



**EFEKTIVITAS EKSTRAK DAUN SINGKONG (*Manihot Esculenta Crantz*)  
TERHADAP JUMLAH OSTEOBLAS PADA TULANG ALVEOLAR TIKUS  
PERIODONTITIS YANG DIINDUKSI *Porphyromonas gingivalis***

**SKRIPSI**

oleh

**Amelia Nur Ilahi**

**NIM 181610101108**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI**

**UNIVERSITAS JEMBER**

**2022**



**EFEKTIVITAS EKSTRAK DAUN SINGKONG (*Manihot Esculenta Crantz*)  
TERHADAP JUMLAH OSTEOLAS PADA TULANG ALVEOLAR  
TIKUS PERIODONTITIS YANG DIINDUKSI *Porphyromonas gingivalis***

**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

**Amelia Nur Ilahi**

**NIM 181610101108**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI**

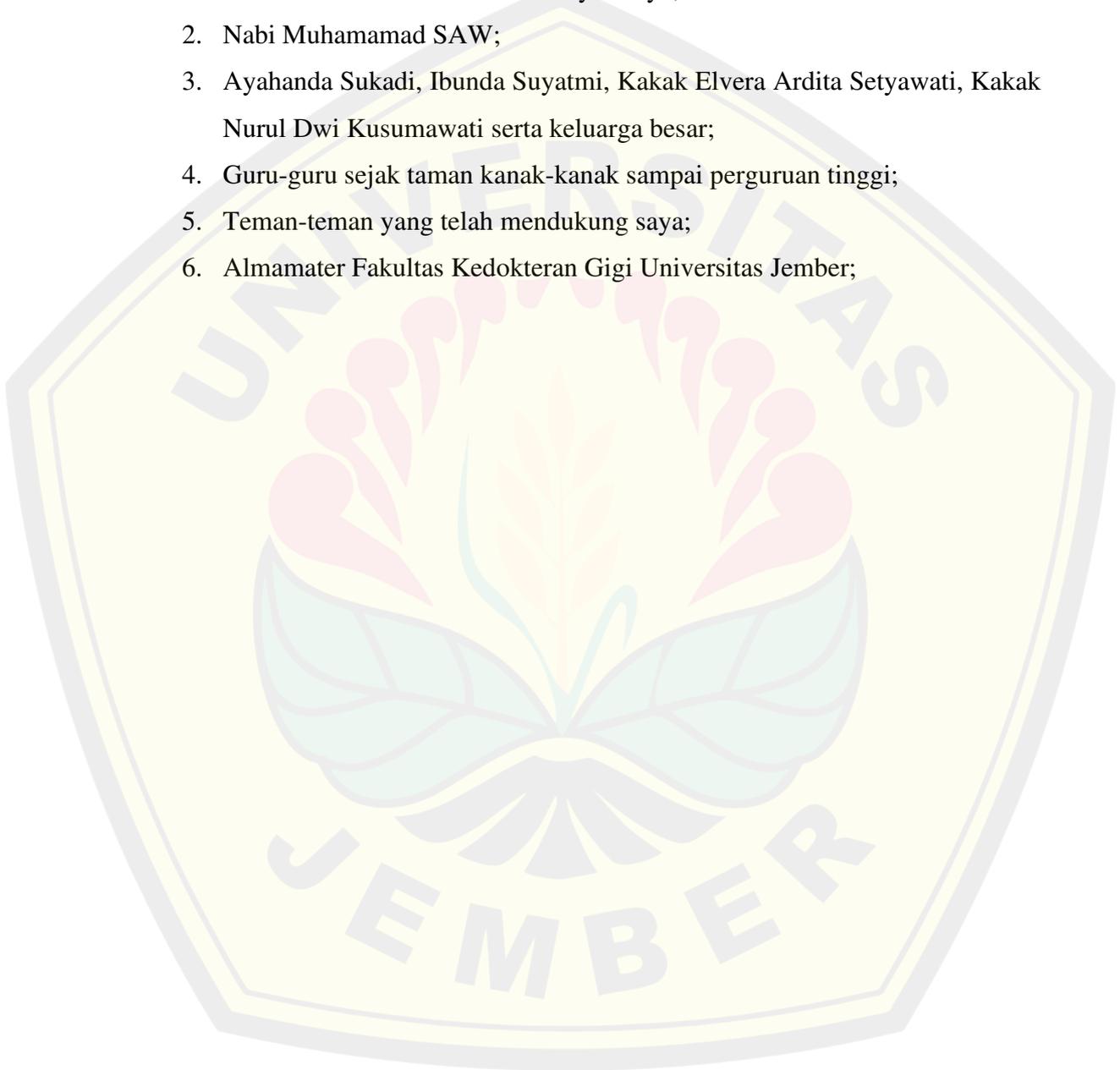
**UNIVERSITAS JEMBER**

**2022**

**PERSEMBAHAN**

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT atas rahmat dan hidayah-Nya;
2. Nabi Muhamamad SAW;
3. Ayahanda Sukadi, Ibunda Suyatmi, Kakak Elvera Ardita Setyawati, Kakak Nurul Dwi Kusumawati 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;



**MOTO**

“Hai orang-orang yang beriman, bersabarlah kamu dan kuatkanlah kesabaranmu dan tetaplah bersiap siaga dan bertakwalah kepada Allah, supaya kamu beruntung.”

(Q.S Ali Imran: 200)\*)

“Hanya kepada Engkau kami menyembah dan hanya kepada Engkaulah kami meminta pertolongan”

(Q.S Al Fatihah: 5)\*)

“Allah menempatkan saya disuatu situasi karena Allah tau bahwa saya mampu melaluinya maka saya harus percaya dengan terus mencoba, berdoa dan tidak menyerah”

(Penulis)

---

\*) Departemen Agama Republik Indonesia. 1998. Al Qur'an dan Terjemahannya. Semarang: PT Kumudasmoro Grafindo

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama: Amelia Nur ilahi

NIM: 181610101108

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Efektivitas Ekstrak Daun Singkong (*Manihot Esculenta Crantz*) Terhadap Jumlah Osteoblas Pada Tulang Alveolar Tikus Periodontitis Yang Diinduksi *Porphyromonas Gingivalis*” 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, 03 Juni 2022

Yang menyatakan,

Amelia Nur ilahi

NIM 181610101108

SKRIPSI

EFEKTIVITAS EKSTRAK DAUN SINGKONG (*Manihot Esculenta Crantz*)  
TERHADAP JUMLAH OSTEOBLAS PADA TULANG ALVEOLAR TIKUS  
PERIODONTITIS YANG DIINDUKSI *Porphyromonas gingivalis*

oleh

Amelia Nur Ilahi

181610101108

Dosen Pembimbing Utama : drg. Amandia Dewi Permana S, M.Biomed  
Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Zahara Meilawaty, M.Kes  
Dosen Penguji Utama : drg. Peni Pujiastuti, M.Kes  
Dosen Penguji Anggota : drg. Rudy Joelijanto, M.Biomed

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
2022

**PENGESAHAN**

Skripsi yang berjudul “Efektivitas Ekstrak Daun Singkong (*Manihot Esculenta Crantz*) Terhadap Jumlah Osteoblas Pada Tulang Alveolar Tikus Periodontitis Yang Diinduksi *Porphyromonas Gingivalis*” telah diuji dan disahkan pada:

Hari, tanggal : Jumat, 03 juni 2022

Tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Tim penguji:

Dosen Penguji Utama,

Dosen Penguji Anggota,

drg. Peni Pujiastuti, M.Kes

NIP 196705171996012000

drg. Rudy Joelijanto, M.Biomed

NIP 197207151998021000

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Pendamping,

drg. Amandia Dewi Permana S,

M.Biomed

NIP 198006032006042000

drg. Zahara Meilawaty, M.Kes

NIP 198005272008122000

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

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

NIP 196901121996011000

## RINGKASAN

**EFEKTIVITAS EKSTRAK DAUN SINGKONG (*Manihot Esculenta Crantz*) TERHADAP JUMLAH OSTEUBLAS PADA TULANG ALVEOLAR TIKUS PERIODONTITIS YANG DIINDUKSI *Porphyromonas gingivalis***; Amelia Nur ilahi;181610101108; 2022; 102 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Periodontitis adalah suatu penyakit peradangan pada jaringan pendukung gigi yang disebabkan oleh mikroorganisme tertentu, salah satunya *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*). *P. gingivalis* merupakan bakteri anaerob Gram negatif yang memiliki banyak faktor virulensi yang berperan dalam menginduksi periodontitis yaitu fimbriae, gingipain, dan lipopolisakarida (LPS). Faktor virulensi ini digunakan untuk menghindari respon imun inang dan untuk menginvasi jaringan periodonsium dengan cara merangsang pelepasan sitokin proinflamasi seperti interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) dan eikosanoid yaitu prostaglandin (PGE2). Prostaglandin dan sitokin proinflamasi yang terbentuk dapat menstimulasi osteoblas untuk meningkatkan produksi Receptor Activator of Nuclear Factor K $\beta$ -Ligand (RANKL) dan menurunkan produksi Osteoprotegerin (OPG). OPG berfungsi untuk mengikat RANKL sehingga apabila produksi OPG menurun, RANKL mudah berikatan dengan RANK pada prekursor osteoklas. Hal tersebut dapat menyebabkan pembentukan dan aktivasi osteoklas sehingga terjadi kerusakan tulang. Inflamasi yang berlangsung terus menerus tentunya harus dicegah menggunakan obat yang berperan sebagai antibakteri dan antiinflamasi. Daun singkong (*Manihot esculenta Crantz*) telah diteliti mengandung senyawa aktif, yaitu flavonoid, saponin, tannin dan triterpenoid yang bersifat antiinflamasi dan juga antibakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji efektivitas pemberian Daun singkong (*Manihot esculenta Crantz*) terhadap jumlah osteoblas pada tulang alveolar model tikus periodontitis.

Jenis penelitian adalah eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian *the post-test only control group design*. Penelitian ini menggunakan 20 ekor tikus yang dibagi menjadi 2 kelompok; kelompok kontrol (normal) dan kelompok perlakuan. Kelompok perlakuan merupakan kelompok tikus yang diinduksi *P. gingivalis*. kelompok perlakuan terdiri dari 3 subkelompok yaitu

kelompok diberi aquadest (P1), kelompok diberi metronidazole (P2), dan kelompok diberi ekstrak daun singkong (P3). Masing-masing kelompok akan dieuthanasia setelah 7 hari pemberian aquadest, metronidazole dan ekstrak daun singkong. Setelah itu dilakukan pewarnaan HE dan penghitungan osteoblas.

Data hasil penelitian disajikan dalam rata-rata jumlah osteoblas lalu diuji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* dan didapatkan data berdistribusi normal lalu uji homogenitas menggunakan *Levene* dan menunjukkan data yang homogen. Data lalu dilakukan uji parametrik *one Way Anova* dengan hasil terdapat perbedaan signifikan ( $p < 0,05$ ) sehingga dilanjutkan uji LSD. Hasil uji LSD osteoblas didapatkan bahwa jumlah osteoblas pada kelompok ekstrak daun singkong berbeda bermakna dengan kelompok periodontitis yang diberi aquades dan tidak berbeda bermakna dengan kelompok metronidazole, hal ini menunjukkan bahwa jumlah osteoblas pada kelompok tikus yang diberi ekstrak daun singkong memiliki kemampuan yang hampir setara dalam meningkatkan jumlah osteoblas dengan kelompok tikus yang diberi metronidazole. Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan, dapat ditarik kesimpulan bahwa pemberian ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta Crantz*) efektif meningkatkan jumlah osteoblas pada tulang alveolar model tikus periodontitis dikarenakan memiliki efektivitas yang hampir setara dengan metronidazole.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas limpahan rahmat, karunia, dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efektivitas Ekstrak Daun Singkong (*Manihot Esculenta Crantz*) Terhadap Jumlah Osteoblas Pada Tulang Alveolar Tikus Periodontitis Yang Diinduksi *Porphyromonas Gingivalis*”. 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. Peni pudjiastuti, M.Kes., selaku Dosen Penguji Ketua dan drg. Rudy Joelijanto, M.Biomed., 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, MDSc. yang telah mengikutsertakan saya dalam penelitian ini dan memberikan ide penelitian sehingga saya memiliki kesempatan melakukan penelitian yang berintegritas;
5. drg. Swasthi M.Kes., selaku Dosen Pembimbing Akademik (DPA) yang telah memberikan nasihat dan semangat kepada saya;
6. Bu Wahyu, Bu Indri, Mas Agus, Bu Nur, Mas Teguh dan seluruh staf pengajar dan karyawan di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
7. Kedua orangtua saya tercinta, Ayah Sukadi dan Ibu Suyatmi, Kakak Elvera Ardita Setyawati, serta kakak kedua Nurul dwi kusumawati yang telah

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

8. Teman-teman satu tim penelitian: Maria Lestari, Salsabil, Izzan, Octaviana dan Sofinatur, yang berjuang bersama dari awal dan saling membantu hingga skripsi ini terselesaikan dengan baik;
9. Sahabat yang saya sayangi: Ni Made Prema Triartini, Tika Vienty Amiroh, Fadhlan Rifqi Ghiffary Mukthi, Isrofana Fika Wildania, Yuli Dwi Kristanti, Risma Nur Baiti, Nadia Khalisah, Syifa, Nurul Aulia Pratiwi, Laurentia Nadia, Alya Misna, Muhammad Jimly A., Rana Jilan, dan Fairuza yang selalu setia menemani, memberikan semangat, motivasi, nasihat, apresiasi, serta selalu ada dalam suka dan duka;
10. Teman-teman FKG saya yang turut membantu dan memberi semangat dalam proses penelitian di Laboratorium histologi: Ratna Widayawati, Siska, Saufa, arida, sayidah, farah dan hilmi.
11. Teman-teman eldentium FKG angkatan 2018, yang telah memberikan semangat, bantuan, apresiasi, dan kerja samanya;
12. Teman-teman dari SD-SMA yang menemani saya selama masa sekolah; Milen, Liset, Siti maimunah, Nurul madani, stefanny, Elifas Gavra, Novelia, Aslama, annisa, dwi putri yustika, alfiah az-zahra, dan fira.
13. Kakak tingkat yang turut membantu dan mengajari saya banyak hal; Syeifira Salsabila, Miladatus Syafiyah, Pramita, Pintan, Khoirul Amalia, Pramudibta, Dhesya, Ajeng Anjani Dan Haifa Azzura
14. 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, 03 juni 2022

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN .....</b>	<b>ii</b>
<b>HALAMAN MOTO .....</b>	<b>iii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN.....</b>	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN.....</b>	<b>vi</b>
<b>RINGKASAN/SUMMARY .....</b>	<b>vii</b>
<b>PRAKATA .....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xv</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xvi</b>
<b>BAB I. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar belakang .....	1
1.2 Rumusan masalah.....	3
1.3 Tujuan penelitian .....	4
1.4 Manfaat penelitian .....	4
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>5</b>
2.1 Periodontitis.....	5
2.1.1 Definisi.....	5
2.1.2 Etiologi.....	5
2.1.3 Patogenesis.....	6
2.1.4 Gambaran klinis .....	6
2.1.5 Gambaran radiografi .....	7
2.2 Osteoblas .....	7
2.2.1 Definisi.....	7
2.2.2 Gambaran histologi.....	8
2.3 <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	9
2.3.1 Definisi.....	9
2.3.2 Taksonomi.....	10
2.3.3 Faktor virulensi .....	10
2.4 Tanaman singkong .....	12
2.4.1 Definisi.....	12
2.4.2 Taksonomi.....	13
2.4.3 Bagian-bagian tanaman singkong .....	13
2.4.4 Kandungan dan manfaat daun singkong .....	15
2.5 Hubungan periodontitis terhadap jumlah osteoblas .....	20
2.6 Proses remodeling .....	21
2.7 Metode ekstraksi.....	22
2.7.1 Maserasi .....	22
2.7.2 Perkolasi.....	23

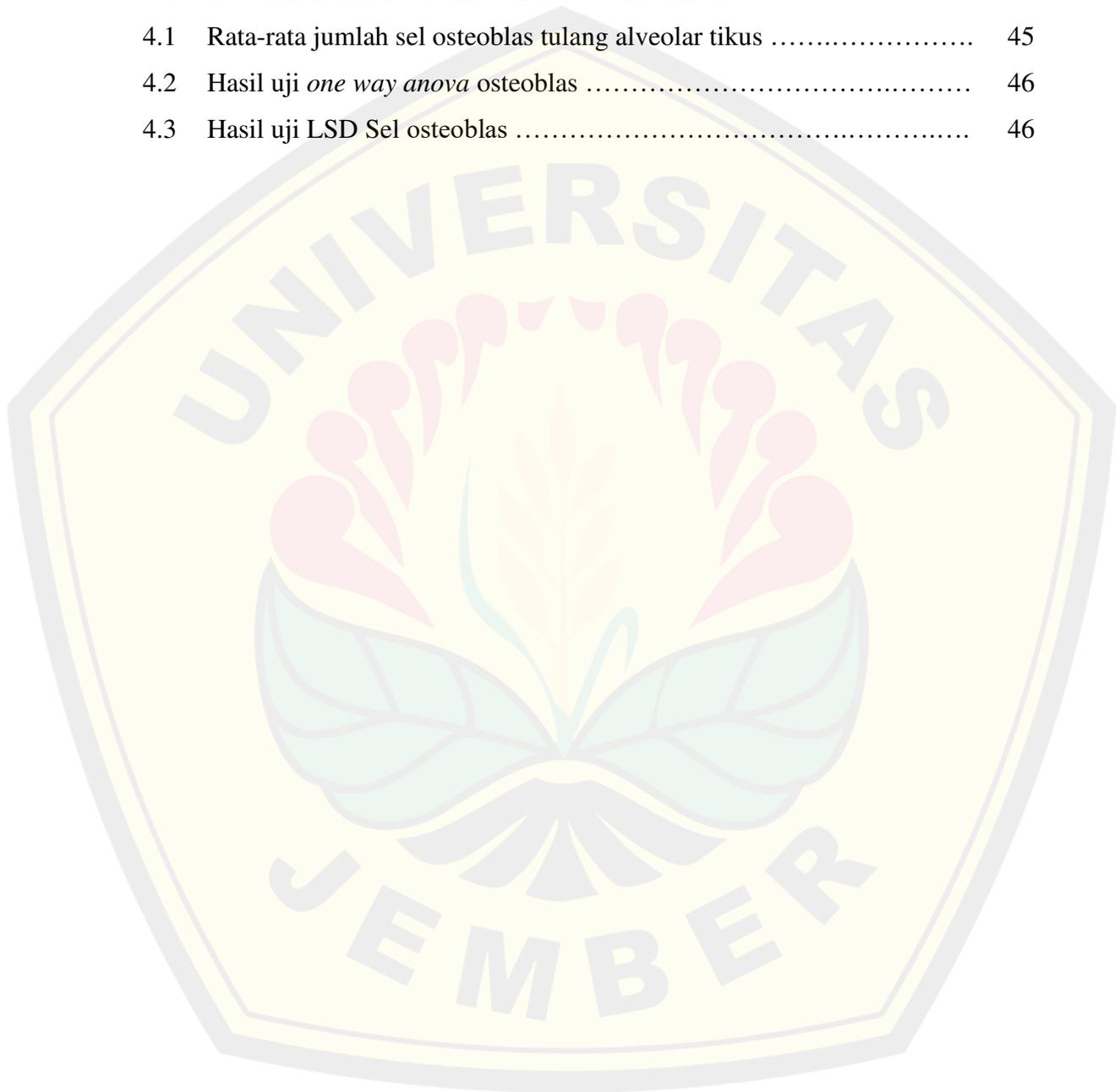
2.7.3 Soxhletasi .....	23
2.7.4 Reflux .....	24
2.8 Metronidazole .....	24
2.9 Kerangka konsep .....	25
2.10 Penjelasan kerangka konsep .....	25
2.11 Hipotesis .....	26
<b>BAB III. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>27</b>
3.1 Jenis dan rancangan penelitian .....	27
3.2 Tempat penelitian .....	27
3.3 Waktu penelitian .....	27
3.4 Variabel penelitian .....	27
3.4.1 Variabel bebas .....	27
3.4.2 Variabel terikat .....	28
3.4.3 Variabel terkendali .....	28
3.5 Definisi operasional .....	28
3.5.1 Ekstrak daun singkong .....	28
3.5.2 Model tikus periodontitis .....	28
3.5.3 Osteoblas .....	29
3.6 Sampel penelitian .....	29
3.6.1 Kriteria daun singkong .....	29
3.6.2 Kriteria sampel penelitian .....	29
3.6.3 Jumlah sampel penelitian .....	30
3.7 Alat dan bahan penelitian .....	31
3.7.1 Alat penelitian .....	31
3.7.2 Bahan penelitian .....	31
3.8 Prosedur Penelitian .....	32
3.8.1 <i>Ethical Clearence</i> .....	32
3.8.2 Identifikasi tanaman singkong .....	32
3.8.3 Persiapan hewan coba .....	32
3.8.4 Pembuatan suspensi <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	32
3.8.5 Pembuatan model tikus periodontitis .....	32
3.8.6 Pembuatan ekstrak daun singkong .....	33
3.8.7 Pembagian kelompok hewan coba .....	33
3.8.8 Pemberian ekstrak daun singkong pada tikus periodontitis .....	34
3.8.9 Pemberian metronidazole pada model tikus periodontitis .....	36
3.8.10 Euthanasia sampel .....	36
3.8.11 Dekalsifikasi jaringan .....	37
3.8.12 Pembuatan sediaan histologi .....	37
3.8.13 Perhitungan osteoblas .....	39
3.9 Analisis data .....	40
3.10 Alur penelitian .....	41
<b>BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>42</b>
4.1 Hasil penelitian .....	42
4.2 Analisis data .....	45
4.3 Pembahasan .....	47
<b>BAB V. PENUTUP .....</b>	<b>51</b>

5.1 Kesimpulan.....	51
5.2 Saran .....	51
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>52</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>63</b>



**DAFTAR TABEL**

	Halaman
3.1 Tabel Konversi Dosis Hewan Coba dan Manusia .....	34
4.1 Rata-rata jumlah sel osteoblas tulang alveolar tikus .....	45
4.2 Hasil uji <i>one way anova</i> osteoblas .....	46
4.3 Hasil uji LSD Sel osteoblas .....	46



**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
2.1 Gambaran klinis periodontitis .....	7
2.2 Gambaran radiografi periodontitis .....	7
2.3 Osteoblas dan osteosit .....	9
2.4 Bakteri <i>P. gingivalis</i> pada pembesaran 1000x .....	10
2.5 Morfologi tanaman singkong .....	13
2.6 Siklus remodeling tulang .....	22
3.1 Alur penelitian .....	41
4.1 Gambaran klinis periodontitis pada tikus .....	42
4.2 Gambaran radiografi jaringan periodontal tikus .....	43
4.3 Gambaran histolgi preparat dengan pewarnaan HE .....	43
4.4 Gambaran histolgi osteoblas kelompok kontrol perbesaran 400x.....	44
4.5 Gambaran histologi osteoblas kelompok perlakuan perbesaran 400x...	45
4.6 Diagram jumlah sel osteoblast tulang alveolar tikus .....	45

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
4.1 Alat dan bahan penelitian .....	63
4.2 Prosedur penelitian .....	66
4.3 Hasil perhitungan osteoblast .....	75
4.4 Analisis data .....	76
4.5 Surat identifikasi tumbuhan .....	78
4.6 <i>Ethical clearence</i> .....	79
4.7 Surat keterangan tikus sehat .....	80
4.8 Surat sertifikat bakteri <i>P. gingivalis</i> .....	81
4.9 Surat izin laboratorium Bioscience .....	82
4.10 Surat izin laboratorium Hewan .....	83
4.11 Surat izin laboratorium Mikrobiologi .....	84
4.12 Surat izin laboratorium Histologi .....	85

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar belakang

Penyakit periodontal merupakan penyakit pada rongga mulut urutan pertama dalam catatan buku rekor dunia tahun 2001 yang dituliskan sebagai penyakit pada rongga mulut yang paling sering dialami oleh manusia di dunia (Tonneti *et al.*, 2017). Penyakit periodontal mempengaruhi sekitar 20-50% dari populasi di seluruh dunia (Nazir, 2017). Menurut data Riskesdas tahun 2018, persentase terjadinya kasus periodontitis di Indonesia sebesar 74,1%, hal tersebut menunjukkan bahwa dari 10 orang penduduk di Indonesia, 7 orang diantaranya menderita periodontitis (Kemenkes, 2018).

