



**UJI ANTIINFLAMASI EKSTRAK UMBI BIT MERAH (*Beta vulgaris Linn*)  
TERHADAP JUMLAH SEL POLIMORFONUKLEAR NEUTROFIL  
PADA MENCIT YANG DIINDUKSI *Escherichia coli***

**SKRIPSI**

Oleh

**Ni Putu Yogi Wiranggi**

**NIM 131610101008**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI**

**UNIVERSITAS JEMBER**

**2017**



**UJI ANTIINFLAMASI EKSTRAK UMBI BIT MERAH (*Beta vulgaris Linn*)  
TERHADAP JUMLAH SEL POLIMORFONUKLEAR NEUTROFIL  
PADA MENCIT YANG DIINDUKSI *Escherichia coli***

**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

**Ni Putu Yogi Wiranggi**

**NIM 131610101008**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2017**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ida Sang Hyang Widhi Wasa kemudahan, rahmat, dan berkah yang tiada habisnya sepanjang hidup;
2. Papa I Ketut Wiraba dan Mama Ni Made Sukeniri yang tercinta;
4. Kakak ku I Gede Wiraguna (alm) dan Adik ku I Made Yoga Wiranata yang tersayang;
5. Guru-guruku sejak taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi;
6. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

**MOTO**

**Ananyas cintayanto mam ye janah paryupasate, Tesam nityabhiyuktanan yoga-ksemam wahamy aham.**

"Tetapi mereka yang memuja-Ku dan hanya bermeditasi kepada-Ku saja, kepada mereka yang senantiasa gigih demikian itu, akan Aku bawakan segala apa yang belum dimilikinya dan akan menjaga apa yang sudah dimilikinya"

(Bahgawad Gita, IX-22)<sup>\*)</sup>

---

<sup>\*)</sup> Sri Srimad. 2000. Bhagavad-Gita Menurut Aslinya. Sweden: PT. Hanuman Sakti.

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Ni Putu Yogi Wiranggi

NIM : 131610101008

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Uji Antiinflamasi Ekstrak Umbi Bit Merah (*Beta vulgaris Linn*) terhadap Jumlah Sel Polimorfonuklear Neutrofil pada Mencit yang Diinduksi *Escherichia coli*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 28 Desember 2016

Yang menyatakan,

NI Putu Yogi Wiranggi

NIM 131610101008

**SKRIPSI**

**UJI ANTIINFLAMASI EKSTRAK UMBI BIT MERAH (*Beta vulgaris Linn*)  
TERHADAP JUMLAH SEL POLIMORFONUKLEAR NEUTROFIL  
PADA MENCIT YANG DIINDUKSI *Escherichia coli***

Oleh

**Ni Putu Yogi Wiranggi**

**NIM 131610101008**

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : drg. Yani Corvianindya Rahayu, M.KG

Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Amandia Dewi Permana S., M. Biomed

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Uji Antiinflamasi Ekstrak Umbi Bit Merah (*Beta vulgaris Linn*) terhadap Jumlah Sel Polimorfonuklear Neutrofil pada Mencit yang Diinduksi *Escherichia coli*” karya Ni Putu Yogi Wiranggi telah diuji dan disahkan pada:

Hari, tanggal : Rabu, 28 Desember 2016

Tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Penguji Ketua,

Dr. drg. Atik Kurniawati, M.Kes

NIP 197102041998022002

Penguji Anggota,

drg. Yenny Yustisia, M.Biotech

NIP 197903252005012001

Pembimbing Utama

drg. Yani Corvianindya Rahayu, M. KG

NIP 197308251998022001

Pembimbing Pendamping

drg. Amandia Dewi Permana S, M. Biomed

NIP 198006032006042002

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi

Universitas Jember,



drg. R. Rahardyan Pamaadji, M.Kes., Sp.Prog

NIP 196901121996011001

## RINGKASAN

**Uji Antiinflamasi Ekstrak Umbi Bit Merah (*Beta vulgaris Linn*) terhadap Jumlah Sel Polimorfonuklear Neutrofil pada Mencit yang Diinduksi *Escherichia coli*; Ni Putu Yogi Wiranggi, 131610101008; 2017: 80 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.**

Inflamasi adalah suatu respons protektif normal terhadap luka jaringan yang disebabkan oleh trauma fisik, zat kimia yang merusak, atau zat-zat mikrobiologik. Kasus inflamasi di bidang kedokteran gigi, antara lain gingivitis, periodontitis, pulpitis dan inflamasi yang timbul pasca tindakan pencabutan gigi. Agen penyebab inflamasi, salah satunya adalah *Escherichia coli*. Endotoksin yang masuk sirkulasi akan memacu makrofag untuk mengeluarkan mediator-mediator radang dan sitokin proinflamasi, merangsang terjadinya adhesi neutrofil dan endotel vaskular, aktivasi faktor pembekuan darah dan terbentuknya mediator-mediator lain. Untuk mengurangi gejala-gejala inflamasi yang berlebihan biasanya digunakan kortikosteroid ataupun NSAID (*nonsteroidal anti-inflammatory drugs*), yaitu natrium diklofenak. Efek samping dari natrium diklofenak meliputi distress gastrointestinal, pendarahan gastrointestinal yang terselubung, dan timbulnya ulserasi lambung. Salah satu alternatif untuk mengatasi masalah tersebut adalah dengan menggunakan tanaman herbal yang saat ini mulai diminati adalah umbi bit merah (*Beta vulgaris Linn*). Ekstrak umbi bit merah mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, sterol, triterpen, saponin dan tanin yang diketahui memiliki daya antiinflamasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian dan konsentrasi ekstrak umbi bit merah yang efektif dalam menurunkan jumlah sel PMN neutrofil darah tepi mencit jantan setelah diinduksi *Escherichia coli*.

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian *the post-test only control group design*. Sampel pada penelitian



ini adalah mencit *balb-c* jantan. Besar sampel adalah 24 ekor mencit jantan yang dibagi menjadi 6 kelompok besar yang masing-masing kelompok terdiri atas 4 sampel. Terdapat enam kelompok sampel yaitu kontrol positif yang diberi perlakuan natrium diklofenak, kontrol negatif yang diberi perlakuan aquades steril dan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak umbi bit merah dosis 2000 mg/kg BB, 1000 mg/kg BB, 500 mg/kg BB, dan 250 mg/kg BB. Kemudian membuat hapusan darah yang diambil dari darah tepi ekor mencit dan diwarnai dengan pewarnaan giemsa. Selanjutnya, dilakukan penghitungan jumlah neutrofil per seratus leukosit.

Data hasil penelitian kemudian ditabulasi dan dianalisis secara statistik. Hasil pengamatan terlebih dahulu dilakukan uji normalitas *Kolmogorov-smirnov* dan uji homogenitas uji *Levene*. Karena data yang diperoleh normal dan homogen, maka dilanjutkan dengan uji statistik parametrik *One Way Anova* dan dilanjutkan uji LSD. Perbedaan yang signifikan dari hasil analisis statistik menandakan bahwa terdapat penurunan jumlah neutrofil yang signifikan pada umbi bit merah setelah diinduksi *Escherichia coli*. Penurunan jumlah neutrofil menunjukkan bahwa ekstrak umbi bit merah mengandung senyawa antiinflamasi berupa flavonoid, polifenol, dan tanin. Dari penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa ekstrak umbi bit merah dapat menurunkan jumlah sel PMN neutrofil darah tepi mencit jantan setelah diinduksi *Escherichia coli*. Ekstrak umbi bit merah dosis 1000 mg/kg BB paling efektif untuk menurunkan jumlah sel PMN neutrofil darah tepi mencit jantan setelah diinduksi *Escherichia coli*.

## PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Ida Sang Hyang Widhi Wasa. atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji Antiinflamasi Ekstrak Umbi Bit Merah (*Beta vulgaris Linn*) terhadap Jumlah Sel Polimorfonuklear Neutrofil pada Mencit yang Diinduksi *Escherichia coli*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

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

1. Orang tua tersayang, Papa I Ketut Wiraba dan Mama Ni Made Sukeniri yang tidak pernah berhenti memberikan kasih sayang, doa, motivasi, dukungan, dan semangat;
2. Kakak tercinta, I Gede Wiraguna (alm) dan Adik I Made Yoga Wiranata yang dengan tulus memberikan doa dan dukungan dalam setiap langkah;
3. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Pros selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember dan Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan dan motivasi dalam perjalanan studi selama penulis menjadi mahasiswa;
4. drg. Yani Corvianindya Rahayu., M.KG selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah meluangkan waktu dalam memberikan bimbingan dan motivasi dengan penuh kesabaran sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
5. drg. Amandia Dewi Permana Shita, M. Biomed selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang telah meluangkan waktu dalam memberikan bimbingan dan motivasi dengan penuh kesabaran sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
6. Dr. drg. Atik Kurniawati, M.Kes selaku Dosen Penguji Ketua yang telah memberikan kritik dan saran demi kesempurnaan skripsi ini;

7. drg. Yenny Yustisia, M.Biotech., selaku Dosen Penguji Anggota yang telah memberikan kritik dan saran demi kesempurnaan skripsi ini;
8. Staf Laboratorium Farmakologi, Patologi Klinik, Mikrobiologi, Bio Science Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
9. Staf Laboratorium Mikrobiologi dan Botani Fakultas MIPA Universitas Jember;
10. Petani umbi bit kecamatan pujon, Malang-Jawa Timur, pemasok umbi bit sebagai bahan baku utama;
11. Sahabat-sahabat tersayang Nur Sita, Ananda, Kristiani, Cahya, Adindhya, Eni Ilmiatin, Tita, Fitriana, Rahajeng, Richa, Dessy, Sani, dan Emastari yang selalu mendukung dan memberikan semangat dalam mengerjakan skripsi ini;
12. Teman-teman seperjuangan skripsi Iman Santoso, Ayung, Alfin Tiara, Yasa'a, Dewi Muflikhah, Karina, Ahmad Yusuf, dan Christian Agung;
13. Seluruh teman-teman FKG 2013 (JJMB) dan teman-teman KKN 70. Terima kasih atas motivasi, kerja sama, persaudaraan, dan kekompakkannya selama ini;
14. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 28 Desember 2016

Penulis

**DAFTAR ISI**

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN MOTO</b> .....	iii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iv
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vi
<b>RINGKASAN</b> .....	vii
<b>PRAKATA</b> .....	ix
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xi
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xv
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xvi
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xviii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	5
<b>1.3 Tujuan Penelitian</b> .....	5
<b>1.4 Manfaat Penelitian</b> .....	5
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	6
<b>2.1 Inflamasi</b> .....	6
2.1.1 Definisi Inflamasi.....	6
2.1.2 Mekanisme Terjadinya Inflamasi.....	6
2.1.3 Tanda-tanda Inflamasi secara Klinis.....	8
2.1.4 Macam-macam Inflamasi.....	10
<b>2.2 Polimorfonuklear Neutrofil</b> .....	12
2.2.1 Definisi Polimorfonuklear Neutrofil.....	12

2.2.2 Sifat-sifat Polimorfonuklear Neutrofil.....	13
2.2.3 Respon Neutrofil selama Inflamasi.....	15
<b>2.3 <i>Escherichia coli</i>.....</b>	<b>16</b>
2.3.1 Taksonomi <i>Escherichia coli</i> .....	16
2.3.2 Epidemiologi <i>Escherichia coli</i> .....	17
2.3.3 Mekanisme <i>Escherichia coli</i> Menyebabkan Inflamasi.....	17
<b>2.4 Obat Anti Inflamasi Non Steroid.....</b>	<b>20</b>
2.4.1 Definisi Obat Anti Inflamasi Non Steroid.....	20
2.4.2 Mekanisme Kerja Obat Anti Inflamasi Non Steroid.....	21
2.4.3 Efek Farmakodinamik.....	23
2.4.4 Efek Samping Obat Antiinflamasi Non Steroid.....	23
2.4.5 Natrium Diklofenak .....	23
<b>2.5 Umbi Bit Merah (<i>Beta vulgaris Linn</i>) .....</b>	<b>24</b>
2.5.1 Taksonomi.....	24
2.5.2 Kandungan Kimia.....	25
2.5.3 Efek Farmakologis.....	27
<b>2.6 Metode Menghitung Jumlah Polimorfonuklear Neutrofil.....</b>	<b>28</b>
<b>2.7 Metode Ekstraksi Tanaman Obat.....</b>	<b>29</b>
<b>2.8 Kerangka Konsep.....</b>	<b>31</b>
<b>2.9 Hipotesis.....</b>	<b>32</b>
<b>BAB 3.METODE PENELITIAN.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1 Jenis Penelitian .....</b>	<b>33</b>
<b>3.2 Rancangan Penelitian .....</b>	<b>33</b>
<b>3.3 Tempat dan Waktu Penelitian .....</b>	<b>33</b>
<b>3.4 Variabel Penelitian .....</b>	<b>33</b>
3.4.1 Variabel Bebas.....	33
3.4.2 Variabel Terikat.....	34
3.4.3 Variabel Terkendali.....	34

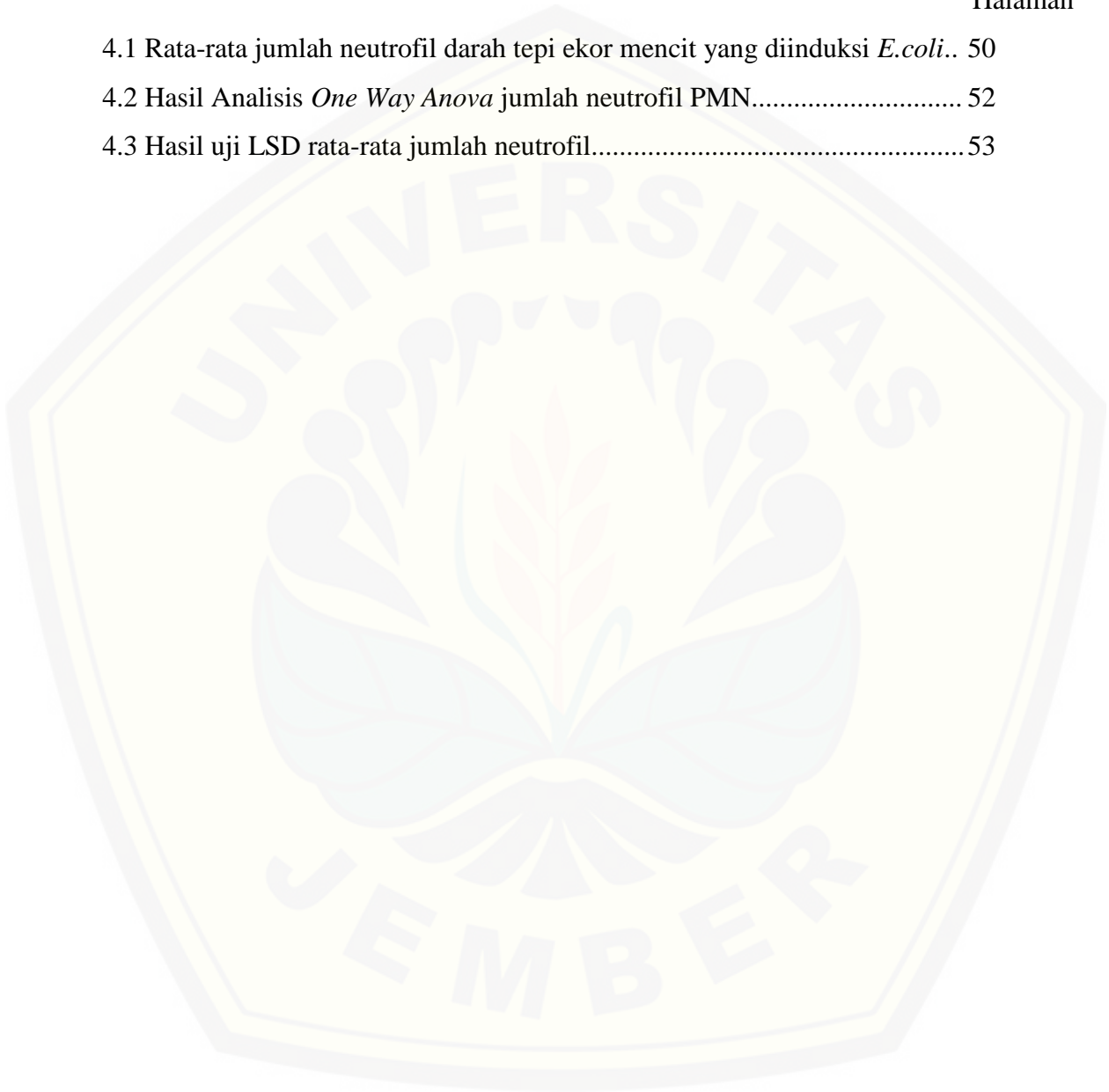
<b>3.5 Definisi Operasional</b> .....	34
3.5.1 Ekstrak Umbi Bit.....	34
3.5.2 Bakteri <i>Escherichia coli</i> .....	34
3.5.3 Polimorfonuklear Neutrofil.....	35
3.5.4 Hapusan Darah Tepi.....	35
<b>3.6 Jumlah dan Kriteria Sampel</b> .....	36
3.6.1 Besar Sampel Penelitian .....	36
3.6.2 Kriteria Sampel .....	36
<b>3.7 Alat dan Bahan Penelitian</b> .....	38
3.7.1 Alat Penelitian .....	38
3.7.2 Bahan Penelitian .....	39
<b>3.8 Prosedur Penelitian</b> .....	39
3.8.1 Permohonan <i>Ethical Clearance</i> .....	39
3.8.2 Persiapan Hewan Coba .....	39
3.8.3 Penetapan Dosis Natrium Diklofenak.....	40
3.8.4 Pembuatan Larutan Natrium Diklofenak.....	40
3.8.5 Pembuatan Ekstrak Umbi Bit Merah.....	40
3.8.6 Pembuatan Suspensi Bakteri <i>Escherichia coli</i> .....	42
3.8.7 Tahap Perlakuan.....	43
3.8.8 Tahap Pemeriksaan.....	46
3.9 Analisa Data.....	49
3.10 Alur Penelitian .....	49
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	50
4.1 Hasil Penelitian .....	50
4.2 Analisa Data .....	52
4.3 Pembahasan .....	54
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	60
5.1 Kesimpulan .....	60

5.2 Saran.....	60
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>61</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>69</b>



**DAFTAR TABEL**

	Halaman
4.1 Rata-rata jumlah neutrofil darah tepi ekor mencit yang diinduksi <i>E.coli</i> ..	50
4.2 Hasil Analisis <i>One Way Anova</i> jumlah neutrofil PMN.....	52
4.3 Hasil uji LSD rata-rata jumlah neutrofil.....	53

