat bakterisidal (protein kationik) yang dinamakan fagositin (Paramaatha, 2009).

Neutrofil jarang mengandung membran endoplasma granuler, sedikit mitokondria, *apparatus Golgi* rudimenter dan sedikit granula glikogen. Neutrofil merupakan garis depan pertahanan seluler terhadap invasi jasad renik, menfagosit partikel kecil dengan aktif. Adanya asam amino D oksidase dalam granula azurofilik penting dalam penceran dinding sel bakteri yang mengandung asam amino D. Selama proses fagositosis dibentuk peroksidase. Mieloperoksidase yang terdapat dalam neutrofil berikatan dengan peroksida dan membran bekerja pada molekul tirosin dinding sel bakteri dan menghancurkannya (Effendi, 2003).



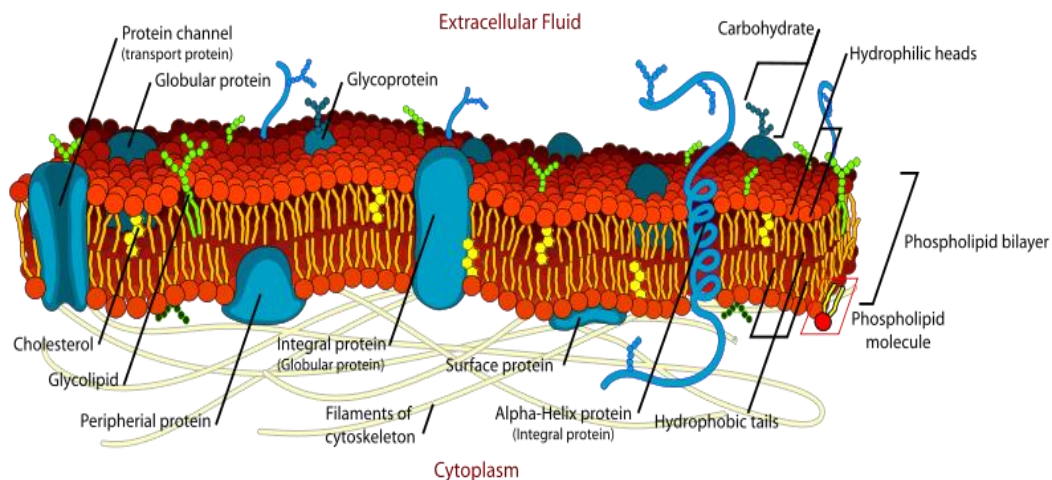
Gambar 2.4 Gambaran mikroskopis neutrofil (Fakrizal, 2009)

2.3.2 Membran Sel Neutrofil

Membran plasma secara umum tersusun dari dua lapisan lemak dan protein yang bersifat dinamis. Protein terletak secara intristik dan ekstrinsik pada kedua lapisan lemak. Protein berfungsi sebagai tempat pertukaran materi, energi dan informasi dari dan keluar sel. Sedangkan lemak terutama terdiri atas fosfolipid yang merupakan elemen struktural dari membran sel yang berfungsi sebagai prekursor bagi sejumlah senyawa biologis aktif. Demikian pula menyebabkan fluiditas membran serta sebagai medium transportasi untuk senyawa yang larut dalam lemak (Bertrand, dkk, 2006).

Membran sel berfungsi sebagai barier semipermeabel yang memungkinkan molekul yang berukuran kecil dapat keluar masuk ke dalam sel. Hasil pengamatan mikroskop elektron terhadap membran sel menunjukkan bahwa membran sel merupakan lipid bilayer (disebut sebagai *fluid-mosaic* model). Molekul penyusun utama adalah fosfolipid, yang terdiri dari bagian kepala yang polar (hidrofilik) dan dua ekor nonpolar (hidrofobik). Fosfolipid ini tersusun atas bagian nonpolar membentuk daerah hidrofobik yang diapit oleh daerah kepala yang pada bagian dalam dan luar membran. Komposisi membran sel adalah protein 55%, fosfolipid 25%, kolesterol 13%, lipid lain 4%, dan karbohidrat 3% (Guyton dan Hall, 1997).

Protein pada membran sel sebagian besar tersusun atas glikoprotein. Terdapat dua jenis protein membran yaitu protein integral yang menembus membran sepenuhnya dan protein perifer yang hanya melekat pada satu sisi atau permukaan membran dan tidak menembus membran sepenuhnya. Protein integral memiliki banyak fungsi, salah satunya adalah sebagai reseptor. Interaksi reseptor dengan molekul tertentu (ligan) spesifik yang menempel pada reseptor, mengakibatkan perubahan bentuk reseptor. Hal tersebut selanjutnya mengaktifkan bagian dalam protein integral atau menginduksi terjadinya interaksi antara reseptor dan protein yang terdapat dalam sitoplasma, yang berperan sebagai *second messenger*. Oleh karena itu sinyal dapat diteruskan dari bagian luar reseptor ke dalam sel. Dalam hal ini protein integral yang tersebar di membran sel berfungsi sebagai sarana penyampaian informasi mengenai lingkungan di luar ke dalam sel. Pada neutrofil reseptor ini berupa reseptor Fc (FcR) dan reseptor C3b (C3bR) yang berinteraksi dengan sebuah antibodi yang diangkut darah yaitu IgG dan sebuah komponen komplemen dari plasma darah yaitu C3b, yang melekat pada permukaan bakteri pada proses opsonisasi. (Guyton dan Hall, 1997).



Gambar 2.5 Gambaran membran neutrofil (Rahman, 2010)

2.3.3 Mekanisme Neutrofil dalam Pertahanan Tubuh

Neutrofil merupakan sel pertahanan tubuh non spesifik yang pertama kali mengatasi adanya antigen dengan memfagosit antigen tersebut. Neutrofil berperan penting pada respon radang akut, dimana terjadi perubahan-perubahan vaskuler dan eksudasi. Beberapa jam setelah dimulai radang akut, terjadi peningkatan jumlah neutrofil dalam darah, kadang-kadang sampai empat hingga lima kali lipat dari jumlah normal. Hal ini disebabkan karena adanya mediator peradangan seperti histamin, bradikinin, serotonin, prostaglandin, beberapa produk sistem komplemen dan produk reaksi pembuluh darah yang memasuki aliran darah kemudian ditranspor di sumsum tulang guna menggerakkan neutrofil-neutrofil ke dalam sirkulasi untuk segera menuju daerah radang. Di dalam jaringan neutrofil memiliki sifat yaitu diapedesis, ameboid, kemotaksis dan fagositosis (Guyton dan Hall, 1997).

Secara *in-vivo*, proses fagositosis diawali dengan migrasi neutrofil. Celah antara sel endotel pembuluh darah dilewati dengan cara diapedesis. Jadi walaupun ukuran celahnya jauh lebih kecil daripada besarnya sel, pada suatu ketika sebagian kecil sel tersebut meluncur dan berkonstriksi sesuai dengan ukuran celah tersebut. Kemudian selanjutnya neutrofil bergerak melalui jaringan dengan gerakan ameboid. Beberapa sel dapat bergerak dengan kecepatan sebesar 40 $\mu\text{m}/\text{menit}$, beberapa kali panjangnya sendiri tiap menit (Guyton dan Hall, 1997).

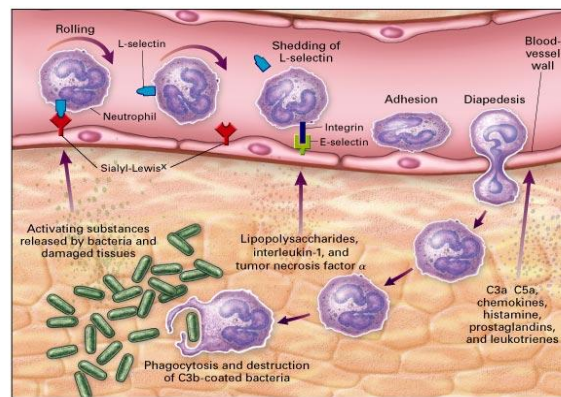
Neutrofil menuju jaringan terinfeksi dengan cara merangkak dan diarahkan oleh suatu kemotaktik faktor (kemoatraktan) sehingga neutrofil akan bergerak ke arah konsentrasi kemoatraktan lebih tinggi. Kemoatraktan yang mengarahkan gerak neutrofil antara lain adalah produk bakterial, *formil-methionil-leucocil-protein (F-MLP)*, lektin, komplemen C5a, kalikrein dan faktor Hageman (Ferencik. 1993). Sejumlah zat kimia dalam jaringan menyebabkan leukosit bergerak mendekati atau menjauhi sumber zat kimia. Fenomena ini dikenal sebagai hasil kemotaksis. Hasil-hasil degenerasi jaringan yang meradang khususnya jaringan polisakarida dan salah satu hasil reaksi zat-zat kompleks yang dinamakan komplemen dapat menyebabkan

neutrofil bergerak mendekati daerah peradangan. Selain itu sejumlah toksin bakteri dapat menyebabkan kemotaksis leukosit (Guyton dan Hall, 1997).

Kemotaksis tergantung dari adanya gradien konsentrasi zat kemotaksis. Konsentrasi paling besar tergantung pada sumber dan waktu zat menyebar dengan difusi menjauhi sumbernya, konsentrasinya berkurang sebanding jarak kuadrat. Pada sisi sel yang menjauhi zat kemotaktik, konsentrasinya lebih sedikit daripada tempat yang menuju sumber. Konsentrasi yang tersebar pada salah satu sisi menyebabkan pseudopodi menonjol ke arah sumber dari zat kemotoksik (Guyton dan Hall, 1997).

Setelah berada di lokasi di mana bakteri tersebut berada, akan terjadi perlekatan antara bakteri dengan neutrofil. Perlekatan tersebut dipermudah oleh proses opsonisasi, sehingga opsonin yang mengikat bakteri mudah melekat pada reseptornya di membran neutrofil. Setelah melekat, neutrofil akan membentuk pseudopodia yang dijulurkan di sekitar bakteri, mengelilingi bakteri dan berfusi membentuk vesikel vakuola fagosom. Membran yang menyelimuti bakteri, sedikit demi sedikit menjauh dari permukaan membran dan fagosom dimasukkan ke dalam sel. Bakteri yang berada dalam fagosom selanjutnya dibunuh oleh mekanisme bakterisidal (Ferencik, 1993; Bellanti, 1994). Fungsi neutrofil yang paling penting adalah fungsi fagositosis. Sebenarnya fagositosis harus memilih zat yang akan difagosit, karena bila tidak, sebagian dari struktur tubuh sendiri akan dimakan. Sebuah sel neutrofil dapat memfagosit 5-20 bakteri sebelum sel neutrofil itu sendiri menjadi inaktif dan mati.

Keberhasilan proses fagositosis dipengaruhi oleh faktor neutrofil, bakteri yang difagosit dan lingkungan. Faktor neutrofil yakni umur sel, energi yang tersedia, integritas komponen seluler serta faktor kemotaktik. Faktor bakteri yang difagosit meliputi susunan dinding bakteri, kapsul, toksin dan sifat permukaan bakteri. Faktor lingkungan yang mempengaruhi proses fagositosis adalah temperatur, pH, osmolaritas, komposisi ionik dan tegangan antar permukaan (Wahyuningsih, 2009).



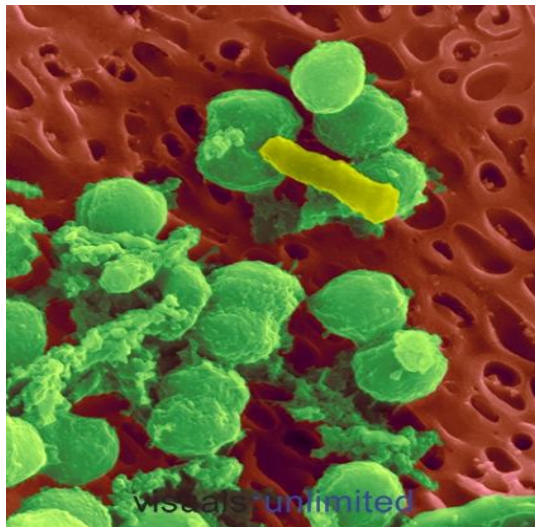
Gambar 2.6 Neutrofil pada radang akut (Nathael, 2004)

2.4 *Streptococcus mutans*

2.4.1 Taksonomi *S. mutans*

Nama *Streptococcus mutans* diberikan untuk membedakan bakteri yang menyerang manusia secara oral selain itu yaitu *Streptococcus sobrinus*. *S. mutans* merupakan anggota dari Grup *Streptococcus viridians*. Klasifikasi terbaru tentang bakteri oral menunjukkan bahwa *S. mutans* merupakan salah satu dari empat kelompok *Streptococcus* oral selain *Streptococcus anginosus*, *mistis* dan *salivarius*. Klasifikasi ini didasarkan pada data kemotaksonomi dan genotipik (Whiley dan Beighton, 1998). Adapun tatanama atau klasifikasi dari *S. mutans* menurut Bergey dalam Capuccino (1998) adalah :

Kingdom : Monera
 Divisio : Firmicutes
 Class : Bacilli
 Order : Lactobacilalles
 Family : Streptococcaceae
 Genus : Streptococcus
 Species : *Streptococcus mutans*
 (Nugraha, 2007)



Gambar 2.7 Gambaran mikroskopis koloni *S. mutans* pada epitel lidah (Kunkel, 2010)

2.4.2 Morfologi dan Habitat *S. mutans*

S. mutans telah diisolasi dari rongga mulut dan sejumlah hewan percobaan termasuk tikus dan rongga mulut manusia (Nolte, 1982). *S. mutans* merupakan bakteri gram positif, bersifat nonmotil (tidak bergerak) dan merupakan bakteri anaerob fakultatif. *S. mutans* memiliki bentuk kokus yang sendirian berbentuk bulat atau bulat telur dan tersusun dalam rantai. Bakteri ini tumbuh secara optimal pada suhu sekitar 18⁰ -40⁰ Celsius (Nugraha, 2007).

S. mutans dominan dalam proses terjadinya karies (Bachtiar, 1997). *S. mutans* memiliki berbagai unsur antigenik di dalam dinding selnya, seperti misalnya antigen protein, polisakarida spesifik, peptidoglikan, dan asam lipoterikoat. Antigen-antigen tersebut menentukan imunogenitas *S. mutans*. Secara serologis *S. mutans* dapat dibedakan menjadi 8 serotipe berdasarkan spesifitas karbohidrat pada dinding selnya yaitu serotipe a yang disebut *S. cricetus*, serotipe b yang disebut *S. ratius*, Serotipe c, e, dan f yang disebut *S. mutans*, serotipe d dan g yang disebut *S. cobrinus*, serotipe h yang disebut *S. downer*. Semua serotipe *S. mutans* kecuali *S. ratius* mengekspresikan *major cell surface-associated* protein yang disebut antigen I atau antigen II, antigen

B, Streptococcus protein A atau antigen *S. mutans* serotipe c dan *Streptococcus cobrinus* yang disebut *S. mutans* serotipe g sebagai agen etiologi karies yang utama.