Periodontitis merupakan penyakit inflamasi pada jaringan pendukung gigi yang disebabkan oleh adanya akumulasi plak subgingiva dan bakteri patogenik periodontal tertentu (Mesa *et al.*, 2019). Salah satu Bakteri patogenik penyebab periodontitis adalah *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) (Kurniawati *et al.*, 2020). *P. gingivalis* merupakan bakteri anaerob Gram negatif yang memiliki banyak faktor virulensi. Dari beberapa faktor virulensi yang dimiliki oleh *P. gingivalis* yang paling berperan dalam menginduksi periodontitis yaitu fimbriae, gingipain, dan LPS. Faktor virulensi ini digunakan untuk menghindari respon imun inang dan untuk menginvasi jaringan periodontal dengan cara merangsang pelepasan sitokin proinflamasi seperti interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) dan eikosanoid yaitu prostaglandin (PGE2). Prostaglandin dan sitokin proinflamasi yang diproduksi tersebut mengakibatkan destruksi jaringan periodontal dengan cara menstimulasi pembentukan dan peningkatan aktivitas osteoklas serta penurunan jumlah dan aktivitas osteoblas (Ayu, 2018; Jia *et al.*, 2019; Putri *et al.*, 2020). Sitokin proinflamasi yang terbentuk dapat menstimulasi osteoblas untuk meningkatkan produksi Receptor Activator of Nuclear Factor K $\beta$ -Ligand (RANKL) dan menurunkan produksi Osteoprotegerin (OPG). OPG berfungsi untuk mengikat RANKL sehingga apabila produksi OPG

menurun, RANKL mudah berikatan dengan RANK pada prekursor osteoklas. Hal tersebut dapat menyebabkan penurunan jumlah osteoblas dan pembentukan serta aktivasi osteoklas sehingga terjadi kerusakan tulang (Tang *et al.*, 2016; Fatimatuzzahro *et al.*, 2020).

Osteoblas merupakan sel yang berfungsi untuk membentuk, mensekresi komponen matriks tulang dan berperan penting pada proses remodeling tulang alveolar. Osteoblas mengandung enzim alkali fosfatase yang menandakan bahwa osteoblas membentuk suatu lapisan sel diatas permukaan tulang yang berfungsi melindungi dari resorpsi tulang dengan mensintesis dan memediasi mineralisasi osteoid. Osteoid merupakan matriks tulang yang belum mengapur, baru dibentuk, dan tidak mengandung mineral, namun tidak lama setelah terjadinya deposisi, osteoid akan segera mengalami mineralisasi dan menjadi tulang yang baru (Majdina *et al.*, 2016; Astuti *et al.*, 2021).

Inflamasi yang berlangsung terus menerus tentunya harus dicegah menggunakan obat yang tepat untuk meminimalisir terjadinya kerusakan tulang alveolar. Adanya pembentukan tulang dalam respon inflamasi dan penyakit periodontal mempengaruhi hasil pengobatan. Salah satu obat yang digunakan untuk pengobatan periodontitis adalah metronidazole. Metronidazole merupakan obat yang secara efektif dapat menghambat sintesis DNA asam nukleat pada bakteri (Carranza *et al.*, 2018). Namun metronidazole yang digunakan dalam jangka panjang dapat memberikan efek samping ringan hingga sedang seperti mulut kering, sakit kepala, timbul rasa mual, mulut berasa logam, nyeri perut, diare, stomatitis dan neutropenia (Tedjasulaksana, 2016; Heta *et al.*, 2018; Ceruelos *et al.*, 2019). Selain itu, penggunaan antibiotik dengan dosis tidak sesuai pedoman terapi dapat menyebabkan terjadinya resistensi sehingga efektivitasnya dalam mengobati infeksi menjadi menurun (Azaripour *et al.*, 2018; Jamiati *et al.*, 2019; Hasyul *et al.*, 2020; Gultom *et al.*, 2021). Sehingga memerlukan alternatif bahan yang memiliki efek samping lebih sedikit, salah satunya yaitu yang berasal dari bahan alami. Bahan alami diketahui dapat

meminimalkan efek samping yang ditimbulkan dari penggunaan obat kimia (Ahmad, 2017). Salah satu bahan alami tersebut dapat diperoleh melalui tanaman yaitu tanaman singkong.

Tanaman singkong merupakan tanaman yang dapat tumbuh sepanjang tahun di daerah tropis dan memiliki daya adaptasi tinggi terhadap kondisi diberbagai tanah (Womsiwor *et al.*, 2018). Bagian-bagian tanaman singkong seperti umbi, daun dan batang diketahui memiliki banyak manfaat di berbagai industri pangan dan non-pangan khususnya pada bagian daun singkong yang banyak digunakan sebagai obat herbal (Restiani *et al.*, 2014; Akbar *et al.*, 2019). Kandungan yang terdapat dalam daun singkong yaitu air, fosfor, kalsium, karbohidrat, vitamin C (asam askorbat), lemak, protein, vitamin B1, zat besi, flavonoid, saponin, tannin dan triterpenoid (Muthmainna *et al.*, 2018). Daun singkong telah dilaporkan memiliki aktivitas antiinflamasi, antioksidan, antialergi, antidiabetes, antibakteri, antivirus, dan antikanker (Solikhah *et al.*, 2019). Kandungan flavonoid dalam daun singkong dapat menekan inflamasi dengan cara memblokir siklus siklooksigenase (COX) dan lipoksigenase. Selain itu, flavonoid mempunyai kandungan quercetin yang dapat menstimulasi diferensiasi osteoblas. Saponin juga diketahui memiliki efek antiinflamasi yang hampir sama dengan flavonoid yaitu dengan cara memblokir jalur prostaglandin sebagai penghambat aktifasinya, namun tidak berpengaruh terhadap sintesisnya dan dikenal dapat mengurangi lamanya fase inflamasi (Meilawaty, 2013; Sa'diyah *et al.*, 2020). Selain flavonoid dan saponin, kandungan daun singkong seperti tannin, triterpenoid dan vitamin C juga memiliki efek antiinflamasi dan antibakteri (Yulistiana *et al.*, 2016; Wenas *et al.*, 2020).

Berdasarkan penelitian sebelumnya, dosis pemberian ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta crantz*) yang bekerja secara efektif sebagai antiinflamasi dalam menurunkan profil leukosit perifer model tikus disfungsi ovarium dan periodontitis serta efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *P. gingivalis* adalah sebanyak 179,2 mg/kg BB (Sari

*et al.*, 2021). Sampai saat ini, belum ada penelitian mengenai efektivitas ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta crantz*) terhadap jumlah osteoblas pada tulang alveolar tikus periodontitis. Oleh karena itu penulis ingin melakukan penelitian mengenai efektivitas ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta crantz*) terhadap jumlah osteoblas pada tulang alveolar tikus periodontitis yang diinduksi *P. gingivalis*.

### **1.2 Rumusan masalah**

Bagaimana efektivitas ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta crantz*) terhadap jumlah osteoblas pada tulang alveolar tikus periodontitis yang diinduksi *P. gingivalis*?

### **1.3 Tujuan penelitian**

Untuk mengkaji efektivitas ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta crantz*) terhadap jumlah osteoblas pada tulang alveolar tikus periodontitis yang diinduksi *P. gingivalis*.

### **1.4 Manfaat penelitian**

Manfaat penelitian yang diharapkan dari penelitian ini adalah:

1. Dapat meningkatkan pengetahuan tentang periodontitis dan pengaruhnya terhadap jumlah osteoblas serta resorpsi tulang alveolar.
2. Dapat menjadi dasar untuk penelitian-penelitian selanjutnya terkait dengan pengobatan herbal berupa ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta crantz*) dalam fungsi dan keterkaitannya dengan peningkatan jumlah osteoblas dan periodontitis.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Periodontitis

##### 2.1.1 Definisi

Periodontitis merupakan penyakit inflamasi pada jaringan periodontal yang disebabkan oleh mikroorganisme spesifik atau sekelompok mikroorganisme spesifik, salah satunya adalah *P. gingivalis*. *P. gingivalis* ini akan menyebabkan kerusakan progresif pada ligamen periodontal dan tulang alveolar yang ditandai dengan adanya resesi, pembentukan poket periodontal, maupun keduanya (Carranza *et al.*, 2018; Kurniawati *et al.*, 2020). Periodontitis yang parah mengakibatkan kerusakan seperti kehilangan perlekatan (*loss attachment*) dan resorpsi tulang alveolar (Prasetya *et al.*, 2021).

##### 2.1.2 Etiologi

Periodontitis sering disebut sebagai penyakit multifaktorial karena penyakit ini disebabkan oleh berbagai macam faktor. Etiologi utama yang paling berperan dalam terjadinya periodontitis ini adalah akumulasi plak (Wijaksana, 2016; Andriani, 2019). Plak merupakan substansi yang terstruktur, berwarna kuning, lunak dan melekat pada permukaan gigi yang biasanya mengandung berbagai jenis mikroorganisme yaitu bakteri, jamur, protozoa, dan juga virus, namun paling banyak ditemukan adalah bakteri yang bersifat patogenik. Plak yang memiliki kandungan mikroorganisme patogenik dapat memperparah terjadinya infeksi periodontal (Quamilla, 2016). Mikroorganisme patogenik atau Bakteri utama yang terlibat dalam periodontitis, antara lain *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*Aa*), *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia* dan *Treponema denticola* (Ayu, 2018; Prasetya *et al.*, 2021).

Selain faktor bakteri patogen, ada beberapa hal yang berperan dalam terjadinya periodontitis, salah satunya yaitu kerentanan host. Kerentanan host dapat dipengaruhi oleh berbagai macam hal seperti genetik, pengaruh

lingkungan dan tingkah laku. Respon host yang tidak adekuat dalam menghancurkan bakteri patogen juga dapat menyebabkan terjadinya destruksi jaringan periodontal (Quamilla, 2016).

### 2.1.3 Patogenesis

Infeksi pada jaringan periodontal diawali dengan adanya invasi mikroorganisme patogen spesifik yang berkolonisasi membentuk biofilm plak. Kolonisasi serta invasi bakteri patogen dan produknya pada sulkus gingiva menjadi tahap awal perkembangan penyakit periodontal. Mikroorganisme dapat menyebabkan destruksi jaringan secara langsung dan secara tidak langsung dengan cara menstimulasi respon pertahanan tubuh pejamu. Interaksi antara mikroorganisme patogen dan sistem imun tubuh pejamu tersebut menimbulkan reaksi kompleks yang disebut respon inflamasi. Respon Inflamasi yang disebabkan oleh mikroorganisme spesifik tersebut dapat menyebabkan perubahan jaringan, destruksi jaringan ikat dan resorpsi tulang alveolar (Rusyanti, 2014; Wijaksana, 2016).

### 2.1.4 Gambaran klinis

Gambaran klinis periodontitis yaitu adanya perubahan warna, kontur dan konsistensi gingiva disertai dengan peningkatan kedalaman probing, dan pendarahan saat probing (Gambar 2.1) (Carranza *et al.*, 2018). Pada penderita periodontitis, terjadi perubahan warna gingiva menjadi merah mengkilat, perubahan konsistensi menjadi lebih lunak, perubahan tekstur yang ditandai dengan hilangnya *stippling* pada gingiva cekat, margin gingiva yang membulat atau berbentuk kawah, resesi gingiva dan kedalaman probing  $\geq 4$  mm yang disebabkan oleh migrasi epitel penyatu ke arah apikal (Quamilla, 2016). Karakteristik atau tanda klinis yang membedakan periodontitis dengan gingivitis adalah adanya *attachment loss* atau adanya kehilangan perlekatan yang menyebabkan timbulnya pembentukan poket periodontal serta berkurangnya kepadatan dan ketinggian tulang alveolar (Carranza *et al.*, 2018).



**Gambar 2.1** Gambaran klinis periodontitis (Carranza *et al.*, 2018).

#### 2.1.5 Gambaran radiografi periodontitis

Gambaran radiografi pada periodontitis yaitu ditandai dengan adanya kekaburan dan putusnya kontinuitas lamina dura pada bagian mesial atau distal dari puncak septum interdental serta pelebaran ruang periodontal akibat radiolusen *wedge shape* pada puncak tulang (Gambar 2.2). Puncak tulang septum interdental yang mengalami proses destruksi akan menyebabkan tinggi tulang septum interdental berkurang secara progresif (Saputri, 2018).



**Gambar 2.2** Gambaran Radiografi periodontitis. **A)** Gambaran radiografi pasien periodontitis dengan CAL > 5 mm. **B)** Kekaburan dan Putusnya Kontinuitas Lamina Dura dan Radiolusen *Wedge Shaped* (Carranza *et al.*, 2018; Saputri, 2018).

## 2.2 Osteoblas

### 2.2.1 Definisi

Osteoblas merupakan sel yang berfungsi untuk membentuk, mensekresi komponen matriks tulang (kolagen dan non-kolagen organik). Osteoblas mengandung enzim alkali fosfatase yang menandakan bahwa osteoblas membentuk suatu lapisan sel di atas permukaan tulang yang

berfungsi melindungi dari resorpsi tulang dengan mensintesis dan memediasi mineralisasi osteoid. Osteoid merupakan matriks tulang yang belum mengapur, baru dibentuk, dan tidak mengandung mineral, namun tidak lama setelah terjadinya deposisi, osteoid akan segera mengalami mineralisasi dan menjadi tulang yang baru (Majdina *et al.*, 2016; Astuti *et al.*, 2021).

Osteoblas juga berperan dalam proses pembentukan tulang serta berperan dalam aktivitas sintesis dan sekresi mineral ke seluruh substansi dasar sampai substansi pada daerah yang kecepatan metabolismenya tinggi dan menjadi perantara pada mineralisasi osteoid. Osteoblas berkembang dari osteoprogenitor yang terdapat pada bagian dalam periosteum dan sumsum tulang (Koraag *et al.*, 2015; Majdina *et al.*, 2016).

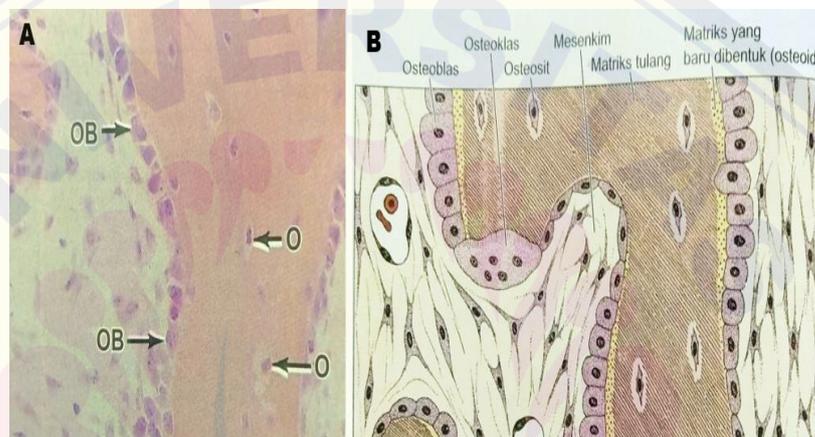
Sel osteoblas mensekresi berbagai unsur matriks tulang (kolagen dan non-kolagen organik) seperti kolagen tipe I, proteoglikan, osteonektin, osteokalsin, dan osteopoetin, serta menghasilkan faktor penumbuh yang mempunyai efek parakrin dan autokrin pada pertumbuhan tulang. Selain itu, sel osteoblas juga memiliki reseptor permukaan terhadap berbagai hormon, vitamin, dan sitokin yang mempengaruhi aktivitasnya (Koraag *et al.*, 2015; Sardi *et al.*, 2018).

### 2.2.2 Gambaran histologi

Gambaran histologi osteoblas terlihat mirip dengan epitel selapis dan berbentuk bundar. sel osteoblas tampak sebagai sebaris sel yang berdekatan dengan selapis tipis matriks yang sedikit terpulsa (Gambar 2.3). Matriks yang sedikit terpulsa adalah osteoid. Setiap osteoblas secara bertahap dikelilingi oleh produk-produk sekresinya sendiri dan menjadi osteosit. Osteosit berbentuk kurang bundar dan terselubung sendiri-sendiri di dalam ruang yang disebut dengan lacuna (Koraag *et al.*, 2015; Mescher, 2017).

Deposisi komponen anorganik dari tulang bergantung pada adanya sel-sel osteoblas yang aktif. Jumlah sel osteoblas aktif dapat mempengaruhi bentuk dari sel osteoblas itu sendiri. Pada saat osteoblas aktif mensintesis

matriks tulang, sel osteoblas akan tersusun sebagai lapisan epiteloid sel-sel kuboid sampai kolumnar atau silindris pada permukaan tulang dengan inti sel osteoblas biasanya terletak pada ujung sel paling jauh dari permukaan tulang disertai sitoplasmanya sangat basofilik dan kompleks golgi tampak mencolok sebagai daerah lebih pucat antara inti dan dasar sel. Namun, jika sel osteoblas yang aktif tersebut berkurang maka aktivitas sintesis matriks tulang juga akan mengalami pengurangan, sehingga osteoblas akan terlihat berbentuk gepeng dan sifat basofilia pada sitoplasmanya juga akan berkurang (Koraag *et al.*, 2015; Sardi *et al.*, 2018).

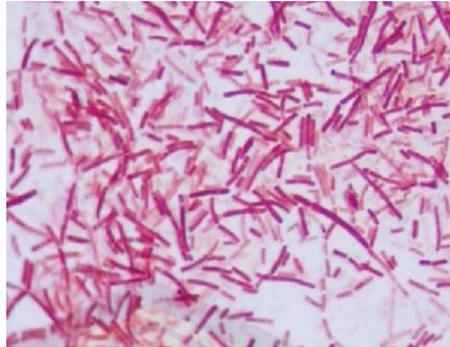


**Gambar 2.3** Osteoblas dan osteosit. **A)** Fotomikrograf tulang yang sedang terbentuk, terlihat perbedaan lokasi dan morfologi antara osteoblas (OB) dan osteosit (O). 300x. H&E. **B)** Gambar skematis mengenai hubungan osteoblas dan osteoid, matriks tulang dan osteosit (Mescher, 2017).

### 2.3 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)

#### 2.3.1 Definisi

*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) merupakan bakteri gram-negatif yang banyak ditemukan pada area sulkus gingiva, plak subgingiva, lidah dan tonsil. Bakteri *P. gingivalis* ini termasuk flora normal di dalam rongga mulut manusia (Dwipriastuti *et al.*, 2017). *P. gingivalis* adalah bakteri yang paling sering dikaitkan dengan patogenesis periodontitis karena hampir 40-100% kasus periodontitis yang terjadi dipicu oleh bakteri ini. *P. gingivalis* adalah salah satu bakteri dominan penyebab periodontitis kronis yang berpigmen hitam, berbentuk batang, *non-motile*, bersifat anaerob, dan *assacharolytic* (Gambar 2.4) (Alibasyah *et al.*, 2018; Putri *et al.*, 2020).



**Gambar 2.4** Bakteri *P. gingivalis* pada perbesaran 1000x (Fitriyana *et al.*, 2013).

### 2.3.2 Taksonomi

Taksonomi bakteri *Porphyromonas gingivalis* adalah sebagai berikut :

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

### 2.3.3 Faktor virulensi

Faktor virulensi adalah faktor yang menyebabkan suatu bakteri menjadi patogen. Faktor virulensi juga dapat dikatakan sebagai metabolit dari suatu organisme yang penting dalam berbagai tahap siklus hidup dan yang menjadi penyebab kerusakan pada inang. Faktor virulensi dikeluarkan oleh bakteri saat penetrasi ke dalam inang, sehingga bakteri menjadi lebih mudah berinvansi dan menyebabkan terjadinya kerusakan jaringan. Kolonisasi pada inang hanya dapat terjadi apabila terdapat faktor virulensi dari bakteri patogen yang dapat menyebabkan destruktif tulang jika mekanisme perlindungan host terhambat. Faktor virulensi yang dimiliki *P. gingivalis* adalah fimbriae, Lipopolisakarida (LPS), kapsul, asam lipoteichoic, protease, seramida, hemaglutinin, vesikel membrane luar,

antigen kapsuler dan hemolisin (How *et al.*, 2016; Alibasyah *et al.*, 2018; Domini *et al.*, 2019; Pudla *et al.*, 2019; Pratiwi *et al.*, 2020).

- 1) Fimbriae: *P. gingivalis* memiliki *fimbriae A* (FimA) yang memberikan kontribusi penting pada kolonisasi dan perlekatan bakteri ke substrat yaitu pada plak subgingiva dan epitel gingiva. Fimbriae pada *P. Gingivalis ini* memiliki sifat hidrofobik. sifat hidrofobik ini bertujuan untuk mempermudah perlekatan pada membran sel fagosit karena sel fagosit tersebut cenderung bersifat hidrofobik (Lee *et al.*, 2018; Putri *et al.*, 2020; Attallah *et al.*, 2021; Vishwakarma *et al.*, 2021). Selain itu, fimbriae dapat menstimulasi sel inang untuk memproduksi sitokin proinflamasi (Jia *et al.*, 2019).
- 2) Kapsul: bakteri *P. gingivalis* ada yang mempunyai kapsul dan ada yang tidak mempunyai kapsul. *P. gingivalis* yang memiliki kapsul lebih virulen karena *P. gingivalis* yang tidak memiliki kapsul akan lebih mudah dibunuh oleh makrofag dan sel dendritik. *P. gingivalis* berkapsul memiliki kemampuan untuk memodulasi respon *host* dengan cara menstimulasi sintesis sitokin proinflamasi seperti interleukin 1 (IL-1), IL-6, dan IL-8 dari fibroblas (How *et al.*, 2016; Attallah *et al.*, 2021).
- 3) Lipopolisakarida (LPS): Faktor virulensi LPS pada *P. gingivalis* dapat menyebabkan destruksi jaringan periodontal secara tidak langsung akibat teraktivasi sitokin proinflamasi seperti IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , dan PGE2. Selain itu, LPS dapat menghambat diferensiasi osteoblas dan mineralisasi osteoblastic sehingga menyebabkan peningkatan jumlah osteoklas. Pertahanan *host* yang tidak adekuat mengakibatkan meningkatnya jumlah bakteri periodontal (How *et al.*, 2016; Ayu, 2018; Putri *et al.*, 2020).
- 4) Asam Lipoteichoic: Asam lipoteichoic bersifat *highly inflammagenic* yang dapat merangsang respon imun spesifik dan dapat berinteraksi dengan *toll-like receptor* kemudian merangsang produksi sitokin dan menyebabkan terjadinya inflamasi (Pudla *et al.*, 2019; Hajishengallis *et al.*, 2020; Nunes *et al.*, 2020).

5) Protease: kelompok protease yang diproduksi oleh *P. gingivalis* terbagi menjadi dua yaitu “*trypsin-like*” dan *serine proteinase*. *Trypsin-like* pada umumnya dikenal sebagai gingipain. Gingipain adalah *cysteine proteinase* yang disekresikan oleh bakteri *P. gingivalis* dan juga merupakan 85% dari total aktivitas proteolitik bakteri *P. gingivalis* (Septiwidyati *et al.*, 2020). Gingipain dari bakteri *P. gingivalis* dapat menstimulasi sel inang untuk memproduksi sitokin proinflamasi seperti IL-1 $\beta$  dan TNF- $\alpha$  serta dapat menyebabkan terjadinya interaksi antara *P. gingivalis* dengan sel dendritik sehingga dapat memanipulasi sel imun (Jia *et al.*, 2019; Putri *et al.*, 2020).

Seramida, hemaglutinin, haemolysin, vesikel membrane luar dan Antigen kapsuler juga merupakan faktor virulensi dari *P. Gingivalis* yang juga berperan penting bagi potensi virulensi pada bakteri ini seperti berperan pada saat terjadi perlekatan ke substrat, saat berkolonisasi, memodulasi pertahanan host serta merusak jaringan host (Lee *et al.*, 2018; Domini *et al.*, 2019).

Dari beberapa faktor virulensi yang dimiliki oleh *P. gingivalis* yang paling berperan dalam menginduksi periodontitis adalah fimbriae, gingipain, dan LPS. Faktor virulensi ini digunakan untuk menghindari respon imun inang dan untuk menginvasi jaringan periodonsium (Jia *et al.*, 2019; Putri *et al.*, 2020).

## **2.4 Tanaman singkong**

### **2.4.1 Definisi**

Singkong atau ubi kayu (*Manihot esculenta Crantz*) merupakan salah satu sumber karbohidrat di Indonesia yang menempati urutan tiga terbesar setelah padi dan jagung. Singkong atau ubi kayu, merupakan pohon yang dapat tumbuh sepanjang tahun karena memiliki daya adaptasi yang tinggi terhadap kondisi berbagai tanah serta memiliki banyak manfaat. Singkong biasanya dijadikan olahan pangan karena kandungan karbohidratnya yang tinggi, sedangkan daunnya biasa dijadikan sayuran (Berlian *et al.*, 2016; Anggraini *et al.*, 2017; Yunita *et al.*, 2019).

#### 2.4.2 Taksonomi tanaman singkong

Kedudukan atau taksonomi tanaman singkong diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Divisi	: <i>Spermatophyta</i> (tumbuhan berbiji)
Subdivisi	: <i>Angiospermae</i> (berbiji tertutup)
Kelas	: <i>Dicotyledonae</i>
Ordo	: <i>Euphorbiales</i>
Family	: <i>Euphorbiaceae</i>
Genus	: <i>Manihot</i>
Spesies	: <i>Manihot esculenta crantz sin. M.utilissima</i>

#### 2.4.3 Bagian-bagian tanaman singkong

Tanaman singkong (*Manihot esculenta Crantz*) terdiri dari beberapa bagian seperti akar, umbi, batang, daun, kulit, bunga dan buah (Gambar 2.4). Ubi kayu merupakan tanaman serbaguna yang memiliki banyak manfaat pada bagian-bagian tanaman tersebut seperti batang, daun, dan umbinya yang dapat dimanfaatkan untuk berbagai industri (Restiani *et al.*, 2014; Yunita *et al.*, 2019).