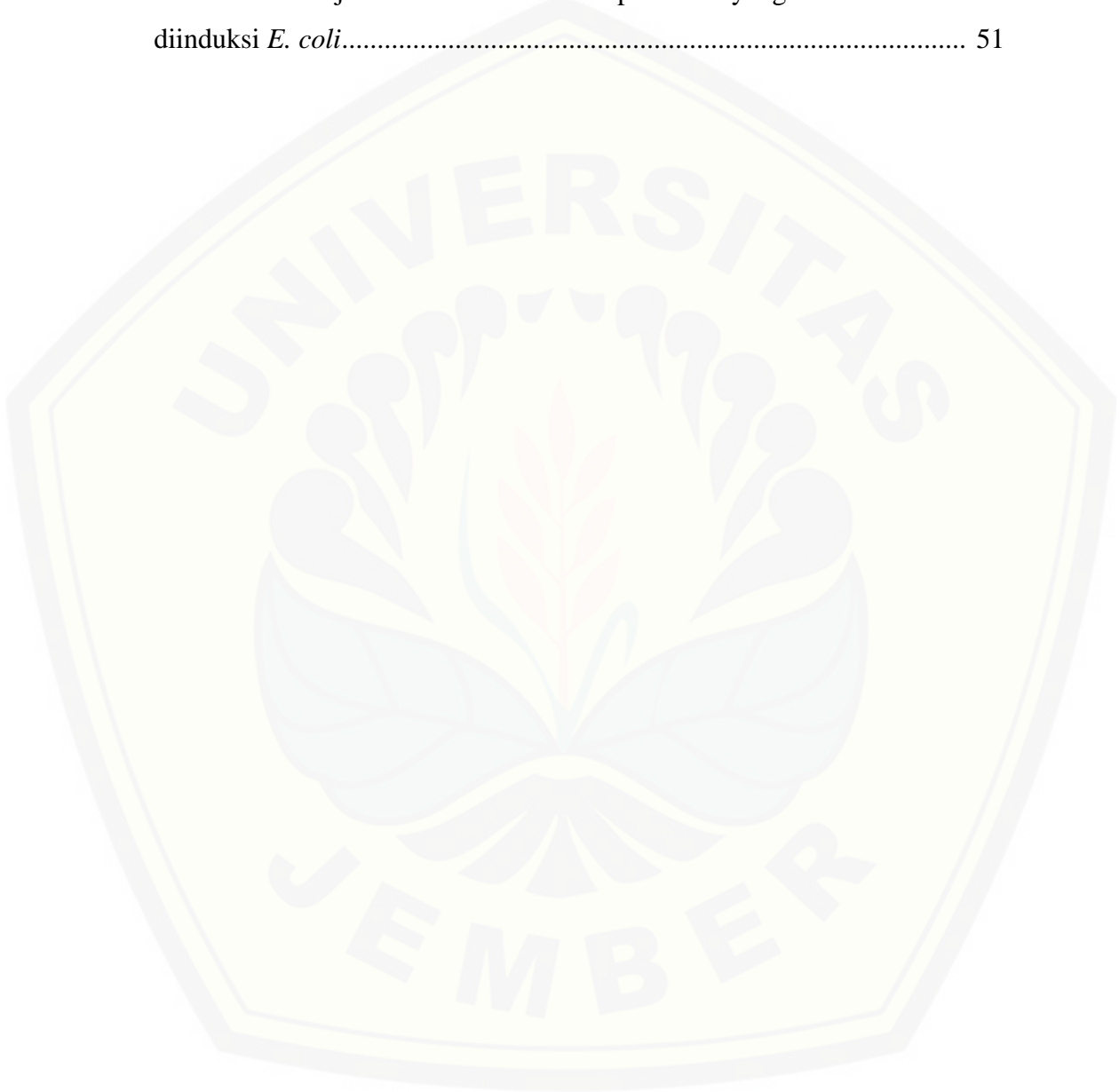




DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Gambaran mikroskopis neutrofil.....	13
2.2 <i>Escherichia coli</i> .....	16
2.3 <i>Escherichia coli</i> .....	16
2.4 Aktivitas dari LPS bakteri.....	19
2.5 <i>Beta vulgaris Linn</i> .....	25
2.6 Penghitungan Jumlah Leukosit dengan Cara <i>Differential</i> .....	29
3.1 Umbi Bit Merah.....	37
3.2 (a) Umbi bit merah ditimbang; (b) dipotong dan dianginkan, (c) dioven dengan suhu 50°C; (d) Umbi bit ditimbang dalam keadaan berat kering; (e) dihaluskan dengan ayakan 80 mesh; (f) simplisia halus.....	41
3.3 (a) Serbuk simplisia halus direndam dengan etanol 96%; (b) Maserat di evaporasi; (c) Maserat dipisahkan dengan cara filtrasi; (d) Penimbangan ekstrak umbi bit merah.....	42
3.4 Alur pembuatan suspensi <i>E.coli</i> .....	43
3.5 Mencit dipuasakan selama 8 jam.....	43
3.6 Mencit ditimbang dan dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan.....	44
3.7 <i>Escherichia coli</i> diinduksi secara subkutan.....	45
3.8 Pemberian (a) ekstrak umbi bit merah dan (b) natrium diklofenak, secara intragastric dengan sonde lambung.....	45
3.9 Pengambilan sampel darah.....	46
3.10 (a) Satu tetes darah dari ekor mencit diletakan pada ujung <i>object</i> <i>glass</i> ; (b) Pembuatan hapusan darah menggunakan <i>glass</i> penghapus; (c) Hapusan Darah.....	47

- 3.11 (a) Hapusan darah yang telah difiksasi menggunakan methanol 96%;  
(b) Pengecatan hapusan darah menggunakan Giemsa stain..... 48
- 4.1 Grafik rata-rata jumlah neutrofil darah tepi mencit yang  
diinduksi *E. coli*..... 51



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Konversi Dosis Natrium Diklofenak.....	69
B. Dosis Umbi bit merah( <i>Beta vulgaris Linn</i> ) .....	70
C. Perhitungan Rendemen Ekstrak.....	70
D. Analisis Data.....	71
D.1 Hasil Uji Normalitas Menggunakan Uji <i>Kolmogorov-Smirnov</i> .....	71
D.2 Hasil Uji Homogenitas Menggunakan <i>Levene Test</i> .....	72
D.3 Hasil Uji <i>One Way Anova</i> .....	72
D.4 Hasil Uji Beda Menggunakan Uji LSD.....	73
E. Foto Hasil Penelitian.....	74
F. Foto Alat dan Bahan Penelitian.....	75
G. Surat Keterangan Identifikasi Tanaman.....	77
H. Surat Keterangan Identifikasi Bakteri <i>Escherichia coli</i> .....	78
I. Surat <i>Ethical Clearance</i> .....	79
J. Surat Pembuatan Ekstrak.....	80

## BAB I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Inflamasi adalah suatu respons protektif normal terhadap luka jaringan yang disebabkan oleh trauma fisik, zat kimia yang merusak, atau zat-zat mikrobiologik. Proses ini adalah usaha tubuh untuk menginaktivasi atau merusak organisme yang menyerang, menghilangkan zat iritan dan mengatur derajat perbaikan jaringan (Mycek *et al.*, 2001). Inflamasi yang sering ditemukan dalam bidang kedokteran gigi, antara lain gingivitis, periodontitis, pulpitis dan inflamasi yang timbul pasca tindakan pencabutan gigi. Inflamasi yang terjadi biasanya sangat mengganggu pasien (Purnama, 2013).

Agen penyebab inflamasi, salah satunya adalah *Escherichia coli*. *Escherichia coli* dapat menghasilkan lipopolisakarida yang dikenal sebagai endotoksin. Endotoksin mempunyai potensi bervariasi tergantung pada jenis mikroorganismenya, tetapi efek yang ditimbulkan secara kualitatif adalah sama (Jawetz *et al.*, 2005). Endotoksin bakteri pada mamalia akan memberikan efek biologis yaitu inflamasi kulit, selain itu endotoksin juga akan mempengaruhi imunitas non spesifik terhadap infeksi bakteri, fagositosis dan sintesis antibodi. Endotoksin yang masuk sirkulasi akan memacu makrofag untuk mengeluarkan mediator-mediator radang dan sitokin proinflamasi, merangsang terjadinya adhesi neutrofil dan endotel vaskular, aktivasi faktor pembekuan darah dan terbentuknya mediator-mediator lain (Widodo dan Govinda, 2006). Inflamasi yang terjadi dapat dibagi menjadi akut dan kronis. Inflamasi akut diperantarai oleh granulosit, polimorfonuklear yang juga disebut neutrofil. Neutrofil adalah sel pertama yang nampak dalam ruang perivaskular. Di dalam sirkulasi sel ini hidup 4 sampai 8 jam, sedangkan di dalam jaringan 4 sampai 5 hari dan mati secara apoptosis (Guyton dan Hall, 2008).

Neutrofil memiliki kemampuan untuk menyerang dan menghancurkan bakteri, virus dan bahan-bahan merugikan lain yang menyerbu masuk ke dalam tubuh (Guyton dan Hall, 2008). Neutrofil juga mengandung bahan bakterisidal yang membunuh sebagian besar bakteri, bahkan bila enzim lisosomal gagal mencerna bakteri tersebut. Hal ini menjadi penting karena beberapa bakteri mempunyai selubung pelindung atau faktor lain yang mencegah penghancurannya oleh enzim pencernaan. Banyak efek mematikan dari beberapa bahan pengoksidasi kuat yang dibentuk oleh enzim dalam membran fagosom, atau oleh organel khusus. Bahan pengoksidasi ini meliputi sejumlah superoksida ( $O_2^-$ ), hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), dan ion-ion hidroksil ( $OH^-$ ), semuanya bersifat mematikan bagi sebagian besar bakteri, bahkan bila bahan pengoksidasi itu jumlahnya sedikit (Guyton dan Hall, 2014). Ketika jumlah neutrofil berlebihan, ini dapat merugikan karena ketika neutrofil memfagosit bakteri, sel ini akan mengeluarkan enzim secara ekstraseluler yang disebut proses degranulasi. Enzim-enzim tersebut merupakan enzim-enzim sumber ROS (*reactive oxygen species*) terutama NADPH (*nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate*), oksidase dan MPO (*mieloperoxidase*). Selain itu, proses ini juga menghasilkan granula-granula lisosomal neutrofil yang mengandung enzim hidrolitik dan proteolitik. Enzim-enzim ini apabila tumpah ke jaringan akan merusak struktur kolagen (Susilawati, 2008). Untuk mengurangi gejala-gejala inflamasi yang berlebihan biasanya digunakan kortikosteroid ataupun NSAID (*nonsteroidal anti-inflammatory drugs*).

Pemberian NSAID pada keadaan inflamasi mempunyai efek menurunkan rasa nyeri akibat proses inflamasi dalam waktu yang signifikan. Salah satu golongan NSAID adalah natrium diklofenak (Katzung, 2007). Pada bidang kedokteran gigi natrium diklofenak digunakan pada post operasi molar ketiga, operasi *maxillofacial*, trismus dan pembengkakan (Nagendra *et al.*, 2013). Natrium diklofenak adalah derivat asam fenil asetat yang memiliki kemampuan menekan tanda-tanda dan gejala-gejala inflamasi. Efek samping dari natrium diklofenak terjadi pada kira-kira 20%

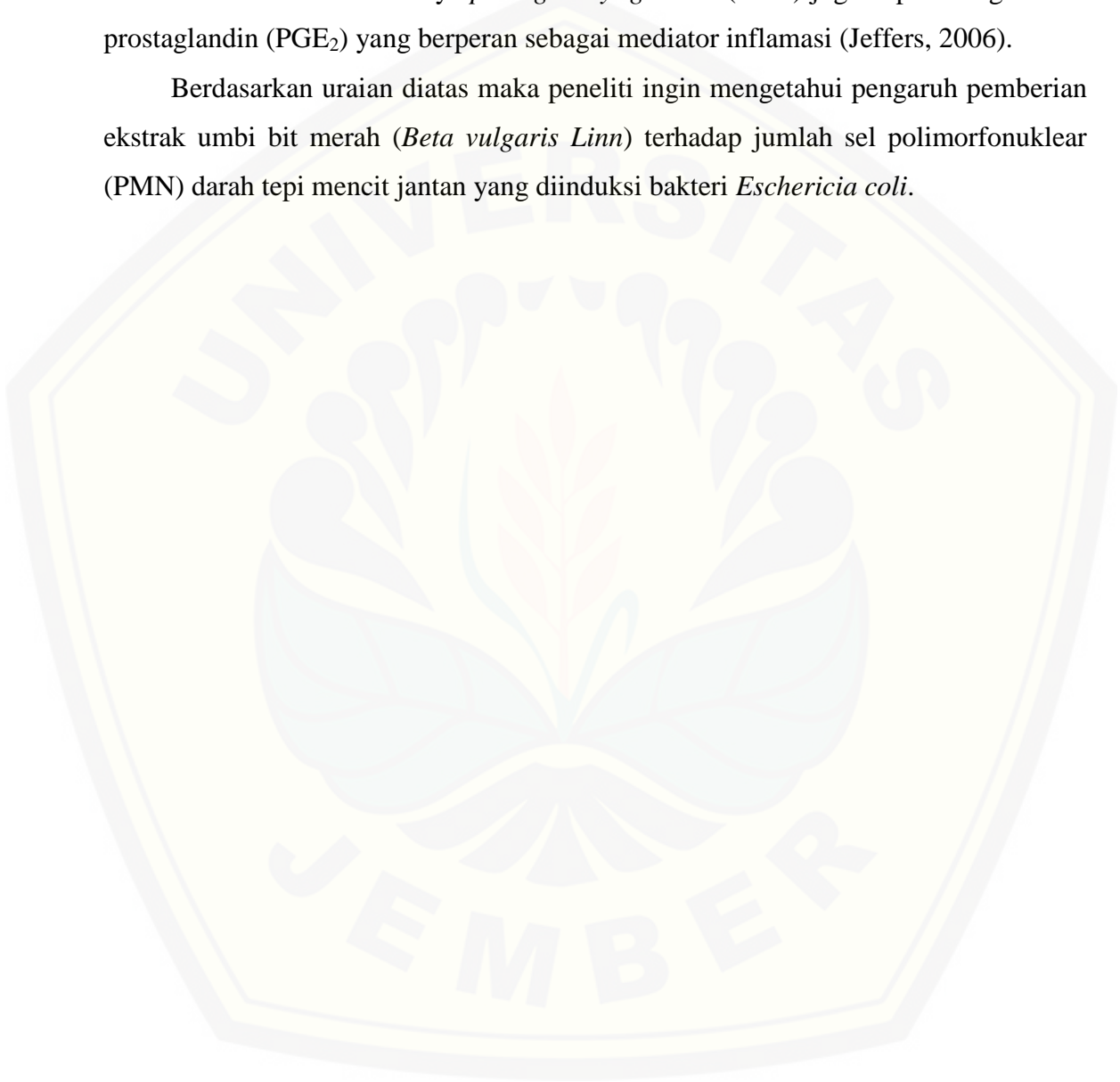
dari pasien meliputi distress gastrointestinal, pendarahan gastrointestinal yang terselubung, dan timbulnya ulserasi lambung (Katzung, 2007). Salah satu alternatif untuk mengatasi masalah tersebut adalah dengan menggunakan pengobatan tradisional yaitu dari bahan herbal.

Pengobatan tradisional dengan menggunakan obat herbal tidaklah asing bagi masyarakat Indonesia, karena sejak dahulu, pengobatan tradisional digunakan pada kalangan masyarakat luas. Ini sejalan dengan kebijakan pemerintah yang terus membina dan mengembangkan pelayanan kesehatan primer, baik sebagai obat preventif maupun kuratif (Nursiyah, 2013). Salah satu tanaman herbal yang saat ini mulai diminati adalah umbi bit merah (*Beta vulgaris Linn*) atau dikenal dengan nama *Ruby Queen*. Umbi bit merah memiliki kandungan yaitu asam folat sebesar 34%, berfungsi untuk menumbuhkan dan mengganti sel-sel yang rusak, kalium sebesar 14,8% berfungsi untuk memperlancar keseimbangan cairan di dalam tubuh, serat sebesar 13,6%, vitamin C sebesar 10,2% berfungsi untuk menumbuhkan jaringan dan menormalkan saluran darah, magnesium sebesar 9,8% berfungsi untuk menjaga fungsi otot, dan triptofan sebesar 1,4% (Shepherd *et al.*, 2015). Penelitian yang dilakukan sebelumnya oleh Ahuja dan Bapna (2015), dosis maksimal aman ekstrak umbi bit merah pada mencit dengan berat badan 20 gram adalah 2000 mg/kg BB mencit.

Hasil penelitian menunjukkan ekstrak umbi bit merah mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, sterol, triterpen, saponin dan tanin (Rao *et al.*, 2013). Penelitian secara *in vivo* maupun *invitro* menunjukkan bahwa flavonoid memiliki efek antiinflamasi, antibakteri, antialergi, antioksidan, antikarsinogen dan melindungi pembuluh darah (Sabir, 2003). Manfaat flavonoid antara lain untuk melindungi struktur sel, meningkatkan efektifitas vitamin C, antiinflamasi, mencegah keropos tulang dan sebagai antibiotik (Haris, 2011). Flavonoid berfungsi sebagai antiinflamasi dengan cara menghambat siklooksigenase dan lipooksigenase. Penghambat enzim siklooksigenase dan lipooksigenase dapat memberi harapan untuk pengobatan gejala

inflamasi, sedangkan tanin mampu mempengaruhi respons inflamasi dengan cara menghambat *inflammatory marker* mungkin dengan oksidasi dari tanin dan reduksi dari radikal bebas serta adanya *pentagalloyl glucose* (PGG) juga dapat menghambat prostaglandin (PGE<sub>2</sub>) yang berperan sebagai mediator inflamasi (Jeffers, 2006).

Berdasarkan uraian diatas maka peneliti ingin mengetahui pengaruh pemberian ekstrak umbi bit merah (*Beta vulgaris Linn*) terhadap jumlah sel polimorfonuklear (PMN) darah tepi mencit jantan yang diinduksi bakteri *Eschericia coli*.



## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian diatas dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

1. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak umbi bit merah terhadap jumlah sel PMN neutrofil darah tepi mencit jantan setelah diinduksi bakteri *Escherichia coli*?
2. Berapakah dosis ekstrak umbi bit merah yang efektif dalam menurunkan jumlah sel PMN neutrofil darah tepi mencit jantan setelah diinduksi bakteri *Escherichia coli*?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak umbi bit merah terhadap jumlah sel PMN neutrofil darah tepi mencit jantan setelah diinduksi *Escherichia coli*.
2. Mengetahui dosis ekstrak umbi bit merah yang efektif dalam menurunkan jumlah sel PMN neutrofil darah tepi mencit jantan setelah diinduksi *Escherichia coli*.

## 1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberi beberapa manfaat, yaitu :

1. Dapat memberi masukan terhadap ilmu pengetahuan tentang pengaruh pemberian ekstrak buah bit terhadap respons inflamasi.
2. Mengetahui dosis ekstrak umbi bit merah yang efektif dalam menurunkan jumlah sel PMN neutrofil sehingga dapat digunakan sebagai alternatif pengganti obat anti inflamasi.



## BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Inflamasi

#### 2.1.1 Definisi Inflamasi

Inflamasi adalah respons jaringan yang bersifat protektif terhadap cedera atau pengerusakan jaringan, yang berfungsi menghancurkan, mengencerkan atau mengurung agen yang menyebabkan cedera maupun jaringan yang cedera itu (Dorland, 2012).

Inflamasi adalah respons biologis kompleks dari jaringan vaskuler atas adanya bahaya, seperti patogen, kerusakan sel, atau iritasi. Ini adalah usaha perlindungan diri organisme untuk menghilangkan rangsangan penyebab luka dan inisiasi proses penyembuhan jaringan. Jika inflamasi tidak ada maka luka dan infeksi tidak akan sembuh dan akan mengalami kerusakan yang lebih parah. Inflamasi yang tidak terkontrol juga dapat menyebabkan penyakit, seperti demam, atherosklerosis, dan reumathoid arthritis (Gard, 2001).

Bila terjadi cedera jaringan, baik oleh bakteri, trauma, bahan kimia, panas, atau fenomena lainnya maka jaringan yang cedera itu akan melepaskan berbagai zat yang menimbulkan inflamasi sekunder yang dramatis di sekeliling jaringan yang tidak cedera. Keseluruhan kompleks perubahan jaringan ini disebut inflamasi (Guyton dan Hall, 2014).

#### 2.1.2 Mekanisme Terjadinya Inflamasi

Inflamasi merupakan suatu mekanisme penting untuk melindungi tubuh dari serangan mikroorganisme penginvasi, tetapi inflamasi juga menyebabkan ketidakmampuan yang menyertai berbagai kelainan. Biasanya respons inflamasi dimulai oleh antigen misalnya virus, bakteri, protozoa atau fungi maupun trauma.

Kerusakan sel yang menyertai inflamasi menyebabkan pelepasan enzim lisosom dari leukosit melalui membran sel, kemudian asam arakhidonat dilepaskan dari senyawa prekursor oleh fosfolipid. Enzim siklooksigenase merubah asam arakhidonat menjadi peroksida yang aktif secara biologis dan bermasa hidup singkat. Senyawa ini cepat dirubah menjadi prostaglandin dan tromboksan (Price dan Wilson, 2005).

Jaringan yang mengalami luka baik karena bakteri, trauma, bahan kimiawi, panas, atau setiap fenomena lainnya maka jaringan yang terluka itu akan melepaskan berbagai substansi yang menimbulkan perubahan yang dramatis dalam jaringan (Guyton dan Hall, 2014). Setelah timbul luka akan terjadi dilatasi arteriol lokal yang didahului oleh vasokonstriksi singkat. Peningkatan permeabilitas vaskuler tersebut disertai keluarnya protein plasma dan sel-sel darah putih ke dalam jaringan disebut eksudasi dan merupakan gambaran utama reaksi radang akut. Kemudian sel-sel darah putih melahap bahan yang bersifat asing, termasuk bakteri dan debris sel-sel nekrosis dan enzim lisosom terdapat didalamnya membantu pertahanan tubuh (Robbins dan Kumar, 2004).

Lipooksigenase adalah enzim yang mengubah asam arakhidonat menjadi leukotrien. Leukotrien mempunyai efek kemotaktik yang kuat terhadap eosinofil, neutrofil dan makrofag, serta meningkatkan bronkokonstriksi dan permeabilitas vaskuler. Kinin dan histamin juga dilepaskan pada tempat jaringan cedera, seperti juga komponen komplemen, serta produk leukosit lainnya dan trombosit. Perangsangan membran neutrofil menghasilkan rantai bebas yang memberi oksigen. Anion superoksida dibentuk oleh reduksi oksigen molekuler yang bisa merangsang produksi molekul relatif lain, seperti hidrogen peroksida dan rantai hidroksil. Interaksi senyawa ini dengan asam arakhidonat menghasilkan pembentukan senyawa kemotaktik yang kemudian disebut sebagai proses inflamasi (Katzung, 2007).

### 2.1.3 Tanda Inflamasi secara Klinis

#### a. Rubor (Kemerahan)

Kemerahan atau rubor biasanya merupakan hal pertama yang terlihat di daerah yang mengalami inflamasi. Waktu reaksi inflamasi mulai timbul, maka arteriol yang mensuplai daerah tersebut melebar, dengan demikian lebih banyak darah yang mengalir ke dalam mikrosirkulasi lokal. Kapiler-kapiler yang sebelumnya kosong atau sebagian saja meregang, dengan cepat saja terisi darah. Keadaan ini yang dinamakan hiperemia atau kongesti, bertanggung jawab atas warna merah lokal karena inflamasi akut (Price dan Wilson, 2005).

#### b. Kalor (Panas)

Panas atau kalor berjalan sejajar dengan kemerahan reaksi inflamasi akut. Sebenarnya, panas hanyalah merupakan suatu sifat reaksi inflamasi pada permukaan badan, yang dalam keadaan normal lebih dingin dari  $37^{\circ}\text{C}$ , yaitu suhu di dalam tubuh. Daerah peradangan kulit menjadi lebih panas dari sekelilingnya, sebab terdapat lebih banyak darah (pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ ) yang disalurkan dari dalam tubuh ke permukaan daerah yang terkena daripada yang disalurkan ke daerah yang normal (Price dan Wilson, 2005).

#### c. Tumor (Pembengkakan)

Pembengkakan ditimbulkan oleh pengiriman cairan dan sel-sel dari sirkulasi darah ke jaringan-jaringan interstisial. Campuran cairan dan sel yang tertimbun di daerah inflamasi disebut eksudat (Price dan Wilson, 2005).

#### d. Dolor (Rasa Sakit)

Rasa sakit atau dolor, dari reaksi inflamasi mungkin ditimbulkan melalui berbagai cara. Perubahan pH lokal atau konsentrasi lokal ion-ion tertentu dapat merangsang ujung-ujung saraf. Hal yang sama, pengeluaran zat kimia tertentu seperti histamin atau zat kimia bioaktif lainnya dapat merangsang saraf. Selain itu, pembengkakan jaringan yang meradang mengakibatkan peningkatan tekanan lokal yang tanpa diragukan lagi dapat menimbulkan rasa sakit (Price dan Wilson, 2005).

e. *Funcioloaesa* (Perubahan Fungsi)

Secara superfisial, mudah untuk mengerti mengapa bagian yang bengkak dan sakit disertai sirkulasi yang abnormal dan lingkungan kimiawi lokal yang abnormal berfungsi secara abnormal. Namun, sebetulnya kita tidak mengetahui secara mendalam dengan jalan bagaimana fungsi jaringan yang meradang terganggu (Price dan Wilson, 2005). Inflamasi ditandai oleh:

1. Vasodilatasi pembuluh darah lokal yang mengakibatkan terjadinya aliran darah setempat yang berlebihan
2. Peningkatan permeabilitas kapiler, menimbulkan banyak sekali kebocoran cairan ke dalam ruang interstisial
3. Sering kali terjadi pembekuan cairan di dalam ruang interstisial yang disebabkan oleh peningkatan sejumlah besar fibrinogen dan protein lainnya yang bocor dari kapiler
4. Migrasi sejumlah besar granulosit dan monosit ke dalam jaringan
5. Pembengkakan sel jaringan.

Beberapa dari sekian banyak produk jaringan yang menimbulkan reaksi ini adalah histamin, bradikinin, serotonin, prostaglandin, beberapa macam produk reaksi sistem komplemen, produk reaksi sistem pembekuan darah dan berbagai substansi yang disebut limfokin yang dilepaskan oleh sel T yang tersensitisasi. Beberapa dari substansi ini dapat mengaktifkan sistem makrofag dengan kuat, dan dalam waktu beberapa jam, makrofag mulai melahap jaringan yang telah dihancurkan. Tetapi pada suatu saat, makrofag selanjutnya juga dapat mencederai sel-sel jaringan yang masih hidup (Guyton dan Hall, 2014).

#### 2.1.4 Macam-Macam Inflamasi

Respons inflamasi terjadi dalam tiga fase dan diperantarai oleh mekanisme yang berbeda (Wilmana dan Gan, 2007):

##### a. Inflamasi akut

Inflamasi akut merupakan respons langsung dari diri terhadap agen jejas, berlangsung beberapa jam atau hari dan menunjukkan usaha tubuh untuk menghancurkan atau menetralkan agen penyebab. Penyebab inflamasi akut adalah organisme, trauma mekanik, zat-zat kimia, radiasi, perbedaan temperatur, kehilangan suplai darah, dan reaksi imunologi (Lawler *et al.*, 2002). Inflamasi akut merupakan respons langsung dari tubuh terhadap cedera atau kematian sel yang penyebabnya adalah infeksi mikrobial (misalnya bakteri piogenik dan virus) reaksi hipersensitifitas (misalnya parasit dan basil tuberkulosis), agen fisik (trauma, reaksi pengion, panas dan dingin), kimia (korosif, asam, basa, agen pengurang, dan toksin bakteri), dan jaringan nekrosis (infark iskemik) (Price dan Wilson, 2005).

Respons inflamasi akut relatif singkat, hanya beberapa jam atau beberapa hari. Terdapat tiga komponen penting inflamasi akut, yaitu perubahan penampang pembuluh darah akibat meningkatnya aliran darah, perubahan struktural pada pembuluh darah mikro yang memungkinkan protein plasma dan leukosit meninggalkan aliran darah, serta agregasi leukosit di lokasi jejas. Kejadian-kejadian yang berhubungan dengan proses inflamasi akut, sebagian besar dimungkinkan oleh produksi dan pelepasan berbagai macam mediator kimia. Meskipun jenis pengaruh jejas dapat bermacam-macam dan jaringan yang menyertai berbeda, tetapi mediator yang dilepaskan sama sehingga respons terhadap inflamasi tampak stereotip (Robbins dan Kumar, 1995).

Penimbunan sel-sel darah putih, terutama neutrofil dan monosit pada lokasi jejas merupakan aspek terpenting reaksi inflamasi. Sel-sel darah putih mampu melahap bahan yang bersifat asing, termasuk bakteri dan debris sel-sel nekrosis dan enzim lisosom yang terdapat didalamnya membantu pertahanan tubuh terhadap reaksi

inflamasi (Robbins dan Kumar, 1995). Adapun gambaran mikroskopis inflamasi akut antara lain (Lawler *et al*, 2002):

1. Konstriksi arteriol sementara, disebabkan oleh reflek neurogenik setempat dan dapat berkembang tetapi hanya bertahan beberapa menit.
2. Dilatasi arteriol berkepanjangan.
3. Kenaikan aliran darah setempat (hiperemi) dan dilatasi kapiler setempat.
4. Kenaikan permeabilitas kapiler.
5. Melambatnya aliran darah kapiler dan hemokonsentrasi intravaskuler. Kenaikan konsentrasi protein plasma menghasilkan peningkatan viskositas darah.
6. Hilangnya aliran darah aksial normal.
7. Peneplan leukosit.
8. Pengumpulan sel-sel darah merah ketengah membentuk rouleaux.
9. Terjadi perlekatan leukosit ke sel endotel kapiler.
10. Perpindahan akut oleh gerakan amuboid ke dalam jaringan perivaskuler melalui celah-celah diantara sel endotel.
11. Kemotaksis, proses dimana sel ditarik menuju substansi kimia tertentu yang konsentrasinya lebih tinggi.
12. Akumulasi sejumlah leukosit ditempat yang sesuai.
13. Fagositosis adalah fungsi utama leukosit yang meliputi penelanan, pencernaan, pembuangan benda-benda asing tertentu khususnya bakteri dan sel-sel rusak.

**b. Inflamasi Sub Akut**

Inflamasi sub akut merupakan fase respons inflamasi akut yang sedikit terlambat dan dikarakteristikkan dengan pengelompokan monosit dan limfosit serta pembentukan jaringan granulasi. Misalnya, satu sampai tiga hari setelah laserasi kulit, di tempat tersebut terjadi proliferasi yang dramatis dari sel endotel dan fibroblas. Keseluruhan sel-sel tersebut membentuk kapiler-kapiler halus yang tumbuh rapat ke dalam area injuri. Kapiler-kapiler ini menambah persediaan darah ke area tersebut

dan memberi unsur hara untuk kebutuhan metabolik yang bertambah pada jaringan meradang (Bellanti, 1993).

### c. Inflamasi Kronis

Inflamasi kronis terjadi saat menetapnya stimulus cedera dan ditandai dengan sebuah lesi disertai penyembuhan parsial dan bukti adanya perbaikan fibrosa (parut), makrofag dan limfosit dalam jumlah yang lebih besar, serta inflamasi yang persisten (Price dan Wilson, 2005). Perubahan yang berlangsung selama beberapa minggu, bulan atau bahkan bertahun-tahun ini menunjukkan usaha tubuh untuk melokalisasi agen penyebab dan memperbaiki kerusakan yang terjadi (Lawler *et al.*, 1992).

Inflamasi kronis dapat timbul melalui satu atau dua jalan. Inflamasi kronis dapat timbul menyusul inflamasi akut atau responsnya sejak awal bersifat kronik. Perubahan inflamasi akut menjadi kronik berlangsung bila respons inflamasi akut tidak dapat reda, disebabkan agen penyebab jejas yang menetap atau terdapat gangguan pada proses penyembuhan normal. Penyebab jejas inflamasi kronis ini sering memiliki toksisitas rendah dibandingkan dengan penyebab yang menimbulkan inflamasi akut. Terdapat kelompok besar penyebab inflamasi kronis yaitu infeksi persisten oleh mikroorganisme intrasel tertentu, kontak lama dengan bahan yang tidak dapat hancur, dan pada keadaan-keadaan tertentu yang menyebabkan terjadinya reaksi imun terhadap jaringan individu sendiri dan menyebabkan penyakit autoimun (Robbins dan Kumar, 1995).

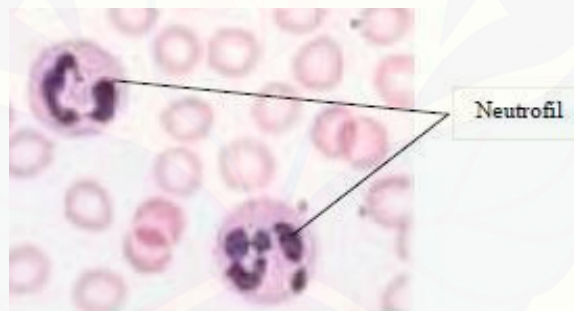
## 2.2 Polimorfonuklear Neutrofil (PMN)

### 2.2.1 Definisi Polimorfonuklear Neutrofil (PMN)

Jenis leukosit yang berperan dalam inflamasi kronis antara lain limfosit dan sel plasma (PMN neutrofil dalam inflamasi akut) yang memberikan reaksi pertahanan imunologis humoral dan seluler setempat, ada pula makrofag yang memfagosit dan membersihkan sisa-sisa jaringan setempat, kadang-kadang membentuk sel raksasa

berinti banyak (*multinucleated giant cell*). Kadang-kadang ditemukan polimorf eosinofil khususnya dalam reaksi parasit dan reaksi hipersensitivitas. Sel-sel dari jaringan terutama adalah fibroblas yang berpoliferasi dan sel-sel endotel yang membatasi kapiler, keduanya selalu ditemukan bersama dan membentuk jaringan granulasi (Lawler *et al.*, 2002).

Neutrofil adalah sel matang yang dapat menyerang dan menghancurkan bakteri, bahkan di dalam sirkulasi darah (Guyton dan Hall, 2014). PMN adalah nama lain dari neutrofil karena adanya bentuk nukleus yang bervariasi yang menjadi dasar nama lain bagi jenis sel ini. Neutrofil merupakan granulosit yang mempunyai nukleus tiga hingga lima lobus dihubungkan dengan benang kromatin dan sitoplasma mengandung granula yang sangat halus. Dalam darah sel ini terdapat 60-70% dari leukosit yang bersirkulasi (Juncqueira *et al.*, 1997).



**Gambar 2.1** Gambaran mikroskopis neutrofil (Sumber: Eroschenko, 2010)

### 2.2.2 Sifat-sifat Polimorfonuklear Neutrofil (PMN)

#### a. Sel darah putih memasuki ruang jaringan dengan cara diapedesis

Neutrofil dan monosit dapat terperas melalui pori-pori kapiler darah dengan cara diapedesis. Jadi, walaupun sebuah pori ukurannya jauh lebih kecil daripada sel, pada suatu ketika sebagian kecil sel tersebut meluncur melalui pori-pori. Bagian yang



meluncur tersebut untuk sesaat terkonstriksi sesuai dengan ukuran pori (Guyton dan Hall, 2014).

b. Sel darah putih bergerak melewati ruang jaringan dengan gerakan amuboid

Neutrofil dan makrofag dapat bergerak melalui jaringan dengan gerakan amuboid. Beberapa sel dapat bergerak dengan kecepatan 40  $\mu\text{m}/\text{menit}$ , sepanjang ukuran tubuhnya sendiri setiap menit (Guyton dan Hall, 2014).

c. Sel darah putih tertarik ke daerah jaringan yang meradang dengan cara kemotaksis

Banyak jenis zat kimia dalam jaringan yang dapat menyebabkan neutrofil dan makrofag bergerak menuju sumber zat kimia. Bila suatu jaringan mengalami peradangan, banyak produk dibentuk sehingga menyebabkan kemotaksis ke arah area yang mengalami peradangan. Zat-zat ini antara lain toksin bakteri atau virus, produk degeneratif jaringan yang meradang itu sendiri, produk reaksi kompleks komplemen dan produk reaksi yang disebabkan oleh pembekuan plasma di area yang meradang. Proses kemotaksis bergantung pada perbedaan konsentrasi zat-zat kemotaktik. Pada daerah dekat sumber, konsentrasi zat paling tinggi, dan menyebabkan gerakan sel darah putih yang terarah. Kemotaksis efektif sampai jarak 10  $\mu\text{m}$  dari jaringan yang meradang (Guyton dan Hall, 2014).

d. Fagositosis oleh neutrofil

Neutrofil sewaktu memasuki jaringan sudah merupakan sel-sel matang yang dapat segera memulai fagositosis. Ketika mendekati suatu partikel untuk difagositosis, mula-mula neutrofil melekatkan diri pada partikel kemudian menonjolkan pseudopodia ke semua jurusan di sekeliling partikel. Pseudopodia bertemu satu sama lain pada sisi yang berlawanan dan bergabung. Hal ini menciptakan ruangan tertutup yang berisi partikel yang sudah difagositosis. Kemudian ruangan ini berinvaginasi ke dalam rongga sitoplasma dan melepaskan diri dari membran sel bagian luar untuk membentuk vesikel fagositik yang mengapung dengan bebas di dalam sitoplasma. Sebuah sel neutrofil biasanya dapat

memfagositosis 3 sampai 20 bakteri sebelum sel neutrofil itu sendiri menjadi inaktif dan mati (Guyton dan Hall, 2014).

