

**POTENSI EKSTRAK DAUN SINGKONG (*Manihot esculenta* Crantz)
TERHADAP EKSPRESI MMP-8 FIBROBLAS GINGIVA PADA
MODEL TIKUS DISFUNSI OVARIUM DAN
PERIODONTITIS**

SKRIPSI

Oleh

Paramudibta Lungit Kuncaraningtyas

NIM 161610101021

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS JEMBER

2020



**POTENSI EKSTRAK DAUN SINGKONG (*Manihot esculenta* Crantz)
TERHADAP EKSPRESI MMP-8 FIBROBLAS GINGIVA PADA
MODEL TIKUS DISFUNSI OVARIUM DAN
PERIODONTITIS**

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

Paramudibta Lungit Kuncaraningtyas

NIM 161610101021

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS JEMBER

2020

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT atas rahmat dan hidayah-Nya;
2. Nabi Muhamamad SAW;
3. Ayahanda Maryani, Ibunda Wahyu Setyorini, Adik Narendra Lungit Prabandaru serta keluarga besar;
4. Guru-guru sejak taman kanak-kanak sampai perguruan tinggi;
5. Teman-teman yang telah mendukung saya;
6. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;

MOTTO

“Maka sesungguhnya beserta kesulitan ada kemudahan, sesungguhnya beserta kesulitan itu ada kemudahan. Maka apabila engkau telah selesai (dari sesuatu urusan), tetaplah bekerja keras (untuk urusan yang lain), dan hanya kepada

Tuhanmulah engkau berharap.”

(Q.S Al-Insyirah:5-8)^{*)}

“Talk Less Do More.”

(Penulis)

*) Qur'an Kemenag: Lajnah Pentashihan Mushaf Al-Qur'an Buku & Referensi

<https://quran.kemenag.go.id>

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Paramudibta Lungit Kuncaraningtyas

NIM : 161610101021

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Potensi Ekstrak Daun Singkong (*Manihot Esculenta* Crantz) Terhadap Ekspresi MMP-8 Fibroblas Gingiva pada Model Tikus Disfungsi Ovarium dan Periodontitis” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggungjawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 21 April 2020

Yang menyatakan,

Paramudibta Lungit Kuncaraningtyas
NIM 161610101021

SKRIPSI

**POTENSI EKSTRAK DAUN SINGKONG (*Manihot esculenta* Crantz)
TERHADAP EKSPRESI MMP-8 FIBROBLAS GINGIVA PADA
MODEL TIKUS DISFUNSI OVARIUM DAN
PERIODONTITIS**

Oleh

**Paramudibta Lungit Kuncaraningtyas
NIM 161610101021**

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : drg. Amandia D.P.S., M.Biomed
Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Zahara Meilawaty, M.Kes

PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul “Potensi Ekstrak Daun Singkong (*Manihot Esculenta* Crantz) Terhadap Ekspresi MMP-8 Fibroblas Gingiva pada Model Tikus Disfungsi Ovarium dan Periodontitis” telah diuji dan disahkan pada:

Hari, tanggal : Selasa, 21 April 2020

Tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Penguji Utama

Penguji Anggota

drg. Nadie Fatimatuzzahro, MDSc
NIP. 198204242008012022

drg. Depi Praharani, M.Kes
NIP. 196801221997022001

Pembimbing Utama

Pembimbing Anggota

drg. Amandia Dewi P.S., M.Biomed
NIP. 198006032006042002

drg. Zahara Meilawaty, M.Kes
NIP. 198005272008122002

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Jember,

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

RINGKASAN

Potensi Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) Terhadap Ekspresi MMP-8 Fibroblas Gingiva Pada Model Tikus Disfungsi Ovarium dan Periodontitis; Paramudibta Lungit Kuncaraningtyas; 161610101021; 96 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Kondisi disfungsi ovarium menimbulkan defisiensi hormon estrogen dan progesteron. Penurunan kadar estrogen memiliki efek pada pengurangan keratinisasi epitel gingiva dan mempengaruhi metabolisme kolagen. Hal ini menyebabkan peningkatan produksi *Tumor Necrosis Factor* (TNF) yang kemudian memicu produksi matriks metalloproteinase (MMP). MMP-8 adalah MMP yang menjadi biomarker jaringan periodontal yang diekspresikan salah satunya oleh fibroblas gingiva. Ekspresi MMP-8 ini diproduksi oleh fibroblas gingiva yang distimulasi oleh TNF- α . Periodontitis yang disebabkan oleh bakteri Gram negatif seperti *Porphyromonas gingivalis*, akan memicu makrofag melepaskan TNF- α yang berkontribusi terhadap degradasi jaringan, resorpsi tulang, dan menstimulasi pembentukan MMP. Berbagai kondisi negatif yang dialami tubuh pada fase menopause dan periodontitis dapat dicegah dengan bahan alam salah satunya adalah tanaman singkong. Daun singkong memiliki kandungan senyawa flavonoid, vitamin C, triterpenoid, tannin, dan saponin yang berperan sebagai antiinflamasi, antibakteri, dan antioksidan. Ekstrak daun singkong yang dipakai dalam penelitian ini adalah sebesar 179,2 mg/kgBB. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi ekstrak daun singkong terhadap ekspresi MMP-8 fibroblas gingiva pada model tikus disfungsi ovarium dan periodontitis.

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris dengan *the post test only control group design*. Sampel yang digunakan adalah tikus *Sprague Dawley* yang berjumlah 15 ekor dibagi dalam 3 kelompok, yaitu kelompok kontrol, kelompok tikus yang diinduksi bakteri *Porphyromonas gingivalis*, dan kelompok tikus yang dilakukan ovariektomi. Kelompok tikus yang diinduksi bakteri *P.gingivalis* dan yang dilakukan ovariektomi ini dibagi menjadi 2 subkelompok yaitu subkelompok tikus diberi aquades sebagai kontrol negatif dan subkelompok yang diberi ekstrak daun singkong. Kelompok yang diinduksi *P.gingivalis* dan

kelompok yang diovariectomi ini diberikan aquades dan ekstrak daun singkong 2 kali sehari selama 7 hari, kemudian dilakukan euthanasia pada hari ke-8 setelah pemberian aquades dan ekstrak daun singkong. Pengambilan jaringan setelah tahap euthanasia dilakukan untuk pembuatan preparat histologi dengan pewarnaan imunohistokimia. Pengamatan dan penghitungan ekspresi MMP-8 dilakukan dengan menggunakan aplikasi *ImageJ* dan *Immunoratio* pada tiga lapang pandang yang berbeda dengan hasil penghitungan berupa persentase.

Hasil analisis data *One-way Anova* ekspresi MMP-8 fibroblas gingiva menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Selanjutnya dilakukan uji LSD. Hasilnya menunjukkan terdapat perbedaan antara kelompok kontrol (tikus sehat) dengan kelompok model tikus periodontitis yang diberi aquades, antara kelompok model tikus periodontitis yang diberi aquades dengan yang diberi ekstrak daun singkong, serta antara kelompok model tikus disfungsi ovarium yang diberi aquades dengan yang diberi ekstrak daun singkong.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun singkong dapat menurunkan ekspresi MMP-8 fibroblas gingiva tikus yang mengalami disfungsi ovarium dan periodontitis diinduksi *P.gingivalis*. Hal ini dikarenakan ekstrak daun singkong memiliki kandungan flavonoid yang berperan sebagai antiinflamasi dengan memblokir siklus siklooksigenase dan lipoksigenase sehingga menyebabkan terjadinya penurunan produksi prostaglandin. Hal ini akan menyebabkan penurunan jumlah sel radang neutrofil dan mediator-mediator inflamasi, seperti TNF- α pada jaringan yang mengalami inflamasi; saponin, tanin, dan terpenoid sebagai antibakteri. Hal ini menyebabkan sel-sel inflamasi yang bermigrasi menjadi terbatas, ekspresi MMP-8 dapat ditekan, dan tanda-tanda klinis peradangan berkurang.

Kesimpulan penelitian ini bahwa ekstrak daun singkong mampu menurunkan ekspresi MMP-8 sel fibroblas gingiva model tikus disfungsi ovarium dan periodontitis.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas limpahan rahmat, karunia, dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Potensi Ekstrak Daun Singkong (*Manihot Esculenta* Crantz) Terhadap Ekspresi MMP-8 Fibroblas Gingiva pada Model Tikus Disfungsi Ovarium dan Periodontitis”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

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

1. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Pros., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
2. drg. Amandia Dewi Permana Shita, M.Biomed., selaku Dosen Pembimbing Utama dan drg. Zahara Meilawaty, M.Kes., selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang telah meluangkan waktu dalam memberikan bimbingan, berbagi ilmu, dan memberikan motivasi dalam proses penyusunan skripsi sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik;
3. drg. Nadie Fatimatuzzahro, MDS., selaku Dosen Penguji Ketua dan drg. Depi Praharani, M.Kes., selaku Dosen Penguji Anggota yang telah meluangkan waktu untuk memberikan kritik dan saran dalam penulisan skripsi ini sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik;
4. drg. Agustin Wulan Suci Dharmayanti, MDS. dan Dr. drg. Zahreni Hamzah, M.S., yang telah mengikutsertakan saya dalam penelitian ini dan memberikan ide penelitian sehingga saya memiliki kesempatan melakukan penelitian yang berintegrasi;
5. Dr. drg. Ari Tri Wanodyo Handayani M.Kes., selaku Dosen Pembimbing Akademik (DPA) yang telah memberikan nasihat dan semangat kepada saya;
6. Bu Wahyu, Bu Indri, Mas Agus dan seluruh staf pengajar dan karyawan di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
7. Kedua orangtua saya tercinta, Ayah Maryani dan Ibu Wahyu Setyorini, serta adik saya Narendra Lungit Prabandaru yang tidak pernah lepas dalam

memberikan doa dan dukungan terbaiknya dalam proses penyusunan skripsi ini hingga selesai;

8. Teman-teman satu tim penelitian: Dhesyarmani Putri R., Lutfi Meiga Sari, Khoirul Amalia, dan Anjani Ajeng, yang berjuang bersama dari awal dan saling membantu hingga skripsi ini terselesaikan dengan baik;
9. Teman-teman Dextra FKG angkatan 2016, yang telah memberikan semangat, bantuan, apresiasi, dan kerja samanya;
10. Teman-teman FKG seperjuangan saya dalam suka dan duka: Pramita, Dinda Atika, Choridatul Aini, dan Reganita; serta teman-teman seperjuangan di Laboratorium Histologi: Astrid, Pintan, Syafira, Okky, Savira, Favinas, Septiana, dan Innanisa;
11. Sahabat yang saya sayangi: Ayu Kristina, Isna Yulia Agustin, Jihan Noviantika, Ikhwan Abu Zakaria, Nur'aini Elita Putri, Feby Widyaningsih, dan Rurin Nur Maidah yang selalu setia menemani, memberikan semangat, motivasi, nasihat, apresiasi, serta selalu ada dalam suka dan duka;
12. M. Yulis Pratama Putra yang selalu meluangkan waktu untuk memberikan dukungan, semangat, motivasi, dan bantuan penuhnya untuk saya;
13. Semua pihak yang telah mendukung terselesainya skripsi ini yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Penulis berharap, semoga skripsi ini bermanfaat untuk semua pembacanya.

Jember, 21 April 2020

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Disfungsi Ovarium.....	5
2.2 Periodontitis	7
2.2.1 Definisi Periodontitis.....	7
2.2.2 Etiopatologi	8
2.2.3 Faktor Resiko.....	8
2.2.4 Gejala dan Gambaran Klinis	10
2.2.5 Patogenesis Periodontitis.....	11
2.3 <i>Porphyromonas gingivalis</i>	12
2.3.1 Klasifikasi <i>Porphyromonas gingivalis</i>	12

2.3.2	Morfologi <i>Porphyromonas gingivalis</i>	13
2.3.3	Mekanisme <i>Porphyromonas gingivalis</i> dalam Menyebabkan Periodontitis.....	13
2.4	Matriks Metalloproteinase (MMP)	14
2.5	Singkong (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)	16
2.5.1	Taksonomi Singkong.....	16
2.5.2	Bagian Tubuh Singkong	17
2.5.3	Kandungan Daun Singkong.....	18
2.6	Kerangka Konsep.....	21
2.7	Penjelasan Kerangka Konsep.....	22
2.8	Hipotesis.....	24
BAB 3.	METODE PENELITIAN	25
3.1	Jenis Penelitian.....	25
3.2	Tempat dan Waktu Penelitian	25
3.3	Identifikasi Variabel Penelitian.....	26
3.3.1	Variabel Bebas	26
3.3.3	Variabel Terikat.....	26
3.3.3	Variabel Terkendali	26
3.4	Definisi Operasional Penelitian.....	26
3.4.1	Ekstrak Daun Singkong.....	26
3.4.2	Ekspresi MMP-8	26
3.4.3	Bakteri <i>Porphyromonas gingivalis</i>	27
3.4.4	Induksi Bakteri <i>Porphyromonas gingivalis</i>	27
3.4.5	Metode Ovariectomi.....	27
3.5	Populasi dan Sampel	28
3.5.1	Populasi Penelitian	28
3.5.2	Kriteria Sampel	28
3.5.3	Besar Sampel Penelitian.....	28
3.5.4	Pembagian Kelompok Penelitian	29
3.6	Alat dan Bahan Penelitian	30

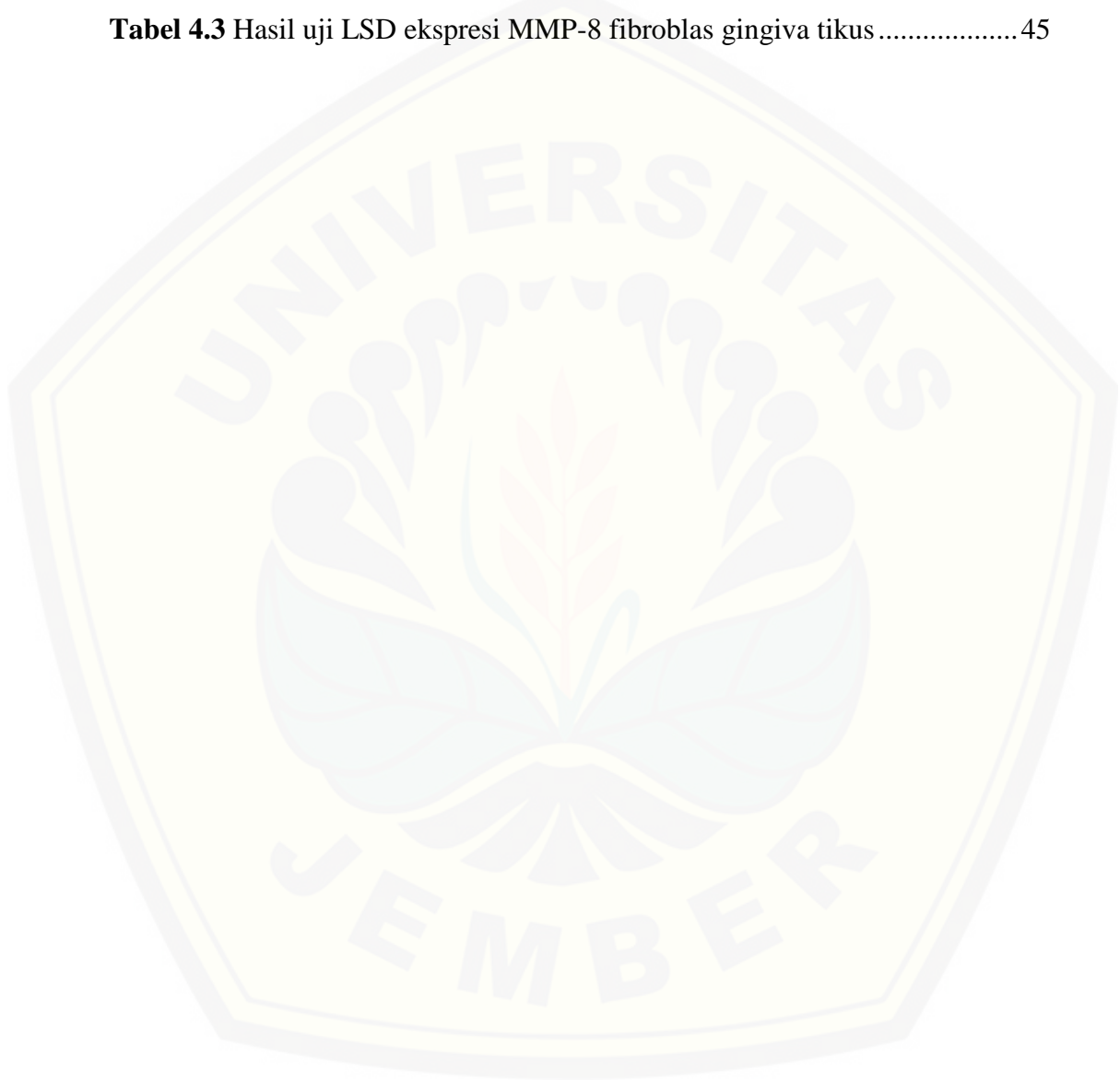
3.6.1	Alat Penelitian	30
3.6.2	Bahan Penelitian	30
3.7	Prosedur Penelitian	30
3.7.1	<i>Ethical Clearence</i>	30
3.7.2	Identifikasi Tanaman	31
3.7.3	Identifikasi <i>P.gingivalis</i>	31
2.7.4	Pembuatan Suspensi <i>P.gingivalis</i>	31
3.7.5	Pembuatan Ekstrak Flavonoid Daun Singkong	32
3.7.6	Persiapan Hewan Coba	32
3.7.7	Pembuatan Model Tikus Disfungsi Ovarium dengan Metode Ovariectomi	32
3.7.8	Pembuatan Model Tikus Periodontitis	33
3.7.9	Aplikasi Ekstrak Flavonoid Daun Singkong	34
3.7.10	ahap Euthanasia	35
3.7.11	Tahap Dekalsifikasi Jaringan	36
3.7.12	Pembuatan Preparat Histologi	36
3.8	Penghitungan Ekspresi MMP-8	39
3.9	Analisis Data	39
3.10	Alur Penelitian	40
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	41
4.1	Hasil Penelitian	41
4.2	Analisis Data	44
4.3	Pembahasan	46
BAB 5.	KESIMPULAN DAN SARAN	50
DAFTAR PUSTAKA	51
LAMPIRAN	62

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Gambaran Klinis Periodontitis	11
Gambar 2.2 <i>Porphyromonas gingivalis</i>	14
Gambar 2.3 Ekspresi MMP-8 fibroblas.....	16
Gambar 2.4 Pohon singkong	17
Gambar 2.5 Daun singkong (<i>Manihot esculenta</i> Crantz).....	18
Gambar 2.6 Kerangka Konsep Penelitian.....	21
Gambar 3.1 Alur Penelitian	40
Gambar 4.1 Gambaran histologi preparat jaringan gingiva	41
Gambar 4.2 Gambaran histologi preparat jaringan gingiva	42
Gambar 4.3 Gambaran ronsenologis jaringan periodontal kelompok tikus diinduksi <i>P.gingivalis</i> dan disfungsi ovarium.....	43
Gambar 4.4 Diagram Batang Rata-Rata Hasil Ekspresi MMP-8 Fibroblas Gingiva Tikus	44

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1 Tabel Konversi Dosis Hewan Coba dan Manusia.....	34
Tabel 4.1 Rata-rata hasil ekspresi MMP-8 fibroblas gingiva tikus	43
Tabel 4.2 Hasil uji <i>One-way Anova</i> ekspresi MMP-8 fibroblas gingiva tikus.	45
Tabel 4.3 Hasil uji LSD ekspresi MMP-8 fibroblas gingiva tikus	45



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Alat dan Bahan Penelitian	62
Lampiran 2. Prosedur Penelitian	63
Lampiran 3. Rata-rata Hasil Penghitungan Ekspresi MMP-8.....	72
Lampiran 4. Analisis data.....	73
Lampiran 5. Surat Keterangan Identifikasi Tumbuhan.....	75
Lampiran 6. <i>Ethical Clearance</i>	76
Lampiran 7. Surat Izin Penelitian Laboratorium Farmakologi	77
Lampiran 8. Surat Izin Penelitian Laboratorium Mikrobiologi	78
Lampiran 9. Surat Izin Penelitian Laboratorium Histologi.....	79

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Disfungsi ovarium merupakan kondisi yang berhubungan dengan anovulasi yang dapat menyebabkan gangguan pola menstruasi sebagai proses penuaan wanita melalui fase pramenopause, menopause dan postmenopause (Sari *et al.*, 2017; Koeryaman dan Ermiati, 2018). Menopause merupakan suatu fase dalam kehidupan wanita yang ditandai dengan berhentinya periode menstruasi selama 12 bulan terakhir pada usia rata-rata 45 tahun (Hameed dan Yenzeel, 2018). Keadaan menopause ini merupakan fase transisi bagi wanita dengan hilangnya fungsi ovarium, yaitu mengalami penurunan kemampuan dalam merespon rangsangan hormon hipofisis untuk menghasilkan hormon steroid, sehingga dapat menimbulkan defisiensi hormon estrogen dan progesteron (Zulkarnain, 2014; Kitajima *et al.*, 2015; Wulandari, 2015).