**Gambar 2.5** Morfologi tanaman singkong. **A.** Morfologi batang. **B.** Daun muda (pucuk). **C.** Daun dewasa. **D.** Umbi singkong. **E.** Bunga jantan dan betina. **F.** buah secara utuh dan buah pada Irisan melintang. **G.** kulit songkong dengan irisan melintang. **H.** akar tanaman singkong (Restiani *et al.*, 2014; Siswati *et al.*, 2019).

#### 2.4.3.1 Akar dan umbi singkong

Akar pada tanaman singkong merupakan akar tunggang dengan sejumlah cabang akar yang tumbuh dengan arah menyamping yang akan mengalami pembesaran dan membentuk umbi (Gambar 2.5H) (Hariana, 2015; Muzakki *et al.*, 2020).

#### 2.4.3.2 Batang

Warna batang bervariasi tergantung dari kulit terluar, tetapi batang yang masih muda berwarna hijau dan pada saat tua berubah keputih-putihan, hijau kelabu atau coklat kelabu dengan diameter 2 sampai 4 cm serta tingginya 1 sampai 4 meter (Gambar 2.5A) (Restiani *et al.*, 2014).

#### 2.4.3.3 Kulit

Pada umumnya, Kulit singkong terbagi menjadi lapisan epidermis dan dermis yang diantaranya terdapat kambium yang menyebabkan umbi dapat tumbuh dan membesar (Gambar 2.5G) (Restiani *et al.*, 2014).

#### 2.4.3.4 Bunga dan buah

Bunga singkong memiliki ukuran sangat kecil dan berwarna putih, kelopak bunga tanaman singkong ini umumnya berjumlah 5 buah berwarna hijau dan berukuran lebih besar dari ukuran bunga (Gambar 2.5E). Buah tanaman singkong memiliki bentuk bulat bergerigi pada bagian tepi (Gambar 2.5F) (Restiani *et al.*, 2014).

#### 2.4.3.5 Daun

Tangkai daun singkong menjadi perantara antara batang tanaman singkong dan daun singkong. Tangkai daun singkong memiliki warna yang bervariasi yaitu hijau, hijau kekuningan, hijau kemerahan, merah, ungu kemerahan, sampai berwarna ungu dengan panjang tangkai sekitar 16-20 cm dan ruas yang pendek antar tangkai sekitar 3-5 cm. Daun singkong merupakan bagian dari tanaman singkong yang tumbuh di sepanjang batang pada tanaman singkong. Daun singkong memiliki warna kehijauan dan tulang daun majemuk menjari, anak daun berbentuk elips berujung runcing dan bagian tiap daun (cuping daun) berukuran kurang dari 5 cm yang umumnya berjumlah 5-7 helai (Gambar 2.5B). Pertulangan daun singkong

dari permukaan atas sampai bagian bawah pada pangkal daun berwarna kuning. Sama halnya dengan tangkai daun singkong, daun singkong juga memiliki warna yang bervariasi. Pucuk daun singkong dapat berwarna hijau muda, hijau kekuningan, hijau tua, hijau keunguan dan dapat berwarna ungu sedangkan daun singkong dewasa dapat berwarna hijau muda dan hijau tua. Warna pada daun singkong tersebut dapat berubah menurut keadaan tempat tumbuhnya dan terkait dengan persediaan air, nutrisi yang diserap dan penyinaran. Pada umumnya, daun singkong yang muda (pucuk) berwarna hijau kekuningan atau hijau keunguan sedangkan daun singkong dewasa berwarna hijau tua atau hijau gelap (Gambar 2.5C) (Caniago *et al.*, 2014; Restiani *et al.*, 2014; Kotto *et al.*, 2020).

#### 2.4.4 Kandungan dan manfaat daun singkong

Kandungan yang terdapat dalam daun singkong yaitu air, fosfor, karbohidrat, kalsium, Vitamin A, vitamin C (asam askorbat) sekitar 27,5%, protein, lemak, vitamin B1, zat besi, flavonoid, triterpenoid, saponin dan tannin. (Hasim *et al.*, 2016; Dirayati *et al.*, 2017; Muthmainna *et al.*, 2018; Megawati *et al.*, 2020). Daun singkong telah dilaporkan memiliki efek antiinflamasi, antioksidan, antialergi, antidiabetes, antibakteri, antivirus, dan antikanker (Solikhah *et al.*, 2019).

##### 2.4.4.1 Flavonoid

Flavonoid adalah kelompok polifenol yang terdiri dari 15 atom karbon dan merupakan turunan dari 2-phenyl-benzyl- $\gamma$ -pyrone. Flavonoid memiliki ikatan dengan gugus gula yang menyebabkan flavonoid bersifat polar. Flavonoid merupakan salah satu metabolit sekunder penting pada tumbuhan yang berperan untuk melindungi struktur sel, memberi warna, rasa pada biji, bunga, buah dan memberi aroma pada tumbuhan serta sebagai perlindungan dari paparan sinar UV. Dalam bidang kesehatan, flavonoid dapat meningkatkan efektivitas vitamin C dan memiliki efek antimikroba, antibakteri, antiinflamasi, antivirus, antijamur, antialergi, antikanker, antidiabetes serta antioksidan (Meilawaty, 2013; Noer *et al.*, 2016; Alfaridz

*et al.*, 2018; Edrizal *et al.*, 2018; Solikhah *et al.*, 2019; Megawati *et al.*, 2020).

Flavonoid dapat memberikan efek antibakteri dengan cara menyebabkan kerusakan dan mengganggu fungsi membran sel sehingga menghambat pertumbuhan bakteri. Flavonoid dapat membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler yang menyebabkan lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan rusaknya dinding sel. Kerusakan dinding sel ini dapat menyebabkan perubahan permeabilitas membran sel sehingga menghambat kerja enzim intraseluler dan air masuk ke dalam sel secara tidak terkontrol (Pratiwi, 2016).

Flavonoid dalam daun singkong dapat berfungsi sebagai antioksidan. Efek antioksidan yang diberikan oleh flavonoid ini dapat mencegah penyakit kardiovaskular, kanker dan penyakit degenerasi komponen sel lainnya yang disebabkan oleh usia (Indra *et al.*, 2019; Andika *et al.*, 2020; kurniasih *et al.*, 2022). Senyawa flavonoid sebagai antioksidan juga diketahui dapat menghambat, menangkal, dan membuat aktivitas radikal bebas dalam tubuh menjadi tidak aktif sehingga terhambatnya aktivasi mediator inflamasi oleh radikal bebas. Mekanisme flavonoid sebagai antioksidan dalam menangkal radikal bebas yaitu dengan cara memberikan elektron pada molekul radikal bebas sehingga molekul tersebut menjadi stabil (Hasim *et al.*, 2016; Solikhah *et al.*, 2019; Malik *et al.*, 2020)

Flavonoid yang terkandung pada daun singkong dapat berperan sebagai antiinflamasi dengan cara memblokir siklus siklooksigenase (COX) dan lipoksigenase, sehingga terbatasnya migrasi sel radang dan tanda-tanda klinis peradangan berkurang (Meilawaty 2013; Anggraini *et al.*, 2017). Siklus siklooksigenase dan lipoksigenase berperan dalam proses pengubahan asam arakhidonat menjadi prostaglandin. Hambatan pada jalur siklooksigenase menyebabkan terjadinya penurunan produksi prostaglandin sehingga akan mengurangi permeabilitas vaskuler, vasodilatasi pembuluh darah, dan aliran darah lokal sehingga terjadinya penurunan jumlah sel radang neutrofil dan mediator inflamasi seperti IL-1, IL-6, IL-8, dan TNF-

$\alpha$  pada jaringan yang mengalami inflamasi. Flavonoid yang memberikan efek antiinflamasi juga berpengaruh terhadap proliferasi sel fibroblas dan menghambat sekresi enzim lisosom serta dapat menghambat degranulasi neutrofil yang menyebabkan terhambatnya radikal bebas. Efek antiinflamasi yang diberikan oleh flavonoid tersebut dapat menghambat proses inflamasi sehingga proses inflamasi yang terjadi dapat berlangsung lebih singkat (Ulviani *et al.*, 2016; Megawati *et al.*, 2020; Meilawaty *et al.*, 2020; Sa'diyah *et al.*, 2020).

Flavonoid yang terdapat pada daun singkong mempunyai kandungan quercetin dan merupakan polisakarida glikosaminoglikan yang bersifat osteokonduktif sehingga dapat menstimulasi pembentukan dan diferensiasi osteoblas serta dapat menurunkan aktivitas osteoklas dengan cara menghambat aktivitas IL-6 (Rikomah *et al.*, 2017; Megawati *et al.*, 2020; Sa'diyah *et al.*, 2020). Flavonoid juga dapat bertindak melindungi lipid membran terhadap agen yang merusak sehingga dapat menjaga membran sel agar tidak mudah dirusak oleh bakteri dan tetap menjalankan fungsinya dengan baik (Meilawaty, 2013).

#### 2.4.4.2 Saponin

Saponin adalah glikosida yang banyak ditemukan dalam tumbuhan dan mempunyai masa molekul besar. Saponin memiliki sifat larut dalam air dan mudah rusak oleh panas. Saponin memiliki efek positif dari segi kesehatan yaitu dapat berfungsi sebagai antioksidan, dapat menghambat karies gigi dan agregasi trombosit. Selain itu saponin merupakan senyawa yang mempunyai efek antiinflamasi, analgesik, antifungi, sitotoksik dan antimikroba (Pratiwi, 2016; Gunawan *et al.*, 2018; Andika *et al.*, 2020; Kurniasih *et al.*, 2022).

Saponin dalam daun singkong berfungsi sebagai antimikroba dan antiinflamasi. Ketika berinteraksi dengan sel bakteri, Saponin dapat berdifusi melalui membran kemudian mengikat sitoplasma sehingga mengganggu dan mengurangi kestabilan membran serta menyebabkan keluarnya sitoplasma dari sel. Hal tersebut pada akhirnya dapat

meningkatkan permeabilitas membran sel bakteri sehingga terjadi hemolisis sel bakteri dan mengakibatkan kematian bakteri. Saponin juga dikenal memiliki efek antiinflamasi yang hampir sama dengan flavonoid. Mekanismenya yaitu dengan menghambat kenaikan permeabilitas vascular dan dengan memblokir jalur prostaglandin sebagai penghambat aktifasinya, tetapi tidak memiliki pengaruh terhadap sintesisnya. Aktivitas pelepasan prostaglandin yang terhambat ini menyebabkan keluarnya sel radang yang dapat ditekan. Adanya saponin dalam ekstrak daun singkong diduga dapat mengurangi lamanya fase inflamasi dan mempercepat proses penyembuhan luka dengan meminimalisir kontaminasi bakteri sehingga mendukung regenerasi sel-sel epitel dan jaringan ikat (Meilawaty, 2013; Pratiwi, 2016; Ulviani *et al.*, 2016; Aggraini *et al.*, 2017; Megawati *et al.*, 2020; Sa'diyah *et al.*, 2020).

#### 2.4.4.3 Vitamin C

Vitamin adalah senyawa kompleks yang berfungsi untuk membantu pengaturan atau proses metabolisme tubuh. Salah satu vitamin yang diperlukan oleh tubuh adalah vitamin C. Vitamin C merupakan turunan heksosa yang larut dalam air, bersifat thermolabile dan mudah teroksidasi (Gunawan *et al.*, 2018; Kurniasih *et al.*, 2022).

Daun singkong mengandung vitamin C sebesar 27,5% atau sekitar 275 mg setiap 100 gr daun singkong. Vitamin C merupakan nutrisi yang berguna untuk mencegah dan mengobati sariawan atau kelainan mulut lainnya. Selain itu, vitamin C dapat berfungsi meningkatkan sistem imun, memiliki peran dalam pembentukan kolagen, sebagai pencegah kanker, antioksidan, serta dapat berfungsi sebagai antiinflamasi, (Anggraini *et al.*, 2017; Malik *et al.*, 2020). Vitamin C juga berperan dalam proses pembentukan tulang baru atau osteogenesis dengan menginduksi *mesechymal stem cell* untuk mempercepat pertumbuhan dan diferensiasi osteoblas (Sa'diyah *et al.*, 2020; Kurniasih *et al.*, 2022).

#### 2.4.4.4 Tannin

Tannin merupakan golongan senyawa polifenol yang dapat membentuk senyawa kompleks dengan protein. Tannin banyak dijumpai pada tanaman dengan berat molekul lebih dari 1000 g/mol. Tannin mempunyai peranan biologis yang besar karena fungsinya sebagai pengendap protein. Tannin telah dilaporkan dapat berperan sebagai antioksidan dan antibakteri. Tannin bersifat sebagai antibakteri karena dapat menghambat enzim *reverse* transkriptase dan DNA topoisomerase sehingga membrane sel bakteri rusak dan sel bakteri tidak dapat terbentuk (Noer *et al.*, 2018; Meilawaty *et al.*, 2020; Sa'diyah *et al.*, 2020).

Tannin diketahui mempunyai aktifitas antioksidan yang berperan dalam menangkap radikal bebas sehingga dapat menyebabkan kerusakan membran sel. Hal tersebut diketahui dapat mengaktifkan histamin yang nantinya akan menjadi mediator sel radang (Meilawaty, 2013). Antioksidan di dalam tannin dapat berperan sebagai antiinflamasi. Antioksidan berperan sebagai antiinflamasi dengan dua cara yaitu cara pertama dengan menghambat produksi oksidan oleh monosit, neutrofil, dan makrofag yang akan mengurangi pembentukan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sehingga mengakibatkan terhambatnya produksi asam hipoklorid (HOCl) dan OH. Cara kedua, yaitu dengan menghambat secara langsung oksidan reaktif seperti radikal hidroksi (OH) dan asam hipoklorid (Ulviani *et al.*, 2016; Wenas *et al.*, 2020).

#### 2.4.4.5 Triterpenoid

Triterpenoid merupakan salah satu zat yang sering ditemukan pada banyak tanaman obat dan diketahui memiliki aktivitas antibakteri, antivirus, serta dapat mengobati kerusakan pada kulit (Meilawaty, 2013). Triterpenoid sebagai antibakteri karena dapat bereaksi dengan porin (protein trans membran) pada membran luar dinding sel bakteri kemudian membentuk ikatan polimer yang kuat sehingga menyebabkan rusaknya porin pada bakteri (Rini *et al.*, 2017). Triterpenoid berfungsi meningkatkan aktifitas makrofag, meningkatkan fagositosis dan memiliki peran dalam aktivitas

antiinflamasi. Senyawa triterpenoid memiliki kemampuan menghambat aktivitas enzim siklooksigenase dalam mengkonversikan asam arakidonat menjadi prostaglandin sebagai mediator proinflamasi (Munir *et al.*, 2016; Wenas *et al.*, 2020). Triterpenoid juga diduga dapat mengurangi adanya radikal bebas yang merusak membran sel dan mengurangi pelepasan mediator sel radang (Meilawaty, 2013).

## 2.5 Hubungan periodontitis terhadap jumlah osteoblas

Periodontitis dapat disebabkan oleh adanya pengaruh dari bakteri dan produknya yang akan menginduksi sintesis dan sekresi dari sitokin proinflamasi. Komponen struktur bakteri dapat merangsang terjadinya perkembangan reaksi kekebalan pada host yang melindungi host terhadap infeksi menjadi peristiwa kerusakan jaringan periodontal. Terdapat dua pengaruh dari bakteri yaitu pengaruh secara langsung dan pengaruh secara tidak langsung. Pengaruh secara langsung merupakan pengaruh dari beberapa produksi enzim-enzim yang dihasilkan seperti protease, kolagenase, fibrinolisin, fosfolipase A yang dihasilkan oleh bakteri *P. gingivalis*, *Agregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), dan *Prevotella intermedia* yang dapat menyebabkan terjadinya degradasi lapisan superfisial pada jaringan periodontal (Prasetya, 2015; Carranza *et al.*, 2018).

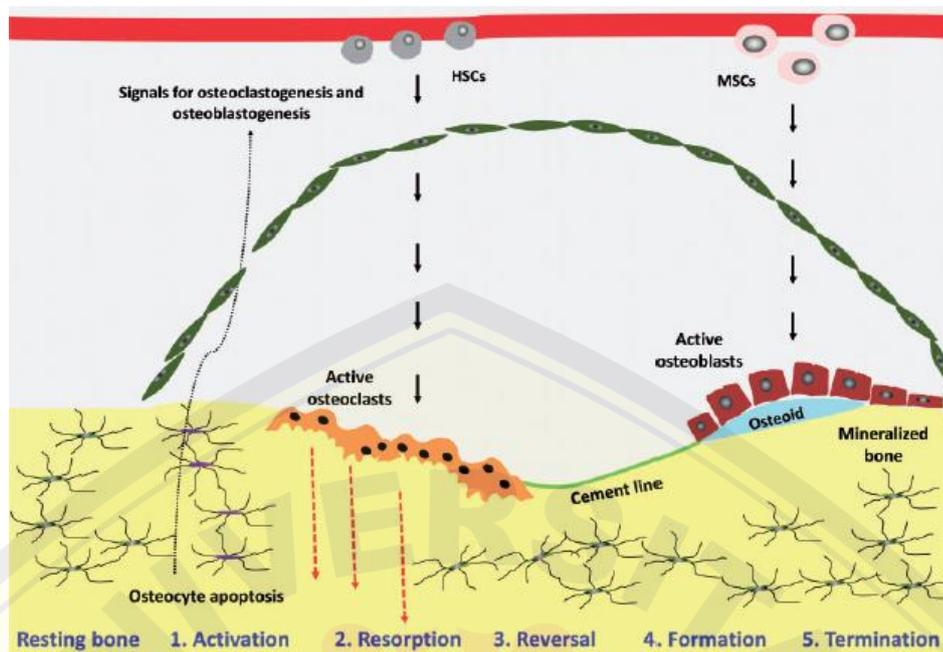
Pengaruh tidak langsung merupakan pengaruh berupa mekanisme pertahanan sel inang terhadap adanya jejas. Jejas ini berasal dari komponen bakteri gram negatif anaerob yaitu LPS dan faktor virulensi lainnya (Prasetya, 2015). Salah satu bakteri gram negatif anaerob penyebab periodontitis adalah *P. Gingivalis*. Dari beberapa faktor virulensi yang dimiliki oleh *P. gingivalis* yang paling berperan dalam menginduksi periodontitis fimbriae, gingipain, dan LPS. Faktor virulensi ini digunakan untuk menghindari respon imun inang dan untuk menginvasi jaringan periodonsium dengan cara merangsang pelepasan sitokin proinflamasi seperti interleukin 1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) dan prostaglandin E2 (PGE- 2), oksida nitrat, dan radikal bebas. Sitokin proinflamasi dapat memicu osteoklastogenesis sehingga terjadi peningkatan jumlah osteoklas dan penurunan jumlah osteoblas. Sitokin

proinflamasi tersebut akan bekerja dengan menginduksi sel osteoblas untuk meningkatkan ekspresi Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ -B-Ligand (RANKL) dan menurunkan produksi Osteoprotegerin (OPG). OPG merupakan protein dari osteoblas yang berfungsi untuk mengikat RANKL. Kondisi inflamasi yang terus berlanjut mengakibatkan produksi OPG menurun sehingga OPG yang terbentuk akan sedikit mengikat RANKL dan RANKL mudah berikatan dengan RANK pada prekursor osteoklas. Hal tersebut dapat menyebabkan terjadinya resorpsi tulang alveolar (Ayu, 2018; Jia *et al.*, 2019; Fatimatu Zahro *et al.*, 2020; Putri *et al.*, 2020; Wahyu *et al.*, 2021).

## 2.6 Proses remodeling tulang

Remodeling tulang adalah dua tahapan aktivitas seluler yang terjadi secara siklik, yaitu melibatkan resorpsi tulang yang lama oleh osteoklas diikuti dengan pembentukan tulang yang baru oleh osteoblas dengan kecepatan yang sama sehingga masa tulang tetap konstan. Remodeling ini ditujukan untuk memperbaiki kerusakan tulang dan mempertahankan homeostasis mineral dengan membebaskan simpanan kalsium dan fosfor. Proses *remodeling* melibatkan *osteoblas* dan *osteoklas* melalui mekanisme signal parakin dan autokrin pada pembangkitan dan aktivitas diferensiasi. Tahap remodeling dimulai dengan sel osteoklas melakukan resorpsi kemudian osteoblas akan menginvasi area tersebut dan memulai proses pembentukan dengan cara menyekresi osteoid (matriks kolagen dan protein lainnya) yang kemudian akan mengalami mineralisasi (Kenkre *et al.*, 2018; Sardi *et al.*, 2018; Carranza *et al.*, 2018; Edrizal *et al.*, 2019; Iraniza *et al.*, 2020).

Secara anatomis, siklus berlangsung dalam *Basic Multicellular Unit* (BMU), yang terdiri dari osteoklas, osteoblas dan suplai darah kapiler. BMU bertahan lebih lama dari umur osteoblas dan osteoklas di dalamnya dan karenanya membutuhkan pengisian terus-menerus dari sel-sel tersebut yang dikontrol oleh osteosit. Mekanisme seluler dan molekuler siklus remodeling terjadi dengan lima tahap yaitu *activation*, *resorption*, *reversal*, *formation* dan *termination* yang terjadi selama  $\pm 120$ -200 hari di tulang kortikal dan trabecular (Gambar 2.6) (Kenkre *et al.*, 2018).



**Gambar 2.6** siklus remodeling tulang (Kenkre *et al.*, 2018).

## 2.7 Metode ekstraksi

Ekstraksi adalah proses pemisahan komponen-komponen dari suatu tanaman dengan bantuan zat cair sebagai pelarut sehingga didapatkan senyawa aktif dengan kemurnian tinggi yang dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti jenis pelarut, perbandingan pelarut dengan bahan ekstraksi, waktu ekstraksi, tekanan, suhu, ukuran partikel dan komponen bioaktif tumbuhan (Suharto *et al.*, 2016; Hidayah *et al.*, 2018). Ada beberapa macam metode ekstraksi yang sering digunakan pada proses pemisahan senyawa bioaktif dari tumbuhan yaitu ekstraksi dengan cara dingin dan ekstraksi dengan cara panas. Ekstraksi cara dingin meliputi maserasi, dan perkolasi sedangkan ekstraksi cara panas yaitu soxhletasi dan refluks (Novitasari *et al.*, 2018; Safitri *et al.*, 2018; Wiraningtyas *et al.*, 2020; Ningsih *et al.*, 2020).

### 2.7.1 Maserasi

Maserasi merupakan cara ekstraksi sederhana dengan cara merendam bahan dalam pelarut yang sesuai dengan senyawa aktif yang akan diambil selama beberapa hari pada temperatur kamar dan terlindung dari cahaya untuk menarik komponen yang diinginkan dengan kondisi

dingin atau tanpa pemanasan sehingga dapat meminimalkan kerusakan senyawa yang bersifat thermolabil (Ruslan, 2019; Islamiah *et al.*, 2021).

Metode maserasi dipilih karena perlakuan yang lebih sederhana yaitu tidak membutuhkan peralatan yang mahal, dan dapat mengekstraksi senyawa aktif dalam simplisia dengan baik melalui perendaman tanpa pemanasan sehingga dapat menghindari kerusakan komponen senyawa yang labil dan tidak tahan panas (Chairunnisa *et al.*, 2019; Ningsih *et al.*, 2020).

Pada proses perendaman bahan terjadi pemecahan dinding sel dan membran sel yang disebabkan oleh perbedaan tekanan antara luar sel dengan bagian dalam sel sehingga metabolit sekunder di dalam sitoplasma akan pecah dan pelarut akan menembus dinding sel lalu masuk ke dalam sel yang mengandung zat aktif sehingga zat aktif tersebut akan larut dalam pelarut (Chairunnisa *et al.*, 2019).

#### 2.7.2 Perkolasi

Perkolasi merupakan metode ekstraksi dengan mengalirkan pelarut secara terus menerus pada sampel sehingga pelarut akan membawa senyawa organik bersama dengan pelarut yang memungkinkan pelarut tersebut dapat berkontak dengan luas permukaan sampel secara optimal sehingga perkolasi ini lebih efektif untuk senyawa organik yang mudah larut dalam pelarut yang digunakan (Hasrianti *et al.*, 2016; Handayani *et al.*, 2019; Silviani *et al.*, 2020). Pada metode perkolasi terdapat penambahan suatu pelarut untuk mengekstrak senyawa di dalam sampel dan dilakukan pada suhu ruangan (Hasanah *et al.*, 2020).

#### 2.7.3 Soxhletasi

Soxhletasi merupakan metode ekstraksi yang memiliki beberapa persamaan dengan metode perkolasi, yaitu adanya penambahan suatu pelarut untuk mengekstrak senyawa di dalam sampel dan terdapat pengaliran suatu pelarut melalui sampel dalam prosesnya. Metode soxhletasi ini dilakukan pada suhu pemanasan untuk menguapkan pelarut

sehingga dapat dilakukan berulang kali pada ekstraksi sedangkan perkolasi dilakukan pada suhu ruangan (Hasanah *et al.*, 2020).

#### 2.7.4 Reflux

Refluks merupakan metode ekstraksi dengan cara panas yang pelarutnya berada pada temperatur titik didihnya selama waktu tertentu menggunakan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Salah satu pelarut polar yang efektif pada metode ini dan umum digunakan yaitu pelarut air yang merupakan pelarut penting karena dapat melarutkan banyak zat kimia (Hasrianti *et al.*, 2016; Febriani *et al.*, 2020).