### 2.2.3 Respons Neutrofil selama Inflamasi

Invasi neutrofil sebagai garis pertahanan kedua. Dalam jam pertama setelah inflamasi dimulai sejumlah besar neutrofil dari darah mulai menginvasi daerah yang meradang. Hal ini disebabkan oleh sitokin inflamasi, misalnya TNF (*Tumor Necrosis Factor*), IL-1 (Interleukin-1) dan produk biokimia lainnya yang diproduksi oleh jaringan inflamasi yang akan memicu reaksi berikut ini (Guyton dan Hall, 2014) :

- a. Produk tersebut menyebabkan peningkatan penampilan molekul adhesi, seperti selektin dan molekul adhesi intrasel-1 (*Intracellular Adhesion Molecule-1*) pada permukaan sel endotel kapiler dan venula. Molekul adhesi ini berinteraksi dengan molekul integrin komplementer di neutrofil, menyebabkan neutrofil menempel di dinding kapiler dan venula pada daerah inflamasi. Efek ini disebut marginasi.
- b. Produk ini juga menyebabkan longgarnya perlekatan interseluler antara sel endotel kapiler dan venula kecil, sehingga terbuka cukup lebar yang memungkinkan neutrofil untuk bergerak lambat melalui proses diapedesis secara langsung dari darah ke dalam ruang-ruang jaringan.
- c. Produk inflamasi lain menyebabkan kemotaksis neutrofil menuju ke arah daerah yang cedera.

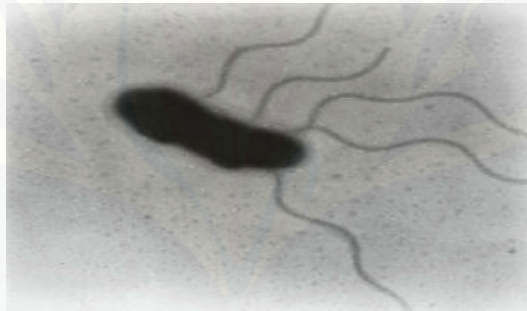
Jadi, dalam waktu beberapa jam setelah dimulainya kerusakan jaringan, tempat tersebut akan diisi oleh neutrofil. Oleh karena neutrofil darah telah terbentuk sel matang, maka sel-sel tersebut sudah siap untuk segera memulai fungsinya untuk membunuh bakteri dan menyingkirkan benda-benda asing (Guyton dan Hall, 2014).

## 2.3 *Escherichia coli*

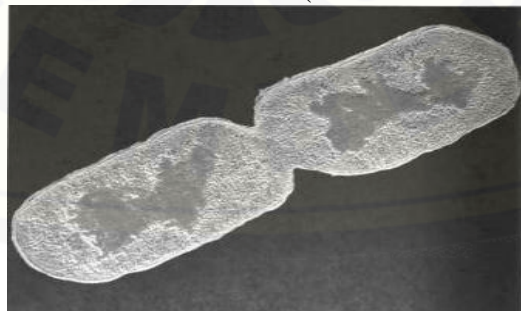
### 2.3.1 Taksonomi

Klasifikasi *Escherichia coli* menurut Bergey dalam Cappucino dan Sherman (1998) adalah:

Kingdom : Monera  
Divisi : Firmicutes  
Kelas : Bacilli  
Ordo : Bacillales  
Famili : Escherichiaceae  
Genus : Escherichia  
Spesies : *Escherichia coli*



**Gambar 2.2** *Escherichia coli* (Sumber: Howard, 2008)



**Gambar 2.3** *Escherichia coli* (Sumber: Burgess, 1990)

### 2.3.2 Epidemiologi *Escherichia coli*

Sejumlah besar *E. coli* terdapat dalam saluran sistem gastrointestinal. Meskipun organisme ini dapat oportunistik patogen ketika bakteri masuk ke rongga peritoneum. *E. coli* yang menyebabkan gastrointestinal dan penyakit ekstraintestinal telah memperoleh faktor virulensi tertentu dikodekan pada plasmid atau DNA bakteriofag. Efektivitas *E. coli* sebagai patogen dapat diilustrasikan sebagai berikut :

- a. Batang Gram-negatif yang paling umum diisolasi dari pasien dengan sepsis
- b. Bertanggung jawab dalam menyebabkan lebih dari 80% dari infeksi saluran kemih, serta banyak infeksi didapat di rumah sakit; dan
- c. Penyebab yang menonjol dari gastroenteritis.

*Escherichia coli* yang merupakan bagian dari flora normal pasien yang mampu membangun infeksi ketika pertahanan pasien terganggu (Murray *et al.*, 2013).

### 2.3.3 Mekanisme *Escherichia coli* Menyebabkan Inflamasi

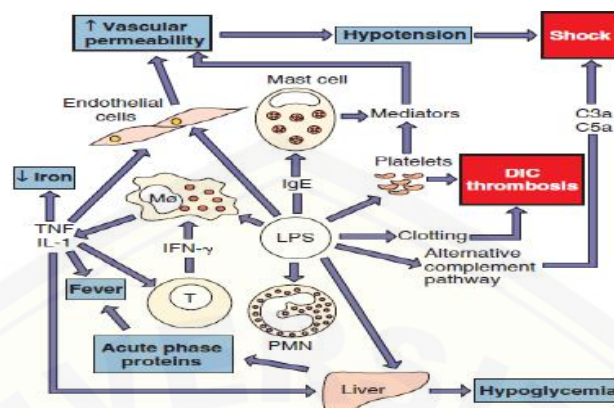
*Escherichia coli* adalah anggota flora normal usus. *E. coli* berperan penting dalam sintesis vitamin K, konversi pigmen-pigmen empedu, asam-asam empedu dan penyerapan zat-zat makanan. *E. coli* termasuk ke dalam bakteri heterotrof yang memperoleh makanan berupa zat organik dari lingkungannya karena tidak dapat menyusun sendiri zat organik yang dibutuhkannya. Zat organik diperoleh dari sisa organisme lain. Bakteri ini menguraikan zat organik dalam makanan menjadi zat anorganik, yaitu CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, energi, dan mineral. Di dalam lingkungan, bakteri pembusuk ini berfungsi sebagai pengurai dan penyedia nutrisi bagi tumbuhan (Ganiswara, 2004).

*Escherichia coli* memiliki berbagai faktor virulensi. Selain faktor-faktor umum yang dimiliki oleh semua anggota *Enterobacteriaceae*, strain *E. coli* memiliki faktor virulensi khusus yang dapat ditempatkan ke dalam dua kategori umum, yaitu adhesins dan eksotoksin (Murray *et al.*, 2013). *E. coli* menjadi

patogen jika jumlah bakteri ini dalam saluran pencernaan meningkat atau berada di luar usus. *E. coli* menghasilkan enterotoksin yang menyebabkan beberapa kasus diare. *E. coli* berasosiasi dengan enteropatogenik menghasilkan enterotoksin pada sel epitel (Jawetz *et al.*, 2005).

Dalam tubuh bakteri harus menempel atau melekat pada sel inang, biasanya adalah epitel. Salah satu komponen penyusun dinding sel bakteri, khususnya dari golongan Gram negatif yang sering menimbulkan efek yang merugikan adalah lipopolisakarida (LPS) yang kemudian dikenal dengan istilah endotoksin. Di samping lipopolisakarida, dinding sel juga tersusun dari mukopeptida, lipid, lipoprotein dan bahan yang lain. Salah satu yang menarik dari endotoksin adalah sifat toksik dan antigenik yang dimilikinya. Sifat toksin dikaitkan dengan senyawa lipid penyusunnya, sedang penyusun yang lain yaitu polisakarida berperan dalam membentuk sifat antigenik. Endotoksin mempunyai potensi bervariasi tergantung pada jenis mikroorganismenya, tetapi efek yang ditimbulkan secara kualitatif adalah sama (Jawetz *et al.*, 2005).

Salah satu aktivitas endotoksin bakteri dari lipopolisakarida (LPS) yaitu dapat mengaktifkan hampir setiap mekanisme kekebalan tubuh, serta dapat membentuk *clotting pathway*, yang secara bersama membuat LPS menjadi salah satu peningkatan stimuli imun, dikenal dengan istilah DIC (*Disseminated Intravascular Coagulation*) yang terdiri dari IFN- $\gamma$ , IgE, IL-1, polimorfonuklear neutrofil, TNF (Gambar 2.4).



**Gambar 2.4** Aktivitas dari LPS bakteri (Murray *et al.*, 2013).

Endotoksin bakteri pada mamalia mempunyai efek biologis seperti reaksi epinefrin, inflamasi pada kulit, toleransi dan resistensi non spesifik terhadap injeksi, proteksi efek vaskular dan haemodinamik terhadap radiasi, metabolisme karbohidrat, efek seluler, abortus, artritis, stimulasi produk interferon, dan sebagainya. Selain itu endotoksin juga akan mempengaruhi imunitas non spesifik terhadap infeksi bakteri, fagositosis dan sintesis antibodi. Karena sifat resistensi non spesifik tersebut, binatang yang diinjeksi endotoksin berulang-ulang akan menjadi tidak responsif terhadap pirogenitas dan efek biologis yang lain. Endotoksin yang masuk sirkulasi akan memacu makrofag untuk mengeluarkan mediator, misalnya TNF dan Interleukin-1. Sitokin proinflamasi ini merangsang terjadinya adhesi netrofil dan endotel vaskular, aktivasi faktor pembekuan darah dan terbentuknya mediator-mediator lain seperti PAF (*Platelet Activating Factor*), protease, prostaglandin, leukotrien dan juga dibebaskannya sitokin antiinflamasi seperti Interleukin-6 dan Interleukin-1. Melalui proses ini juga dirangsang sistem komplemen dan akan mengakibatkan pula neutrofil teraktivasi dan keluarnya radikal bebas yang toksik terhadap sel. Mediator tersebut juga akan menyebabkan depresi miokard sehingga dapat menimbulkan renjatan (Widodo dan Govinda, 2006).

Ketika host dalam keadaan normal, *E. coli* dapat mencapai aliran darah dan menyebabkan sepsis yang terjadi setelah adanya infeksi (Jawetz *et al.*, 2005). Sepsis adalah adanya mikroorganisme patogenik atau toksinnya di dalam darah atau jaringan lainnya (Dorland, 2012). Sepsis merupakan proses infeksi dan inflamasi yang kompleks dimulai dengan rangsangan endotoksin atau eksotoksin terhadap sistem imunologi, sehingga terjadi aktivasi makrofag, sekresi berbagai sitokin dan mediator, aktivasi komplemen dan neutrofil, sehingga terjadi disfungsi dan kerusakan endotel, aktivasi sistem koagulasi dan trombosit yang menyebabkan gangguan perfusi ke berbagai jaringan dan disfungsi atau kegagalan organ *multiple* (Cisela dan Guerrant, 2003).

Manifestasi patologik penyakit bakteri pada usus halus dan kolon cukup bervariasi oleh karena patogen bakteri yang bermacam-macam. Sebagian besar infeksi bakteri memperlihatkan pola kerusakan epitel permukaan yang non spesifik, disertai peningkatan angka mitotik di kriptus mukosa dan penurunan pematangan sel epitel permukaan. Hal ini diikuti hiperemia dan edema lamina propria serta infiltrasi neutrofil ke dalam lamina propria dan lapisan epitel dengan derajat bervariasi. Pada infeksi parah oleh bakteri penghasil sitotoksin atau entero invasif, terjadi destruktif progresif mukosa yang menyebabkan erosi, ulserasi, dan inflamasi submukosa berat (Robbins dan Kumar, 2004).

## **2.4 Obat Anti Inflamasi Non Steroid (AINS)**

### **2.4.1 Definisi Obat Anti Inflamasi Non Steroid**

Obat anti inflamasi non steroid merupakan obat yang dapat mengurangi inflamasi dan meredakan nyeri melalui penekanan pembentukan prostaglandin (PG) dengan cara menghambat enzim siklooksigenase (COX). AINS banyak digunakan untuk pereda nyeri pada organ atau sistem lain seperti sakit kepala, nyeri visera, kolik ureter dan bilier, dismenore dan pada nyeri akut akibat trauma (Soeroso, 2008).

#### 2.4.2 Mekanisme Kerja Obat Anti Inflamasi Non Steroid

Mekanisme kerja berhubungan dengan sistem biosintesis prostaglandin. Penelitian lanjutan telah membuktikan bahwa produksi prostaglandin akan meningkat bila sel mengalami kerusakan. Walaupun *in vitro* obat AINS diketahui menghambat berbagai reaksi biokimia lainnya, hubungannya dengan efek analgesik, antipiretik, dan antiinflamasi belum jelas. Selain itu obat AINS secara umum tidak menghambat biosintesis leukotrien, pada beberapa orang sintesis meningkat dan dikaitkan dengan reaksi hipersensitivitas yang bukan berdasarkan pembentukan antibodi (Syarif *et al.*, 2012).

Golongan obat ini menghambat enzim siklooksigenase sehingga konversi asam arakhidonat menjadi PGG<sub>2</sub> (Siklikendoperoksidase) terganggu. Setiap obat menghambat siklooksigenase dengan kekuatan dan selektivitas yang berbeda. Enzim siklooksigenase terdapat dalam dua isoform, yaitu COX-1 dan COX-2. Kedua isoform tersebut dikode oleh gen yang berbeda dan ekspresinya bersifat unik. Secara garis besar COX-1 esensial dalam pemeliharaan berbagai fungsi dalam kondisi normal di berbagai jaringan khususnya ginjal, saluran cerna dan trombosit. Di mukosa lambung, aktivasi COX-1 menghasilkan prostasiklin, yang bersifat sitoprotektif. Siklooksigenase-2 semula diduga diinduksi berbagai stimulus inflamator, termasuk sitokin, endotoksin, dan faktor pertumbuhan (*growth factor*). Ternyata sekarang COX-2 mempunyai fungsi fisiologis yaitu di ginjal, jaringan vaskuler dan pada proses perbaikan jaringan. Tromboksan A<sub>2</sub>, yang disintesis trombosit oleh COX-1, menyebabkan agregasi trombosit, vasokonstriksi, dan proliferasi otot polos. Sebaliknya prostasiklin (PGI<sub>2</sub>) yang disintesis oleh COX-2 di endotel makrovaskular melawan efek tersebut dan menyebabkan penghambatan agregasi trombosit, vasodilatasi dan efek anti-proliferatif (Syarif *et al.*, 2012).

Mekanisme dan sifat dasar obat analgesik anti inflamasi non steroid merupakan suatu kelompok sediaan dengan struktur kimia yang sangat heterogen, dimana efek



samping dan efek terapinya berhubungan dengan kesamaan mekanisme kerja sediaan ini pada enzim siklooksigenase (COX). Kemajuan penelitian dalam dasawarsa terakhir memberikan penjelasan mengapa kelompok yang heterogen tersebut memiliki kesamaan efek terapi dan efek samping, ternyata hal ini terjadi berdasarkan atas penghambatan biosintesis prostaglandin. Mekanisme kerja yang berhubungan dengan biosintesis prostaglandin ini mulai dilaporkan pada tahun 1971 oleh Vane dan kawan-kawan yang memperlihatkan secara *in vitro* bahwa dosis rendah aspirin dan indometason menghambat produksi enzimatik prostaglandin. Dimana juga telah dibuktikan bahwa jika sel mengalami kerusakan maka prostaglandin akan dilepas. Namun demikian obat AINS secara umum tidak menghambat biosintesis leukotrien, yang diketahui turut berperan dalam inflamasi (Fajriani, 2008).

Obat anti inflamasi non steroid menghambat enzim siklooksigenase (COX) sehingga konversi asam arakidonat menjadi PGG<sub>2</sub> terganggu. Setiap obat menghambat siklooksigenase dengan cara yang berbeda. AINS dikelompokkan berdasarkan struktur kimia, tingkat keasaman dan ketersediaan awalnya. Dan sekarang yang populer dikelompokkan berdasarkan selektifitas hambatannya pada penemuan dua bentuk enzim *constitutive* siklooksigenase-1 (COX-1) dan *inducible* siklooksigenase-2 (COX-2). COX-1 terdapat di berbagai jaringan tubuh dan berfungsi dalam mempertahankan fisiologi tubuh seperti produksi mukus di lambung tetapi sebaliknya, COX-2 merupakan enzim inducibel yang umumnya tidak terpantau di kebanyakan jaringan, tetapi akan meningkat pada keadaan inflamasi atau patologik. AINS yang bekerja sebagai penyekat COX akan berikatan pada bagian aktif enzim, pada COX-1 dan atau COX-2, sehingga enzim ini menjadi tidak berfungsi dan tidak mampu merubah asam arakidonat menjadi mediator inflamasi prostaglandin (Fajriani, 2008).

#### 2.4.3 Efek Farmakodinamik

Kebanyakan obat mirip aspirin, terutama yang baru, lebih dimanfaatkan sebagai antiinflamasi pada pengobatan kelainan muskuloskeletal, misalnya artritis reumatoid, osteoarthritis, dan spondilitis ankilosa. Bahwa obat mirip aspirin ini hanya meringankan gejala nyeri dan inflamasi yang berkaitan dengan penyakitnya secara simptomatik, tidak menghentikan, memperbaiki atau mencegah kerusakan jaringan pada kelainan muskuloskeletal (Nafrialdi, 2007).

#### 2.4.4 Efek Samping Obat Antiinflamasi Non Steroid

Antiinflamasi Non Steroid juga memiliki efek samping serupa, karena didasari oleh hambatan pada sistem biosintesis prostaglandin. Selain itu, kebanyakan obat bersifat asam sehingga lebih banyak terkumpul dalam sel yang bersifat asam misalnya di lambung, ginjal dan jaringan inflamasi. Secara umum, AINS berpotensi menyebabkan efek samping pada tiga sistem organ, yaitu saluran cerna, ginjal dan hati. Efek samping yang paling sering terjadi adalah tukak peptik yang terkadang disertai anemia sekunder akibat perdarahan saluran cerna (Nafrialdi, 2007).

#### 2.4.5 Natrium Diklofenak

Natrium diklofenak merupakan golongan AINS derivat asam fenil asetat yang dipakai untuk mengobati penyakit reumatik dengan kemampuan menekan tanda-tanda dan gejala-gejala inflamasi. Natrium diklofenak cepat diserap sesudah pemberian secara oral, tetapi bioavailabilitas sistemiknya rendah hanya antara 30-70% sebagai efek metabolisme lintas pertama di hati. Waktu paruh natrium diklofenak juga pendek yakni hanya 1-2 jam. Efek-efek yang tidak diinginkan bisa terjadi pada kira-kira 20% dari pasien meliputi distress gastrointestinal, pendarahan gastrointestinal yang terselubung, dan timbulnya ulserasi lambung (Katzung, 2007).

