



**GAMBARAN HISTOPATOLOGIS EKSPRESI SUPEROKSIDA
DISMUTASE (SOD) PADA OVARIUM MODEL TIKUS
PERIODONTITIS YANG DIINDUKSI BAKTERI
Porphyromonas gingivalis DAN DITERAPI
DENGAN EKSTRAK DAUN SINGKONG
(*Manihot esculenta* Crantz)**

SKRIPSI

Oleh

**Ajeng Nurwahyuningtyas Anjani
NIM 161610101105**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2020**



**GAMBARAN HISTOPATOLOGIS EKSPRESI SUPEROKSIDA
DISMUTASE (SOD) PADA OVARIUM MODEL TIKUS
PERIODONTITIS YANG DIINDUKSI BAKTERI
Porphyromonas gingivalis DAN DITERAPI
DENGAN EKSTRAK DAUN SINGKONG
(*Manihot esculenta Crantz*)**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Pendidikan Dokter Gigi (S1) dan mencapai gelas Sarjana Kedokteran Gigi

Oleh

Ajeng Nurwahyuningtyas Anjani
NIM 161610101105

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2020

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Kedua orangtua saya, Ayah H. Jajang Ismayadi, SKM dan Bunda Hj. Aryani Yahya, S.Farm., M.Kes. yang tercinta;
2. Adik tersayang, Muhammad Alghifari Ismayadi dan Muhammad Rafi Dhirgam Ismayadi;
3. Guru-guru sejak taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi yang telah membimbing dan mendidik saya;
4. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;

MOTTO

“No disaster strikes except by permission of Allah and whoever believes in Allah,
he will guide his heart, and Allah is knowing of all things.”

(Q.S Al-Taghabun : 11)*



*) Q.S. Al-Taghabun : 11

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Ajeng Nuwahyuningtyas Anjani

NIM : 161610101105

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Gambaran Histopatologis Ekspresi Superoksida Dismutase (SOD) pada Ovarium Model Tikus Periodontitis yang diinduksi Bakteri *Porphyromonas gingivalis* dan diterapi dengan Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta Crantz*)” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 21 September 2020

Yang menyatakan,

Ajeng Nurwahyuningtyas Anjani

NIM 161610101105

SKRIPSI

**GAMBARAN HISTOPATOLOGIS EKSPRESI SUPEROKSIDA
DISMUTASE (SOD) PADA OVARIUM MODEL TIKUS
PERIODONTITIS YANG DIINDUKSI BAKTERI
Porphyromonas gingivalis DAN DITERAPI
DENGAN EKSTRAK DAUN SINGKONG
(*Manihot esculenta* Crantz)**

Oleh

Ajeng Nurwahyuningtyas Anjani
NIM 161610101105

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : drg. Agustin Wulan Suci D., M.D.Sc.

Dosen Pembimbing Anggota : Dr. drg. Ari Tri Wanodyo H., M.Kes.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Gambaran Histopatologis Ekspresi Superoksida Dismutase (SOD) pada Ovarium Model Tikus Periodontitis yang diinduksi Bakteri *Porphyromonas gingivalis* dan diterapi dengan Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta Crantz*)” telah diuji dan disahkan pada :

hari, tanggal : Senin, 21 September 2020

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Tim Penguji

Penguji Utama

Penguji Anggota

Prof. drg. Mei Syafriadi, M.D.Sc.,
Ph.D.,Sp. PMM (K)

NIP 196805291994031003

Pembimbing Utama

Dr. drg. Zahreni Hamzah, M.S.

NIP 196104011985112001

Pembimbing Pendamping

drg. Agustin Wulan Suci D., M.D.Sc.

NIP 197908142008122003

Dr. drg. Ari Tri Wanodyo H., M.Kes.

NIP 197308182001122001

Mengesahkan

Deksan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember,

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

RINGKASAN

Gambaran Histopatologis Ekspresi Superoksida Dismutase (SOD) pada Ovarium Model Tikus Periodontitis yang diinduksi Bakteri *Porphyromonas gingivalis* dan diterapi dengan Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta Crantz*); Ajeng Nurwahyuningtyas Anjani; 2020 : 84 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Prevalensi periodontitis cukup tinggi di Indonesia, berdasarkan data WHO menunjukkan bahwa periodontitis mempengaruhi sekitar 20-50% populasi di dunia. Indonesia menduduki urutan kedua dengan penduduk yang menderita penyakit periodontal yaitu mencapai 96,58%. 459 dari 1000 jiwa penduduk di Jawa Timur menderita penyakit periodontal. Beberapa penelitian terbaru menyatakan bahwa periodontitis dapat memicu terjadinya menopause atau *early aging*, hal ini diduga faktor virulensi bakteri yang dapat menyebabkan stres oksidatif. Stres oksidatif dapat dihambat oleh antioksidan, maka dilakukan penelitian lebih dalam lagi dengan menggunakan antioksidan eksogen yang terdapat pada ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta Crantz*).

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian *the post test only control group design*. Populasi penelitian yang digunakan adalah tikus dengan jenis Sprague Dawley betina dengan besar sampel menggunakan rumus *Resource Equation* adalah 3 ekor tikus perkelompok penelitian dengan jumlah sampel keseluruhan adalah 15 ekor tikus. Sebelum dilakukan perlakuan, tikus diaklimatisasi selama satu minggu. Tikus dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu kelompok kontrol (K), kelompok tikus yang diinduksi bakteri *P. gingivalis* dan diberi aquadest (P1), kelompok tikus yang diinduksi bakteri *P. gingivalis* dan diberi ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta C.*) (P2), kelompok tikus yang diinduksi bakteri *P. gingivalis* dan diberi vitamin C (P3), kelompok tikus yang diinduksi bakteri *P. gingivalis* dan diberi metronidazole (P4). Pemberian perlakuan pada masing-masing kelompok pada hari ke 0-7. Setelah itu, dilakukan pengambilan jaringan ovarium dan dilakukan

pemrosesan pewarnaan HE dan IHC. Pada pewarnaan HE akan diamati secara deskriptis kualitatif yaitu dengan mengamati gambaran folikel pada ovarium tikus. Pada pewarnaan IHC akan dilakukan pengamatan ekspresi SOD di sekitar folikel ovarium dengan menggunakan *software Image J*.

Hasil penelitian pada pewarnaan HE kelompok K nampak adanya folikel tertier yang ditandai dengan adanya antrum folikel. Pada kelompok P1, terlihat adanya perkembangan folikel sekunder yang ditandai dengan proliferasi sel granulosa yang menghasilkan *Zone of Granulosa*. Pada kelompok P2, menunjukkan adanya perkembangan folikel primer yang ditandai adanya lapisan sel granulosa kuboid. Pada kelompok P3 dan P4, terlihat adanya folikel sekunder yang mengalami atretic. Pada pewarnaan IHC, kelompok K, P1, dan P2 menunjukkan ekspresi SOD yang sedang. Ekspresi SOD yang kuat terdapat hampir di semua kelompok yang mengalami folikel atretic.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Gambaran Histopatologis Ekspresi Superoksida Dismutase (SOD) pada Ovarium Model Tikus Periodontitis yang diinduksi Bakteri *Porphyromonas gingivalis* dan diterapi dengan Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta Crantz*)”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan strata satu (S1) pada program studi Pendidikan Dokter Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terimakasih kepada :

1. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes. Sp.Pros., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
2. drg. Agustin Wulan Suci D., M.D.Sc., selaku Dosen Pembimbing Utama dan Dr. drg. Ari Tri Wanodyo H., M.Kes., selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang telah meluangkan waktu dan memberikan bimbingan hingga terselesaikannya skripsi ini.
3. Prof. drg. Mei Syafriadi, M.D.Sc., Ph.D.,Sp. PMM (K) selaku Dosen Penguji Utama dan Dr. drg. Zahreni Hamzah, M.S., selaku Dosen Penguji Anggota yang telah memberikan kritik dan saran dalam penyempurnaan skripsi ini.
4. drg. Yenny Yustisia, M. Biotech., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan motivasi pada masa perkuliahan hingga penulisan skripsi ini.
5. Kedua orang tua tercinta, Ayah Jajang Ismayadi dan Bunda Aryani Yahya yang telah memberikan dorongan dan doa demi terselesaikannya skripsi ini.
6. Adik tersayang, Muhammad Alghifari Ismayadi dan Muhammad Rafi Dhirgam Ismayadi yang telah memberikan motivasi dan semangat.
7. Teman-teman yang membantu dalam penelitian, Vina, Nanad, Bila, Dhesya, Amalia, Dita, Fifi, dan Dina.
8. Teman-teman LISMA 2016, Cimon, Nada, Cho, Ina dan Akbar.

9. Sahabat saya Kevin Justisio, Misbahul Munir, Musfira, Nur Rahmi Amir, Dian Septianti, Rosi Latifa H, dan Moli yang telah memberikan dukungan dan semangat.
10. Teman-teman seperantauan saya dari Sulawesi Squad, yang telah memberikan dukungan dan berjuang bersama di kota perantauan ini (Jember).
11. Teman-teman Dextra 2016 yang turut berjuang demi mencapai gelar sarjana.
12. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat di kemudian hari.

Jember, 21 September 2020

Penulis

DAFTAR ISI

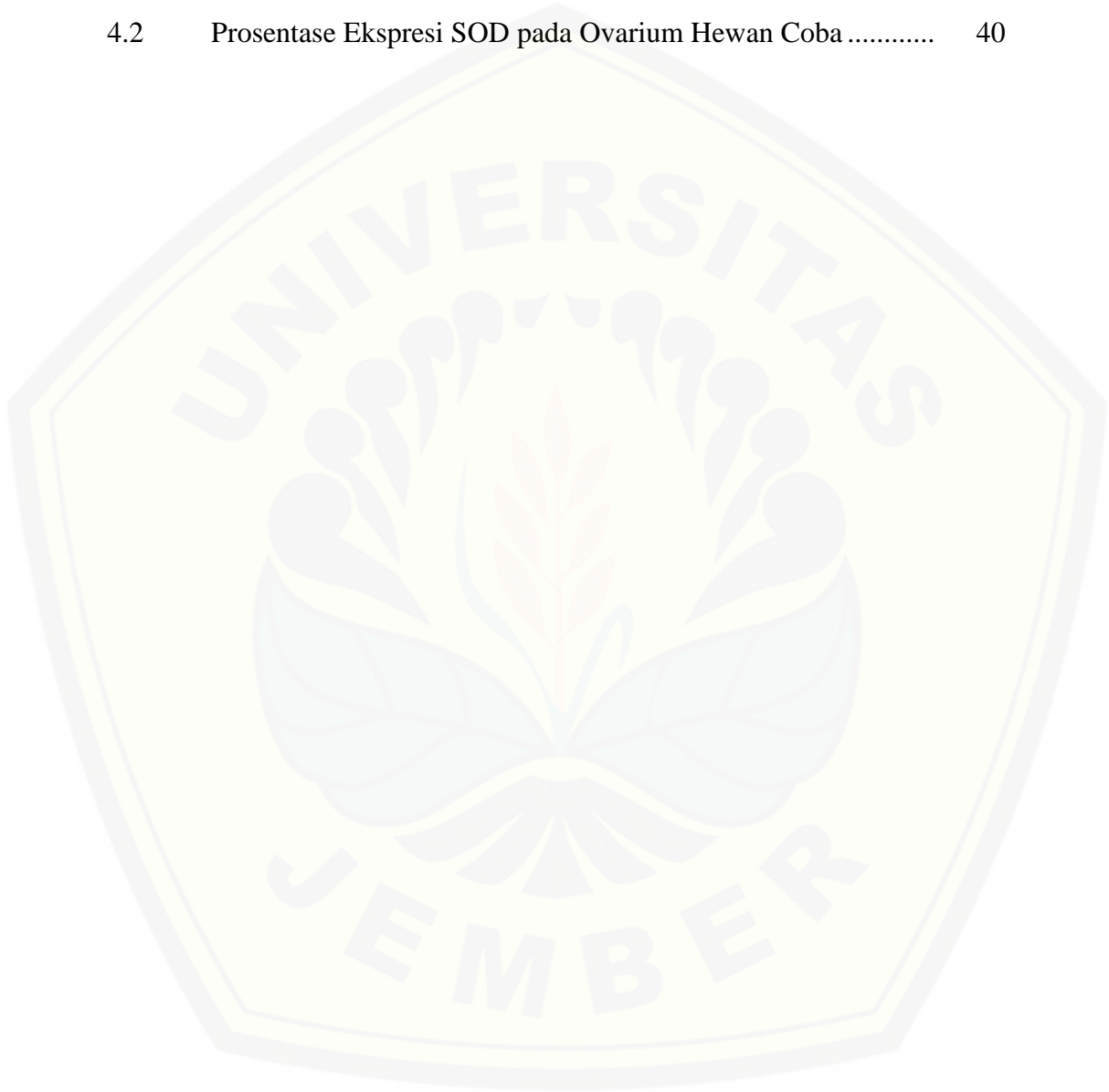
	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	vii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 LatarBelakang	1
1.2 RumusanMasalah	3
1.3 Tujuan	3
1.4 Manfaat	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Ovarium	4
2.1.1 Folikel Primer.....	5
2.1.2 Folikel Sekunder.....	5
2.1.3 Folikel Tertier.....	5
2.1.4 Atretic Folikel.....	6
2.2 Singkong	6
2.2.1 Klasifikasi Singkong	6
2.2.2 Kandungan Daun Singkong.....	7
2.3 Antioksidan	8

2.3.1	<i>Copper/Zinc (Cu/Zn)</i> - SOD	10
2.3.2	<i>Manganase (Mn)</i> - SOD	10
2.3.3	Ekstraseluler (EC)- SOD.....	10
2.4	Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Galur Sprague-Dawley	11
2.5	Periodontitis	12
2.6	Bakteri <i>P. gingivalis</i>	14
2.7	Kerangka Konsep	18
2.8	Hipotesis	20
BAB 3.	METODE PENELITIAN	21
3.1	Jenis Penelitian	21
3.2	Rancangan Penelitian	21
3.3	Tempat Penelitian	21
3.4	Waktu Penelitian	21
3.5	Identifikasi Variabel Penelitian	21
3.5.1	Varibael Bebas.....	21
3.5.2	Variabel Terikat.....	22
3.5.3	Variabel Terkendali	22
3.6	Definisi Operasional Penelitian	22
3.6.1	Ekstrak Daun Singkong (<i>Manihot esculenta C.</i>)....	22
3.6.2	Vitamin C	22
3.6.3	Metronidazole.....	23
3.6.4	Antioksdan SOD.....	23
3.6.5	Periodontitis dengan Induksi <i>P. gingivalis</i>	23
3.7	Populasi dan Sampel	23
3.7.1	Populasi Penelitian	23
3.7.2	Kriteria Sampel.....	23
3.7.3	Besar Sampel Penelitian	24
3.8	Alat dan Bahan	24
3.8.1	Alat Penelitian	24
3.8.2	Bahan Penelitian	25
3.9	Prosedur Penelitian	26