### 2.8 Metronidazole

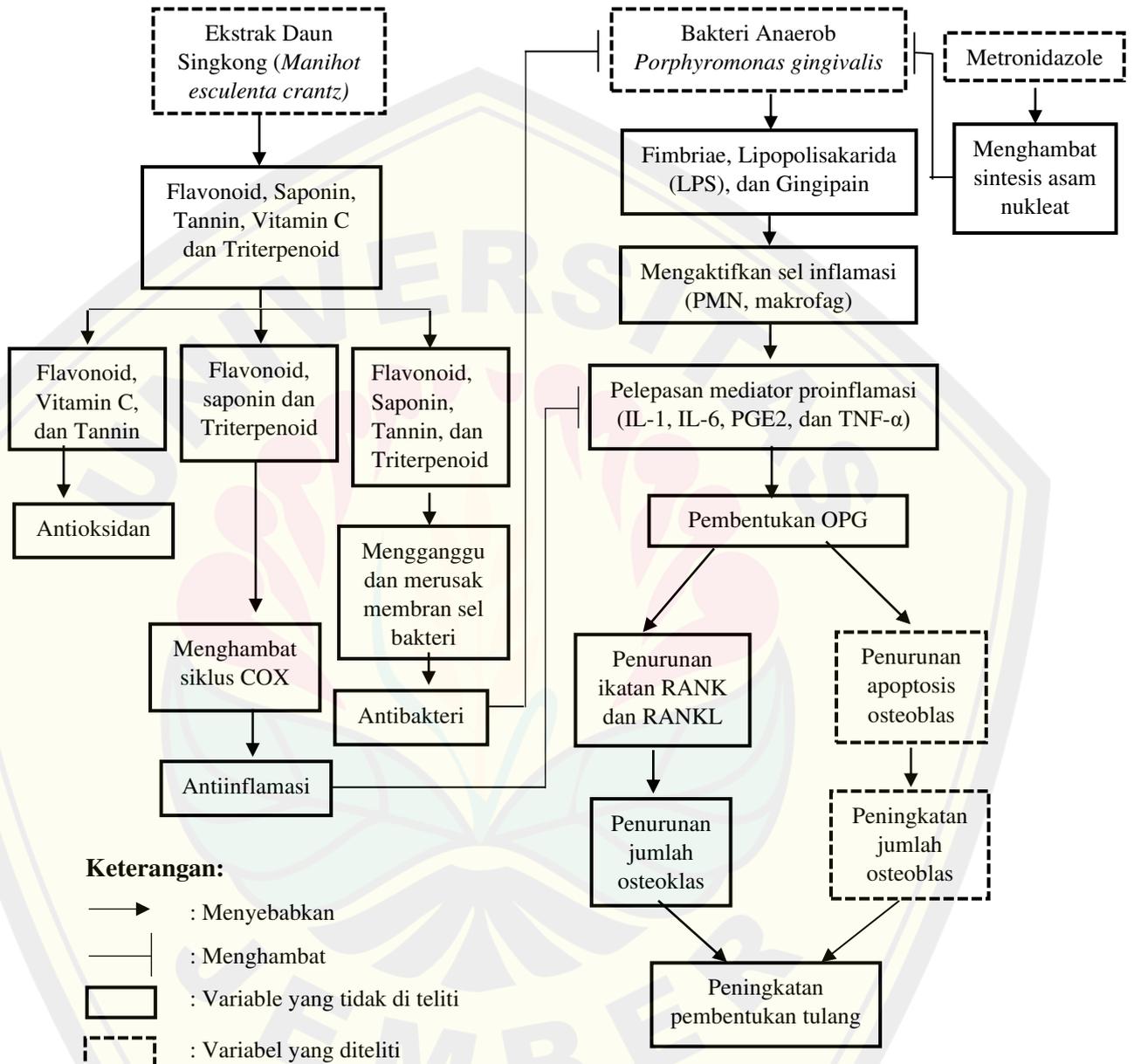
Metronidazole merupakan antibiotik yang memiliki aktivitas terhadap bakteri gram negatif dan gram positif anaerob pembentuk spora namun memiliki indeks terapi yang sempit (Tedjasulaksana, 2016; Herdianti *et al.*, 2020). Selain itu, metronidazole juga dikenal memiliki mekanisme kerja obat yang aktif dalam melawan parasit protozoa anaerob namun tidak efektif pada bakteri aerob karena tidak memiliki komponen transpor elektron (Agistia *et al.*, 2017; Pratiwi, 2017). Dengan demikian metronidazole merupakan salah satu pilihan utama untuk membunuh bakteri anaerob (Arianto *et al.*, 2019).

Metronidazole merupakan antibiotik bakteriosid dengan mekanisme kerja menghambat sintesis asam nukleat bakteri yang dapat digunakan untuk mengobati periodontitis Kronis, pericoronitis dan NUG (necrotizing ulcerative gingivitis). Selain itu, Metronidazole juga merupakan salah satu antibiotik yang umum digunakan untuk perawatan penyakit periodontal serta aman digunakan pada ibu hamil (Tedjasulaksana, 2016; Paliling *et al.*, 2016; Tani *et al.*, 2017; Wijaksana, 2019).

Metronidazole yang digunakan dalam jangka panjang dapat memberikan efek samping ringan hingga sedang seperti mulut kering, sakit kepala, timbul rasa mual, mulut berasa logam, nyeri perut, diare, stomatitis dan neutropenia (Tedjasulaksana, 2016; Heta *et al.*, 2018; Ceruelos *et al.*, 2019). Selain itu pada beberapa kasus, penggunaan jangka panjang metronidazole dapat menyebabkan

efek karsinogenik pada tikus, efek mutagen pada bakteri dan defek wajah pada manusia (Wijaksana, 2019).

2.9 Kerangka konsep



Gambar 2.7 Kerangka konsep

2.10 Penjelasan kerangka konsep

*P. gingivalis* memiliki faktor virulensi berupa LPS dan gingipain. LPS dan Gingipain akan menginduksi tubuh untuk melakukan pengaktifan sel-sel imun

seperti makrofag dan PMN untuk melakukan pelepasan mediator proinflamasi seperti IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  dan PGE-2 yang dapat menyebabkan terjadinya resorpsi tulang alveolar. PGE-2 akan bekerja dengan menginduksi sel osteoblas untuk meningkatkan ekspresi RANKL dan menurunkan produksi OPG. IL-1 dan TNF- $\alpha$  berperan dalam peningkatan apoptosis osteoblas. Penurunan OPG yang berperan mengikat RANKL untuk membentuk sel osteoblas dan mengakibatkan RANKL berikatan dengan RANKL yang menyebabkan pembentukan sel osteoklas. Keadaan tersebut mengakibatkan adanya penurunan pembentukan osteoblas dan peningkatan osteoklas yang menyebabkan terjadinya kerusakan tulang atau resorpsi tulang alveolar.

Ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta crantz*) mengandung senyawa aktif berupa flavonoid, saponin, tannin, triterpenoid dan vitamin C yang memiliki banyak manfaat. Kandungan flavonoid, tannin dan vitamin C dalam ekstrak daun singkong dapat berperan sebagai antioksidan yang membantu meningkatkan sistem imun dan menangkal radikal bebas. Kandungan Flavonoid, saponin, tannin dan triterpenoid dalam ekstrak daun singkong juga dapat memberikan efek antibakteri dengan mengganggu dan merusak membran sel bakteri sehingga dapat menghambat pertumbuhan dari bakteri *P. gingivalis*. Selain itu, Kandungan flavonoid, saponin dan triterpenoid dalam ekstrak daun singkong ini dapat memberikan efek antiinflamasi sehingga dapat menghambat pelepasan mediator proinflamasi seperti IL-1, IL-6, PGE2, dan TNF- $\alpha$ . Keadaan tersebut menyebabkan terjadinya penurunan ekspresi RANKL, penurunan jumlah osteoklas, peningkatan OPG dan peningkatan pertumbuhan serta differensiasi sel osteoblas sehingga terjadi peningkatan pembentukan tulang alveolar (remodeling tulang alveolar).

### **2.11 Hipotesis**

Ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta crantz*) efektif meningkatkan jumlah osteoblas tulang alveolar tikus periodontitis yang diinduksi *P. gingivalis*.

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis penelitian dan Rancangan penelitian**

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimental laboratoris. Penelitian eksperimental laboratoris adalah penelitian yang dilakukan untuk mencari pengaruh dari suatu perlakuan terhadap objek-objek yang ingin diteliti dalam kondisi yang dapat dikendalikan. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *the post test only control group design* dengan melakukan pengukuran melalui pengamatan atau observasi dan pencatatan secara sistematis pada kelompok kontrol positif, kelompok kontrol negatif, dan kelompok perlakuan (Payadnya et al., 2018; Fatimatuzzahro *et al.*, 2020).

#### **3.2 Tempat penelitian**

1. Identifikasi tanaman daun singkong di Laboratorium Tanaman Politeknik Negeri Jember.
2. Pembuatan ekstrak daun singkong di Laboratorium *Bioscience* Rumah Sakit Gigi dan Mulut Universitas Jember
3. Perlakuan pada hewan coba di Laboratorium Fisiologi, Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
4. Isolasi dan preparasi bakteri *P. gingivalis* di Laboratorium Mikrobiologi, Bagian Biomedik Universitas Jember.
5. Pemrosesan dan pengamatan jaringan secara mikroskopis di Laboratorium Patologi Anatomi, Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

#### **3.3 Waktu penelitian**

Penelitian akan dilakukan pada Desember 2021 – februari 2022

#### **3.4 Variabel penelitian**

##### **3.4.1 Variabel bebas**

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

### 3.4.2 Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah jumlah osteoblas pada tulang alveolar tikus.

### 3.4.3 Variabel terkendali

Variable terkendali pada penelitian ini antara lain:

1. Kriteria sampel yaitu tikus meliputi jenis kelamin, berat badan, usia dan kondisi fisik tikus.
2. Bakteri *P. gingivalis* (ATCC 33277, Medimark, Perancis),
3. Induksi bakteri *P. gingivalis* pada tikus wistar jantan untuk membuat model tikus periodontitis
4. Makanan dan minuman tikus secara *ad libitum*
5. Tindakan dan perlakuan hewan

## 3.5 Definisi operasional

### 3.5.1 Ekstrak daun singkong

Ekstrak daun singkong merupakan sediaan yang diperoleh menggunakan metode maserasi berbentuk semisolid dengan prosedur dan peralatan yang sederhana serta tidak dipanaskan sehingga bahan alam tidak terurai (Paendong *et al.*, 2022). Daun singkong diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% selama 3 hari dan dilakukan pengadukan setiap 24 jam. Selanjutnya, larutan dipekatkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu 50°C dan putaran 90 rpm sehingga menjadi ekstrak daun singkong (Sari *et al.*, 2021).

### 3.5.2 Model tikus periodontitis

Model tikus periodontitis merupakan model tikus yang diinduksi oleh bakteri *P. gingivalis* pada sulkus gingiva bagian bukal dan lingual gigi molar pertama kiri bawah masing-masing sebanyak 0,05 ml dan diberikan selama 14 hari setiap 3 hari sekali hingga mengalami periodontitis. Tikus yang mengalami periodontitis ditandai dengan adanya tanda klinis yaitu pembengkakan dan kemerahan pada gingiva. (Fadli *et al.*, 2016; Kurniawati *et al.*, 2020; Shita *et al.*, 2021).

### 3.5.3 Osteoblas

Osteoblas adalah sel mononuklear yang membentuk tulang baru dan menempel pada permukaan tulang yang memiliki bentuk pipih atau kubus dengan inti sel satu berwarna biru atau ungu gelap dan memiliki sitoplasma yang tampak basofilik (Koraag *et al.*, 2015; Sardi *et al.*, 2018). Pengecatan jaringan dilakukan menggunakan pewarnaan HE (*Hematoxylin Eosin*). Jumlah osteoblas dari preparat jaringan periodontal tikus diamati di bawah mikroskop binokuler menggunakan perbesaran 400x.

## 3.6 Sampel penelitian

### 3.6.1 Kriteria Daun Singkong

Daun singkong yang digunakan pada penelitian ini diambil dari ladang petani di Daerah Kreongan, Kecamatan Patrang, Kabupaten Jember. Daun singkong yang dipetik adalah daun yang masih hijau dan dipetik pada tangkai ke-5 dari pucuk untuk menghindari adanya kandungan sianida yang berlebihan pada daun yang masih terlalu muda (Meilawaty *et al.*, 2016). Pengambilan Daun singkong dilakukan pada pagi hari agar daun singkong masih dalam keadaan segar dan memiliki kandungan sianida yang paling sedikit (Kurnia *et al.*, 2013; Rikomah *et al.*, 2017).

### 3.6.2 Kriteria sampel penelitian

#### 3.6.2.1 Kriteria inklusi

Sampel yang akan digunakan pada penelitian ini adalah tikus wistar (*Rattus norvegicus*) dengan kriteria dan ketentuan sebagai berikut (Notoadmodjo, 2018):

- a. Tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*)
- b. Usia sekitar 2- 3 bulan dengan berat badan  $\pm$  200 gram
- c. Kondisi fisik tikus wistar tampak warna bulu putih bersih, dan mata tikus normal (dalam keadaan sehat)

#### 3.6.2.2 Kriteria Sampel Eksklusi

Ciri-ciri anggota populasi yang tidak dapat diambil sampel (Notoadmodjo, 2018).

- a. Memiliki kelainan anatomis.
- b. Tikus yang sakit sebelum perlakuan dan tikus yang mati.

### 3.6.3 Jumlah sampel penelitian

Jumlah sampel yang akan digunakan dalam penelitian ini diambil berdasarkan rumus Daniel (1991):

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

Keterangan:

n = besar sampel minimal

$\sigma$  = standart deviasi sample

d = kesalahan yang dapat ditoleransi diasumsikan  $d = \sigma$

Z = konstanta pada tingkat kesalahan tertentu jika  $\alpha = 0.05$  maka  $Z = 1,96$

Berdasarkan rumus yang ditentukan diatas, maka jumlah penghitungan sampel minimal adalah sebagai berikut :

$$n = (1,96)^2$$

$$n = 3,84$$

$$n = 4 \text{ (dibulatkan)}$$

Sampel penelitian yang berjumlah 4 tersebut, ditambahkan dengan faktor koreksi dengan rumus sebagai berikut (Akbar *et al.*, 2008):

$$N = \frac{n}{1-f}$$

keterangan :

N = Besar sampel setelah dikoreksi

n = Jumlah sampel minimum

f = Perkiraan terjadinya drop out pada sampel sebesar 20% (0,20) maka didapatkan hasil :

$$N = \frac{4}{0,8}$$

$$N = 5$$

Berdasarkan hasil perhitungan diatas, didapatkan jumlah sampel per kelompok penelitian minimal sebanyak 4 ekor dengan *saving sampel* 1 ekor tikus. Jumlah keseluruhan sampel pada penelitian ini sebanyak 20 ekor tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*).

### 3.7 Alat dan bahan

#### 3.7.1 Alat penelitian

Alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian ini yaitu masker medis (Sensi, Indonesia), sarung tangan (Maxter, Malaysia), timbangan hewan coba (Ohaus, USA), dental rat chair, botol minum tikus, kandang tikus wistar, sonde oral (Schezher, Germany), *rotary evaporator* (Heidolph, Germany), toples, gelas ukur (Iwaki, Indonesia), wadah, spatula, corong, *syringe* 1 ml (Cosmo Med, Singapore), *needle 30 gauge* (Precision Glide, USA), wadah jaringan, papan bedah, gunting bedah (Onemed, Indonesia), Surgical blade No.11 (Onemed, Indonesia), *scapel* No. 3 (Onemed, Indonesia), *object glass*, *deck glass*, *slide warmer*, *embedding kaset*, *saining jar*, *histological basket*, *pinset*, *sentrifuge*, *kawat ose*, *decycator*, *inkubator*, *oven* (Binder, Germany), *pinset* (Schezher, Germany), *microtom* (Tissue-Tek, Japan), *kain lap*, *tisu*, *tabung Erlenmeyer* (Schott Duran, Germany), *blender* (Miyako BL-102, Indonesia), *mortar*, *pastel*, *waterbath* (Mommert, Germany), *Bunsen*, *kuas kecil*, *kompur listrik*, *mikroskop cahaya* (Olympus, Japan), *kulkas sharp*, *staining jar*, *base mould paraffin*, *embedding cassette*, *oven*, *balok kayu ukuran 2x2 cm*.

#### 3.7.2 Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) sebanyak 20 ekor, makanan standar berupa turbo, *cutton bud*, *aquades*, *air mineral*, *sekam*, *cotton roll*, *Povidone iodine*, *spirtus*, *ketamin*, *kapas*, *bakteri P. gingivalis* (ATCC 33277, Medimark, Perancis), *alkohol 70%*, *95%* dan *100%*, *xylol*, *CMC 0,5%*, *propilen glikol 10%*, *etanol 96%*, *Hematoxylin*, *larutan eosin 2%*, *Canada balsam*, *buffer formalin 10%*, *daun singkong*, *Metronidazole*, *minyak emersi*, *label*, *aluminium foil*, *kertas saring*, *parafin Paraplast plus*.

### 3.8 Prosedur penelitian

#### 3.8.1 Ethical clearance

Pengajuan kelayakan etik penelitian (*ethical clearance*) memenuhi syarat kelayakan sampel penelitian menggunakan hewan coba di unit etika dan advokasi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gajah Mada dan telah disetujui dengan nomor 0024/KKEP/FKG-UGM/EC/2022.

#### 3.8.2 Identifikasi tanaman singkong

Identifikasi pada tanaman singkong dilakukan di Laboratorium Tanaman Politeknik Negeri Jember, untuk menentukan klasifikasi tanaman tersebut.

#### 3.8.3 Persiapan hewan coba

Persiapan hewan coba pada Penelitian ini yaitu dengan cara memberikan masa adaptasi/aklimatisasi dengan tempat dan makanan selama 7 hari sebelum diberi perlakuan. Masa aklimatisasi dilakukan agar hewan coba bebas dari ketakutan dan stress jangka panjang, dengan menciptakan lingkungan yang dapat mencegah stress (Ridwan, 2013).

#### 3.8.4 Pembuatan suspensi *P. gingivalis*

Pembuatan suspensi *P. gingivalis* diawali dengan membuat media cair sebanyak 10 ml, yaitu dari 0,37 gram BHI-B, 50 µl ekstrak yeast 1 µl vitamin K, dan 5 µl hemin. Kemudian media cair diberi satu ose *P. gingivalis* yang berasal dari pembiakan di media agar BHI-A. Setelah itu, suspensi *P. gingivalis* yang didapat dimasukkan ke *desiccator* dan diinkubasi selama 2x24 jam. Setelah itu, suspensi *P. gingivalis* diukur konsentrasinya sehingga didapatkan  $12 \times 10^9$  CFU/ml (Pujiastuti *et al.*, 2015; Meilawaty *et al.*, 2020).

#### 3.8.5 Pembuatan model tikus periodontitis

Model tikus periodontitis merupakan tikus wistar jantan yang diinduksi dengan bakteri *P. gingivalis* pada sulkus gingiva bagian distobukal dan distolingual gigi molar kiri rahang bawah sebanyak 0,05 ml setiap 3 hari sekali selama 14 hari menggunakan *tuberculine syringe* dan jarum dengan ukuran 30 gauge. Waktu yang diperlukan untuk membuat

tikus menjadi model tikus periodontitis adalah selama 14 hari. Tikus dikatakan mengalami periodontitis ditandai dengan terbentuknya poket periodontal, terdapat resorpsi tulang alveolar dan adanya inflamasi seperti pembengkakan dan kemerahan gingiva (Fadlil *et al.*, 2016; Kurniawati *et al.*, 2020; Sari *et al.*, 2021)

#### 3.8.6 Pembuatan ekstrak daun singkong

Pembuatan ekstrak daun singkong dilakukan menggunakan teknik maserasi. Pembuatan ekstrak daun singkong diawali dengan mencuci daun singkong. Kemudian dilanjutkan dengan proses pengeringan daun singkong, tahap pengeringan ini dilakukan dengan cara meletakkan daun singkong pada tempat dengan suhu ruang yang tidak terkena cahaya matahari secara langsung selama  $\pm 2$  hari sampai daun singkong mengering (Shita *et al.*, 2021). Jika daun singkong belum cukup kering, dilakukan pengeringan menggunakan oven pada suhu 40°C selama 24 jam penuh. Setelah itu dilakukan penimbangan daun singkong yang sudah kering kemudian daun singkong tersebut dihaluskan dan diayak menggunakan ayakan 80 maze sehingga menjadi serbuk-serbuk halus, serbuk tersebut dimaserasi dengan etanol 96% dengan rasio simplisia : pelarut sebesar 1: 6 selama 3 hari dan diaduk setiap 24 jam. Selanjutnya, larutan dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C dan putaran 90 rpm sampai menjadi sebuah ekstrak daun singkong (Widyaningsih *et al.*, 2017; Sari *et al.*, 2021).

#### 3.8.7 Pembagian kelompok hewan coba

Hewan coba yang telah sesuai dengan kriteria penelitian akan dibagi menjadi 2 kelompok yaitu:

- a) Kelompok kontrol (K1). Yaitu tikus yang tidak diberi perlakuan sama sekali.
- b) Kelompok perlakuan (P) merupakan kelompok tikus yang diinduksi bakteri *P. gingivalis*, terdiri dari 15 ekor tikus, kemudian dibagi menjadi 3 subkelompok:

- 1) Kelompok P1 (5 ekor tikus): tikus diberi aquades sebanyak 2 ml sebagai kontrol negatif dan dieuthanasia pada hari ke-8.
- 2) Kelompok P2 (5 ekor tikus): tikus diberi metronidazole dengan dosis 2,25 mg/kg BB secara per oral dan dieuthanasia pada hari ke-8.
- 3) Kelompok P3 (5 ekor tikus): tikus diberi ekstrak daun singkong dengan dosis 179,2 mg/kg BB secara per oral dan dieuthanasia pada hari ke-8.

### 3.8.8 Pemberian ekstrak daun singkong pada model tikus periodontitis

Ekstrak daun singkong diberikan pada model tikus periodontitis dengan cara per oral setelah tikus dinyatakan mengalami periodontitis. Pemberian dilakukan selama 7 hari sebanyak 179,2 mg/kg BB dalam bentuk larutan sebanyak 2 ml setiap 2 kali sehari saat pagi jam 08.00 dan malam hari pada jam 20.00 dengan menggunakan sonde lambung. Ekstrak daun singkong yang 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 dapat dilihat 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

(Sumber: Wiyandani, 2016).

## 3.8.8.1 Penghitungan dosis ekstrak daun singkong

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

$$= 25,6 \text{ mg/kgBB} \times 7,0$$

$$= 179,2 \text{ mg/kgBB tikus}$$

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

$$179,2 \text{ mg} : \text{mgX} = 1000 \text{ gram} : 200 \text{ gram}$$

$$X = \frac{179,2 \times 200}{1000}$$

$$X = 35,84 \text{ mg}/200 \text{ gram BB tikus}$$

Dosis yang diperlukan untuk per 1 gram berat badan tikus wistar adalah sebagai berikut:

$$35,84 \text{ mgX} = 200 \text{ gram}/1 \text{ gram}$$

$$X = \frac{35,84 \times 1 \text{ gram}}{200}$$

$$X = 0,1792 \text{ mg}/\text{gram BB tikus}$$

Untuk volume pemberian ekstrak daun singkong adalah sebanyak 0,02 ml/gram BB tikus

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

$$2 \text{ ml} = 17,92 \text{ mg}$$

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

Pelarut yang digunakan untuk melarutkan ekstrak daun singkong adalah propilen glikol 10%, yaitu 10 gram propilen glikol dengan 100 ml aquades.

$$10 \text{ gram} = 100 \text{ ml}$$

$$1000 \text{ mg} = 100 \text{ ml}$$

$$10 \text{ mg} = 1 \text{ ml}$$

Jadi, pada setiap pembuatan ekstrak untuk 1 kali sondasi mengandung 8,96 mg ekstrak daun singkong, 1 ml aquadest, dan 10 mg propilen glikol.

### 3.8.9 Pemberian metronidazole pada model tikus periodontitis

Pemberian metronidazole pada model tikus periodontitis diberikan secara per oral sebanyak 2 kali sehari. Dosis penggunaan metronidazole pada manusia adalah 500 mg/kgBB, sehingga diperlukan konversi dosis metronidazole ke tikus wistar per 200 gram berat badan (Hariyatmi, 2004):  
Dosis metronidazole pada tikus = Dosis pada manusia x konstanta konversi (0,018)

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

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

$$= 0,045 \text{ mg}/\text{gr BB}$$

Sehingga volume pemberian maksimal pada lambung tikus wistar adalah sebanyak 0,02 ml/grBB

$$\begin{aligned} \text{Volume pemberian pada tikus} &= 0,045 \text{ mg}/\text{gr BB} = 0,02 \text{ ml}/\text{grBB} \\ &= 2,25 \text{ mg}/1\text{ml aquadest} \end{aligned}$$

Untuk melarutkan metronidazole diperlukan CMC 0,5%, pada CMC 0,5 % berarti terdapat sebanyak 0,5 gram dalam 100 ml air

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

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

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

### 3.8.10 Euthanasia hewan coba

Prosedur euthanasia yang dilakukan dengan cara kimia menggunakan ketamin pada dosis yang mematikan (*lethal*). Tahapan euthanasia meliputi (Ardana, 2015; Meilawaty *et al.*, 2020):

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

- b. Pengambilan tikus dari kandang dengan sedikit menarik bagian ekornya. Kemudian posisikan tikus dengan kepala lebih rendah daripada abdomen.
- c. Ketamin disuntikkan pada hewan coba dengan posisi 45 derajat dengan abdomen (posisi jarum agak menepi dari *linea alba* agar tidak mengenai organ dalam peritoneum tikus).
- d. Proses euthanasia ditunggu selama 2-5 menit. Setelah itu melakukan pemeriksaan denyut jantung dan pernapasan. Apabila tikus sudah tidak bernapas, maka pembedahan bisa dilakukan.
- e. Setelah itu dilakukan pengambilan rahang bawah tikus, kemudian sampel tersebut dimasukkan ke dalam buffer formalin selama 24 jam agar jaringan tidak mengalami kerusakan.