Rute pemberian obat topikal memiliki tujuan lokal. Tujuan lokal hanya membutuhkan permeasi obat melalui kulit pada organ atau jaringan tertentu tubuh

yang mengalami gangguan, dengan harapan hanya sedikit atau tidak ada obat yang terakumulasi di sistemik. Untuk menekan tanda-tanda dan gejala-gejala inflamasi maka natrium diklofenak harus berpenetrasi sampai ke jaringan sasarannya yakni tulang (Ranade dan Hollinger, 2004).

## 2.5 Umbi Bit Merah (*Beta vulgaris* Linn)

### 2.5.1 Taksonomi

Klasifikasi lengkap umbi bit merah menurut Splittstoesser (1984) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Superdivision	: Spermatophyta
Division	: Magnoliophyta
Class	: Magnoliopsida
Subclass	: Caryophyllidae
Ordo	: Caryophyllales
Family	: Chenopodiaceae
Genus	: Beta
Spesies	: <i>Beta vulgaris</i> Linn



**Gambar 2.5** *Beta vulgaris* Linn. (a) Tanaman umbi bit merah secara keseluruhan, (b) Bunga umbi bit, (c) Umbi bit merah (Sumber: Navazio *et al.*, 2010)

### 2.5.2 Kandungan Kimia

Hasil penelitian menunjukkan ekstrak umbi bit merah mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, sterol, triterpen, saponin dan tanin (Rao *et al.*, 2013). Umbi bit merah mengandung komposisi aktif seperti karotenoid (Dias *et al.*, 2009), glycine betanine (Zwart *et al.*, 2003), saponin (Atamanova dan Brezhneva, 2005), betacyanine (Patkai *et al.*, 1997), betanine, polifenol dan flavonoid (Vali *et al.*, 2007).

a. Tanin

Berbagai teori menyebutkan bahwa tanin mempunyai efek antiseptik, dapat mencegah kerusakan yang disebabkan oleh serangga dan jamur. Tanin juga berkhasiat dalam perawatan luka bakar karena menyebabkan protein dapat terendap pada jaringan yang terbuka sehingga dapat melindungi lapisan dibawahnya dan merangsang regenerasi. Beberapa tanin terbukti mempunyai aktifitas antioksidan, menghambat pertumbuhan tumor, dan menghambat enzim seperti reverse transkriptase dan DNA topoisomerase (Robinson, 1995).

b. Flavonoid

Flavonoid bersifat antibakteri karena mampu berinteraksi dengan DNA bakteri. Hasil interaksi ini menyebabkan perubahan permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom, dan lisosom (Sabir, 2003). Sifat antiinflamasi dari flavonoid telah terbukti baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Mekanisme flavonoid sebagai antiinflamasi yaitu (Sabir, 2003):

1. Menghambat pelepasan asam arakhidonat dan sekresi enzim lisosom dari sel neutrofil dan sel endotelial
2. Menghambat fase proliferasi dan fase eksudasi dari proses inflamasi

c. Polifenol

Saat ini makanan yang mengandung polifenol cukup menarik perhatian karena berperan sebagai antioksidan. Antioksidan mampu mengikat radikal bebas sehingga diduga mampu menghambat aktivasi karsinogen dan mengurangi resiko terjangkitnya penyakit kronis (Robinson, 1995).

d. Triterpenoid

Senyawa triterpenoid mempunyai banyak kegunaan, antara lain dapat mengobati diabetes, gangguan menstruasi, patukan ular, gangguan kulit, kerusakan hati dan malaria (Robinson, 1995), antiinflamasi (Aguirre *et al.*, 2009), analgesik (Delporte *et al.*, 2007) dan sitotoksik (Atenza *et al.*, 2009).

e. Saponin

Saponin memiliki kemampuan sebagai pembersih dan antiseptik yang berfungsi membunuh atau mencegah pertumbuhan mikroorganisme (Robinson, 1995).

f. Alkaloid

Alkaloid adalah suatu golongan senyawa organik yang banyak ditemukan di alam. Hampir seluruh senyawa alkaloid berasal dari tumbuh-tumbuhan dan tersebar luas dalam berbagai jenis tumbuhan. Semua alkaloid mengandung paling sedikit satu atom nitrogen ini merupakan bagian dari cincin heterosiklik (Lenny, 2006). Senyawa ini terdapat dalam tumbuhan sebagai garam berbagai asam organik dan sering ditangani di laboratorium sebagai garam dengan asam hidroklorida dan asam sulfat. Garam dan alkaloid bebas berupa senyawa padat berbentuk kristal tanpa warna. Beberapa alkaloid dapat berupa cairan (Robinson, 1991).

### 2.5.3 Efek Farmakologis

Umbi bit merah memiliki kandungan yaitu asam folat sebesar 34%, berfungsi untuk menumbuhkan dan mengganti sel-sel yang rusak, kalium sebesar 14,8% berfungsi untuk memperlancar keseimbangan cairan di dalam tubuh, serat sebesar 13,6%, vitamin C sebesar 10,2% berfungsi untuk menumbuhkan jaringan dan menormalkan saluran darah, magnesium sebesar 9,8% berfungsi untuk menjaga fungsi otot, dan triptofan sebesar 1,4% (Yanti, 2012). Umbi bit merah mampu menghancurkan sel tumor dan sel kanker, mencegah penyakit stroke dan jantung, mampu berfungsi sebagai obat hati dan kantong empedu, menurunkan kolesterol, membersihkan dan menetralkan racun di dalam tubuh, memperkuat fungsi darah dan mengatasi anemia, memproduksi sel-sel darah merah, memperkuat sistem peredaran darah dan sistem kekebalan tubuh, mengobati infeksi dan inflamasi, menghasilkan energi dan menyeimbangkan tubuh (Handayani, 2011).

## 2.6 Metode Menghitung Jumlah Polimorfonuklear Neutrofil

Prinsip metode ini yaitu setetes darah dibuat hapusan pada *slide*, dicat, dan diperiksa di bawah mikroskop. Dengan jalan ini dapat dihitung jumlah leukosit per lapang pandang (Gandasoebrata, 2007). Tiap-tiap penghitungan leukosit harus dikontrol dengan pemeriksaan sediaan hapusan darahnya. Penaksiran jumlah leukosit harus dilakukan pada daerah penghitung (*counting area*) yaitu bagian untuk hapusan tempat eritrosit–eritrosit terletak berdampingan satu dengan yang lainnya, tetapi tidak saling bertumpukan. Apabila didapatkan 20-30 leukosit per lapang pandang ini kira-kira sesuai dengan jumlah leukosit 5.000, 30-40 leukosit per lapang pandang ini kira-kira sesuai dengan jumlah leukosit 7500, dan jika di dapatkan 40-50 per lapang pandang ini sesuai dengan jumlah leukosit kira-kira 10.000 (Depkes,1989).

*Counting area* yang didapatkan dari sediaan hapusan diamati dengan menggunakan mikroskop binokuler dengan perbesaran 400 kali. Kemudian diletakkan satu tetes minyak emersi pada sediaan yang akan diperiksa. Jumlah PMN neutrofil tiap 100 leukosit dapat diamati dan dihitung dengan perbesaran 1000 kali. Jumlah PMN neutrofil didapatkan dengan menjumlahkan *stab* dengan segmen neutrofil (Santosa, 2010; Wirawan, 1996).

Penghitungan jumlah leukosit dengan cara penghitungan *differential* dilakukan pada daerah penghitungan (*counting area*), dimulai dari daerah yang tipis bergerak menuju sisi yang tebal lalu pindah sejauh 2-3 lapang pandang. Pembuatan kolom untuk berbagai leukosit dan masing-masing dibagi menjadi 10. Leukosit terlihat dicatat pada kolom no.1, bila jumlahnya sudah sepuluh pindah mengisi kolom kedua dan seterusnya. Jadi tiap-tiap kolom mengandung sepuluh leukosit. Kemudian, dilakukan penghitungan jumlah leukosit. Cara penghitungan leukosit dapat dilihat pada (Gambar 2.6).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	%
Eo		↑									4
Ba											1
St											5
Seg											59
Ly											27
Mo	↓	→									4

**Gambar 2.6** Penghitungan Jumlah Leukosit dengan Cara *Differential* (Sumber: Sudiono dan Herawati, 2005)

## 2.7 Metode Ekstraksi Tanaman Obat

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian rupa sehingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Ditjen Binfar dan Alkes, 2013). Sedangkan ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan menggunakan pelarut cair (Ditjen POM, 2000).

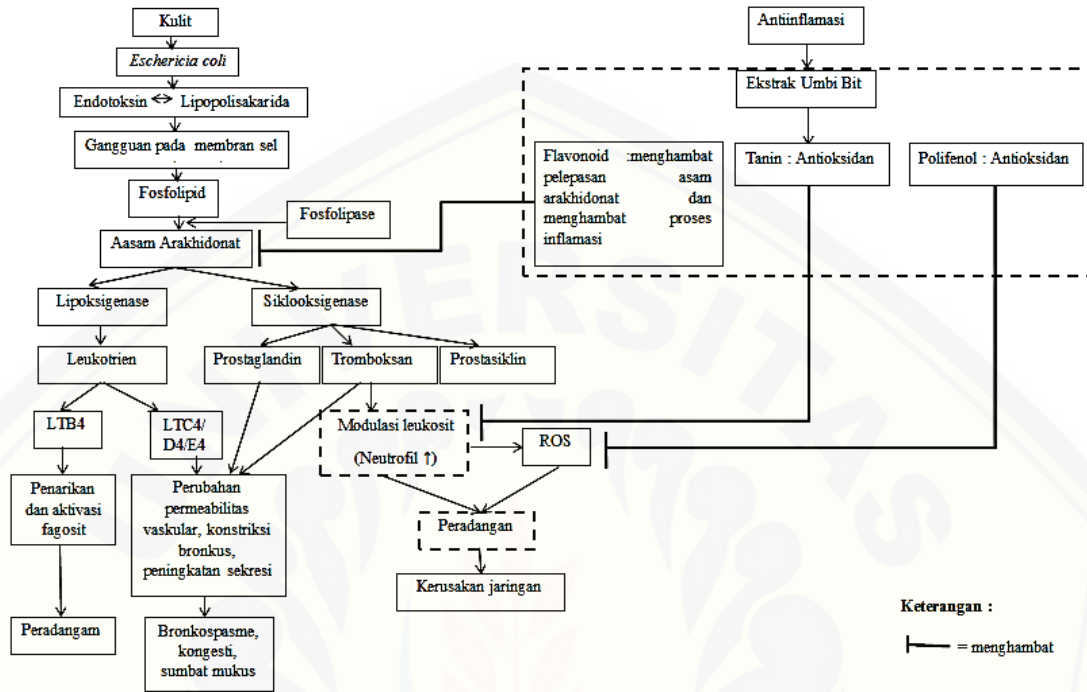
Salah satu metode ekstraksi dengan menggunakan pelarut adalah metode maserasi. Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Secara teknologi, maserasi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan (Ditjen POM, 2000). Pada metode maserasi ini, cairan pelarut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif sehingga zat aktif akan terlarut. Adanya perbedaan konsentrasi zat aktif di dalam maupun di luar sel maka larutan yang terpekat akan terdesak keluar.



Peristiwa ini terus berulang sampai terjadinya keseimbangan konsentrasi larutan antara di dalam dan di luar sel (Ditjen POM, 1986).

Cairan pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 96%. Etanol merupakan pelarut yang paling banyak digunakan untuk ekstraksi karena memiliki daya pelarut yang luas. Etanol dapat menarik senyawa yang bersifat polar sampai non polar karena memiliki gugus polar (-OH) dan non polar (-CH<sub>3</sub>) dalam struktur kimianya. Hal ini didasarkan pada hasil *review* oleh Cowan (1999) yang menyatakan bahwa pelarut etanol dapat mengekstraksi beberapa senyawa aktif seperti tanin, polifenol, flavonoid, terpenoid, dan alkaloid. Selain itu diketahui juga bahwa etanol memiliki toksisitas rendah dibanding pelarut organik lain, seperti metanol, kloroform, heksana, dan lain-lain (Saifudin *et al.*, 2011).

### 2.8 Kerangka Konsep



#### Penjelasan Kerangka Konsep:

Kulit punggung mencit diinduksi *Escherichia coli*. *Escherichia coli* merupakan salah satu agen penyebab inflamasi yang dapat menghasilkan lipopolisakarida, dikenal sebagai endotoksin (Jawetz *et al.*, 2005). Endotoksin bakteri pada mamalia mempunyai efek biologi antara lain inflamasi pada kulit (Widodo dan Govinda, 2006).

Kerusakan sel akibat inflamasi terjadi pada membran sel, menyebabkan leukosit melepaskan enzim lisosom. Kemudian asam arakidonat dilepaskan dari senyawa prekursor, dan berbagai eikosanoid disintesis. Jalur siklooksigenase (COX) dalam metabolisme arakidonat menghasilkan prostaglandin yang memiliki berbagai efek pada pembuluh darah, ujung saraf, dan pada sel yang terlibat dalam peradangan. Serta tromboksan yang dapat memodulasi leukosit sehingga terjadi peningkatan neutrofil. Perangsangan membran neutrofil menghasilkan radikal bebas yang berasal dari oksigen. Anion superoksida dibentuk dari reduksi molekul oksigen, yang dapat

merangsang produksi molekul reaktif lainnya, seperti hidrogen peroksida dan radikal hidroksil. Interaksi senyawa ini dengan asam arakidonat menghasilkan pembentukan senyawa kemotaktik sehingga melanjutkan proses inflamasi (Katzung, 2007). Alternatif untuk mengatasi masalah tersebut dengan menggunakan pengobatan tradisional yaitu dari bahan herbal. Bahan yang digunakan adalah umbi bit merah (*Beta vulgaris L.*).

Zat-zat yang terkandung dalam umbi bit, yaitu flavonoid, tanin dan polifenol. Flavonoid dalam menghambat terjadinya radang melalui dua cara, yang pertama menghambat pelepasan asam arakidonat dan sekresi enzim lisosom dari sel neutrofil dan sel endotelial, dan yang kedua menghambat fase proliferasi dan fase eksudasi dari proses radang (Robinson, 1995). Tanin, yang memiliki sifat sebagai pengikat ion logam (*metal ion chelator*), mengikat Fe, sehingga bakteri tidak dapat bermultifikasi. Tanin mampu mempengaruhi respons peradangan dengan aktivitasnya yang menghilangkan radikal bebas, sehingga dapat menghambat pada proses modulasi leukosit (Sabir, 2003). Polifenol dapat menghambat pada proses pembentukan ROS (*Reactive Oxygen Species*), karena memiliki kandungan antioksidan yang mampu mengikat radikal bebas sehingga mampu menghambat aktivasi karsinogen dan mengurangi resiko terjangkitnya penyakit kronis (Robinson, 1995).

## 2.9 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah

1. Ekstrak umbi bit merah (*Beta vulgaris Linn*) dapat menurunkan jumlah sel neutrofil pada mencit jantan yang diinduksi *Escherichia coli*.
2. Dosis yang paling efektif dalam menurunkan jumlah neutrofil adalah 2000 mg/kg BB.

## BAB III. METODE PENELITIAN

### 3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental laboratoris. Dipilih jenis ini karena baik sampel maupun perlakuan lebih terkendali, terukur dan pengaruh perlakuan lebih dapat dipercaya (Notoatmodjo, 2010).

### 3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini menggunakan *the post-test only control group design*, yaitu dilakukan pengukuran atau pengamatan pada kelompok kontrol dan perlakuan pada waktu yang telah ditentukan setelah diberi suatu perlakuan (Notoatmodjo, 2010).

### 3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di bagian Biomedik Laboratorium Patologi Klinik, Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Bioscience Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Pelaksanaan penelitian dilakukan pada bulan Oktober - November 2016.

### 3.4 Variabel Penelitian

#### 3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak umbi bit merah (*Beta vulgaris Linn*) dengan dosis 2000 mg/kg BB, 1000 mg/kg BB, 500 mg/kg BB dan 250 mg/kg BB.

### 3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah sel neutrofil darah tepi pada hapusan darah.

### 3.4.3 Variabel Terkendali

Yang termasuk variabel terkontrol adalah :

1. Waktu pemberian ekstrak
2. Lingkungan hidup mencit
3. Mencit jantan
4. Berat badan mencit 20-30 gram
5. Mencit berusia 2-3 bulan
6. Makanan mencit
7. Kriteria sampel
8. Prosedur penelitian
9. Varietas umbi bit

## 3.5 Definisi Operasional

### 3.5.1 Ekstrak umbi bit merah (*Beta vulgaris Linn*)

Ekstrak dari umbi bit merah (*Beta vulgaris Linn*) yang diperoleh dengan cara mengeringkan umbi bit merah dan diekstraksi menggunakan teknik maserasi dengan etanol 96%. Ekstrak tersebut diberikan pada mencit dengan dosis 2000 mg/kg BB, 1000 mg/kg BB, 500 mg/kg BB dan 250 mg/kg BB.

### 3.5.2 Bakteri *Escherichia coli*

*Escherichia coli* didapatkan dari laboratorium mikrobiologi Fakultas MIPA Universitas Jember. *E. coli* merupakan bakteri Gram negatif dan flora normal gastrointestinal manusia (dan binatang) yang bisa menyebabkan proses

inflamasi, yang kemudian diencerkan hingga didapat konsentrasi  $10^{-3}$  dan digunakan sebagai agen untuk menyebabkan inflamasi dengan cara diinjeksikan sebanyak 0,01cc di punggung mencit pada hari pertama penelitian.

### 3.5.3 Polimorfonuklear Neutrofil (PMN)

Neutrofil merupakan leukosit granular yang memiliki nukleus dengan 3-5 lobus yang dihubungkan dengan benang kromatin dan sitoplasma yang mengandung granula yang sangat halus, inti berwarna ungu berbentuk batang atau segmen yang didapatkan dari darah tepi ekor mencit jantan dan dihitung dengan cara menghitung jumlah neutrofil per 100 leukosit (Santosa 2010, Wirawan, 1996). Polimorfonuklear neutrofil diamati pada hari ke-1, 3, dan 7 setelah diberi ekstrak umbi bit merah.

### 3.5.4 Hapusan darah tepi

Hapusan darah tepi adalah hapusan darah yang dibuat dari setetes darah ekor mencit yang dilukai sepanjang 1cm dari ujung ekornya, kemudian tetesan darah yang kedua diletakkan pada glass objek untuk dibuat hapusan dan dilakukan pengecatan Giemsa.

### 3.6 Jumlah dan Kriteria Sampel

#### 3.6.1 Besar Sampel Penelitian

Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini didapat dari penghitungan dengan menggunakan rumus (Daniel, 2005) :

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

n : besar sampel tiap kelompok

Z : nilai Z pada tingkat kesalahan tertentu, jika  $\alpha = 0,05$  maka  $Z = 1,96$

$\sigma$  : standart deviasi sampel

d : kesalahan yang masih dapat ditoleransi

Dengan asumsi bahwa kesalahan yang masih dapat diterima ( $\sigma$ ) sama besar dengan (d) maka :  $\sigma^2 = d^2$

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

$$n \geq Z^2$$

$$n \geq (1,96^2)$$

$$n \geq 3,84$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan hasil penghitungan diatas, dalam penelitian ini digunakan 4 sampel untuk setiap kelompok. Jumlah total subyek sebanyak 24 yang terbagi dalam 6 kelompok.