3.9.1 <i>Ethical Clearance</i>	26
3.9.2 Persiapan Hewan Coba.....	26
3.9.3 Pembagian Kelompok Hewan Perlakuan	26
3.9.4 Pemberian Metronidazole dan Vitamin C	27
3.9.5 Pembuatan Suspensi <i>P. gingivalis</i>	27
3.9.6 Pembuatan Model Tikus yang diinduksi <i>P. gingivalis</i>	28
3.9.7 Pembuatan Ekstrak Daun Singkong (<i>Manihot esculenta C.</i>)	28
3.9.8 Euthanasia.....	29
3.9.9 Dekalsifikasi Jaringan	29
3.9.10 Pengambilan Jaringan Ovarium	30
3.9.11 Pembuatan Sediaan Histologis	31
3.9.12 Pewarnaan Immunohistokimia	32
3.10 Penghitungan Data	34
3.11 Analisis Data	34
3.12 Alur Penelitian	35
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	36
4.1 Gambaran Histologi Folikel Ovarium dengan Pewarnaan HE	36
4.2 Gambaran Ekspresi SOD dengan Pewarnaan IHC	39
4.3 Pembahasan	40
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	44
5.9 Kesimpulan	44
5.10 Saran	44
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN	52

DAFTAR TABEL

	Halaman
4.1 Intensitas Ekpresi SOD pada Ovarium Hewan Coba	39
4.2 Prosentase Ekspresi SOD pada Ovarium Hewan Coba	40

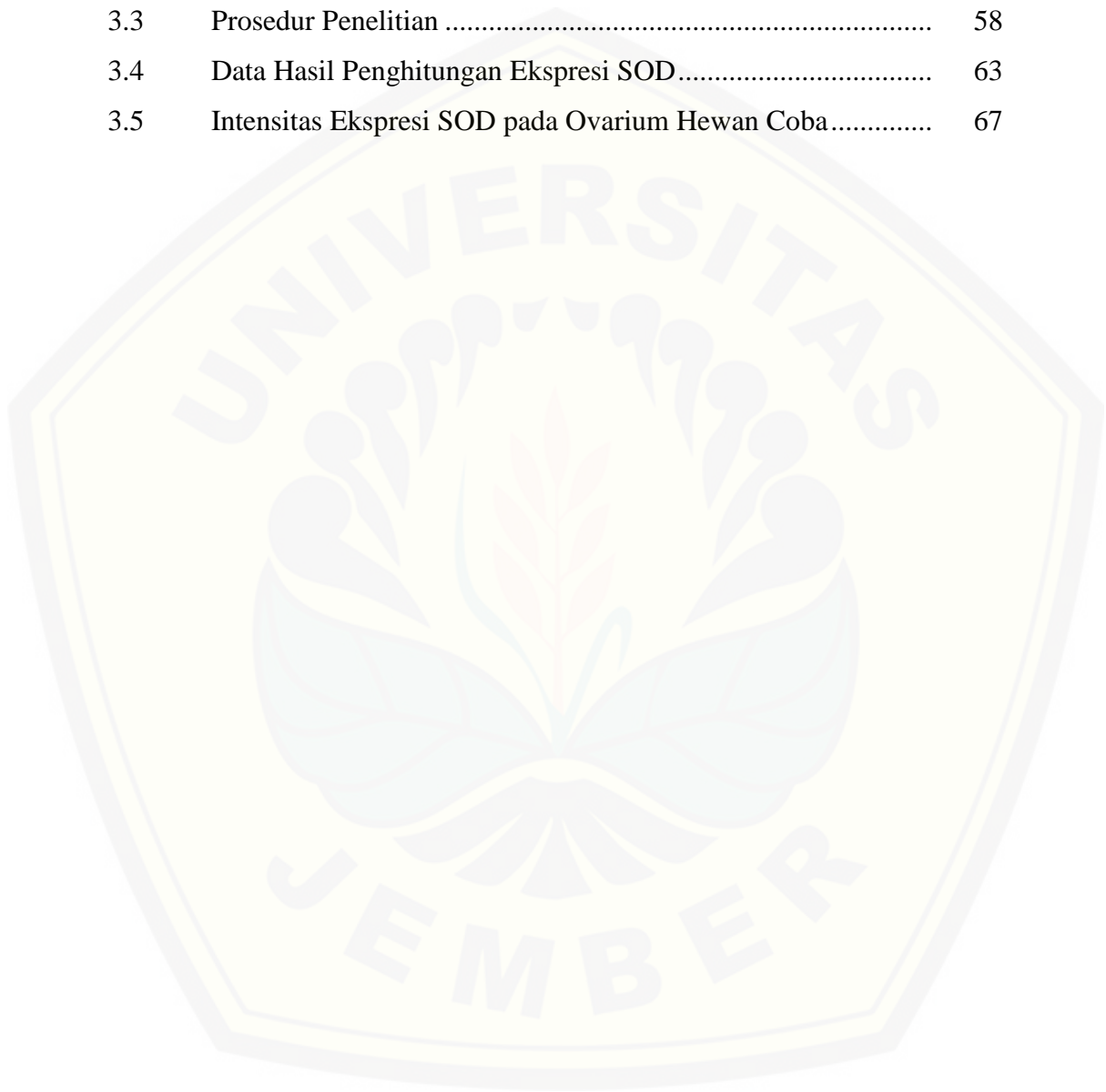


DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1	Gambaran Histologis Ovarium 4
2.2	Morfologi Singkong 7
2.4	Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) galur Sprague Dawley 12
2.6	Bakteri <i>P. gingivalis</i> 15
3.10	Gambaran Intensitas Pewarnaan IHC 34
4.1	Histologi Preparat Jaringan Ovarium 36
4.2	Histologi Ovarium Tikus yang diinduksi <i>P. gingivalis</i> 38

DAFTAR LAMPIRAN

3.1	Surat Ijin Penelitian.....	52
3.2	Alat dan Bahan Penelitian.....	56
3.3	Prosedur Penelitian	58
3.4	Data Hasil Penghitungan Ekspresi SOD.....	63
3.5	Intensitas Ekspresi SOD pada Ovarium Hewan Coba.....	67



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sebagian besar penyakit infeksi atau degeneratif yang berkembang saat ini disebabkan oleh radikal bebas, walaupun radikal bebas ini merupakan produk alami tubuh. Radikal bebas ini dapat memicu penyakit kronis oleh karena molekul ini tidak stabil dan reaktif, sehingga mudah menerima elektron dari molekul lain. Selain itu, tubuh juga memperoleh radikal bebas lain dari luar tubuh seperti polutan, sinar ultra violet, dan makanan (Khaira, 2010). Hal ini menyebabkan akumulasi radikal bebas dalam tubuh. Secara fisiologis, tubuh menghasilkan senyawa antioksidan endogen seperti glutathione peroxide, katalase, dan superoksida dismutase (SOD) untuk menurunkan dan mencegah akumulasi radikal bebas (Rosahdi, *et al*, 2013).

SOD merupakan enzim detoksifikasi yang diproduksi oleh tubuh (Atta, *et al*, 2017). SOD dapat melindungi sel terhadap *Reactive Oxygen Species* (ROS), stress oksidatif, yang harapannya dapat mencegah terjadinya kelainan dan disfungsi organ, termasuk pada ovarium. Stress oksidatif dapat terjadi juga karena proses inflamasi, proses inflamasi dapat menghasilkan bahan-bahan toksik prooksidatif seperti ROS yang dapat berupa oksidan dan radikal bebas (Fitriyana, 2013).

Beberapa penelitian menyebutkan bahwa penyakit periodontal seperti periodontitis mempunyai pengaruh terhadap sistemik, salah satunya ke ovarium yang dapat memicu terjadinya menopause atau *early aging* (Lubis, 2016). Periodontitis merupakan peradangan jaringan periodontal yang disebabkan oleh periopathogen, terutama bakteri gram negatif, seperti *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) (How, *et al*, 2016). Bakteri *P. gingivalis* memiliki bahan toksin yang dapat menyebabkan kerusakan jaringan sehingga bahan toksinnya dapat secara langsung ke sirkulasi darah sistemik melalui pembuluh darah yang robek pada poket gingiva (How, *et al*, 2016).

Prevalensi periodontitis ini cukup tinggi di Indonesia. Berdasarkan data World Health Organization (WHO) menunjukkan bahwa penyakit periodontal

mempengaruhi sekitar 20-50% populasi dunia. Indonesia menduduki urutan kedua dengan penduduk yang menderita penyakit periodontal yaitu mencapai 96,58% (Lumentut, *et al*, 2013). 459 dari 1000 jiwa penduduk Jawa Timur menderita penyakit periodontal, terutama di pedesaan (Wachidah, 2016).

Beberapa penelitian terbaru menyatakan bahwa ada hubungan antara periodontitis dengan menopause, periodontitis dapat memicu terjadinya menopause atau *early aging*, hal ini diduga faktor virulensi bakteri. Faktor virulensi bakteri menyebabkan endotoksemia dan stress oksidatif sistemik, sehingga dapat menginfeksi organ reproduksi, salah satunya ovarium (Quamilla, 2016). Selain itu, hal ini kemungkinan dikaitkan dengan perubahan reseptor hormon estrogen pada gingiva dan jaringan periodontal. Pada gingiva, estrogen dan progesterone mempengaruhi perkembangan fibroblast, kolagen, efektivitas barrier epitel terhadap bakteri, dan pemeliharaan tulang alveolar, sehingga hormon estrogen akan sangat berpengaruh pada jaringan periodontal jika mengalami perubahan (Erawati, 2006). Perubahan hormon estrogen ini disebabkan oleh penuaan ovarium. Penuaan ovarium ini dimediasi stress oksidatif yang akan mempengaruhi percepatan patologi dalam saluran reproduksi wanita (Surasandi, 2017). Paradigma tersebut masih belum jelas, sehingga perlu dieksplorasi lebih lanjut.

Pentingnya antioksidan dalam menghambat stress oksidatif pada disfungsi ovarium perlu dilakukan penelitian lebih dalam lagi untuk mencegah terjadinya stress oksidatif pada ovarium dengan menggunakan antioksidan eksogen yang terdapat pada ekstrak daun singkong. Daun singkong (*Manihot esculenta C.*) memiliki banyak kandungan seperti vitamin C, senyawa aktif flavonoid, tannin, dan saponin. Senyawa flavonoid, tannin, dan vitamin C pada daun singkong berfungsi sebagai antioksidan untuk menghambat aktivitas radikal bebas dalam tubuh dengan cara memberikan elektron pada molekul radikal bebas sehingga radikal bebas tersebut menjadi stabil (Hasim, 2016).

1.2 Rumusan Masalah

Masalah yang dapat dirumuskan berdasarkan latar belakang di atas adalah bagaimana gambaran histopatologis ekspresi SOD pada folikel ovarium tikus yang diinduksi bakteri *P. gingivalis* dan diterapi dengan ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta C.*).

1.3 Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui gambaran ekspresi SOD pada ovarium tikus yang diinduksi bakteri *P. gingivalis* dan diterapi dengan ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta C.*).

1.4 Manfaat

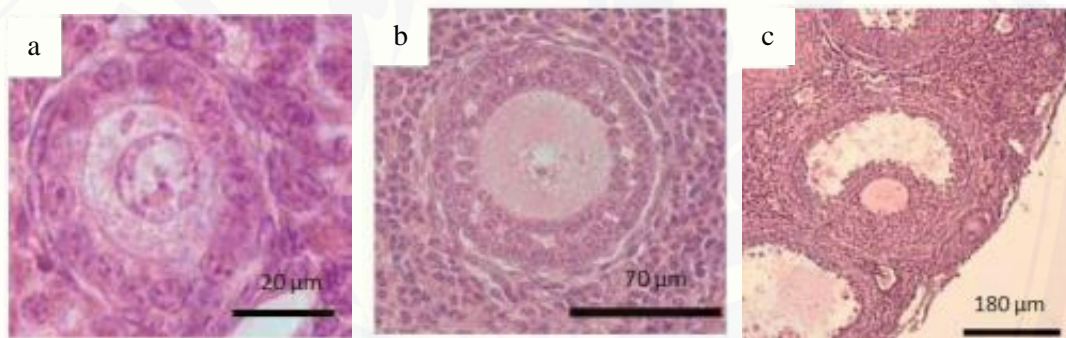
Berdasarkan hasil penelitian ini diharapkan dapat :

1. Memberikan dasar ilmiah tentang efek penyebaran toksin bakteri *P. gingivalis* terhadap ovarium.
2. Memberikan dasar ilmiah tentang manfaat antioksidan dari tanaman daun singkong untuk mengeliminasi stres oksidatif akibat penyebaran sistemik toksin bakteri *P. gingivalis*.
3. Hasil penelitian ini dapat dijadikan sebagai acuan bagi peneliti yang berhubungan dengan penelitian sejenis.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ovarium

Ovarium merupakan organ reproduksi yang terbagi atas medula dan korteks, bagian korteks menjadi tempat pembentukan folikel primer, sekunder, dan korpus luteum serta tempat terbentuknya hormon reproduksi seperti estrogen, progesteron. Ovarium berbentuk seperti anggur dan merupakan tempat berkembangnya folikel telur yang dilingkupi oleh sel-sel granulosa dengan ketebalan yang bervariasi, sesuai dengan tingkat perkembangannya (Akbar, 2010).



Gambar 2.1 Gambaran histologis ovarium; a) folikel primer; b) folikel sekunder; c) folikel tertier (Winarto, *et al*, 2017).

Pada ovarium terdapat hormon estrogen dan progesteron. Estrogen merupakan senyawa steroid yang memiliki berbagai fungsi baik secara lokal maupun sistemik. Estrogen berperan dalam metabolisme lemak yang bersifat melindungi dengan membuat pembuluh darah lebih lebar sehingga mengurangi terjadinya aterosklerosis yang dapat memicu penyakit jantung, stroke, dan dimensia. Jika terjadi penurunan pada hormon estrogen, maka akan terjadi peningkatan kolesterol, trigliserida, LDL (*Low Density Lipoprotein*), dan penurunan HDL (*High Density Lipoprotein*) yang memicu terjadinya kelainan vaskuler pada otak (dimensia), hal ini dapat terjadi karena penurunan suplai darah ke otak yang disebabkan deposit lemak pada pembuluh darah menuju otak

(Pratiwi, N, 2012). Selain metabolisme lemak, estrogen juga berperan sebagai antioksidan. Estrogen dapat mempengaruhi ekspresi dan fungsi dari antioksidan enzim (SOD, GPx, dan katalase). Pada masa menopause, wanita cenderung mengalami stress oksidatif, hal ini dapat diketahui dari penurunan kadar antioksidan seperti SOD karena antioksidan banyak terpakai untuk menetralkan radikal bebas (Sugiritama, 2019).

2.1.1 Folikel Primer

Folikel primer merupakan stadium pertama pertumbuhan folikel. Folikel primer terdiri dari oosit yang mulai tumbuh dan terbentuk zona pelusida yang mengelilingi oosit. Zona pelusida tersebut disintesis oleh oosit dan sel granulosa yang terletak di antara oosit dan lapisan granulosa. Oosit yang dikelilingi satu lapisan sel epitel squamos yang akan berdiferensiasi menjadi sel kuboid dan membentuk massa yang disebut *Zone of Granulose*. Folikel primer cenderung berkembang di korteks, di bawah tunica albuginea (Cox, *et al*, 2020).