Euthanasia dilakukan pada masing-masing kelompok dengan 5 ekor tikus pada hari ke-29 yaitu hari ke-8 setelah pemberian ekstrak daun singkong, kemudian dilakukan pengambilan sampel jaringan dengan cara mengambil rahang bawah tikus untuk dilakukan proses pembuatan sediaan jaringan.

#### 3.8.11 Dekalsifikasi jaringan

Proses dekalsifikasi dilakukan menggunakan larutan asam formic untuk menghilangkan garam kalsium jaringan tulang dan gigi sehingga menjadi lebih lunak dan memudahkan dalam pemotongan. Tahapan dekalsifikasi dimulai dari membilas sampel yang telah direndam dalam buffer formalin 10 % selama 24 jam dengan air bersih yang mengalir secara perlahan-lahan. Setelah itu, sampel dimasukkan dan direndam kedalam larutan asam formic 10 % selama 14 hari. Vibrasi dilakukan setiap hari agar proses dekalsifikasi merata pada semua permukaan sampel. Sampel dibilas kembali dengan air mengalir untuk menghilangkan sisa-sisa bahan dekalsifikasi (Roshida, 2017; Meilawaty *et al.*, 2020).

#### 3.8.12 Pembuatan sediaan histologi

Tahap pembuatan sediaan histologi diawali dengan melakukan proses dehidrasi, *clearing* dan impregnasi. Setelah itu dilanjutkan pada

tahapan pembuatan blok (*embedding*), pemotongan jaringan menggunakan mikrotom dan Tahap pengecatan jaringan (Tim Patologi Anatomi FKG Unej, 2007; Nofikasari *et al.*, 2016; Fatimatuzzahro *et al.*, 2020):

1. Dehidrasi

Dehidrasi dilakukan dengan cara merendam jaringan ke dalam alkohol bertingkat dengan konsentrasi 70%, 80%, 90%, Absolut (100%) I, II, III selama  $\pm 60$  menit untuk menghilangkan air di dalam jaringan.

2. *Clearing*

*Clearing* dilakukan dengan cara merendam jaringan ke dalam larutan *xylol* I, II, dan III selama  $\pm 60$  menit.

3. Impregnasi

Impregnasi dilakukan dengan infiltrasi paraffin dalam oven. Proses infiltrasi paraffin dilakukan dengan suhu  $60^{\circ}\text{C}$  secara bertahap. Setelah itu, sediaan dimasukkan ke dalam paraffin murni I, II, III, masing-masing selama  $\pm 60$  menit.

4. Pembuatan blok (*embedding*)

Pada tahap ini dimulai dari persiapan alat cetak logam berbentuk balok bersiku diletakkan pada permukaan kaca. Kemudian alat cetak diolesi dengan gliserin untuk mempermudah proses pemisahan alat cetak dengan balok parafin saat telah *setting*. Setelah itu parafin cair dibagi dalam dua wadah, yaitu parafin yang digunakan untuk *embedding* dan parafin sebagai media agar terdapat penyesuaian temperatur pada jaringan yang akan ditanam. Parafin cair untuk *embedding* dituangkan ke dalam cetakan hingga penuh, lalu jaringan ditanamkan pada posisi yang sesuai. Apabila parafin sudah *setting*, cetakan dilepaskan dan blok parafin diberi label dan siap dilakukan pemotongan

5. Pemotongan jaringan menggunakan mikrotom

Pada tahap ini Balok parafin diletakkan pada mikrotom. Sebelum memotong jaringan, Pisau mikrotom harus dalam keadaan bersih. Setelah itu dilakukan pemasangan pisau mikrotom pada posisinya. Kemudian lakukan pengaturan ketebalan sayaratan dengan ketebalan sayatan antara 4-

6 mikron. Selanjutnya agar sayatan jaringan dapat mengembang dengan baik, sayatan jaringan seperti pita tipis dipindahkan menggunakan kuas ke atas permukaan air dalam *waterbath* dengan temperatur tetap berkisar 56°-60°C. Hasil sayatan tersebut dipilah terlebih dahulu dan dipindahkan di atas objek glass lalu diberi label nama sebagai penanda sesuai dengan label jaringan yang dipotong. Setelah itu, Sediaan jaringan dibiarkan kering dengan menggunakan hotplate pada suhu 30-35°C minimal selama 24 jam.

#### 6. Tahap pengecatan jaringan menggunakan pewarnaan HE

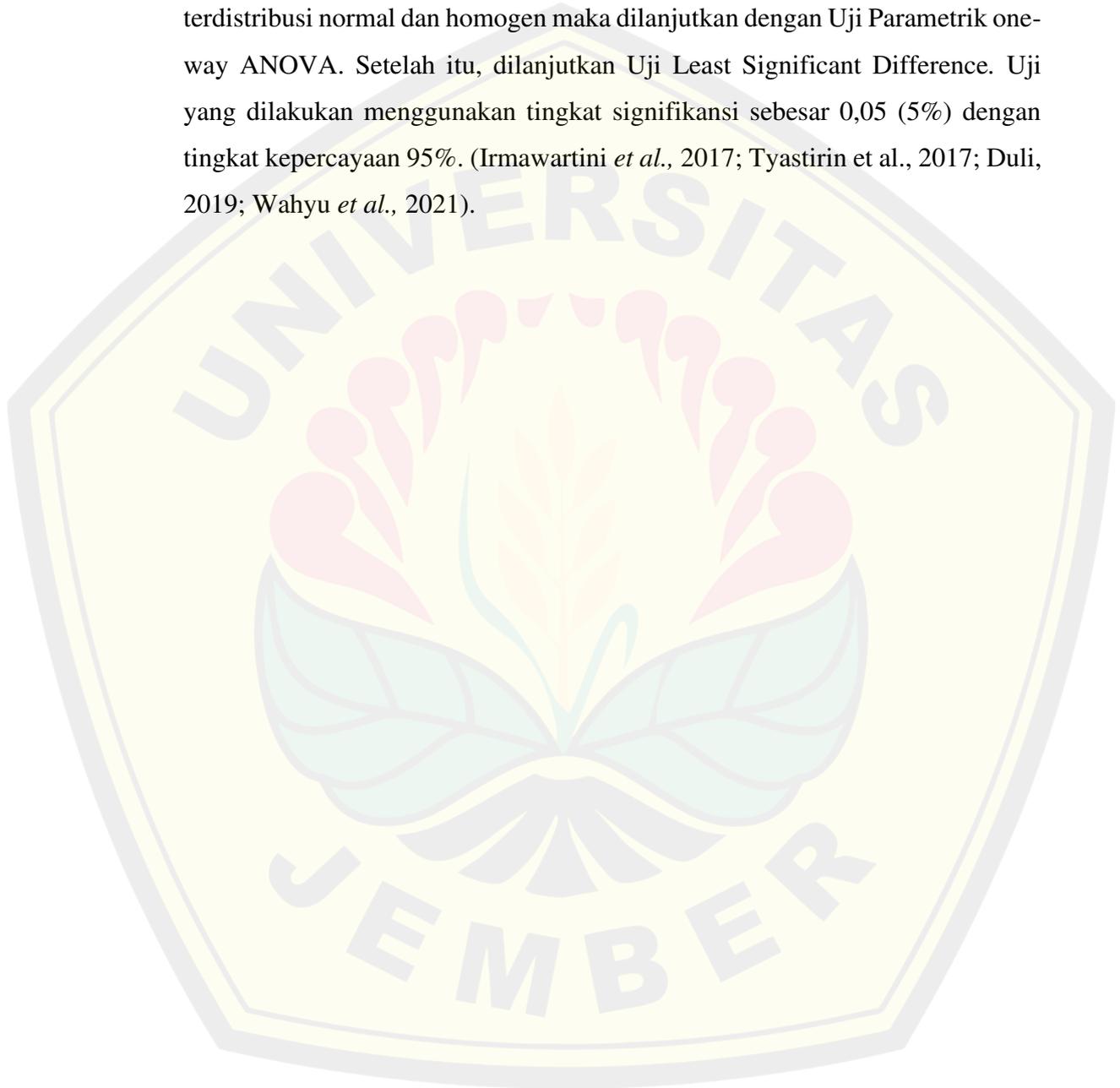
Tahap pengecatan jaringan menggunakan pewarnaan Haematoksilin-Eosin (HE) dimulai dari tahapan Deparafinisasi dengan larutan xylol yaitu dengan memasukkan preparat ke dalam xylol selama 3 menit lalu diulang kembali ke wadah yang berbeda selama 3 menit. Setelah itu dilakukan Redehidrasi menggunakan larutan alkohol 100% dan 95% masing-masing sebanyak 2 kali selama 3 menit dalam wadah berbeda. Kemudian Preparat tersebut dibilas dengan air mengalir selama 20 menit, untuk menghilangkan kelebihan alkohol. Setelah dibilas, Preparat diwarnai dengan pewarna Hematoxylin Mayer's selama 8 menit dan Dibilas ulang dengan air. Selanjutnya Preparat direndam eosin selama 1 menit dan dilakukan Dehidrasi kembali dengan konsentrasi meningkat 95% dan 100% masing-masing sebanyak 2 kali selama 3 menit dalam wadah berbeda. Kemudian, preparat dimasukkan ke dalam xylol sebanyak 3 kali masing-masing 3 menit dengan wadah berbeda setelah itu dilakukan mounting menggunakan cairan Entellan lalu ditutup dengan deck glass.

#### 3.8.13 Penghitungan Osteoblas

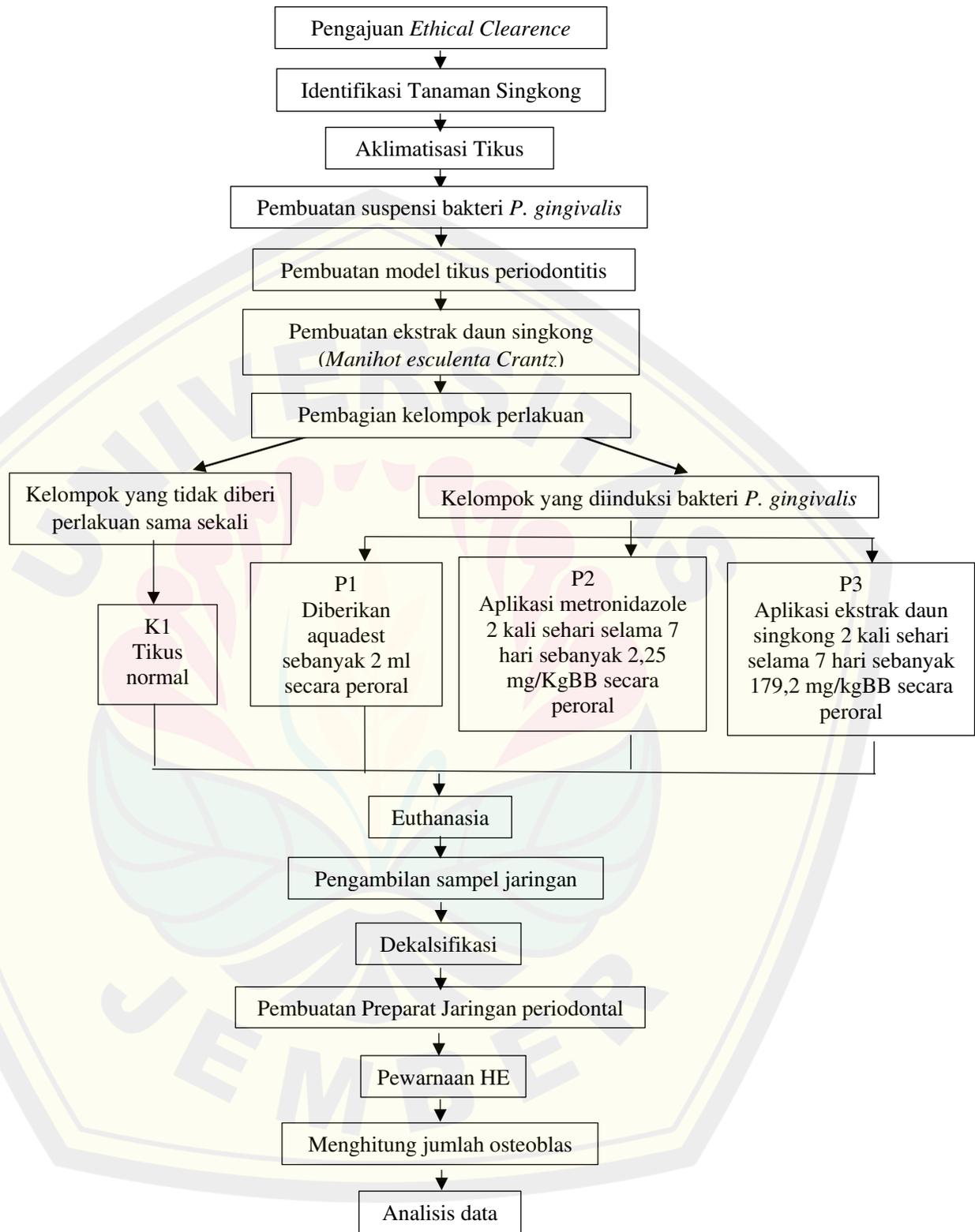
Pengamatan preparat jaringan periodontal tikus dilakukan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Tiap sampel akan diamati pada 3 lapang pandang yaitu sepertiga atas, sepertiga tengah dan sepertiga bawah dari tulang alveolar gigi molar bawah kiri sisi bukal dan sisi lingual. Penghitungan osteoblas dilakukan oleh 3 pengamat yang berbeda dengan menghitung jumlah seluruh sel pada setiap lapang pandang kemudian dijumlahkan dan dirata-rata (Wahyu *et al.*, 2021)

### 3.9 Analisis data

Analisis data dilakukan menggunakan *software SPSS 26 for windows*. Data yang diperoleh dilakukan uji normalitas menggunakan Uji Saphiro-wilk terlebih dahulu untuk mengetahui data terdistribusi normal, selanjutnya dilakukan uji homogenitas data menggunakan Levene Test. Hasilnya data terdistribusi normal dan homogen maka dilanjutkan dengan Uji Parametrik one-way ANOVA. Setelah itu, dilanjutkan Uji Least Significant Difference. Uji yang dilakukan menggunakan tingkat signifikansi sebesar 0,05 (5%) dengan tingkat kepercayaan 95%. (Irmawartini *et al.*, 2017; Tyastirin *et al.*, 2017; Duli, 2019; Wahyu *et al.*, 2021).



## 3.10 Alur penelitian



Gambar 3.1 Alur penelitian

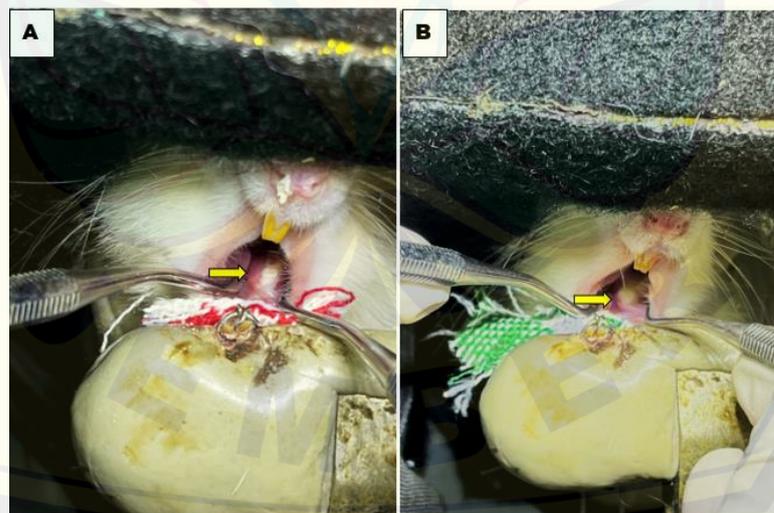
## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Hasil Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji efektivitas pemberian ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta crantz*) terhadap jumlah sel osteoblas tulang alveolar pada tikus periodontitis yang diinduksi *P. gingivalis*. Penelitian ini menggunakan 20 ekor tikus *Wistar* yang terbagi menjadi 2 kelompok, yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Kelompok kontrol (K1), yaitu tikus yang tidak diberi perlakuan sama sekali. Kelompok perlakuan (P) merupakan kelompok tikus yang diinduksi bakteri *P. gingivalis*, kemudian dibagi menjadi 3 subkelompok yaitu kelompok P1, P2 dan P3. Kelompok P1, yaitu tikus yang diberi aquades. Kelompok P2, yaitu tikus yang diberi metronidazole. Kelompok P3, yaitu tikus yang diberi ekstrak daun singkong. Masing-masing kelompok tikus dieuthanasia pada hari ke-8 setelah perlakuan.

Hasil pemeriksaan secara klinis pada kelompok tikus yang diinduksi *P. gingivalis* disajikan pada Gambar 4.1. Gambar tersebut menunjukkan adanya tanda periodontitis berupa pembengkakan (gambar A) dan kemerahan (gambar B) pada gingiva.



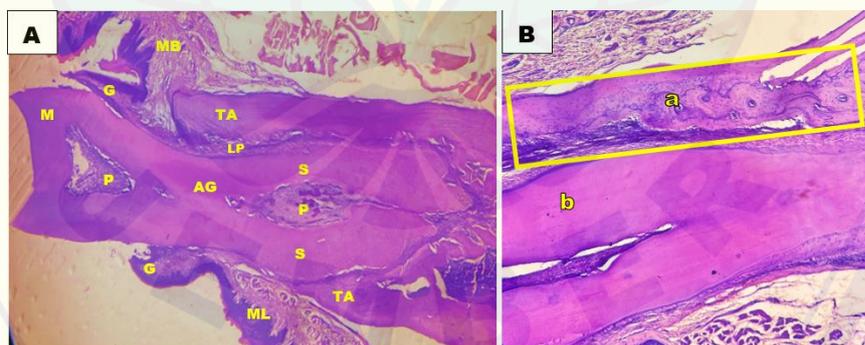
**Gambar 4.4** Gambaran Klinis tikus yang mengalami periodontitis. **A)** Tanda panah kuning menunjukkan gambaran klinis berupa pembengkakan gingiva pada tikus. **B)** Tanda panah kuning menunjukkan gambaran klinis berupa kemerahan pada tikus.

Hasil pemeriksaan radiografi pada kelompok tikus yang diinduksi *P. gingivalis* ditampilkan pada Gambar 4.2. Gambaran radiografi tersebut menunjukkan tanda periodontitis pada tikus berupa gambaran radiolusen pada puncak tulang alveolar yang berarti tikus mengalami resorpsi tulang alveolar akibat induksi bakteri *P. gingivalis*.



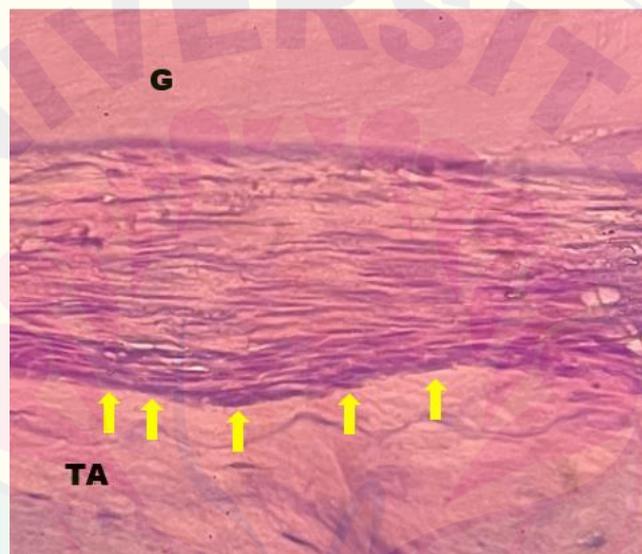
**Gambar 4.2** Gambaran radiografi jaringan periodontal pada Kelompok tikus diinduksi *P. gingivalis*. Tanda panah kuning menunjukkan gambaran radiolusen pada puncak tulang alveolar.

Hasil dari pemotongan dan pewarnaan jaringan gigi dan periodontal ditunjukkan pada gambar 4.3. gambar tersebut ialah gigi molar bawah kiri tikus dengan pemotongan bukolingual yang diwarnai dengan pewarnaan Haematoksilin-Eosin (HE) perbesaran 40x dan 100x. Gambar 4.3.A adalah Perbesaran 40x menunjukkan lapang pandang jaringan gigi dan periodontal tikus secara keseluruhan. Osteoblas kemudian dicari dengan perbesaran 100x yang dibagi menjadi dua, yaitu bukal dan lingual. Gambar 4.3.B menunjukkan bagian yang dilakukan penelitian yaitu bagian tulang alveolar pada tikus.



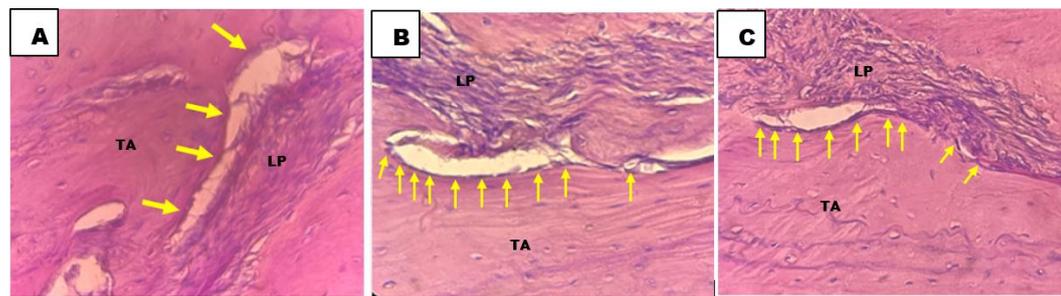
**Gambar 4.3** Gambaran histologi gigi dan jaringan periodontal dengan pewarnaan HE. A) Gambaran histologi gigi dan jaringan periodontal perbesaran 40x. M) Mahkota gigi, G) Gingiva, P) Pulpa, AG) Akar gigi, ML) Mukosa lingual, MB) Mukosa bukal, TA) Tulang alveolar, LP) Lingamen periodontal, S) Sementum. B) Gambaran histologi gigi dan jaringan periodontal dengan perbesaran 100x. a) Gambaran tulang alveolar (bagian yang diamati), b) Gigi.

Hasil pewarnaan Haematoksilin-Eosin (HE) untuk mengamati jumlah sel osteoblas dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x dengan 3 lapang pandang pada sisi bukal dan sisi lingual tulang alveolar gigi molar bawah kiri. Gambaran histologis osteoblas pada kelompok tikus yang tidak diberi perlakuan sama sekali (kontrol) dapat dilihat pada Gambar 4.4. Gambaran preparat pewarnaan HE pada Gambar 4.4 menunjukkan bahwa sel osteoblas ditandai sebaris sel dengan sel yang berbentuk pipih atau kubus dengan inti sel satu berwarna biru atau ungu gelap dan memiliki sitoplasma tampak basofilik yang menempel dengan tulang alveolar (Koraag *et al.*, 2015; Sardi *et al.*, 2018).



**Gambar 4.4** Gambaran histologis osteoblas pada kelompok kontrol (K1) dengan pewarnaan HE perbesaran 400x. TA) tulang alveolar, G) gigi. Tanda panah kuning menunjukkan sel osteoblas pada tulang alveolar tikus.

Gambaran histologi sel osteoblas pada kelompok tikus perlakuan yang diinduksi *P. gingivalis* dapat dilihat pada Gambar 4.5. Gambaran preparat tulang alveolar tikus dengan pewarnaan HE pada Gambar 4.5 menunjukkan bahwa pada kelompok tikus perlakuan yang diinduksi *P. gingivalis* mengalami resorpsi tulang alveolar. Pada gambar tersebut menunjukkan adanya sel osteoblas ditandai sebaris sel yang menempel dengan tulang alveolar berada pada bagian yang mengalami resorpsi, pada area ini mulai terjadi proses remodeling tulang tahap awal formation (Kenkre *et al.*, 2018; Sardi *et al.*, 2018).



**Gambar 4.5** Gambaran histologis osteoblas pada bagian yang mengalami resorpsi tulang alveolar kelompok tikus perlakuan dengan perwarnaan HE perbesaran 400x. **A)** kelompok perlakuan yang diinduksi bakteri *P. gingivalis* dan diberi aquadest (P1); **B)** kelompok perlakuan yang diinduksi *P. gingivalis* dan diberikan metronidazole (P2); **C)** kelompok perlakuan yang diinduksi *P. gingivalis* dan diberi ekstrak daun singkong (P3). **TA)** tulang alveolar, **LP)** ligament periodontal. Tanda panah kuning menunjukkan sel osteoblas

Hasil penghitungan jumlah osteoblas dari seluruh kelompok disajikan pada Tabel 4.1 dan Gambar 4.6. Gambar dan tabel tersebut menunjukkan bahwa urutan nilai tertinggi sampai urutan dengan nilai terendah yaitu kelompok perlakuan yang diberi Metronidazole, kelompok perlakuan yang diberi Ekstrak daun singkong, Kelompok kontrol, dan kelompok perlakuan yang diberikan aquadest.