#### 3.6.2 Kriteria Sampel

a. Kriteria inklusi sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. Mencit jenis kelamin jantan
2. Berat badan 20-30 gram
3. Usia 2-3 bulan
4. Sehat dan tidak cacat

b. Kriteria eksklusi :

1. Mencit yang punggungnya tidak mengalami inflamasi setelah induksi *E. coli*
2. Mencit tidak sehat, cacat atau mati selama penelitian

c. Kriteria Umbi Bit Merah

Kriteria umbi bit merah yang akan diambil dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Umbi bit merah segar yang dipetik dari daerah perkebunan umbi bit di Kecamatan Pujon, Kabupaten Malang, Jawa Timur.
2. Umbi bit yang sudah siap petik atau yang sudah tua dengan karakteristik tanaman berumur 2,5-4 bulan dan ciri tanaman siap panen, daun tanaman sudah mulai melebar, umbi bit merah sudah lumayan besar karena setengah dari umbi bit merah dapat dilihat di atas permukaan tanah.



**Gambar 3.1** Umbi Bit Merah (Navazio *et al.*, 2010)



### 3.7 Alat dan Bahan Penelitian

#### 3.7.1 Alat Penelitian

- a. Kandang mencit
- b. Tempat makanan dan minuman mencit
- c. Timbangan digital
- d. Timbangan analitik
- e. Alat cukur
- f. Disposable syringe 1 ml
- g. Sonde lambung
- h. Masker dan sarung tangan
- i. Spidol hitam besar
- j. Scalpel dan gunting
- k. *Object glass* dan *deck glass*
- l. Mikroskop binokuler
- m. Maserator
- n. Blender
- o. Evaporator
- p. Ayakan 80 mesh
- q. Kertas Saring Whatman
- r. Laminar Flow Cabinet
- s. Inkubator
- t. Toples
- u. oven
- v. Tabung Erlemeyer
- w. Thermolyne
- x. Mikropipet
- y. *Tip Tube* dan *Blue Tip*

### 3.7.2 Bahan Penelitian

- a. Ekstrak umbi bit merah dosis 2000 mg/kg BB, 1000 mg/kg BB, 500 mg/kg BB dan 250 mg/kg BB.
- b. Etanol 96%
- c. Aquadest steril
- d. Mencit jantan
- e. Makanan mencit (Turbo, Indonesia)
- f. Bakteri *Eschericia coli*
- g. Alkohol
- h. Minyak emersi
- i. Methanol 96%
- j. Cat Giemsa
- k. Air

## 3.8 Prosedur Penelitian

### 3.8.1 Permohonan *Ethical Clearance* dan Identifikasi Tanaman

Permohonan *ethical clearance* ke komisi etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember dan permohonan identifikasi tanaman ke Laboratorium Botani Fakultas MIPA Universitas Jember.

### 3.8.2 Persiapan Hewan Coba

- a. Mencit diadaptasikan terhadap lingkungan kandang di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember selama 7 hari.
- b. Mencit diberi makanan standart (Turbo, Indonesia) dan air minum setiap hari secara *ad libitum*.
- c. Mencit ditimbang dan dikelompokkan secara acak.

### 3.8.3 Penetapan Dosis Natrium Diklofenak

Dosis natrium diklofenak yang digunakan pada tikus dengan berat badan 250 gram adalah 30 mg/kg BB (Maryanto, 1997). Menurut penelitian Widyastuti (2007), dosis natrium diklofenak yang digunakan pada tikus 200 gram adalah 32 mg/kg BB kemudian dikonversikan ke dalam berat badan mencit 20 gram sebanyak 4,48 mg/kg BB. Penghitungan dosis sebagai berikut :

$$\text{Dosis untuk tikus 250 g} = 30 \text{ mg/kg BB}$$

$$\text{Dosis untuk tikus 200 g} = \frac{200 \text{ g} \times 30 \text{ mg/kg BB}}{250 \text{ g}}$$

$$= 32 \text{ mg/kg BB}$$

$$\text{Faktor konversi dari tikus ke mencit} = 0,14 \text{ (Laurence, 2008).}$$

$$\text{Konversi dari tikus 200 g ke mencit 20 g} = 0,14 \times 32 \text{ mg/kg BB}$$

$$= 4,48 \text{ mg/kg BB}$$

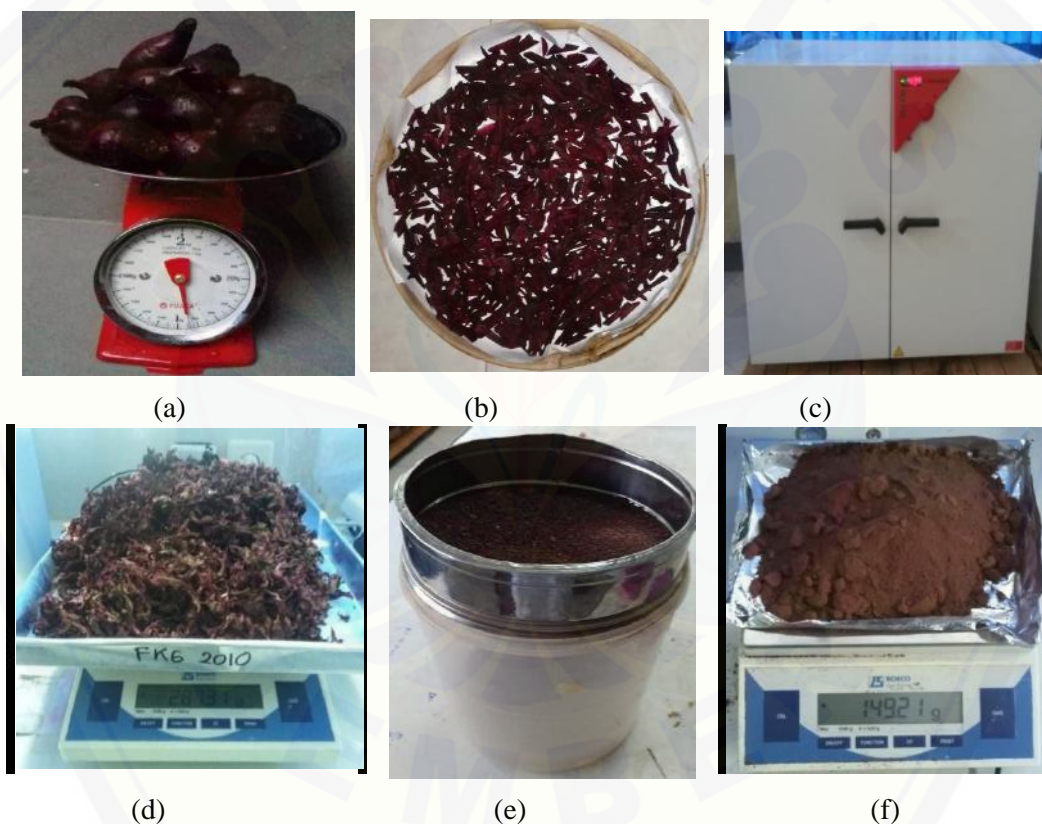
### 3.8.4 Pembuatan Larutan Natrium Diklofenak

Serbuk natrium diklofenak ditimbang seksama 9 mg lalu dilarutkan dalam aquades hingga volume 50 ml sehingga diperoleh konsentrasi larutan natrium diklofenak sebesar 0,18 mg/ml (Widyastuti, 2007).

### 3.8.5 Pembuatan Ekstrak Umbi Bit

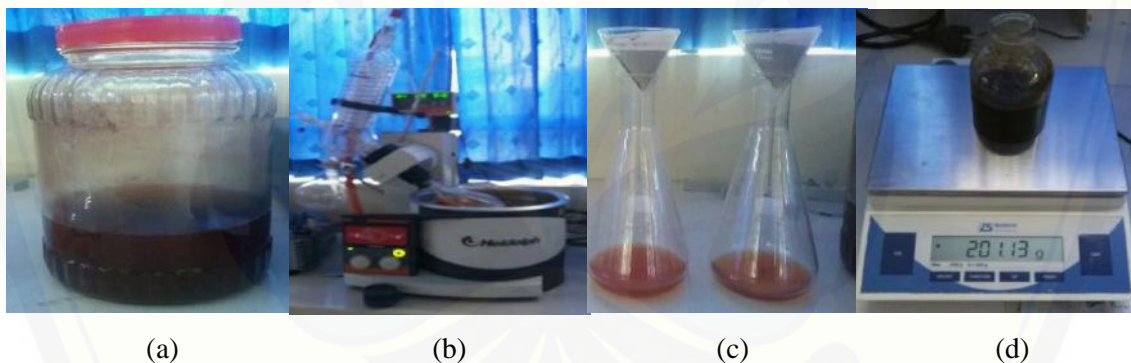
Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi. Umbi bit merah dipilih yang berumur 2,5-4 bulan. Tahapan yang dilakukan pertama adalah umbi bit sebanyak 8 kg dicuci dengan air mengalir sampai bersih. Umbi bit yang sudah bersih dipotong-potong menggunakan pisau *stainless steel* lalu ditimbang berat basahannya dan diperoleh berat sebanyak 7,5 kg. Potongan umbi bit kemudian ditiriskan pada tampah untuk menghilangkan sisa air. Umbi bit kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan pada tempat yang teduh selama 3 hari. Umbi bit merah yang sudah diangin-

anginkan kemudian dioven dengan suhu  $50^{\circ}\text{C}$  selama 1 jam. Suhu pengeringan harus memenuhi standar yaitu tidak lebih dari  $60^{\circ}\text{C}$  (Kemenkes RI, 2009). Setelah dikeringkan, umbi bit ditimbang dan diperoleh berat kering sebanyak 530,55 gr. Umbi yang sudah kering dihaluskan hingga menjadi serbuk dengan menggunakan blender. Serbuk kemudian diayak dengan menggunakan ayakan berukuran 80 mesh sehingga menjadi serbuk simplisia halus (Kemenkes RI, 2009). Hasil serbuk simplisia halus yang diperoleh sebanyak 435,17 gr. Kemudian sediaan ekstrak dibuat dengan cara maserasi menggunakan etanol 96% sebagai pelarut.



**Gambar 3.2** (a) Umbi bit merah ditimbang, (b) dipotong dan diangin-anginkan, (c) dioven dengan suhu  $50^{\circ}\text{C}$ ; (d) Umbi bit ditimbang dalam keadaan kering, (e) dihaluskan dengan ayakan 80 mesh, (f) Hasil serbuk simplisia halus

Serbuk simplisia halus sebanyak 435,17 gr dimasukkan ke dalam toples lalu direndam dengan etanol 96% sebanyak 3.263 ml sesuai perbandingan 1:7,5 (b/v) antara banyaknya serbuk simplisia dengan pelarut. Perendaman dilakukan selama 3 hari di dalam wadah toples bertutup pada suhu ruangan dengan dilakukan pengadukan larutan 2 kali sehari. Serbuk simplisia yang sudah selesai direndam selama 3 hari kemudian disaring. Maserat dipisahkan dengan cara filtrasi menggunakan corong kaca yang diberi kertas saring. Hasil maserasi kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dengan kecepatan 180 rpm pada suhu 50°C selama 1 jam dan diuapkan kembali dengan cara *waterbath* di atas *hot plate* untuk menghilangkan sisa pelarut pada suhu 40-50°C selama 3 jam. Ekstrak kental umbi bit yang diperoleh sebanyak 30,29 gram dengan hasil rendemen 6,96% (b/b), penghitungan rendemen ekstrak dapat dilihat pada Lampiran B. Hasil ekstrak umbi bit disimpan di dalam lemari es apabila tidak langsung digunakan.

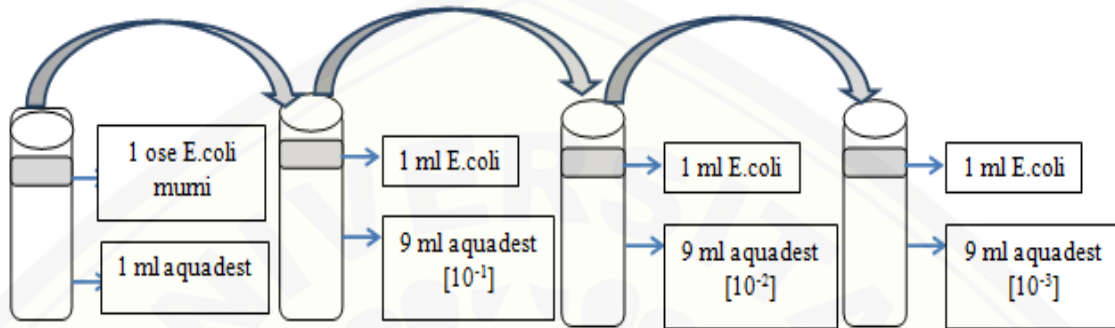


**Gambar 3.3** (a) Serbuk simplisia halus direndam dengan etanol 96%; (b) Maserat di evaporasi; (c) Maserat dipisahkan dengan cara Filtrasi; (d) Penimbangan ekstrak umbi bit merah

### 3.8.6 Pembuatan Suspensi Bakteri *Escherichia coli*

Satu ose bakteri *E. coli* dalam 1 ampul bakteri *E. coli* diencerkan dengan 1 cc aquadest steril (*serial dilution*) dalam *laminar flow cabinet*. Kemudian dilakukan pengenceran sampai  $10^{-3}$ . Pengenceran  $10^{-1}$  diperoleh dengan menambahkan 1 ml

*E.coli* ditambah dengan 9 ml aquadest steril. Selanjutnya bakteri *E. coli* dengan konsentrasi  $10^{-3}$  ditutup dengan kapas steril dan diinkubasi kurang lebih 24 jam dalam inkubator (Indahyani, 2008). Cara pengenceran adalah sebagai berikut:



**Gambar 3.4** Alur pembuatan suspensi *E.coli* (Sumber: Indahyani, 2008)

### 3.8.7 Tahap Perlakuan

- Sebelum diinduksi *E. coli*, mencit dipuaskan (tidak diberi pakan) selama 8 jam, tetapi tetap diberi air secara *ad libitum*.
- Pada hari perlakuan, bulu yang terdapat pada punggung masing-masing mencit dicukur dengan alat cukur (diameter  $\pm 15$  mm).



**Gambar 3.5** Mencit dipuaskan selama 8 jam (tetap diberi minum secara *ad libitum*)

c. Semua mencit (24 ekor) ditimbang dan dibagi menjadi 6 kelompok secara acak sebagai berikut :

Kelompok kontrol positif (K+) : mencit diberi natrium diklofenak

Kelompok kontrol negatif (K-) : mencit diberi aquadest steril

Perlakuan 1 (P1) : mencit diberi ekstrak umbi bit merah dosis 2000 mg/kg BB

Perlakuan 2 (P2) : mencit diberi ekstrak umbi bit merah dosis 1000 mg/kg BB

Perlakuan 3 (P3) : mencit diberi ekstrak umbi bit merah dosis 500 mg/kg BB

Perlakuan 4 (P4) : mencit diberi ekstrak umbi bit merah dosis 250 mg/kg BB



(a)



(b)

**Gambar 3.6** (a) dan (b) Mencit ditimbang dan dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan

d. Kemudian disuntikkan suspensi bakteri *Escherichia coli* secara subkutan pada punggung mencit yang sudah dicukur dengan konsentrasi  $10^{-3}$  sebanyak 0,01cc.



**Gambar 3.7** *Escherichia coli* diinduksi secara subkutan

- e. Mencit diletakkan di dalam kandang dan ditunggu selama  $\pm 24$  jam untuk proses pembentukan inflamasi. Tanda klinis terjadinya inflamasi ditunjukkan dengan adanya kemerahan dan pembengkakan pada daerah yang diinduksi bakteri *E. coli*.
- f. Aquadest, natrium diklofenak dan masing masing dosis ekstrak umbi bit merah diberikan dua kali sehari (pada jam 7 pagi dan jam 6 sore) dengan dosis untuk natrium diklofenak sebanyak 0,5 ml/20gr BB sedangkan untuk ekstrak umbi bit merah diberikan sesuai dengan dosisnya mulai hari ke-1 sampai hari ke-7 *intra gastric* dengan sonde lambung pada semua mencit.



(a)



(b)

**Gambar 3.8** Pemberian (a) ekstrak umbi bit merah dan (b) natrium diklofenak, secara intragastric dengan sonde lambung

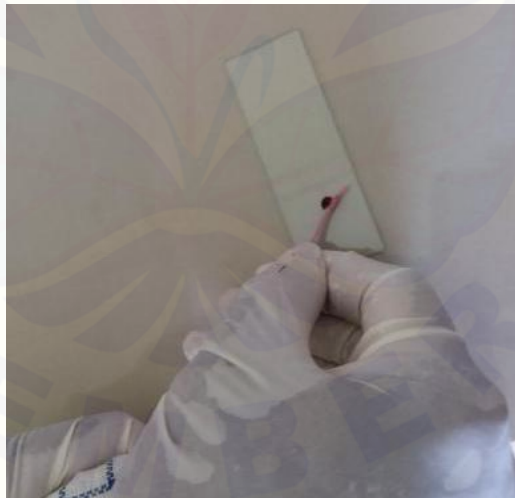


- g. Mencit dimasukkan ke kandang sesuai kelompoknya dan ditunggu selama  $\pm 90$  menit setelah pemberian ekstrak umbi bit merah untuk proses metabolisme tubuh kemudian dilakukan pengambilan darah.

### 3.8.8 Tahap Pemeriksaan

#### a. Pengambilan Sampel Darah

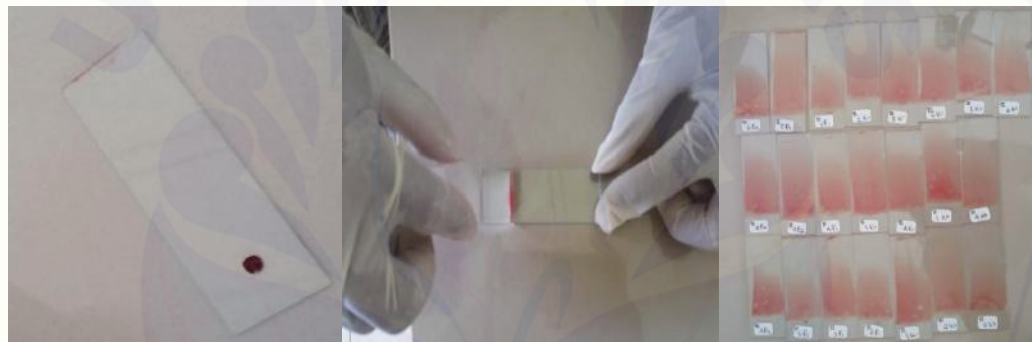
Pengambilan sampel darah dilakukan pada hari ke-1, 3 dan 7 pada semua kelompok. Darah diambil dari ekor mencit yang sebelumnya telah dibersihkan dengan alkohol kemudian diregangkan dan dilukai  $\pm 1$  cm dari ujung dengan menggunakan scalpel. Pada hari ke-3, perlakuan pada ekor mencit dilakukan pada 1 cm dari luka hari pertama dan hari ke-7 perlakuan pada 1 cm dari luka hari ke-3. Tetesan kedua dari perlakuan tersebut diletakkan pada salah satu ujung dari glass objek dan dilakukan pembuatan hapusan darah.



