



**INFILTRASI SEL INFLAMASI PADA GINGIVA TIKUS YANG DIINDUKSI
PERIODONTITIS SETELAH PEMBERIAN GEL EKSTRAK
FLAVONOID DAUN SINGKONG (*Manihot esculenta*)
KONSENTRASI 25% DAN 50%**

SKRIPSI

Oleh

Adriano Joshua

NIM 131610101065

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2017**



**INFILTRASI SEL INFLAMASI PADA GINGIVA TIKUS YANG DIINDUKSI
PERIODONTITIS SETELAH PEMBERIAN GEL EKSTRAK
FLAVONOID DAUN SINGKONG (*Manihot esculenta*)
KONSENTRASI 25% DAN 50%**

SKRIPSI

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

Oleh

Adriano Joshua

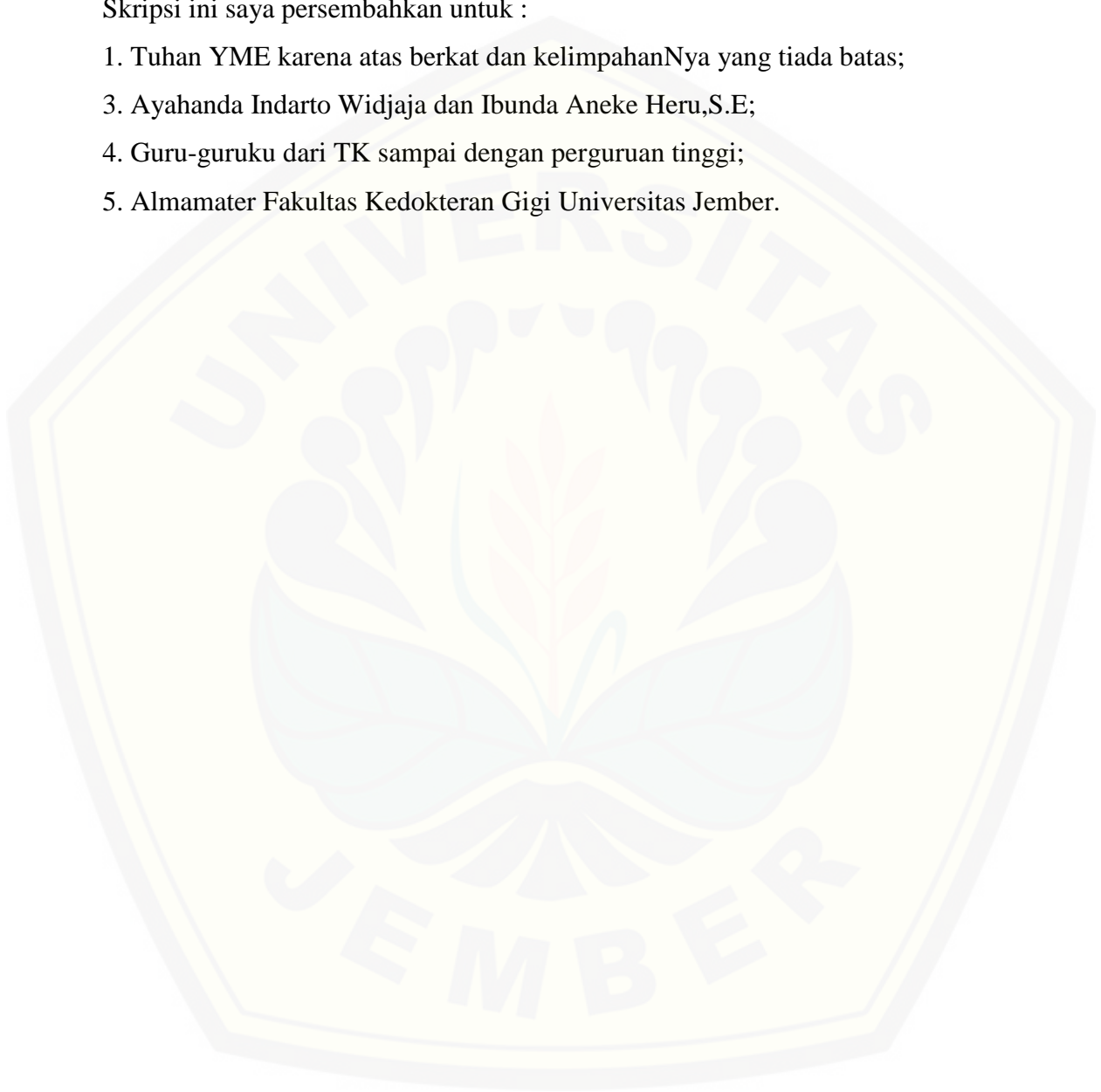
NIM 131610101065

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2017**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Tuhan YME karena atas berkat dan kelimpahanNya yang tiada batas;
3. Ayahanda Indarto Widjaja dan Ibunda Aneke Heru,S.E;
4. Guru-guruku dari TK sampai dengan perguruan tinggi;
5. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.



MOTTO

“Sebab seperti bumi memancarkan tumbuh-tumbuhan, dan seperti kebun menumbuhkan benih yang ditaburkan, demikianlah Tuhan ALLAH akan menumbuhkan kebenaran dan puji-pujian di depan semua bangsa-bangsa.”
(Yesaya 61:11)^{*)}

“Allah itu Roh dan barangsiapa menyembah Dia, harus menyembah-Nya dalam roh dan kebenaran.”
(Yohanes 4:24)^{**)}

“Berbahagialah kamu, jika kamu dinista karena nama Kristus, sebab Roh kemuliaan, yaitu Roh Allah ada padamu.”
(1 Petrus 4:14)^{**)}

^{*)}Lembaga Alkitab Indonesia. 2003. *Alkitab Versi Pemulihan Perjanjian Lama*. Jakarta: Yayasan Perpustakaan Injil Indonesia.

^{**)}Lembaga Alkitab Indonesia. 1998. *Alkitab Versi Pemulihan Perjanjian Baru*. Jakarta: Yayasan Perpustakaan Injil Indonesia.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Adriano Joshua