**Tabel 4.1** Rata-rata jumlah sel osteoblas tulang alveolar tikus

Kelompok	N	X±SD
Kelompok kontrol (K1)	5	17,0±2,6
Kelompok Perlakuan (P1)	5	12,4±1,5
Kelompok Perlakuan (P2)	5	21,5±2,2
Kelompok Perlakuan (P3)	5	19,9±0,9

**Keterangan :**

N: Jumlah Sampel

X: Rata-rata hasil perhitungan Osteoblas

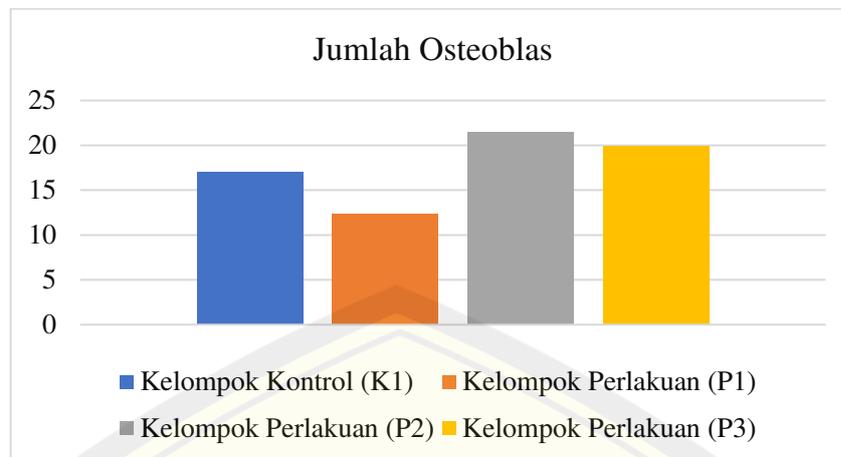
SD: Standar Deviasi

K1: Kelompok tikus yang tidak diberikan perlakuan sama sekali

P1: Kelompok tikus yang diinduksi *P. gingivalis* dan diberi aquadest

P2: Kelompok tikus yang diinduksi *P. gingivalis* dan diberi metronidazole

P3: Kelompok tikus yang diinduksi *P. gingivalis* dan diberi ekstrak daun singkong



**Gambar 4.6** Diagram jumlah sel osteoblas tulang alveolar tikus

#### 4.2 Analisis data

Data hasil penelitian dilakukan uji normalitas dengan uji *Shapiro-Wilk* dan homogenitas dengan uji *Levene*. Hasil uji *Shapiro-Wilk* menunjukkan semua data terdistribusi normal dengan nilai  $p > 0,05$  (lampiran 4). Selanjutnya, hasil uji *Levene* menunjukkan data homogen dengan nilai  $p > 0,05$  (lampiran 4). Oleh karena data berdistribusi normal dan homogen, sehingga dilanjutkan dengan uji parametrik *one way anova*. Hasil uji *one way anova* ditampilkan pada Tabel 4.2.

**Tabel 4.2** Hasil uji *one way anova* osteoblas pada tulang alveolar tikus

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
<b>Between Groups</b>	238.241	3	79.414	22.353	.000
<b>Within Groups</b>	56.844	16	3.553		
<b>Total</b>	295.086	19			

Hasil uji *one way anova* menunjukkan nilai  $p$  sebesar 0,00 yang berarti bahwa terdapat perbedaan bermakna pada seluruh kelompok ( $p < 0,05$ ). Kemudian dilanjutkan dengan uji statistik LSD. Hasil uji LSD ditampilkan pada Tabel 4.3.

**Tabel 4.3** Hasil uji LSD Sel osteoblast pada tulang alveolar tikus

Kelompok	K1	P1	P2	P3
K1	-	0,001*	0,002*	0,027*
P1		-	0,00*	0,00*
P2			-	0,198
P3				-

**Keterangan :**

(\*): Perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ )

K1: Kelompok tikus yang tidak diberikan perlakuan sama sekali

P1: Kelompok tikus yang diinduksi *P. gingivalis* dan diberi aquadest

P2: Kelompok tikus yang diinduksi *P. gingivalis* dan diberi metronidazole

P3: Kelompok tikus yang diinduksi *P. gingivalis* dan diberi ekstrak daun singkong

Berdasarkan uji *Post Hoc Least Significant Difference* (LSD) didapatkan perbedaan yang bermakna pada jumlah osteoblas dari beberapa kelompok, ditandai dengan nilai signifikansi  $p < 0,05$  kecuali pada kelompok P2 terhadap kelompok P3.

**4.3 Pembahasan**

Penelitian ini membahas mengenai efektivitas pemberian ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta crantz*) dalam meningkatkan jumlah sel osteoblas tulang alveolar pada tikus periodontitis yang diinduksi *P. gingivalis*. Dalam penelitian ini metode yang dipilih dalam menyebabkan inflamasi adalah dengan cara menginjeksikan *P. gingivalis* pada sulkus gingiva tikus wistar. Hal ini disebabkan karena *P. gingivalis* memiliki beberapa faktor virulensi yaitu fimbriae, gingipain dan lipopolisakarida (LPS) dan faktor virulensi lainnya yang dapat melakukan penetrasi pada jaringan gingiva dan menyebabkan kerusakan jaringan. Faktor virulensi ini merupakan suatu kelompok metabolit yang digunakan untuk menghindari respon imun inang dan untuk menginvasi jaringan periodontal dengan cara merangsang pelepasan sitokin proinflamasi seperti interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) dan eikosanoid yaitu prostaglandin (PGE2).

Prostaglandin dan sitokin proinflamasi yang diproduksi tersebut mengakibatkan destruksi jaringan periodontal dengan cara menstimulasi pembentukan dan peningkatan aktivitas osteoklas serta penurunan jumlah dan aktivitas osteoblas. Jumlah koloni bakteri dan kemampuan melawan pertahanan imun dari host, serta menghasilkan produk yang dapat memicu kerusakan jaringan merupakan faktor keberhasilan virulensi (Ayu, 2018; Jia *et al.*, 2019; Putri *et al.*, 2020; Wahyu *et al.*, 2021).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) dapat meningkatkan jumlah sel osteoblas tulang alveolar pada tikus periodontitis yang diinduksi *P. gingivalis*. Hasil jumlah perhitungan yang telah dilakukan diperoleh bahwa jumlah osteoblas pada kelompok yang diberikan metronidazole dan kelompok yang diberikan ekstrak daun singkong menunjukkan hasil jumlah osteoblas lebih banyak jika dibandingkan dengan kelompok diinduksi *P. gingivalis* yang diberi aquadest dan kelompok kontrol. Hal ini dibuktikan dengan hasil uji LSD yang menunjukkan perbedaan yang bermakna.

Hasil Uji LSD menunjukkan kelompok tikus yang diinduksi *P. gingivalis* diberi aquadest berbeda signifikan dengan kelompok kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa pada kelompok diinduksi *P. gingivalis* yang diberi aquadest tidak mampu meningkatkan jumlah sel osteoblas. Rata-rata jumlah osteoblas kelompok perlakuan diberi aquadest menunjukkan hasil berbeda bermakna dengan kelompok kontrol (normal). Penurunan jumlah osteoblas ini terlihat dengan membandingkan rata-rata kelompok perlakuan yang diberi aquadest sebanyak 12,4 dengan kelompok kontrol sebanyak 17,0. Hal tersebut menunjukkan bahwa penurunann jumlah osteoblas yang cukup besar. Hal ini dikarenakan PGE-2, IL-1 dan TNF- $\alpha$  yang terbentuk selama terjadinya inflamasi berperan dalam peningkatan apoptosis osteoblas dan prekusornya sehingga dapat menurunkan produksi osteoblas. PGE-2 akan menginduksi osteoblas memproduksi RANKL dan menurunkan produksi *osteoprotegerin* (OPG) yang mengakibatkan RANKL berikatan dengan RANK sehingga menyebabkan pembentukan osteoklas dan penurunan jumlah osteoblas (Chen *et al.*, 2018; Fatimatuzzahro *et al.*, 2020). Pemberian aquadest bersifat netral dan tidak memberikan efek apapun sebagai antibakteri ataupun antiinflamasi

sehingga Ketika diberikan perlakuan berupa induksi bakteri *P. gingivalis* sampai mengalami periodontitis, kelompok perlakuan yang diberi aquadest tersebut mengalami penurunan jumlah osteoblast karena tidak adanya efek terapi dalam mengobati periodontitis pada aquadest (Gerung *et al.*, 2021).

Pada kelompok perlakuan yang diberi metronidazole berbeda signifikan dengan kelompok kontrol dan dengan kelompok perlakuan yang diberi aquadest. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok diinduksi *P. gingivalis* yang diberikan Metronidazole dapat meningkatkan jumlah sel osteoblas dibandingkan kelompok diinduksi *P. gingivalis* yang diberi Aquadest. Peningkatan jumlah osteoblas ini terlihat dengan membandingkan rata-rata jumlah osteoblas pada kelompok perlakuan yang diberi aquadest sebanyak 12,4, kelompok kontrol sebanyak 17,0 dan dengan kelompok perlakuan yang diberi metronidazole sebanyak 21,5. Hal tersebut menunjukkan adanya peningkatan jumlah osteoblas yang cukup besar. Hal ini dikarenakan metronidazole memiliki sifat bakterisid yang efektif membunuh bakteri anaerob yang biasanya mendominasi pada penyakit periodontal seperti periodontitis dengan cara berdifusi ke dalam organisme, menghambat sintesis protein dan berinteraksi dengan DNA bakteri yang menyebabkan hilangnya struktur DNA heliks dan kerusakan untai DNA pada bakteri sehingga terjadi hambatan sintesis DNA yang menyebabkan kematian pada bakteri. Kematian bakteri ini membantu mencegah kolonisasi bakteri berlebih agar tidak terjadi infeksi yang lebih parah sehingga fase inflamasi terjadi dalam waktu lebih singkat (Atiqah *et al.*, 2021; Faizah *et al.*, 2021; Rismadianti *et al.*, 2022).

Hasil perhitungan rata-rata jumlah osteoblas kelompok perlakuan diberi ekstrak daun singkong menunjukkan hasil berbeda signifikan dengan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang diberi aquadest. Peningkatan jumlah osteoblas ini terlihat dengan membandingkan rata-rata jumlah osteoblas kelompok perlakuan yang diberi aquadest sebanyak 12,4, kelompok kontrol sebanyak 17,0 dan dengan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak daun singkong sebanyak 19,9. Hal tersebut menunjukkan pada kelompok perlakuan yang diberi ekstrak daun singkong juga terdapat peningkatan jumlah osteoblas yang cukup besar sehingga dapat dikatakan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak daun singkong mampu

meningkatkan jumlah osteoblas. Hal ini didukung dengan hasil uji LSD kelompok perlakuan yang diberi ekstrak daun singkong memiliki hasil tidak berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan yang diberi metronidazole. Sehingga dapat dikatakan bahwa ekstrak daun singkong memiliki efek yang hampir setara dengan metronidazole. Metronidazole merupakan obat antibakteri yang menjadi *drug of choice* dari penyakit periodontal dengan cara menghambat sintesis DNA asam nukleat bakteri penyebab periodontitis. Sedangkan, pada kelompok tikus yang diberi ekstrak daun singkong terdapat senyawa aktif yaitu flavonoid, triterpenoid, saponin, dan tanin. (Tedjasulaksana, 2016; Paliling *et al.*, 2016; Tani *et al.*, 2017; Wijaksana, 2019; Meilawaty *et al.*, 2020)

Kandungan daun singkong yang berperan sebagai antibakteri yaitu flavonoid, Saponin, tannin dan triterpenoid yang diduga mampu mengurangi jumlah bakteri periodontal pada sulkus gingiva sehingga inflamasi yang terjadi dapat berlangsung lebih singkat. Sementara itu, flavonoid, saponin dan triterpenoid juga dapat bertindak sebagai antiinflamasi yaitu dengan cara menghambat kerja asam arakidonat melalui enzim siklooksigenase (COX) sehingga dapat menghambat pelepasan mediator proinflamasi seperti IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  dan PGE2. PGE2 dapat menginduksi sel osteoblas untuk menghasilkan Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand (RANKL) dan menghambat produksi osteoprogenin (OPG). OPG berikatan dengan RANKL untuk memblokir ikatan antara RANKL dengan Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B (RANK). Aktivitas penghambatan PGE2 menyebabkan terjadinya penurunan ekspresi RANKL, penurunan jumlah osteoklas, peningkatan OPG dan peningkatan pertumbuhan serta differensiasi sel osteoblas sehingga terjadi peningkatan pembentukan tulang alveolar. Mekanisme tersebut yang mengakibatkan meningkatnya jumlah sel osteoblas (Soleha *et al.*, 2016; Fatimatuzzahro *et al.*, 2020; Wahyu *et al.*, 2021).

**BAB V****KESIMPULAN DAN SARAN****5.1 Kesimpulan**

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini yaitu ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta crantz*) efektif meningkatkan jumlah osteoblas pada tikus wistar yang diinduksi *Porphyromonas gingivalis*.

**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 meningkatkan jumlah osteoblas pada tulang alveolar model tikus periodontitis.
2. Perlu dilakukan penelitian tentang pemberian ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta Crantz*) dengan waktu yang lebih lama, sehingga dapat dilihat peningkatan osteoblas secara lebih optimal.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agistia, N., Muchtar, H., dan Nasif, H. 2017. Efektifitas Antibiotik pada Pasien Ulkus Kaki Diabetik. *Jurnal Sains Farmasi dan Klinis*. 4(1): 43-48.
- Ahmad, I. 2017. Pemanfaatan Limbah Cangkang Kerang Darah (Anadara Granosa) Sebagai Bahan Abrasif Dalam Pasta Gigi. *Jurnal Galung Tropika*. 6(1): 49-59.
- Akbar, A. K., dan Febriani, A. K. 2019. Uji kompresibilitas granul pati singkong dengan metode granulasi basah. *Jurnal Ilmiah JOPHUS: Journal Of Pharmacy UMUS*, 1(01), 7-11.
- Alfaridz, F., dan Riezki A. 2018. Review Jurnal: Klasifikasi Dan Aktivitas Farmakologi Dari Senyawa Aktif Flavonoid. *Jurnal Farmaka Suplemen*. 16(3): 1-9.
- Alibasyah, Z. M., Diana S., Dan Siti F. 2018. Daya Hambat Minuman Probiotik Yoghurt Susu Sapi Terhadap Porphyromonas Gingivalis Secara In Vitro. *J Syiah Kuala Dent Soc*. 3 (2): 65-75.
- Andika, B., Halimatussakdiah, H., dan Amna, U. 2020. Analisis Kualitatif Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak Daun Gulma Siam (*Chromolaena odorata L.*) di Kota Langsa, Aceh. *QUIMICA: Jurnal Kimia Sains dan Terapan*, 2(2), 1-6.
- Andriani, i., dan Alima, F. 2019. Periodontitis Kronis dan Penatalaksanaan Kasus dengan Kuretase. *Insisiva Dental Journal: Majalah Kedokteran Gigi Insisiva*. 8 (1): 25-30.
- Anggraini, D., Suhada, A., dan Rahmawati, S. 2017. Efektivitas Ekstrak Etanol Daun Singkong (*Manihot Esculenta*) Dalam Mengobati Luka Bakar Kulit Punggung Tikus (*Rattus Novergicus*) Jantan. *Jurnal Farmasetis*. 6(2): 39-46.
- Ardana, I.B.K. 2015. Etika Menggunakan Hewan Percobaan dalam Penelitian Kesehatan. Bali: Komisi Etik Penelitian Kesehatan FK Universitas Udayana
- Arianto, D. R., dan AC, R. 2019. Pola Kuman, Hasil Uji Sensitifitas Antibiotik dan Komplikasi Abses Leher dalam di RSUD DR. Soetomo. *J Ilm Kedokt Wijaya Kusuma*, 8(1), 88.
- Astuti, L. A., Masriadi, M., Arifin, F. A., Aslan, S., dan Hikmah, N. 2021. Perbedaan Densitas Tulang Alveolar Sebelum dan Sesudah Kuretase Menggunakan Software ImageJ Pada Periodontitis Kronis. *Sinnun Maxillofacial Journal*, 3(01), 1-12.

- Atiqah, A. N., Poetri, A. R., dan Niam, M. H. 2021. The Difference Of Effectivity Between Mangosteen Peel Extract And Metronidazole On Fibroblast Proliferation. *Odonto: Dental Journal*, 8(1), 80-85.
- Attallah, N. G., Negm, W. A., Elekhrawy, E., Altwaijry, N., Elmongy, E. I., El-Masry, T. A., dan Y Shoukheba, M. 2021. Antibacterial activity of *Boswellia sacra* Flueck. Oleoresin extract against *Porphyromonas gingivalis* periodontal pathogen. *Antibiotics*, 10(7), 859.
- Ayu, K. V. 2018. Efek Induksi LPS Terhadap Jumlah Osteoblas Pada Resorpsi Tulang Alveolar Tikus Putih Jantan (*Rattus Norvegicus*) Galur Sprague Dawley. *Interdental Jurnal Kedokteran Gigi*. 14(1): 13-17.
- Azaripour, A., Dittrich, S., Van Noorden, C. J., dan Willershausen, B. 2018. Efficacy of photodynamic therapy as adjunct treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Lasers in medical science*, 33(2), 407-423.
- Berlian, Z., Fitriatul A., dan Resti U. 2018. Uji Kadar Alkohol Pada Tapai Ketan Putih Dan Singkong Melalui Fermentasi Dengan Dosis Ragi Yang Berbeda. *Jurnal Biota*. 2(1): 106-111.
- Caniago, M., Dewi I., Dan Herman. 2014. Deskripsi Karakter Morfologi Ubi Kayu (*Manihot Esculenta* Crantz) Juray Dari Kabupaten Rokan Hulu. *JOM FMIPA*. 1(2): 613-619.
- Carranza, F.A., Newman F.G., and Takei, H.H. 2018. Carranza's Clinical Periodontology. Edisi 13. Philadelphia: *WB Saunders*.
- Ceruelos, A. Hernández., L.C. Romero-Quezada, J.C. Ruvalcaba Ledezma, And L. López Contreras. 2019. Therapeutic Uses Of Metronidazole And Its Side Effects: An Update. *European Review For Medical And Pharmacological Sciences*. 23: 397-401.
- Chen, X., Wang, Z., Duan, N., Zhu, G., Schwarz, E. M., and Xie, C. 2018. Osteoblast-osteoclast interactions. *Connective tissue research*, 59(2), 99-107.
- Dahlen, G., dan Preus, H.R., 2017. Low antibiotic resistance among anaerobic Gram-negative bacteria in periodontitis 5 years following metronidazole therapy. *Anaerobe*. 43: 94-98.
- Dirayati, A. G., dan Erlidawati. 2017. Pengaruh Jenis Singkong Dan Ragi Terhadap Kadar Etanol Tape Singkong. *Jurnal IPA dan Pembelajaran IPA (JIPI)*. 1(1): 26-33.
- Domini, F. B. A., Dewanti, I. D. A. R., & Wulandari, E. 2019. Analisis Jumlah Sel Monosit yang Mengekspresikan Tnf-A setelah dipapar *Porphyromonas*

Gingivalis dan Tulang Ikan Kuniran (*Upeneus Sulphureus*) dengan Teknik Imunositokimia. *Jurnal Kesehatan Gigi*. 6(2): 87-92.

Duli, N. 2019. *Metodologi Penelitian Kuantitatif: Beberapa konsep dasar untuk penulisan skripsi dan analisis data dengan SPSS*. Deepublish.

Dwipriastuti, D., Putranto, R. R., dan Anggarani, W. 2017. Perbedaan Efektivitas Chlorhexidine Glukonat 0, 2% dengan Teh Hijau (*Camellia Sinensis*) terhadap Jumlah *Porphyromonas* Gingivalis. *ODONTO: Dental Journal*, 4(1), 50-54.

Edrizal, E., Desnita, E., dan Suri, T. A. A. 2018. Uji Aktifitas Ekstrak Daun Sicerek (*Clausena Excavata* Burm. F) Terhadap *Candida Albicans*. *Ensiklopedia of Journal*. 1(1): 169-173.

Fadlil, P. N., T. Ermawati, dan H. Nuzulul. 2016. Pengaruh Pemberian Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea robusta*) Terhadap Ketebalan Epitel Gingiva Model Tikus Periodontitis yang Diinduksi *Porphyromonas gingivalis*. *Prosiding The 3<sup>rd</sup> Dentistry Scientific Meeting of Jember* : 102-110.

Faizah, A., dan Anindhita, M. 2021. Curettage Treatment In Cases Of Gingivitis Et Causa Plaque And Dental Calculus 41,42: Case Report. *Prosiding 14th Urecol: Seri Kesehatan*: 286-292.

Fatimatuzzahro, N., Ermawati, T., Prasetya, R. C., dan Destianingrum, P. Q. 2020. Efek pemberian gel ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap jumlah osteoblas dan osteoklas pada tulang alveolar tikus periodontitis. *Padjadjaran Journal of Dental Researchers and Students*, 4(2), 128-133.

Febriani, R., Wiraningtyas, A., Ruslan., dan Annafi, N. 2020. Perbandingan Metode Ekstraksi Zat Warna Dari Rumput Laut *Sargassum* sp. *Jurnal Redoks: Jurnal Pendidikan Kimia dan Ilmu Kimia*. 3(1): 13-17.

Fitriyana, N., Arina, Y. M. D., Harmono, H., dan Susilawati, I. 2013. Pemaparan bakteri *Porphyromonas gingivalis* mempengaruhi produksi superoksida netrofil. *Dentofasial*. 12 (3): 152, 153.

Gerung, W. H. P., Fatimawali, F., dan Antasionasti, I. (2021). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Belimbing Botol (*Averrhoa Bilimbi* L.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Propionibacterium Acne* Penyebab Jerawat. *Pharmakon*, 10(4), 1087-1093.

Gultom, R., dan Khairani. 2021. Evaluasi Kepatuhan Pasien Anak Penderita Diare Terhadap Penggunaan Antibiotik Di Rumah Sakit Umum (Rsu) Karya Bakti Ujung Bandar Rantauprapat. *Jurnal Ilmiah Farmasi Imelda*. 4(2): 37-42.

- Gunawan, D. H. 2018. Penurunan Senyawa Saponin Pada Gel Lidah Buaya Dengan Perebusan Dan Pengukusan. *Jurnal Teknologi Pangan*. 9 (1): 41-44.
- Hajishengallis, G., dan Diaz, P. I. 2020. Porphyromonas gingivalis: Immune subversion activities and role in periodontal dysbiosis. *Current oral health reports*, 7(1), 12-21.
- Hariana, A. 2015. 262 Tanaman obat dan khasiatnya. Edisi 2. Jakarta: *penebar swadaya*.
- Hariyatmi. 2004. Kemampuan Vitamin E Sebagai Antioksidan Terhadap Radikal Bebas Pada Lanjut Usia. *Journal MIPA*. 14 (1): 52 - 60
- Hasanah, M., Kartini, Y., Dan Darwis, D. 2020. Perbedaan Daya Antioksidan Ekstrak Daun Kersen (Muntingia Calabura L.) Yang Diekstraksi Dengan Metode Perkolasi Dan Soxhletasi. *Jurnal Penelitian Farmasi Indonesia*. 9(2): 61-65.
- Hasim, H., Falah, S., dan Dewi, L. K. 2016. Effect of boiled cassava leaves (Manihot esculenta Crantz) on total phenolic, flavonoid and its antioxidant activity. *Current Biochemistry*, 3(3), 116-127.
- Hasrianti, H., Nururrahmah, N. dan Nurasia, N., 2016. Pemanfaatan Ekstrak Bawang Merah dan Asam Asetat sebagai Pengawet Alami Bakso. *Dinamika*. 7(1): 9-30.
- Hasyul, S. F. P., Nuari, D. A., Anggraini, S., Aditya, A., dan Lisni, I. 2020. Analisis Drug-Related Problems Penggunaan Antibiotik Fluorokuinolon Di Salah Satu Puskesmas Kabupaten Garut. *Jurnal Ilmiah Farmako Bahari*, 11(2), 137-144.
- Herdianti, C. D., Primariawan, R. Y., Rusiani, D. R., dan Soeliono, I. 2020. Evaluasi Penggunaan Antibiotik menggunakan Indeks ATC/DDD dan DU90% pada Pasien Operasi TAH BSO dengan Infeksi Daerah Operasi: Studi Retrospektif di RSUD Dr. Soetomo. *Jurnal Sains Farmasi dan Klinis*, 7(3), 188-193.
- Heta, S., dan Robo, I. 2018. The Side Effects Of The Most Commonly Used Group Of Antibiotics In Periodontal Treatments. *Medical sciences Journal*. 6(6): 1-6.
- Hidayah, N., Hisan, A. K., Solikin, A., Irawati, I., dan Mustikaningtyas, D. 2018. Uji Efektivitas Ekstrak Sargassum muticum Sebagai Alternatif Obat Bisul Akibat Aktivitas Staphylococcus aureus. *Journal of Creativity Students*. 1(1):1-9.