Dinding sel *S. mutans* terdiri dari 6,8 % protein, 8,9 asam *tricoicid gliserol*, 3,3,6 nonpeptidonglikan polisakarida dan 4,9,9 peptidonglikan. Spesies ini mengandung antigen yang telah diberi nama melalui komponen besarnya antigen minornya dimana sangat mudah ditunjukkan dengan teknik *microplate* daripada dengan metode biasanya yaitu imunoelektroniforetik (Nolte, 1982).

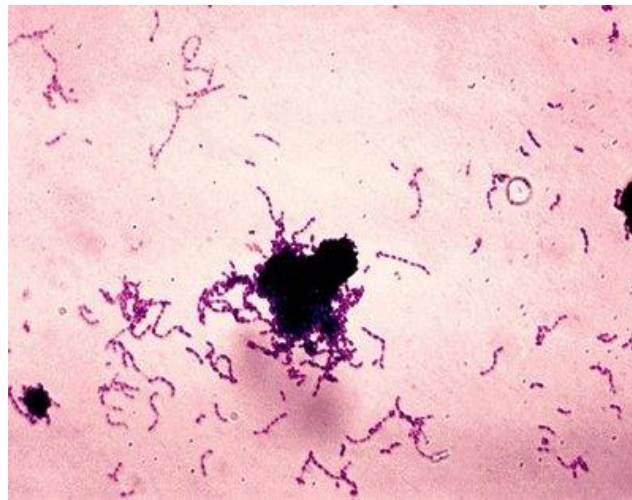
Habitat utama *S. mutans* adalah permukaan gigi namun bakteri ini tidak dapat tumbuh secara bersama ke seluruh permukaan gigi melainkan *S. mutans* sering tumbuh pada area tertentu pada permukaan gigi. Biasanya kita dapat menemukan koloni *S. mutans* dalam pit dan fisur, permukaan oklusal, area proksimal permukaan gigi, gingiva atau pada lesi karies gigi. Jumlah populasi *S. mutans* dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain diet sukrosa, topikal aplikasi fluor, penggunaan antibiotik, obat kumur yang mengandung antiseptik dan keadaan higienis oral (Jamilah, 2010).

Jumlah *S. mutans* di dalam plak gigi dan air liur sangat bervariasi, jumlah ini dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti diet, sukrosa, pemberian fluor secara topikal, dan pemakaian antibiotik. Derajat infeksi *S. mutans* dipengaruhi jumlah *S. mutans* baik komposisi maupun jumlah aliran dan interaksi antarmikro-organisme di dalam plak (Newbrun, 1989 dalam Roeslan, 1990). Kadar *S. mutans* dalam air liur berkisar 10⁶ sampai 10⁷ CFU (*Colony Forming Unit*) per ml (Febriana, 2006).

Michalek dan Mc Ghee (1996) serta Nolte (1982) menyatakan bahwa media selektif untuk pertumbuhan *S. mutans* adalah agar *Mitis Salivarius*, yang menghambat kebanyakan bakteri mulut lainnya kecuali *Streptococcus*. Penghambatan pertumbuhan bakteri mulut lainnya pada agar *Mitis Salivarius* disebabkan karena kadar biru *trypan*. Di samping itu, media ini juga mengandung membran violet, telurit dan sukrosa berkadar tinggi. *S. mutans* yang tumbuh pada agar *Mitis Salivarius* memperlihatkan bentuk koloni halus berdiameter 0,5 – 1,5 mm, cembung, berwarna biru tua dan pada pinggiran koloni kasar serta berair membentuk genangan di sekitarnya (Michalek dan Mc Ghee, 1996).

S. mutans tumbuh dalam suasana fakultatif anaerob (Lehner, 1995; Michalek dan Mc Ghee, 1996). Menurut Nolte (1982) dalam keadaan anaerob, bakteri ini memerlukan 5% CO₂ dan 95% nitrogen serta memerlukan membran sebagai sumber nitrogen agar dapat bertahan hidup dalam lapisan plak yang tebal (Pratama, 2005). *S. mutans* hidup di rongga mulut pada permukaan yang keras dan solid seperti gigi, gigi tiruan, dan alat orthodonti cekat. Bakteri ini juga ditemukan dalam luka gigitan.

Pertumbuhan *S. mutans* cenderung menjadi kurang subur pada perbenihan padat atau kaldu, kecuali diperkaya darah atau cairan jaringan. Kebanyakan *S. mutans* tumbuh dalam media padat sebagai koloni *discoïd* (Jawetz, et al, 1991). Media lain yang dapat dipakai untuk menumbuhkan *S. mutans* adalah *Brain Heart Infusion Broth (BHIB)*, *Trypton Yeast Cystein (TYC)* dan agar darah (Sukanto dkk, 2003).



Gambar 2.8 Gambaran mikroskopis koloni *S. mutans* (Todar, 2009)

2.4.3 Patogenesis *S. mutans*

Karies gigi adalah satu kerusakan gigi yang dimulai dari permukaan gigi dan berkembang ke arah dalam. Mula-mula permukaan email yang keseluruhannya non-selular mengalami demineralisasi. Hal ini terjadi akibat pengaruh asam hasil peragian bakteri. Dekomposisi dentin dan sementum yang terjadi selanjutnya akan meliputi pencernaan matriks protein oleh bakteri. Langkah pertama yang penting dalam karies

adalah pembentukan plak pada permukaan email yang keras dan halus. Plak ini terdiri dari endapan gelatin dari glukon yang mempunyai berat molekul besar, di sini bakteri penghasil asam melekat pada email polimer karbohidrat (glukan) terutama dihasilkan oleh *Streptococcus* (*S. mutans*, *Peptostreptococcus*) yang mungkin bekerja sama dengan *Actinomyces* (Mars dan Martin, 1999).

Teori *chemicoparasitic* Miller tahun 1980 menunjukkan bahwa bakteri rongga mulut dapat mengubah karbohidrat menjadi asam yang kemudian melarutkan kalsium fosfat pada email sehingga menghasilkan lesi karies. Walaupun Clarke mengisolasi organisme yang kemudian disebut *S. mutans* dari lesi karies manusia pada tahun 1984, bukti nyata dalam *S. mutans* bersifat kariogenik baru ada pada tahun 1950 dan 1960 dimana terdapat eksperimen percobaan bebas kuman (Mars dan Martin, 1999).

S. mutans bekerja secara patogen, yang dibutuhkan pada keadaan kerusakan email dari gigi hasil fermentasi asam dalam perkembangan karies gigi. Sehingga mengakibatkan invasi pada dentin oleh mikroorganisme dan pada organisme akhirnya menyebabkan infeksi pulpa. Selain itu *S. mutans* dapat merusak tulang periapikal, ketika diinokulasikan ke dalam lapisan gigi dan pada organisme yang sama diisolasi dalam darah selama 21 hari setelah inokulasi. Pembentukan pusat infeksi pada apeks gigi yang mengandung *S. mutans* mungkin merupakan suatu masalah yang serius. Sejak itu antigen yang bereaksi secara berlawanan dengan jaringan hati yang ditemukan pada beberapa bibit kuman (Nolte, 1982). *S. mutans* bersifat asidogenik yaitu menghasilkan asam, asidodurik, mampu tinggal pada lingkungan asam, dan menghasilkan suatu polisakarida yang lengket disebut *dextran*. Oleh karena kemampuan ini, *S. mutans* bisa menyebabkan lengket dan mendukung bakteri lain menuju ke email gigi, lengket mendukung bakteri-bakteri lain, pertumbuhan bakteri asidodurik yang lainnya, dan asam melarutkan email gigi (Nugraha, 2007).

S. mutans menghasilkan dua enzim, yaitu glikosiltransferase dan fruktosiltransferase. Enzim-enzim ini bersifat spesifik untuk substrat sukrosa yang digunakan untuk sintesa glukon dan fruktan. Pada metabolisme karbohidrat, enzim glikosiltransferase menggunakan sukrosa untuk mensintesa molekul glukosa dengan

berat molekul tinggi yang terdiri dari ikatan glukosa alfa (1-6) dan alfa (1-3) (Michalek dan Mc Ghee, 1982). Ikatan glukosa alfa (1-3) bersifat pekat seperti lumpur, lengket dan tidak larut dalam air. Kelarutan ikatan glukosa alfa (1-3) dalam air sangat berpengaruh terhadap pembentukan koloni *S. mutans* pada permukaan gigi. Ikatan glukosa alfa (1-3) berfungsi pada perlekatan dalam kaitannya dengan pembentukan plak dan terjadinya karies gigi (Roeslan, 1996).

Protein antigen yang dianggap berperan dalam adherensi *S. mutans* adalah I/II yang berasal dari *S. mutans* serotipe c. Protein tersebut dianggap sebagai reseptor untuk aglutinin saliva. Selain protein yang berfungsi sebagai molekul adhesi atau reseptor, pada dinding *S. mutans* terdapat protein lain yang berfungsi sebagai enzim, yaitu glukosiltransferase yang mengubah sukrosa menjadi glukanan (Bachtiar, 1997).

Peningkatan kolonisasi terjadi karena agregasi bakteri melalui tiga dasar interaksi sel. Interaksi yang terjadi meliputi perlekatan bakteri pada permukaan gigi, perlekatan homotipik antar sel yang sama, dan perlekatan heterotipik antar sel yang berbeda. Dekstran dengan ikatan α (1 \rightarrow 3) juga bertindak sebagai mediator agregasi antara *S. mutans*, *S. sanguis* dan *A. viscosus*. Oleh karena itu dekstran yang pembentukannya dikatalisis oleh *glukosyltransferase* yang merupakan ekspresi esensial dari virulensi *S. mutans* (Roeslan, 1996).

S. mutans pada plak memetabolisme sukrosa menjadi asam lebih cepat daripada bakteri lain di dalam agregasi. Koloni *S. mutans* ditutupi oleh *glucans* atau dekstran yang dapat mengurangi perlindungan dan aktifitas anti bakteri pada saliva terhadap plak gigi. Plak dapat menghambat difusi asam ke saliva dan sebagai hasil konsentrasi asam menjadi tinggi di permukaan enamel. Kemudian seiring dengan produksi asam meningkat dan reaksi dalam rongga mulut menjadi asam dan kondisi ini akan membuat demineralisasi gigi terus berlanjut yang merupakan proses awal terjadinya karies. Ikatan glukosa alfa (1-3) berfungsi pada perlekatan dan peningkatan koloni bakteri ini dalam pembentukan plak dan terjadinya karies gigi. (Roeslan, 1996).

2.4.4 *S. mutans* dalam Darah

S. mutans mengakibatkan peradangan dengan cara melepaskan racun eksotoksin ke dalam tubuh. Inflamasi bertujuan untuk mengisolasi, menghancurkan, dan menonaktifkan benda asing yang masuk. Selain itu, inflamasi berfungsi sebagai pembuangan debris (jaringan yang telah mati atau sisa benda asing), perbaikan jaringan dan penyembuhan penyakit.

Apabila lesi karies sudah mencapai pulpa, maka akses untuk masuk ke dalam pembuluh darah akan lebih mudah lagi, akibatnya terjadi inflamasi. Adanya trauma, misalnya ketika menyikat gigi dan mengunyah makanan, dapat mendorong *S. mutans* masuk ke dalam darah (Slovkin, 2001; Juarez dan Stindon, 1999; Stinson, Alder dan Kumar, 2003; Vojdani, 2003 dalam Purwanto). Herzberg dan Mayer dalam Purwanto menyatakan bahwa bakteri ini masuk ke sirkulasi paling tidak 40% ketika menyikat gigi, 60% setelah dicabut gigi dan 88% setelah bedah periodontal.

Selain aksesnya mudah, beberapa peneliti membuktikan bahwa mikroba ini bisa menjalankan aktivitasnya di daerah tertentu pada dinding vasa. Vojdani (2003) menyatakan bahwa di antara berbagai mikroba oral, *S. mutans* paling sering ditemukan di dalam darah. Vojdani (2003) juga melaporkan bahwa pada individu dengan hygiene mulut buruk, konsentrasi *S. mutans* di dalam darah bisa mencapai 10 kali lipat atau lebih pada kondisi bakteremia asimtomatik.

Bibit kuman dari *S. mutans* yang diisolasi dari plak gigi tidak dapat dibedakan dari bibit kuman yang diisolasi dalam darah. Bakteremia yang mengikuti ekstraksi gigi menghasikan *S. mutans* dalam sedikit kejadian, tapi perbandingan isolasi dari darah pasien dengan bakteri endokarsitis sesuai dengan deskripsi spesies untuk *S. mutans*. Bakteri endokarditis dihasilkan dari *S. mutans* yang telah diketahui setelah ekstraksi gigi, termasuk yang dilakukan oleh pasien dengan persoalan ketidak cukupan katup mitral pada pembersihan gigi di bawah kulit entromisin. Isolasi organisme dari bahan percobaan klinik mungkin sulit dari dalam kenyataannya bakteri endokarditis mungkin membutuhkan inkubasi dalam kultur air daging darah yang lazim (konvensional) selama enam hari (Nolte, 1982).

2.6 Hipotesis

Berdasarkan tinjauan pustaka dapat ditarik hipotesis sebagai berikut:

- a. Indeks adhesi akan menurun setelah neutrofil yang dipapar dengan *S. mutans* diberi ekstrak daun beluntas konsentrasi 100%, 75%, 50% dan 25%.
- b. Ekstrak daun beluntas yang efektif untuk menurunkan indeks adhesi neutrofil yang dipapar *S. mutans* adalah ekstrak dengan konsentrasi 100%.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah jenis penelitian eksperimental laboratoris. Dipilih karena baik pada sampel maupun pada perlakuan terkendali, terukur dan pengaruh perlakuan dipercaya. Adapun rancangan pada penelitian ini adalah penelitian dengan kelompok kontrol (*The Post Test Only Control Group Design* (Notoatmojo, 2005)).

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

3.2.1 Waktu Penelitian

Pelaksanaan penelitian dilakukan pada bulan September 2011.

3.2.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Bagian Biomedik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, Bagian Taksonomi Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Jember dan Laboratorium *Bioscience* Rumah Sakit Gigi dan Mulut Universitas Jember.

3.3 Identifikasi Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak daun beluntas dengan konsentrasi 25%, 50%, 75% dan 100%.

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah indeks adhesi *Streptococcus mutans* yang melekat pada neutrofil.

3.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah kriteria sampel penelitian, media pembiakan *S. mutans* dan teknik penghitungan indeks adhesi *S. mutans* pada neutrofil.

3.4 Definisi Operasional Penelitian

3.4.1 Ekstrak Daun Beluntas

Bahan tumbuhan yang digunakan adalah daun beluntas (*Pluchea indica* Less.). Pengambilan cuplikan dipilih daun yang sehat dan cukup tua. Daun dicuci dengan air mengalir, dikeringkan, dihaluskan, kemudian diekstraksi. Pelarut yang digunakan adalah etanol 97% (Ferdian, 2008). Konsentrasi yang akan dipergunakan adalah ekstrak dengan konsentrasi ekstrak 25%, 50%, 75% dan 100%.