NIM : 131610101065

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul "Infiltrasi Sel Inflamasi pada Gingiva Tikus yang diinduksi Periodontitis Setelah Pemberian Gel Ekstrak Flavonoid Daun Singkong (*Manihot esculenta*) Konsentrasi 25% dan 50%" adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 2 Agustus 2017
Yang menyatakan,

Adriano Joshua
NIM 131610101065

SKRIPSI

**INFILTRASI SEL INFLAMASI PADA GINGIVA TIKUS YANG DIINDUKSI
PERIODONTITIS SETELAH PEMBERIAN GEL EKSTRAK
FLAVONOID DAUN SINGKONG (*Manihot esculenta*)
KONSENTRASI 25% DAN 50%**

Oleh

Adriano Joshua

NIM 131610101065

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER**

2017

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : drg. Rendra Chriestedy Prasetya, MD.Sc

Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Zahara Meilawaty, M.Kes

PENGESAHAN

Karya Ilmiah skripsi berjudul "Infiltrasi Sel Inflamasi pada Gingiva Tikus yang diinduksi Periodontitis Setelah Pemberian Gel Ekstrak Flavonoid Daun Singkong (*Manihot esculenta*) Konsentrasi 25% dan 50%" telah diuji dan disahkan pada :

hari, tanggal : Rabu, 2 Agustus 2017

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Tim Penguji:

Penguji Utama

Penguji Anggota

drg. Melok Aris W., M.Kes, Sp.Perio
NIP 1971040920051122001

drg. Suhartini, M.Biotech
NIP 197909262006042002

Pembimbing Utama

Pembimbing Pendamping

drg. Rendra Chriestedy Prasetya, MD.Sc
NIP 198305312008011003

drg. Zahara Meilawaty, M.Kes
NIP 198005272008122002

Mengesahkan
Dekan,

drg. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Prof
NIP 196901121996011001