Hormon estrogen dan progesteron merupakan jenis hormon steroid yang mengendalikan fungsi reproduksi dan memiliki efek penting pada kondisi rongga mulut termasuk jaringan periodontal (Utami *et al.*, 2016). Hormon estrogen dan progesteron terbukti berpengaruh pada jaringan gingiva, yaitu pada differensiasi dan pertumbuhan seluler keratinosit dan fibroblas, serta dapat mengubah efektivitas barrier epitel terhadap bakteri. Hormon estrogen dan progesteron juga berperan dalam perbaikan kolagen yang merupakan elemen utama pembentuk ligamen periodontal yang disintesis oleh sel fibroblas gingiva (Erawati *et al.*, 2006).

Penurunan kadar estrogen pada saat menopause memiliki efek pada pengurangan keratinisasi epitel gingiva dan mempengaruhi metabolisme kolagen. Penurunan hormon estrogen dapat menyebabkan berkurangnya pembentukan kolagen tipe I yang merupakan komponen matriks ekstraseluler gingiva yang utama, dan penurunan ketebalan gingiva, sehingga memudahkan terjadinya inflamasi. Defisiensi estrogen pada fase menopause menyebabkan peningkatan produksi *Tumor Necrosis Factor* (TNF) oleh sel T yang teraktivasi, sedangkan

defisiensi progesteron dapat menyebabkan penurunan perbaikan dan pemeliharaan gingiva (Erawati *et al.*, 2006; Fitri *et al.*, 2014).

Peningkatan produksi TNF diinduksi oleh defisiensi estrogen melalui mekanisme yang melibatkan sitokin yang kemudian memicu produksi prostaglandin, osteoklas, dan matriks metalloproteinase (MMP). MMP adalah endopeptidase yang bertanggung jawab dalam proses fisiologis maupun patologis, seperti degradasi matriks ekstraseluler (ECM) yang meliputi kolagen, elastin, gelatin, matriks glikoprotein dan proteoglikan (Balli *et al.*, 2016).

MMP-8 adalah MMP yang menjadi biomarker jaringan periodontal. MMP-8 merupakan MMP kolagenolitik utama yang terdeteksi dalam jaringan gingiva dan cairan oral (80% dari kolagenase dalam GCF). MMP-8 diproduksi terutama di sumsum tulang dan diekspresikan dalam neutrofil, fibroblas gingiva, sel endotel, sel epitel, sel plasma, makrofag, dan sel tulang (Ríos *et al.*, 2016). Fibroblas memainkan peran penting dalam pergantian matriks normal serta dalam deposisi atau degradasi matriks, misalnya, selama fibrosis (Lindner *et al.*, 2012). Ekspresi dan aktivasi MMP terhadap kerusakan jaringan periodontal yang menurunkan matriks jaringan ikat ini dirangsang oleh TNF- α (Anbinder *et al.*, 2016). Ketika konsentrasi TNF- α meningkat, maka produksi MMP juga akan semakin tinggi. Konsentrasi TNF- α dalam sampel serum dan biopsi jaringan gingiva pada pasien dengan periodontitis lebih tinggi dibandingkan dengan orang sehat (Anbinder *et al.*, 2016).

Periodontitis merupakan salah satu penyakit pada jaringan periodontal yang disebabkan oleh bakteri Gram negatif seperti *Porphyromonas gingivalis*. Komponen bakteri dari periodontopatogen, seperti lipopolisakarida (LPS), peptidoglikan, asam lipoteichoic, dan protease, dapat menginduksi peradangan. LPS yang dihasilkan oleh bakteri Gram negatif akan mengaktifkan respon imun. Makrofag akan memicu pelepasan TNF- α yang berkontribusi terhadap degradasi jaringan dan resorpsi tulang yaitu dengan menstimulasi pembentukan MMP (Prasetyaningrum *et al.*, 2018; Garcia *et al.*, 2019).

Berbagai kondisi negatif yang dialami tubuh pada fase menopause dan periodontitis dapat dicegah ataupun diperlambat dengan bahan alam yang

berperan sebagai antiinflamasi. Bahan alam tersebut salah satunya adalah daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz). Singkong merupakan tanaman pangan tahunan di daerah tropis yang tumbuh dan beradaptasi dengan baik menghadapi perubahan iklim. Batang, daun, dan umbi singkong juga dapat dimanfaatkan untuk berbagai industri, khususnya pada daunnya yang dapat digunakan sebagai makanan dan diolah menjadi obat herbal (Restiani *et al.*, 2014; Soto *et al.*, 2015; Hasim *et al.*, 2016; Saddamiah, *et al.*, 2017). Daun singkong memiliki kandungan senyawa flavonoid, vitamin C, triterpenoid, tannin, serta saponin (Yendriwati, 2006; Meilawaty, 2013). Ekstrak daun singkong yang dipakai dalam penelitian ini adalah sebesar 179,2 mg/kgBB, sesuai dengan penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Nisa *et al.* (2013) dan Meilawaty dan Kusumawardani (2016) menunjukkan bahwa ekstrak daun singkong 179,2 mg/kgBB memiliki efek antiinflamasi dan efektif menurunkan ekspresi TNF- α (Nisa *et al.*, 2013; Meilawaty dan Kusumawardani, 2016).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka didapatkan rumusan masalah, yaitu bagaimana potensi ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) terhadap ekspresi MMP-8 fibroblas pada model tikus disfungsi ovarium dan periodontitis.

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) terhadap ekspresi MMP-8 fibroblas pada model tikus disfungsi ovarium dan periodontitis.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian yang diharapkan penulis antara lain:

1. Mengetahui potensi ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) terhadap ekspresi MMP-8 fibroblas pada model tikus disfungsi ovarium dan periodontitis, serta manfaatnya sebagai antiinflamasi.

2. Memberikan informasi mengenai efek perubahan hormon yang disebabkan karena disfungsi ovarium terhadap jaringan periodontal.
3. Memberikan informasi untuk penelitian selanjutnya tentang pengobatan herbal dengan menggunakan kandungan senyawa spesifik dari daun singkong.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Disfungsi Ovarium

Disfungsi ovarium merupakan kondisi yang berhubungan dengan gangguan pola menstruasi pada wanita, yaitu terjadi transisi dari tahap reproduktif ke nonreproduktif melalui tahapan fase awal pramenopause, menopause dan postmenopause (Sari *et al.*, 2017; Koeryaman dan Ermiami, 2018). Menopause merupakan kondisi berhentinya menstruasi secara spontan dan permanen selama 12 bulan terakhir yang mengakibatkan hilangnya perkembangan folikel ovarium (Dalal dan Agarwal, 2015).

Perubahan hormon dan kimia terbukti terjadi dalam tubuh wanita sebagai akibat dari menopause. Ketidakseimbangan hormon ini terjadi akibat penghentian fungsi ovarium secara permanen (Doshi dan Agarwal, 2013). Jumlah folikel selama masa reproduksi berkurang secara bertahap akibat dari ovulasi. Penurunan jumlah folikel ini menyebabkan penurunan kadar inhibin B, sehingga umpan balik negatif ke hipofisis pun berkurang. Produksi *follicle-stimulating hormone* (FSH) yang meningkat menyebabkan jumlah folikel yang direkrut menjadi lebih besar, sehingga mempercepat kehilangan folikel ovarium. Folikel yang tersisa tidak bisa merespon FSH. Hal ini menyebabkan jumlah sel granulosa berkurang. Penurunan jumlah sel granulosa ini menyebabkan kadar estrogen mengalami penurunan sehingga pada akhirnya tidak terjadi ovulasi yang mengakibatkan menghilangnya siklus menstruasi pada wanita (Sugiritama dan Adiputra, 2019).

FSH diproduksi dari kelenjar hipofisis anterior yang kemudian merangsang sel granulosa ovarium untuk mensintesis estrogen. Penurunan estrogen pada masa menopause menyebabkan reaksi umpan balik terhadap hipotalamus menjadi berkurang, sehingga terjadi peningkatan sekresi FSH dan *luteinizing hormone* (LH). Wanita menopause, seiring dengan penurunan kadar hormon estrogen tersebut, akan mengalami berbagai keluhan, seperti kekeringan pada vagina, *hot flashes*, berkeringat pada malam hari, gangguan tidur, dan perubahan suasana hati (Edwards, *et al.*, 2019).

Hormon estrogen dan progesteron memiliki pengaruh pada pertumbuhan seluler fibroblas serta mempengaruhi pemeliharaan dan perbaikan kolagen (Erawati *et al.*, 2006). Hormon estrogen berperan dalam *remodeling* dan perbaikan jaringan periodontal, serta terlibat dalam patogenesis dari kondisi patologis umum yang terkait dengan infiltrasi leukosit dan disfungsi imunologis (Stygar, *et al.*, 2007), sedangkan progesteron memiliki efek sistemik dan lokal, yaitu memicu metabolisme katabolik, melemaskan sel-sel otot polos, meningkatkan ekskresi kalsium dan fosfor, memiliki efek sedatif dan analgesik, meningkatkan memori visual dan meningkatkan proliferasi dan differensiasi osteoblas (Regidor, 2014).

Penurunan estrogen menimbulkan berbagai permasalahan meliputi gangguan kognitif, penurunan memori, psikologis dan perubahan fisiologis yang disebabkan oleh atrofi urogenital sehingga dapat menyebabkan sejumlah gangguan patologis (Kitajima, 2015; Zulkarnain, 2014). Defisiensi estrogen pada fase menopause menyebabkan peningkatan produksi TNF oleh sel T yang teraktivasi. Peningkatan produksi TNF ini diinduksi oleh defisiensi estrogen melalui mekanisme yang melibatkan sitokin yang kemudian memicu produksi prostaglandin, osteoklas, dan MMP (Balli *et al.*, 2016). Defisiensi estrogen menunjukkan penurunan keratinisasi epitel gingiva marginal serta menyebabkan pembentukan kolagen pada jaringan ikat berkurang sehingga menurunkan ketebalan epitel gingiva dan deskuamasi jaringan gingiva (Erawati *et al.*, 2006; Hariri dan Alzoubi, 2017).

Penelitian Amadei *et al.* (2011) menunjukkan bahwa defisiensi estrogen menghasilkan kehilangan tulang yang diinduksi ligatur yang lebih besar pada tikus yang diberikan defisiensi estrogen selama 90 hari. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa defisiensi estrogen pada tikus selama 81 hari menghasilkan kehilangan tulang alveolar yang signifikan pada periodontitis eksperimental ketika tikus dibandingkan dengan tikus yang cukup estrogen. Temuan ini secara histologis terdapat di daerah furkasi molar mandibula pertama (Amadei *et al.*, 2011).

Reaksi inflamasi dan aktivasi sistem imun bawaan dapat dirangsang oleh akumulasi bakteri lokal. Sel-sel kekebalan mengeluarkan sitokin yang

meningkatkan pematangan osteoklas. Hal ini menyebabkan metabolisme tulang menjadi tidak seimbang, namun proses ini membutuhkan waktu untuk terjadi. Periodontitis menyebabkan peningkatan jumlah osteoklas secara signifikan. IL-6 dan IL-1 dalam sel-sel sumsum tulang dikenal untuk merangsang resorpsi tulang osteoklastik pada kondisi defisiensi estrogen. Penelitian yang dilakukan oleh Xu *et al.* (2015) menunjukkan bahwa ovariektomi mengakibatkan kerusakan mikroarsitektur tulang alveolar, reduksi *alveolar crest height* (ACH), penurunan laju pembentukan tulang dan peningkatan aktivitas osteoklas, sehingga dapat disimpulkan bahwa osteoporosis pascamenopause berdampak pada perkembangan periodontitis (Amadei *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2015).

2.2 Periodontitis

2.2.1 Definisi Periodontitis

Periodontitis adalah penyakit inflamasi pada jaringan pendukung gigi yang disebabkan oleh akumulasi plak subgingiva dan bakteri patogenik periodontal tertentu (Mesa *et al.*, 2019). Periodontitis disebabkan oleh kelompok mikroorganisme yang mengakibatkan penghancuran progresif ligamentum periodontal dan tulang alveolar dengan pembentukan poket dan resesi gingiva (Elisabetta, 2010; Rohmawati dan Santik, 2019). Menurut Aljehani (2014), periodontitis adalah salah satu penyakit yang ditandai oleh penghancuran jaringan ikat dan jaringan pendukung gigi setelah respons host inflamasi sekunder akibat infeksi oleh bakteri periodontal. Periodontitis menyebabkan destruksi jaringan yang permanen yang dikarakteristikan dengan inflamasi kronis, kehilangan perlekatan dan kehilangan tulang alveolar (Quamilla, 2016). Klasifikasi periodontitis berdasarkan gejala klinis, gambaran radiografis, riwayat penyakit dan pemeriksaan laboratorium meliputi periodontitis kronis, periodontitis agresif, dan periodontitis yang merupakan manifestasi dari penyakit sistemik (Elkhaira *et al.*, 2020).

2.2.2 Etiopatologi

Periodontitis merupakan suatu kondisi infeksi yang disebabkan oleh patogen tertentu, seperti *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum* dan sebagainya. Cairan krevikular gingiva mengandung mediator inflamasi dan patogen oral yang berhubungan dengan periodontitis. Mekanisme proses destruktif melibatkan kerusakan jaringan langsung yang dihasilkan dari produk bakteri plak dan kerusakan jaringan tidak langsung melalui induksi bakteri dari respon inflamasi dan imun host (Abiodun *et al.*, 2012). Respon inflamasi ini mengaktifkan mediator inflamasi yang berkontribusi terhadap degradasi jaringan dan resorpsi tulang, seperti sitokin yang merupakan komponen penting proses inflamasi pada periodontitis, yaitu berupa IL-1, IL-6, IL-17, dan TNF- α yang terlibat dalam imunopatologi penyakit ini (Garcia, 2019).

2.2.3 Faktor Resiko

a. Faktor Risiko yang Dapat Diubah

1) Mikroorganisme

Bakteri oral mencakup sekitar 400 spesies yang ditemukan dalam plak subgingiva. Plak gigi adalah substansi yang terstruktur, lunak, berwarna kuning, yang melekat pada permukaan gigi. Plak subgingiva dari poket periodontal didominasi oleh bakteri anaerob Gram negatif berbentuk batang dan spirochetes, yaitu *Porphyromonas gingivalis* (Quamilla, 2016).

2) Rokok

Merokok tembakau memberikan efek destruktif yang substansial pada jaringan periodontal dan meningkatkan laju perkembangan penyakit periodontal. Faktor risiko merokok tembakau ini memodifikasi respons inang terhadap bakteri dalam plak gigi. Reseptor nikotin asetilkolin telah ditemukan memainkan peran penting dalam perkembangan periodontitis (Aljehani, 2014).

3) Diabetes Mellitus

Salah satu tanda oral pada penderita diabetes adalah gingivitis dan periodontitis. Pasien dengan diabetes mellitus tipe 1 atau tipe 2 yang tidak terkontrol, memiliki risiko lebih tinggi mengalami penyakit periodontal. Ada banyak penelitian yang menunjukkan hubungan antara penyakit diabetes mellitus dan peningkatan kerentanan terhadap infeksi mulut termasuk penyakit periodontal (Aljehani, 2014)

4) Penyakit Kardiovaskular

Beberapa mekanisme biologis menjelaskan hubungan antara penyakit periodontal dan penyakit kardiovaskular. Periodontitis dapat menimbulkan respons inflamasi sistemik (Aljehani, 2014)

5) Stres

Pasien dengan perilaku stres yang tidak memadai (*defensive coping*) memiliki risiko yang lebih besar untuk mengalami penyakit periodontal. Stres dikaitkan dengan kebersihan mulut yang buruk, peningkatan sekresi glukokortikoid yang dapat menekan fungsi kekebalan tubuh, meningkatkan resistensi insulin, dan berpotensi meningkatkan risiko periodontitis (Aljehani, 2014).

b. Faktor Risiko Tidak Dapat Diubah

1) Osteoporosis

Osteoporosis merupakan penyakit yang berkaitan dengan kehilangan tulang alveolar crest yang parah, periodontitis, dan kehilangan gigi pada wanita pascamenopause. Banyak penelitian menunjukkan ada hubungan antara osteoporosis dan kehilangan tulang postmenopause yang dapat menyebabkan osteopenia gigi yang melibatkan rahang, khususnya mandibula (Aljehani, 2014).

2) Kelainan Hematologi

Pertumbuhan berlebih pada gingiva dengan atau tanpa nekrosis adalah manifestasi awal umum dari leukemia akut, sedangkan pasien dengan leukemia kronis dapat mengalami perubahan periodontal yang serupa.

Kemoterapi atau terapi yang berhubungan dengan transplantasi sumsum tulang juga dapat mempengaruhi kesehatan gingiva (Aljehani, 2014)

3) Respon Host

Periodontitis kronis melibatkan interaksi kompleks antara faktor-faktor mikroba dan host. Komponen bakteri seperti lipopolisakarida mengaktifkan makrofag untuk menghasilkan sitokin seperti IL-1 dan TNF. Sitokin ini mengaktifkan fibroblas yang berada di jaringan periodontal ke MMP, aktivator plasminogen, yang dapat mengaktifkan plasmin. MMP yang berlebihan dapat menginduksi peningkatan degradasi kolagen, yang merupakan komponen utama dari matriks periodontal. MMP-8 dan MMP-9 bertanggung jawab atas sebagian besar kerusakan yang disebabkan oleh respons host. MMP-13 juga memfasilitasi resorpsi tulang dengan menurunkan matriks kolagen tulang setelah tulang didemineralisasi oleh osteoklas (Aljehani, 2014).

4) Perubahan Hormon Wanita

Fluktuasi hormonal pada pasien wanita selama masa pubertas, siklus menstruasi, kehamilan, atau menopause dapat mengubah status kesehatan periodontal (Aljehani, 2014). Periodontitis dapat muncul pada masa menopause yang dipengaruhi oleh perubahan hormon seks, yaitu estrogen, progesteron, dan hormon wanita lainnya yang memiliki efek pada IL-1, IL-6, dan sekresi TNF- α , yang merupakan sitokin proinflamasi dalam proses resorpsi tulang dan reaksi inflamasi periodontal (Aljehani, 2014).

2.2.4 Gejala dan Gambaran klinis

Periodontitis merupakan penyakit yang sering tidak menimbulkan keluhan rasa sakit sehingga sering ditemukan dalam keadaan lanjut. Gejala periodontitis pada beberapa laporan kasus antara lain terlihat peradangan pada jaringan gingiva, berupa warna gingiva yang lebih merah daripada gingiva yang sehat, perdarahan spontan yang sering terjadi saat menyikat gigi, gingiva sering bengkak tapi kemudian sembuh sendiri, dan gigi terasa goyang. Gejala periodontitis yang tidak diobati dan dilakukan perawatan dapat menyebabkan longgarnya jaringan

periodontium, migrasi gigi, gangguan pengunyahan dan estetika, serta kehilangan gigi (Susilawati, 2011; Abiodun *et al.*, 2012; Kiswaluyo, 2013; Saputri dan Masulili, 2015; Andriani dan Chairunnisa, 2019).

Gambaran klinis dari periodontitis adalah adanya akumulasi plak, pembentukan kalkulus, kemerahan dan pembengkakan gingiva, perdarahan atau supurasi gingiva yang dapat terjadi baik secara spontan atau ketika probing, kehilangan *stippling* gingiva, kehilangan perlekatan gingiva, mengalami peningkatan kedalaman celah gingiva yang menghasilkan pembentukan poket periodontal patologis, terjadi migrasi epitel jungsional ke arah akar gigi, dan paparan akar akibat resesi gingiva. Gambaran klinis periodontitis ditunjukkan pada Gambar 2.1 di bawah ini (Abiodun *et al.*, 2012; Carranza *et al.*, 2012).



Gambar 2.1 Gambaran Klinis Periodontitis (Carranza *et al.*, 2012).