- Hindayani, R., dan Qamariyah, N. 2019. Formulasi Masker Peel Off Ekstrak Etanol Batang Saluang Belum Sebagai Antioksidan. *Jurnal Pharmascience*. 6(2): 65-73.
- 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.
- Iraniza, A. D., dan Machmud, E. 2020. The effect of application of Chlorella vulgaris extract gel on bone remodeling. *Makassar Dental Journal*, 9(3), 220-224.
- Irmawartini., dan Nurhaedah. 2017. Bahan Ajar Kesehatan Lingkungan: Metodologi Penelitian. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Islamiah, S., Rezeki, S., dan Ivontianti, W. D. 2021. Studi Pengaruh Tingkat Kematangan Buah Kelapa Sawit Terhadap Kandungan Asam Lemak Melalui Metode Maserasi. *Rafflesia Journal Of Natural And Applied Sciences*, 1(1), 40-49.
- Jamiati., H. A., dan Sari, M. 2019. Evaluasi Peresepan Antibiotik Pada Pasien Rawat Jalan Di Puskesmas Dabun Gelang Kabupaten Gayo Lues. *Jurnal Dunia Farmasi*. 3(3): 115-122.
- Jia, L., Han, N., Du, J., Guo, L., Luo, Z., dan Liu, Y. 2019. Pathogenesis of important virulence factors of Porphyromonas gingivalis via toll-like receptors. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9, 262.
- Kanzaki H, Wada S, Narimiya T, Yamaguchi Y, Katsumata Y, Itohiya K, Fukaya S, Miyamoto Y dan Nakamura Y. 2017. Pathways that Regulate ROS Scavenging Enzymes, and Their Role in Defense Against Tissue Destruction in Periodontitis. *Front. Physiol. Journal*. 8(351): 1-8.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Laporan Nasional RISKESDAS 2018: 207.
- Kenkre, J. S., dan Bassett, J. H. D. 2018. The bone remodelling cycle. *Annals of clinical biochemistry*, 55(3): 308-327.
- Koraag, J. R., Michael., dan Siagian. 2015. Efektivitas Perasan Daun Pepaya Terhadap Jumlah Osteoblas Pasca Pencabutan Gigi Pada Tikus Wistar Jantan *Pharmacon Jurnal Ilmiah Farmasi Unsrat*. 4 (4): 2302 – 2493.
- Kotto, F., Yuliadi, E., Setiawan, K., dan Hadi, M. S. 2020. Inventarisasi Klon Ubi Kayu (Manihot esculenta Crantz) Di Empat Wilayah Provinsi Lampung. *Journal of Tropical Upland Resources (J. Trop. Upland Res.)*. 2(2): 162-172.

- Kurnia, N., dan Marwatoen, F. 2013. Penentuan Kadar Sianida Daun Singkong Dengan Variasi Umur Daun Dan Waktu Pemetikan. *Jurnal Ilmiah Pendidikan Kimia "Hydrogen".*1(2): 117-121.
- Kurniasih, W., dan Yuniaswan, A. 2022. Potensi Physalis Angulata (Ciplukan) sebagai Manajemen Kelainan pada Kulit. *Jurnal Klinik dan Riset Kesehatan, 1*(2), 87-100.
- Kurniawati, A., Saputra, D. R., Sari, D. Y., Amanitha, I. C., dan Hariyati, S. N. M. 2020. Cowhide Gelatin Nanoparticles and Titanium-Prepared Platelet-Rich Fibrin Potential in Periodontitis Healing Process. *ODONTO: Dental Journal, 7*(1), 73-81.
- Kurniawati, A., Wahyukundari, M. A., dan Astuti, S. D. 2020. Potensi Ekstrak Daun Ungu dalam Menurunkan Jumlah Sel Osteoklas Tikus yang Diinduksi Porphyromonas gingivalis. *Cakradonya Dental Journal, 12*(2), 75-82.
- Lee, J. Y., Miller, D. P., Wu, L., Casella, C. R., Hasegawa, Y., and Lamont, R. J. 2018. Maturation of the Mfa1 fimbriae in the oral pathogen Porphyromonas gingivalis. *Frontiers in cellular and infection microbiology, 8*, 137.
- Majdina, S., Mulawarmanti, D., dan Rizka, Y. 2016. Efektifitas Kombinasi Terapi Oksigen Hiperbarik dan Gel Teripang Emas (*Stichopus hermannii*) terhadap Peningkatan Jumlah Osteoblas pada Tikus Diabetes Melitus yang Diinduksi Bakteri *Porphyromonas gingivalis*. *Jurnal kedokteran gigi. 10*(1): 31-41.
- Megawati, S., Nur'aini., dan Kurniasih, D. 2020. Uji Efektivitas Gel Ekstrak Etanol 96% Daun Singkong (*Manihot Esculenta Crantz*) Pada Penyembuhan Luka Sayat Kelinci Jantan Galur New Zealand White. *Jurnal Farmagazine. 7*(1): 1-12.
- Meilawaty, Z. 2013. Efek ekstrak daun singkong (*Manihot utilissima*) terhadap ekspresi COX-2 pada monosit yang dipapar LPS E.coli. *Dent. J. (Maj. Ked. Gigi). 46*(4): 196-201.
- Meilawaty, Z., dan Kusumawardani, B. 2016. Effect Of Cassave Leaf Flavonoid Extract on TNF- $\alpha$  Expressions in Rat Models Suffering from Periodontitis. *Dent J (Maj. Ke. Gigi). 49*(3): 137-142.
- Meilawaty, Z., Shita, A. D. P., Kuncaraningtyas, P. L., Dharmayanti, A. W. S., dan Hamzah, Z. 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 Padjadjaran, 32*(2), 105-112.
- 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.

Mescher, A. L. 2017. Teks dan Atlas Histologi dasar Junqueira edisi 14. Jakarta: EGC. Halaman 120-121.

Munir, M., dan Jariah, S. 2016. Pengaruh Kadar Thiamine (Vitamin B1) Terhadap Pertumbuhan Jamur Tiram Putih (*Pleurotus Ostreatus*). *Jurnal Biota*, 2(2), 158-165.

Muthmainna, B., dan Nilasari, A. 2018. Uji Aktivitas Antimikroba Herba Daun Singkong (*Manihot utilissima Pohl*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Ilmiah Kesehatan Diagnosis*. 12(6): 614-616.

Muzakki, H. 2020. Produksi Kue Brownies sebagai Upaya Meningkatkan Nilai Ekonomi Singkong di Krajan Blimbing Dolopo Madiun. *Amalee: Indonesian Journal of Community Research and Engagement*, 1(2), 87-99.

Nazir, M. A. 2017. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *International Journal of Health Sciences*. 1(2): 72-80

Ningsih, A. W., Hanifa, I., dan Hisbiyah, A. 2020. Pengaruh Perbedaan Metode Ekstraksi Rimpang Kunyit (*Curcuma domestica*) Terhadap Rendemen dan Skrining Fitokimia. *Journal of Pharmaceutical Care Anwar Medika*. 2(2): 96-104.

Noer, S., Pratiwi, R. D., dan Gresinta, E. 2018. Penetapan Kadar Senyawa Fitokimia (Tanin, Saponin Dan Flavonoid Sebagai Kuersetin) Pada Ekstrak Daun Inggu (*Ruta Angustifolia L.*). *Eksakta: Jurnal Ilmu-Ilmu Mipa*. 18(1): 19-29.

Novitasari, N., dan Jubaidah, S. 2018. Perbandingan Metode Ekstraksi Terhadap Rendemen Ekstrak Daun Rambai Laut (*Sonneratia caseolaris L. Engl*). *Jurnal Ilmiah Manuntung*, 4(1): 79-83.

Nunes, J. M., Fillis, T., Page, M. J., Venter, C., Lancry, O., Kell, D. B., dan Pretorius, E. 2020. Gingipain R1 and lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* have major effects on blood clot morphology and mechanics. *Frontiers in Immunology*. 11: 1551.

Paendong, A. R. M., Fatimawali, F., dan Lebang, J. S. 2022. Karakterisasi Ekstrak Etanol Kulit Buah Lemon Suanggi (*Citrus Limon L.*). *Pharmacon*. 11(1):1302-1308.

- Paliling, A., Posangi, J., dan Anindita, P. S. 2016. Uji Daya Hambat Ekstrak Bunga Cengkeh (*Syzygium Aromaticum*) Terhadap Bakteri *Porphyromonas Gingivalis*. *Jurnal e-GiGi*. 4(2): 229-234.
- 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.
- Prasetya, R. C., Praharani, D., FatimatuZZahro, N., Ermawati, T., dan Tsalats, F. O. N. 2021. Efek pemberian seduhan kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap jumlah sel makrofag dan limfosit pada model tikus periodontitis kronis. *Padjadjaran Journal of Dental Researchers and Students*, 5(1): 18-23.
- Pratiwi, A. P. 2016. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta C.*) Terhadap *Shigella sp.* *Jurnal Kesehatan*. 7(1): 161-164.
- Pratiwi, R. H. 2017. Mekanisme Pertahanan Bakteri Patogen Terhadap Antibiotik. *Jurnal Pro-Life*. 4(3): 418-429.
- Pudla, M., Srisaowakarn, C., dan Utaisincharoen, P. 2019. NLRP12 negatively modulates inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and tumor necrosis factor- $\alpha$  production in *Porphyromonas gingivalis* LPS-treated mouse macrophage cell line (RAW264. 7). *Inflammation Research*, 68(10), 841-844.
- Pujiastuti, P. dan Lestari, S., 2015. Perbedaan Efektifitas Antibakteri Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) pada *Porphyromonas gingivalis* dan *Streptococcus viridans*. *Stomatognatic-Jurnal Kedokteran Gigi*. 12(1): 1-4.
- Putri, C. F., Dan Bachtiar, E. W. 2020. *Porphyromonas Gingivalis* Dan Patogenesis Disfungsi Kognitif: Analisis Peran Sitokin Neuroinflamasi. *Cakradonya Dent J*; 12(1): 15-23.
- Quamilla, N. 2016. Stres dan Kejadian Periodontitis (Kajian Literatur). *Jurnal of Syiah Kuala*. 1(2): 161–168.
- Restiani, R., Roslim, D. I., dan Herman. 2014. Karakter Morfologi Ubi Kayu (*Manihot Esculenta Crantz*) Hijau Dari Kabupaten Pelalawan. *Jom Fmipa*. 1(2): 619-623.
- Ridwan, E. 2013. Etika Pemanfaatan Hewan Percobaan dalam Penelitian Kesehatan. *J Indon Med Assoc*. 63(3): 112-116.
- Rini, A. A., Supriatno., dan Rahmatan, H. 2017. Skrining Fitokimia Dan Uji Antibakteri Ekstrak Etanol Buah Kawista (*Limonia Acidissima L.*) Dari

- Daerah Kabupaten Aceh Besar Terhadap Bakteri Escherichia Coli. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Fakultas Keguruan Dan Ilmu Pendidikan Unsyiah*. 2(1): 1-12.
- Rismadianti, A., Poetri, A. R., Dan Feranisa, A. 2022. Efektivitas Ekstrak Kulit Buah Manggis Terhadap Peningkatan Jumlah Sel Fibroblas Pada Proses Penyembuhan Periodontitis Tikus Wistar (*Rattus Norvegicus*). *Prosiding Konstelasi Ilmiah Mahasiswa Unissula (Kimu) 7 Universitas Islam Sultan Agung*: 86-93.
- Roshida, A. 2017. *Potensi Minyak Ikan Lemuru (Sardinella longiceps) Terhadap Jumlah Kondrosit Kartilago Sendi Temporomandibula Tikus yang Mengalami Osteoarthritis*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi
- Ruslan, R., Agustina, S., dan Hasanah, U. 2019. Penentuan Nilai Sun Protection Factor (SPF) Dari Kulit Bawang Merah. *Jurnal Redoks: Jurnal Pendidikan Kimia Dan Ilmu Kimia*. 2(1): 34-43.
- Rusyanti, Y. 2014. Analisis Kadar Interleukin-8 Pada Periodontitis Agresif. *Jurnal IJAS*. 4(3): 1-8.
- Sa'diyah, J. S., Septiana, D. A., Farih, N. N., dan Ningsih, J. R. 2020. Pengaruh Gel Ekstrak Daun Binahong (*Anredera Cordifolia*) 5% Terhadap Peningkatan Osteoblas Pada Proses Penyembuhan Luka Pasca Pencabutan Gigi Tikus Strain Wistar. *Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Padjadjaran*. 32(1): 9-15.
- Safitri, I., Nuria, M. C., dan Puspitasari, A. D. 2018. Perbandingan kadar flavonoid dan fenolik total ekstrak metanol daun beluntas (*Pluchea indica L.*) pada berbagai metode ekstraksi. *Jurnal Inovasi Teknik Kimia*, 3(1): 31-36.
- Sardi, N. W. A., Sukrama, I. D. M., & Satriyasa, B. K. 2018. Peningkatan Sel Osteoblast Mandibula Tikus Wistar Jantan Setelah Pemberian Fermentasi Teh Kombucha. *Interdental: Jurnal Kedokteran Gigi*, 14(2), 51-55.
- Sari, L. M., Meilawaty, Z., Astuti, P., Shita, A. D. P., Dharmayanti, A. W. S., & Hamzah, Z. 2021. Potensi Ekstrak Daun Singkong (*Manihot Esculenta Crantz*.) Terhadap Profil Leukosit Darah Tepi Model Tikus Disfungsi Ovarium Dan Periodontitis. *Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Padjadjaran*, 33(1), 44-52.
- Savitri, A. Y. 2014. Pengaruh Berbagai Perlakuan Stek terhadap Pertumbuhan Akar pada Ubikayu (*Manihot esculenta Crantz*). Fakultas Pertanian Universitas Lampung. Bandar Lampung. *Jurnal kelitbangan*. 2(3): 85-95.

- Septiwidyati, T. R., dan Bachtiar, E. W. 2020. The Role of *Porphyromonas gingivalis* Virulence Factors in Periodontitis Immunopathogenesis. *Dentika Dental Journal*. 23(1): 6-12.
- Silviani, Y., dan Nirwana, A. P. 2020. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Daun Sukun (*Artocarpus Altilis*) Metode Perkolasi Terhadap *Pseudomonas Aeruginosa*. *Jurnal Kesehatan Kusuma Husada*. 11(1): 1-6.
- Siswati, L., Ardie, S. W., dan Khumaida, N. 2019. Pertumbuhan dan Perkembangan Ubi Kayu Genotipe Lokal Manggu pada Panjang Setek Batang yang Berbeda. *Jurnal Agronomi Indonesia (Indonesian Journal of Agronomy)*, 47(3), 262-267.
- Solikhah, R., Purwantoyo, E, dan Rudyatmi, E. 2019. Aktivitas Antioksidan dan Kadar Klorofil Kultivar Singkong DiDaerah Wonosobo. *Life Science Journal*. 8 (1): 86-95.
- Tang, X. Han., J. Meng., Huanxin Zhao., Y. Wang., H. Liu., J Lin., L. Zhang., Dongmei Li., and C. Ma. 2016. Downregulation of RANKL and RANKL/osteoprotegerin ratio in human periodontal ligament cells during their osteogenic differentiation. *Journal of periodontal*. 51(1): 125-132.
- Tani, P. G., Wowor, P. M., dan Khoman, J. A. 2017. Uji Daya Hambat Daging Buah Sirsak (*Annona Muricata L.*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Porphyromonas Gingivalis*. *Pharmacon Jurnal Ilmiah Farmasi*. 6(3): 99-104.
- Tedjasulaksana, R. 2016. Metronidasol Sebagai Salah Satu Obat Pilihan Untuk Periodontitis Marginalis. *Jurnal Kesehatan Gigi*. 4(1): 19-23.
- Tim Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. 2007. Petunjuk Praktikum Patologi Anatomi Degenerasi dan Inflamasi. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Tonetti, M. S., Jepsen, S., Jin, L., & Otomo-Corgel, J. 2017. Impact of the global burden of periodontal diseases on health, nutrition and wellbeing of mankind: A call for global action. *Journal of clinical periodontology*, 44(5), 456-462.
- Tyastirin, E., dan Hidayati, I. 2017. Statistik Parametrik Untuk Penelitian Kesehatan. Edisi 1. Surabaya: Program Studi Arsitektur Uin Sunan Ampel.
- Vishwakarma, A., and Verma, D. 2021. Microorganisms: crucial players of smokeless tobacco for several health attributes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(16): 6123-6132.

- Wahyu, P., Kurniawati, A., dan Pujiastuti, P. 2021. Potentially Of Purple Leaves To Increase Osteoblastat Alveolar Bone Rat Induced Porphyromonas Gingivalis. *Journal Of Vocational Health Studies*. 4(3): 114-118.
- Wenas, D. M., Aliya, L. S., dan Janah, N. U. 2020. Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Etanol Daun Kopi Arabika (*Coffea Arabica L.*) Pada Edema Tikus. *Buletin Penelitian Tanaman Rempah Dan Obat*. 31(2):75 – 84.
- Widyaningsih, I., Inawati., dan Tjandra L. 2017. Kandungan Xanton dalam Ekstrak Kulit Manggis dengan Pelarut Etanol Absolut. *Jurnal Ilmiah Pendidikan Eksakta*. 3(2): 225-234.
- Wijaksana, I. K. E. 2016. Infectobesity dan Periodontitis: Hubungan Dua Arah Obesitas Dan Penyakit Periodontal. *Odonto Dental Journal*. 3(1): 67-73.
- Wijaksana, I. K. E. 2019. Dental Treatment Consideration in Pregnant Women. *Jurnal Kesehatan Gigi*. 6(2): 118-125.
- 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.
- Womsiwor, O. O. O., Nurmaini., Zikri, A., Hendra., Amrizal., Yudistira., Dan Yuliana, F. B. 2018. Design and Development of Horizontal Types of Cupping and Cash Washing Machines. *Journal Of Applied Agricultural Science and Technology*. 2(2): 11-19.
- Yulistiana, F., Suradi, R., Sutanto, Y. S., Raharjo, A. F., & Makhabah, D. N. 2016. Pengaruh vitamin C terhadap kadar interleukin 6 plasma, MDA plasma, dan lama rawat inap penderita PPOK eksaserbasi. *J Respir Indo*. 36(3): 157-66.
- Yunita, S., Jasuma, A., Sudir, M., dan Kusrini. 2019. Sistem Pakar Deteksi Penyakit Pada Tanaman Singkong. *Jurnal Ilmiah SISFOTENIKA*. 9(1): 24-35.

LAMPIRAN

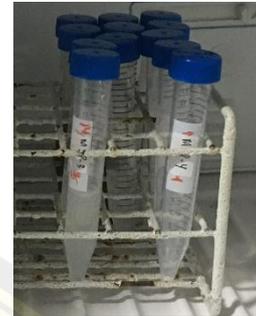
Lampiran 1. Alat dan bahan penelitian



Tikus Wistar jantan



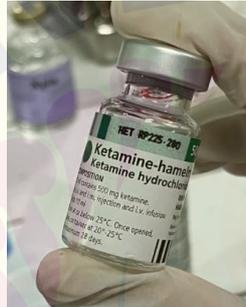
Daun singkong



Metronidazole



Alkohol 70%



Ketamine



*Porphyromonas gingivalis*



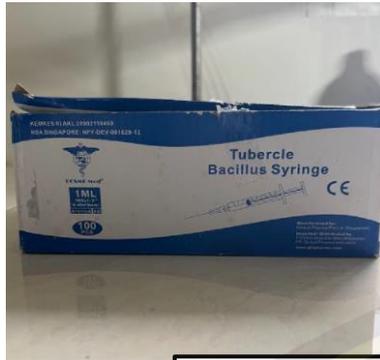
Wadah air minum tikus



Rat dental



Pinset, plastic filling instrument, gunting bedah, Surgical blade No.11 dan scapel No.3



Syringe



Blender



Mikroskop



Microtom



Automatic Tissue processing



Kulkas



Waterbath



Kompur listrik



Slide warmer



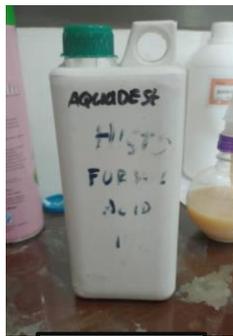
Corong



Staining Jar



Cassete



Aquadest



Filling Cabinet



Formic acid



Wadah jaringan



Toples  
Bejana



Gelas ukur, wadah,  
dan spatula



Base mould  
parafin



Tabung reaksi  
dan spatula



Balok kayu



Oven



Sonde lambung



Timbangan



Needle 30  
gauge



Makanan  
tikus (turbo)



saringan



Buffer  
formalin



Keterangan gambar:

1. *Xylol*
2. *Etanol*
3. *formic acid*
4. *Entelan*
5. *Paraffin wax*
6. *Alkohol*
7. *Pewarna hematoxilin*
8. *Eosin*
9. *Deck glass*
10. *Microscope slide*

## Lampiran 2. Prosedur penelitian

### 2.1 Pembuatan Ekstrak Daun Singkong

#### 2.1.1 Pengambilan Daun Singkong



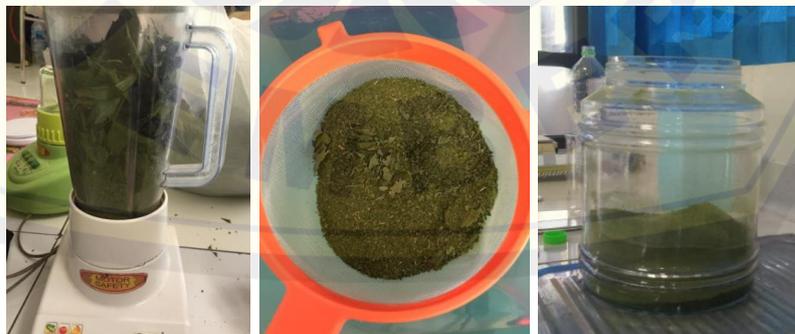
### 2.1.2 Penimbangan dan pencucian Daun Singkong



### 2.1.3 Tahap mengeringkan daun singkong



### 2.1.4 Tahap Menghaluskan Daun Singkong



2.1.5 Pengadukan Serbuk Halus dan dilakukan Maserasi Selama 3 Hari Dengan Pengadukan Setiap 24 Jam



2.1.6 Larutan hasil maserasi disaring



2.1.7 Larutan Dipekatkan Dengan Rotary Evaporator



2.1.7 Ekstrak Daun Singkong



## 2.2 Pembuatan Dosis Daun Singkong, Metronidazole Dan Aquades



## 2.3 Persiapan Hewan Coba



## 2.4 Pembuatan Model Tikus Periodontitis



2.5 Aplikasi Ekstrak Daun Singkong, metronidazole, dan aquadest



2.6 Euthanasia dan pengambilan rahang bawah



2.7 Dekalsifikasi Jaringan



## 2.8 Pembuatan Sediaan Histologi



Pemrosesan jaringan



Pemberian gliserin



Pembuatan blok (*embedding*)



blok parafin dipasang pada balok kayu



Pemotongan dengan *microtom*



Hasil potongan dipindahkan ke *waterbath*



Sediaan jaringan dibiarkan kering pada *slide warmer* minimal 12 jam

### 2.9 Pewarnaan jaringan



Deparafinisasi dengan xylool dan rehidrasi dengan alkohol



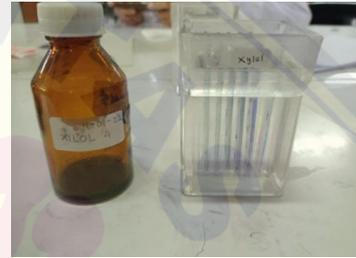
Pewarnaan dengan Hematoxylin Mayer's selama 8 menit dan dibilas air mengalir