RINGKASAN

Infiltrasi Sel Inflamasi pada Gingiva Tikus yang diinduksi Periodontitis Setelah Pemberian Gel Ekstrak Flavonoid Daun Singkong (*Manihot esculenta*) Konsentrasi 25% dan 50% ; Adriano Joshua, 131610101065; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Periodontitis sebagai salah satu penyakit periodontal disebabkan oleh bakteri gram negatif yang terdapat dalam plak gigi. Bakteri ini menghasilkan produk yaitu endotoksin yang berupa lipopolisakarida (LPS). Bakteri dan produknya yang masuk akan direspon dengan emigrasi dari sel-sel inflamasi menuju jaringan untuk menghancurkan dan menetralkan bakteri dan produknya. Penatalaksanaan periodontitis melalui *scaling* dan *root planing* serta dibantu dengan pemberian obat antiinflamasi ibuprofen. Penggunaan jangka panjang ibuprofen memiliki efek samping yaitu masalah gastrointestinal, gangguan ginjal dan pendarahan akibat terganggunya agregasi platelet. Salah satu sediaan untuk mempermudah aplikasi obat dalam poket periodontal adalah bentuk sediaan gel karena mampu meningkatkan daya *bioavailability* dari obat. Singkong (*Manihot esculenta*) merupakan tanaman yang mudah tumbuh di Indonesia. Salah satu bagian tanaman singkong yang bermanfaat adalah daun singkong karena memiliki efek antiinflamasi terutama kandungan flavonoidnya. Penelitian eksperimental ini bertujuan untuk mengetahui infiltrasi sel inflamasi pada gingiva tikus yang diinduksi periodontitis setelah pemberian gel ekstrak flavonoid daun singkong (*Manihot esculenta*) konsentrasi 25% dan 50%.

Jenis penelitian adalah eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian *the post test only control group design*. 27 ekor tikus wistar jantan dibagi 3 kelompok kemudian diinjeksi LPS (Lipopolisakarida) *E.coli* (*Sigma* ATCC 25922) pada molar 1 rahang bawah kanan sisi bukal dan lingual selama 14 hari. Kelompok pertama tanpa perawatan. Kelompok kedua diberi gel ekstrak flavonoid daun singkong 25%. Kelompok ketiga diberi gel ekstrak flavonoid daun singkong 50%. Pada hari ke-1, ke-

7, dan ke-14 setelah perlakuan, 3 ekor tikus setiap kelompok didekapitasi. Jaringan diproses, diwarnai HE, dan diamati sel neutrofil, makrofag, dan limfositnya menggunakan mikroskop binokuler perbesaran 400X dan dijumlahkan oleh 3 orang pengamat.

Data hasil penelitian disajikan dalam rata-rata jumlah tiap jenis sel inflamasi, kemudian dilakukan uji normalitas menggunakan *Shapiro-wilk* dan didapatkan untuk neutrofil terdistribusi normal namun makrofag dan limfosit tidak normal lalu uji homogenitas menggunakan *Levene Test* dan menunjukkan semua jenis sel terdistribusi homogen. Neutrofil dilakukan uji parametrik *Two Way Anova* dengan dengan hasil bahan (kelompok perlakuan) dan hari tidak berbeda signifikan (0,293) sehingga tidak dilanjutkan uji *Least Significant Difference*. Makrofag dan limfosit dilakukan uji non parametrik *Friedman* dan didapati hari dekapitasi signifikan tapi bahan (kelompok perlakuan) tidak berbeda signifikan, maka dilakukan uji lanjutan *Mann Whitney* pada faktor hari dekapitasi dan didapati pada semua hubungan hari dekapitasi memiliki nilai yang signifikan.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa ekstrak flavonoid daun singkong konsentrasi 50% tidak berbeda signifikan dalam menghambat respon sel inflamasi ditandai dengan menurunnya jumlah sel inflamasi sedangkan ekstrak flavonoid daun singkong konsentrasi 25% tidak efektif dalam menurunkan respon inflamasi ditandai dengan meningkatnya jumlah sel inflamasi.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Tuhan YME karena hanya dengan berkat dan kasih karuniaNya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "Infiltrasi Sel Inflamasi pada Gingiva Tikus yang diinduksi Periodontitis Setelah Pemberian Gel Ekstrak Flavonoid Daun Singkong (*Manihot esculenta*) Konsentrasi 25% dan 50%" sebagai persyaratan menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) di Fakultas kedokteran gigi Universitas Jember.