2.2.5 Patogenesis Periodontitis

Tahap awal perkembangan periodontitis adalah inflamasi pada gingiva sebagai respon terhadap invasi bakteri. Periodontitis terkait dengan adanya plak subgingiva yang meluas ke dalam sulkus gingiva yang dapat mengganggu perlekatan bagian korona epitelium dari permukaan gigi. Mikroorganisme yang terdapat di dalam plak subgingiva seperti *Porphyromonas gingivalis* akan mengaktifkan respon imun terhadap patogen periodontal dengan merekrut

neutrofil, makrofag dan limfosit ke sulkus gingiva untuk menjaga jaringan dan mengontrol perkembangan bakteri (Quamilla, 2016).

Sitokin, termasuk IL-17 atau TNF- α , memiliki peran kunci dalam resorpsi tulang alveolar periodontal. IL-17 meningkatkan aktivator reseptor ekspresi ligan faktor kappa-B dalam osteoblas dan sel T CD4+ dan mempromosikan resorpsi alveolar ketika dilepaskan dalam jumlah berlebihan. TNF- α secara langsung berkontribusi terhadap kerusakan periodontal melalui efeknya pada osteoklastogenesis, melalui amplifikasi reaksi imun inflamasi. Hal ini berkaitan juga dengan defisiensi estrogen saat menopause pada wanita. Defisiensi estrogen ini terkait dengan peningkatan kadar IL-17 atau TNF- α sistemik, sehingga dapat meningkatkan resorpsi tulang alveolar. Respon host yang tidak adekuat dalam menghancurkan bakteri dapat menyebabkan destruksi jaringan periodontal (Xu *et al.*, 2015; Quamilla, 2016).

Tahap destruksi jaringan merupakan tahap transisi dari gingivitis ke periodontitis. Destruksi jaringan periodontal terjadi ketika terdapat gangguan pada keseimbangan jumlah bakteri dengan respon host. Hal ini dapat terjadi akibat host sangat rentan terhadap infeksi periodontal atau host terinfeksi bakteri dalam jumlah yang besar. Sistem imun berusaha menjaga host dari infeksi ini dengan mengaktifasi sel imun seperti neutrofil, makrofag, dan limfosit untuk memerangi bakteri. Makrofag dan fibroblas gingiva distimulasi untuk memproduksi MMP dan prostaglandin E2 (PGE₂) oleh mediator proinflamasi, seperti IL-1 β dan TNF- α . Peningkatan kadar aMMP-8 dalam saliva dan *gingiva crevicular fluid* (GCF), ditemukan terkait dengan parameter periodontal klinis, yaitu kedalaman poket, perdarahan saat probing, dan kehilangan perlekatan klinis. PGE₂ memediasi destruksi tulang dan menstimulasi osteoklas dalam jumlah besar untuk meresorpsi puncak tulang alveolar (Panche *et al.*, 2016; Quamilla, 2016; Majid *et al.*, 2018).

2.3 *Porphyromonas gingivalis*

2.3.1 Klasifikasi *Porphyromonas gingivalis*

Porphyromonas gingivalis merupakan bakteri yang diklasifikasikan dalam kingdom *Bacteria*, subkingdom *Negibacteria*, filum *Bacteroidetes*, klas

Bacteriodia, order *Bacteriales*, famili *Porphyromonadaceae*, genus *Porphyromonas*, spesies *Porphyromonas gingivalis* (Kusumawardani *et al.*, 2010; Integrated Taxonomic Information System, 2012).

2.3.2 Morfologi *Porphyromonas gingivalis*

Porphyromonas gingivalis merupakan bakteri Gram negatif, berpigmen hitam, asakarolitik dan anaerob, sebagai anggota penting mikrobiota periodontopatik yang terlibat dalam perkembangan penyakit periodontal dan kerusakan tulang dan jaringan. *P. gingivalis* menghasilkan serangkaian faktor virulensi potensial, diantaranya adalah lipopolisakarida, kapsul, hemaglutinin, fimbriae, protein serB, dan protease sistein yang disebut "gingipain" (Mysak *et al.*, 2014).

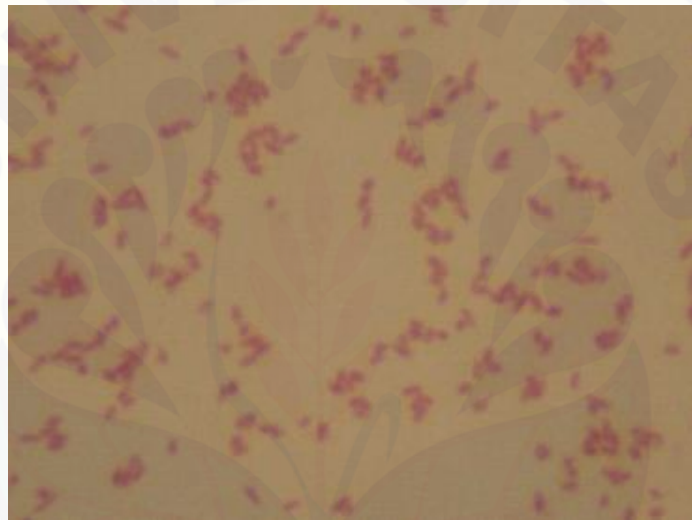
2.3.3 Mekanisme *Porphyromonas gingivalis* dalam Menyebabkan Periodontitis

Porphyromonas gingivalis dapat mensintesis kapsul ekstraseluler, terdiri dari polisakarida bermuatan negatif yang memungkinkan bakteri ini menahan fagositosis. Faktor virulensi bakteri penting lainnya adalah fimbriae yang merupakan komponen berfilamen pada permukaan sel, dan protein subunitnya, fimbrillin (FimA), bekerja pada interaksi bakteri dengan jaringan inang dengan memediasi adhesi bakteri dan kolonisasi di lokasi sasaran. Fibroblas gingiva, yang merupakan konstituen utama dari jaringan ikat gingiva, dapat langsung berinteraksi dengan *Porphyromonas gingivalis* dan LPS pada lesi periodontitis (Mysak *et al.*, 2014).

LPS yang dilepaskan berikatan dengan *Lipopolysaccharide Binding Protein* (LBP) yang kemudian membentuk suatu kompleks molekul. Kompleks molekul ini akan dikenali oleh CD14 yang berada dipermukaan sel target, kemudian dikenali oleh makrofag melalui reseptor TLR4. Reseptor ini akan mengaktifkan makrofag sebagai respons imun adaptif dengan pembentukan

sitokin *proinflammatory*. Sitokin yang dihasilkan oleh makrofag yaitu IL-1 dan TNF (Yustina *et al.*, 2012).

Konsentrasi tinggi dari MMP-8, IL-1 β , dan *Porphyromonas gingivalis* berhubungan dengan poket periodontal yang dalam dan kehilangan tulang alveolar dengan perdarahan saat probing (Mysak *et al.*, 2014). Secara histologi, identifikasi biokimiawi bakteri anaerob digambarkan pada Gambar 2.2. Warna gelap pada pusatnya disebabkan oleh karena produksi protoheme, suatu substansi yang bertanggungjawab terhadap tipikal warna koloni bakteri ini (Kusumawardani *et al.*, 2010).



Gambar 2.2 *Porphyromonas gingivalis* (Kusumawardani *et al.*, 2010).

2.4 Matriks Metalloproteinase (MMP)

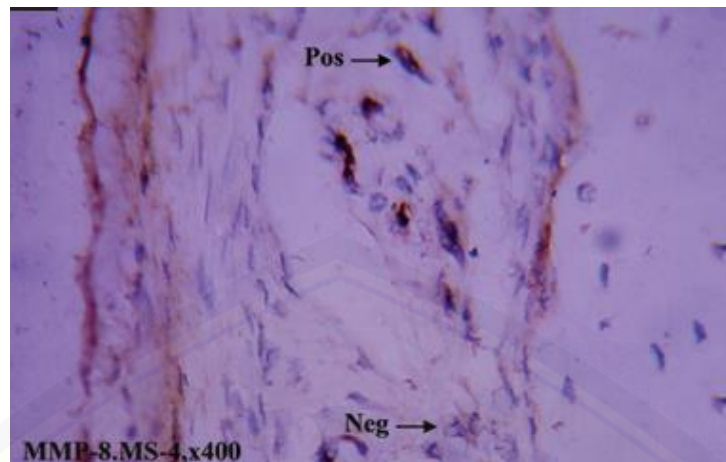
Matriks metalloproteinase (MMP) adalah kelompok endopeptidase yang memainkan peran penting dalam degradasi ekstraseluler matriks fisiologis dan patologis. MMP terdiri dari 23 anggota protein, yang memiliki kemampuan untuk mendegradasi hampir semua komponen struktural dari matriks ekstraseluler. MMP dianggap sebagai pengatur utama degradasi dan remodeling jaringan, serta memainkan peran penting dalam regulasi osteogenesis dan remodeling tulang selama embriogenesis, remaja, dan penyembuhan tulang. MMP terdiri dari kolagenase (MMP-1, MMP-8, MMP-13, dan MMP-18), gelatinase (MMP-2 dan MMP-9), stromelysins (MMP-3, MMP-10, MMP -11, dan MMP-17), matrilysins

(MMP-7 dan MMP-26), tipe membran (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-24, dan MMP-25) dan tipe lainnya (MMP- 12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-22, MMP-28, dan MMP-29) (Alipour *et al.*, 2016).

MMP pada jaringan periodontal dapat dideteksi sesuai dengan status inflamasi. Aktivitas sebagian besar MMP adalah rendah dalam jaringan periodontal normal yang sehat, sedangkan konsentrasi MMP dapat ditemukan lebih banyak pada kondisi jaringan periodontal yang sakit dan inflamasi. Tingkat MMP-8 dan MMP-9 ditemukan meningkat dengan perkembangan penyakit periodontal (Gupta *et al.*, 2018).

MMP kolagenase memainkan peran penting dalam hilangnya dukungan jaringan periodontal dengan adanya penurunan kolagen. MMP utama yang terlibat dalam penghancuran jaringan periodontal adalah MMP-8, MMP-9, dan MMP-13. MMP-8 diproduksi terutama di sumsum tulang dan dapat juga diproduksi oleh berbagai sel, seperti fibroblas gingiva, sel endotel, sel epitel, sel plasma, makrofag, dan sel tulang. MMP-8 dapat memotong struktur tripel heliks dari kolagen asli, sehingga memulai langkah pertama degradasi kolagen. Peningkatan ekspresi MMP-8 dapat meningkatkan differensiasi dan aktivitas osteoklas (Feimeng *et al.*, 2017).

MMP-8 merupakan MMP kolagenolitik utama yang terdeteksi pada jaringan gingiva dan cairan oral yang merupakan biomarker periodontal. MMP-8 dikaitkan dengan diagnosis penyakit periodontal, keparahan peradangan periodontal, dan perkembangannya. MMP-8 juga terbukti sebagai salah satu biomarker saliva terkuat untuk mendeteksi kerusakan tulang alveolar (Ríos, *et al.*, 2016). Penelitian Narmada *et al.*, 2020 menunjukkan bahwa terdapat ekspresi MMP-8 fibroblas ligamen periodontal karena adanya tekanan ortodontik. MMP-8 dianggap sebagai tanda adanya peradangan yang parah. Ekspresi MMP-8 fibroblas pada jaringan ligamen periodontal disajikan pada Gambar 2.3 di bawah ini, dengan keterangan Pos (Positif) untuk sel fibroblas yang mengekspresikan MMP-8 dan keterangan Neg (Negatif) untuk sel fibroblas yang tidak mengekspresikan MMP-8.



Gambar 2.3 Ekspresi MMP-8 fibroblas ligamen periodontal (Narmada *et al.*, 2020).

2.5 Singkong (*Manihot esculenta* Crantz)

2.5.1 Taksonomi Singkong

Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) adalah salah satu tanaman dalam famili *Euphorbiaceae* yang tumbuh di Afrika, Karibia, dan Asia yang memiliki konsentrasi karbohidrat tinggi, mudah tumbuh, dan dianggap sebagai tanaman multifungsi. Singkong terdiri atas 45% bagian umbi, 35% bagian batang, dan 20% bagian daun. Klasifikasi tanaman singkong, yaitu:

Kingdom	: <i>Plantae</i> (Tumbuh-tumbuhan)
Divisi	: <i>Spermatophyta</i> (Tumbuhan berbiji)
Subdivisi	: <i>Angiospermae</i>
Class	: <i>Dicotyledoneae</i> (Biji berkeping dua)
Ordo	: <i>Euphorbiales</i>
Familia	: <i>Euphorbiaceae</i>
Genus	: <i>Manihot</i>
Species	: <i>Manihot esculenta</i> Crantz sin. <i>Manihot utilisima</i> (Suprapti, 2005).

Tanaman singkong dapat dilihat pada Gambar 2.4 di bawah ini.



Gambar 2.4 Pohon singkong (*Manihot esculenta* Crantz) (Koh *et al.*, 2009).

2.5.2 Bagian tubuh singkong

Bagian tubuh singkong, terdiri atas:

a. Batang

Batang tanaman singkong berkayu, memiliki ruas dengan ketinggian mencapai lebih dari 3 m, warna batang singkong bervariasi, yaitu umumnya berwarna hijau ketika masih muda menjadi keputih-putihan, kelabu, atau hijau kelabu saat sudah tua (Suprapti, 2005).

b. Bunga

Bunga tanaman singkong berumah satu dengan penyerbukan silang sehingga jarang berbuah. Tanaman singkong memiliki bunga jantan dan bunga betina dalam satu pohon. Bunga singkong mengalami protogini dimana bunga betina pada perbungaan yang sama dengan bunga jantan membuka 1-2 minggu lebih cepat (Alves, 2002; Suprapti, 2005).

c. Umbi

Umbi singkong yang terbentuk merupakan akar yang berfungsi sebagai tempat cadangan makanan. Bentuk umbi singkong biasanya bulat memanjang yang terdiri atas kulit luar tipis berwarna kecoklatan, kulit

dalam agak tebal berwarna keputihan, dan daging berwarna putih atau kuning tergantung varietasnya (Suprapti, 2005).

d. Daun

Daun singkong tersusun menjari 5-9 helai. Daun singkong yang masih muda banyak mengandung sianida, namun dapat dimanfaatkan sebagai sayuran dan digunakan sebagai penetralisir rasa pahit pada sayuran lain, seperti daun pepaya. Daun singkong dapat dilihat sesuai dengan gambaran di bawah ini. Permukaan atas daun dilapisi kutikula yang mengkilap. Stomata terdapat pada bagian bawah (abaksial) daun dan memiliki bentuk parasitik. Panjang tangkai daun biasanya bervariasi antara 5-30 cm (Suprapti, 2005). Gambaran daun singkong dapat dilihat pada Gambar 2.5 di bawah ini.



Gambar 2.5 Daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) (Ramcharan *et al.*, 2017).

2.5.3 Kandungan Daun Singkong

Daun singkong mengandung jumlah protein, asam amino esensial, vitamin B1, B2, dan C dan karoten yang lebih tinggi daripada akar dan konten pati bervariasi dari 7-18g/100g. Daun singkong juga mengandung lebih banyak mineral seperti kalsium, besi, mangan, dan magnesium dan seng. Kandungan besi dalam daun singkong berkisar antara 284-293 mg/kg (Burns *et al.*, 2012). Selain itu, daun singkong juga mengandung kelompok metabolit sekunder polifenol, yaitu flavonoid (Kamboh *et al.*, 2019). Flavonoid dapat dibagi menjadi beberapa subklas sesuai dengan konstituen yang berbeda seperti flavanon, flavon, flavanol

dan flavonol. Flavonoid dapat diserap di lambung dan di usus halus dengan difusi pasif atau transpor aktif (Serafini *et al.*, 2010).

Flavonoid merupakan senyawa dalam kandungan daun singkong yang memiliki efek sebagai antiinflamasi, antibakteri, dan fitoestrogen. Flavonoid dapat menghambat siklooksigenase atau lipooksigenase dan menghambat akumulasi leukosit di daerah inflamasi sehingga dapat berperan sebagai antiinflamasi. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri yaitu dengan cara membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri yang diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler (Ngajow *et al.*, 2013; Ramadhani dan Sumiwi, 2016). Flavonoid juga mempunyai cincin fenolik yang dapat terikat ke reseptor estrogen. Senyawa ini secara struktural menyerupai estrogen dan memiliki aktivitas estrogenik lemah dan dapat digunakan sebagai alternatif terapi sulih hormon pada wanita menopause sehingga dapat memperbaiki gejala menopause (Sunita dan Pattanayak, 2011).

Kandungan lain dari daun singkong adalah saponin, tanin, dan terpenoid. Saponin bekerja sebagai antibakteri dengan mekanisme kerja menurunkan tegangan permukaan sehingga mengakibatkan naiknya permeabilitas atau kebocoran sel dan mengakibatkan senyawa intraseluler akan keluar. Saponin ini berdifusi melalui membran luar dan dinding sel lalu mengikat membran sitoplasma dan mengganggu kestabilannya, sehingga menyebabkan sitoplasma keluar dari sel dan mengakibatkan kematian sel (Nuria *et al.* 2009; Ngajow *et al.*, 2013).

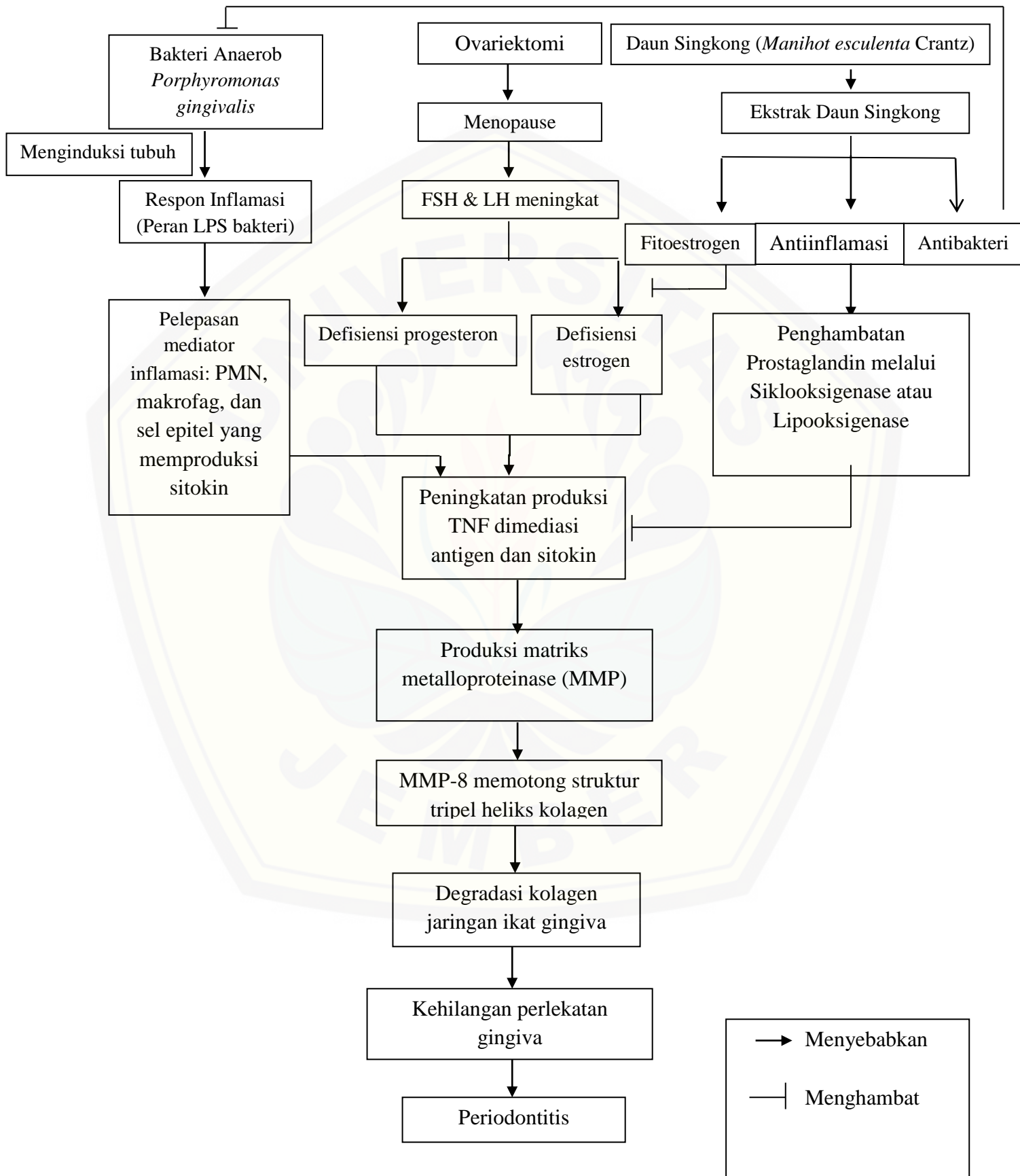
Tanin bekerja sebagai antibakteri dengan jalan menghambat enzim *reverse* transkriptase dan DNA topoisomerase sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk (Nuria *et al.*, 2009; Ngajow *et al.*, 2013). Tanin memiliki aktivitas antibakteri untuk menginaktifkan adhesin sel mikroba dan enzim, serta mengganggu transpor protein pada lapisan dalam sel. Tanin dapat menyebabkan sel bakteri menjadi lisis karena tekanan osmotik maupun fisik sehingga sel bakteri akan mati (Cowan, 1999; Ngajow *et al.*, 2013).