3.4.2 Neutrofil

Neutrofil diambil dari darah vena perifer orang sehat (tidak memiliki kelainan sistemik). Isolasi neutrofil dilakukan dengan teknik *gradient density* menggunakan *Histopaque-1077* (Sigma) (Salasia, dkk. 1995; Susanti, 2000).

3.4.1 *S. mutans*

S. mutans merupakan bakteri gram positif, bersifat nonmotil (tidak bergerak) serta merupakan bakteri anaerob fakultatif. Memiliki bentuk kokus yang sendirian berbentuk bulat atau bulat telur serta tersusun dalam rantai. *S. mutans* yang dipakai adalah ATCC *strain* nomor 2517.

3.4.3 Indeks Adhesi

Parameter ditentukan sesuai dengan penelitian Susanti (2000) yaitu indeks adhesi diukur dengan menghitung rata-rata jumlah bakteri terfagositosis per-neutrofil. Dari uji adhesi diperoleh nilai indeks adhesi yaitu banyaknya bakteri yang melekat pada suatu sel dihitung sampai satuan sel dan dibuat rata-ratanya. Pada penelitian ini

digunakan penghitungan indeks adhesi yaitu banyaknya *Streptococcus mutans* yang melekat pada neutrofil dihitung pada sebuah sel neutrofil baik kelompok kontrol maupun kelompok yang diberi perlakuan ekstrak, kemudian dibandingkan.

3.5 Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan sampel berupa neutrofil yang diisolasi dari neutrofil darah orang sehat (tidak memiliki penyakit sistemik).

3.6 Alat dan Bahan

3.6.1 Bahan

1. Biakan *S. mutans*
2. Aquadest steril
3. Darah vena perifer
4. Heparin
5. Ficoll hypaque gradient
6. Penstrip
7. RPMI
8. RBC lysing buffer
9. Alkohol
10. Minyak emersi
11. Trypan blue
12. Ethanol (Merck)
13. Air suling
14. Kloroform
15. Amil alkohol (Merck)
16. Daun beluntas

3.6.2 Alat

- | | |
|---|-----------------------------------|
| 1. Petridis kecil | 15. Blender |
| 2. Tabung reaksi | 16. Syringe |
| 3. Labu ukur | 17. Mikroplate <i>six well</i> |
| 4. <i>Becker glass</i> | 18. Kaca obyektif |
| 5. Tabung elenmeyer | 19. <i>Coverglass</i> |
| 6. <i>Centrifuge</i> (Hettich, Germany) | 20. Mikroskop |
| 7. Timbangan atau neraca | 21. Rak objek glass |
| 8. <i>Laminar flow</i> | 22. <i>Hemocytometer</i> |
| 9. Inkubator | 23. <i>Vortex</i> |
| 10. <i>Desicator</i> | 24. Pipet mikro |
| 11. Oven | 25. Alat ekstraksi <i>Soxhlet</i> |
| 12. <i>Autoclave</i> | 26. Pisau / gunting |
| 13. Lampu spiritus | 27. Corong |
| 14. Jangka sorong | |

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Preparasi Ekstrak Daun Beluntas

Pertama dilakukan pengambilan cuplikan daun yang sehat dan cukup tua. Kemudian daun beluntas dicuci bersih lalu diangin-anginkan tanpa pemaparan langsung dari sinar matahari kira-kira 2-3 hari. Setelah didapatkan daun yang kering kemudian diblender sampai didapatkan bubuk daun beluntas yang halus. Setelah itu serbuk daun beluntas ditambah ethanol 96% dan diaduk selama 30 menit. Kemudian ditunggu selama 24 jam di atas shaker. Setelah 24 jam, larutan kemudian disaring dan penyaringan digunakan sebanyak 3 kali pada tabung penyaring vakum. Filtrat yang didapatkan kemudian diuapkan dengan penguap putar (*Rotary Vacuum Evaporator*) pada suhu 70⁰. Kemudian dihasilkan ekstrak kental dan dituang dalam cawan porselen. Selanjutnya dipanaskan dengan pemanas *waterbath* sambil terus diaduk (penyusutan berat basah dan berat kering adalah sekitar 13,57%) dan menyesuaikan

konsentrasi yang akan dicari yakni 25%, 50%, 75% dan 100% dengan diencerkan menggunakan akuades.

3.7.2 Preparasi *S. mutans*

Pertama dilakukan pengambilan solat *S. mutans* yang diambil dari *S. mutans* ATCC Strain 2517 kemudian dilakukan penanaman pada media spesifik TYC Selanjutnya kemurnian dipastikan dengan membuat preparat menggunakan pewarnaan Gram untuk melihat bentuk koloninya. Selanjutnya *S. mutans* stok dikultur dengan medium BHIB selama 2 X 24 jam dan diatur agar konsentrasi *S. mutans* menjadi 1×10^9 per ml. Resuspensi menggunakan akuades steril dengan densitas 0,5 Mc. Farland. Suspensi yang dibutuhkan sebanyak 500 μ L untuk 10 kelompok (masing masing kelompok 50 μ L).

3.7.3 Isolasi Neutrofil

Untuk isolasi neutrofil diawali dengan pengambilan darah peripoherial orang sehat sebanyak 6 cc kemudian dicampur dengan antikoagulan (heparin). 6 cc darah (*heparide wholeblood*) dibagi menjadi 2 tabung, kemudian diencerkan dengan HBSS dengan perbandingan 1:2. Selanjutnya dilapiskan secara hati-hati pada *ficoll* dengan pipet mikro. Disentrifuge selama 30 menit, 1400 rpm, RT sehingga terbentuk 4 lapisan. Lapisan terbawah mengandung neutrofil dicampur dengan RBC, dipisahkan dan dimasukkan ke dalam tabung falcon. Kemudian ditambahkan dengan dekstran dan dibiarkan selama 90 menit, RT, agar RBC turun. Supranatan mengandung neutrofil diaspirasi dan diencerkan dengan HBSS (1:2), disentrifuge 1700 rpm selama 10 menit. Pelet neutrofil divortex, bila masih ada RBC, ditambahkan NH_4Cl *lysing buffer*, diencerkan dengan HBSS, dan dicuci 2 kali. Selanjutnya resuspensi dalam 500 μ l HBSS sehingga didapatkan resuspensi PMN. Selanjutnya adalah menyiapkan 500 μ l suspensi neutrofil dalam HBSS (masing masing kelompok 50 μ L).

3.7.4 Perlakuan Uji Indeks Adhesi

Pertama kali disiapkan 10 *coverslip* dan 10 *cover glass* yang telah dibersihkan dengan asam diletakkan dalam 10 petridis kecil. Ekstrak beluntas diberikan terhadap 8 dari 10 petridis kecil sebanyak masing-masing 50 μ L. Dua petridis kecil diberikan ekstrak dengan konsentrasi 25%, dua petridis kecil diberikan ekstrak dengan konsentrasi 50% dan dua petridis kecil selanjutnya diberikan ekstrak dengan konsentrasi 75% serta dua petridis kecil selanjutnya diberikan ekstrak dengan konsentrasi 100%. Untuk petridis kecil dua sisanya tidak diberi ekstrak dan berfungsi sebagai kontrol. Neutrofil kemudian ditapiskan pada masing masing *coverslip* (@100 μ l) kemudian diinkubasi selama 15 menit, 37⁰C dan 5% CO₂. Neutrofil dicuci 2 kali dan diresuspensi dengan 800 μ l suspensi HBBS, kemudian diinkubasi selama 15 jam 37 derajat celcius dalam 5% CO₂. Selanjutnya ditambahkan 200 μ l suspense *S. mutans* (dalam media kultur) 2×10^9 sel/ml dan diinkubasikan selama 15 jam 37⁰C, 5% CO₂. Selanjutnya dengan membuang medium inkubasi dan sel dicuci 3 x dengan HBSS kemudian difiksasi dan dicat dengan *Giemza*. Hasil preparat yang sudah dicat dengan *Giemza*, diamati dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x, terlebih dahulu mengamati jumlah *S. mutans* yang menempel pada neutrofil pada perlakuan kontrol. Kemudian dilanjutkan dengan mengamati indeks adhesi dengan konsentrasi yang berturut-turut, mulai dari 25% sampai 100% dan dihitung indeks adesinya. Indeks adesi diperoleh dengan menghitung banyaknya bakteri yang melekat pada suatu sel. Untuk neutrofil, dihitung jumlah *S. mutans* pada 100 sel neutrofil menggunakan mikroskop inverted dengan pembesaran 400x untuk kemudian dihitung rata-ratanya.

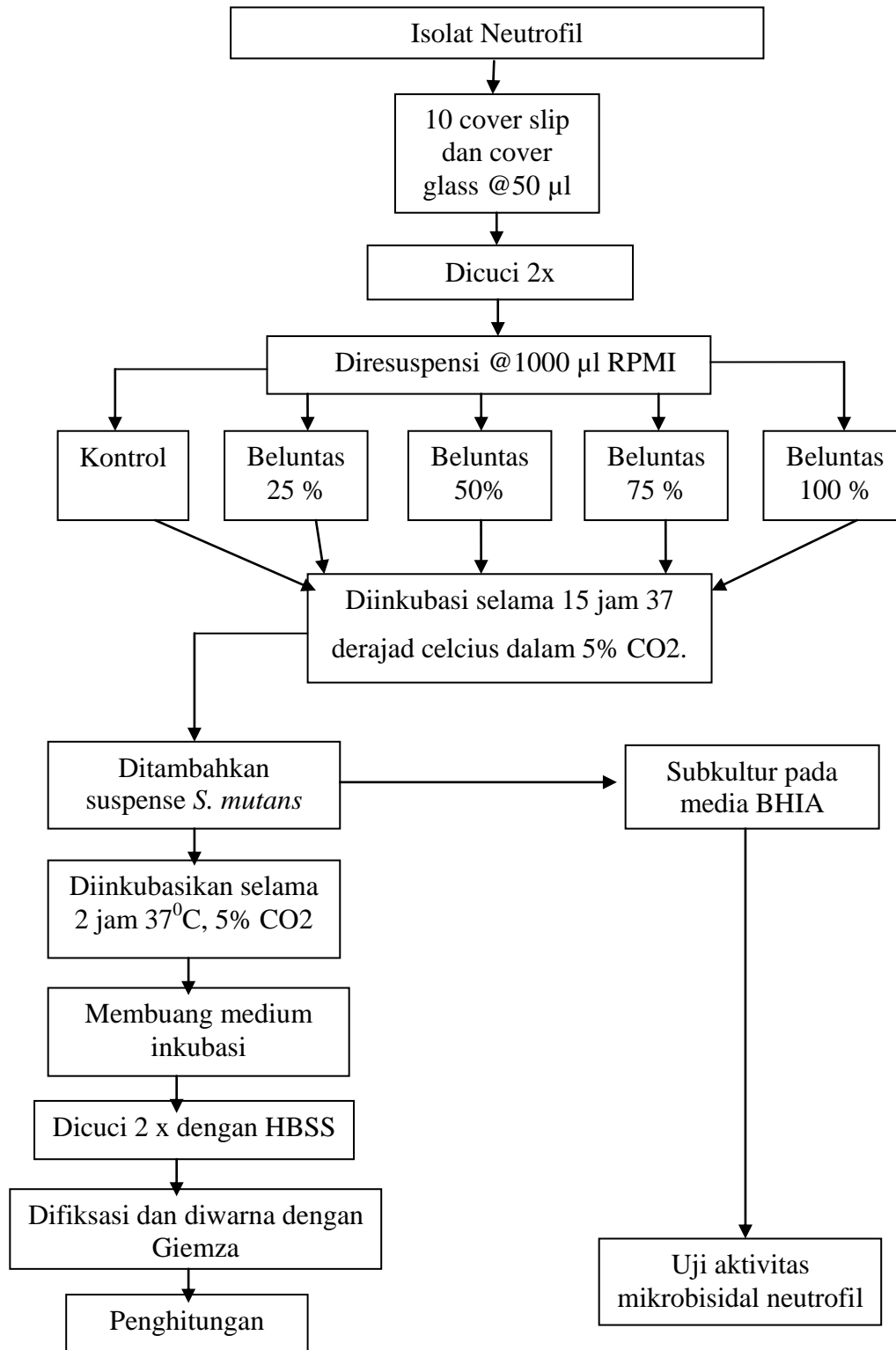
3.7.5 Uji Aktivitas Mikrobisidal Neutrofil

Uji aktivitas mikrobisidal dengan mengambil resuspensi neutrofil baik kontrol maupun yang sudah diberi perlakuan untuk ditanamkan pada media agar BHIA dan selanjutnya diinkubasi selama 2x24 jam pada suhu 37 derajat Celcius.

3.8 Analisis Data

Data dianalisis dengan menggunakan uji statistik parametrik, yaitu *one way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji LSD. Semua uji data menggunakan tingkat kemaknaan 95% ($\alpha=0,05$).

3.9 Alur Penelitian



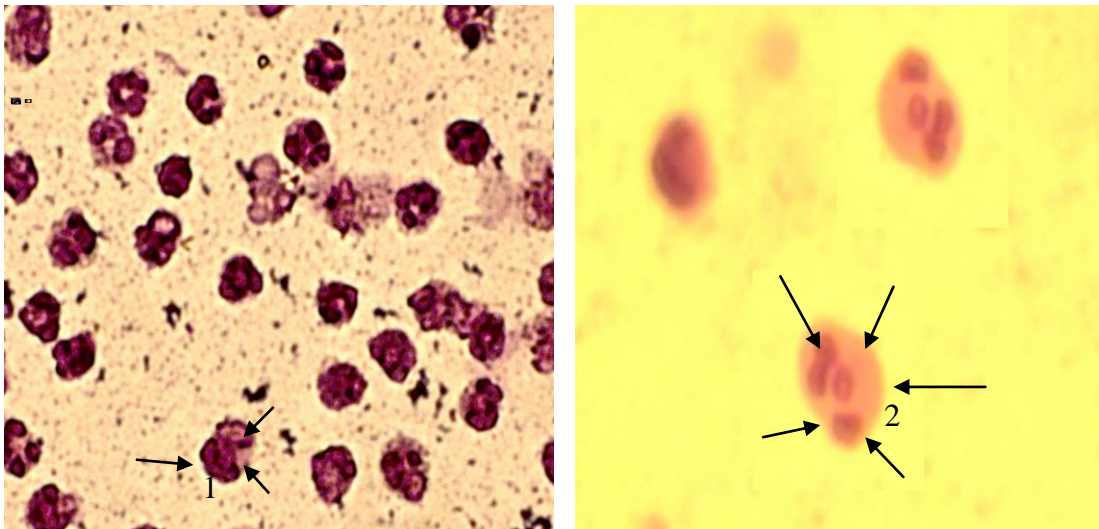
BAB 4. HASIL

4.1 Hasil

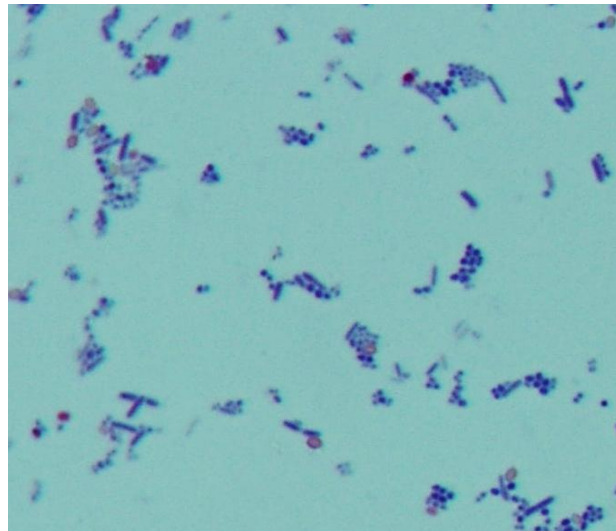
4.1.1 Hasil Isolasi Neutrofil dan Subkultur *Streptococcus mutans*

Penelitian telah dilakukan pada bulan September 2011 di Bagian Biomedik Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium *Bio Science* Rumah Sakit Gigi dan Mulut Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Penelitian ini menggunakan sampel berupa neutrofil yang diisolasi dari darah orang sehat dan tidak merokok.