2.1.2 Folikel Sekunder

Folikel primer akan berkembang menjadi folikel sekunder, oosit yang dikelilingi oleh dua atau lebih lapisan dari sel granulosa yang terus berkembang. Pada perkembangan folikel sekunder, membran basal akan terbentuk di luar lapisan sel granulosa dan terbentuk pula lapisan konsentris yang disebut sebagai *Theca Follicle*. Lapisan sel teka berfungsi sebagai sumber androgen yang merupakan substrat untuk produksi estrogen oleh sel granulosa. Sel teka banyak menerima vaskularisasi dari pembuluh darah di sekitarnya (Rimon, *et al*, 2016).

2.1.3 Folikel Tertier

Pada stadium akhir perkembangan folikel adalah folikel tertier dan akan ada rongga yang membentuk rongga sentral yang besar, disebut antrum folikuler. Rongga tersebut diisi cairan yang mengandung steroid, protein, elektrolit dan proteoglycans yang diproduksi oleh sel teka. Folikel tertier ditandai dengan pembentukan sebuah antrum atau rongga dalam folikel (Hati, 2016).

2.1.4 Atretik Folikel

Perkembangan folikel tidak selalu berhasil namun banyak yang mengalami atretik. Sel granulosa merupakan komponen utama folikel dan penyebab awal terjadinya folikel atresia. Folikel yang mengalami atretik dapat ditandai dengan lapisan granulosa yang longgar, lamina basal yang tidak nampak, oosit mengalami degenerasi, dan sel theca mengalami hipertropi menjadi sel yang bulat atau spindel (Matsuda, *et al*, 2012).

2.2 Singkong

Singkong adalah tanaman yang telah dikenal di seluruh pelosok Indonesia. Tanaman singkong merupakan tanaman dikotil dengan tinggi 1-4 m dengan daun bertangkai dan mudah luruh serta menjari 5-9 belahan lembar, daun, umbi akar besar, memanjang, kulit berwarna coklat Pengolahan daun singkong secara terpadu merupakan upaya memanfaatkan seluruh bagian dari singkong termasuk daunnya (Puspitarini, 2010).

2.2.1 Klasifikasi Singkong

Klasifikasi singkong adalah sebagai berikut (Tjitrosoepomo, 2005) :

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Super Divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Euphorbiales
Famili	: Euphorbiaceae
Genus	: Manihot
Spesies	: <i>Manihot esculenta Crantz</i>



Gambar 2.2 Morfologi Singkong : a) batang singkong; b) daun singkong; c) bunga singkong (Septiriyani,2017).

2.2.2 Kandungan Daun Singkong

Daun singkong mengandung flavonoid, alkaloid, tannin, antrakuinon, saponin, gula pereduksi dan antrosianida. Kandungan asam sianida dalam daun singkong dapat dikurangi melalui proses pengeringan, perendaman dalam air, dan perebusan (Puspitarini, 2010). Beberapa penelitian menunjukkan aktivitas flavonoid, saponin, tannin, sebagai penghambat pertumbuhan bakteri gram negatif. Dinding sel bakteri gram negatif memiliki susunan dinding sel yang lebih kompleks yang memiliki kandungan lipid yang lebih tinggi yaitu 11–22% dan akan lebih bersifat non polar sehingga akan lebih mudah ditembus oleh senyawa antibakteri yang bersifat non polar. Mekanisme penghambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh senyawa tersebut secara umum ialah dengan menyebabkan kerusakan dan mengganggu fungsi membran sel. Flavonoid yang terdapat pada daun singkong dapat membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler. Hal ini akan menyebabkan lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh. Kerusakan dinding sel dapat menyebabkan perubahan permeabilitas membran sel sehingga menghambat kerja enzim intraseluler dan air masuk ke dalam sel secara tidak terkontrol (Pratiwi, 2016).

a. Flavonoid

Flavonoid memiliki fungsi penting bagi manusia. Flavonoid dapat berfungsi sebagai antiinflamasi karena flavonoid dapat menghambat terbentuknya sitokin proinflamasi seperti $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, IL-1 β dan interferon- γ . Flavonoid dapat

menghambat terjadinya kerusakan DNA dan merangsang terbentuknya antioksidan enzimatis seperti SOD, katalase, dan glutathione peroxidase, serta meningkatkan efektifitas vitamin C (Parwata, 2016).

b. Tannin

Tannin memiliki fungsi sebagai antioksidan yang akan memberikan elektronnya ke radikal bebas sehingga menghambat terjadinya stres oksidatif yang dapat menyebabkan kerusakan membran sel dan mengurangi terjadinya pelepasan mediator sel radang (Meilawaty, 2013).

b. Vitamin C

Vitamin C atau asam askorbat pada daun singkong memiliki aktivitas antioksidan dengan menghambat kerusakan oksidatif terhadap suatu molekul target dengan cara memberikan elektron kepada radikal bebas sehingga tidak terjadi stres oksidatif. Selain sebagai antioksidan, vitamin C dapat mempercepat penyembuhan luka dengan membantu pembentukan kolagen dengan cara mengaktifkan prolin dan lisin hidroksilase sehingga terjadinya hidroksilasi prokolagen (Pakaya, 2014).

c. Saponin

Saponin dalam ekstrak daun singkong berfungsi sebagai antibakteri yaitu sebagai pendukung proses penyembuhan luka lebih cepat dengan meminimalisir kontaminasi bakteri dan antiinflamasi yang dapat memblokir jalur prostaglandin (Meilawaty, 2013).

2.3 Antioksidan

Antioksidan dalam tubuh berperan penting dalam melawan stress oksidatif. Antioksidan merupakan molekul yang dapat menetralkan radikal bebas dengan menerima atau memberikan elektron radikal bebas yang tidak berpasangan. Molekul antioksidan dapat langsung bereaksi dengan radikal bebas yang reaktif dan menghancurkannya (Ming Lu, *et al*, 2010).

Antioksidan dibagi menjadi dua kelompok besar, yaitu sebagai berikut :

a. Antioksidan Primer

Antioksidan primer disebut juga antioksidan enzimatis. Antioksidan ini meliputi enzim SOD, katalase dan glutathion peroksidase (GPx). Enzim-enzim tersebut mampu menekan atau menghambat pembentukan radikal bebas dengan cara memutus reaksi berantai dan mengubahnya menjadi produk lebih stabil, disebut sebagai reaksi *chain breaking antioxidant*. Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan primer apabila dapat memberikan atom hidrogen secara cepat kepada senyawa radikal, kemudian radikal antioksidan yang terbentuk segera berubah menjadi senyawa yang lebih stabil (Winarsi, 2007).

SOD merupakan enzim detoksifikasi karena dapat melindungi sel terhadap ROS, stress oksidatif, yang dapat menyebabkan terjadinya penyakit dan proses degenerasi seperti penuaan dan karsinogenik (Ighodaro, 2017). SOD terdapat pada semua organisme aerob dan hampir semua komponen subseluler yang mampu membentuk oksigen teraktivasi, karenanya SOD berperan penting dalam sistem pertahanan terhadap serangan stres oksidatif (Wulandari, 2016).

SOD merupakan antioksidan yang sangat kuat dan merupakan pertahanan tubuh garis pertama dalam mengatasi stres oksidatif. SOD merupakan antioksidan pencegah yang dapat menghambat kerusakan anion superoksida. Cara kerja SOD yaitu dengan mengkonversi anion superoksida menjadi komponen lain yang kurang berbahaya, yaitu hidrogen peroksida. Hidrogen peroksida di dalam mitokondria akan mengalami detoksifikasi oleh enzim katalase menjadi senyawa H_2O dan O_2 , sedangkan H_2O_2 yang berdifusi ke dalam sitosol akan didetoksifikasi oleh enzim glutathion peroksidase. SOD bersifat tidak stabil terhadap panas, cukup stabil pada kondisi basa dan masih mempunyai aktivitas walaupun disimpan sampai lima tahun pada suhu $5^\circ C$ (Muhammad, 2009).

Aktivitas enzim SOD memiliki peran penting dalam sistem pertahanan tubuh, terutama terhadap aktivitas senyawa oksigen reaktif yang dapat menyebabkan stres oksidatif. Pada tanaman, SOD diklasifikasikan berdasarkan adanya logam yang berperan sebagai kofaktor pada sisi aktif enzim, dapat dikelompokkan menjadi 3 yaitu Cu/ZnSOD, MnSOD dan ECSOD, aktivitas

tertinggi SOD dapat ditemukan pada di hati, kelenjar adrenalin, ginjal, darah, limfa, pankreas, otak, paru-paru, lambung, usus, ovarium dan timus (Wulandari, 2016).

2.3.1 *Copper/Zinc (Cu/Zn) – SOD*

Copper/Zinc (Cu/Zn) – SOD terdapat sitoplasma dan nukleus. Cu, Zn – SOD dikodekan oleh gen *sodC* yang terdapat di berbagai bakteri gram positif dan gram negatif yang melekat di periplasma atau membran luar, seperti *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*, dan *Salmonella Dublin* (Sanjay, 2011). Mutasi gen *sodC* bertujuan untuk melemahkan virulensi bakteri. Cu, Zn – SOD berperan penting untuk memutus radikal bebas yang dihasilkan dari metabolisme oksidatif seluler menjadi hidrogen peroksida. Peradangan ditandai dengan aktivasi makrofag. SOD-1 atau Cu, Zn – SOD akan meningkatkan kemampuan makrofag untuk menghalangi menghambat peningkatan ROS selama peradangan (Marikovsky, *et al*, 2003).

2.3.2 *Manganase (Mn) – SOD*

Manganase (Mn) – SOD merupakan enzim yang terdapat pada mitokondria untuk memediasi ROS yang direduksi parsial O₂. Mn – SOD sering terlibat dalam sejumlah penyakit yang biasanya berhubungan dengan stress oksidatif. Mn – SOD eksogen dapat memblokir pensinyalan ROS untuk menghambat tumorigenesis, hal ini menunjukkan bahwan Mn –SOD kemungkinan dapat dijadikan sebagai terapi antitumor potensial. Ekspresi Mn – SOD yang dapat meningkatkan aktivitas enzim aconitase yang peka terhadap superoksida sehingga mengubah kemampuan metabolisme sel dan menghambat pertumbuhan sel (Chang Li, 2011).

2.3.3 *Ekstraseluler (EC) – (SOD)*

Ekstraseluler (EC) – SOD merupakan enzim yang terdapat pada cairan ekstraseluler seperti cairan sinovial, getah bening, dan plasma. EC – SOD banyak diekspresikan pada pembuluh darah terutama dinding arteri dan disintesis dalam

sel oto polos pembuluh darah serta disekresikan ke lingkungan ekstraseluler yang dapat mengikat komponen permukaan endotel. Aktivasinya tetap mengendalikan tingkat superoksida untuk mencegah inaktivasi nitrat oksida di wilayah pembuluh darah (Cristiana, *et al*, 2014).

b. Antioksidan Sekunder

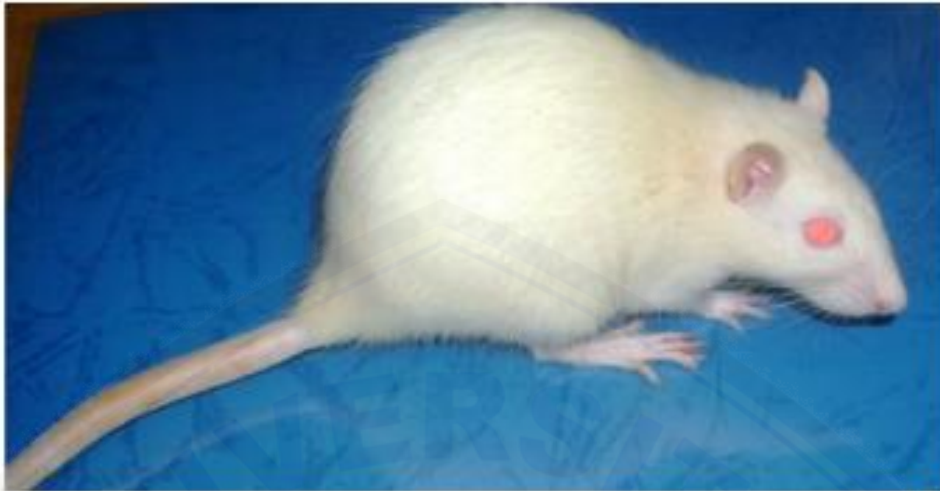
Antioksidan sekunder merupakan antioksidan non enzimatis atau antioksidan eksogen. Antioksidan dalam kelompok ini disebut sebagai sistem pertahanan preventif. Antioksidan non enzimatis dapat berupa 24 komponen non nutrisi dan komponen nutrisi dari sayuran dan buah-buahan meliputi vitamin E, vitamin C, β -karoten, flavonoid, asam urat, bilirubin dan albumin. Kerja antioksidan non enzimatis dengan cara memotong reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas atau dengan cara menangkap radikal bebas (*scavenger free radical*). Akibatnya, radikal bebas tidak akan bereaksi dengan komponen seluler (Wulandari, 2016).

2.4 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur Sprague Dawley

Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) merupakan salah satu hewan coba yang sering digunakan dalam penelitian karena tikus putih memiliki fungsi sistem tubuh yang mirip dengan manusia dan tikus putih juga merupakan hewan eksperimental yang sering digunakan dalam studi fungsi reproduksi. Tikus putih yang sering digunakan dalam penelitian eksperimen adalah tikus galur Sprague Dawley (Nugroho, *et al*, 2018).

Klasifikasi tikus putih adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Odontoceti
Familia	: Muridae
Genus	: Rattus
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>



Gambar 2.4. Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) galur Sprague Dawley (Akbar, 2010)

Tikus putih sering dijadikan pilihan untuk penelitian karena memiliki beberapa sifat seperti perkembangbiakan yang cepat, memiliki ukuran yang lebih besar dibandingkan mencit, dan mudah dipelihara dalam jumlah yang banyak. Ciri-cirinya yaitu, albino, kepalanya yang kecil, ekornya yang lebih panjang dibandingkan dengan badannya, dan tempramen yang baik (Akbar, 2010).

Tikus putih yang digunakan adalah tikus dengan umur 2-3 bulan, jenis kelaminnya adalah betina dan tikus putih dipastikan sehat. Tikus putih betina yang digunakan adalah tikus putih yang belum kawin. Tikus putih memiliki siklus reproduksi yang singkat, setiap siklus lamanya 4-5 hari, ovulasi 8-11 jam setelah dimulainya tahap estrus (Akbar, 2010). Penentuan umur reproduktif pada tikus ini dapat dipelajari pada fase kehidupan dan perilakunya. Beberapa fasenyanya ialah seperti rentang hidup yang dimiliki tikus adalah 2,0-3,5 tahun, fase kematangan seksual mulai umur 6 minggu, fase pradewasa umur 63-70 hari, dan fase penuaan saat umur 15-24 bulan (Sengupta, 2013).