Senyawa terpenoid juga diketahui aktif melawan bakteri. Mekanisme antibakteri terpenoid diduga melibatkan pemecahan membran oleh komponen-

komponen lipofilik. Senyawa fenolik dan terpenoid memiliki target utama yaitu membran sitoplasma yang mengacu pada sifat alamnya yang hidrofobik (Cowan, 1999; Bobbarala, 2012; Ngajow *et al.*, 2013).



2.6 Kerangka Konsep



Gambar 2.6 Kerangka Konsep Penelitian

2.7 Penjelasan Kerangka Konsep

Hewan coba diberikan perlakuan ovariektomi dengan melakukan pemotongan dan pengambilan ovarium sehingga hewan coba akan mengalami disfungsi ovarium. Keadaan disfungsi ovarium ini menyebabkan terjadinya menopause yang ditandai dengan perubahan produksi hormonal, yaitu terjadi peningkatan FSH diikuti oleh peningkatan LH (Doshi dan Agarwal, 2013), serta terjadi penurunan hormon estrogen dan progesteron. Defisiensi estrogen menunjukkan penurunan keratinisasi epitel gingiva marginal dan menyebabkan pembentukan kolagen pada jaringan ikat berkurang sehingga menurunkan ketebalan epitel gingiva (Erawati *et al.*, 2006). Defisiensi estrogen menyebabkan peningkatan produksi TNF yang kemudian memicu produksi prostaglandin, osteoklas, dan MMP. MMP-8 merupakan biomarker jaringan periodontal dan pada saat TNF mengalami peningkatan, maka MMP-8 dapat memotong struktur tripel heliks dari kolagen asli, sehingga memulai langkah pertama degradasi kolagen (Feimeng *et al.*, 2017), dan menyebabkan terjadinya penurunan ketebalan gingiva dan mengakibatkan terjadinya periodontitis (Erawati *et al.*, 2006).

Periodontitis dapat diperparah oleh induksi bakteri anaerob *Porphyromonas gingivalis* dengan produknya berupa lipopolisakarida (LPS) yang berpotensi kuat sebagai stimulator inflamasi. Respon inflamasi dalam tubuh ditandai dengan adanya berbagai mediator, seperti proinflamasi sitokin berupa IL-1, TNF. TNF- α menginduksi MMP yang berperan dalam degradasi kolagen. Jika MMP-8 meningkat, maka degradasi kolagen juga akan meningkat sehingga menyebabkan inflamasi jaringan periodontal (Setia dan Tjitaesmi, 2016).

Singkong memiliki banyak manfaat untuk kesehatan khususnya pada daun singkong yang memiliki banyak kandungan seperti flavonoid, vitamin C, vitamin A, triterpenoid, tannin, saponin, vitamin B1 dan zat besi. Flavonoid pada daun singkong memiliki sifat antiinflamasi, antibakteri, dan sebagai fitoestrogen. Flavonoid mempunyai cincin fenolik yang dapat terikat ke reseptor estrogen. Senyawa ini secara struktural menyerupai estrogen dan memiliki aktivitas estrogenik lemah sehingga dapat memperbaiki gejala menopause (Sunita dan Pattanayak, 2011). Flavonoid memiliki sifat sebagai antiinflamasi. Mekanisme

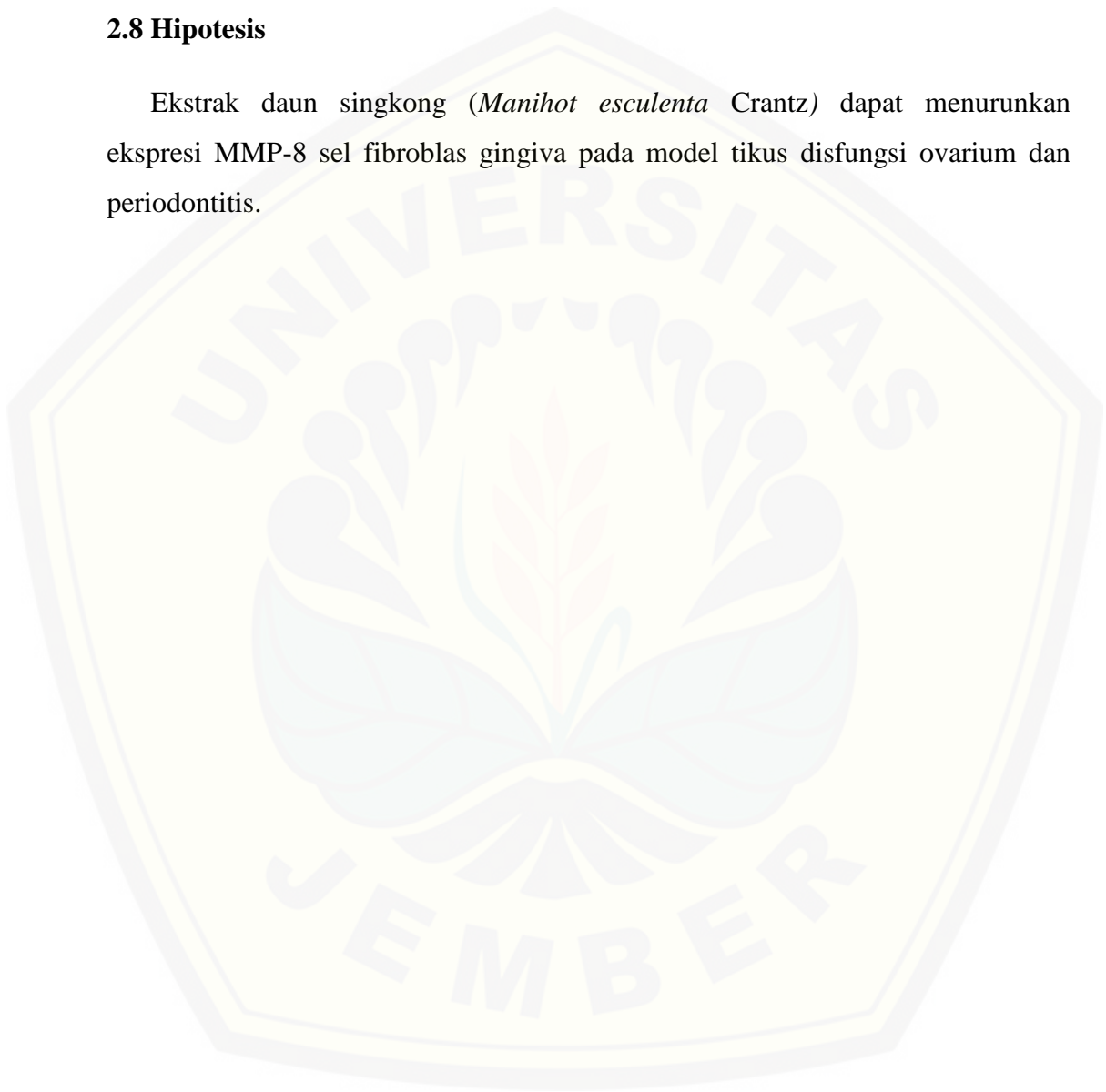
antiinflamasi yang dilakukan oleh flavonoid yaitu melalui jalur penghambatan aktivitas enzim siklooksigenase atau lipooksigenase. Hambatan pada jalur siklooksigenase menyebabkan terjadinya penurunan produksi prostaglandin sehingga akan mengurangi mediator inflamasi, seperti IL-1, IL-6, IL-8, dan TNF- α pada jaringan yang mengalami inflamasi (Tamara *et al.*, 2019). Beberapa kelompok flavonoid, seperti kuersetin dan genistein, diketahui menunjukkan aktivitas seperti hormon dan memiliki kemiripan dengan hormon steroid, termasuk hormon estrogen. Kuersetin dapat menghambat produksi sitokin (IL-1 β , TNF- α). Penurunan TNF- α pada jaringan yang mengalami inflamasi dapat menurunkan stimulasi fibroblas gingiva untuk memproduksi MMP-8 (Napimoga *et al.*, 2013; Resende *et al.*, 2013). Penghambatan yang dilakukan oleh flavonoid ini dapat menurunkan gejala inflamasi yaitu dapat menurunkan produksi TNF yang dapat memicu produksi MMP. Produksi MMP yang meningkat pada saat inflamasi dapat mendegradasi kolagen secara berlebihan sehingga menjadi bersifat patologis. Dengan peran flavonoid dari daun singkong tersebut maka perkembangan periodontitis akan dihambat (Apridamayanti *et al.*, 2018).

Kandungan lain daun singkong, yaitu saponin bekerja sebagai antibakteri dengan mengganggu stabilitas membran sel bakteri sehingga menyebabkan bakterilisis. Saponin juga diketahui memiliki efek sebagai fitoestrogen untuk terapi gejala menopause. Hidrolisis saponin menghasilkan aglikon bernama sapogenin yang dapat mengaktifkan enzim metabolisme dan biosintesis estrogen. Sapogenin berikatan dengan reseptor hormon estrogen pada hipotalamus dan menyebabkan peningkatan kadar hormon estrogen (Mills dan Bone, 2000; Agustini *et al.*, 2005). Aktivitas antibakteri terpenoid juga berperan dalam pemecahan membran oleh komponen lipofilik. Mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri yaitu menghambat enzim *reverse* transkriptase dan DNA topoisomerase sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk. Kandungan-kandungan dari daun singkong yang berperan dalam antiinflamasi dan antibakteri ini menyebabkan sel-sel inflamasi yang bermigrasi menjadi terbatas, ekspresi MMP-8 dapat ditekan, dan tanda-tanda klinis peradangan pun berkurang. Dengan demikian, ekstrak daun singkong ini efektif menurunkan ekspresi MMP-8

sehingga tidak menyebabkan degradasi kolagen yang lebih besar dan dapat menekan gejala klinis periodontitis (Cowan, 1999; Nuria *et al.*, 2009; Bobbarala, 2012; Ngajow *et al.*, 2013; Meilawaty, 2013).

2.8 Hipotesis

Ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) dapat menurunkan ekspresi MMP-8 sel fibroblas gingiva pada model tikus disfungsi ovarium dan periodontitis.



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratoris yang merupakan sebuah metode penelitian sistematis untuk membangun hubungan sebab akibat (*causal-effect relationship*) (Sugiyono, 2011; Sukardi, 2011; Payadnya dan Jayantika, 2018). Rancangan penelitian yang digunakan adalah *the post test only control group design* yang dilakukan dengan membandingkan dua kelompok, yaitu kelompok eksperimen dan kelompok kontrol (Payadnya dan Jayantika, 2018).

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.1 Tempat Penelitian

- 1) Identifikasi daun singkong di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) melalui Balai Konservasi Tumbuhan (BKT) Kebun Raya Purwodadi, Malang, Jawa Timur.
- 2) Identifikasi bakteri *P. gingivalis* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Bagian Biomedik, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember.
- 3) Pembuatan ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) dilakukan di Laboratorium Analisis Terpadu, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember.
- 4) Perlakuan hewan coba dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Bagian Biomedik, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember.
- 5) Pembuatan preparat histologi dilakukan di Laboratorium Histologi, Bagian Biomedik, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember.

3.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari 2020–Februari 2020.

3.3 Identifikasi Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) dosis 179,2 mg/kgBB.

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah ekspresi MMP-8 fibroblas gingiva tikus.

3.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini sebagai berikut:

- a. Kriteria sampel meliputi galur, jenis kelamin, berat badan, umur, dan kondisi fisik tikus.
- b. Bakteri *P. gingivalis* (ATCC 33.277, Medimark, Perancis).
- c. Induksi bakteri *P. gingivalis* pada tikus.
- d. Metode ovariektomi pada tikus.
- e. Makanan dan minuman tikus secara *ad libitum*.
- f. Tindakan atau perlakuan pada hewan coba.

3.4 Definisi Operasional Variabel Penelitian

3.4.1 Ekstrak Daun Singkong

Ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) merupakan sediaan ekstrak dalam bentuk semi solid yang didapat dengan metode maserasi (Wulandari, 2011; Septaningsih *et al.*, 2018).

3.4.2 Ekspresi MMP-8

Ekspresi MMP-8 sel fibroblas gingiva dapat dianalisis menggunakan pewarnaan imunohistokimia menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400x pada 3 lapang pandang berbeda yang representatif. Ekspresi MMP-8 pada gambaran histologi akan terlihat berwarna ungu kecokelatan pada inti sel fibroblas dan kecokelatan pada sitoplasma sel. Analisis ekspresi MMP-8 pada sel fibroblas dilakukan melalui aplikasi *ImageJ* dan *immunoratio*. Aplikasi dan *software* ini

mensegmentasikan *diaminobenzidine* (DAB) yang diwarnai dan nuklei hematoxylin dari gambar mikroskopis. Hasil akhir dari penghitungan ini berupa sebuah persentase (%) dari ekspresi MMP-8 fibroblas gingiva terhadap seluruh lapang pandang yang diamati (Omar *et al.*, 2015; Fulawka dan Halon, 2016).

3.4.3 Bakteri *Porphyromonas gingivalis*

Bakteri *Porphyromonas gingivalis* merupakan bakteri Gram negatif anaerob obligat sebagai spesies kunci dalam perkembangan periodontitis. *P.gingivalis* berbentuk coccobacilli dengan panjang 0,5–2 μm (How *et al.*, 2016). Bakteri dalam penelitian ini diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember dengan nomor ATCC 33.277, Medimark, Perancis.

3.4.4 Induksi Bakteri *Porphyromonas gingivalis*

Induksi bakteri dilakukan pada bagian bukal dan lingual molar pertama kiri bawah tikus sebanyak 0.05 ml setiap 3 hari sekali selama 14 hari. Gambaran klinis dari periodontitis meliputi perubahan warna menjadi merah disertai pembengkakan margin gingiva (Quamilla, 2016).

3.4.5 Metode Ovariectomi Tikus

Disfungsi ovarium melalui prosedur ovariectomi pada hewan percobaan dilakukan pembedahan pada bagian dorsal secara bilateral dengan insisi transversal dengan ukuran 0,5—1 cm menggunakan *scalpel blade* nomor 11 sebagai *mimicking* kondisi menopause. Tidak adanya ovarium karena prosedur ovariectomi pada hewan coba dapat menginduksi penurunan drastis hormon estrogen. Keadaan defisiensi estrogen terjadi setelah masa tunggu 4 minggu (Li *et al.*, 2014).

3.5 Populasi dan Sampel

3.5.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian yang digunakan adalah tikus putih dari galur *Sprague Dawley* (*Rattus norvegicus*) betina dan belum pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya.

3.5.2 Kriteria Sampel Penelitian

- Tikus strain *Sprague Dawley* berjenis kelamin betina.
- Umur 2-3 bulan.
- Berat badan ± 200 gram.
- Tikus dalam keadaan sehat ditandai dengan respon gerakan aktifnya dan tidak cacat.

3.5.3 Besar Sampel Penelitian

Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini berdasarkan rumus (Dell *et al.*, 2002):

$$n = \frac{\log \beta}{\log p},$$

Keterangan :

n = jumlah sampel

β = kesempatan mendapatkan hasil negatif (0,05)

p = proporsi hewan dalam koloni yang tidak terinfeksi

Dalam penelitian ini terdapat 3 kelompok perlakuan, sehingga,

$$P = \frac{1}{3}$$
$$= 0,33$$

Sehingga didapatkan hasil:

$$n = \frac{\log \beta}{\log p},$$

$$n = \frac{\log 0,05}{\log 0,33}$$

$$n = \frac{1,301}{0,481}$$

$$n = 2,704 = 3$$

Jadi sampel yang digunakan dalam penelitian adalah 3 ekor per kelompok penelitian sehingga jumlah sampel keseluruhan adalah 15 ekor tikus.

3.5.4 Pembagian Kelompok Penelitian

Hewan coba yang telah diadaptasikan akan dibagi menjadi 3 kelompok besar yang masing-masing dibagi lagi menjadi 2 subkelompok, kecuali kelompok kontrol.

Pembagian kelompok sebagai berikut:

- a) Kelompok kontrol (K) merupakan kelompok tikus yang tidak diinduksi *Porphyromonas gingivalis* maupun dilakukan ovariektomi, terdiri dari 3 ekor tikus lalu dieuthanasia pada hari ke-8.
- b) Kelompok 2 perlakuan 1 (P1) merupakan kelompok tikus yang diinduksi bakteri *Porphyromonas gingivalis*, terdiri dari 6 ekor tikus, kemudian dibagi menjadi 2 subkelompok:
 - 1) Kelompok P.1.1 (3 ekor tikus): tikus diberi aquades sebagai kontrol negatif dan dieuthanasia pada hari ke-8.
 - 2) Kelompok P.1.2 (3 ekor tikus): tikus diberi ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) 179,2 mg/kgBB dan dieuthanasia pada hari ke-8.
- c) Kelompok 3 perlakuan 2 (P2) merupakan kelompok tikus yang dilakukan ovariektomi dan ditunggu 4 minggu, terdiri dari 6 ekor tikus, kemudian dibagi menjadi 2 subkelompok:

- 1) Kelompok P.2.1 (3 ekor tikus): tikus diberi aquades sebagai kontrol negatif dan dieuthanasia pada hari ke-8.
- 2) Kelompok P.2.2 (3 ekor tikus): tikus diberi ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) 179,2 mg/kgBB dan dieuthanasia pada hari ke-8.

3.6 Alat dan Bahan Penelitian

3.6.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah kandang tikus termasuk tempat makan dan minum, neraca digital (Ohaus), masker, *handscoon*, kayu berukuran 2x2 cm, *syringe* kecil kapasitas 1 ml, sonde lambung, *rat dental chair*, tabung reaksi, sentrifuge, kawat ose, *decycator*, *spektrofotometer*, *shakerbath*, *rotary evaporator*, inkubator, blender, mortar, *tuberculine syringe*, sonde, pinset, scalpel, pot, lampu spiritus, *microtom* (Tissue-Tek, Jepang), *object glass* dan *deck glass*, mikroskop cahaya, *waterbath*, kuas kecil, kompor listrik, optilab, *software imageJ*, jarum jahit, dan benang jahit.

3.6.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus *Sprague Dawley* betina (*Rattus norvegicus*), aquades steril, media BHI-B, media BHI-A, vitamin K, *yeast extract*, bakteri *Porphyromonas gingivalis*, ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) 179,2 mg/kgBB, Ketamin (KTM 1000), buffer formalin, *chloroform*, asam formic 10%, *xylol*, etanol 70%, 80%, 95%, 100%, gliserin, *meyer egg albumin*, *Embedding paraffin* (paraplast plus), betadine, kassa, kapas, plester, minyak emersi, IHC-Kit, antibodi primer *polyclonal Abcam* (ab78423), enthelan, kertas saring, dan makanan tikus (turbo).

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Ethical Clearence

Pengajuan *ethical clearence* untuk prosedur perlakuan terhadap hewan coba dilakukan di Unit Etika dan Advokasi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas

Gadjah Mada dan telah disetujui dengan nomor 00356/KKEP/FKG-UGM/EC/2020.

3.7.2 Identifikasi Tanaman

Identifikasi tanaman singkong dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) melalui Balai Konservasi Tumbuhan (BKT) Kebun Raya Purwodadi, Malang, Jawa Timur. Identifikasi dilakukan untuk memastikan bahwa tanaman yang digunakan adalah benar daun singkong. Hal ini dapat diketahui melalui ciri khas daun singkong yakni terdiri dari helai daun dan tangkai daun. Daunnya memiliki pertulangan daun menjari dan jumlah belahan helai atau sirip daun pada satu tangkai terdiri dari 5-9 helai (Suprpti, 2005).

3.7.3 Identifikasi *P. gingivalis*

Identifikasi *P. gingivalis* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Bagian Biomedik, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember. Identifikasi dilakukan untuk memastikan bahwa bakteri yang digunakan adalah benar *P. gingivalis*. *P. gingivalis* berdasarkan identifikasi memiliki ciri berbentuk batang yang membentuk koloni berpigmen hitam pada lempeng agar darah yang berasal dari protoheme di eritrosit (Nakayama, 2015).