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

1. Ayah, Indarto Widjaja yang selalu memotivasi, memberikan nasehat dan mendukung cita-cita saya sebagai dokter gigi
2. Ibu, Aneke Heru, S.E yang selalu mendukung, memberikan semangat, kasih sayang, doa serta kepercayaan kepada saya dalam setiap pilihan hidup saya.
3. drg. Rahardyan Parnaadji, M.Kes, Sp. Pros sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
4. drg. Rendra Christedy Prasetya, MD.Sc sebagai dosen pembimbing utama yang selalu sabar memberikan pengarahan dan bimbingan untuk menyelesaikan skripsi ini
5. drg. Zahara Meilawaty, M.Kes sebagai dosen pembimbing anggota sekaligus kepala proyek penelitian Ekstrak Flavonoid Daun Singkong yang telah memberikan banyak sekali masukan dan selalu sabar dalam membimbing saya dalam menyelesaikan skripsi ini
6. drg. Melok Aris Wahyukundari, M.Kes, Sp.Perio dan drg. Suhartini, M.Biotech sebagai penguji yang sudah meluangkan waktu untuk membaca, memberikan kritik dan saran dalam penulisan skripsi ini

7. Staff Laboratorium Bioscience Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember diantaranya mas Erwan, mbak Azizah, dan lain-lain yang banyak membantu dalam penyediaan alat dan bahan yang digunakan dalam skripsi
8. Staff Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yaitu mas Agus yang banyak membantu meskipun hari libur dan atas penemuan *rat dental chair* yang sangat membantu dalam perlakuan terhadap hewan coba
9. Staff Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yaitu mbak Wahyu yang meskipun dengan banyak kesibukan masih dapat membantu prosedur histologi dari sampel penelitian ini
10. Staff Akademik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
11. Staff Laboratorium Biologi Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang
12. Staff Laboratorium Teknologi Sedia Likuida Bagian Farmasetika, Fakultas Farmasi Universitas Jember
13. Seluruh saudara-saudari Gereja Lokal Jember beserta trainees FTTI Surabaya yang telah membantu didalam kasih, doa, dan permohonan.
14. Teman skripsi Ekstrak Flavonoid Daun Singkong: Ferdina Recky yang telah banyak membantu memberi bantuan tenaga, pikiran, dan waktu dalam setiap tahapan penelitian yang tidak bisa disebutkan satu per satu
15. Teman-teman baik yang senasib, seperjuangan, dan sepenanggungan meskipun berbeda penelitian: Akbar, Ucup, Fredi, mas Benny yang telah menemani dalam pengerjaan skripsi mulai dari merawat hewan coba, pengamatan histologi, bahkan meluangkan waktunya jalan-jalan, cari tempat makan enak, bermain, atau hunting foto dikala jenuh.
16. Teman-teman angkatan 2013 yang selalu kompak dan selalu memberi motivasi kepada saya, Jaya-Jaya Membangun Bangsa

Jember, 2 Agustus 2017

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Periodontitis	4
2.1.1 Definisi.....	4
2.1.2 Etiologi.....	4
2.1.3 Gejala Klinis.....	5
2.2 Inflamasi	7
2.2.1 Pengertian.....	7
2.2.2 Jenis Respon Inflamasi.....	7
2.2.3 Sel-sel inflamasi dalam periodontitis dan karakteristiknya.....	8