2.5 Periodontitis

Periodontitis merupakan kondisi peradangan yang mencakup jaringan penyangga gigi, seperti gingiva, sementum, tulang alveolar, dan ligamen

periodontal. Periodontitis diawali dengan adanya bakteri plak yang memicu terjadinya gingivitis, jika tidak segera dilakukan perawatan gingivitis akan berlanjut menjadi periodontitis. Periodontitis ditandai dengan hilangnya perlekatan pada gingiva, destruksi tulang alveolar, dan ligamen periodontal, serta terbentuknya poket periodontal yang merupakan ciri khas dari periodontitis (Kinane, *et al*, 2017).

Periodontitis diawali dengan adanya inflamasi gingiva yang menyebabkan perubahan seluler yang meliputi kemotaksis sel leukosit ke jaringan gingiva sehingga terjadi peningkatan proliferasi leukosit. Periodontitis disebabkan oleh bakteri plak subgingiva seperti *P. gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia* dan *Treponema denticola*. Bakteri tersebut berinvansi melalui junctional epitelium dan epitel sulkus yang merangsang terjadinya peradangan. Pembesaran pada gingiva dapat terjadi apabila adanya stagnasi vaskuler, retensi cairan jaringan dan fibrosis. Selain faktor bakteri patogen, faktor kerentanan host juga sangat berperan dalam terjadinya periodontitis, kerentanan host dapat dipengaruhi oleh genetik, pengaruh lingkungan dan tingkah laku seperti merokok, stres dan diabetes. Respon host yang tidak adekuat menghancurkan bakteri patogen dapat menyebabkan terjadinya destruksi jaringan periodontal (Quamilla, 2016).

Tahap destruksi jaringan merupakan tahap transisi dari gingivitis ke periodontitis. Penyebab utama destruksi jaringan periodontal adalah karena perluasan inflamasi marginal gingiva ke jaringan pendukung dan adanya ketidakseimbangan jumlah bakteri dengan respon pejamu. Pada tahap ini aktifitas osteoklas meningkat, karena adanya produk plak bakteri yang meningkatkan diferensiasi sel progenitor tulang menjadi osteoklas dan merangsang sel gingiva untuk mengeluarkan suatu mediator yang memicu terjadinya hal tersebut. Adanya osteoklas tanpa dibarengi dengan adanya sel pembentuk tulang sehingga dapat memperparah destruksi pada tulang. Sistem imun berusaha menjaga host dari infeksi dengan mengaktifasi sel imun seperti neutrophil, makrofag, dan limfosit. Makrofag distimulasi untuk memproduksi sitokin *matrix metalloproteinases* (MMPs) dan prostaglandin E2 (PGE2). Sitokin MMPs dalam konsentrasi yang

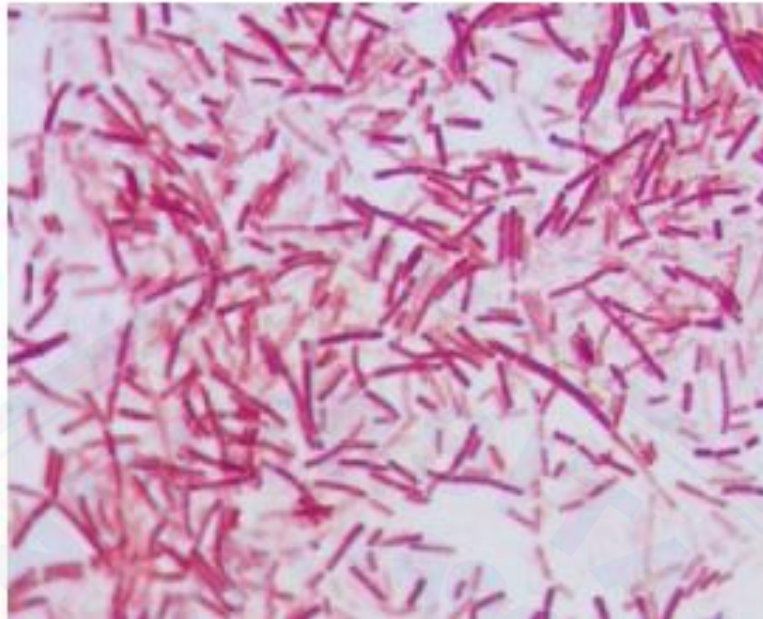
tinggi akan memediasi destruksi matriks seluler gingiva, perlekatan serat kolagen pada apical epitel penyatu dan ligament periodontal. Sitokin PGE2 memediasi destruksi tulang dan menstimulasi osteoklas dalam jumlah besar untuk meresorpsi puncak tulang alveolar. Kehilangan kolagen dapat menyebabkan junctional epitelium bergerak ke apical dan menyebabkan poket (Quamilla, 2016).

2.6 Bakteri *Porphyromonas gingivalis*

Porphyromonas gingivalis (*P. gingivalis*) merupakan etiologi utama pada periodontitis, bakteri ini ditemukan pada sampel plak subgingiva sebanyak 85,75% dari penderita periodontitis. Bakteri gram negatif ini merupakan obligat anaerob yang membentuk koloni berpigmen hitam pada *blood agar plates*. Sulkus gingiva merupakan tempat bakteri *P. gingivalis* dengan bergantung pada fermentasi asam amino untuk produksi energinya (How, *et al*, 2016).

Taksonomi bakteri *P. gingivalis* sebagai berikut :

Kingdom	: Eubacteria
Filum	: Bacterioedetes
Kelas	: Bacterioedes
Ordo	: Bacteriodales
Familia	: <i>Porphyromonadaceae</i>
Genus	: <i>Porphyromonas</i>
Spesies	: <i>Porphyromonas gingivalis</i>



Gambar 2.6 Bakteri *P. gingivalis* perbesaran 1000x (Fitriyana, 2013).

Faktor virulensi merupakan metabolit dari suatu organisme yang penting dalam berbagai tahap siklus hidup dan yang menjadi penyebab kerusakan pada inang. Faktor virulensi akan dikeluarkan oleh bakteri saat penetrasi ke dalam *host*, sehingga bakteri lebih mudah berinvansi dan menimbulkan kerusakan pada jaringan. Kolonisasi pada inang hanya dapat terjadi dengan adanya faktor virulensi seperti fimbriae, kapsul, Lipopolisakarida (LPS), asam lipoteichoic, dan protease. Faktor virulensi dari bakteri patogen dapat menyebabkan destruktif tulang jika mekanisme perlindungan *host* terhambat melalui : (How, *et al*,2016)

a. Fimbriae

Fimbriae sebagai perantara utama dalam perlekatan ke substrat yang tersedia, *P. gingivalis* memiliki fimbriae yang bersifat hidrofob, dapat lebih mudah melekat pada membran sel fagosit yang juga cenderung hidrofob melalui interaksi hidrofobik (Pratiwi L, 2012).

b. Kapsul

Porphyromonas gingivalis ada yang memiliki kapsul dan ada yang tidak memiliki kapsul. *P.gingivalis* yang memiliki kapsul lebih virulen daripada *P.gingivalis* yang tidak memiliki kapsul. *P.gingivalis* yang tidak memiliki kapsul

akan lebih mudah dibunuh oleh makrofag dan sel dendritik. *P.gingivalis* yang memiliki kapsul mampu memodulasi respon *host* dengan menstimulasi sintesis sitokin interleukin 1 (IL-1), IL-6, dan IL-8 dari fibroblast (How, *et al*, 2016).

c. Lipopolisakarida (LPS)

Pada bakteri gram negatif, LPS berperan penting untuk menjaga integritas seluler dan struktural serta mengendalikan masuknya molekul hidrofobik dan bahan kimia beracun. LPS sangat berperan pada pengaktifkan respon inflamasi pada inang dan remodeling tulang. Berdasarkan aktivitas biologisnya, LPS sebagai faktor patogen bakteri periodontopatik (How, *et al*, 2016). LPS dapat merusak jaringan periodontal dengan memediasi dan menginduksi sitokin proinflamasi seperti interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-6 dan IL-8 . Produksi sitokin proinflamasi dapat distimulasi melalui *Toll-like receptor* (TLR) 4 dan factor- κ B (NF- κ B) (Zhang, *et al*, 2017).

LPS *P. gingivalis* juga dapat menghambat diferensiasi dan mineralisasi osteoblastik dalam sel induk ligamen periodontal, sehingga terjadi peningkatan jumlah osteoklas yang berakibat pada destruksi tulang. Tidak adanya pertahanan imun *host*, jumlah bakteri periodontal akan meningkat (How, *et al*, 2016).

d. Asam Lipoteichoic

Asam lipoteichoic memiliki sifat antigenik yang mampu merangsang respon imun spesifik. Bakteri di dalam plak, termasuk LPS dan asam lipoteichoic berinteraksi dengan *toll-like receptor* pada sel epitel, leukosit, dan fibroblas kemudian merangsang produksi sitokin. Untuk memudahkan infiltrasi leukosit, fibroblas yang distimulasi oleh IL-1 beta dan TNF-alfa mensekresi matriks metalloproteinase (MMPs), yang mendegradasi molekul-molekul matriks ekstraseluler termasuk kolagen. Respon inflamasi dari jaringan periodontal dapat menimbulkan kerusakan jaringan dan resorpsi tulang alveolar (Wedarti, *et al*, 2015).

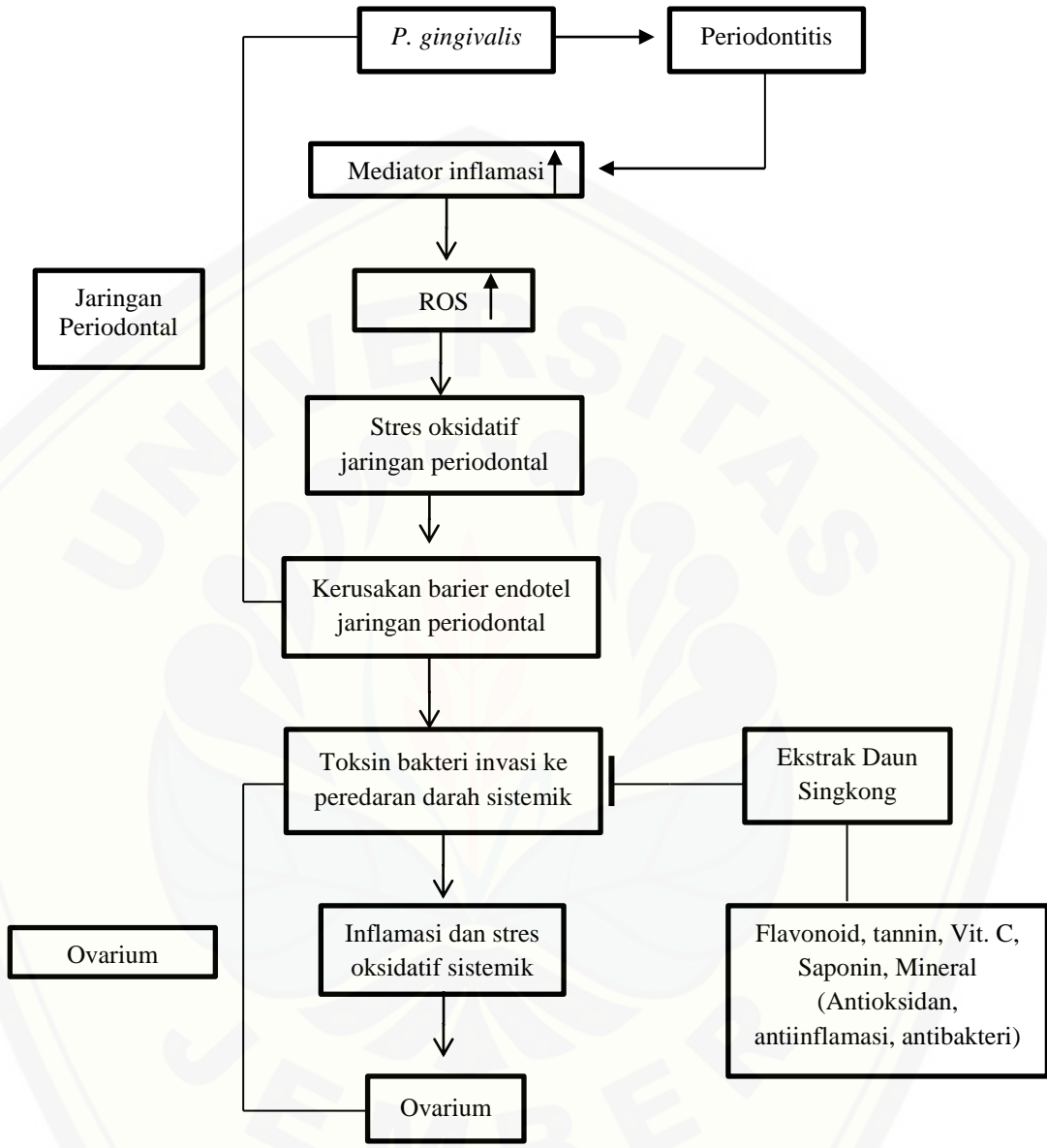
e. Protease

Secara umum, ada dua kelompok protease yang diproduksi oleh *P.ginvalis*, “*trypsin-like*” dan *serine proteinase*. *Trypsin-like* pada umumnya dikenal sebagai gingipain, yaitu gingipain R (Rgp) dan K (Kgp). Ada dua jenis Rgp, yaitu RgpA

dan RgpB. Rgp mampu mendegradasi komponen matriks ekstraseluler, pengikatan integrin-bronektin (*integrinfibronectin-binding*), sitokin, immunoglobulin, dan faktor komplemen (Bostanci & Belibasakis, 2012).

Toksin yang dihasilkan bakteri periodontal ini dapat merusak jaringan pada host dan respon inflamasi pada daerah yang juga menghasilkan bahan-bahan toksik prooksidatif yang dapat merusak jaringan host. Hal ini ditandai dengan respons fagosit terutama netrofil untuk menghancurkan antigen bakterial dengan cara netrofil memproduksi bahan-bahan toksik seperti oksidan/radikal bebas. Bahan-bahan yang bertujuan untuk membunuh bakteri ini juga dapat menyerang molekul-molekul yang ada di sekitar daerah inflamasi. Jika hal ini terus berlanjut, radikal bebas tersebut akan terakumulasi dan menyebabkan stres oksidatif (Susilawati, 2011).

2.7 Kerangka Konsep



Keterangan :

—| : Menghambat

Penjelasan Kerangka Konsep

Bakteri *P. gingivalis* merupakan bakteri anaerob gram negatif yang dapat menyebabkan terjadinya periodontitis. Periodontitis diawali dengan adanya bakteri plak yang memicu terjadinya gingivitis dan dapat berlanjut menjadi periodontitis. Bakteri *P. gingivalis* berinvasi melalui junctional epitelium dan epitel sulkus gingiva yang merangsang terjadinya peradangan. Setelah itu bakteri akan menyebabkan destruksi pada jaringan. Pada tahap transisi dari gingivitis ke periodontitis, osteoklas mengalami peningkatan karena adanya produk plak bakteri yang meningkatkan diferensiasi sel progenitor tulang menjadi osteoklas. Adanya peningkatan pada osteoklas tanpa dibarengi dengan pembentukan tulang dapat memperparah destruksi pada matriks tulang yang menyebabkan terbentuknya poket periodontal yang merupakan ciri khas dari periodontitis.