3.7.4 Pembuatan Suspensi *Porphyromonas gingivalis*

Pembuatan suspensi bakteri diawali dengan pembuatan media cair sebanyak 10 ml, yaitu dari 0,37 gram BHI-B (*Brain heart infusion Broth*), 1 µl vitamin K, 5 µl hemin serta 50 µl ekstrak yeast. Media cair yang telah dibuat dibagi menjadi 2 bagian, masing-masing 5cc yang diberi satu ose bakteri *P.gingivalis* yang berasal dari pembiakan dimedia agar BHI-A. Suspensi bakteri *P.gingivalis* yang didapat lalu dimasukkan *desicator* dan dinkubasi selama 2x24 jam. Setelah diinkubasi, suspensi bakteri *P.gingivalis* diukur konsentrasinya hingga didapatkan 2×10^9 CFU/ml (Fitriyana *et al.*, 2013).

3.7.5 Pembuatan Ekstrak Daun Singkong

Pembuatan ekstrak daun singkong meliputi langkah-langkah:

1. Daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) yang digunakan berasal dari daerah Kreongan, Kabupaten Jember. Daun singkong yang dipetik adalah daun ke-5 dari pucuk sebanyak 450 gram.
2. Daun singkong dicuci bersih, lalu dipotong kecil-kecil dan dikeringkan dengan cara dianginkan selama 2 hari pada suhu ruang yang tidak terkena cahaya matahari secara langsung.
3. Daun singkong dikeringkan di oven pada suhu 40°C selama 24 jam penuh. Berat daun singkong kering setelah dilakukan pengovenan menjadi 238,54 gram.
4. Daun singkong kering selanjutnya dihaluskan dan diayak menggunakan ayakan 80 maze sehingga didapatkan serbuk halus sebanyak 207,25 gram.
5. Serbuk halus daun singkong dimaserasi dengan etanol 96% dengan rasio simplisia : pelarut sebesar 1 : 6 (250 gram : 1.5 liter) selama 3 hari dan dilakukan pengadukan setiap 24 jam.
6. Selanjutnya, larutan dipekatkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu 50°C dan putaran 90 rpm sehingga menjadi ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) berbentuk semi solid dengan dosis 179,2 mg/kgBB sebanyak 20 gram.

3.7.6 Persiapan Hewan Coba

Hewan dilakukan aklimatisasi selama seminggu sebelum diberi perlakuan untuk adaptasi tikus dengan tempat dan makanan.

3.7.7 Pembuatan Model Tikus Disfungsi Ovarium dengan Metode Ovariektomi.

Model tikus yang dilakukan ovariektomi adalah tikus *Sprague Dawley* betina. Prosedur ovariektomi sebagai berikut (Raden, 2011; Suarsana *et al.*, 2014):

- 1) Penimbangan berat badan tikus, kemudian tikus disiapkan di atas meja untuk dilakukan anestesi lokal secara *intramuscular*.

- 2) Larutan anestesi umum disiapkan pada tikus dengan campuran:
 - a. Xylazine : 3 mg/kg BB
 - b. Ketamin : 25 mg/kg BB
- 3) Anestesi dilakukan di daerah paha bagian dalam atau luar secara *intra muscular*. Sekitar 5 menit kemudian tikus akan tertidur selama ± 45 menit.
- 4) Bulu tikus di daerah yang akan di bedah dicukur seluas $\pm 4 \text{ cm}^2$. Setelah dicukur, daerah pembedahan diolesi dengan *povidone iodine*.
- 5) Tikus dilakukan pembedahan pada daerah dorsal dengan sayatan sebesar 0,5-1 cm .
- 6) Eksplorasi terhadap uterus dilakukan setelah rongga abdomen terbuka. Begitu ovarium ditemukan (berbentuk granul-granul seperti anggur dan berada di bawah kolon), kemudian ovarium diikat dengan menggunakan benang *silk ligature* dan dipotong.
- 7) *Povidone iodine* dioleskan pada luka tikus yang terbuka, lalu dilakukan penjahitan.
- 8) Kulit dalam dijahit sebanyak 1 simpul dan kulit luar sebanyak 2 simpul.
- 9) Setelah jahitan selesai, diberikan antibiotik *powder* secukupnya pada area jahitan.
- 10) Tikus yang telah dioperasi ditempatkan pada kandang tunggal yang beralaskan kertas dan tisu lalu diberi makanan dan botol minum.

3.7.8 Pembuatan Model Tikus Periodontitis

Model tikus periodontitis adalah tikus *Sprague Dawley* betina yang diinduksi bakteri *P. gingivalis* pada sulkus gingiva bagian bukal dan lingual gigi molar pertama kiri bawah dengan dosis masing-masing bagian 5mg/0,05 ml PBS (*Phospate Buffer Saline*) dan diberikan 3 hari sekali selama 2 minggu menggunakan *tuberculine syringe* dengan ukuran jarum 30 gauge. Perlakuan induksi bakteri ini dilakukan tanpa menggunakan anestesi (Puspaningrum *et al.*, 2015).

3.7.9 Aplikasi Ekstrak Daun Singkong

Setelah tikus mengalami periodontitis dan disfungsi ovarium dengan prosedur ovariektomi, maka diaplikasikan ekstrak daun singkong dosis 179,2 mg/kgBB dalam bentuk larutan diberikan secara per oral sebanyak 2 ml setiap 2 kali sehari (setiap pukul 8 pagi dan pukul 6 sore) dengan menggunakan sonde lambung, diberikan berdasarkan pada volume normal lambung tikus yaitu 3-5 ml. Dosis ekstrak daun singkong yang diberikan kepada tikus, dilakukan konversi dosis hewan coba dengan manusia. Konversi dosis hewan coba dan manusia disajikan dalam Tabel 3.1 (Wiyandani, 2016).

Tabel 3.1 Tabel Konversi Dosis Hewan Coba dan Manusia

	Mencit 20 gr	Tikus 200 gr	Marmot 400 gr	Kelinci 1,5 kg	Kucing 2 kg	Kera 4 kg	Anjing 12 kg	Manusia 70 kg
Mencit 20 gr	1.0	7.0	12.25	27.8	29.7	64.1	124.2	387.9
Tikus 200 gr	0.14	1.0	1.74	3.9	4.2	9.2	17.8	56.0
Marmot 400 gr	0.08	0.57	1.0	2.25	2.4	5.2	10.2	31.5
Kelinci 1,5 kg	0.04	0.25	0.44	1.0	1.08	2.4	4.5	14.2
Kucing 2 kg	0.03	0.23	0.41	0.92	1.0	2.2	4.1	13.0
Kera 4 kg	0.016	0.11	0.19	0.42	0.45	1.0	1.9	6.1
Anjing 12 kg	0.008	0.06	0.1	0.22	0.24	0.52	1.0	3.1
Manusia 70 kg	0.0026	0.018	0.031	0.07	0.076	0.16	0.32	1.0

Penghitungan dosis

Penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Nisa *et al.* (2013) didapatkan hasil bahwa ekstrak daun singkong memiliki efek analgesik yang sangat baik pada dosis 25,6 mg/kgBB mencit. Berdasarkan hasil tersebut maka pada penelitian ini digunakan pula dosis yang sama setelah dikonversikan pada dosis tikus, yaitu sebagai berikut:

Dosis ekstrak daun sigkong pada mencit : 25,6 mg/kgBB

Dosis ekstrak daun singkong pada tikus : 25,6 mg/kgBB x konstanta konversi
 : 25,6 mg/kgBB x 7,0
 : 179,2 mg/kgBB tikus (1000 gram)

Berat badan tikus pada penelitian ini \pm 200 gram, sehingga dosis yang didapatkan adalah:

$$\begin{aligned} \frac{179,2 \text{ mg}}{X} &= \frac{1000 \text{ gram}}{200 \text{ gram}} \\ X &= \frac{179,2 \times 200}{1000} \\ X &= 35,84 \text{ mg}/200 \text{ gram BB tikus} \end{aligned}$$

Dosis untuk per gram BB tikus adalah sebagai berikut:

$$\begin{aligned} \frac{35,84 \text{ mg}}{X} &= \frac{200 \text{ gram}}{1 \text{ gram}} \\ X &= \frac{35,84 \times 1 \text{ gram}}{200} \\ X &= 0,1792 \text{ mg/gram BB tikus} \end{aligned}$$

Untuk volume pemberian ekstrak daun singkong adalah sebagai berikut:

Volume pemberian : 0,02 ml/gram BB tikus
--

$$0,02 \text{ ml/grm BB} = 0,1792 \text{ mg/gram BB}$$

$$1 \text{ ml} = 8,96 \text{ mg (ekstrak daun singkong)}$$

Pelarut yang digunakan untuk melarutkan ekstrak adalah propilen glikol 10%, yaitu 10 mg propilen glikol dengan 1 ml aquades.

Jadi, pada setiap pembuatan ekstrak untuk 1 kali sondasi mengandung komposisi: 8,96 mg ekstrak daun singkong –1 ml aquades –10 mg propilen glikol.

3.7.10 Tahap Euthanasia

Prosedur euthanasia yang dilakukan adalah dengan cara kimia dengan menggunakan ketamin pada dosis yang mematikan (*lethal*). Tahapan euthanasia meliputi (Ardana, 2015):

- a) Persiapan dosis ketamin yang digunakan sebesar 120-150 mg/kgBB dengan injeksi *intraperitoneum* (IP) dengan syringe 1 ml dan *needle* 5-8 inci.

- b) Pengambilan tikus dari kandang dengan sedikit menarik bagian ekornya.
- c) Posisikan tikus dengan kepala lebih rendah daripada abdomen.
- d) Ketamin disuntikkan dengan posisi 45 derajat dengan abdomen (posisi jarum agak menepi dari *linea alba* agar tidak mengenai organ dalam peritoneum).
- e) Proses euthanasia ditunggu selama 2-5 menit kemudian dilakukan pemeriksaan denyut jantung dan pernapasan. Apabila tikus tidak bernapas, maka pembedahan bisa dilakukan.

3.7.11 Tahap Dekalsifikasi Jaringan

Sampel yang dimasukkan ke dalam buffer formalin kemudian dilakukan prosedur dekalsifikasi dengan menggunakan larutan asam formiat 10% selama 7-14 hari (Roshida, 2017) untuk menghilangkan garam-garam kalsium dari jaringan tulang dan gigi sebelum pemotongan. Hal ini dilakukan untuk melunakkan struktur tulang dan gigi sehingga memudahkan dalam proses pemotongan. Tahap dekalsifikasi meliputi:

- a) Sampel yang telah direndam dalam larutan formalin 10%, dicuci bersih dengan air mengalir selama 30 menit.
- b) Larutan asam formiat 10% dimasukkan dan direndam selama 14 hari, lalu dilakukan vibrasi setiap hari agar proses dekalsifikasi merata.
- c) Setelah itu, sampel dicuci dengan air mengalir hingga bersih untuk menghilangkan sisa bahan dekalsifikasi.

3.7.12 Pembuatan Preparat Histologi

Pembuatan preparat histologi gingiva dilakukan dengan langkah sebagai berikut (Nofikasari *et al.*, 2016):

a) Tahap Fiksasi

Gingiva difiksasi pada larutan formalin 10% selama 12-18 jam diulang sebanyak 2 kali pada larutan yang berbeda.

b) Tahap Dehidrasi

Selanjutnya jaringan mengalami proses dehidrasi bertahap sebagai berikut: ethanol 70% (2 jam), ethanol 80% (2 jam), ethanol 90% (2 jam), ethanol absolute (2 jam), ethanol absolute (2 jam). Tahap selanjutnya yaitu penjernihan dengan xylol (2 jam) sebanyak 2 kali.

c) Tahap *Clearing* (penjernihan)

Gingiva yang telah didehidrasi kemudian diclearing untuk menarik kadar etanol dengan menggunakan larutan *xylol* I selama 1 jam dan dilanjutkan ke larutan *xylol* II selama 1 jam.

d) Tahap *Embedding*

Gingiva dimasukkan ke dalam kaset dan diinfiltrasi dengan menuangkan paraffin yang dicairkan pada suhu 56-58°C. Paraffin dibiarkan mengeras, lalu dimasukkan ke dalam *freezer* selama 2 jam.

e) Tahap *Sectioning* (pemotongan)

Pemotongan blok paraffin dilakukan menggunakan mesin mikrotom dengan ketebalan berkisar 3–4 µm. Potongan tersebut diletakkan di atas permukaan air dalam *waterbath* bersuhu 46 °C. Bentuk irisan dirapikan kemudian diletakkan di atas kaca obyek, lalu disimpan dalam inkubator dengan suhu 2-5 °C di bawah titik lebur paraffin sampai preparat siap diwarnai.

f) Tahap *Staining* (pewarnaan) Imunohistokimia

Tahapan pewarnaan imunohistokimia adalah sebagai berikut (Anggraini, 2012):

- a) Potong blok parafin menggunakan mikrotom dengan ketebalan 5µm,
- b) Lekatkan pada object glass yang telah dilapisi dengan poly-L-lysine.
- c) Inkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 1 malam.
- d) Deparafinisasi dengan xylol sebanyak 3 kali dan masing-masing selama 3 menit.
- e) Rehidrasi dengan memasukkan slide ke dalam rangkaian alkohol 100% sebanyak dua kali, 95% sebanyak dua kali, masing-masing dilakukan selama 3 menit.
- f) Tetesi preparat dengan *aquadest* selama 10 menit.

- g) Cuci preparat dengan *Phosphat Buffer Saline (PBS)* selama 5 menit.
- h) Tetesi preparat dengan hydrogen peroxide (H_2O_2) 3% selama 10 menit.
- i) Cuci preparat dengan PBS sebanyak tiga kali dengan masing-masing 5 menit.
- j) Tetesi preparat dengan superbloc selama 5 menit.
- k) Cuci preparat dengan PBS selama 5 menit.
- l) Tetesi preparat dengan antibody primer dan inkubasi selama semalam.
- m) Cuci preparat dengan PBS sebanyak empat kali dengan waktu masing-masing 5 menit.
- n) Tetesi preparat dengan *Biotinylated Link Antibody (yellow cap)* dan inkubasi selama 10 menit pada suhu ruang.
- o) Cuci preparat dengan PBS sebanyak empat kali dengan waktu masing-masing 5 menit.
- p) Tetesi preparat dengan *Streptavidin Peroxidase* dan inkubasi selama 10 menit pada suhu ruang.
- q) Cuci preparat dengan PBS sebanyak empat kali dengan waktu masing-masing 5 menit.
- r) Tetesi *DAB Plus Chromogen* selama 5-15 menit.
- s) Cuci preparat dengan PBS sebanyak empat kali dengan waktu masing-masing 5 menit.
- t) Beri *aquadest* pada preparat jaringan selama 5 menit, lalu beri *Hematoxilin* selama 1 menit.
- u) Dehidrasi preparat jaringan dengan alkohol 95% dua kali dan 100% dua kali, masing-masing selama 3 menit.
- v) *Clearing* dengan menggunakan xylol dua kali, masing-masing selama 3 menit.
- w) Mounting preparat jaringan dan tutup slide dengan *coverslip*
- x) Hasil pewarnaan imunohistokimia MMP-8 diamati menggunakan mikroskop cahaya (Olympus CH-20) dan dan didokumentasikan menggunakan optilab 2.2, serta pengamatan ekspresi MMP-8 dapat dilakukan dengan aplikasi *ImageJ* dan *software immunoratio*.

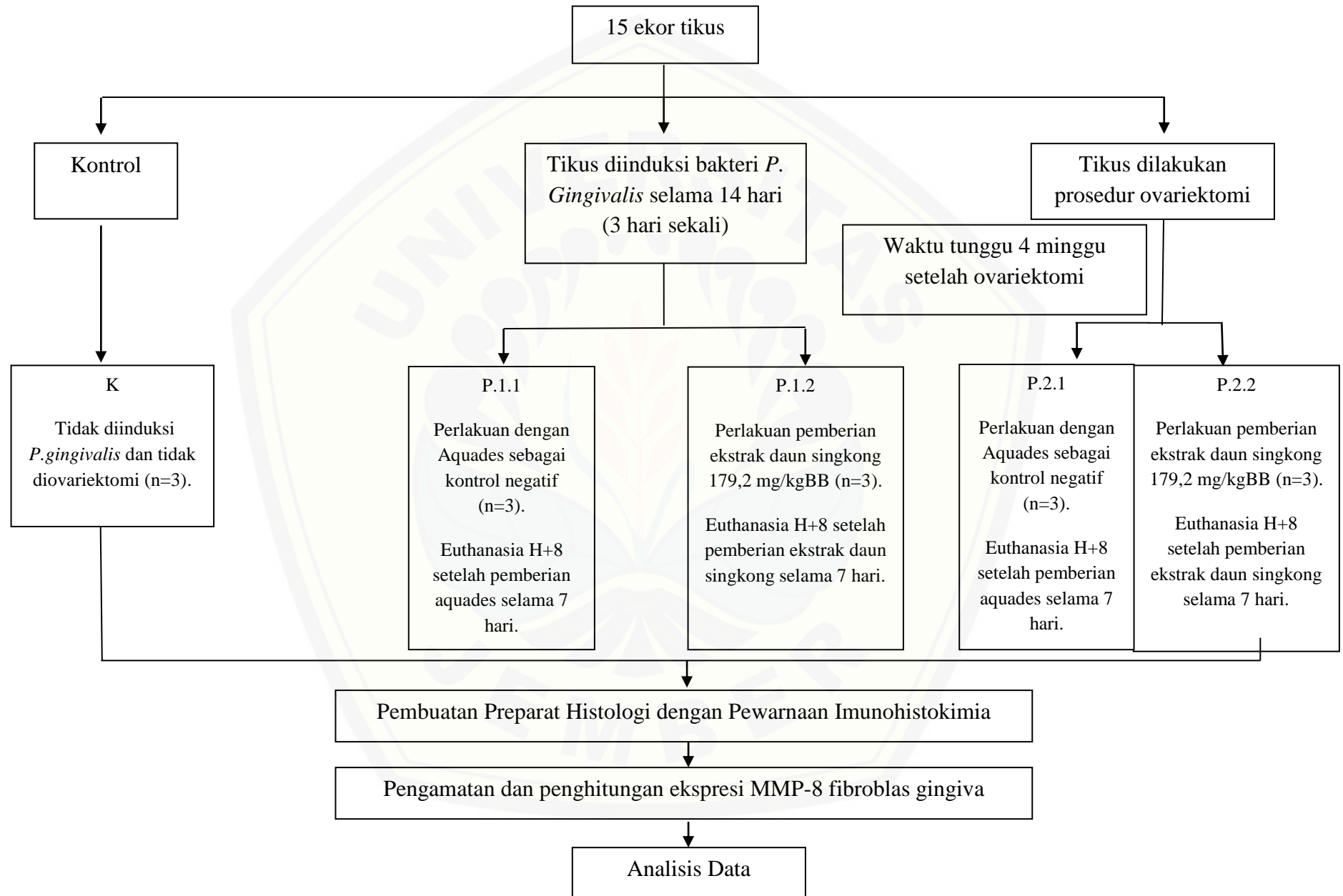
3.8 Penghitungan Ekspresi MMP-8

Penghitungan jumlah sel fibroblas gingiva yang mengekspresikan MMP-8 diamati menggunakan mikroskop pada pembesaran 400x. Pengamatan intensitas warna ungu kecokelatan pada inti sel fibroblas dan warna ungu pada sitoplasma fibroblas, menandakan adanya ekspresi MMP-8 dilakukan melalui aplikasi *ImageJ* dan *immunoratio* yang mensegmentasikan DAB yang diwarnai dan nuklei hematoxylin dari gambar mikroskopis dengan hasil akhir sebuah persentase (%) (Omar *et al.*, 2015; Fulawka dan Halon 2016).

3.9 Analisis Data

Data yang telah diperoleh ditabulasi dan dilakukan uji normalitas data untuk melihat sebaran distribusi data menggunakan uji *Shapiro Wilk*, lalu uji homogenitas data menggunakan *Levene Test*. Hasilnya data berdistribusi normal dan homogen maka dilakukan uji statistika parametrik *One-way Anova* dengan tingkat kepercayaan 95% ($p < 0,05$), lalu dilanjutkan dengan uji *Least Significant Difference*. Analisis data ini dilakukan dengan menggunakan *software SPSS 20 for windows* (Santoso, 2010; Sarmanu, 2017).