2.3 Hubungan Lipopolisakarida (LPS) dalam Periodontitis dan Respon inflamasi	10
2.4 Singkong	13
2.4.1 Definisi, perkembangan, dan karakteristik singkong.....	13
2.4.2 Klasifikasi Singkong.....	14
2.4.3 Kandungan dan manfaat flavonoid Daun Singkong.....	15
2.5 Kerangka Konsep Penelitian	17
2.6 Hipotesis	18
BAB 3. METODE PENELITIAN	19
3.1 Jenis Penelitian	19
3.2 Rancangan Penelitian	19
3.3 Tempat dan Waktu Penelitian	19
3.3.1 Tempat Penelitian.....	19
3.3.2 Waktu Penelitian.....	19
3.4 Identifikasi Variabel Operasional	20
3.4.1 Variabel Bebas.....	20
3.4.2 Variabel Terikat.....	20
3.4.3 Variabel Terkendali.....	20
3.5 Definisi Operasional Penelitian	20
3.5.1 Gel Ekstrak Flavonoid Daun Singkong (<i>Manihot esculenta</i>).....	20
3.5.2 Tikus Periodontitis.....	20
3.5.3 Infiltrasi sel inflamasi.....	21
3.6 Populasi dan Sampel	21
3.6.1 Populasi Penelitian.....	21
3.6.2 Kriteria Sampel.....	21
2.6.3 Besar Sampel Penelitian.....	21
3.7 Alat dan Bahan Penelitian	22
3.7.1 Alat Penelitian.....	22
3.7.2 Bahan Penelitian.....	22

3.8 Prosedur Penelitian	23
3.8.1 <i>Ethical Clearence</i>	23
3.8.2 Persiapan Hewan Coba.....	23
3.8.3 Pembagian Kelompok Perlakuan.....	23
3.8.4 Pembuatan Model Tikus Periodontitis.....	24
3.8.5 Pembuatan Ekstrak Flavonoid Daun Singkong.....	24
3.8.6 Pembuatan Gel Ekstrak Flavonoid Daun Singkong.....	25
3.8.7 Aplikasi Topikal Gel Ekstrak Flavonoid Daun Singkong.....	25
3.8.8 Pengambilan Sampel Penelitian.....	25
3.8.9 Tahap Dekalsifikasi Jaringan.....	26
3.8.10 Pembuatan Sediaan Histologi.....	26
3.9 Analisis Data	29
3.10 Alur Penelitian	30
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	31
4.1 Hasil Penelitian	31
4.2 Pembahasan	41
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	44
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN	51

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Rata-rata jumlah neutrofil.....	34
Tabel 4.2 Uji Normalitas Neutrofil menggunakan <i>Shapiro-wilk</i>	35
Tabel 4.3 Uji Homogenitas Neutrofil menggunakan <i>Levene</i>	35
Tabel 4.4 Uji <i>Two way Anova</i> Neutrofil.....	36
Tabel 4.5 Rata-rata jumlah Makrofag.....	36
Tabel 4.6 Uji Normalitas Makrofag menggunakan <i>Shapiro-wilk</i>	37
Tabel 4.7 Uji Homogenitas Makrofag menggunakan <i>Levene</i>	37
Tabel 4.8 Uji <i>Friedman</i> Makrofag.....	38
Tabel 4.9 Uji <i>Mann Whitney</i> Makrofag Faktor Hari Dekapitasi.....	38
Tabel 4.10 Rata-rata jumlah Limfosit.....	38
Tabel 4.11 Uji Normalitas Limfosit menggunakan <i>Shapiro-wilk</i>	40
Tabel 4.12 Uji Homogenitas Limfosit menggunakan <i>Levene</i>	40
Tabel 4.13 Uji <i>Friedman</i> Limfosit.....	40
Tabel 4.14 Uji <i>Mann Whitney</i> Limfosit Faktor Hari Dekapitasi.....	41