Selain itu, pada saat bakteri menghasilkan toksinnya akan terjadi peningkatan mediator inflamasi pada jaringan periodontal, yang ditandai dengan respon fagosit terutama netrofil untuk memfagositosis dan menghancurkan antigen bakteri. Mekanisme penghancuran bakteri dengan cara netrofil memproduksi bahan-bahan toksik prooksidatif seperti oksidasi/radikal bebas (ROS). Bahan-bahan yang ditujukan untuk menghancurkan bakteri juga dapat menyerang dan merusak molekul host di sekitar daerah inflamasi. Inflamasi pada jaringan periodontal yang tidak dilakukan perawatan dapat menyebabkan stres oksidatif karena bahan toksik dari mekanisme penghancuran bakteri oleh netrofil yang memproduksi ROS terus meningkat.

Bakteri *P. gingivalis* dan bahan toksinnya berinvasi ke sirkulasi darah karena adanya kerusakan endotel pada jaringan periodontal yang memudahkan invasi bakteri ke sistemik. Inflamasi terus meningkat dan menyebabkan stres oksidatif pada sistemik dan menyebabkan kerusakan barier endotel sistemik dan dapat mempengaruhi ovarium. Keadaan ini dapat dicegah dengan pemberian antioksidan eksogen yang terdapat pada daun singkong yang mengandung flavonoid, tanin, vitamin C, dan saponin yang berfungsi untuk menghambat aktivitas radikal bebas dengan memberikan elektronnya sehingga tidak terjadi stress oksidatif.

2.8 Hipotesis

Secara histopatologis terdapat gambaran ekspresi SOD pada folikel ovarium tikus yang diinduksi bakteri *P. gingivalis* dan diterapi dengan ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta C.*).



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan merupakan eksperimental laboratoris.

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang dilakukan adalah *the post test only control group design* yaitu melakukan pengamatan dan pengukuran pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pada waktu yang telah ditentukan.

3.3 Tempat Penelitian

1. Identifikasi tanaman daun singkong di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) melalui Balai Konservasi Tumbuhan (BKT) Kebun Raya Purwodadi, Pasuruan, Jawa Timur.
2. Pembuatan ekstrak daun singkong di Laboratorium Analisis Terpadu, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember.
3. Perlakuan pada hewan coba di Laboratorium Hewan, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember.
4. Isolasi dan preparasi bakteri *P. gingivalis* di Laboratorium Mikrobiologi, Universitas Jember.
5. Pemrosesan dan pengamatan jaringan secara mikroskopis di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember.

3.4 Waktu Penelitian

Penelitian akan dilakukan pada bulan Januari – September 2020.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak daun singkong, vitamin C, dan metronidazole.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah gambaran histopatologis ekspresi SOD pada folikel ovarium tikus.

3.5.3 Variabel Terkendali

- a. Kriteria sampel meliputi galur tikus, jenis kelamin, berat badan, umur, dan kondisi fisik.
- b. Bakteri *Phorpyromonas gingivalis* 0,05 ml (ATCC 33.277, Medimark, Perancis).
- c. Dosis ekstrak singkong (*Manihot esculenta C.*) yang diberikan secara peroral sebanyak 1ml selama 7 hari.
- d. Ukuran kandang 40 cm x 60 cm x 15 cm dengan ventilasi yang cukup, 1 kandang berisi 3 tikus dan dibersihkan setiap 3 kali sehari
- e. Tindakan atau perlakuan pada hewan coba.

3.6 Definisi Operasional Penelitian

3.6.1 Ekstrak Daun singkong (*Manihot esculenta C.*)

Ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta C.*) merupakan ekstrak dari daun singkong yang berbentuk larutan yang diperoleh dengan menggunakan metode maserasi dan diberikan pada kelompok P2 secara peroral dengan dosis 179,2%/hari atau 1ml/hari, hasil dari pemberian perlakuan ekstrak daun singkong akan tampak adanya perubahan pada folikel ovarium.

3.6.2 Vitamin C

Vitamin C merupakan salah satu senyawa kompleks yang terdapat dalam buah dan sayuran yang diberikan pada kelompok P3 secara peroral dengan dosis 1ml/hari, hasil dari pemberian perlakuan vitamin C akan tampak pada folikel ovarium.

3.6.3 Metronidazole

Metronidazole menunjukkan aktivitas anti bakteri terhadap semua kokus anaerob dan basil gram negatif anaerob, diberikan pada kelompok P4 secara peroral dengan dosis 1ml/hari, hasil dari pemberian perlakuan metronidazole akan tampak pada folikel ovarium.

3.6.4 Antioksidan SOD

SOD merupakan enzim detoksifikasi karena dapat melindungi sel terhadap ROS, stress oksidatif, yang dapat menyebabkan terjadinya penyakit dan proses degenerasi seperti penuaan dan karsinogenik. Antioksidan SOD akan diamati di sekitar folikel ovarium (Ighodaro, 2017).

3.6.5 Periodontitis dengan induksi *P. gingivalis*

Porphyromonas gingivalis merupakan bakteri gram negatif anaerob yang diperoleh dengan pembuatan media cair sebanyak 10 ml, kemudian dilakukan injeksi *P. gingivalis* pada area sulkus gingiva bagian distobukal dan distopalatal molar pertama rahang atas, sebanyak 0,05 ml 3 hari sekali selama 21 hari. Periodontitis pada tikus akan ditandai dengan margin gingiva kemerahan, kontur margin gingiva yang membulat dan adanya resesi gingiva (Prasetya, 2014).

3.7 Populasi dan Sampel

3.7.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian yang digunakan adalah tikus dengan jenis Sprague Dawley betina dan belum pernah digunakan untuk penelitian.

3.7.2 Kriteria Sampel

- a. Tikus Sprague Dawley berjenis kelamin betina.
- b. Umur 2-3 bulan.
- c. Berat badan \pm 200 gram.
- d. Tikus dalam keadaan sehat ditandai dengan gerakan aktif tikus.

3.7.3 Besar Sampel Penelitian

Penentuan besar sampel dengan menggunakan rumus *Resource Equation* (Charan & Kantharia, 2013), sebagai berikut :

$$E = (\text{Jumlah total hewan coba} - \text{Jumlah total kelompok})$$

Keterangan :

E : *Degree of Freedom* (Derajat Kebebasan). Angka E dianggap optimal jika dalam rentang 10-20

n : Jumlah hewan coba tiap kelompok

Dalam penelitian ini terdapat 5 kelompok perlakuan, sehingga :

$$\begin{aligned} E &= (\text{Jumlah total hewan coba} - \text{Jumlah total kelompok}) \\ &= (15-5) \end{aligned}$$

$$E = 10$$

$$\text{Jika } E = 10$$

$$10 = 5n - 5$$

$$5n = 15$$

$$n = 3$$

Berdasarkan rumus di atas, jumlah sampel penelitian adalah 3 ekor tikus perkelompok penelitian, sehingga jumlah sampel keseluruhan adalah 15 ekor tikus.

3.8 Alat dan Bahan

3.8.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan untuk penelitian ini adalah sebagai berikut :

- 5 kandang tikus termasuk tempat makan dan minum,
- Neraca digital (O'haus),
- Masker dan *handscoon*,
- Sonde lambung untuk pemberian aquadest, ekstrak daun singkong, vitamin C, dan metronidazole secara oral,
- *Rat dental chair*
- Kapas dan gunting,

- *Artericlaim* dan pinset,,
- *Rotary evaporator*,
- Alat yang digunakan untuk preparat jaringan antara lain :
- *Scalpel blade* no. 11,
- *Microtom* (Tissue-Tek, Jepang),
- *Object glass* dan *deck glass*,
- *Waterbath*,
- Kuas kecil,
- Mikroskop cahaya (Olympus, Jepang),
- Optilab

3.8.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah :

- Makanan tikus (turbo),
- *Phorpyromonas gingivalis* (ATCC 33.277, Medimark, Perancis),
- *Enthelan*,
- Aquadest steril,
- Media BHI-A, media BHI-B,
- Ketamin/xyzaline (80/10 mg/kgBB),
- Hydrogen peroksida,
- *Povidone iodine* dan *yodium povidone*,
- Ekstrak daun singkong (*Manihot esclenta L.*) 179,2%,
- Buffer formalin dan *chloroform*,
- Asam formic 10 %,
- Paraformaldehid 4%, gliserin.

Untuk melakukan pewarnaan bahannya antara lain :

- Xylol,
- Alkohol 70 %, 80 %, 95 %, 100 %,
- NaCl fisiologis 0,9%,
- *Embedding Paraffin* (Paraplast Plus),
- *Mayer egg albumin*,

- Pewarnaan *Hematoxilin-Eosin* (HE),
- IHC kit,
- Phosphate Buffered (PBS).

3.9 Prosedur Penelitian

3.9.1 *Ethical Clearence*

Penelitian dilakukan setelah pengurusan *ethical clearence* untuk prosedur perlakuan terhadap hewan coba di Unit Etika dan Advokasi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Gadjah Mada.

3.9.2 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang diperoleh dari Universitas Gadjah Mada diaklimatisasi selama satu minggu untuk adaptasi tikus dengan tempat dan makan sebelum dilakukan perlakuan.

3.9.3 Pembagian Kelompok Hewan Perlakuan

Hewan coba dibagi menjadi 5 kelompok, pembagian kelompok sebagai berikut:

- a. Kelompok K adalah kelompok kontrol, kelompok yang diberi makan dan minum standar serta tidak diberi perlakuan.
- b. Kelompok P1 adalah kelompok tikus yang diinduksi bakteri *P. gingivalis* dan diberikan aquades.
- c. Kelompok P2 adalah kelompok tikus yang diinduksi bakteri *P. gingivalis* dan diberikan ekstrak daun singkong 179,2% secara peroral (Miladiyah, *et al*, 2011).
- d. Kelompok P3 adalah kelompok tikus yang diinduksi bakteri *P. gingivalis* dan diberikan vitamin C dengan dosis 1 ml/hari (Hariyatmi, 2004).
- e. Kelompok P4 adalah kelompok tikus yang diinduksi bakteri *P. gingivalis* dan diberikan tablet metronidazole dengan dosis 1 ml peroral (Hariyatmi, 2004).

3.9.4 Pemberian Metronidazole dan Vitamin C

Pemberian tablet metronidazole dan vitamin C pada manusia adalah 500mg/kgB dan jika dikonversi ke tikus dengan berat badan 200gr adalah sebagai berikut (Hariyatmi, 2004) :

Dosis vitamin C dan

metronidazole pada tikus = dosis pada manusia x konstanta konversi (0,018)

$$= 500\text{mg} \times 0,018$$

$$= 9\text{mg}/200\text{grBB}$$

$$= 0,045\text{mg}/\text{grBB}, \text{ sehingga}$$

Volume pemberian maksimal pada lambung tikus = 0,02ml/grBB

Volume pemberian pada tikus = 0,045mg/kgBB = 0,02ml.grBB

$$= 2,25\text{mg}/1\text{ml aquadest}$$

Untuk melarutkannya digunakan CMC 0,5%

CMC 0,05 berarti 0,5gr dalam 100ml air

$$500\text{mg} = 100\text{ml}$$

$$5\text{mg} = 1\text{ml}$$

Sehingga dalam 2,25 mg metronidazole dibutuhkan 1 ml aquadest dan 5 mg CMC 0,5%.

3.9.5 Pembuatan Suspensi *P. gingivalis*

Pertama, dilakukan pembuatan media cair sebanyak 10 ml, yaitu dari 0,37 gram BHI-B, 1 µl vitamin K, 5 µl hemin dan 50 µl ekstrak *yeast*. Selanjutnya dilakukan pembuatan suspensi *P. gingivalis*. Pada media cair diberi satu ose *P. gingivalis* yang berasal dari pembiakan di media agar BHI-A. Suspensi *P. gingivalis* yang didapat lalu dimasukkan *desiccator* dan diinkubasi selama 2x24 jam. Setelah itu, suspensi *P. gingivalis* diukur konsentrasinya hingga didapatkan 12×10^9 CFU/ml (Fitriyana, 2012).

3.9.6 Pembuatan Model Tikus yang diinduksi *P.gingivalis*

Model tikus yang diinduksi *Phorphyromonas gingivalis* adalah model tikus yang diinduksi *P. gingivalis* bagian sulkus gingiva distobukal dan distolingual dari molar kiri pertama rahang bawah (36) dengan dosis 0,05 ml dan diinjeksi menggunakan tuberculine syringe dengan ukuran jarum 30 gauge setiap 3 hari sekali selama 21 hari (Ermawati, 2015).

3.9.7 Pembuatan Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta C.*)

Daun singkong yang digunakan telah dilakukan uji taksonomi terlebih dahulu di LIPI, Malang untuk menentukan jenisnya. Pembuatan ekstrak daun singkong dilakukan dengan mencuci bersih, dipotong kecil-kecil dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan selama 24 jam di dalam ruangan dengan suhu ruang, yang tidak terkena sinar matahari secara langsung, kemudian dioven selama 3 jam dalam suhu 45°C. Setelah itu, daun yang kering tersebut digiling menggunakan blender, diayak dengan ayakan 50 maze sehingga didapatkan serbuk halus sebanyak total 400 gram serbuk daun. Setelah itu, serbuk daun dimaserasi dengan etanol 95% selama 2 hari dan dilakukan pengadukan setiap hari. Selanjutnya, larutan tersebut dipekatkan dengan rotavapor (*rotary evaporator*) dengan suhu 50°C dan putaran 90rpm menjadi ekstrak daun singkong dengan konsentrasi 100%. Penyimpanan ekstrak 100% ini diletakkan dalam kulkas (Meilawaty, 2013). Setelah di maserasi dilakukan pengenceran dengan larutan DMSO.

Pada hasil penelitian Miladiyah *et al*, 2011 menunjukkan daun singkong memiliki efek analgesik pada dosis 25,6mg/KgBB mencit. Dengan demikian jika konversikan pada dosis tikus adalah sebagai berikut :

Dosis ekstrak daun singkong pada mencit = 25,6mg/kgBB

Dosis ekstrak daun singkong pada tikus = 25,6mg/kgBB x konstanta konversi
= 25,6mg/kgBB x 7,0
= 179,2mg/kgBB

Jadi dosis pembuatan ekstrak daun singkong menurut perhitungan sebagai berikut:

Dosis ekstrak daun singkong pada tikus = 179,2mg/kgBB

Volume cairan yang diberikan pada tikus = 0,02ml/grBB

179,2mg/kgBB ~ 0,02ml/grBB

179,2mg/1000grBB ~ 0,02ml/grBB

0,1792mg ~ 0,02ml

17,92mg ~ 2 ml

8,96mg ~ 1 ml

Sediaan dibuat dengan cara melarutkan 8,96mg ekstrak daun singkong 100% ke dalam 1ml propilen.