**Gambar 3.9** Pengambilan sampel darah

### b. Pembuatan Hapusan Darah

1. *Glass* penghapus dipegang dengan sedemikian rupa sehingga membentuk sudut  $\pm 30^0$  dengan *glass* objek dan tetesan darah tadi terletak di dalam sudut tersebut.
2. *Glass* penghapus ditarik ke arah tetesan darah, sehingga menyentuh darah.
3. *Glass* penghapus dengan cepat digeser ke arah yang berlawanan dengan arah yang pertama sehingga darah akan merata di atas *glass* objek sebagai lapisan yang tipis.
4. Hapusan ini segera dikeringkan dengan mengangin-anginkan di udara.



(a)

(b)

(c)

**Gambar 3.10** (a) Satu tetes darah dari ekor mencit diletakan pada ujung *object glass*; (b) Pembuatan hapusan darah menggunakan *glass* penghapus; (c) Hapusan Darah.

### c. Pengecatan Hapusan Darah

1. Letakkan *object glass* berisi hapusan darah yang sudah mengering diatas rak objek gelas.
2. Fiksasi hapusan darah dengan cara meneteskan methanol 96% pada seluruh permukaan *object glass* selama 3-5 menit. Diletakkan dalam keadaan miring dan biarkan mengering.

3. Tetesi kedua *object glass* dengan larutan giemsa 3% dan biarkan selama 30 menit.
4. Siram dengan air mengalir sampai bersih.
5. Setelah bersih letakkan dalam keadaan miring dan biarkan mengering (Wahyuni, 2015).



(a)

(b)

**Gambar 3.11** (a) Hapusan darah yang telah difiksasi menggunakan methanol 96%; (b) Pengecatan apusan darah menggunakan Giemsa

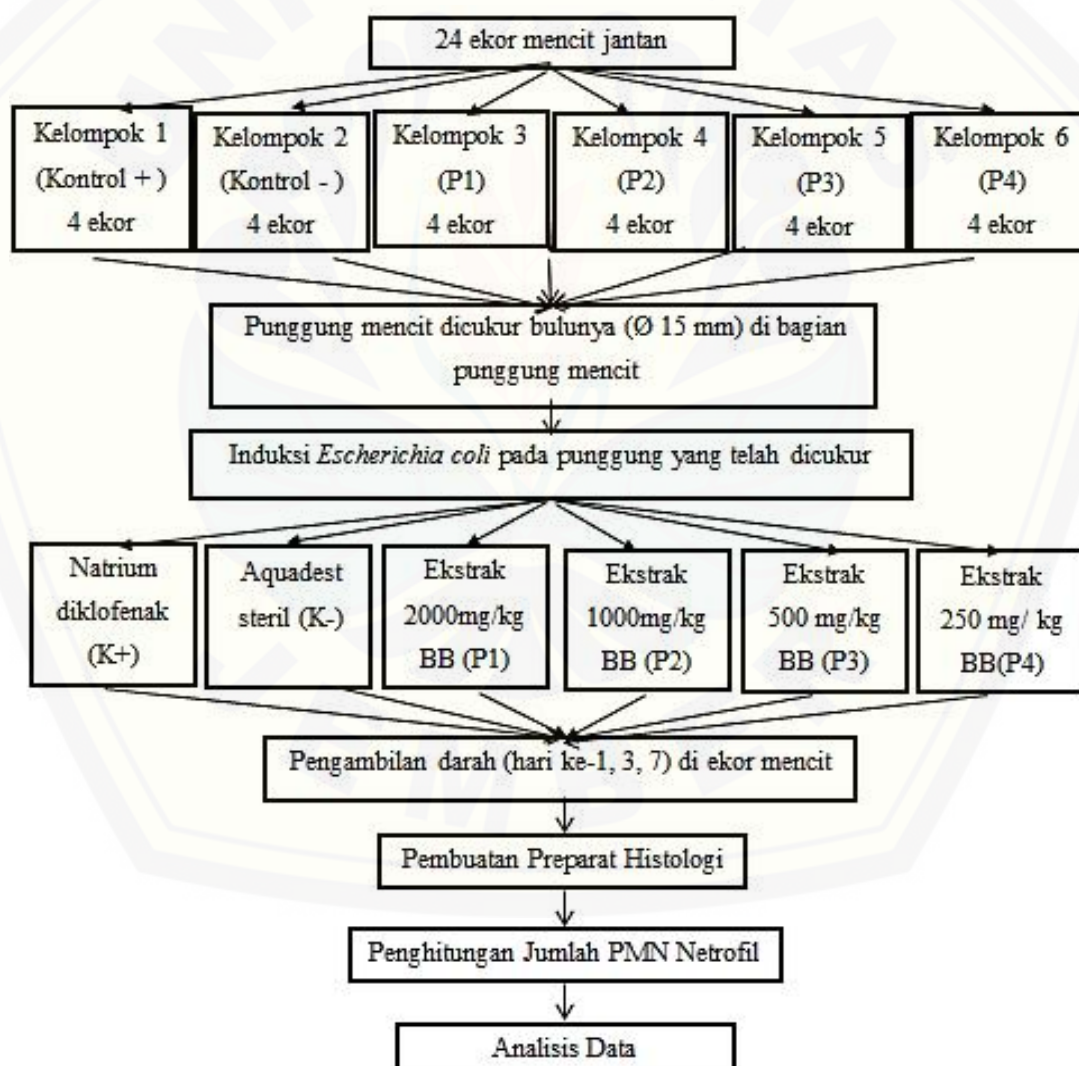
#### d. Penghitungan Jumlah Neutrofil

Sediaan hapusan diamati dengan menggunakan mikroskop binokuler dengan perbesaran 400 kali untuk mendapatkan *counting area*. Kemudian diletakkan satu tetes minyak emersi pada sediaan yang akan diperiksa. Dilakukan penghitungan neutrofil di bawah mikroskop binokuler dengan perbesaran 1000x. Penghitungan neutrofil (stab dan segmen) dimulai dari daerah hapusan yang tipis menuju daerah hapusan yang tebal hingga menemukan 100 leukosit. Dari 100 leukosit yang ditemukan dihitung jumlah neutrofilnya (Santosa, 2010; Wirawan 1996).

### 3.9 Analisa Data

Data yang diperoleh terlebih dahulu dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas dengan menggunakan uji *Kolmogorov Smirnov* dan *Levene*. Selanjutnya, dilakukan uji parametrik dengan *One Way Anova* dengan tingkat kepercayaan 95% ( $p < 0,05$ ) kemudian dilanjutkan uji *LSD (Least Significance Difference)* (Notoatmodjo, 2010).

### 3.10 Alur Penelitian



## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

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

1. Ekstrak umbi bit merah dapat menurunkan jumlah sel PMN neutrofil darah tepi mencit jantan setelah diinduksi *Escherichia coli*.
2. Ekstrak umbi bit merah dosis 1000 mg/kg BB paling efektif untuk menurunkan jumlah sel PMN neutrofil darah tepi mencit jantan setelah diinduksi *Escherichia coli*.

### 5.2 Saran

1. Perlu adanya penelitian lebih lanjut tentang farmakokinetik dan farmakodinamik ekstrak umbi bit merah (*Beta vulgaris Linn*) sehingga dapat diketahui efek samping tertentu pada manusia.
2. Penelitian ini dapat digunakan sebagai acuan untuk penelitian selanjutnya dengan menggunakan variabel yang berbeda.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aguirre, L., Frias, J. M., Barry-Ryan, C. dan Grogan, H. 2009. Modelling browning and brown spotting of mushrooms (*Agaricus bisporus*) stored in controlled environmental conditions using image analysis. *Journal of Food Engineering*.
- Ahuja D dan Bapna J S. 2015. Analysis of Nootropic Effect of Ethanolic Extract of *Beta vulgaris L.* Roots in Age Induced Amnesia in Swiss Albino Mice. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 4(8). Jaipur College of Pharmacy, rajasthan University of Health Sciences.
- Atamanova A dan Brezhneva TA. 2005. Isolation of saponins from table beetroot and primary evaluation of their pharmacological activity. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 39(12) 650–652.
- Atenza, M., Ratnawati, D dan Widiyati, E. 2009. “Uji Pendahuluan Penentuan Adanya Kandungan Senyawa Flavonoid dan Triterpenoid Pada Tanaman Sayuran Serta Bioassay Brine Shrimp Menggunakan *Artemia Salina* Leach”. Bengkulu : FMIPA Universitas Bengkulu.
- Bellanti, J. A. 1993. *Imunologi III*, diterjemahkan oleh A. S. Wahab dan N Soerapto, Yogyakarta: Gajah Mada Press.
- Burgess, Jeremy., Marteen, Michael dan Taylor, Rosemary. 1990. *Under the Microscope: a Hidden World Revealed*. New York: University of Cambridge.
- Cappucino, J.G dan Sherman, N. 1998. *Microbiology: A Laboratory Manual. 5 th Edition*. California: Benjamin Cummings Science Publishing.
- Cisela, W. P., dan Guerrant, R. L. 2003. *Infectious Diarrhea. In: Wilson WR, Drew WL, Henry NK, et al editors. Current Diagnosis and Treatment in Infectious Disease*. New York: Lange Medical Books.

- Cowan, M. M. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. rev.*12 (4): 564-582.
- Daniel, W. 2005. *Biostatic a Foundation for Analysis in The Health Science 6th edition*. Canada: John Wiley and Sons, Inc.
- Delporte, C., Backhouse, N., Inostroza, V., Aguirre, M. C., Peredo, N., Silva, X., Negrete, R., Miranda, H. F. 2007. Analgesic Activity of *Ugni molinae* (Murtilla) in Mice Models of Acute Pain. *In Journal Bioorganic and Medicinal Chemistry*.
- Departemen Kesehatan RI. 1989. *Materia Medika Indonesia. Jilid V*. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawasan Obat Dan Makanan.
- Dias MG, Camoes MFGFC and Oliveira L. 2009. Carotenoids in traditional Portuguese fruits and vegetables. *Food Chemistry* 113 808–815.
- Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. 1986. *Sediaan Galenik*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Direktorat Jendral Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan. 2013. *Kinerja Program Kefarmasian dan Alat Kesehatan 2013*. Kementrian Kesehatan Republik Indonesia.
- Dorland, W.A. Newman. 2012. *Kamus Kedokteran Dorland. Edisi 28*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Eroschenko, V. P. 2010. *Atlas Histologi diFiore dengan Korelasi Fungsional*. Edisi 11. Jakarta: EGC.

- Fajriani. 2008. Pemberian Obat-Obatan Anti Inflamasi Non Steroid (AINS) pada Anak. *Indonesian Journal of Dentistry*. 15(3): 200-4.
- Gandasoebrata. 2007. *Penuntun Laboratorium Klinik*. Jakarta : Dian Rakyat.
- Ganiswara, S. G. 2004. *Farmakologi dan Terapi. Edisi 4*. Jakarta: Gaya Baru.
- Gard, P. 2001. *Human Pharmacology, Chapter IX*. London: New York.
- Guyton, A.C., dan Hall, J.E. 2008. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran. Edisi 11*. Jakarta: EGC.
- Guyton, A.C., dan Hall, J.E. 2014. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran. Edisi 12*. Jakarta: EGC.
- Handayani, I. 2011. Kenalan dengan Buah Bit [serial online] <http://kesehatan.kompasiana.com> [26 Juni 2016].
- Haris, M. 2011. "Penentuan Kadar Flavanoid Total Dan Aktivitas Antioksidan Dari Daun Dewa (*Gynura pseudochina* [Lour] DC) dengan spektrofotometer UV-Visibel". Skripsi. Fakultas Farmasi. Universitas Andalas. Padang.
- Howard, C Berg. 2008. *Escherichia coli in Motion*. Cambridge : Departement of Molecular and Cellular Biology.
- Indahyani, D. E. 2008. *Buku Petunjuk Praktikum Biologi Mulut II*. Jember : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Hal: 4, 14- 15.
- Jawetz., Melnick., dan Adelberg. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran (Medical Microbiology) Buku I*. Jakarta: Salemba Medika.



- Jeffers, Melanie D. 2006. *Tannins as Anti-Inflammatory Agents*. Miami University, Oxford.
- Juncqueira, L. C. Carneiro, J. Dan Kelly, R. O. 1997. *Basic Histology (1995)*. Terjemahan Jan Tambayong. *Histologi Dasar*. Edisi 8. Jakarta: EGC.
- Katzung, B. G. 2007. *Farmakologi Dasar dan Klinik , Edisi 10*. Jakarta: EGC.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2009. *Farmakope Herbal Indonesia. Edisi Pertama*. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Kimin, Indiarto, Santoso, Dewi, Santosa, Riyanti, Mulyawan, Susanto dan Tofas. 2001. *Farmakologi untuk Sekolah Menengah Farmasi*. Jakarta: Departemen Kesehatan.
- Lawler, W., Ahmed, A., dan Hume, W. 2002. *Buku Pintar Patologi Untuk Kedokteran Gigi*. Jakarta: EGC.
- Laurence, Bacharach. 2008. *Evaluation of Drug Activities Pharmacometrics, cit: Ngatidjan, Metode Laboratorium dalam Toksikologi, reviewer: Hakim*.
- Lenny, S. 2006. Senyawa Flavonoid, Fenilpropanoide, dan Alkaloida [serial online] <http://library.usu.ac.id/download/fmipa/06003489.pdf> [28 Mei 2016].
- Maryanto, 1997. "Daya Anti Inflamasi Infus Cocor Bebek (*Kalanchoe pinnatapers*) Pada Tikus Putih Jantan". Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada.
- Murray., Rosenthal dan Pfaller. 2013. *Medical Microbiology 7th edition*. Elsevier.

- Mycek, M.J., Harvey, R.A., dan Champe C.C. 2001. *Farmakologi Ulasan Bergambar. Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology*. Penerjemah Azwar Agoes. Edisi II. Jakarta. Widya Medika.
- Nafrialdi, Setawati, A., 2007. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi 5. Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran UI, Jakarta.
- Nagendra S., Tanveer., Venkateswarulu., Kiran., dan Krishnaveni. 2013. Efficacy of aceclofenac and diclofenac sodium for relief of postoperative pain after third molar surgery: A randomised open label comparative study. *Journal Pharmacol Pharmacother* 4(2): 144-145
- Navazio, John., Colley, Micaela., dan Zyskowski. 2010. *Principles and Practices of Organic Beet Seed Production in the Pacific Northwest*. Organic Seed Alliance.
- Nursiyah. 2013. "Studi Deskriptif Tanaman Obat Tradisional yang digunakan Orangtua untuk Kesehatan Anak Usia Dini di Gugus Melati Kecamatan Kalikajar Kabupaten Wonosobo". Semarang.
- Notoatmodjo, S. 2010. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta: Rineka Pustaka.
- Patkai G, Barta J and Varsanyi I. 1997. Decomposition of Anticarcinogen Factors of The Beetroot During Juice and Nectar Production. *Cancer Letters* 114 105–106.
- Price, S. A dan L.M.C Wilson. 2005. *Pathofisiologi Clinical Concept of Deasease Processes*. Terjemahan Brahm U. Pendit *et al*. Patofisiology Konsep Klinik Proses-Proses Penyakit. Edisi 6. Bagian I. Jakarta: EGC.
- Purnama, Agung S. 2013. "Efek Anti Inflamasi Liquis Smoke Tempurung Kelapa (Cocos nucifera L) Grade 2 Pada Tikus Putih (Ratus novergicus) Galur Wistar yang Diinduksi Karagenan 1% (Penelitian Eksperimental Laboratoris)". Surabaya: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga BHMN.

- Rahayu, Corvianindya. Y. 2014. Respons Antiinflamasi Serbuk Biji Alpukat (*Persea americana mill*) terhadap Jumlah PMN Neutrofil Mencit yang Diinduksi Bakteri E. Coli. *Bagian Oral Biologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember*.
- Ranade, V. V. and M. A. Hollinger. 2004. *Transdermal Drug Delivery, in: Drug Delivery Systems*, V. V. Ranade and M. A. Hollinger, 2nd ed., CRC Press LLC, New York.
- Rao, GS., Kapadia., Ramachandran., Lida., Suzuki dan Tokuda. 2013. Synergistic cytotoxicity of red beetroot (*Beta vulgaris L.*) extract with doxorubicin in human pancreatic, breast and prostate cancer cell lines. *College of Pharmacy, Howard University*.
- Robbins dan Kumar. 1995. *Buku Ajar Patologi 1*. Edisi 4. Jakarta. EGC.
- Robbins, S dan Kumar, V. 2004. *Buku Ajar Patologi*. Edisi , Volume 2. Jakarta: EGC.
- Robinson, Trevor. 1991. *The Basic of Higher Plants. 6<sup>th</sup> Edition*. Terjemahan Padmawinata, K. Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi. Bandung: ITB.
- Robinson, Trevor. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi Edisi keenam*. Bandung: Penerbit ITB.
- Sabir, A. 2003. Pemanfaatan Flavonoid di Bidang Kedokteran Gigi. *Majalah Kedokteran Gigi (Dental Journal)*. Edisi Khusus Temu Ilmiah III: 81-87.
- Saifudin, A., Rahayu, V., dan Teruna, H.Y. 2011. *Standarisasi Bhan Obat Alam*. Yogyakarta: Graha Ilmu.

- Santosa, Budi. 2010. Differential Counting Berdasarkan Zona Baca Atas dan Bawah Pada Preparat Hapus. Prosiding Seminar Nasional Unimus. Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan. Universitas Muhammadiyah Semarang
- Shepherd, AI., Wilkerson., Dobson., Kelly., Winyard., Jones., Benjamin., Shore dan Gilchrist. 2015. The effect of dietary nitrate supplementation on the oxygen cost of cycling, walking performance and resting blood pressure in individuals with chronic obstructive pulmonary disease: A double blind placebo controlled, randomised control trial. *University of Exeter Medical School, Exeter. Devon.*
- Shoenfeld, Gurewich, Gallant, Pinkhas. 1981. Influence Dosage, Method and Duration of Administration on the Degree of Leukocytosis. Sackler School of Medicine. Israel.
- Soeroto J. 2008. *Pedoman Penggunaan Obat Anti Inflamasi Non Steroid. [Laporan Penelitian Internal]*. Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Surabaya
- Splittstoesser, W. E. 1984. *Vegetable Growing Handbook*. Van Nostrand Reinhold Company, New York.
- Sudiono dan Herawati. 2005. *Penuntun Patologi Klinik: Hematologi*. Jakarta: Bagian Patologi Klinik FK UKRIDA.
- Susilawati, I D A. 2008. “Induksi Porphyromonas gingivalis terhadap Aktivitas Kolagenolisis Neutrofil pada Kolagen Tipe IV (Studi in vitro Mekanisme Kolagenolisis Plak Aterosklerotik)”. Disertasi: Program Doktor Ilmu Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Syarif, Amir., Purwastyastuti Ascobat, Ari Estuningtyas, Rianto Setiabudy, Arini Setiawati, dan Armen Muchtar. 2012. *Farmakologi dan terapi. Edisi 5 (Cetakan dengan Tambahan)*. Gaya Baru: Jakarta. h.471.