Tahapan persiapan utama adalah sterilisasi alat dan bahan. Bahan yang harus disiapkan antara lain ekstrak daun beluntas yang telah diencerkan dengan akuades, sediaan *S. mutans* dari hasil subkultur dan isolat neutrofil.



Gambar 4.1 Preparat hapus hasil isolasi neutrofil menunjukkan sel neutrofil yang berwarna keunguan (pengecatan Giemza, pembesaran 400x) (1). Tampak sel dengan lobus yang berjumlah sekitar 2-5 lobus (pengecatan Giemza, pembesaran 1000x) (2).



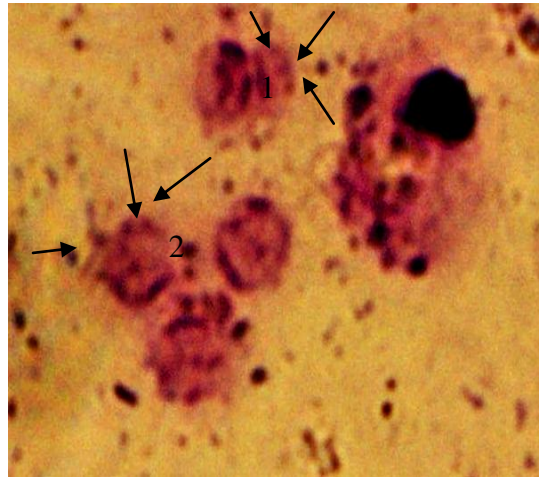
Gambar 4.2 Sediaan *S. mutans* terlihat berwarna biru tua pada pemeriksaan mikroskopik sesuai dengan sifat *S. mutans*, yaitu gram positif berbentuk kokus berpasangan atau berantai (Pengecatan Gram, pembesaran 1000x).

4.1.2 Hasil Indeks Adhesi *S. mutans* Terhadap Neutrofil

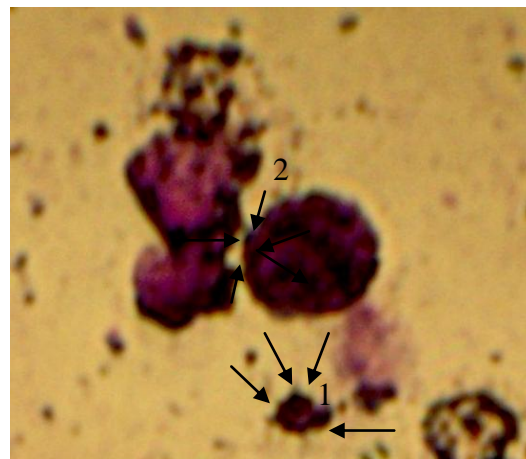
Neutrofil yang telah diisolasi diletakkan pada 10 petridis kecil dan dibagi dalam 5 kelompok. Kelompok (K1) adalah kelompok kontrol yang terdiri dari neutrofil murni yang diberikan media HBSS (*Hank's Buffered Salt Solution*) pada 2 petridis. Kemudian kelompok P (perlakuan) merupakan kelompok isolat neutrofil yang diberi ekstrak daun beluntas. Untuk kelompok P1 diberikan ekstrak daun beluntas 25%, berturut-turut kelompok P2 diberikan ekstrak beluntas 50%, kelompok P3 diberikan ekstrak daun beluntas 75% dan kelompok P4 diberikan ekstrak daun beluntas 100%. Masing-masing perlakuan diletakkan pada 2 petridis. Isolat neutrofil kemudian diinkubasikan di dalam inkubator selama 15 jam setelah diberikan ekstrak daun beluntas. Selanjutnya isolat neutrofil kontrol dan perlakuan dipapar *S. mutans* selama 2 jam dimana setiap jam diamati menggunakan mikroskop *inverted* untuk melihat perlekatan *S. mutans* terhadap neutrofil.

Setelah dilakukan pengecatan Giemza, dilakukan perhitungan indeks adesi. Indeks adesi diperoleh dari menghitung jumlah *S. mutans* yang melekat pada sebuah

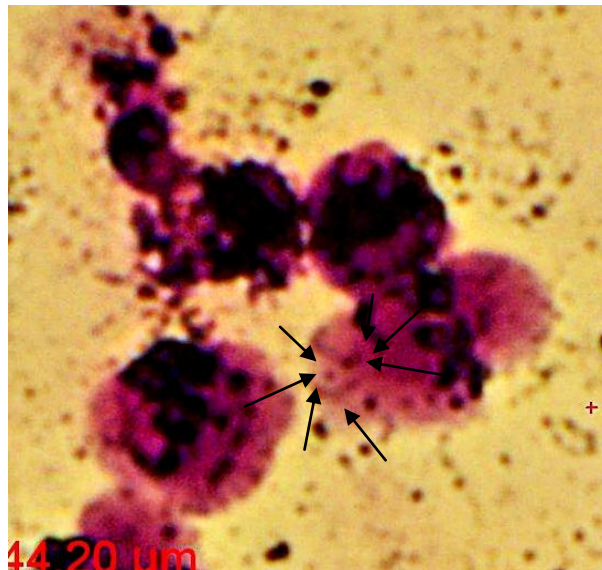
sel neutrofil. Untuk setiap kelompok baik kontrol maupun perlakuan dilakukan penghitungan pada 100 sel neutrofil, kemudian *S. mutans* yang melekat di neutrofil dihitung pada masing-masing sel dan diambil rata-ratanya.



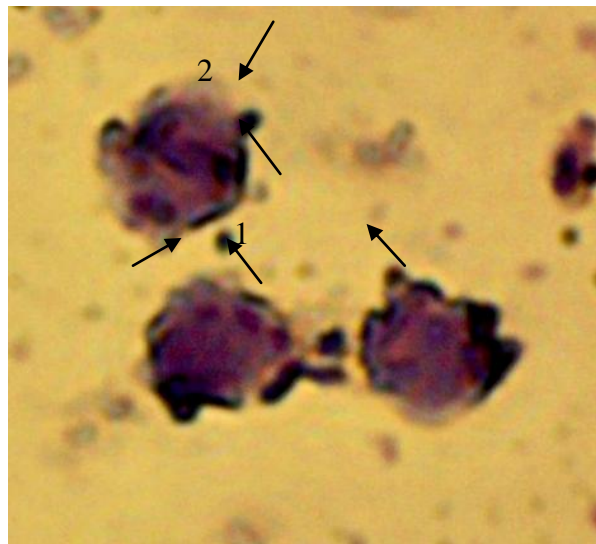
Gambar 4.3 Sel neutrofil yang dipapar *S. mutans* tanpa diinkubasi dengan ekstrak daun beluntas (kelompok kontrol) menunjukkan bahwa membran neutrofil sebagian besar tampak banyak yang rusak atau lisis. Adhesi *S. mutans* ditunjukkan pada panah (2) (pengecatan Giemza, pembesaran 400x).



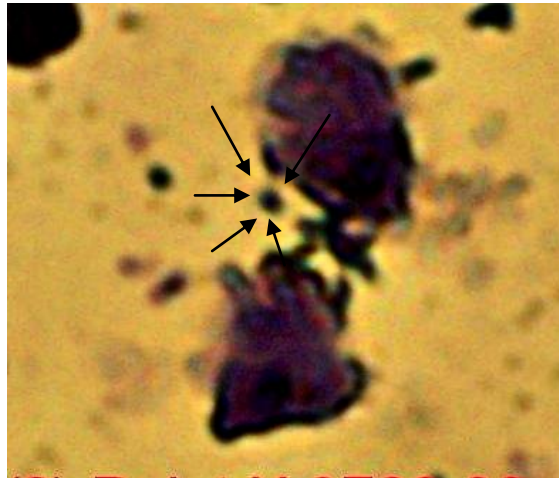
Gambar 4.4 Sel neutrofil yang dipapar *S. mutans* yang diinkubasi dengan ekstrak daun beluntas 25% (kelompok P1) tampak membran sel neutrofil rusak (1). Jumlah bakteri yang cukup banyak tersebar melekat pada sel neutrofil (2) (pengecatan Giemza, pembesaran 400x).



Gambar 4.5 Sel neutrofil yang dipapar *S. mutans* diinkubasi dengan ekstrak 50% (kelompok P2). Tampak bakteri menempel pada membran neutrofil yang ditunjuk oleh panah (Pengecatan Giemza, pembesaran 400x).



Gambar 4.6 Sel neutrofil yang dipapar *S. mutans* diinkubasi dengan ekstrak 75% (kelompok P3) memiliki indeks adesi yang rendah. (Pengecatan Giemza, pembesaran 400x).



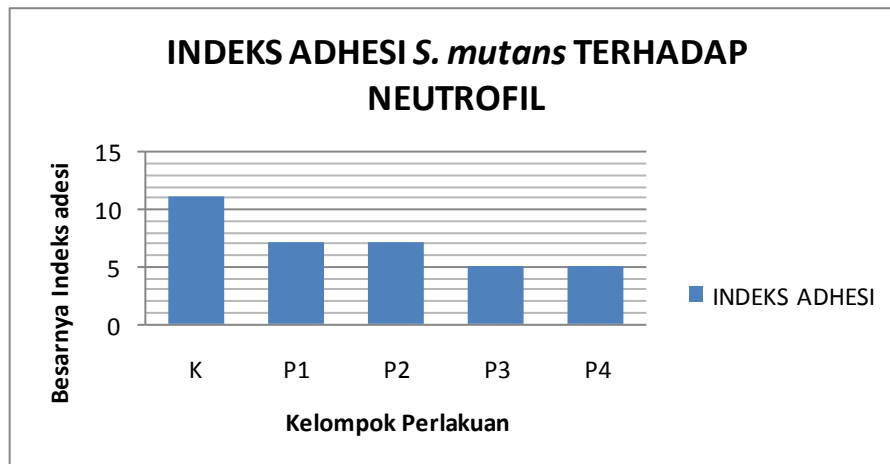
Gambar 4.7 Sel neutrofil yang dipapar *S. mutans* dengan diinkubasi ekstrak 100% (kelompok P4) dimana *S. mutans* yang melekat pada neutrofil memiliki jumlah yang hamper sama dengan inkubasi ekstrak 100% (Pengecatan Giemza, pembesaran 400x).

Hasil pengamatan diperoleh rata-rata jumlah *S. mutans* yang melekat pada neutrofil yang terlampir pada tabel berikut.

Tabel 4.1 Hasil Rata-Rata Penghitungan Indeks Adhesi *S. mutans* terhadap Neutrofil Pada Masing-Masing Kelompok

	Adhesi <i>S. mutans</i> ($\bar{x} \pm SD$)				
	NEUTROFIL + HBSS + <i>S. mutans</i> (KONTROL)	NEUTROFIL + Beluntas 25% + <i>S. mutans</i> (P1)	NEUTROFIL + Beluntas 50% + <i>S. mutans</i> (P2)	NEUTROFIL + Beluntas 75% + <i>S. mutans</i> (P3)	NEUTROFIL + Beluntas 100% + <i>S. mutans</i> (P4)
X	11,25	7,37	7,46	4,83	5,09
±	± 0,17	± 1.07	± 1.07	±0,84	±0,87
SD					

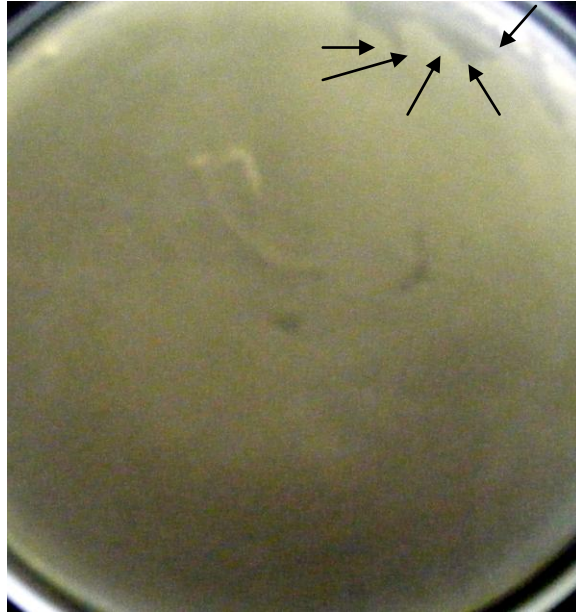
Pada penghitungan yang dilakukan didapatkan rata-rata sebagai berikut. Pada kelompok kontrol (K) didapatkan indeks adesi sebesar 11,25 bakteri per-satuan sel neutrofil. Sedangkan pada P1 didapatkan indeks adesi sebesar 7,36, P2 didapatkan indeks adesi sebesar 7,46, P3 didapatkan indeks adesi sebesar 4,83 dan perlakuan P4 didapatkan indeks adesi sebesar 5,09 setiap satuan sel neutrofil.