3.9.8 Euthanasia

Prosedur euthanasia yang dilakukan adalah dengan cara kimia dengan menggunakan eter atau pentobarbital-Na pada dosis yang mematikan (*lethal*).

Tahapan euthanasia meliputi (Siregar, 2017) :

- a) Pengambilan tikus dari kandang dengan sedikit menarik bagian ekornya.
- b) Cubit bagian belakang kepala tikus dan jepit bagian ekornya untuk memindahkan ke dalam toples.
- c) Tikus dimasukkan ke dalam wadah yang tertutup rapat.
- d) Selanjutnya eter sebanyak 10-20 ml dituangkan kedalam kapas.
- e) Kapas dimasukkan ke dalam wadah yang didalamnya telah ada tikus.
- f) Proses euthanasia ditunggu selama 2-5 menit kemudian dilakukan pemeriksaan denyut jantung dan pernapasan. Apabila tikus tidak bernapas, maka wadah bisa dibuka dan pembedahan bisa dilakukan.

3.9.9 Pengambilan Jaringan Ovarium

Pengambilan organ ovarium dilakukan dengan pembedahan di bagian abdomen sisi kiri dan kanan tikus yang berbentuk seperti anggur, sebelumnya tikus telah dianestesi dengan ketamin secara injeksi. Organ ovarium yang telah diperoleh, dicuci dengan larutan NaCl fisiologis 0,9% dan dimasukkan ke dalam larutan fiksasi paraformaldehid 4% selama 24 jam. Kemudian dipindahkan ke larutan alkohol 70% sebagai *stopping point* (Wahyuni, 2019).

3.9.10 Tahap Pembuatan Sediaan Histopatologis

Tahapan ini diawali dengan proses dehidrasi, dehidrasi dilakukan dengan merendam jaringan selama 60 menit dalam alkohol bertingkat dengan konsentrasi 70%, 80%, 90%, Absolut (100%) I, II, III untuk menghilangkan air dalam jaringan. Kemudian dilakukan *clearing* dengan cara merendam dalam larutan *xylol* I, II, dan III selama 60 menit. Setelah itu dilakukan impregnasi dengan proses infiltrasi paraffin dalam oven dengan suhu 60⁰C secara bertahap. Sediaan dimasukkan ke dalam paraffin murni I, II, III, masing-masing selama 60 menit. Tahapan pembuatan sediaan histologi sebagai berikut (Tim Patologi Anatomi FKG Unej, 2007):

a. Pembuatan blok (*embedding*)

Embedding merupakan proses penanaman jaringan ke dalam suatu bahan *embedding* yaitu paraffin. *Moul base* (cetakan) dari bahan stainless steel diolesi dengan gliserin agar blok paraffin yang mengeras mudah dilepas. Cetakan diisi dengan paraffin cair kurang lebih $\frac{1}{4}$ cetakan. Kemudian jaringan *tissue cassette* dimasukkan tanpa merubah letak *cutting surface* dengan sedikit tekanan. Paraffin cair kemudian dituangkan ke dalam cetakan sampai seluruh jaringan terendam paraffin. Paraffin dibiarkan membeku dan selanjutnya blok paraffin dilepas dari cetakan dan disimpan dalam lemari pendingin sebelum dilakukan pematangan.

b. Pematangan jaringan menggunakan mikrotom

- 1) Letakkan blok paraffin pada mikrotom.
- 2) Pisau mikrotom sebelumnya telah dibersihkan dengan kasa yang dibasahi dengan *xylol* dengan arah tegak lurus.
- 3) Ketebalan sayatan diatur yaitu 6 mikrotom.
- 4) Memindahkan hasil potongan menggunakan kuas ke atas permukaan air dalam *waterbath* dengan temperatur tetap 56⁰C-58⁰C agar sayatan jaringan dapat mengembang dengan baik.
- 5) Seleksi hasil sayatan dan dipindahkan ke *object glass* yang telah diolesi *mayer egg albumin* dan diberi label sesuai lebel jaringan yang dipotong.

- 6) Sediaan jaringan dibiarkan kering dengan hotplate suhu 30⁰C-35⁰C minimal selama 12 jam kemudian dilakukan tahapan pengecatan.

3.9.11 Tahap Pewarnaan *Hematoxilin Eosin* (HE)

Proses pewarnaan jaringan dilakukan dengan menggunakan pewarnaan *Hematoxilin Eosin* (HE). Hasil pemotongan jaringan yang akan diwarnai melalui tahapan sebagai berikut :

Tahapannya adalah deparafinisasi, dehidrasi I, pengecatan utama, pengecatan pembeding, dehidrasi II, dan *clearing*.

1. Deparafinisasi

Deparafinisasi dilakukan dengan cara merendam sediaan jaringan dengan larutan xylol I, II, dan III masing-masing selama 23 menit.

2. Dehidrasi I

Dehidrasi I dilakukan dengan merendam sediaan jaringan dalam alkohol dengan konsentrasi absolut (100%) I, absolut (100%) II, alkohol 95% I dan alkohol 95% II, masing-masing direndam secara berurut selama 3 menit. Setelah itu, dilakukan irigasi dengan air mengalir selama 10 menit.

3. Pewarnaan Utama

Pewarnaan utama menggunakan *Moyer's Hematocyclin*, yaitu sediaan jaringan direndam selama 15 menit kemudian diirigasi dengan air mengalir selama 15 menit.

4. Pewarnaan Pembeding

Pewarnaan pembeding menggunakan *Eosin*, yaitu sediaan jaringan direndam selama 2 menit.

5. Dehidrasi II

Sediaan jaringan didehidrasi kembali dengan direndam alkohol dengan konsentrasi absolut (100%) II, alkohol 95% I dan alkohol 95% II, masing-masing direndam selama 2-3 menit.

6. *Clearing*

Tahap pewarnaan sediaan jaringan diakhir dengan *clearing* menggunakan xylol I, II, III selama 3 menit.

7. Tahap *Mounting* dengan entelan dan *deck glass*

Sediaan dibiarkan pada suhu ruangan hingga mengering dan ditempatkan pada tempat yang datar, ditetesi bahan mounting, berupa entelan dan ditutup dengan *deck glass* tanpa terbentuk gelembung udara dan dilakukan pemberian label. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya untuk menganalisis bentuk folikel ovarium.

3.9.12 Pewarnaan Imunohistokimia (IHC)

Tahapan pewarnaan imunohistokimia adalah sebagai berikut :

1. Preparat jaringan disimpan di dalam inkubator dengan suhu 37°C minimal 24 jam. Sebelum diwarnai disimpan kembali pada inkubator suhu 65°C selama 3 menit untuk penyempurnaan penempelan organ.
2. Pewarnaan imunohistokimia dimulai dengan deparafinisasi (xylol I, II) dan rehidrasi (alkohol I 100%, alkohol II 100%, alkohol I 95%, alkohol II 95% selama 3 menit.
3. Dimasukkan ke dalam aquadest selama 10 menit
4. Membuat pengenceran antibodi primer dengan perbandingan SOD = 1 : 250
5. Memberikan larutan PBS ke preparat selama 5 menit lalu dilap pelan-pelan
6. Tahapan berikutnya inaktivasi peroksidase endogen dengan memasukkan preparat jaringan ke dalam H₂O₂ 3% selama 10 menit. Inaktivasi peroksidase dilakukan pada keadaan gelap.
7. Preparat jaringan dibilas dengan PBS sebanyak 3x selama 5 menit kemudian di lap
8. Preparat jaringan diinkubasi untuk memblok protein non spesifik (selama kurang dari 10 menit) dan dibilas dengan PBS (selama 5 menit). Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C.
9. Preparat jaringan diinkubasi dan diberi antibodi primer-SOD (24 jam) pada suhu 4°C. Setelah diinkubasi semalaman, didiamkan selama kurang lebih 15-30 menit.
10. Pembilasan dengan PBS sebanyak 4 kali selama 5 menit dan dilap.

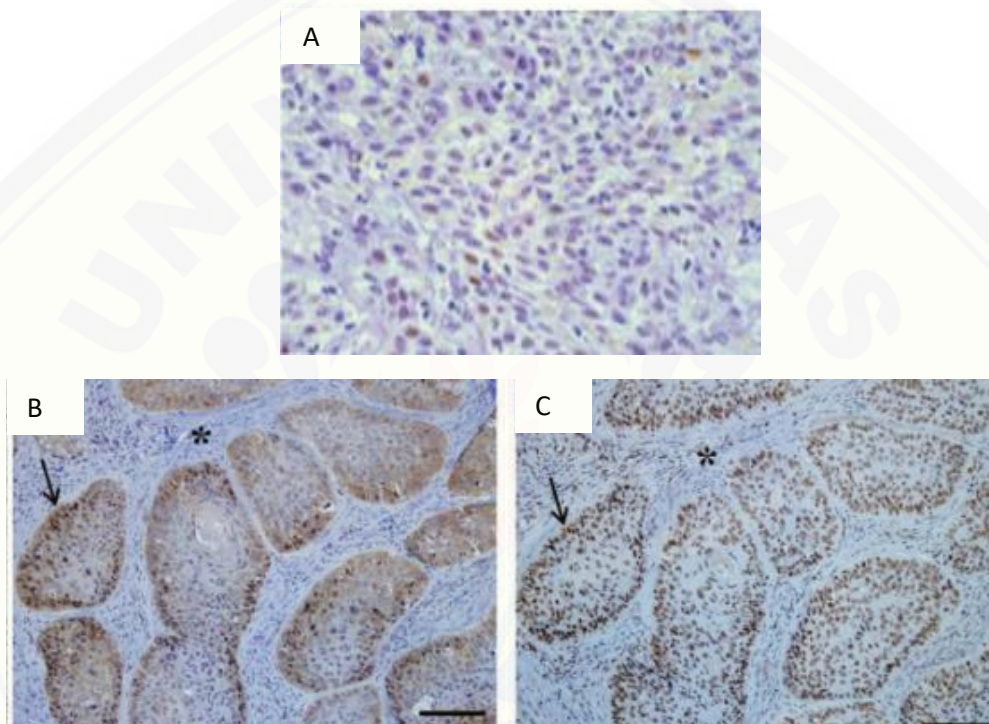
11. Tetesi antibodi biotinilated (*yellow cap*) selama 15-30 menit dengan temperature ruang
12. Pembilasan dengan PBS sebanyak 4 kali selama 5 menit dan dilap.
13. Tetesi antibodi ultra HRP (*red cap*) 20 menit dengan temperature ruang.
14. Pembilasan dengan PBS sebanyak 4 kali selama 5 menit dan dilap.
15. DAB cromogen di tetesi ke preparat selama 20 menit.
16. Pembilasan dengan PBS sebanyak 4 kali selama 5 menit dan dilap.
17. Kemudian di lanjutkan dengan aquadest selama 5 menit.
18. Selanjutnya dilakukan *counterstain* hematoksin selama 2 menit.
19. Preparat jaringan direndam dalam aquadest selama 10 menit.
20. Preparat jaringan didehidrasi dengan alkohol I 95%, alkohol II 95%, alkohol I 100%, alkohol II 100% (masing-masing 3 menit)
21. Tahapan selanjutnya yaitu clearing dengan xylol I dan xylol II masing-masing 3 menit.
22. Tahap terakhir dilakukan mounting menggunakan entelan. Hasil pewarnaan IHC terhadap SOD diamati dan didokumentasikan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x dan optilab yang dihubungkan ke laptop untuk menganalisis ekspresi SOD menggunakan *software Image J*.

Cara menggunakan *software Image J* adalah sebagai berikut :

Metode atau cara yang digunakan peneliti untuk mendapatkan hasil data berdasarkan perlakuan yang diberikan terhadap tiap kelompok ialah menggunakan perangkat lunak *Image J*, yang diamati adalah SOD yang diekspresikan di sekitar folikel. *Image J* merupakan perangkat lunak untuk pengolahan gambar digital berbasis Java. Perangkat lunak yang telah diunduh dapat dipasangkan ke komputer dengan menjalankan paket program tersebut (Kurniawan, 2011). Pengolahan gambar dengan *Image J* dimulai dengan membuka gambar yang telah disiapkan dari hasil pengambilan gambar mikroskop dengan perbesaran 400x, gambar dibuka menggunakan “*Open*” pada *software Image J*. Setelah gambar tampil, dilakukan analisis dengan menggunakan “*Plugins*” pada *software Image J*, setelah itu “*Immunoratio*” dan hasilnya ditampilkan dalam bentuk gambaran dengan hasil persentase SOD (Rifano, 2014).

3.10 Penghitungan Data

Penghitungan banyaknya yang mengekspresikan SOD disekitar folikel pada ovarium tikus diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x. Pengamatan intensitas warna coklat yang menandakan adanya ekspresi SOD dilakukan dengan metode kualitatif yaitu lemah (-), sedang (+), kuat (++) melalui aplikasi *Image J* (Prasetya, *et al* 2014).