- Vali L, Stefanovits-Banyai E, Szentmihalyi K, Febel H, Sardi E, Lugasi A, Kocsis I and Blazovics A. 2007. Liver-protecting Effects of Table Beet (Beta vulgaris var. Rubra) During Ischemia-reperfusion. *Nutrition* 23.
- Wahyuni, Sitti. 2015. *Manual Keterampilan Pengambilan Darah Tepi, Membuat Hapusan, Pewarnaan Giemsa dan Pemeriksaan Mikroskopik Hapusan Darah Tepi*. Bagian Parasitologi Universitas Hasanuddin.
- Widodo, D dan Govinda, A. 2006. *Penanganan Sepsis*. Jakarta: pusat informasi dan penerbitan bagian ilmu penyakit dalam FK UI. Hal: 2.
- Widyastuti, Miliandani. 2007. “Pengaruh Pemberian Beta Karoten Terhadap Daya Antiinflamasi Natrium Diklofenak Pada Mencit Putih Jantan”. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Sanata Dharma.
- Wilmana, P.F., dan Gan, S.G. 2007. *Analgesik-Antipiretik Analgesik AntiInflamasi Nonsteroid dan Obat Gangguan Sendi Lainnya*. Dalam: Gan, S.G., Editor. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi 5. Jakarta: Gaya Baru, 230- 240.
- Wirawan,R. 1996. *Pemeriksaan Laboratorium Hematologi Sederhana Edisi II*. Jakarta: EGC.
- Yanti, febli. 2012. “Pengaruh Suhu terhadap Mutu Bubuk Pewarna Makanan Amai dari Buah Bit (Beta vulgaris L)”. Medan: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Negeri Medan.
- Zwart, de FJ., Slow S., Payne RJ., Lever M., George PM., Gerrard JA dan Chambers ST. 2003. Glycine betaine and glycine betaine analogues in common foods. *Food Chemistry* 83 197–204.

## LAMPIRAN

### A. Konversi Dosis Natrium Diklofenak

Dosis natrium diklofenak yang digunakan pada tikus dengan berat badan 250 gram adalah 30 mg/kg BB (Maryanto, 1997). Menurut penelitian Widyastuti (2007), dosis natrium diklofenak yang digunakan pada tikus 200 gram adalah 32 mg/kg BB kemudian dikonversikan kedalam berat badan mencit 20 gram sebanyak 4,48 mg/kg BB. Penghitungan dosis sebagai berikut :

$$\text{Dosis untuk tikus 250 g} = 30 \text{ mg/kg BB}$$

$$\begin{aligned} \text{Dosis untuk tikus 200 g} &= \frac{200 \text{ g} \times 30 \text{ mg/kg BB}}{250 \text{ g}} \\ &= 32 \text{ mg/kg BB} \end{aligned}$$

$$\text{Faktor konversi dari tikus ke mencit} = 0,14 \text{ (Laurence, 2008).}$$

$$\begin{aligned} \text{Konversi dari tikus 200 g ke mencit 20 g} &= 0,14 \times 32 \text{ mg/kg BB} \\ &= 4,48 \text{ mg/kg BB} \end{aligned}$$

### Pembuatan Larutan Natrium Diklofenak

Serbuk natrium diklofenak ditimbang seksama 9 mg lalu dilarutkan dalam aquades hingga volume 50 ml sehingga diperoleh konsentrasi larutan natrium diklofenak sebesar 0,18 mg/ml (Widyastuti, 2007).

### Sediaan Natrium Diklofenak yang Diberikan Pada Tiap Mencit

$\frac{\text{Dosis pada mencit 20 gr} = 1000 \text{ gr}}{X \quad \quad \quad 20 \text{ gr}}$
--

$$\frac{4,48 \text{ mg/kg BB} = 1000 \text{ gr}}{X \quad \quad \quad 20 \text{ gr}}$$

$$X = \frac{4,48 \text{ mg/kg BB} \times 20 \text{ gr}}{1000 \text{ gr}}$$

$$= 0,0896 \text{ mg}$$

$\frac{\text{Konsentrasi larutan Natrium Diklofenak} = 1 \text{ ml}}{0,089 \text{ mg} \quad \quad \quad X}$
---

$$0,18 \text{ mg/ml} = \frac{1 \text{ ml}}$$

$$0,0896 \text{ mg} \quad X$$

$$X = \frac{0,0896 \text{ mg} \times 1 \text{ ml}}$$

$$0,18 \text{ mg/ml}$$

$$= 0,498 \text{ ml}$$

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

Jadi, sediaan natrium diklofenak yang diberikan pada tiap mencit dengan berat badan 20 gr adalah 0,5 ml.

### **B. Dosis Umbi bit merah (*Beta vulgaris Linn*)**

Dosis maksimal aman ekstrak umbi bit merah pada mencit dengan berat badan 20 gram adalah 2000 mg/kg BB (Ahuja dan Bapna, 2015). Pada penelitian tersebut menggunakan dosis ekstrak umbi bit merah sebanyak 250, 500 dan 1000 mg/kg BB sebagai perlakuan.

### **C. Penghitungan Rendemen Ekstrak**

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak (gr)}}{\text{berat simplisia (gr)}} \times 100\%$$

$$= \frac{30,29}{435,17} \times 100\% = 6,96\%$$

Jadi, hasil rendemen ekstrak umbi bit merah sebesar 6,96% (b/b) (Ditjen POM, 2000).

**D. Analisis Data**

**D.1 Hasil Uji Normalitas Menggunakan Uji Kolmogorov-Smirnov**

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		jumlahneutrofil
N		24
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	34.96
	Std. Deviation	5.120
Most Extreme Differences	Absolute	.122
	Positive	.122
	Negative	-.087
Kolmogorov-Smirnov Z		.596
Asymp. Sig. (2-tailed)		.869

a. Test distribution is Normal.

**Descriptives**

**JUMLAHNEUTROFIL**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
k+	4	29.50	1.291	.645	27.45	31.55	28	31
k-	4	43.25	2.500	1.250	39.27	47.23	40	46
P1	4	34.75	1.258	.629	32.75	36.75	33	36
P2	4	30.25	1.258	.629	28.25	32.25	29	32
P3	4	33.25	1.708	.854	30.53	35.97	31	35
P4	4	38.75	1.708	.854	36.03	41.47	37	41
Total	24	34.96	5.120	1.045	32.80	37.12	28	46



**D.2 Hasil Uji Homogenitas Menggunakan *Levene Test***

Test of Homogeneity of Variances

JUMLAHNEUTROFIL

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.501	5	18	.772

**D.3 Hasil Uji One Way Anova**

ANOVA

JUMLAHNEUTROFIL

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	552.208	5	110.442	39.171	.000
Within Groups	50.750	18	2.819		
Total	602.958	23			

## D.4 Hasil Uji Beda Menggunakan Uji LSD

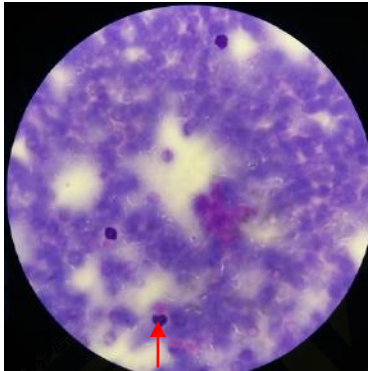
## Multiple Comparisons

JUMLAHNEUTROFIL  
LSD

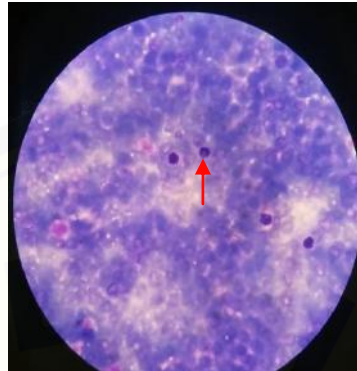
(I) KELOM POKPE RLAKU AN	(J) KELOM POKPE RLAKU AN	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
k+	k-	-13.750*	1.187	.000	-16.24	-11.26
	P1	-5.250*	1.187	.000	-7.74	-2.76
	P2	-.750	1.187	.536	-3.24	1.74
	P3	-3.750*	1.187	.005	-6.24	-1.26
	P4	-9.250*	1.187	.000	-11.74	-6.76
k-	k+	13.750*	1.187	.000	11.26	16.24
	P1	8.500*	1.187	.000	6.01	10.99
	P2	13.000*	1.187	.000	10.51	15.49
	P3	10.000*	1.187	.000	7.51	12.49
	P4	4.500*	1.187	.001	2.01	6.99
P1	k+	5.250*	1.187	.000	2.76	7.74
	k-	-8.500*	1.187	.000	-10.99	-6.01
	P2	4.500*	1.187	.001	2.01	6.99
	P3	1.500	1.187	.223	-.99	3.99
	P4	-4.000*	1.187	.003	-6.49	-1.51
P2	k+	.750	1.187	.536	-1.74	3.24
	k-	-13.000*	1.187	.000	-15.49	-10.51
	P1	-4.500*	1.187	.001	-6.99	-2.01
	P3	-3.000*	1.187	.021	-5.49	-.51
	P4	-8.500*	1.187	.000	-10.99	-6.01
P3	k+	3.750*	1.187	.005	1.26	6.24
	k-	-10.000*	1.187	.000	-12.49	-7.51
	P1	-1.500	1.187	.223	-3.99	.99
	P2	3.000*	1.187	.021	.51	5.49
	P4	-5.500*	1.187	.000	-7.99	-3.01
P4	k+	9.250*	1.187	.000	6.76	11.74
	k-	-4.500*	1.187	.001	-6.99	-2.01
	P1	4.000*	1.187	.003	1.51	6.49
	P2	8.500*	1.187	.000	6.01	10.99
	P3	5.500*	1.187	.000	3.01	7.99

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

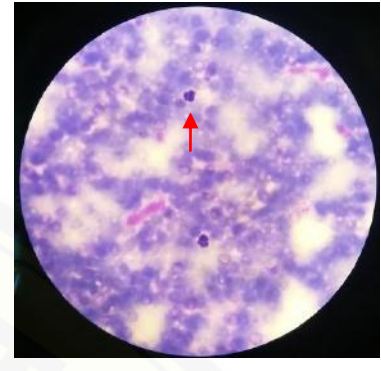
**E. Foto Hasil Penelitian**



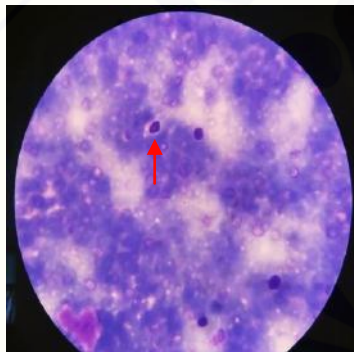
Natrium Diklofenak H7  
Perbesaran 1000x



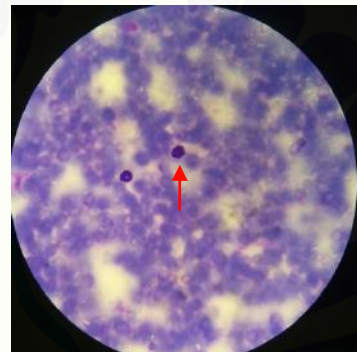
Aquadest H7  
Perbesaran 1000x



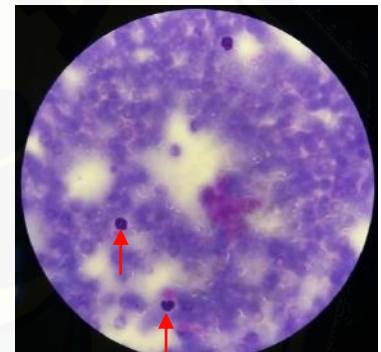
Ekstrak 2000 mg/kg BB  
Perbesaran 1000x



Ekstrak 1000 mg/kg BB  
Perbesaran 1000x



Ekstrak 500 mg/kg BB  
Perbesaran 1000x



Ekstrak 250 mg/kg BB  
Perbesaran 1000x

↑ : sel PMN neutrofil

**F. Foto Alat dan Bahan Penelitian**



Evaporator



Tabung Erlenmeyer



Oven



Timbangan Digital



Waterbath



Timbangan Analitik



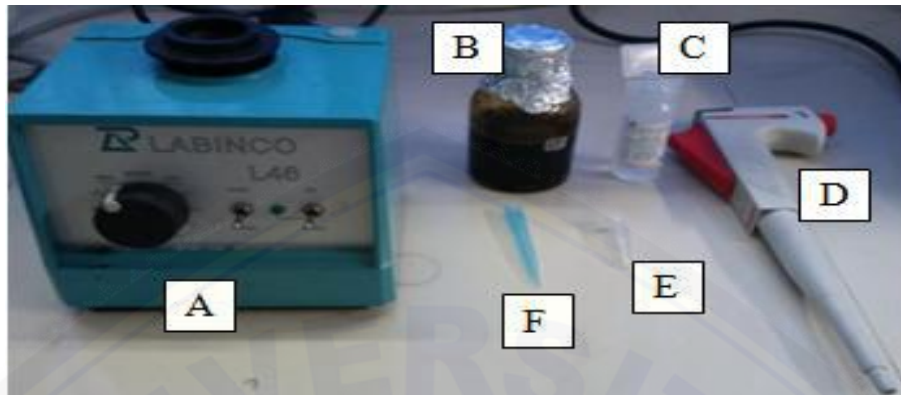
Cat Giemsa



Mikroskop Binokuler



Kertas Saring Whatman



**Alat**

- A: Thermolyne
- D: Mikro pipet
- E: Tip Tube
- F: Blue Tip
- G: Timbangan mencit
- I: Gunting
- I: Alat pencukur
- K: Scalpel
- L: Sonde Lambung

- M: Disposable Syringe
- O; *Object glass*

**Bahan**

- B: Ekstrak umbi bit murni
- C: Aquadest Steril
- H: Ekstrak umbi bit dan larutan natrium diklofenak
- N: *Escherichia coli*

**G. Surat Keterangan Identifikasi Tanaman**

**KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI**  
**UNIVERSITAS JEMBER**  
**Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**  
Jl. Kalimantan 37 Jember Jawa Timur  
Telp 0331-330225

**SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI**No. **1.2.1.1.**/UN25.1.9/TU/2016

Berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke Herbarium Jemberiense, Laboratorium Botani dan Kultur Jaringan, Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Jember oleh :

Nama : Ni Putu Yogi Wiranggi  
NIM : 131610101008  
Jur./Fak./PT : F. Kedokteran Gigi/Universitas Jember

maka dapat disampaikan hasilnya bahwa spesimen tersebut adalah :

*Beta vulgaris* 'Ruby Queen' {Syn.; - Family – Amaranthaceae; Vernacular name – Bit (Ind.)}

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 3 Mei 2016



Mengstahui,  
Pembantu Dekan I,  
Drs. Achmad Sjaifullah, M.Sc, Ph.D.  
NIP 195910091986021001

a.n Ketua Laboratorium  
Sekretaris Jurusan

Eva Tyas Utami, S.Si., M.Si.  
NIP. 197306012000032001

**H. Surat Keterangan Identifikasi Bakteri *Escherichia coli***

**KEMENTRIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
JURUSAN BIOLOGI**  
Jalan Kalimantan III No.23 FMIPA, Universitas Jember, Jawa Timur 68123

---

**SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI**

Berdasarkan hasil identifikasi dengan pengecatan Gram pada bakteri yang digunakan  
Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Jember oleh :

Nama/NIM : NI Putu Yogi Wiranggi / 131610101008

Jurusan/Fak/PT : Kedokteran Gigi / Universitas Jember

Maka dapat disampaikan hasilnya bahwa bakteri tersebut adalah

*Escherichia coli*

Demikian mudah-mudahan bermanfaat.

Jember, 18 Oktober 2016

Kalab. Mikrobiologi

Drs. Rudju Winarsa, M. Kes

NIP. 196008161989021001

I. Surat *Ethical Clearance*

KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI  
UNIVERSITAS JEMBER

**KOMISI ETIK PENELITIAN**

Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877 Jember 68121 – Email :  
fk\_unej@telkom.net

**KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK**

*ETHICAL APPROVA*

Nomor : 1.019 /H25.1.11/KE/2016

Komisi Etik, Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

*The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Jember University, With regards of the protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled :*

**UJI ANTI INFLAMASI EKSTRAK UMBI BIT MERAH (*Beta vulgaris L.*) TERHADAP JUMLAH SEL POLIMORFONUKLEAR (PMN) NEUTROFIL DARAH TEPI EKOR MENCIT YANG DIINDUKSI *Escherichia coli***

Nama Peneliti Utama : Ni Putu Yogi Wiranggi (NIM.131610101008)  
*Name of the principal investigator*

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember  
*Name of institution*

Dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.  
*And approved the above mentioned proposal.*

  
2 Nov 2016  
dr. Rini Riyanti, Sp.PK



## J. Surat Pembuatan Ekstrak



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
RUMAH SAKIT GIGI DAN MULUT  
UNIVERSITAS JEMBER

Jl. Kalimantan 37 Jember 68121, Telp./ fax (0331) 325041

**SURAT KETERANGAN PEMBUATAN EKSTRAK**

Data Pemohon

Nama : Ni Putu Yogi Wiranggi  
NIM : 131610101008  
Fakultas : Kedokteran Gigi Universitas Jember  
Tanggal Pembuatan : 17 Oktober 2016  
Bahan : Umbi Bit Merah (*Beta Vitgaris L*)  
Pelarut Pengekstraksi : Etanol 96%  
Metode ekstraksi : Maserasi  
Prosedur : Serbuk simplisia umbi bit merah sebanyak 435,17 gr dimaserasi dengan etanol 96% sebanyak 7,5 kali berat serbuk selama 3 (tiga) hari. Maserat dipekatkan dengan rotary evaporator.  
Hasil : Ekstrak etanol umbi bit merah dengan rendemen 6,96% (b/b)

Jember, 21 Oktober 2016

Mengetahui,  
Wakil I RSGM

Drg. Sulistiyani, M.Kes  
NIP. 196601311996012001

Petugas Laboratorium

Nur Aziza, A.Md, Ak  
NIP. 198603052010122003