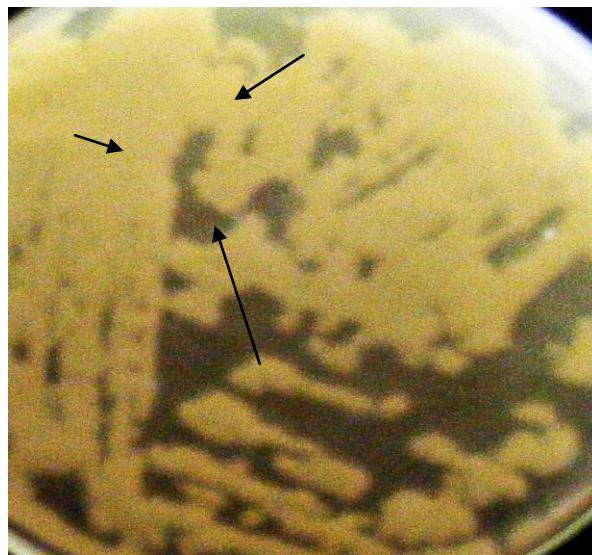
Gambar 4.8 Indeks adhesi *S. mutans* pada neutrofil. K adalah kelompok yang tidak diinkubasi ekstrak daun beluntas. P1 adalah kelompok dengan diinkubasi ekstrak daun beluntas konsentrasi 25%. P2 adalah kelompok dengan diinkubasi ekstrak daun beluntas konsentrasi 50%. P3 adalah kelompok dengan diinkubasi ekstrak daun beluntas konsentrasi 75%. Dan P4 adalah kelompok dengan diinkubasi ekstrak konsentrasi 100%.

4.1.3 Uji Antimikrobisidal Neutrofil

Setelah dilakukan perhitungan indeks adhesi *S. mutans* terhadap neutrofil dilakukan inokulasi *S. mutans* di media agar BHIA. Ternyata didapatkan efek dari ekstrak beluntas selain sebagai antiinflamasi ternyata menambah kemampuan aktivitas mikrobisidal neutrofil terhadap *S. mutans* yang berpengaruh besar terhadap adhesi *S. mutans* terhadap neutrofil. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun beluntas, maka semakin sedikit koloni bakteri yang tumbuh di atas media BHIA. Tanpa adanya inkubasi ekstrak daun beluntas (K), *S. mutans* tumbuh subur pada media agar BHIA. Hanya sedikit area pada media agar yang tidak ditumbuhi *S. mutans*. Berbeda dengan permukaan media agar yang neutrofilnya diinkubasi dengan ekstrak daun beluntas. Permukaan media agar pada neutrofil yang diinkubasi ekstrak dengan konsentrasi 100% hamper tidak ditumbuhi oleh *S. mutans*.



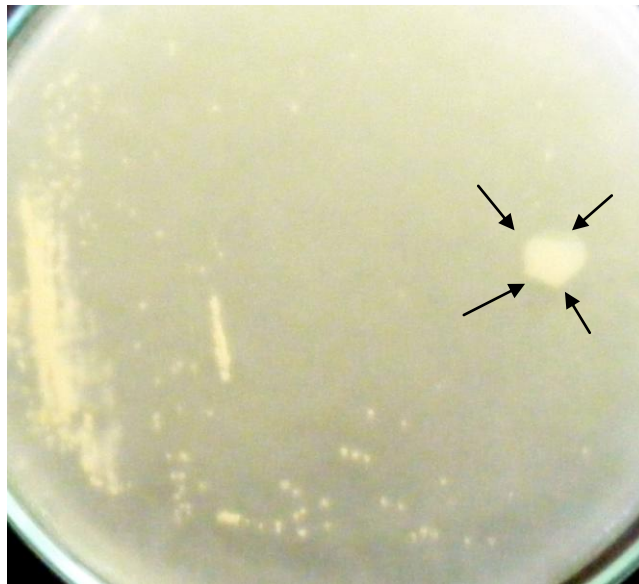
Gambar 4.9 Tanpa inkubasi ekstrak daun beluntas (K), *S. mutans* tumbuh subur pada media agar BHIA. Hanya sedikit area pada media agar yang tidak ditumbuhi *S. mutans* seperti yang ditunjukkan pada panah.



Gambar 4.10 Dengan inkubasi ekstrak daun beluntas 25% (P1), *S. mutans* di agar menyebarkan meliputi media agar, meskipun penyebaran tidak merata, pertumbuhan bakteri banyak memenuhi permukaan agar BHIA. Panah menunjukkan daerah meliputi permukaan media agar diselubungi pertumbuhan padat koloni *S. mutans*.



Gambar 4.11 Dengan inkubasi ekstrak daun beluntas 50% (P2), *S. mutans* mampu tumbuh di permukaan media meskipun sedikit (ditunjukkan pada panah).



Gambar 4.12 Dengan inkubasi ekstrak daun beluntas 75% (P3), *S. mutans* tumbuh sedikit di media BHIA. Tampak pertumbuhan *S. mutans* berukuran kecil pada agar.



Gambar 4.13 Dengan inkubasi ekstrak daun beluntas 100% (P4), media ditumbuh koloni *S. mutans* paling sedikit. Tampak hampir tidak ada *S. mutans* tumbuh di permukaan media agar BHIA.

4.2 Analisis data

4.2.1 Uji Normalitas (*One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test*)

Data dilakukan uji normalitas *One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test* untuk mengetahui apakah sampel penelitian terdistribusi normal atau tidak, data selengkapnya dapat dilihat pada lampiran. Uji normalitas menunjukkan bahwa signifikansi indeks adhesi *S. mutans* terhadap neutrofil pada seluruh sampel lebih besar dari 0,05 ($p > 0,734$). Berarti data penelitian yang diperoleh pada masing-masing kelompok berdistribusi normal.

4.2.2 Uji Perbedaan (*One Way ANOVA Test*)

Uji selanjutnya adalah uji *One Way ANOVA* untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang bermakna pada kelompok kontrol K1, kelompok yang dipapar P1, P2, P3 sampai P4. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa nilai signifikansi lebih

kecil dari 0,05 ($p < 0,004$) yang menunjukkan perbedaan indeks adhesi yang signifikan pada kelima kelompok penelitian.

4.2.3 Uji *Least Significant Different (LSD) Test*

Setelah dilakukan uji *ANOVA* diketahui adanya perbedaan yang bermakna antar kelompok. Untuk mengetahui tingkat perbedaan yang bermakna antar kelompok kontrol K1, kelompok P1, P2, P3 dan P4 maka dilanjutkan dengan uji *LSD* derajat kemaknaan 95% ($p \geq 0,05$) yang ditunjukkan pada tabel 4.2 dan table 4.3. Tabel 4.2 menunjukkan perbedaan antara kelompok kontrol dengan semua kelompok perlakuan. Sedangkan tabel 4.3 menunjukkan perbedaan antar semua kelompok perlakuan.

Tabel 4.2 Hasil Uji *LSD* pada indeks adhesi *S. mutans* terhadap neutrofil kelompok kontrol dan semua kelompok perlakuan. (*) menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dan (-) menunjukkan tidak berbeda signifikan.

Kelompok	Adhesi <i>S. mutans</i> ($\bar{x} \pm SD$)			
	Ekstrak 25%	Ekstrak 50%	Ekstrak 75%	Ekstrak 100%
Kontrol	11,25+0,17	11,25+0,17	11,25+0,17	11,25+0,17
Ekstrak 25%	7,37+1,07	-	-	-
Ekstrak 50%	-	7,46+1,07	-	-
Ekstrak 75%	-	-	4,83+0,84	-
Ekstrak 100%	-	-	-	5,09 + 0,87
	p=0,007(*)	p=0,008(*)	p= 0,001(*)	p=0,001(*)

Tabel 4.3 Hasil Uji *LSD* indeks adhesi *S. mutans* terhadap neutrofil antar kelompok perlakuan. (*) menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dan (-) menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan.

Kelompok	Adhesi <i>S. mutans</i> ($\bar{X} \pm SD$)					
Ekstrak 25%	7,37+1,07	7,37+1,07	7,37+1,07	-	-	-
Ekstrak 50%	7,46+1,07	-	-	7,46+1,07	7,46+1,07	-
Ekstrak 75%	-	4,83+0,84	-	4,83+0,84	-	4,83+0,84
Ekstrak 100%	-	-	5,09 + 0,87	-	5,09 + 0,87	5,09 + 0,87
	p=0,919(-)	p=0,035(*)	p=0,051(*)	p=0,031(*)	p=0,044(*)	p=0,077(-)

Berdasarkan hasil uji LSD didapatkan bahwa kelompok kontrol berbeda signifikan dengan kelompok P1, P2, P3 dan P4. Pada kelompok P1 berbeda signifikan dengan kelompok kontrol (K) dan P3, tetapi tidak berbeda secara signifikan dengan kelompok P2 dan P4. Kemudian pada kelompok P2 berbeda secara signifikan dengan kelompok kontrol (K), P3 dan P4 tetapi tidak berbeda secara signifikan dengan kelompok P1. Pada kelompok P3 berbeda secara signifikan dengan kelompok kontrol (K), P1 dan P2 tetapi tidak berbeda secara signifikan dengan kelompok P4. Pada kelompok P4 berbeda secara signifikan dengan kelompok kontrol (K) dan P2 tetapi tidak berbeda secara signifikan dengan kelompok P1 dan P3.

Dari hasil uji tersebut dapat disimpulkan bahwa indeks adhesi *S. mutans* terhadap sel neutrofil pada kelompok yang diberi ekstrak daun beluntas memiliki indeks adhesi yang jelas berbeda dibandingkan dengan kelompok kontrol yang hanya diberi HBSS dan tidak diberi ekstrak daun beluntas.

4.3 Pembahasan

Penelitian *eksperimental laboratories* ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun beluntas dengan berbagai konsentrasi, 25%, 50%, 75% dan 100% terhadap perbedaan indeks adhesi setelah neutrofil dipapar dengan *S. mutans*. Selanjutnya adalah untuk mengetahui konsentrasi ekstrak perasan daun beluntas yang efektif untuk menurunkan indeks adhesi neutrofil yang dipapar *S. mutans*. Ekstrak daun beluntas diketahui mengandung flavonoid yang bermanfaat dalam menghambat terjadinya peradangan (Fajrin, 2009).

Penelitian *in-vivo* maupun *in-vitro* yang pernah dilakukan menunjukkan bahwa flavonoid memiliki efek antiradang. Penelitian ini menggunakan daun beluntas yang segar, kemudian dicuci dan dikeringkan. Proses pengeringan dilakukan tanpa paparan sinar matahari agar tidak merusak kandungan flavonoid di dalam daun beluntas. Sebelum dipapar dengan *S. mutans*, isolat neutrofil yang telah diisolasi dari darah diinkubasi dengan ekstrak beluntas di dalam inkubator sekaligus dishaker. Tujuan

dari inkubasi adalah mencampur neutrofil dengan ekstrak beluntas sehingga homogen dengan sel neutrofil (Biren dkk, 2007).

Setelah didapat isolat neutrofil, harus pula disiapkan suspensi bakteri. Bakteri disiapkan terlebih dahulu untuk mencapai kekeruhan standar 0,5 Mc. Farland. Inkubasi dilakukan selama 15 jam kemudian dilakukan pemaparan *S. mutans* untuk merangsang proses peradangan dengan adhesi *S. mutans* ke membran sel neutrofil. Kemudian kembali diinkubasi ke dalam inkubator selama 2 jam karena berdasarkan hasil trial yang dilakukan sebelum penelitian, waktu efektif untuk mengamati indeks adhesi terbaik adalah selama 2 jam. Selanjutnya diamati dengan menggunakan mikroskop *inverted* dengan perbesaran 400 kali untuk melihat keadaan sel neutrofil di tiap jamnya. Kemudian suspensi bakteri, neutrofil dan *S. mutans* diambil untuk dilakukan pengecatan. Pengecatan untuk neutrofil yang dipakai adalah metode pengecatan Giemza yang merupakan pewarna khusus untuk sel darah. Kemudian dilakukan penghitungan indeks adhesi.

Indeks adhesi diperoleh dari menghitung jumlah *S. mutans* yang melekat pada sebuah sel neutrofil. Untuk setiap kelompok baik kontrol maupun perlakuan dilakukan penghitungan pada 100 neutrofil, kemudian *S. mutans* yang melekat di neutrofil dihitung pada masing-masing sel dan diambil rata-ratanya.

Secara mikroskopis yang diambil menggunakan mikroskop *inverted* dengan perbesaran 400x menggambarkan pengaruh ekstrak daun beluntas yang cukup besar pada indeks adhesi, dimana semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun beluntas yang diinkubasi, semakin tampak utuh membran sel neutrofil dan semakin sedikit pula *S. mutans* yang melekat pada sel neutrofil. Bisa dilihat bahwa pada kontrol dimana sel tidak diinkubasi dengan ekstrak, beberapa sel neutrofil tampak lisis dan membrannya pecah. Memang peneliti belum menguji menggunakan *trypan blue* apakah sel neutrofil yang secara mikroskopis tampak pecah masih hidup atau sel sudah nekrosis, namun dapat dilihat bahwa semakin tinggi konsentrasi, sel-sel neutrofil tampak utuh dan tidak rusak. Bahkan jumlah adhesi *S. mutans* tampak semakin sedikit seiring dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak daun beluntas.

Rata-rata indeks adhesi *S. mutans* terhadap neutrofil setelah dilakukan penghitungan adalah sebagai berikut. Pada kelompok kontrol (K) didapatkan indeks adhesi sebesar 11,25 bakteri per-satuan sel neutrofil. Sedangkan pada P1 didapatkan indeks adhesi sebesar 7,37, P2 didapatkan indeks adhesi sebesar 7,46, P3 didapatkan indeks adhesi sebesar 4,83 dan perlakuan P4 didapatkan indeks adhesi sebesar 5,09 setiap satuan sel neutrofil. Berdasarkan diagram dapat dilihat penurunan indeks adhesi dibandingkan antara kontrol dan perlakuan. Pada kontrol indeks adhesinya tinggi dan memiliki *range* yang cukup besar dengan perlakuan. Berdasarkan hasil statistik, didapatkan bahwa perbedaan antara kontrol dengan semua perlakuan, baik P1, P2, P3 dan P4 adalah signifikan, yang menunjukkan bahwa sel neutrofil yang diinkubasi dengan ekstrak daun beluntas berbeda signifikan terhadap kontrol yang hanya diberi dengan HBSS saja. Diagram menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun beluntas yang diinkubasi semakin rendah indeks adhesinya, meskipun antara indeks adhesi neutrofil yang diinkubasi ekstrak 75% (P3) dibandingkan dengan indeks adhesi neutrofil yang diinkubasi ekstrak 100% (P4) mengalami kenaikan, meskipun setelah diuji statistik perbedaannya tidak signifikan.

Dari diagram dan uji statistik didapatkan secara keseluruhan sebagai berikut. Terlihat penurunan indeks adesi yang secara berurutan dari kontrol (tanpa inkubasi ekstrak) menuju neutrofil yang diinkubasi ekstrak 25% (P1), selanjutnya menuju neutrofil dengan konsentrasi 50% (P2) dan menurun lagi di neutrofil konsentrasi ekstrak beluntas 75% (P3) yang *range*-nya tidak jauh berbeda dengan neutrofil yang diinkubasi ekstrak 100% (P4), meskipun tampak naik setelah dilihat pada diagram. Hasil perhitungan indeks adhesi membuktikan bahwa ekstrak daun beluntas mampu menurunkan indeks adhesi *S. mutans* terhadap sel radang neutrofil. Gambaran mikroskopis juga mampu membuktikan bahwa keutuhan membran sel neutrofil terjaga dengan adanya inkubasi ekstrak daun beluntas.