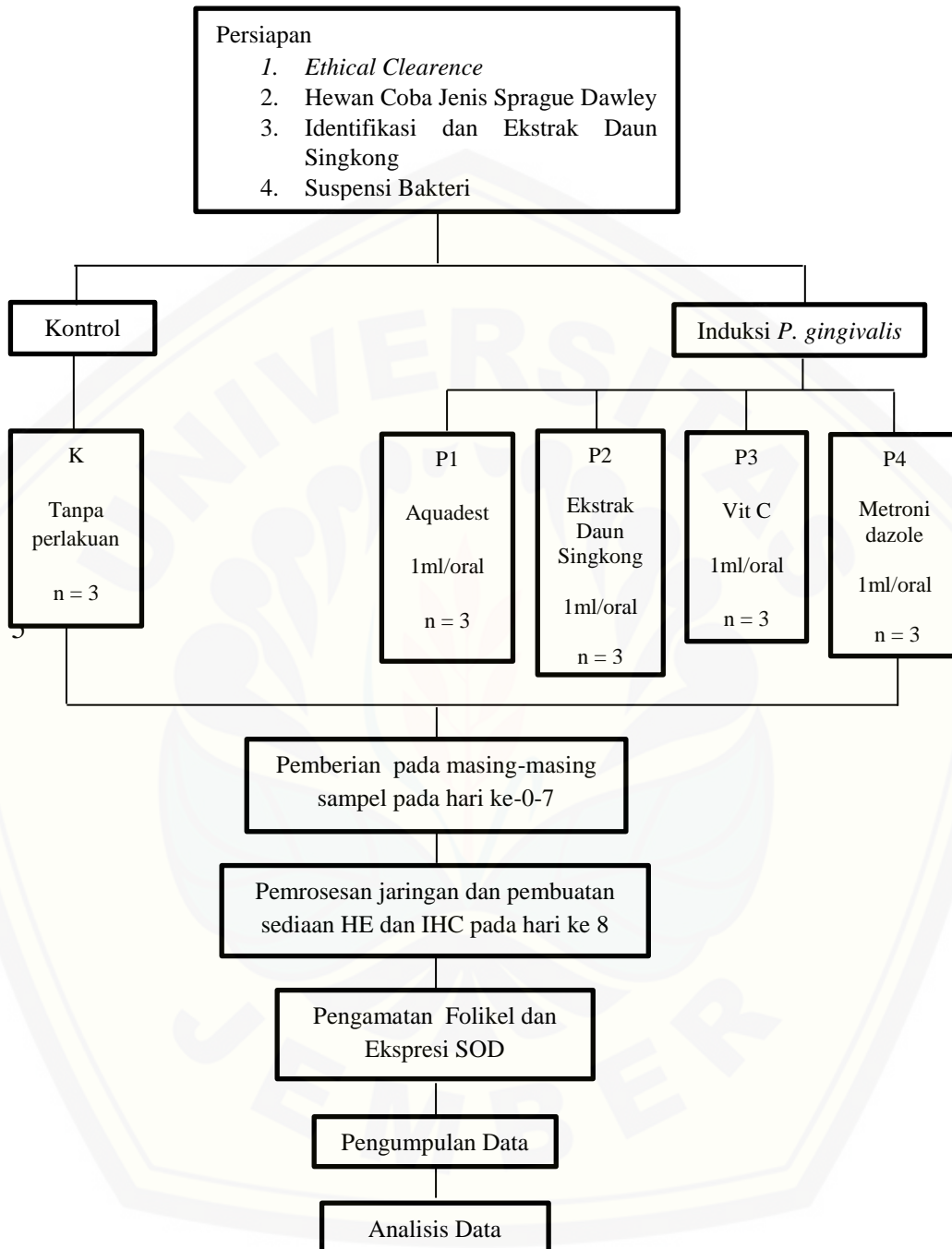


Gambar 3.10 Gambaran intensitas pewarnaan IHC; A. Gambaran pewarnaan IHC yang menunjukkan ekspresi yang lemah; B. Gambaran pewarnaan IHC yang menunjukkan ekspresi yang sedang (anak panah); C. Gambaran pewarnaan IHC yang menunjukkan ekspresi yang kuat (anak panah) (Kim, *et al*, 2017).

3.11 Analisis Data

Data yang diperoleh dari pewarnaan HE diamati dan dideskripsikan dari hasil gambaran preparat pewarnaan HE. Data yang diperoleh dari pewarnaan IHC akan diolah dengan menggunakan *Image J* dan dilakukan analisis deskriptif kualitatif persentase.

3.12 Alur Penelitian



BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Terdapat gambaran histopatologis ekspresi SOD yang sedang pada sel granulosa kuboid folikel primer ovarium tikus yang diinduksi bakteri *P. gingivalis* dan diterapi dengan ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta C.*), hal ini dapat terjadi karena antioksidan pada ekstrak daun singkong dapat menurunkan stres oksidatif yang disebabkan oleh bakteri *P. gingivalis* dan aktivitas enzim SOD berkurang dalam folikulogenesis sehingga mengekspresikan SOD sedang.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai ekspresi SOD yang dapat dihasilkan di sekitar folikel ovarium dan hubungan bakteri *P. gingivalis* terhadap perubahan ovarium, agar diperoleh data yang lebih banyak terkait kandungan ekstrak daun singkong.

DAFTAR PUSTAKA

- Akbar, B. 2010. *Tumbuhan dengan Kandungan Senyawa Aktif yang Berpotensi Sebagai Bahan Antifertilitas*. Jakarta : Adabia Press.
- Atta, E.M., N.H. Mohamed., dan A.A.M. Abdelgawad. 2017. Antioxidants : An Overview On The Natural And Synthetic Types. *Eur. Chem. Bull.* 6(8), 365-375.
- Bostanci, N., G.N Belibasakis. 2012. *Porphyromonas gingivalis* : An Invasive and Evasive Opportunistic Oral Pathogen. *FEMS Microbiol.Lett.* hh 1-9.
- Chang Li, Hai-Meng Zhou. 2011. The Role of Manganase Superoxide Dismutase in Inflammation Defense. *Enzyme Research.*
- Cristiana, F., A. Elena, Z. Nina, 2014. Superoxide Dismutase : Therapeutic Targets in SOD Related Pathology. *Health Sciences Research.* Vol. 6. 975-988.
- Erawati, J., I. Sukardi, dan N.M. Dewi. 2006. Pertimbangan Periodontal pada Wanita Usia Menopause. *Maj. Ked. Gi.* 13(2):222-225.
- Ermawati, Tantin. 2015. *Potensi Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta (C. robusta) Terhadap Ekspresi TNF- α pada Tikus Periodontitis yang diinduksi Porphyromonas gingivalis*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Figueiredo, J.R., L.F de Lima., J.R.V Silva., R.R. Santos. 2018. Control of growth and development of preantral follicle: insights from in vitro culture. *Anim. Reprod.* Vol. 15. 648-659.
- Fitriyana, N. 2012. Pengaruh Pemaparan Bakteri *Porphyromas gingivalis* Terhadap Produksi Superoksid Netrofil. *Skripsi*. Jember : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

- Fitriyana, N., YMD Arina., H. Harmono., IDA Susilawati. 2013. Pemaparan Bakteri *Porphyromas gingivalis* Mempengaruhi Produksi Superoksid Nitrofil. *Dentofasial*. Vol.12, No.3 : 152-158.
- Gershon, E., N. Dekel. 2020. Newly Identified Regulators of Ovarian Folliculogenesis and Ovulation. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 4565.
- Hariyatmi, 2004. Kemampuan Vitamin E Sebagai Antioksidan Terhadap Radikal Bebas Pada Lanjut Usia. *Journal MIPA*, Vol. 14, No. 1, 52 - 60.
- Hasim, S. Falah. dan L.K. Dewi. 2016. Effect of Boiled Cassava Leaves (*Manihot esculenta* Crantz) on Total Phenolic, Flavonoid and its Antioxidant Activity. *Curr. Biochem.* 3(3): 116-127.
- How, K.Y., K.P. Song, K.G. Chan. 2016. Porphyromonas gingivalis : An Overview Periodontopathic Pathogen Below the Gum Line. *Journal Frontiers in Microbiology*. Vol. 7(53):1-14.
- Ighodaro, O.M., O.A. Akinloye. 2017. First Line Defence Antioxidants-superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathione Peroxide (GPX) : Their Fundamental Role In The Entire Antioxidant Defence Grid. *Alexandria Journal of Medicine*.
- Kim, HM., YH Kang., JH Byun., SJ Jang., GJ Rho., JS Lee., BW Park. 2017. Midkine and Nanog Have Similar Immunohistochemical Expression Patterns and Contribute Equally to an Adverse Prognosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Int. J. Med.*
- Kinane, D.F., P.G. Stathopoulou., P.N. Papapanou. 2017. Periodontal Diseases. *Nature Reviews*. Vol. 3.
- Khaira, K. 2010. Menangkal Radikal Bebas Dengan Antioksidan. *Jurnal Sainstek*. Vol. 11. No. 2: 183-187.
- Knight, P.G., L. Satchell., C. Glister. 2012. Intra-ovarian roles of activins and inhibins. *Mol. Cell Endocrinol.* 359, 53-65.

- Lubis, I. 2016. Tingkat Keparahan Penyakit Periodontal Pada Perempuan Menopause Di PNP Kota Palopo. *Skripsi*. Makassar : Universitas Hasanuddin.
- Marikovsky, M., V. Ziv. N. Nevo, C.H. Cerruti, dan O. Mahler. 2003. Cu/Zn Superoxide Dismutase Plays Important Role in Immune Response. *J Immunol*. 170:2993-3001.
- Meilawaty, Z. 2013. Efek ekstrak daun singkong (*Manihot utilissima*) terhadap ekspresi COX-2 pada monosit yang dipapar LPS *E.coli*. *Dental Journal*. Vol. 46. No. 4. Hh. 196-201.
- Ming Lu, J., P.H. Lin, Y. Qizhi, C. Changyi., 2010. Chemical and Molecular Mechanisms of Antioxidants : Experimental Approaches and Model Systems. *J. Cell. Mod*. Vol. 14, No. 4. 840-860.
- Miladiyah, I., D. Ferdianto dan Desrini, Sufi. 2011. Analgesic Activity of Ethanolic Extract of *Manihot esculenta C*. Leaves in Mice. *Universa Medicina*. 30(1):3-10.
- Muhammad I. 2009. Efek antioksidan vitamin C terhadap tikus (*Rattus norvegicus*) jantan akibat pemaparan asap rokok. *Tesis*. Bogor: Sekolah Pascasarjana IPB.
- Muntha, M. 2001. Teknik Pembuatan Preparat Histopatologi Dari Jaringan Hewan Dengan Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin (H&E). *Skripsi* : Bogor : Balai Penelitian Veteriner, Bogor.
- Narulita, E. J. Prihatin. 2017. Kontrasepsi Hormonal. UPT Penerbitan Universitas Jember.
- Nugroho, S.W., K.R. Fauziyah., D. Sajuthi., H.S. Darusman. 2018. Profil Tekanan Darah Normal Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur Wistar dan Sprague-Dawley. *Acta Veterinaria Indonesiana*. Vol. 6. No. 2 : 32-37.

Nurjanah, P. Widiyaningrum. 2016. Perkembangan Ovarium Tikus Yang dipapar Radiasi Sinar X. *Jurnal MIPA*. 39(2) : 85-91.

Okeke, T.C., U.B. Anyaehie, dan C.C., Ezenyeaku, 2013. Premature Menopause. *Annals of Medical and Health Sciences Research*. Vol. 3.

Pakaya, D. 2014. Peranan Vitamin C pada Kulit. *Medika Tadulako, Jurnal Ilmiah Kedokteran*. Vol. 1. No. 2

Panche, A.N., A.D. Diwan., S.R. Chandra. 2016. Flavonoids. *Journal of Nutritional*.

Parwata, I.M.O.A. 2016. Flavonoid. *Skripsi* : Denpasar : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Jurusan Kimia Universitas Udayana.

Pratiwi, A.P.2016. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta C.*) Terhadap *Shigella sp.* *Jurnal Kesehatan*. Vol. 7. No. 1. Hh 161-164.

Pratiwi, L.C. 2012. Adhesi *Porphyromonas gingivalis* Pada Netrofil Yang Diinkubasi Ekstrak Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*). *Skripsi*. Jember : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Prasetya, C.R., N. Purwanti., T. Haniastuti. 2014. Infiltrasi Neutrophil Pada Tikus Dengan Periodontitis Setelah Pemberian Ekstrak Etanolik Kulit Manggis. *Maj. Ked. Gi*. 21(1) : 33-38.

Puspitarini, B.A. 2010. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Singkong (*Manihot Folium*) Menggunakan Metode Diphenylpicryl Hydrazyl (DPPH). *Skripsi* : Yogyakarta Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma.

- Quamillah, N. 2016. Stres Dan Kejadian Periodontitis (Kajian Literatur). *Dent Soc*, 1 (2): 161 – 168.
- Ramadhani, D., I. Kurnia., S. Soetopo., D. Tetriana., I. Ramli., Budiningsih., Andrijono., T. Kurjana., M.D.L Tobing. 2012. Analisis Serta *Stitching* Citra Imunohistokimia MIB-1 dengan *Immunoratio* dan Perangkat Lunak *Nish Element D 2.30*. *Lokakarya Komputasi dalam Sains dan Teknologi Nuklir*. (187-196).
- Rosahdi, T.D., M. Kusmiyati, dan F.R. Wijayanti, 2013. Uji Aktivitas Daya Antioksidan Buah Rambutan Rapih Dengan Metode DPPH. *Skripsi*. Bandung : Jurusan Farmasi Politeknik Kesehatan Bandung.
- Sanjay, M.K., S.M. Srideshikan., V.L. Vanishree., M.S. Usha., A. Philip Raj., S.M. Gaddad., C.T. Shivannavar. 2011. Copper, Zinc-Superoxide Dismutase from Clinically Isolated Escherichia coli: Cloning, Analysis of sodC and Its Possible Role in Pathogenicity. *Indian J Microbiol*. 51(3):326-331.
- Sengupta, P. 2013. The laboratory rat : Relating its age with human's. *International Journal of Preventive Medicine*. 4(6) : 624-630.
- Septiriyani, V.N. 2017. Potensi Pemanfaatan Singkong (*Manihot utilissima*) Sebagai Bahan Tambahan Dalam Pembuatan Es Puter Secara Tradisional. *Skripsi*. Yogyakarta : Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Sanata Dharma.
- Sugino, N. 2005. Reactive Oxygen Species in Ovarian Physiology. *Reproductive Medicine and Biology*. 4 : 31-44.
- Sugiritama, W., N. Adiputra. 2019. Potensi Antosianin Dalam Manajemen Menopause. *Jurnal Kesehatan Andalas*. 8(1).
- Surasandi, D., A.A.N Anantasika. 2017. The Role Of Superoxide Dismutase On Pregnancy Rates Of Women Undergoing

Intrauterine Insemination. *Bali Medical Journal (Bali Med J)*. Volume 6, Number 1: 114-120.

Susilawati, I.D.A. 2011. Periodontal Infection is a Silent Killer. *Stomatognatic (J.K.G. Unej)*. Vol. 8 No. 1.

Takagi, K., T. Yamada., Y. Miki., T. Umegaki., M. Nishimura., J. Sasaki. 2007. Histological Observation of the Development of Follicles and Follicular Atresia in Immature Rat Ovaries. *Acta Med. Okayama*. Vol. 61. No. 5. hh 283-298.

Tim Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. 2007. *Petunjuk Praktikum Patologi Anatomi Degenerasi dan Inflamasi*. Jember : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Tjitrosoepomo, G. 2005. Morfologi Tumbuhan. Yogyakarta : Universitas Gajah Mada Press.

Wachidah, R.N., 2016. Pengaruh Konsentrasi Larutan Madu Lebah Hutan (Apis Dorsata) Terhadap Hambatan Pertumbuhan Bakteri Porphyromonas Gingivalis Dominan Gingivitis (Kajian In Vitro) . *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Muhammadiyah Surakarta.


Wahyuni, S., C. Desfariaza, Hammy, M. Akmal, Gholib, T. Armansyah. 2019. An Immunohistochemical Study of Alpha Estrogen Receptor (Era) Development In Ovary and Uterus of Rat (*Rattus norvegicus*). *Jurnal Medika Veterinaria*. 13(1) : 15-21.

Wang, S., G. He., M. Chen., T. Zuo., W. Xu., X. Liu. 2017. The Role of Antioxidant Enzyme in the Ovaries. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.

Wang, W. H. Liu., W. Tian., F. Zhang., Y. Gong., J. Chen., D. Mao., F. Shi. 2010. Morphologic observation and classification criteria of atretic follicles in guinea pigs. *Zhejiang Univ-Sci B*. 11(5) : 307-314.