3.10 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur Penelitian

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini yaitu ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) dapat menurunkan ekspresi MMP-8 sel fibroblas gingiva pada model tikus disfungsi ovarium dan periodontitis.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian dapat disarankan:

1. Perlu dilakukan penelitian tentang kandungan senyawa aktif dari ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) yang dapat menurunkan ekspresi MMP-8 fibroblas gingiva tikus disfungsi ovarium dan periodontitis.
2. Perlu dilakukan penelitian tentang pemberian ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) dengan waktu yang lebih lama, sehingga dapat dilihat ekspresi MMP-8 fibroblas gingiva secara lebih optimal.
3. Perlu dilakukan penelitian dengan waktu tunggu yang lebih lama setelah ovariektomi, yaitu sampai didapatkan perubahan jaringan periodontal yang lebih nyata akibat disfungsi ovarium.

DAFTAR PUSTAKA

- Abiodun O. A., Babatope, B. O., Bamidele, M. K. 2012. Periodontitis and systemic diseases: A literature review. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 16(4): 487–491.
- Abraham, A. dan Pullishery, F. 2015. The Effect Of Menopause On The Periodontium- A Review. *Iosr Journal Of Dental And Medical Sciences*, 14(4):79-82.
- Agustini, K., Wiryowidagdo, S., dan Kusmana, D. 2005. Aktivitas Biji Klabet (*Trigonella foenum-graecum L.*) terhadap Kadar Hormon Estradiol dan FSH Plasma Tikus Putih Betina Galur Wistar Prepubertal. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 2(2):74-83.
- Agustini, K., Wiryowidagdo, S., dan Kusmana, D. 2007. Aktivitas Biji Klabet (*Trigonella foenum-graecum L.*) terhadap Perkembangan Kelenjar Mamae Tikus Putih Betina Galur Wistar. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 4(1):26-36.
- Agustini, K., Suyatna, F., Siregar, N. C., Sumaryono, W. 2013. Aktivitas Biji Klabet (*Trigonella foenum-graecum L.*) terhadap Pertumbuhan dan Apoptosis Sel Kanker Payudara MCF-7. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 11(1):13-20.
- Aljehani, Y. A. 2014. Risk Factors of Periodontal Disease: Review of the Literature. *International Journal of Dentistry*, 2014: 1-9.
- Alipour, H., Raz, A., Zakeri, S., Djadid, N. D. 2016. Therapeutic Applications Of Collagenase (Metalloproteases): A Review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(11): 975–981.
- Alves, A.A.C. 2002. Cassava Botany and Physiology. In *Cassava: Biology, Production and Utilization*, eds Hillocks, R.J., Thresh, J.M. and Belloti, A.C. CAB International, pp. 67—89.
- Amadei, S. A., Souza, D. M., Brandao, A. A. H., Rocha, R. F. 2011. Influence Of Different Durations Of Estrogen Deficiency On Alveolar Bone Loss In Rats. *Periodontics Braz Oral Res*, 25(6):538-43.
- Amanda, E. A., Oktiani, B. W., Panjaitan, F. U. A. 2019. Efektivitas Antibakteri Ekstrak Flavonoid Propolis *Trigona Sp (Trigona thorasica)* Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Porphyromonas gingivalis*. *Dentin Jurnal Kedokteran Gigi*, 3(1):23-28.

- Anbinder, M. R. M., Lima G. M. G., Oliveira F. E., Campos D. R. C., Rossoni R. D., Oliveira L. D., Junqueira J.C, Ma Y, Elefteriou F. 2016. Periodontal Disease Exacerbates Systemic Ovariectomy-Induced Bone Loss In Mice. *Elsevier*, 83:241-247.
- Andriani, I. dan Chairunnisa, F. A. 2019. Periodontitis Kronis dan Penatalaksanaan Kasus dengan Kuretase: Laporan Kasus. *Insisiva Dental Journal: Majalah Kedokteran Gigi Insisiva*, 8(1):25-30.
- Andriyono, R. I. 2019. *Kaempferia galanga L.* sebagai Anti-Inflamasi dan Analgetik. *Jurnal Kesehatan*, 10(3):495-502.
- Anggraini, R. D. 2012. Ekspresi Imunohistokimi ki-67 pada Tumor Payudara Tikus Wistar yang Diinokulasi Kanker Terinduksi Benzo(α)pyrenedengan Pemberia Ekstrak Benalu Teh. Bandung: Fakultas Keodokteran Universitas Sumatera Utara.
- Apridamayanti, P., Sanera, F., Robiyanto, R. 2018. Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Etanol Daun Karas (*Aquilaria malaccensis Lamk.*). *Pharmaceutical Sciences and Research*, 5(3):152 – 158.
- Ardana, I. B. K. 2015. *Etika Menggunakan Hewan Percobaan Dalam Penelitian Kesehatan*. Komisi Etik Penelitian Kesehatan: FK UNUD
- Balli, U., Cetinkaya, B. O., Keles, G. C., Keles, Z. P., Guler, S., Sogut, M. U., Erisgin, Z. 2016. Assessment of MMP-1, MMP-8 and TIMP-2 in Experimental Periodontitis Treated With Kaempferol. *J Periodontal Implant Sci*, 46(2): 84–95.
- Bharadwaj, A. dan Bharadwaj, S. V. 2012. Effect Of Menopause On Women's Periodontium. *Journal Of Mid-Life Health*, 3(1):5-9.
- Bobbarala, V. 2012. Antimicrobial Agents. Intech: Croatia.
- Burns, A.E, Gleadow R.M., Zacarias A.M., Cuambe C.E., Miller R.E., Cavagnaro T.R. 2012. Variations In The Chemical Composition of Cassava (*Manihot esculenta Crantz*) Leaves and Roots as Affected by Genotypic and Environmental Variation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(19): 4946-4956.
- Caranza, F.A., Newman, M. G., Takei, H. H., Klokkevold, P. R. 2012. *Carranza's Clinical Periodontology 11th Ed.* Saunders Elsevier: China.
- Conventry, Griffiths G., Scully C., Tonetti M. 2000. ABC of Oral Health: Periodontal Disease. *BMJ*, 321(7252): 36-9.

- Cowan, M.M. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12: 564 – 582.
- Dalal, P. K., dan Agarwal, M. 2015. Postmenopausal Syndrome. *Indian Journal of Psychiatry*, 57(6): 222-232.
- Dell, R. B., Holleran, S., Ramakrishnan, R. 2002. Sample Size Determination. *ILAR (Institute for Laboratory Animal Research) Journal*, 43(4): 207–213.
- Dharmayanti A. W. S. dan Kusumawardani, B. 2017. Deoxyypyridinoline and Mineral Levels in Gingival Crevicular Fluid as Disorder Indicators of Menopausal Women With Periodontal Disease. *Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi)*, 50(3): 131–137.
- Doshi, S. B., Agarwal, A. 2013. The Role Of Oxidative Stress in Menopause. *Journal of Midlife Health*, 4(3): 140–146.
- Edwards, Duchesne A; Au A.S; Einstein G., 2019. The Many Menopause: Searching The Cognitive Research Literature for Menopause Type. *The Journal of The North American Menopause Society*, 26(1): 45-65.
- Elisabetta, C. 2010. Can A Cronic Dental Infection Be Considered A Cause of Cardiovasculer Disease? A Review The Literature. *International Journal of Cardiology*. 148(1): 4-10.
- Elkhaira, R., Kusuma, N., Putra, A. E. 2020. Perbedaan Jumlah Koloni Bakteri Asam Laktat Pada Keadaan Sehat Dengan Periodontitis Kronis. *B-Dent: Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Baiturrahmah*, 6(2):119-125.
- Erawati, J., Sukardi, I., Nurul, D. 2006. Pertimbangan Periodotal Pada Wanita Usia Menopause. *Majalah Kedokteran Gigi*, 13(2): 222-225.
- Fitri, H., Fajrin, F.N., Kasuma, N., Suharti, N. 2014. Efek Pemberian Zink Pasca Scaling Root Planning Terhadap Kadar MMP-8 Saliva pada Pasien Gingivitis. *B-Dent: Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Baiturrahmah*, 6(2):132-141.
- Fitriyana, N., Arina, Y.M.D., Harmono, H., Susilawati, I.D.A. 2013. Pemaparan bakteri Porphyromonas gingivalis mempengaruhi produksi superoksid netrofil. *Dentofasial*, 12(3):152-158.
- Fulawka, L., dan Halon, A. 2016. Proliferation Index Evaluation in Breast Cancer Using ImageJ and ImmunoRatio Applications. *Anticancer Research*, 36:3965-3972.

- Feimeng, A., Du, J., Cao, Y., Shi, J., Guo, Y., Jin, T., Li, J., Chen, J., Li, P., Dong, M., Wang, G., dan Wang, J. 2017. MMP-8 Polymorphism Is Associated With Susceptibility to Osteonecrosis of The Femoral Head in A Chinese Han Population. *Oncotarget Journal*, 8(13): 21561–21566.
- García Y. M., García-Iglesias T., Morales-Velazquez G., Lazalde-Ramos B.P., Zúñiga-González G.M., Ortiz-García R.G., Zamora-Perez A.L. 2019. Macrophage Migration Inhibitory Factor Levels in Gingival Crevicular Fluid, Saliva, and Serum of Chronic Periodontitis Patients. *Hindawi BioMed Research International*, 2019: 1-7.
- Ginwala, B. R., Chigbu, D. I., Jain, P., Khan, Z. K. 2019. Potential Role of Flavonoids in Treating Chronic Inflammatory Diseases with a Special Focus on the Anti-Inflammatory Activity of Apigenin. *Antioxidants*, 8(35): 1-28.
- Gupta, S., Chhina, S., Arora, S. A. 2018. A Systematic Review of Biomarkers of Gingival Crevicular Fluid: Their Predictive Role in Diagnosis of Periodontal Disease Status. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 8(2018): 98–104.
- Hameed, H. S., dan Yenzeel, J. H. 2018. Study Of White Blood Cell Count and Sex Hormone Level in Sample Of Iraqi Women with Uterus Cancer. *International Journal of Advanced Biological Research*, 8(1):44-48.
- Hariri, R., dan Alzoubi, E. E. 2017. Oral Manifestations of Menopause. *Journal of Dental Health Oral Disorders & Therapy*, 7(4): 1-4.
- Hariyatmi, 2004. Kemampuan Vitamin E sebagai Antioksidan terhadap Radikal Bebas pada Usia Lanjut. *MIPA*, 14(1): 54.
- Hasim, S. F., dan Dewi, L. K. 2016. Pengaruh Perebusan Daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) terhadap Kadar Total Fenol, Flavonoid dan Aktivitas Antioksidannya. *Current Biochemistry*, 3(3): 116 – 127.
- How, K. P Song, dan Chan, K. G. 2016. *Porphyromonas gingivalis*: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. *Front Microbiology*, 7(53): 1-14.
- Integrated Taxonomic Information System. 2012. *Bacterial Nomenclature*. The Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures.
- Kamboh, A.A., Leghari, R.A, Khan, M. A., Kaka, U. 2019. Flavonoids Supplementation - An Ideal Approach To Improve Quality Of Poultry Products. *World's Poultry Science Journal*, 75(1): 115-126.

- Kiswaluyo. 2013. Perawatan Periodontitis pada Puskesmas Sumber Sari, Puskesmas Wuluhan dan RS Bondowoso. *Stomatognathic (J. K. G Unej)*, 10(3): 115-120.
- Kitajima, Doi, Y. H., Ono, Y., Urata, Y., Goto, S., Kitajima, M., Miura, K., Li, T., dan Masuzaki, H. 2015. Estrogen Deficiency Heterogeneously Affects Tissue Specific Stem Cells In Mice. *Scientific Reports*, 5:1-7.
- Koh, H. L., Kian. C. T., Hoon, T. C. 2009. *A Guide to Medicinal Plants: An Illustrated, Scientific and Medicinal Approach*. Singapore: World Scientific Publishing.
- Koeryaman, M. T., dan Ermiaati. 2018. Adaptasi Gejala Perimenopause dan Pemenuhan Kebutuhan Seksual Wanita Usia 50-60 Tahun. *MEDISAINS: Jurnal Ilmiah Ilmu-ilmu Kesehatan*, 16(1):21-30.
- Kumar S., dan Abhay K. P. 2013. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 2013: 1-16.
- Kusumastuti, E., Handajani, J., Susilowati, H. 2014. Ekspresi COX-2 dan Jumlah Neutrofil Fase Inflamasi pada Proses Penyembuhan Luka Setelah Pemberian Sistemik Ekstrak Etanolik Rosela (*Hibiscus sabdariffa*) (studi in vivo pada Tikus Wistar). *Majalah Kedokteran Gigi*, 21(1): 13-19.
- Kusumawardani, B., Pujiastuti, P., dan Sari, D. S. 2010. Uji Biokimiawi Sistem API 20 A Mendeteksi Porphyromonas Gingivalis Isolat Klinik dari Plak Subgingiva Pasien Periodontitis Kronis. *Jurnal PDGI*, 59(3):110-114.
- Li, R., Cui, J., dan Shen, Y. 2014. Brain Sex Matters: Estrogen In Cognition And Alzheimer's Disease. *Mol Cell Endocrinol*, 389(0): 13-21.
- Lindner, D., Zietsch, C., Becher, P. M., Schulze, K., Schultheiss, H. P., Tschöpe, C., & Westermann, D. 2012. Differential Expression Of Matrix Metalloproteases in Human Fibroblasts with Different Origins. *Biochemistry Research International*, 2012: 1-10.
- Majid, A. A., Alassiri, S., Rathnayake, N., Tervahartiala, T., Gieselmann, D. R., and Sorsa, T. 2018. Matrix Metalloproteinase-8 as an Inflammatory and Prevention Biomarker in Periodontal and Peri-Implant Diseases. *Hindawi International Journal of Dentistry*, 2018:1-27.
- Meilawaty, Z. 2013. Efek Ekstrak Daun Singkong (*Manihot utilissima*) Terhadap Ekspresi COX-2 Pada Monosit yang Dipapar Lps *E.Coli*. *Dental Journal*, 46(4):196-201.

- Meilawaty Z. dan Kusumawardani, B. 2016. Effect of Cassave Leaf Flavonoid Extract on TNF- α Expressions in Rat Models Suffering from Periodontitis. *Dental Journal*, 49(3): 137–142.
- Mesa F, Magan-Fernandez A, Castellino G, Chianetta R, Nibali L, Rizzo M. 2019. Periodontitis and Mechanisms Of Cardiometabolic Risk: Novel Insights and Future Perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1865(2): 476-484.
- Mills, S., dan Bone, K. 2000. *Principles and Practice of Phytoterapy Modern Herbal Medicine*. Churchill Livngstone: Edinburg.
- Mysak, J., Podzimek S., Sommerova P., Lyuya-Mi Y., Bartova J., Janatova T., Prochazkova J., dan Duskova J. 2014. *Porphyromonas gingivalis*: Major Periodontopathic Pathogen Overview. *Journal of Immunology Research*, 2014: 1-8.
- Nakayama, K. 2015. *Porphyromonas gingivalis* and related bacteria: from colonial pigmentation to the type IX secretion system and gliding motility. *Journal of Periodontal Research*, 50(1):1-8.
- Napimoga, M.H., Clemente-Napimoga, J.T., Macedo, C.G., Freitas, F.F., Stipp, R.N., Pinho-Ribeiro, F.A., Casagrande, R., Verri, W.A. 2013. Quercetin Inhibits Inflammatory Bone Resorption in a Mouse Periodontitis Model. *The American Chemical Society and American Society of Pharmacognosy*, 76(12):2316-2321
- Narmada, I. B., Rubianto, M., Putra, S. T. 2020. The Effect Of Low-Level Light Therapy On Orthodontic Tooth Movement Rate, Heat Shock Protein 70, And Matrix Metallopreteinase 8 Expression: Animal Study. *Dental Research Journal*, 17(1):73-79.
- Ngajow, M., Abidjulu, J., Kamu, V. S. 2013. Pengaruh Antibakteri Ekstrak Kulit Batang Matoa (*Pometia pinnata*) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* secara In vitro. *Jurnal Mipa Unsrat Online*, 2(2):128-132.
- Nisa, V. M., Meilawaty, Z., Astuti, P. 2013. Efek Pemberian Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta*) Terhadap Proses Penyembuhan Luka Gingiva Tikus (*Rattus norvegicus*). Artikel Ilmiah Hasil Penelitian Mahasiswa 1-7.
- Nofikasari, I., Rufaida, A., Aqmarina, C. D., Failasofia, A. R., Fauzia, Handajani, J. 2016. Efek Aplikasi Topikal Gel Ekstrak Pandan Wangi Terhadap Penyembuhan Luka Gingiva. *Majalah Kedokteran Gigi Indonesia*, 2(2): 53-59.

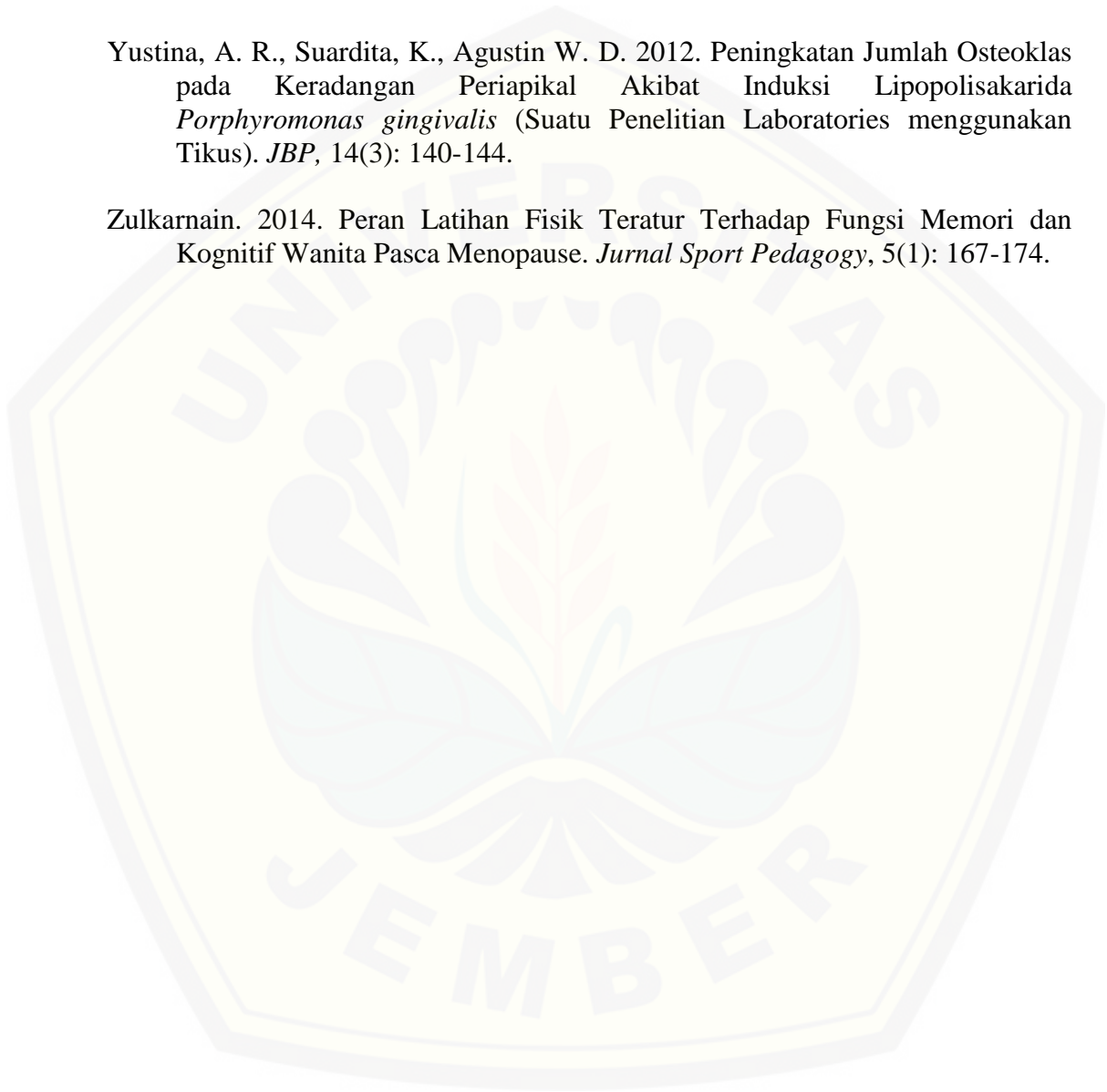
- Nuria, M.C., Faizatun, A., dan Sumantri. 2009. Uji Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Jarak Pagar (*Jatropha curcas*) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, dan *Salmonella typhi* ATCC 1408. *Jurnal Ilmu – ilmu Pertanian* 5:26–37.
- Omar, A. A. H., Haglund, Virolainen, S., Hayry, V., Atula, T., Kuntio, R., Salo, T., Sorsa, T., Hagstrom, J. 2015. MMP-7, MMP-8, and MMP-9 in Oral and Cutaneous Squamous Cell Carcinomas. *Oral and Maxillofacial Pathology*, 119(4):459-467.
- Orienty, F. N., Handajani, J., Haniastuti, T. 2015. Efek Ekstrak Sambiloto (*Andrographis paniculata*) Terhadap Jumlah Sel Inflamasi Pada Model Periodontitis. *Jurnal B-Dent*, 2(1):60-67.
- Panche, A. N., Diwan, A. D., and Chandra, S. R. 2016. Flavonoids: An Overview. *Journal Of Nutritional Science*, 5(47):1-15.
- Payadnya dan Jayantika, 2018. *Panduan Penelitian Eksperimen Beserta Analisis Statistik dengan SPSS*. Sleman: Deepublish.
- Prasetya, R. C. 2015. Ekspresi dan Peran Siklooksigenase-2 dalam Berbagai Penyakit di Rongga Mulut. *Stomatognatic (J. K. G Unej)*, 12(1): 16-19
- Prasetyaningrum, N., Soemardini, dan Fadillah, M.N. 2018. Efek Ekstrak Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis*) Terhadap Sel Osteoklas Tulang Alveolar Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). *E-Prodenta Journal Of Dentistry*, 2(1): 130-139.
- Primiani, C. N. 2013. Potensi Tepung Tempe sebagai Estrogen Alami terhadap Uterus Mencit Premenopause. *Sains & Matematika*, 1(2):47-51.
- Puspaningrum, E. F., Hendari, R., Mujayanto, R. 2015. Ekstrak Cymbopogon Citratus Dan Eugenia Aromaticum Efektif Untuk Penyembuhan Gingivitis. *Odonto Dental Journal*, 2(2):47-51.
- Rohmawati, N., dan Santik, Y.D.P. 2019. Status Penyakit Periodontal pada Pria Perokok Dewasa. *Higeia Journal Of Public Health Research And Development*, 3(2):286-297.
- Quamilla, N. 2016. Stres Dan Kejadian Periodontitis (Kajian Literatur). *J Syiah Kuala Dent Soc*, 1(2): 161-168.
- Raden, A. 2011. Efek Ekstrak Pegagan (*Cantella asiatica*) pada *Rattus norvegicus* Wistar yang dilakukan Ovariektomi Terhadap Proliferasi Epitel pada Dinding Vagina. *Jurnal Ilmiah Kedokteran Hewan*, 4(1):71-76.