Berdasarkan pustaka diketahui bahwa berbagai penelitian telah dilakukan pada daun beluntas yang memiliki efektifitas sebagai antiradang, antibakteri, antioksidan, antikarsinogen serta melindungi pembuluh darah dari berbagai manfaat di atas dalam

berbagai penelitian dilakukan uji senyawa yang terkandung di dalam daun beluntas. Berdasarkan skrining fitokimia yang telah dilakukan, golongan senyawa aktif yang teridentifikasi dalam daun beluntas antara lain fenol hidrokuinon, tanin, alkaloid, steroid dan minyak atsiri (Ardiansyah, 2005). Berdasarkan beberapa penelitian yang telah dilakukan baik secara *in-vivo* maupun *in-vitro* menunjukkan kandungan flavonoid yang tinggi inilah yang berpengaruh besar terhadap keutuhan membran sel dan adhesi *S.mutans* terhadap neutrofil.

Dalam mempengaruhi adhesi *S. mutans* dengan melakukan inhibisi indeks adhesi, flavonoid mempengaruhi fluiditas dan hidrofobisitas dari membran sel neutrofil. Kandungan flavonoid dalam ekstrak daun beluntas yang mengandung fenol mudah sekali bereaksi dengan protein neutrofil sehingga mengurangi hidrofobisitas membran dan menghambat pengikatan partikel ke membran sel neutrofil (Septiana, dkk, 2006). Akibatnya adhesi *S. mutans* menjadi terhambat dengan semakin meningkatnya konsentrasi ekstrak karena kandungan fenol dalam flavonoid yang juga meningkat.

Menurut Salansia dkk. (2001), kandungan flavonoid dapat mengurangi fluktuasi Ca^{2+} pada plasma membran. Banyak molekul sinyal pada hewan termasuk neurotransmitter termasuk faktor pertumbuhan menginduksi respon pada sel targetnya melalui jalur transduksi sinyal yang meningkatkan konsentrasi ion kalsium kalsium sitolitik (Campbell dkk, 2002). Ion Ca^{2+} berperan dalam proses perlekatan bakteri, yaitu *S. mutans*. Flavonoid menyebabkan gangguan *channel* Ca^{2+} sehingga adhesi *S. mutans* dapat terhambat.

Flavonoid adalah komponen fenolik yang terdapat dalam buah-buahan dan sayur yang bertindak sebagai penampung yang baik terhadap radikal hidroksil dan super-oksida, dengan melindungi lipid membran terhadap reaksi oksidasi yang merusak (Robinson, 1995). Flavonoid dan tanin merupakan senyawa yang berfungsi sebagai antioksidan karena ketiga senyawa tersebut adalah senyawa-senyawa fenol, yaitu senyawa dengan gugus $-OH$ yang terikat pada karbon cincin aromatik, berfungsi sebagai antioksidan yang efektif, produk radikal bebas senyawa-senyawa ini

terstabilkan secara resonansi dan karena itu tak reaktif dibandingkan dengan kebanyakan radikal bebas lain (Fessenden, dan Fessenden, 1994).

Saat terjadi inflamasi dengan bakteri patogen yaitu *S. mutans*, neutrofil yang ada di tubuh akan direkrut untuk menghancurkan bakteri sehingga terjadi pengeluaran sitokin akibat proses tersebut. Neutrofil akan memproduksi *superoxide* (O_2^-) melalui proses oksidatif sehingga jumlah neutrofil dan aktivitas oksidatif di jaringan akan semakin meningkat. Flavonoid dan tanin merupakan antioksidan yang bertindak sebagai pencegah radikal bebas. Cara kerja kedua antioksidan ini adalah dengan mencegah pembentukan radikal bebas melalui penguraian senyawa non radikal seperti H_2O_2 dan menangkap radikal oksigen yang dilepaskan oleh peroksida (Sjahid, 2008). Flavonoid mampu memberikan atom hidrogen secara cepat kepada radikal bebas, sedangkan radikal yang berasal dari antioksidan ini lebih stabil daripada radikal bebasnya (Radiati, dkk. 1996). Jadi dapat dipersingkat mekanismenya ialah seperti ini, senyawa flavonoid mampu menghambat reaksi oksidasi melalui mekanisme penangkapan radikal (*radical scavenging*) dengan cara menyumbangkan satu elektron pada elektron yang tidak berpasangan dalam radikal bebas sehingga banyaknya radikal bebas berkurang (Pokorny *et al.*, 2001 dalam Rohman, 2005).

Secara *in vitro*, flavonoid merupakan inhibitor yang kuat terhadap peroksidasi lipid, sebagai penangkap spesies oksigen atau nitrogen yang reaktif, dan juga mampu menghambat aktivitas enzim lipooksigenase dan siklooksigenase (Halliwell and Gutteridge dalam Rohman, 2005). Antioksidan yang terdapat pada flavonoid mampu melindungi lipid membran terhadap reaksi oksidasi yang merusak sehingga integritas membran sel neutrofil terjaga. Akibatnya membran sel yang diinkubasi dengan ekstrak daun beluntas terjaga integritas membran selnya. Dengan integritas membran sel yang bagus, neutrofil mampu menjalankan tugasnya yakni bergerak aktif seperti amoeba dan menelan berbagai zat dengan proses yang disebut fago-sitosis. Neutrofil mampu memfagosit dengan membran sel yang lebih sehat dan utuh *S. mutans* yang

melekat pada membran neutrofil sehingga indeks adhesi menurun seiring dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak daun beluntas.

Pada penelitian ini, keefektifan ekstrak daun beluntas dalam memperkecil indeks adhesi berada pada ekstrak dengan konsentrasi 75% karena memiliki indeks adhesi neutrofil dengan nilai yang paling rendah, yaitu ± 5 *S. mutans* setiap sebuah sel neutrofil yang sedikit berbeda dengan hipotesis. Perbedaan ini bisa dikarenakan karena berbagai kekurangan di dalam penelitian, seperti ketidaktepatan dalam penghitungan, kontaminasi, atau bahkan adanya kemungkinan adanya toksisitas pada ekstrak daun beluntas masih perlu dikaji lebih lanjut. Rendahnya indeks adhesi *S. mutans* terhadap neutrofil ternyata tidak hanya disebabkan efek antiinflamasi ekstrak daun beluntas, berdasarkan hasil uji aktivitas mikrobisidal neutrofil diketahui bahwa daun beluntas juga memiliki daya antibakteri yang cukup tinggi.

Daun beluntas mengandung suatu senyawa fenol. Fenol merupakan suatu alkohol yang bersifat asam sehingga disebut juga asam karbolat. Pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dapat terganggu disebabkan adanya suatu senyawa fenol yang terkandung dalam ekstrak etanol daun beluntas. Kondisi asam oleh adanya fenol dapat berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Faktor lingkungan yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri antara lain zat makanan, konsentrasi ion hidrogen (pH), suhu, dan penganginan (Jawetz dkk., 1996). Pada pH rendah merupakan salah satu faktor yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme penghasil asam tetapi tidak toleran terhadap asam seperti laktobasilus, enterobacteriaceae, dan beberapa pseudomonas. Mekanisme fenol sebagai antimikroba yaitu dengan merusak membran sitoplasma bakteri yang dapat menyebabkan kebocoran isi sel. Sedangkan pada konsentrasi tinggi fenol mampu mengkoagulasikan protein seluler. Aktivitas tersebut efektif ketika bakteri berada pada tahap pembelahan sel karena lapisan fosfolipid saat itu sangatlah tipis sehingga dapat dengan mudah dimasuki dan dirusak oleh fenol (Tirta, 2010)

Penelitian ini telah membuktikan bahwa ekstrak daun beluntas efektif terhadap mekanisme dalam menurunkan indeks adhesi *S. mutans* terhadap neutrofil melalui

perlindungan integritas membran dan meningkatkan aktivitas mikrobisidal pada neutrofil dibandingkan dengan neutrofil tanpa inkubasi ekstrak daun beluntas. Adapun ekstrak daun beluntas yang paling efektif adalah ekstrak dengan konsentrasi 75% karena memiliki indeks adhesi *S. mutans* yang paling rendah terhadap neutrofil. Indeks adhesi yang rendah menunjukkan bahwa sel neutrofil memiliki kemampuan terbaik dalam melawan aktivitas invasi bakteri, yaitu *S. mutans*.

Dengan diketahuinya senyawa flavonoid dalam daun beluntas mampu menghambat adhesi *S. mutans* pada sel neutrofil, diharapkan memiliki manfaat besar dalam mengatasi infeksi dalam rongga mulut yang disebabkan bakteri, khususnya *S. mutans*. Berbagai macam infeksi pada rongga mulut dimana *S. mutans* menjadi etiologi utama karies gigi, yakni pulpitis yang merupakan lanjutan dari lesi karies (Harisson, 1996). Jika pulpitis tidak diobati dengan baik maka infeksi dapat menyebar melalui apeks dentin dan mengenai ligament periodontal yang akan meningkatkan resiko terjadinya granuloma periapikal dan berbagai penyakit infeksi rongga mulut lainnya.

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

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

- a. Pemberian ekstrak daun beluntas konsentrasi 25%, 50%, 75% dan 100% berpengaruh terhadap inhibisi indeks adhesi *S. mutans* terhadap neutrofil.
- b. Konsentrasi ekstrak perasan daun beluntas yang efektif untuk inhibisi indeks adhesi neutrofil yang dipapar *S. mutans* adalah ekstrak daun beluntas dengan konsentrasi 75%.

5.2. Saran

Berdasarkan kekurangan penelitian yang telah peneliti lakukan, maka disarankan:

- a. Perlu adanya uji viabilitas terlebih dahulu sebelum dilaksanakan uji indeks adhesi agar dapat membedakan mana sel yang lisis dan sel yang hidup guna mempermudah penghitungan. Hanya saya peneliti belum bisa memberikan saran yang tepat bagaimana metode pengujian viabilitas yang paling efektif, sehingga perlu dilaksanakan penelitian lanjutan.
- b. Jumlah sampel lebih diperbesar guna mengurangi kemungkinan hasil penelitian yang bias.
- c. Perlunya diteliti mengenai daya antibakteri daun beluntas lebih lanjut berikut toksisitasnya.

DAFTAR BACAAN

- Amanda, L. 2010. Sistem Adhesi Kedokteran Gigi. www.respiratory.usu.ac.id. [17 Oktober 2010].
- Anggraeni, Ajeng. Anita Yuliati, Intan Nirwana. 2003. Perlekatan Koloni *Streptococcus mutans* Pada Permukaan Resin Komposit Sinar Tampak. www.unair.ac.id. [20 September 2011]
- Ardiansyah. 2005. Daun Beluntas Sebagai Bahan Antibakteri dan Antioksidan. <http://www.beritaiptek.com>. [17 November 2010]
- Ayudi, Caesar. 2008. “Peranan Protein Hemagglutinin Pili Proteus Mirabili 20 KDa untuk Menghambat Adhesi Pada Vesika Urinaria Kelinci.” Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember : Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
- Bachtiar, E.W. 1997. Proses Vaksinasi dalam Pencegahan Karies Dengan Antigen Hasil Rekayasa Protein Dinding Sel *Streptococcus mutans*. *Jurnal Kedokteran Gigi Edisi Khusus KPPIKG XI FKG Universitas Indonesia*. Volume 4 : 20-22.
- Bellanti, J. A. 1994. *Immunologi III*. Terjemahan A. Samik Wahab. 1993. Yogyakarta : Gajahmada University Press.
- Bertrand, J. C. Bonin P., Goutx M, Mille. 1993. Biosurfactan Production by Marine Microorganism, Potential Application of Fighting Hydrocarbon marine pollution. *Marine Biotechnology* Volume 1 : 125–129.
- Biren S., Nayak BS, dkk. 2007. Search for Medicinal Plants as Aorce of Antiinflammatory and Anti-Arthitic, Agents-A Review. *Pharmacognozy Magazine*. Volume 6 : 77-86.
- Boel, T. 2002. Daya Antibakteri Pada Beberapa Konsentrasi dan Kadar Hambat Minimal dari Aloe Vera. *Dentika Journal FKG Universitas Sumatra Utara*. Volume 7 : 20-24.
- Campbell, Neil A, Jane B. Reece, Mitchael. 2002. *Biologi*. Jakarta : Penerbit Erlangga.
- Capuccino, J. G dan Sherman, N. 1983. *Microbiology : A Laboratory Manual*. Massachusetts: Addison-Wesley Publishing Company Inc.
- Dalimartha, Susanti. 1999. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia*. Jilid 1. Jakarta : Trubus Agriwidya.

- Direktorat Bina Produksi Hortikultura. 1994. *Multifungsi Tanaman Obat*. Jakarta: Direktorat Jenderal Tanaman Pangan dan Hortikultura.
- Dorland, W. A. N. 2002. *Kamus Kedokteran Dorland*. Edisi 29. Alih Bahasa oleh Huriawati Hartanto. Jakarta : EGC.
- Effendi, Zukesti. 2003. *Peranan Leukosit sebagai Anti Inflamasi Alergik dalam Tubuh*. Sumatra Utara : Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Sumatra Utara.
- Edo, 2010. Aneka Fungsi Tanaman Dalam Kesehatan.
<http://pohonobat.blogspot.com>. [22 November 2010].
- Eufoni, Sinestesia Rima. 2009. “Perbedaan Efek Analgesik Antara Ekstrak Daun Beluntas (*Pluchea indica*) Dengan Aspirin Pada Mencit Jantan Strain BALB/C”. Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Fajrin, Nur Astuti. 2009. “Efek Pemberian Daun Beluntas (*Pluchea indica*) Terhadap Jumlah Sel Monosit Darah Tepi Mencit Jantan yang Diinduksi *Staphylococcus aureus*.” Tidak diterbitkan. Skripsi. Jember : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Fakrizal. 2009. *Manfaat Tanaman Beluntas*. <http://healindonesia.wordpress.com>. [22 November 2010].
- Ferdian, Ansyari. 2008. Tumbuhan Obat dan Sains.
<http://tarmiziblog.blogspot.com/2008/04/bluntas.html> [01 November 2011].
- Ferencik, M. 1993. *Handbook of Immunocemistry 1st Ed*. Melbourne : Glasgow.
- Fessenden, R.J., dan Fessenden, J.S. 1994. *Kimia Organik*. Jilid I Edisi ketiga. Jakarta : Penerbit Erlangga.
- Fikril, Anna. 2009. “Efek Pemberian Perasan Daun Beluntas (*Pluchea indica*) Terhadap Jumlah Sel limfosit Darah Tepi Mencit Jantan yang Diinduksi *Staphylococcus aureus*”. Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