- Wang, X., C. Li., Y. Wang., L. Li., Z. Han., G. Wang. 2020. UFL1 Alleviates LPS-Induced Apoptosis by Regulating the NF- κ B Signaling Pathway in Bovine Ovarian Granulosa Cells. *Biomolecules*.
- Wedarti, YF., P.O. Halim., S. Revianti. 2015. Pengaruh Pemberian Ekstrak *Nannochloropsis oculata* Terhadap Penurunan Kadar TNF- α pada Tikus yang Diinduksi Bakteri *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Jurnal Kedokteran Gigi*. Vol. 9. No. 1.
- Winarsi HMS. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas: Potensi dan Aplikasinya dalam Kesehatan*. Cetakan 5. Yogyakarta: Penerbit Kanisius
- Winarto, A., S.A Ramadhani., I. Supriatna., N.W.K. Karja., 2017. Pengendalian Folikulogenesis Ovarium dengan Pemberian Ekstrak Biji Kapas. *Jurnal Sain Veteriner*. 35 (1).
- Wulan, ADS., T. Ermawati., B. Febrianto. 2017. Ovarian Failure Affected Leukocyte Profile in Peripheral Blood and Gingival Fluid (In Vivo Study). *International Conference in Health Sciences (ICHS)*.
- Wulandari, E. 2016. Efek Ekstrak Kulit Buah Rambutan Terhadap Kadar MDA dan SOD Tikus Yang Dipapar Asap Rokok. *Skripsi*. Semarang : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang.
- Zahreni, H., Z. Meilawaty., A.D.P Shita., P.L. Kuncaraningtyas., A.W.S. Dharmayanti. 2020. Potensi Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta Crantz*) terhadap Ekspresi MMP-8 Fibroblas Gingiva pada Model Tikus dengan Disfungsi Ovarium dan Periodontitis. *Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Padjajaran*. 32(2):105-112.
- Zhang, D., L. Chen., S. Li., Z. Gu., J. Yan. 2017. Lipopolysaccharide (LPS) of *Porphyromonas gingivalis* induces IL-1 β , TNF- α and IL-6 production by THP-1 cells in a way different from that of *Escherichia coli* LPS. *Innate Immunity*. Vol. 14; 25–37.

Lampiran 3.1 Surat Ijin Penelitian

	<p>KOMISI ETIK PENELITIAN FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS GADJAH MADA Sekretariat: Fakultas Kedokteran Gigi UGM Jl. Denta Sekip Utara Yogyakarta Telp. 081239447900</p>
-----------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

KETERANGAN KELAIKAN ETIK PENELITIAN
("ETHICAL CLEARANCE")
 No.00354/KKEP/FGK-UGM/EC/2020

Setelah Tim Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada mempelajari dengan seksama rancangan penelitian yang diusulkan:

Judul : **AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAUN SINGKONG (*Manihotis esculenta L.*) TERHADAP EKSPRESI SOD PADA OVARIUM MODEL TIKUS PERIODONTITIS YANG DIINDUKSI BAKTERI *Porphyromonas gingivalis***

Peneliti Utama : Ajeng Nurwahyuningtyas Anjani

Penanggung Jawab Medis : drg. Agustin Wulan Suci D., MDSc


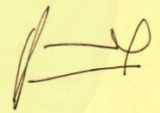
Unit/Lembaga : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Lokasi Penelitian : 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)
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------



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

Nomor : 6349/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 : Ajeng Nurwahyuningtyas Anjani
2. NIM : 161610101105
3. Semester/Tahun : 2019/2020
4. Fakultas : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
5. Alamat : Jln. Baturaden VII No. 4, Jember
6. Judul Penelitian : Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta L.*) Terhadap Ekspresi SOD pada Ovarium Model Tikus Periodontitis yang diinduksi Bakteri *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 Aktivitas Ekstrak Daun Singkong Pada Ekspresi SOD pada Ovarium Tikus Yang diinduksi Bakteri *Porphyromonas gingivalis*
11. Dosen Pembimbing : 1. drg. Agustin Wulan Suci D., MDSc.
2. drg. Ari Triwanodyo Handayani., M. Kes.

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih



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



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

Nomor : 6349/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 : Ajeng Nurwahyuningtyas Anjani
2. NIM : 161610101105
3. Semester/Tahun : 2019/2020
4. Fakultas : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
5. Alamat : Jln. Baturaden VII No. 4, Jember
6. Judul Penelitian : Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta L.*) Terhadap Ekspresi SOD pada Ovarium Model Tikus Periodontitis yang diinduksi Bakteri *Porphyromonas gingivalis*.
7. Lokasi Penelitian : Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
8. Data/alat yang dipinjam : Mikrotom, mikroskop, dll.
9. Waktu : Oktober 2019 s/d Januari 2020
10. Tujuan Penelitian : Untuk Mengetahui Aktivitas Ekstrak Daun Singkong Pada Ekspresi SOD pada Ovarium Tikus Yang diinduksi Bakteri *Porphyromonas gingivalis*
11. Dosen Pembimbing : 1. drg. Agustin Wulan Suci D., MDSc.
 2. drg. Ari Triwanodyo Handayani., 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



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

Nomor : 6349/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 : Ajeng Nurwahyuningtyas Anjani
2. NIM : 161610101105
3. Semester/Tahun : 2019/2020
4. Fakultas : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
5. Alamat : Jln. Baturaden VII No. 4, Jember
6. Judul Penelitian : Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta L.*) Terhadap Ekspresi SOD pada Ovarium Model Tikus Periodontitis yang diinduksi Bakteri *Porphyromonas gingivalis*.
7. Lokasi Penelitian : Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
8. Data/alat yang dipinjam : -
9. Waktu : Oktober 2019 s/d Januari 2020
10. Tujuan Penelitian : Untuk Mengetahui Aktivitas Ekstrak Daun Singkong Pada Ekspresi SOD pada Ovarium Tikus Yang diinduksi Bakteri *Porphyromonas gingivalis*
11. Dosen Pembimbing : 1. drg. Agustin Wulan Suci D., MDSc.
2. drg. Ari Triwanodyo Handayani., 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 3.2 Alat dan Bahan Penelitian



Tikus *Sprague Dawley* betina



Ekstrak daun singkong



Antibiotik



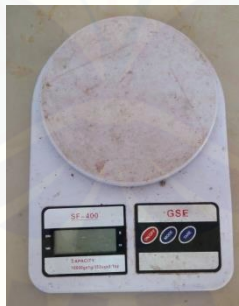
Alkohol



Povidone Iodine



Benang dan jarum jahit



Neraca Ohaus



Waterbath



Mikroskop dan Optilab



Microtom



Automatic Processing Tissue



Keterangan gambar:

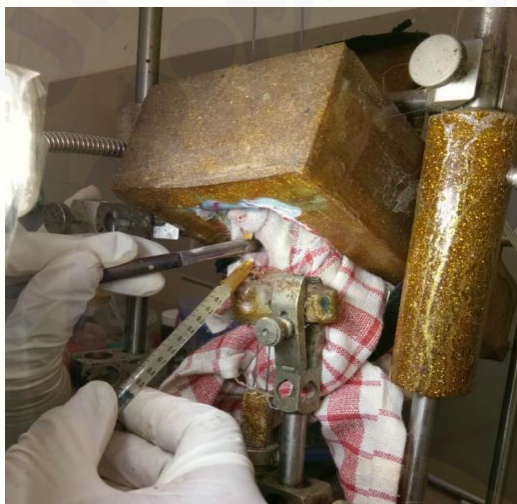
1. *Immunohistochemistry (IHC) Kit*
2. *Poly-L-Lysine Coated Slide*
3. *Deck glass*
4. *Formid Acid 10%*
5. PBS
6. Pewarna *Hematoxylin*
7. Entelan
8. Etanol
9. *Paraffin wax*
10. Xylol

Lampiran 3.3 Prosedur Penelitian

3.9.2 Persiapan Hewan Coba



3.9.5 Pembuatan Model Tikus Periodontitis Induksi *P.gingivalis*



3.9.7 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

Aplikasi Ekstrak Daun Singkong



3.9.10 Pembuatan Sediaan Histologi dan Pewarnaan HE



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



Pewarnaan HE dengan menggunakan *Automatic slide stainer*

3.9.12 Tahap *Staining* (pewarnaan) IHC



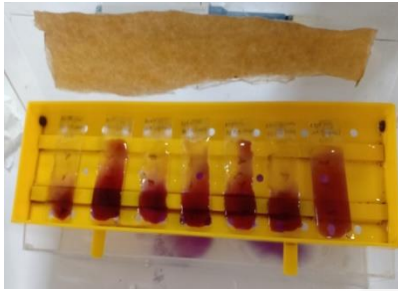
Deparafinisasi dengan xylol dan rehidrasi dengan alkohol 90% dan 100%



Preparat dicuci dengan aquades, PBS, superbloc, antibody primer



Preparat ditetesi *DAB Plus Chromogen*



Preparat ditetesi
Hematoxylin



Dehidrasi preparat
dengan alkohol
bertingkat



Clearing dengan
xylol

Pengamatan Preparat Jaringan Ovarium Tikus



Pengamatan dan pengambilan gambar dengan menggunakan mikroskop Olympus dan Optilab

Lampiran 3.4 Data Hasil Penghitungan Ekspresi SOD

No.	Kelompok	Folikel	Label	SOD	
1.	K	TF		50,30%	
		ATF	367	77,80%	
		ATF	967	70,80%	
	K 2	ATF	927	93,60%	88,65%
			64	83,70%	
	K 3	ATF	986	100,00%	100,00%
743			100,00%		
2.	P1.1	SF		78,30%	57,53%
		ATF	603	67,70%	
		ATF	833	20,90%	
		ATF	497	63,30%	
		ATF	364	54,50%	
		ATF	66	74,50%	
	P1.2	ATF	400.11	100,00%	97,65%
			400.12	91,30%	
			400.13	99,30%	
			400.14	100,00%	
		ATF	400.21	100,00%	98,13%
			400.2	100,00%	
ATF	400.23	93,00%	97,95%		
	400.24	99,50%			
ATF	400.31	95,90%	97,95%		
	400.32	100,00%			
P1.3	ATF	400.1	48,40%	46,00%	
		ATF	400.2		57,70%
	ATF	400.31	52,20%		
		400.32	54,10%		
		400.33	45,60%		
		400.34	40,40%		
ATF	400.35	37,70%	66,35%		
	ATF	400.41		67,20%	
ATF	400.42	65,50%			

3.	P2.1	ATF	574	100,00%	99,57%
			796	100,00%	
			113	98,70%	
		ATF	526	64,50%	87,77%
			392	100,00%	
		468	98,80%		
	ATF	609	90,40%	87,83%	
		24	89,10%		
		230	84,00%		
	ATF	246	100,00%	100,00%	
		734	100,00%		
		465	100,00%		
		606	100,00%		
	ATF	400.3	98,30%		
	P2.2	ATF	289	41,10%	59,55%
		ATF	754	84,00%	
		ATF	409	61,20%	
		ATF	38	52,30%	
			42	66,80%	
ATF		369	53,20%		
ATF		426	61,50%		
ATF		860	56,80%		
ATF		466	46,40%		
ATF		400.2	54,90%		
PF		57,20%			
4.	P2.3	ATF	400.11	74,60%	75,30%
			400.12	77,40%	
			400.13	71,70%	
			400.14	72,20%	
			400.15	81,00%	
			400.16	74,90%	
	ATF	400.21	66,80%	82,23%	
		400.22	89,10%		
		400.23	89,80%		
		400.24	83,20%		
	ATF	400.31	73,90%	65,80%	
		400.33	57,70%		
	ATF	400.41	85,30%		
	400.42	66,80%			

			400.43 400.44	76,30% 76,20%	76,15%
	P3.1	ATF		98,30%	
		ATF		93,40%	
	P3.2	ATF	583	76,70%	
		ATF	184 896	72,70% 75,20%	73,95%
		ATF	141	68,10%	
		ATF	537 658	65,70% 64,80%	65,25%
		ATF	400.11 400.12 400.13	69,50% 83,60% 80,00%	77,70%
		ATF	400.21 400.22 400.23	73,60% 67,20% 83,80%	74,87%
		ATF	929	84,30%	
			107	58,80%	
		ATF	411	85,80%	
	P3.3	ATF	400.3	85,00%	
		ATF	400.4	92,20%	
		ATF	400.5	83,90%	
		ATF	400.7	91,10%	
		ATF	400.11 400.12	78,50% 83,70%	81,10%
5.	P4.1	ATF		100,00%	
			400.41 400.42	88,70% 100,00%	
		ATF	400.43	100,00%	96,23%
		ATF	400.51	100,00%	
			400.61 400.62 400.63	100,00% 100,00% 100,00%	
		ATF	400.64	100,00%	100,00%
			400.71 400.72	100,00% 100,00%	
		ATF	400.73	100,00%	100,00%
		ATF	400.81 400.82 400.83	91,10% 100,00% 66,00%	

		400.84	98,20%	
		400.85	96,80%	90,42%
P4.2	ATF	400.1	83,00%	34,40%
	ATF	400.2	67,00%	
	ATF	400.4	65,20%	
	ATF	400.5	77,00%	
		400.31	66,20%	
	ATF	400.32	2,60%	
P4.3		400.12	59,50%	60,50%
	ATF	400.13	61,50%	
	ATF	400.31	34,60%	42,95%
		400.32	51,30%	
	ATF	400.41	60,20%	56,60%
	400.42	53,00%		

Keterangan :

K : Kontrol

P1 : Kelompok yang diinduksi *P. gingivalis* dan diberi aquades

P2 : Kelompok yang diinduksi *P. gingivalis* dan diberi ekstrak daun singkong

P3 : Kelompok yang diinduksi *P. gingivalis* dan diberi vitamin C

P4 : Kelompok yang diinduksi *P. gingivalis* dan diberi metronidazole

Label : Label pada penyimpanan hasil pengambilan gambar

SOD : Hasil pengamatan dan penghitungan jumlah eskpresi SOD

PF : Folikel Primer

SF : Folikel Sekunder

TF : Folikel Tertier

ATF : Atretic Folikel

Lampiran 3.5 Intensitas Ekspresi SOD pada Ovarium Hewan Coba

NO.	KELOMPOK	FOLIKEL			
		PF	SF	TF	AF
1.	K1.1	-	-	+	++
	K1.2	-	-	-	++
	K1.3	-	-	-	++
2.	P1.1	-	++	-	++
	P1.2	-	-	-	++
	P1.3	-	-	-	+
3.	P2.1	-	-	-	++
	P2.2	+	-	-	++
	P2.3	-	-	-	++
4.	P3.1	-	-	-	++
	P3.2	-	-	-	++
	P3.3	-	-	-	++
5.	P4.1	-	-	-	++
	P4.2	-	-	-	++
	P4.3	-	-	-	++

Keterangan :

K : Kontrol

P1 : Kelompok yang diinduksi *P. gingivalis* dan diberi aquades

P2 : Kelompok yang diinduksi *P. gingivalis* dan diberi ekstrak daun singkong

P3 : Kelompok yang diinduksi *P. gingivalis* dan diberi vitamin C

P4 : Kelompok yang diinduksi *P. gingivalis* dan diberi metronidazole

PF : Folikel Primer

SF : Folikel Sekunder

TF : Folikel Tertier

AF : Atretic Folikel