- Ramadhani, N., dan Sumiwi, S.A. 2016. Aktivitas Antiinflamasi Berbagai Tanaman Diduga Berasal Dari Flavonoid. *Farmaka Suplemen*, 14(2):111-123.
- Ramcharan A., McCloskey, P.C., Baranowski, K., Ahmed, B. 2017. Using Transfer Learning for Image-Based Cassava Disease Detection. *Frontiers in Plant Science*, (8): 1-10.
- Regidor P. A. 2014. Progesterone in Peri- and Postmenopause: A Review. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 74(11): 995–1002.
- Resende F. A, Oliveira, de A. P. S., Camargo, de M. S. Vilegas, W., Varanda, E. A. 2013. Evaluation of Estrogenic Potential of Flavonoids Using a Recombinant Yeast Strain and MCF7/BUS Cell Proliferation Assay. *Plos One*, 8(10):1-7.
- Restiani, R., Roslim, D. I., Herman. 2014. Karakter Morfologi Ubi Kayu (*Manihot esculenta* Crantz) Hijau dari Kabupaten Pelalawan. *JOM FMIPA*, 1(2):619-623.
- Ríos, P. H., Hernández, M., Garrido, M., Tervahartiala, T., Leppilahti, J. M., Kuula, H., Heikkinen, A. M., Mäntylä, P., Rathnayake, N., Nwhator, S., Sorsa, T. 2016. Oral Fluid Matrix Metalloproteinase (MMP)-8 As A Diagnostic Tool In Chronic Periodontitis. *Journal Metalloproteinases In Medicine*, 2016(3): 11-18.
- Roshida, A. 2017. *Potensi Minyak Ikan Lemuru (Sardinella longiceps) Terhadap Jumlah Kondrosit Kartilago Sendi Temporomandibula Tikus yang Mengalami Osteoarthritis*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi
- Saddamiah, S. F. A., Normasari, R., Abrori, C. 2017. Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) terhadap Histopatologi Hepar Tikus Putih Galur Wistar. *Journal of Agromedicine and Medical Sciences*, 4(1):45-49.
- Santoso, H. B. 2006. Struktur Mikroskopis Kartilago Epifisialis Tibia Fetus Mencit (*Mus musculus L.*) dari Induk dengan Perlakuan Kafein. *Penelitian Hayati*, 12:69–74.
- Santoso, S. 2010. *Statistik Nonparametrik: Konsep dan Aplikasi dengan SPSS*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.
- Saputri, D. dan Masulili, S.L.C. 2015. Perawatan Periodontal Pada Pasien Dengan Periodontitis Agresif (Laporan Kasus). *Cakradonya Dent J*, 7(1):745-806.

- Sarmanu. 2017. *Dasar Metodologi Penelitian Kuantitatif, Kualitatif, dan Statistika*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Sari, N. I. Y., Adriani, R.B., dan Mudigdo, A. 2017. Effect of Menopause Duration and Biopsychosocial Factors on Quality of Life of Women in Kediri District, East Java. *Journal of Maternal and Child Health*, 2(2): 125-136.
- Septaningsih, D.A., Darusman, L.K, Afendi, F.M., dan Heryanto, R. 2018. Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS) Fingerprint Combined with Chemometrics for Identification of Metabolites Content and Biological Activities of *Curcuma aeruginosa*. *Indonesia Journal Chemistry*, 18(1):43 – 52.
- Serafini, M., Peluso, I., dan Raguzzini, A. 2010. Antioxidants and the immune system Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proceedings of the Nutrition Society*, 69:273–278.
- Setia, A. I. D., dan Tjitaesmi, A. 2016. Aktivitas Antiinflamasi dari Berbagai Tanaman: Sebuah Review. *Farmaka*, 14(3): 77-86.
- Soto, J. C., Ortiz, J. F., Perlaza-Jiménez, L., Vásquez, A. X., Lopez-Lavalle, L. A., Mathew, B. López, C. E. 2015. A Genetic Map Of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) With Integrated Physical Mapping Of Immunity-Related Genes. *BMC Genomics*, 16(1): 190.
- Stygar D., Masironi B, Eriksson H, Sahlin L. 2007. Studies On Estrogen Receptor (ER) Alpha And Beta Responses On Gene Regulation In Peripheral Blood Leukocytes In Vivo Using Selective ER Agonists. *Journal Endocrinol*, 194(1): 101-119.
- Suarsana, I. N., Silitonga, S.L, Dharmawan, I.N.S, Kardena, I.M., dan Priosoeryanto, B.P. 2014. Pemberian Tepung Tempe Meningkatkan Kualitas Tulang pada Tikus Ovariectomi. *Jurnal Veteriner*, 15(4): 548-556.
- Sugiritama, I. W., dan Adiputra, N. 2019. Potensi Antosianin Dalam Manajemen Menopause. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 8(1):1 158-166.
- Sugiyono. 2011. *Metode Penelitian Kuantitatif Kualitatif dan R&D*. Bandung: Alfabeta.
- Sukardi. 2011. *Metodologi Penelitian Pendidikan Kompetensi dan Praktiknya*. Jakarta: PT Bumi Aksara.
- Sunita, dan Pattanayak. 2011. Phytoestrogens In Postmenopausal Indications: A Theoretical Perspective. *Pharmacogn Rev*. 5(9): 41–47.

- Suprapti, M. L. 2005. *Tepung Tapioka: Pembuatan dan Pemanfaatannya*. Yogyakarta: Kanisius.
- Susilawati, I. D. A. 2011. Periodontal Infection Is A “Silent Killer”. *Stomatognatic (J.K.G. Unej)*, 8(1): 21-26.
- Susilowati. 2010. Peran Matriks Metaloproteinase-8 Pada Cairan Krevikuler Gingiva Selama Pergerakan Gigi Ortodontik. *Dentofasial*, 9(1):47-54.
- Suwandi, R., Jacob, A. M., Sofia, M. 2015. Aplikasi Gelombang Ultrasonik Sebagai Alternatif Untuk Mempertahankan Kesegaran Fillet Ikan Nila. *JPHPI*, 18(1):50-60.
- Tamara, A., Oktiani, B.W., Taufiqurrahman, I. 2019. Pengaruh Ekstrak Flavonoid Propolis Kelulut (*G.thoracica*) Terhadap Jumlah Sel Netrofil Pada Periodontitis (Studi In Vivo Pada Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) Jantan). *Dentin Jurnal Kedokteran Gigi*, 3(1):10-16.
- Utami, A. S., Praharani, D., dan Pujiastuti, P. 2016. *Gingivitis Severity of Contraceptives Injection Users Containing Progesteron and Estrogen-Progesteron Hormones on Puskesmas Sumbersari Jember Regency*. Proceedings Book Forkinas VI FKG Unej 14th-15th
- Wahyuningrum, M. R., dan Probosari, E. 2012. Pengaruh Pemberian Buah Pepaya (*Carica papaya L.*) Terhadap Kadar Trigliserida Pada Tikus Sprague Dawley dengan Hiperkolesterolemia. *Journal Of Nutrition College*, 1(1):192-198.
- Werdhasari, A. 2014. Peran Antioksidan Bagi Kesehatan. *Jurnal Biotek Medisiana Indonesia*, 3(2): 59-68.
- Wiyandani, A. M. 2016. Pengaruh Ekstrak Daun Asam Jawa (*Tamarindus indica L.*) Terhadap Kadar Gula Darah Mencit (*Mus musculus L.*) Jantan Diabetes Melitus dan Pemanfaatannya sebagai Buku Ilmiah Populer. *Skripsi*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Wulandari, L. 2011. *Kromatografi Lapis Tipis*. Jember: Pt. Taman Kampus Presindo.
- Wulandari, C. L. 2015. Terapi Sulih Hormon Alami Untuk Menopause. *Jurnal Involusi Kebidanan*, 5(10): 54-66.
- Xu, Xin-Chen, H. Chen, X. Zhang, Z-J. Zhai, X-Q. Liu, X-Y. Zheng, J. Zhang, A. Qin Dan E-Y. Lu. 2015. Effects Of Oestrogen Deficiency On The Alveolar Bone Of Rats With Experimental periodontitis. *Molecular Medicine Reports* 12: 3494-3502.

- Yendriwati. 2006. Kebutuhan Vitamin C dan Pengaruhnya Terhadap Kesehatan Tubuh Dan Rongga Mulut. *Dentika Dental Journal*, 2(1): 78-83.
- Yuan, C., Liu, X., Zheng, S.. 2018. Matrix Metalloproteinase-8 Levels In Oral Samples As A Biomarker For Periodontitis In The Chinese Population: An Observational Study. *Bmc Oral Health*, 18(51):1-6.
- Yustina, A. R., Suardita, K., Agustin W. D. 2012. Peningkatan Jumlah Osteoklas pada Keradangan Periapikal Akibat Induksi Lipopolisakarida *Porphyromonas gingivalis* (Suatu Penelitian Laboratories menggunakan Tikus). *JBP*, 14(3): 140-144.
- Zulkarnain. 2014. Peran Latihan Fisik Teratur Terhadap Fungsi Memori dan Kognitif Wanita Pasca Menopause. *Jurnal Sport Pedagogy*, 5(1): 167-174.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Alat dan Bahan Penelitian



Tikus *Sprague Dawley* betina



Ekstrak daun singkong



Antibiotik



Alkohol



Povidone Iodine



Benang dan jarum jahit



Neraca Ohaus



Waterbath



Mikroskop dan Optilab



Microtom



Automatic Processing Tissue



Keterangan gambar:

1. *Immunohistochemistry (IHC) Kit*
2. *Poly-L-Lysine Coated Slide*
3. *Deck glass*
4. *Formid Acid 10%*
5. PBS
6. Pewarna *Hematoxylin*
7. Entelan
8. Etanol
9. *Paraffin wax*
10. Xylol

Lampiran 2. Prosedur Penelitian

2.1 Pembuatan Ekstrak Daun Singkong



Penimbangan daun
singkong kering



Daun singkong kering
dihaluskan



Persiapan pengadukan
serbuk halus daun singkong



Persiapan etanol



Pengadukan serbuk halus
daun singkong + etanol



Maserasi selama 3 hari dan
pengadukan setiap 24 jam



Larutan dipekatkan dengan
rotary evaporator

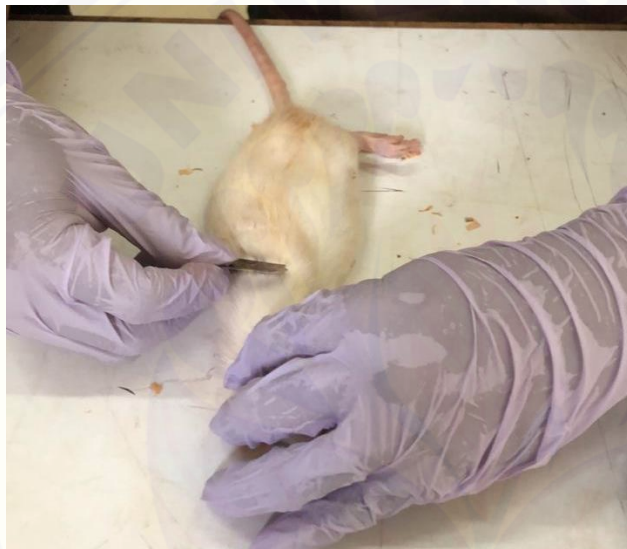


Ekstrak daun singkong

2.2 Persiapan Hewan Coba



2.3 Pembuatan Model Tikus Disfungsi Ovarium dengan Metode Ovariektomi



2.4 Pembuatan Model Tikus Periodontitis Induksi *P.gingivalis*



2.5 Aplikasi Ekstrak Daun Singkong



2.6 Tahap Dekalsifikasi Jaringan



2.7 Pembuatan Sediaan Histologi



Jaringan disimpan dalam pot obat



Pemrosesan jaringan



Embedding



Pemotongan blok paraffin



Potongan blok paraffin diletakkan pada permukaan *waterbath*



Slide preparat disimpan dalam *Slide warmer* sebelum dilakukan pewarnaan

2.8 Tahap *Staining* (pewarnaan) IHC



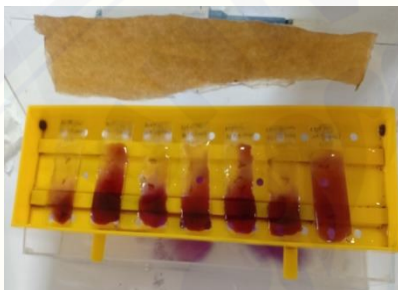
Deparafinisasi dengan xylol dan rehidrasi dengan alkohol 90% dan 100%



Preparat dicuci dengan aquades, PBS, superblock, antibody primer



Preparat ditetesi *DAB Plus Chromogen*



Preparat ditetesi *Hematoxilin*



Dehidrasi preparat dengan alkohol bertingkat



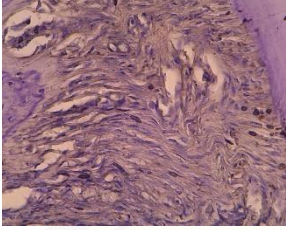
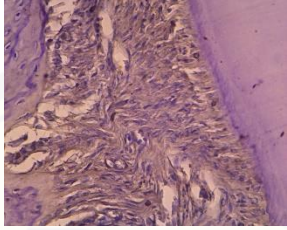
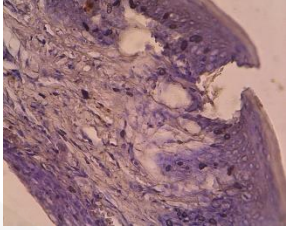
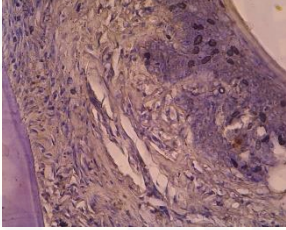
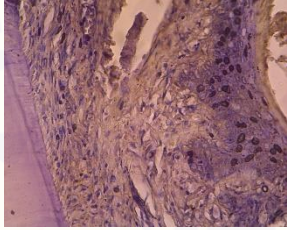
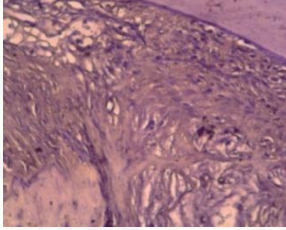
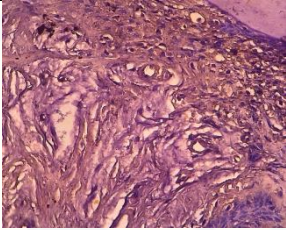
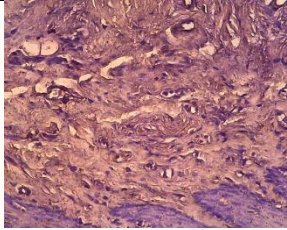
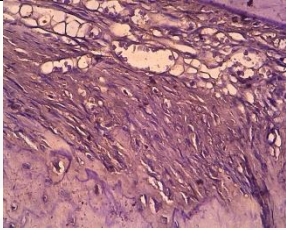
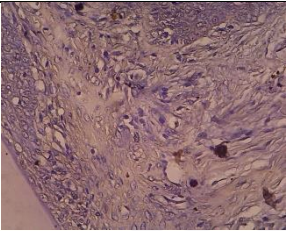
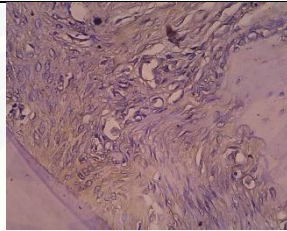
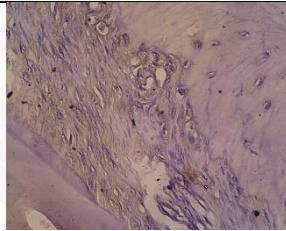
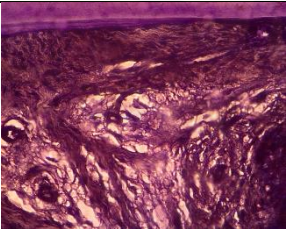
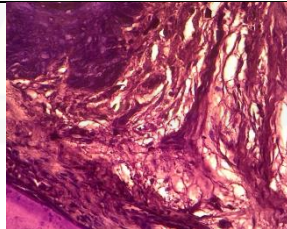
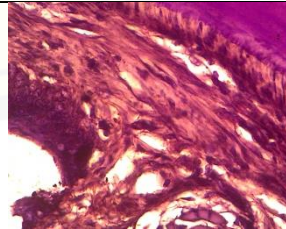
Clearing dengan xylol