- Firman, Bob. 2007. "Perbandingan Pengaruh Sevofluran dan Isofluran Terhadap Jumlah Neutrofil Polimorfonuklear Darah Tepi". Tidak Diterbitkan. Tesis. Semarang : Program Magister Ilmu Biomedik dan Pendidikan Dokter Spesialis Anestesiologi Universitas Diponegoro.
- Giannasca, K.T. M. R. Neutra. 1996. Adherence of *Salmonella typhimurium* to Caco-2 Cells: Identification of a Glycoconjugate Receptor. *Journal of American Society of Microbiology*. Volume 64 (1) : 135-145.
- Guyton, A. C. Dan Hall, J.E. 1996. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Edisi 9. Cetakan I. Terjemahan Irawan S, K. A. Tragedi, dan A. Santos. Jakarta : EGC.
- Graigmyle, M. B. L. 1994. *Atlas Berwarna Histologi*. Penerjemah: Tan Tamboyang dari "A Colour Atlas of Histology". Jakarta : EGC.
- Hamid, M. Fahmi. 2008. Dental Plaque. fahmihamid.blogspot.com. [19 Oktober 2010].
- Hariana, A. 2006. *Tumbuhan Obat dan Khasiatnya Seri I*. Jakarta : Penebar Swadaya.
- Harrison. 1996. *Prinsip Ilmu Penyakit Dalam Vol 1*. Editor Ahmad H. Asdie. Jakarta : EGC.
- Jamilah, 2010. "Pengaruh Ekstrak Daun Sirih yang Dicampurkan Pada Pasta Gigi Terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans*". Tidak Diterbitkan. Skripsi. Medan : Universitas Sumatra Utara.
- Jacques, Paradis 1990. Ultrastructural Study of Surface Components of *Streptococcus*. *Journal of Bacteriology American Society of Microbiology Edisi Juni 1990*. Volume 10 : 2833-2838.
- Jewetz. E, J.L. Menick dan E.A. Adelberg. 1986. *Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan*. Edisi 16. Terjemahan H. Tonang Review of Medical Microbiology (1984). Jakarta : EGC.
- Jewetz, E. 1996. *Mikrobiologi Kedokteran*. Terjemahan Edi Nugroho dan Maulany dari *Medical Microbiology* (1995). Jakarta : EGC
- Kidd, E. A., and S. J. Bechal. 1992. *Dasar-Dasar Karies Penyakit dan Penanggulangannya*. Alih Bahasa : Sumatiwa N., dan Faruk S. Judul asli :

- Essentials of Dental Caries : The disease and its Management (1987). Jakarta: EGC.
- Kresno, S. B. 1984. *Imunologi : Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Kunkel, Dennis. 1999. Oral Microbes - Bacteria (Bacilli and Cocci) and Yeast. <http://www.denniskunkel.com>. [2 November 2010].
- Ladolfi R, Mower RL, Steiner M. 1984. Modification of Platelet Function and Arachidonic Acid Metabolism by Bioflavonoids. *Biochem Pharmacol* Volume 33(9): 1525.
- Lesson, C.R., Lesson, T.S., Paparo, A.A., 1985. *Textbook of Histology* Edisi 5. Jakarta : EGC.
- Lehner, Thomas. 1995. *Imunologi Pada Penyakit Mulut*. Edisi 3. Alih Bahasa : Farida, Suryadhana. Judul Asli : *Imunologi of Oral Disease*. Jakarta : EGC.
- Mars, P and Martin MV. 1999. *The Resident Oral Microflora in Oral Biology 4th ed.* Great Britain : MPG.
- Mc Ghee, J.R., Michalek, S.M., Navia, J., Narkates, A.J. 1996. Effective Immunity to Dental Caries : Studies of Active and Passive Immunity to *Streptococcus mutans* in Malnourished Rats. *Journal Dent Res.* Volume 55 : 206-214
- Nathael, I. M., T. Sprules, M. R. Carpenter, P. D. Cotter, C. Hill, R. P. Ross, and J. C. Vederas. 2004. Structural Characterization of Lacticin 3147, A Two-Peptide Antibiotic With Synergistic Activity. *Journal of Biochemistry.* Volume 43:3049-3056.
- Nolte, A. W. 1982. *Oral Microbiology, with Basic Microbiology and Immunology*. London : The C. V. Mosby Company.
- Notoatmojo. 2002. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Yogyakarta : Rineka Cipta.
- Nugraha, A. W. 2007. *Streptococcus mutans, Plak Dimana-Mana*. Yogyakarta : Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma Yogyakarta.
- Paramaatha, Putri Canndika. 2009. "Efek Ekstra Daun Salam (*Eugenia polyantha* Wight) Terhadap Jumlah Leukosit Darah Tepi Tikus Wistar Jantan yang Dipapar Stressor Rasa Sakit Renjatan Listrik." Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

- Pratama, Moch Rachdie. 2005. "Pengaruh Ekstrak Serbuk Kayu Siwak (*Salvadora persica*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Streptococcus mutans* dan *Staphylococcus aureus* Dengan Metode Difusi Agar". Tidak Diterbitkan. Skripsi. Semarang : Universitas Diponegoro
- Price, S.A dan L.M. Wilson. 1995. "*Clinical Concepts of Disease Processes (1994)*". Terjemahan Peter Augerah. *Patofisiologi Konsep Klinik Proses-proses Penyakit*. Edisi 2. Bagian I. Jakarta : EGC.
- Pujowati, Penny. 2006. "Pengenalan Ragam Tanaman Lanskap Asteraceae (Compositae). Tidak Diterbitkan". Tesis. Bogor : Departemen Arsitektur Lanskap Fakultas Pertanian ITB.
- Purwanto. 2009. "Peran *Streptococcus mutans* dan Monosit Pada Degradasi Kolagen Tipe IV dan Agegrasi Kolagen Platelet". Tidak Diterbitkan. Disertasi. Malang : Universitas Brawijaya..
- Radiati, L.E., E.P. Nabet, P. Franck, B. Nabet, J. Capiaumont, D. Fardiaz, R.f. Zakaria, I. Sudirman dan R.D. Haryadi, 1996. "Pengaruh Ekstrak Diklormetan Jahe (*Zingiber officinale*) Terhadap Pengikatan Toksin Kolera B-subunit Conjugasi (FITC) pada Reseptor Sel Hibridoma LV dan Caco-2". *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. Volume XIV (1) : 59-67.
- Rahman, Safriani. 2010. Sel, Jaringan dan Membran Sel. <http://biofarmasiumi.com/2010/09/26/sel-jaringan-dan-membran-sel/>. [01 Februari 2011].
- Rasmehuli. 1986. *Pemeriksaan Minyak Atsiri dan Flavonoid dari Daun Beluntas (Pluchea indica less)*. Bandung : Institut Teknologi Bandung.
- Rasuna, Gilang. 2010. Patogenesis, Pola Penyebaran dan Abses Terapi Rongga Mulut. <http://gilangrasuna.wordpress.com>. [20 November 2010].
- Rohman, Abdul. 2005. "Daya Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Kemuning (*Murraya paniculata*) L. Jack) Secara in Vitro". Tidak Diterbitkan. Tesis. Yogyakarta : Bagian Farmasi Universitas Gajah Mada.
- Robbins, S.L., Contran dan Kumar Vinay. 1995. *Basic Pathology (1987)*. Terjemahan Staf Pengajar Patologi Anatomik Universitas Airlangga dari Buku Ajar Patologi I. Edisi 4. Surabaya: EGC.
- Roeslan, B.O, 1996. "Karakteristik *Streptococcus mutans* Penyebab Karies Gigi". *Jurnal Ilmiah Majalah Kedokteran Gigi FKG Trisakti*. Volume 10 : 29-30.
- Robinson, Trevor. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Terjemahan Padmawinata, K. Bandung : Institut Teknologi Bandung.

- Roeslan, B., Melanie Errawan, 1988, Sintesis Glukan oleh GT-ase *Streptococcus mutans* : Mekanisme Pembentukan Plak gigi, *Majalah Ilmiah FKG Usakti*, Th. III, No. 9. Jakarta : Universitas Trisakti.
- Roslida, Erazuliana, Zuraini. 2008. Antiinflamatorry and Actinociceptive of The Ethanolic Extrack of *Pluchea Indica* (L) Less Leaf. www.Pharmacologyonline [2 Januari 2011].
- Sabir, Ardo. 2003. Pemanfaatan Flavonoid di Bidang Kedokteran Gigi. *Majalah Kedokteran Gigi (Dental Journal) Edisi Khusus Temu Ilmiah Nasional*. Volume III : 84-85.
- Santosaningsih, D. 2004. “Peranan Protein Fimbriae dan Lipopolisakarida Terhadap Perlekatan Bakteri *Enterohemorrhagic Escherichia Coli* (EHEC) O157 Pada Enterosit Kelinci Secara Invitro : Penelitian Eksperimental Laboratoris”. Tidak Diterbitkan. Tesis. Surabaya: Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Septiana, Dwiyantri, Muchtadi, Zakaria. 2006. “Penghambatan Oksidasi LDL dan Akumulasi Kolesterol Pada Makrofag oleh Ekstrak Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*)”. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. Volume XVII (3) : 221-226.
- Salasia, Siti I. O., R. Susanti., Soesanto. 2001. Efek Tetrachloridibenzol Terhadap Sistem Imun Neutrofil dan Limfosit Tikus Putih (*Rattus norwegicus*). *Jurnal Agrosains*. Volume 14 (2) : 160-163.
- Sjahid, Landyyun Rahmawan (2008) “Isolasi dan Identifikasi Flavonoid Dari Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora L.*)”. Tidak Diterbitkan. Tesis. Surakarta : Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Soesilo, Dhina, dkk. 2005. Peranan Sorbitol Dalam Mempertahankan Kestabilan pH Saliva Pada Proses Pencegahan Karies. *Majalah Kedokteran Gigi (Dental Journal)*. Volume 38 : 25-28.
- Soto, Pinker J, Hultgren SJ. 1999. Adhesin of Type 1 Pili is Assembled into a Fibrillar Tip Structure in Enterobacteria. *Journal Proc Natl Acad SCI USA*. Volume 92 : 2081-2085.

- Sukanto, S. P, A. Yulianti. 2003. Daya Hambat Ekstrak Kulit Buah Delima Putih Terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans*. *Majalah Kedokteran Gigi Universitas Airlangga*. Volume 3 : 34-37.
- Susanti, Ary. 2004. “Daya Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Beluntas (*Pluchea indica* Less) Terhadap *Escherichia coli* Secara in Vitro”. Tidak Diterbitkan. Skripsi. Surabaya : Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Susilawati, I.D.A. 2008. “Induksi *Porphyromonas gingivalis* terhadap Aktivitas Kolagenolisis Neutofil pada Kolagen Tipe IV (Studi in vitro Mekanisme Kolagenolisis Plak Aterosklerotik)”. Tidak Diterbitkan. Disertasi. Malang: Program Doktor Ilmu Kedokteran Universitas Brawijaya.
- Syadziya, Mala. 2010. Mencegah dan Mengobati Bau Mulut. <http://dyahku.wordpress.com/>. [2Januari 2012].
- Tarigan, Rasinta. 1990. *Karies Gigi*. Jakarta : Penerbit EGC.
- Tirta, Ari Sukmari Ekstwati. 2010. “Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Kelopak Rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) Terhadap *Propionibacterium acne*, *Staphylococcus aureus*, dan *Escherichia coli* Serta Uji Bioautografi”. Makalah. Tidak diterbitkan. Fakultas Farmasi : UMY Solo.
- Todar, Kenneth. 2008. The Normal Bacterial Flora of Humans. <http://www.textbookofbacteriology.net>. [10 Agustus 2011].
- Vojdani, A. 2003. A Look at Infectious Agents as a Possible Causative Factor in Cardiovascular Disease. *Journal of Cardiovascular Part I*. Volume 3 : 7-11.
- Wahyudi. 2007. Adhesi dan Aktifitas Fagositosis Sel Polimorfonuklear Terhadap *Staphylococcus aureus* Asal Susu Sapi Perah dan Manusia yang Bersifat Multiresisten Terhadap Antibiotik. <http://yudhie-kh.web.ugm.ac.id/?p=7>. [27 April 2011]
- Wahyuningsih, Tutik Dwi. 2009. “Sintesis dan Karakterisasi 9, 10-Dihidroksi Sterat Dietanolamida Sebagai Surfaktan Nonionik Dari Minyak Jelantah Sawit”. Tidak Diterbitkan. Tesis. Malang : Universitas Brawijaya.

- Whiley, Beighton. 1998. Current Classification of the Oral Streptococci.
<http://onlinelibrary.wiley.com>. [2 Januari 2011]
- Widjiastuti. 1998. *Peran Aglutinin Saliva Sebagai Mediator Perlekatan Bakteri Streptococcus mutans Pada Penderita Bebas Karies dan Karies Gigi*. Surabaya : Lembaga Penelitian Universitas Airlangga.
- Wilmana. 2001. *Farmakologi dan Terapi Edisi keempat*. Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Winarsih, Sri. Sunarto. 1999. Protein Hemaglutinin 36kDa OMP *Salmonella typhi*. *Jurnal Kedokteran Brawijaya Universitas Brawijaya* Volume 2 (4) : 12-13.