Pewarnaan dengan eosin selama 1 menit



Dehidrasi dengan alkohol 95% dan alkohol 100% kemudian dimasukkan kedalam xylool

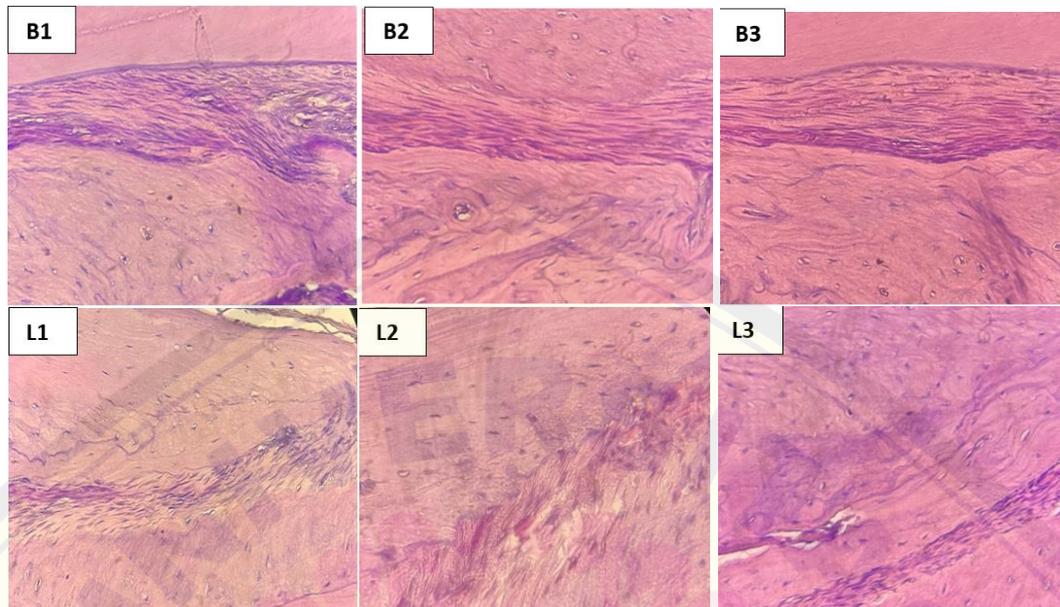


### 2.10 Pengamatan

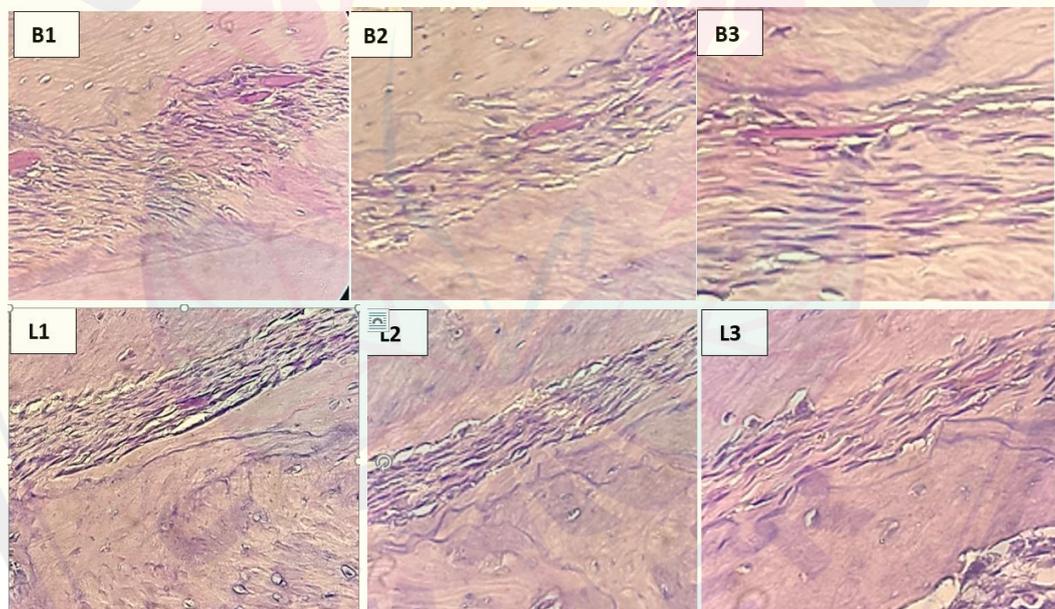


## 2.11 Hasil Pengamatan Gambar Histologi Osteoblas

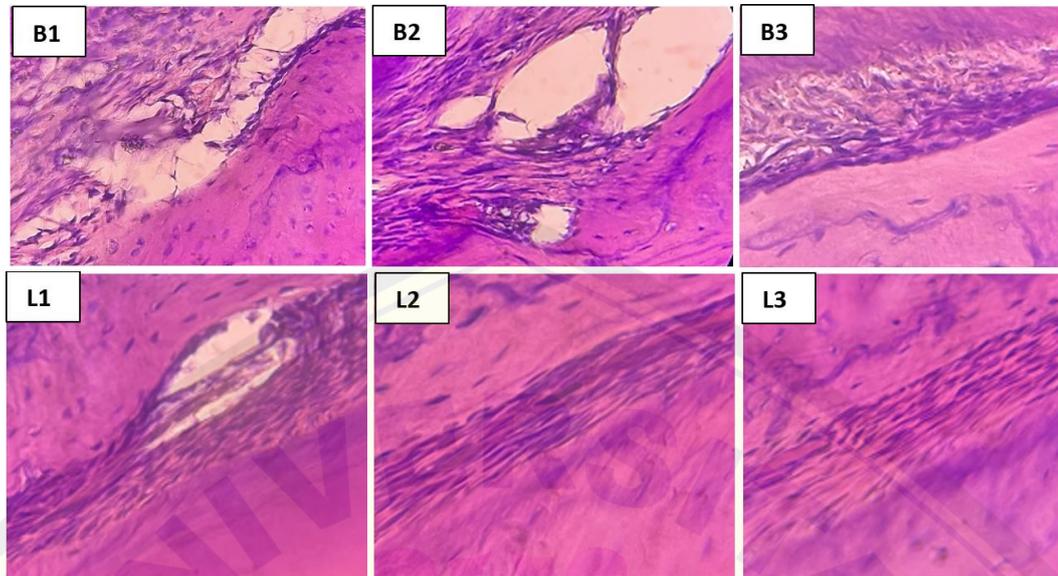
### 2.11.1 Kelompok K1: Kelompok Kontrol



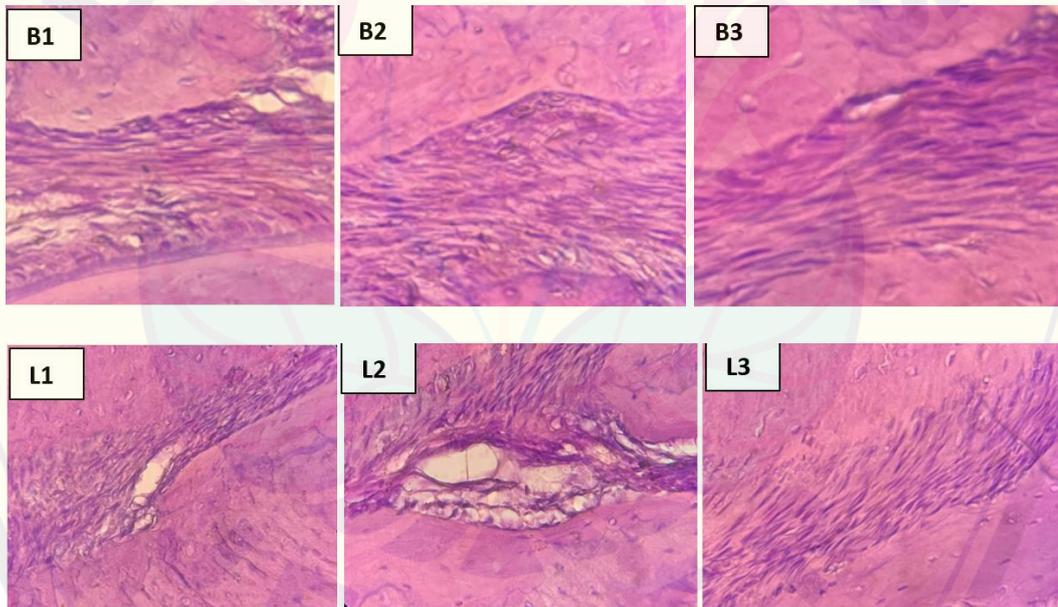
### 2.11.2 Kelompok P1: Kelompok perlakuan yang diberi aquadest



## 2.11.3 Kelompok P2: Kelompok perlakuan yang diberi Metronidazole



## 2.11.4 Kelompok P3: Kelompok perlakuan yang diberi Ekstrak daun singkong



Keterangan:

B1: Lapang pandang bukal 1

B2: Lapang pandang bukal 2

B3: Lapang pandang bukal 3

L1: Lapang pandang Lingual 1

L2: Lapang pandang Lingual 2

L3: Lapang pandang Lingual 3

Lampiran 3. Hasil perhitungan Osteoblas

Kelompok	Sampel	Hasil									Rata-Rata Kelompok
		Bukal			Rata-rata Bukal	Lingual			Rata-Rata Lingual	Rata-Rata Sampel	
		1	2	3		1	2	3			
Kelompok Kontrol (K1)	1	19	17	21	19,0	23	22	20	21,7	20,3	17,0
	2	16	18	21	18,3	16	12	13	13,7	16,0	
	3	21	22	21	21,3	19	14	15	16,0	18,7	
	4	14	17	17	16,0	20	12	17	16,3	16,2	
	5	14	10	17	13,7	16	13	12	13,7	13,7	
Kelompok Perlakuan (P1)	1	14	13	14	13,7	10	9	6	8,3	11,0	12,4
	2	17	9	8	11,3	15	10	10	11,7	11,5	
	3	20	13	8	13,7	13	8	8	9,7	11,7	
	4	17	15	12	14,7	11	14	11	12,0	13,3	
	5	17	14	15	15,3	15	13	13	13,7	14,5	
Kelompok Perlakuan (P2)	1	22	24	14	20,0	20	16	23	19,7	19,8	21,5
	2	34	20	29	27,7	18	28	19	21,7	24,7	
	3	25	21	19	21,7	26	24	18	22,7	22,2	
	4	18	20	24	20,7	19	17	17	17,7	19,2	
	5	18	21	15	18,0	25	28	22	25,0	21,5	
Kelompok Perlakuan (P3)	1	21	17	20	19,3	17	20	18	18,3	18,8	19,9
	2	22	21	20	21,0	21	19	20	18,0	19,5	
	3	21	19	23	21,0	19	18	17	18,0	19,5	
	4	23	21	21	21,7	22	19	19	20,0	20,8	
	5	24	21	22	22,3	21	17	20	19,3	20,8	

**Lampiran 4.** Analisis Data4.1 uji *Shapiro-Wilk***Tests of Normality**

	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Osteoblas	kelompok kontrol (K1)	.219	5	.200*	.965	5	.842
	Kelompok perlakuan (P1)	.285	5	.200*	.899	5	.403
	kelompok perlakuan (P2)	.180	5	.200*	.948	5	.726
	Kelompok perlakuan (P3)	.266	5	.200*	.858	5	.220

a. Lilliefors Significance Correction

4.2 Uji Homogenitas *Levene***Test of Homogeneity of Variances**

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Osteoblas	Based on Mean	1.693	3	16	.209
	Based on Median	.899	3	16	.463
	Based on Median and with adjusted df	.899	3	11.935	.470
	Based on trimmed mean	1.708	3	16	.206

## 4.3 uji one way anova

**ANOVA**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<b>Between Groups</b>	238.241	3	79.414	22.353	.000
<b>Within Groups</b>	56.844	16	3.553		
<b>Total</b>	295.086	19			

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

Dependent Variable: Hasil

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kelompok kontrol (K1)	Kelompok perlakuan (P1)	4.5800*	1.1921	.001	2.053	7.107
	kelompok perlakuan (P2)	-4.5000*	1.1921	.002	-7.027	-1.973
	Kelompok perlakuan (P3)	-2.9000*	1.1921	.027	-5.427	-.373
Kelompok perlakuan (P1)	kelompok kontrol (K1)	-4.5800*	1.1921	.001	-7.107	-2.053
	kelompok perlakuan (P2)	-9.0800*	1.1921	.000	-11.607	-6.553
	Kelompok perlakuan (P3)	-7.4800*	1.1921	.000	-10.007	-4.953
kelompok perlakuan (P2)	kelompok kontrol (K1)	4.5000*	1.1921	.002	1.973	7.027
	Kelompok perlakuan (P1)	9.0800*	1.1921	.000	6.553	11.607
	Kelompok perlakuan (P3)	1.6000	1.1921	.198	-.927	4.127
Kelompok perlakuan (P3)	kelompok kontrol (K1)	2.9000*	1.1921	.027	.373	5.427
	Kelompok perlakuan (P1)	7.4800*	1.1921	.000	4.953	10.007
	kelompok perlakuan (P2)	-1.6000	1.1921	.198	-4.127	.927

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

## Lampiran 5. Surat identifikasi tumbuhan

	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; float: right; font-size: small;">           Kode Dokumen : FR-AUK-064            Revisi : 0         </div> <p style="margin-top: 10px;"> <b>KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,            RISET DAN TEKNOLOGI</b>  <b>POLITEKNIK NEGERI JEMBER</b>  <b>UPT. PENGEMBANGAN PERTANIAN TERPADU</b>  <small>Jalan Mastrip Kotak Pos 164 Jember - 68101 Telp. (0331) 333532 - 333534 Fax.(0331) 333531            E-mail : <a href="mailto:Polije@polije.ac.id">Polije@polije.ac.id</a> Web Site : <a href="http://www.Polije.ac.id">http://www.Polije.ac.id</a></small> </p>
<hr/> <p><b><u>SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN</u></b></p> <p>No: 161/PL17.8/PG/2021</p>	
<p>Mewindaklanjuti surat dari Wakil Dekan I Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember No: 4878/UN25.8/PG/2021 perihal Permohonan Identifikasi Tanaman dan berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke UPT. Pengembangan Pertanian Terpadu, Politeknik Negeri Jember oleh:</p>	
<p>Nama : Amelia Nur Ilahi          NIM : 181610101108          Jur/Fak/PT : Fakultas Kedokteran Gigi/ Universitas Jember</p>	
<p>maka dapat disampaikan hasilnya bahwa spesimen tersebut di bawah ini (terlampir) adalah:  <i>Kingdom/Regnum: Plantae; Divisio: Spermatophyta; Sub Divisio: Magnoliophyta; Kelas: Magnoliopsida; Ordo: Euphorbiales; Famili: Euphorbiaceae; Genus: Manihot; Spesies: Manihot esculenta, Crantz</i></p>	
<p>Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.</p>	
<p>Jember, 15 Nopember 2021</p> <div style="display: flex; align-items: center;">  <div> <p>Dr. Irena Prasetyo, S.Pt, MP, IPM            NIP. 197106212001121001</p> </div> </div>	

**Lampiran 6.** Ethical clearance**SURAT KETERANGAN**

No.0024/KKEP/FKG-UGM/EC/2022

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

Judul : **EFEKTIVITAS EKSTRAK DAUN SINGKONG (*Manihot Esculenta Crantz*) TERHADAP JUMLAH OSTEOLAS PADA TULANG ALVEOLAR TIKUS PERIODONTITIS YANG DIINDUKSI *Porphyromonas gingivalis***

Peneliti Utama : Amelia Nur Ilahi

Penanggung Jawab Medis : drg. Amandia Dewi Permana Shita, M.Biomed

Unit/Lembaga : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Tempat Penelitian : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

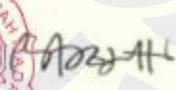
Maka dengan ini menyatakan bahwa proposal penelitian tersebut telah memenuhi syarat atau laik etik. Akan tetapi mengingat saat ini baru kondisi pandemi COVID-19, maka surat laik etik akan kami terbitkan setelah kondisi dinyatakan aman oleh Pemerintah.

Yogyakarta, 21 Februari 2022

Wakil Dekan Bidang Penelitian, Pengabdian  
Kepada Masyarakat dan Kerjasama

Ketua Komisi Etik Penelitian FKG UGM



  
drg. Trianna Wahyu Utami, MDSc., Ph.D

  
Prof. Dr.drg. Pinandi Sri Pudyani, SU., Sp.Ort(K)

## Lampiran 7. Surat keterangan tikus sehat

**DOKTER HEWAN**  
**Drh. Muhammad Jundi Mubarak**  
 No. SIPDRH 503/A.1.0005.B/35.09.325/2020  
 Jl PB Sudirman 57 Jemberlor, Kecamatan Patrang, Kabupaten Jember  
 Telp. 081127155473

SURAT KETERANGAN KESEHATAN HEWAN/TERNAK  
 Nomor: 018/3509/0411/2021

Yang bertanda-tangan di bawah ini, Muhammad Jundi Mubarak, dokter hewan dengan Surat Ijin Praktek Dokter Hewan (SIPDRH) 503/A.1.0005.B/35.09.325/2020, pada hari Kamis tanggal 4 November 2021 pukul 10.30 WIB di Klinik Hewan Dinas Ketahanan Pangan dan Peternakan Kabupaten Jember Desa Kebonsari Kecamatan Sumberari Kabupaten Jember, telah melakukan pemeriksaan pada:

No	Jenis Hewan	Ras	Jumlah	Jenis Kelamin	Umur	Keterangan
1	Tikus Putih	<i>Rattus norvegicus</i> Galur Wistar	4	Jantan	3 bulan	Berat 160-200 gr. Warna putih

Menyatakan hewan-hewan tersebut di atas SEHAT secara klinis dan tidak menunjukkan tanda-tanda penyakit menular.

Ket. Nama Peneliti : Sofinatur Rohibah, Maria Lestari, Izzan Mohammad Amin Mazaya, Octaviana Putri P.S., Salsabil Falakul Khayyuni, Amelia Nur Ilahi

Judul : Potensi Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta* c) Dalam Penurunan Jumlah Sel Radang Kronis Pada Hati Tikus Model Periodontitis

Potensi Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta* c) Terhadap Ketebalan Serat Kolagen Gingiva Tikus Periodontitis Yang Diinduksi *Porphyromonas gingivalis*

Potensi Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta* c) Terhadap Jumlah Fibroblas Pada Gingiva Tikus Periodontitis Pasca Induksi *Porphyromonas gingivalis*

Potensi Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta* c) Terhadap Jumlah Osteoklas Pada Tulang Alveolar Model Tikus Periodontitis

Potensi Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta* c) Dalam Meregulasi Jumlah Sel Radang Kronis Pada Ginjal Tikus Periodontitis Yang Diinduksi *Porphyromonas gingivalis*

Efektivitas Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta* c) Terhadap Jumlah Osteoblas Pada Tulang Alveolar Tikus Periodontitis Yang Diinduksi *Porphyromonas gingivalis*

Alamat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Negeri Jember

Asal Hewan : Malang

Demiikian Surat Keterangan ini dibuat dengan sebenarnya menggunakan keilmuan yang sebaik-baiknya, mengingat Sumpah Dokter Hewan Pemeriksa dan agar dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 4 November 2021  
 DOKTER HEWAN PEMERIKSA



**Lampiran 8.** Surat sertifikat bakteri *P.gingivalis***Thermo**  
SCIENTIFIC**Certificate of Quality****Product Name:** *P. gingivalis* ATCC 33277 PK/5  
**Lot Number:** 779573**Product Number:** R4609008  
**Expiration Date:** 2021-06-30  
(YYYY-MM-DD)

This product has been manufactured, processed and packaged in accordance with Quality Systems Regulation, 21 CFR Part 820. Representative samples were tested per Remel Quality Control specifications and were found to meet performance criteria for this product.

**Purity:**

Standardized aliquots of the rehydrated product are inoculated onto nonselective media and examined for pure growth following the appropriate incubation. Selective and Differential media are also tested where applicable.

**Viability And Quantification:**

Each organism is recovered from the preserved state within the required time frame and at an acceptable level. Passage number is stated as the current preserved state.

**Macroscopic And Microscopic Morphology:**

Colony morphology is consistent with documented referenced description. Traditional staining is performed.

**Biochemical Analysis:**

Organism exhibits characteristic biochemical and/or enzymatic reactions. Automated and/or conventional testing was performed and results were within established limits. Antimicrobial testing performed where applicable. Results within expected ranges.

CFU/loop: &gt;10(4)

Passage: 3

Gram Reaction: Gram Negative Rod

Biochemical Profile: Remel RapID ANA II

Appearance: Preserved Gel Matrix suspended in inoculating loop

pH: N/A

Signed



Product Performance Technologist

**Lampiran 9.** Surat izin laboratorium bioscience



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,  
RISET DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
RUMAH SAKIT GIGI DAN MULUT  
Jl. Kalimantan 37 Jember, Telp. 0331-325041

**SURAT KETERANGAN**

Nomor. 2021112600022

Yang bertanda tangan dibawah ini :

N a m a : Mulyaningsih, A.Md.  
N I P : 197501092003122001  
Pangkat/Gol. : Penata Muda Tk. I / III-a

Menerangkan dengan sesungguhnya bahwa :

N a m a : Amelia Nur Ilahi.  
N I M : 18161010108  
Asal Instansi : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Telah melaksanakan penelitian di Laboratorium Bioscience Rumah Sakit Gigi dan Mulut Universitas Jember

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 26 November 2021

Analisis Medis,

Mulyaningsih, A.Md.  
NIP. 197501092003122001

## Lampiran 10. Surat izin laboratorium Hewan

## FORM 01 SURAT IJIN KERJA PENELITIAN



BAGIAN BIOMEDIK FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
Jl. Kalimantan no. 37-Kampus Bumi Tegol Boto Jember 68121  
Telp. (0331) 333536

Form 01

Yang bertanda tangan di bawah ini bermaksud mengajukan permohonan ijin melakukan penelitian di Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember :

1. Nama lengkap (beserta gelar) : Amelia Nur ilahi
2. NIM/NIP : 181610101108
3. Alamat domisili : Jl. Baturaden 1 No. 52
4. Telp/HP : 082259708742
5. Fakultas/Prodi : Fakultas Kedokteran Gigi
6. Universitas/Instansi : Universitas Jember
7. Lama Penelitian : November 2021 hingga selesai
8. Judul Penelitian : Efektivitas Ekstrak Daun Singkong (*Manihot Esculenta Crantz*) Terhadap Jumlah Osteoblas Pada Tulang Alveolar Tikus Periodontitis Yang Diinduksi *Porphyromonas Gingivalis*
9. Pembimbing : 1. drg. Amanda Dewi Permana Shita, M.Biomed  
2. drg. Zahara Meilawaty, M.Kes
10. Ijin penelitian di Lab : Laboratorium Hewan FKG Universitas Jember

Demikian permohonan ijin saya sampaikan dan saya bersedia mentaati semua peraturan dan ketentuan dari Bagian Biomedik FKG Universitas Jember.

Jember, 1 November 2021

Menyetujui,  
Ketua Bagian Biomedik  
FKG Universitas Jember

(drg. Zahara Meilawaty, M.Kes)

Pemohon

Amelia Nur ilahi

## Lampiran 11. Surat izin laboratorium Mikrobiologi



**KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,  
RISET, DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI**

Jalan Kalimantan 37, Kampus Tegal Boto Jember 68121  
Telepon (0331) 333536, 331743 Faksimili (0331) 331991  
Laman fkg.unej.ac.id; email: [fkg@unej.ac.id](mailto:fkg@unej.ac.id)

---

Nomor : 5328 /UN25.8/PG/2021  
Perihal : Ijin Penelitian

19 NOV 2021

**Kepada Yth.  
Kepala Laboratorium Biomedik Kedokteran Gigi  
FKG Universitas Jember  
Di –  
Jember**

Dalam rangka penelitian, maka dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan Ijin Penelitian bagi Mahasiswa kami:

1	Nama	: Amelia Nur Ilahi
2	NIM	: 181610101108
3	Semester/Tahun Akademik	: VII-2021/2022
4	Fakultas	: Kedokteran Gigi
5	Alamat	: Jalan Baturaden 1 No. 52, Sumbersari, Jember
6	Lokasi Penelitian	: Laboratorium Mikrobiologi FKG Universitas Jember
7	Judul Penelitian	: Efektivitas Ekstrak Daun Singkong ( <i>Manihot Esculenta Crantz</i> ) Terhadap Jumlah Osteoblas Pada Tulang Alveolar Tikus Periodontitis yang Diinduksi <i>Porphyromonas Gingivalis</i>
8	Dosen Pembimbing	: drg. Amandia DPS, M.Biomed : drg. Zahara Meilawaty, M.Kes
9	Tujuan Penelitian	: Untuk sterilisasi ependove untuk bakteri <i>Porphyromonas gingivalis</i>
10	Alat yang digunakan	: Alat sterilisasi ependove <i>Porphyromonas gingivalis</i>
11	Waktu	: November – Desember 2021

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih

  
An. Dekan  
Wakil Dekan I,  
*[Signature]*  
Drg. Masniari Novita, M.Kes., Sp.OF (K)  
NIP.196811251999032001

## Lampiran 12. Surat izin laboratorium Histologi

**FORM 01 SURAT IJIN KERJA PENELITIAN**



**BAGIAN BIOMEDIK FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER**  
Jl. Kalimantan no. 37-Kampus Bumi Tegal Boto Jember 68121  
Telp. (0331) 333536

**Form 01**

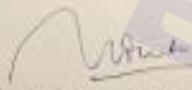
---

Yang bertanda tangan di bawah ini bermaksud mengajukan permohonan ijin melakukan penelitian di Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember :

1. Nama lengkap (beserta gelar) : Amelia Nur ilahi
2. NIM/NIP : 181610101108
3. Alamat domisili : Jl. Baturaden 1 No. 52
4. Telp/HP : 082259708742
5. Fakultas/Prodi : Fakultas Kedokteran Gigi
6. Universitas/Instansi : Universitas Jember
7. Lama Penelitian : November 2021 hingga selesai
8. Judul Penelitian : Efektivitas Ekstrak Daun Singkong (*Manihot Esculenta Crantz*) Terhadap Jumlah Osteoblas Pada Tulang Alveolar Tikus Periodontitis Yang Diinduksi *Porphyromonas Gingivalis*
9. Pembimbing : 1. drg. Amandia Dewi Permana Shita, M.Biomed  
2. drg. Zahara Meilawaty, M.Kes
10. Ijin penelitian di Lab : Laboratorium histologi FKG Universitas Jember

Demikian permohonan ijin saya sampaikan dan saya bersedia mentaati semua peraturan dan ketentuan dari Bagian Biomedik FKG Universitas Jember.

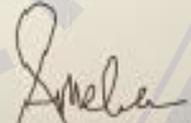
Menyetujui,  
Kepala Laboratorium Biomedik  
FKG Universitas Jember



(Dr. drg. Tecky Indriana, M.Kes)

Jember, 24 Desember 2021

Pemohon



Amelia Nur ilahi