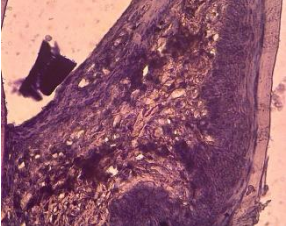
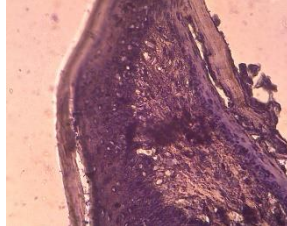
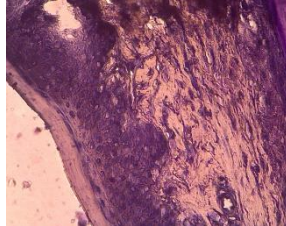
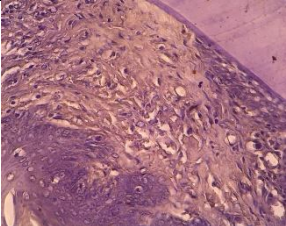
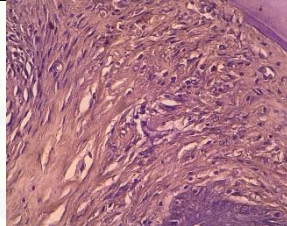
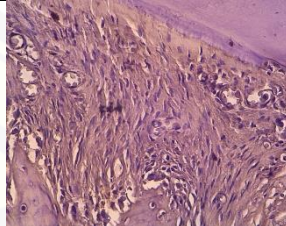
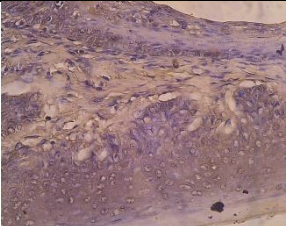
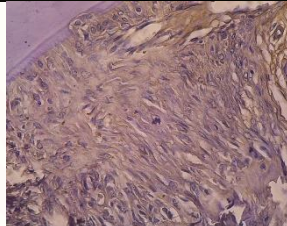
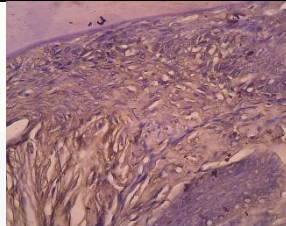
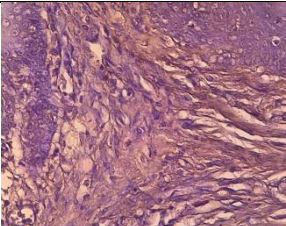
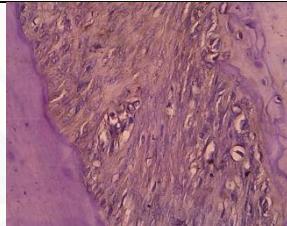
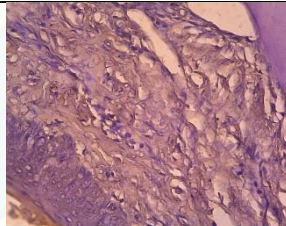
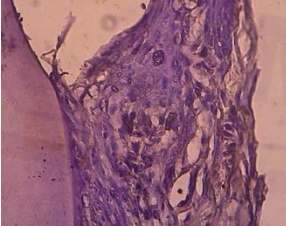
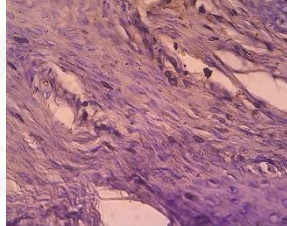
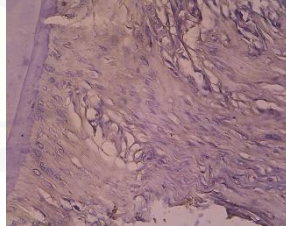
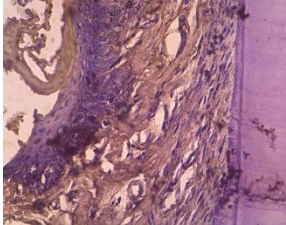
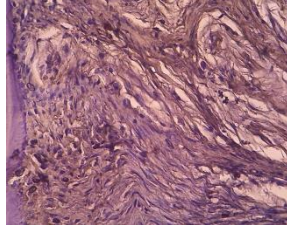
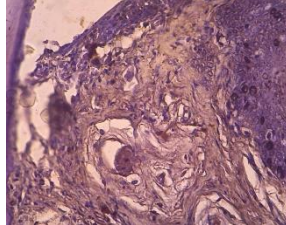
2.9 Pengamatan Preparat Jaringan Gingiva Tikus

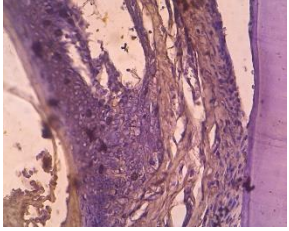
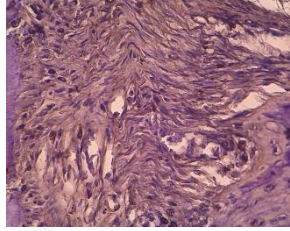
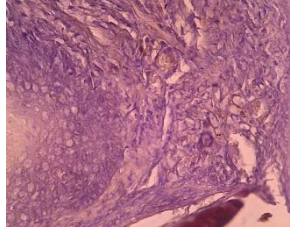
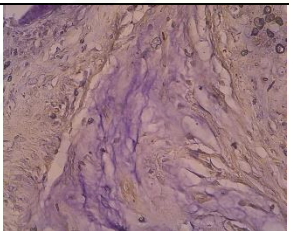
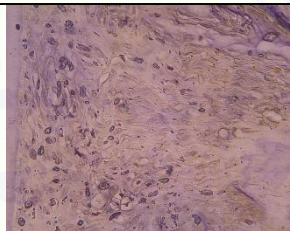
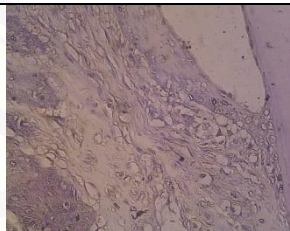
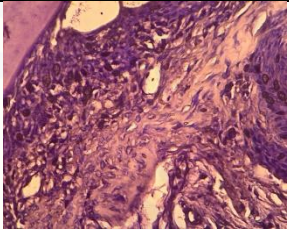
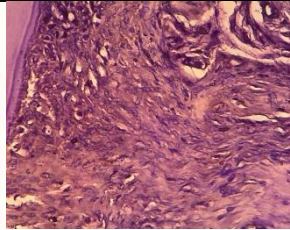
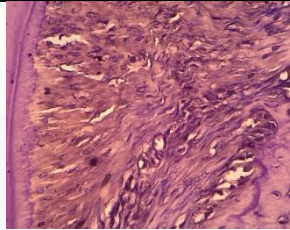
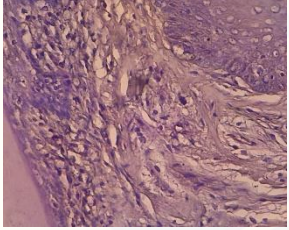
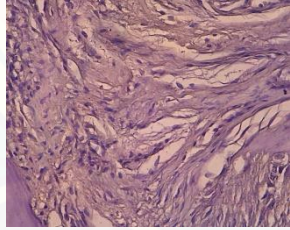
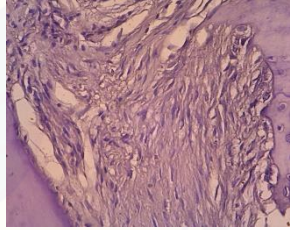


Pengamatan dan pengambilan gambar dengan menggunakan mikroskop Olympus dan Optilab

2.10 Hasil Pengamatan Preparat Jaringan Gingiva Tikus

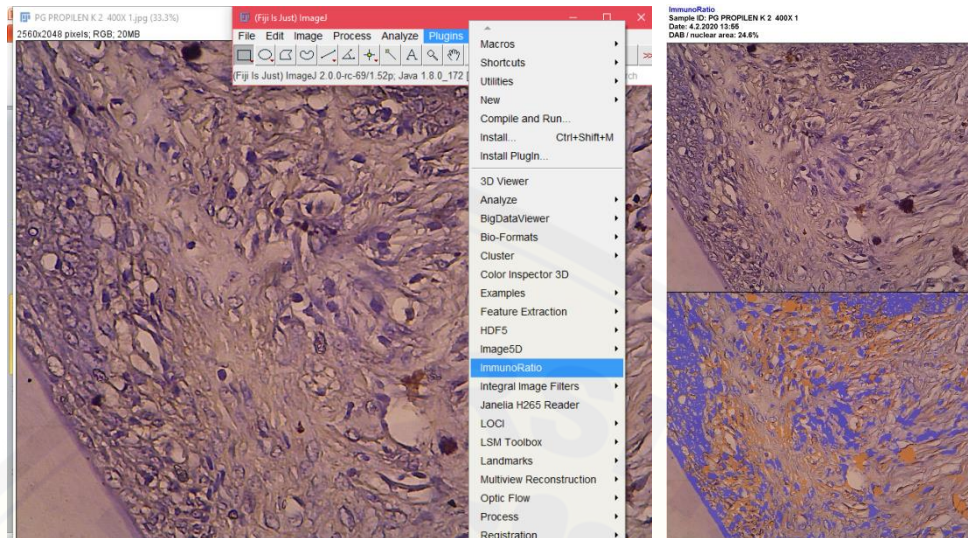
1. Kelompok Kontrol (K1)			
Sampel	I	II	III
1			
2			
3			
2. Kelompok Induksi <i>P.gingivalis</i> + Aquades (P.1.1)			
	I	II	III
1			
2			

3			
3. Kelompok Induksi <i>P.gingivalis</i> + Ekstrak Daun Singkong (P.1.2)			
	I	II	III
1			
2			
3			
4. Kelompok Disfungsi Ovarium + Aquades (P.2.1)			
	I	II	III
1			
2			

3			
5. Kelompok Disfungsi Ovarium + Ekstrak Daun Singkong (P.2.2)			
	I	II	III
1			
2			
3			



2.11 Penghitungan Ekspresi MMP-8 Fibroblas Gingiva Tikus



Pengaplikasian *ImageJ* dan *software Immunoratio* untuk mendapatkan persentasi ekspresi MMP-8 Fibroblas Gingiva Tikus

Lampiran 3. Rata-rata hasil penghitungan ekspresi MMP-8

Kelompok Perlakuan	Sampel	Hasil (3 Lapang Pandang)				Rata-rata
		I	II	III	X	
Kontrol (K)	1	20.6%	23.7%	21.6%	22%	23.3%
	2	24.2%	24.3%	23.7%	24%	
	3	22.4%	30.1%	19.3%	23.9%	
P.1.1	1	30.8%	34.2%	35.7%	33.6%	38.5%
	2	55%	39.4%	43%	45.8%	
	3	38.1%	34.9%	35.7%	36.2%	
P.1.2	1	25.5%	29.7%	26.6%	27.3%	27.2%
	2	33.2%	35.9%	30%	33%	

	3	22.1%	16.1%	26.3%	21.5%	
P.2.1	1	21.7%	24.6%	20.5%	22.3%	32.3%
	2	35.7%	44.8%	40.9%	40.5%	
	3	43.2%	26.8%	32.4%	34.1%	
P.2.2	1	28.4%	23.5%	21.7%	24.5%	21.1%
	2	21.6%	17.3%	18.3%	19.1%	
	3	22.4%	17.3%	19.6%	19.8%	

Lampiran 4. Analisis Data

4.1 Uji *Shapiro-Wilk*

Tests of Normality

	Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
	K1	.369	3	.	.787	3	.085
Hasil	P.1.1	.308	3	.	.901	3	.389
	P.1.2	.175	3	.	1.000	3	.990
	P.2.1	.244	3	.	.971	3	.676
	P.2.2	.342	3	.	.845	3	.228

a. Lilliefors Significance Correction

4.2 Uji Homogenitas *Levene*

Test of Homogeneity of Variances

Hasil

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.068	4	10	.160

4.3 Uji *One-way ANOVA***ANOVA**

Hasil

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.059	4	.015	4.379	.027
Within Groups	.034	10	.003		
Total	.093	14			

4.4 Uji *Least Significant Difference***Multiple Comparisons**

Dependent Variable: Hasil

LSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K1	P.1.1	-.152333*	.047538	.009	-.25825	-.04641
	P.1.2	-.039667	.047538	.424	-.14559	.06625
	P.2.1	-.090000	.047538	.088	-.19592	.01592
	P.2.2	.021667	.047538	.658	-.08425	.12759
P.1.1	K1	.152333*	.047538	.009	.04641	.25825
	P.1.2	.112667*	.047538	.039	.00675	.21859
	P.2.1	.062333	.047538	.219	-.04359	.16825
P.1.2	P.2.2	.174000*	.047538	.004	.06808	.27992
	K1	.039667	.047538	.424	-.06625	.14559
	P.1.1	-.112667*	.047538	.039	-.21859	-.00675
	P.2.1	-.050333	.047538	.315	-.15625	.05559
P.2.1	P.2.2	.061333	.047538	.226	-.04459	.16725
	K1	.090000	.047538	.088	-.01592	.19592
	P.1.1	-.062333	.047538	.219	-.16825	.04359
	P.1.2	.050333	.047538	.315	-.05559	.15625
P.2.2	P.2.2	.111667*	.047538	.041	.00575	.21759
	K1	-.021667	.047538	.658	-.12759	.08425
	P.1.1	-.174000*	.047538	.004	-.27992	-.06808
	P.1.2	-.061333	.047538	.226	-.16725	.04459
	P.2.1	-.111667*	.047538	.041	-.21759	-.00575

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

Lampiran 5. Surat Keterangan Identifikasi Tumbuhan



LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
(INDONESIAN INSTITUTE OF SCIENCES)
BALAI KONSERVASI TUMBUHAN
KEBUN RAYA PURWODADI
 Jl. Raya Surabaya - Malang Km. 65 Purwodadi - Pasuruan 67163
 Telp. (+62 343) 615033, Faks. (+62 341) 426046
 website : <http://www.krpurwodadi.lipi.go.id>

**SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TUMBUHAN**

No: 1191 /IPH.06/HM/X/2019

Kepala Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi LIPI dengan ini menerangkan bahwa material tumbuhan yang dibawa oleh:

Nama : Paramudibta Lungit Kuncaraningtyas
 NIM : 161610101021
 Instansi : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
 Tanggal material diterima : 15 Oktober 2019

Telah diidentifikasi/determinasi berdasarkan koleksi herbarium dan koleksi kebun serta referensi ilmiah, dengan hasil sebagai berikut :

Kingdom : Plantae
 Division : Magnoliophyta
 Class : Magnoliopsida
 Subclass : Rosidae
 Ordo : Euphorbiales
 Family : Euphorbiaceae
 Genus : Manihot
 Species : *Manihot esculenta* Crantz

Referensi:

1. Backer CA & Bakhuizen van den Brink RC. 1963. Flora of Java Vol.II. NVP Noordhoff, Groningen, The Netherlands. Hal. 496
2. Cronquist A. 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press, New York, USA. Hal. XV
3. M. Flach dan F. Rumawas. 1996 (esd) PROSEA (Plants Resources of South-East Asia) No 9; Plants yielding non-seed carbohydrates Hal.109

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Purwodadi, 28 Oktober 2019




An. Kepala

Kepala Seksi Eksplorasi dan Koleksi Tumbuhan



Rony Irawanto, S.Si., M.T.

Lampiran 6. Ethical Clearance

 KOMISI ETIK PENELITIAN FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS GADJAH MADA Sekretariat: Fakultas Kedokteran Gigi UGM Jl. Denta Sekip Utara Yogyakarta Telp. 081239447900	
KETERANGAN KELAIKAN ETIK PENELITIAN ("ETHICAL CLEARANCE") No.00356/KKEP/FGK-UGM/EC/2020	
Setelah Tim Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada mempelajari dengan seksama rancangan penelitian yang diusulkan:	
Judul	: POTENSI EKSTRAK DAUN SINGKONG (<i>Manihot esculenta</i>) TERHADAP EKSPRESI MMP-8 FIBROBLAS GINGIVA PADA MODEL TIKUS DISFUNSI OVARIUM DAN PERIODONTITIS
Peneliti Utama	: Paramudita Lungit Kuncaraningtyas
Penanggung Jawab Medis	: drg. Amandia Dewi P.S., M.Biomed
Unit/Lembaga	: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
Lokasi Penelitian	: 1. Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, 2. Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
Waktu Penelitian	: Januari 2020 – Selesai
Maka dengan ini menyatakan bahwa penelitian tersebut telah memenuhi syarat atau laik etik.	
Yogyakarta, 28 Januari 2020	
Wakil Dekan Bidang Penelitian, Pengabdian Kepada Masyarakat dan Kerjasama  drg. Trianna Wahyu Utami, MDSc., Ph.D	Ketua Komisi Etik Penelitian FKG UGM  Prof. Dr.drg. Pinandi Sri Pudyani, SU., Sp.Ort(K)

Lampiran 7. Surat Izin Penelitian Laboratorium Farmakologi



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
 Jl. Kalimantan No. 37 Jember (0331) 333536, Fak. 331991

Nomor : 6396 /UN.25.8/TL/2019
 Perihal : Ijin penelitian

15 OCT 2019

Kepada Yth.
 Ketua Bagian Biomedik
 Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
 Di Jember

Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediannya untuk memberikan ijin penelitian bagi mahasiswa kami dibawah ini :

1. Nama : Paramudibta Lungit K.
2. NIM : 161610101021
3. Semester / Tahun : 2019/2020
4. Fakultas : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
5. Alamat : Jln. Baturaden I Nomor 2, Jember
6. Judul Penelitian : Potensi Ekstrak Flavonoid Daun Singkong (*Manihot esculenta L.*) Terhadap Ekspresi MMP-8 Fibroblas Gingiva Model Tikus Disfungsi Ovarium Yang Diinduksi *Porphyromonas gingivalis*
7. Lokasi Penelitian : Laboratorium Farmakologi Ruang Hewan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
8. Data / alat yang dipinjam : -
9. Waktu : Oktober 2019 s/d Januari 2020
10. Tujuan Penelitian : Untuk Mengetahui Kemampuan Pemberian Ekstrak Flavonoid Daun Singkong (*Manihot esculenta L.*) Terhadap Ekspresi MMP-8 Fibroblas Gingiva Model Tikus Disfungsi Ovarium Yang Diinduksi *Porphyromonas gingivalis*
11. Dosen Pembimbing : 1. drg. Amandia Dewi Permana Shita, M.Biomed
 2. drg. Zahara Meilawaty, M.Kes

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih



Dekan
 Wakil Dekan I
 Dr. drg. Masniari Novita, M.Kes. Sp. OF (K)
 NIP. 196811251999032001

Lampiran 8. Surat Izin Penelitian Laboratorium Mikrobiologi



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
 Jl. Kalimantan No. 37 Jember (0331) 333536, Fak. 331991

Nomor : 6546/UN.25.8/TL/2019
 Perihal : Ijin penelitian

15 OCT 2019

Kepada Yth.
 Ketua Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi
 Universitas Jember

Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediannya untuk memberikan ijin penelitian bagi mahasiswa kami dibawah ini :

1. Nama : Paramudibta Lungit K.
2. NIM : 161610101021
3. Semester/Tahun : 2019/2020
4. Fakultas : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
5. Alamat : Jln. Baturaden I No. 2. Jember
6. Judul Penelitian : Potensi Ekstrak Flavonoid Daun Singkong (*Manihot esculenta L.*) Terhadap Ekspresi MMP-8 Fibroblas Gingiva Model Tikus Disfungsi Ovarium yang Diinduksi *Porphyromonas gingivalis*
7. Lokasi Penelitian : Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
8. Data/alat yang dipinjam : Autoklaf, Inkubator, Oven dll
9. Waktu : Oktober 2019 s/d Januari 2020
10. Tujuan Penelitian : Untuk Mengetahui Kemampuan Pemberian Ekstrak Flavonoid Daun Singkong (*Manihot esculenta L.*) Terhadap MMP-8 Fibroblas Gingiva Model Tikus Disfungsi Ovarium yang Diinduksi *Porphyromonas gingivalis*
11. Dosen Pembimbing : 1. drg. Amandia Dewi Permana Shita, M.Biomed
 2. drg. Zahara Meilawaty, M.Kes

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih



an, Dekan,
 Wakil Dekan I,
Dr. drg. Masniari Novita, M.Kes, Sp. OF (K)
 NIP. 196811251999032001

Lampiran 9. Surat Izin Penelitian Laboratorium Histologi



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
 UNIVERSITAS JEMBER
 FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
 Jl. Kalimantan No. 37 Jember ☎(0331) 333536, Fak. 331991

Nomor : 6346/UN.25.8/TL/2019
 Perihal : Ijin penelitian

15 OCT 2019

Kepada Yth.
 Ketua Bagian Biomedik
 Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
 Di Jember

Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediannya untuk memberikan ijin penelitian bagi mahasiswa kami dibawah ini :

1. Nama : Paramudibta Lungit K.
2. NIM : 161610101021
3. Semester / Tahun : 2019/2020
4. Fakultas : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
5. Alamat : Jln. Baturaden I Nomor 2, Jember
6. Judul Penelitian : Potensi Ekstrak Flavonoid Daun Singkong (*Manihot esculenta L.*) Terhadap Ekspresi MMP-8 Fibroblas Gingiva Model Tikus Disfungsi Ovarium Yang Diinduksi *Porphyromonas gingivalis*
7. Lokasi Penelitian : Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
8. Data / alat yang dipinjam : Mikroskop, Mikrotom, dll.
9. Waktu : Oktober 2019 s/d Januari 2020
10. Tujuan Penelitian : Untuk Mengetahui Kemampuan Pemberian Ekstrak Flavonoid Daun Singkong (*Manihot esculenta L.*) Terhadap Ekspresi MMP-8 Fibroblas Gingiva Model Tikus Disfungsi Ovarium Yang Diinduksi *Porphyromonas gingivalis*
11. Dosen Pembimbing : 1. drg. Amandia Dewi Permana Shita, M.Biomed
 2. drg. Zahara Meilawaty, M.Kes

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih



Dr. drg. Masniari Novita, M.Kes, Sp. OF (K)
 NIP. 196811251999032001