LAMPIRAN

Lampiran A. Tabulasi data

Tabel Hasil Rata-Rata Penghitungan Indeks Adhesi *S. mutans* terhadap Neutrofil
Pada Masing-Masing Kelompok

ULANGAN	+ <i>S. mutans</i> (KONTROL)	25% + <i>S. mutans</i> (P1)	50% + <i>S. mutans</i> (P2)	75% + <i>S. mutans</i> (P3)	100% + <i>S. mutans</i> (P4)
1.	11,97	7,35	7,98	5,45	5,98
2.	10,53	7,38	6,94	4,2	4,2
Rata- Rata	11,25	7,37	7,46	4,83	5,09

Lampiran B. Uji Statistik

Par Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Indeks Adhesi
N		10
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	7.4470
	Std. Deviation	2.54579
Most Extreme Differences	Absolute	.217
	Positive	.217
	Negative	-.146
Kolmogorov-Smirnov Z		.686
Asymp. Sig. (2-tailed)		.734

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Oneway

ANOVA

Indeks Adhesi					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	53.180	4	13.295	16.857	.004
Within Groups	3.944	5	.789		
Total	57.124	9			

Post Hoc Tests

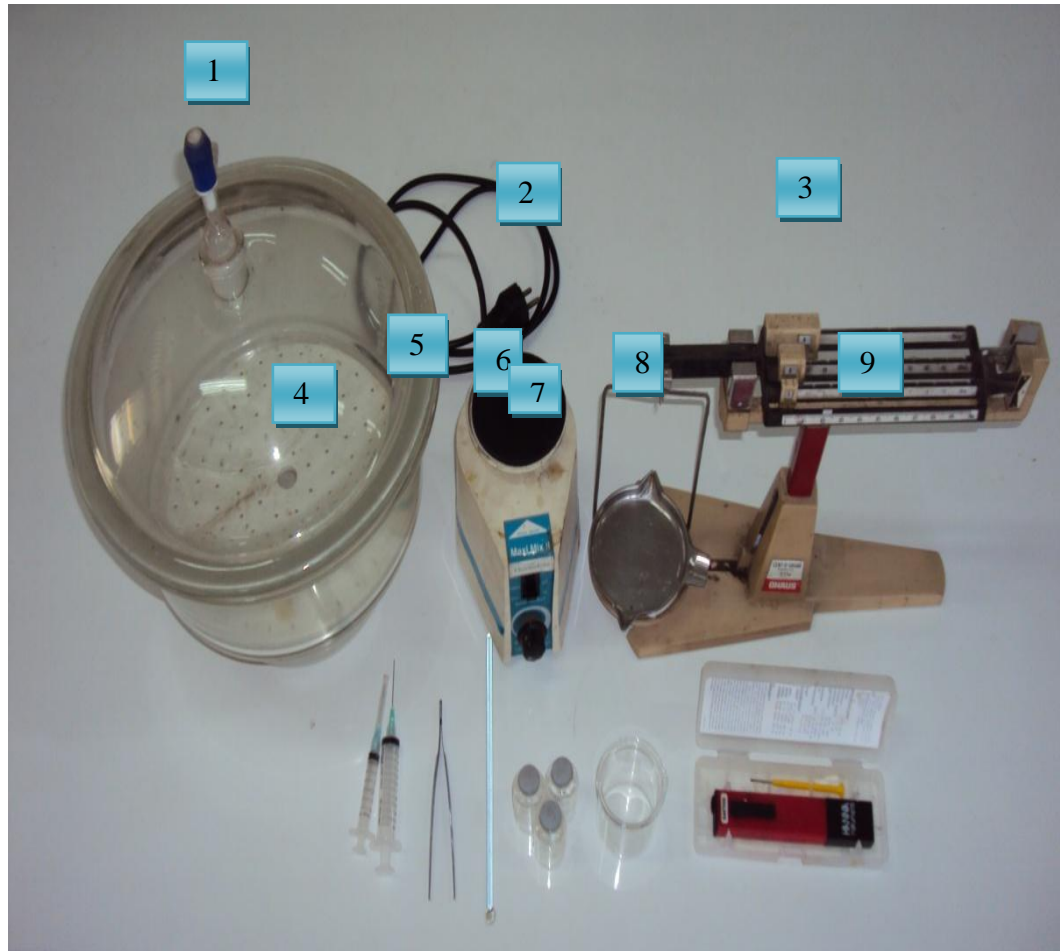
Multiple Comparisons

Dependent Variable: Indeks Adhesi

	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	Kontrol	25%	3.88500*	.88809	.007	1.6021	6.1679
		50%	3.79000*	.88809	.008	1.5071	6.0729
		75%	6.42500*	.88809	.001	4.1421	8.7079
		100%	6.16000*	.88809	.001	3.8771	8.4429
	25%	Kontrol	-3.88500*	.88809	.007	-6.1679	-1.6021
		50%	-.09500	.88809	.919	-2.3779	2.1879
		75%	2.54000*	.88809	.035	.2571	4.8229
		100%	2.27500	.88809	.051	-.0079	4.5579
	50%	Kontrol	-3.79000*	.88809	.008	-6.0729	-1.5071
		25%	.09500	.88809	.919	-2.1879	2.3779
		75%	2.63500*	.88809	.031	.3521	4.9179
		100%	2.37000*	.88809	.044	.0871	4.6529
	75%	Kontrol	-6.42500*	.88809	.001	-8.7079	-4.1421
		25%	-2.54000*	.88809	.035	-4.8229	-.2571
		50%	-2.63500*	.88809	.031	-4.9179	-.3521
		100%	-.26500	.88809	.777	-2.5479	2.0179
100%	Kontrol	-6.16000*	.88809	.001	-8.4429	-3.8771	
	25%	-2.27500	.88809	.051	-4.5579	.0079	
	50%	-2.37000*	.88809	.044	-4.6529	-.0871	
	75%	.26500	.88809	.777	-2.0179	2.5479	

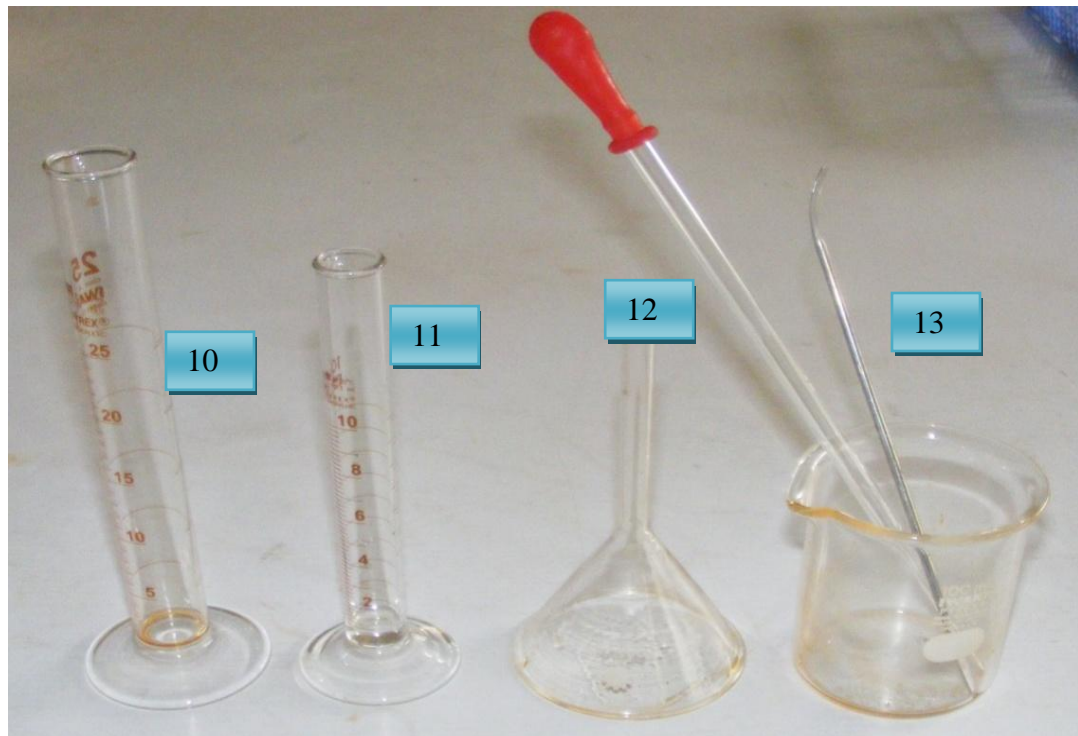
*. The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran C. Foto Penelitian
C.1 Alat Penelitian



Keterangan :

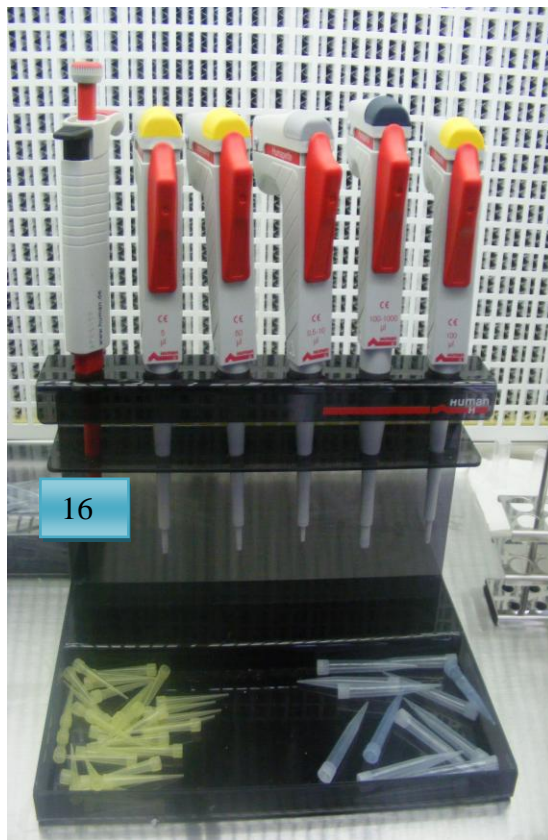
1. Desikator
2. *Thermolyne*
3. Timbangan
4. *Syringe*
5. Pinset
6. Spatula kaca
7. Botol vial
8. *Beaker glass*
9. *pH meter*



- Keterangan :
- 10. Tabung ukur
 - 11. Corong
 - 12. Pipet
 - 13. Spatula kaca
 - 14. Timbangan Elektrik
 - 15. *Rotary evaporator*

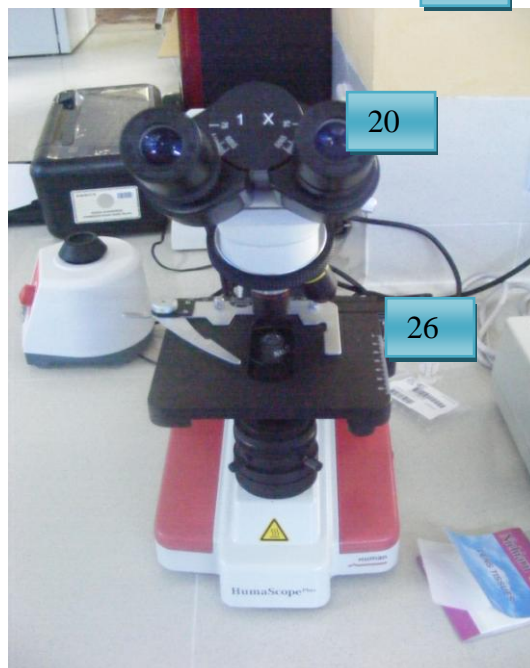


- Keterangan :
16.Sentrifugator
17.Oven
18. Laminar flow



16

21



20

26



22

24

23



25

Keterangan :

19. Mikropipet berbagai ukuran

20. *Yellowtip*21. *Whitetip*22. *Syringe*

23. Hand ban

24. *Microscop slide*

25. Densitometer

26. *Digital microscop binokuler*



Keterangan :

27. Petridis kecil

28. Deck glass

29. tabung inkubator anaerob

30. Gas CO₂

31. Gelas ukur berbagai ukuran

32. Tabung reaksi berikutraknya

33. Inkubator

34. Mikroskop inverted

Lampiran C2. Bahan Penelitian



Keterangan:

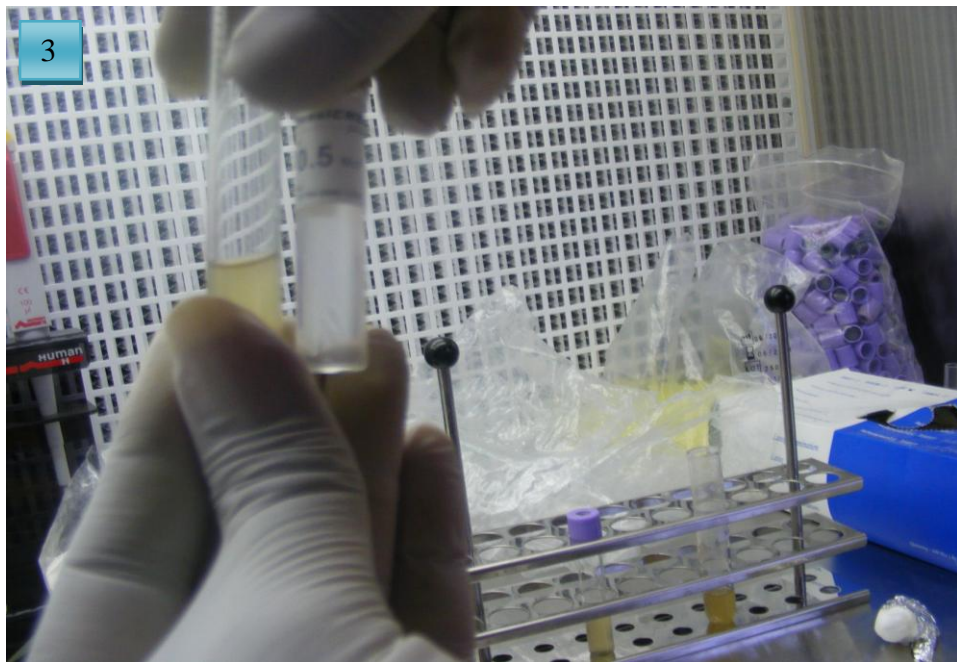
1. Daun beluntas bubuk
2. Bubuk NaCl
3. Trypanblue
4. HBSS
5. RPMI
6. Ficoll
7. Tabung heparin



Keterangan:

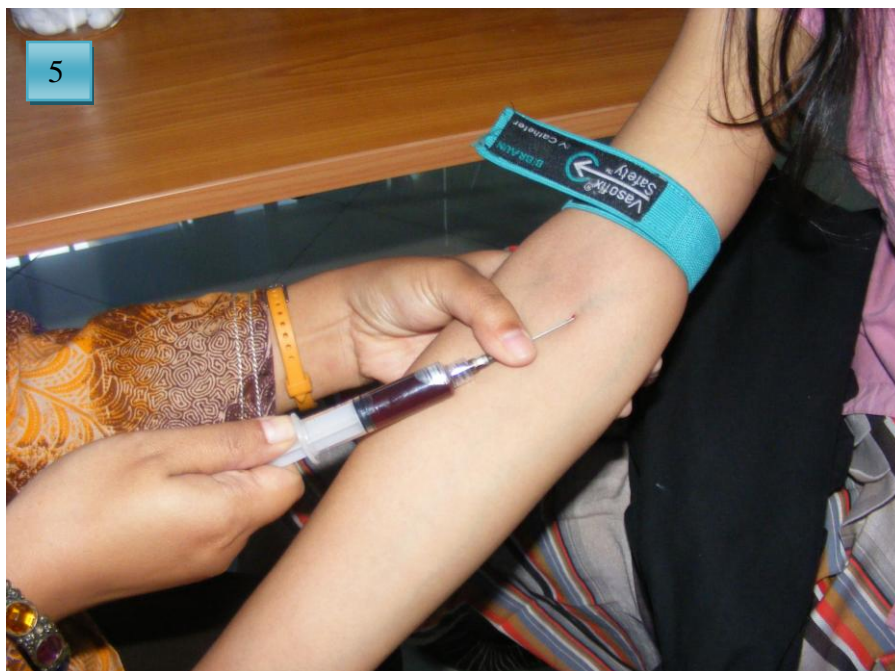
8. Suspensi *S. mutans*
9. Aquades steril
10. Alkohol 70 % dan 80%
11. Dekstran

Lampiran C3. Prosedur Penelitian



Keterangan:

1. Proses pengeringan daun beluntas
2. Proses pembuatan ekstrak daun beluntas
3. Pembuatan suspensi *S. mutans*



Keterangan:

4. Sterilisasi alat alat dari plastik dengan klorin
5. Pengambilan darah vena fossa cubiti



Keterangan :

6. Proses isolasi neutrofil dari darah.

7. Proses pencampuran suspensi neutrofil, ekstrak daun beluntas dan *S. mutans*.



Keterangan:

8. Inkubasi dalam inkubator

9. Pengecatan dengan Giemza



Keterangan:
10. Penghitungan indeks adhesi.