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1: Gambaran histologi gingiva yang sehat.....	6
Gambar 2.2: Gambaran histologi periodontitis pada interproksimal.....	6
Gambar 2.3: Inflamasi akut dan Inflamasi kronis.....	8
Gambar 2.4: Gambaran Histologis Neutrofil jenis segmen.....	9
Gambar 2.5: Gambaran Histologis Makrofag dengan residu selulernya.....	9
Gambar 2.6: Gambaran Histologis Limfosit.....	10
Gambar 2.7: Ilustrasi respon inflamasi dalam vaskuler.....	12
Gambar 2.8: Ilustrasi aktivasi leukosit.....	12
Gambar 2.9: Respon inflamasi dalam periodontitis.....	13
Gambar 2.10: Daun singkong.....	14
Gambar 2.11: Struktur kimia kuersetin.....	15
Gambar 2.12: Kerangka Konsep Penelitian.....	17
Gambar 3.1: Gambaran Histologis (perbesaran 40x) daerah yang akan diamati yakni daerah jaringan ikat <i>sulcular</i> dan <i>junctional</i> dari gingiva tikus yang diinduksi periodontitis	29
Gambar 3.2: Bagan Alur Penelitian.....	30
Gambar 4.1: Gambaran Histologis (perbesaran 400x) kelompok Hari dekapitasi ke-1.....	31
Gambar 4.2: Gambaran Histologis (perbesaran 400x) kelompok Hari dekapitasi ke-7.....	32
Gambar 4.3: Gambaran Histologis (perbesaran 400x) kelompok Hari dekapitasi ke-14.....	33
Gambar 4.4: Grafik batang rata-rata jumlah neutrofil berdasarkan Hari dekapitasi.....	34
Gambar 4.5: Grafik batang rata-rata jumlah makrofag berdasarkan Hari dekapitasi.....	36

Gambar 4.6: Grafik batang rata-rata jumlah limfosit berdasarkan Hari dekapitasi..... 39



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran A: Surat <i>Ethical Clearance</i>	51
Lampiran B: Surat Identifikasi Tanaman.....	53
Lampiran C: Surat Keterangan Pembuatan Gel.....	54
Lampiran D: Pengenceran Gel Ekstrak Flanonoid Daun Singkong	55
Lampiran E: Tabel Hasil Pengamatan.....	56
Lampiran F: Hasil Penghitungan Sel inflamasi pada hari ke-1, 7, dan 14.....	57
Lampiran G: Hasil Uji Statistik.....	61
Lampiran H: Foto Penelitian.....	70
Lampiran I: Alat dan Bahan Penelitian.....	77

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit periodontal merupakan penyakit umum pada rongga mulut berupa suatu respon inflamasi pada jaringan periodontal dan dapat lebih luas melibatkan sementum dan tulang alveolar (Kurniawati, 2005). Secara epidemiologi penyakit periodontal juga mendapat perhatian penting selain karies (KEMENKES RI, 2012) dan cenderung lebih destruktif pada orang dewasa daripada anak-anak (*American Academy of Periodontology*, 2004). Berdasarkan Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) tahun 2010 penyakit periodontal menduduki urutan kedua dengan jumlah penderita 42,8% penduduk Indonesia (Tuhuteru *et al.*, 2014).

Periodontitis sebagai salah satu penyakit periodontal disebabkan oleh bakteri gram negatif seperti *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, dan *Bacteriodes forsythus* yang terdapat dalam plak gigi. Bakteri ini menghasilkan produk salah satunya adalah endotoksin yang berupa lipopolisakarida (LPS) (Sanz *et al.*, 2004; Djais, 2006; Fitria, 2006).

Bakteri dan produknya yang masuk ke jaringan akan direspon oleh sel-sel makrofag dengan mensintesis sitokin proinflamasi seperti IL-1 α dan TNF- α dan mediator proinflamasi seperti interferon- γ , TGF- β , dan IL-8 pada daerah subgingival. Peningkatan sitokin dan mediator proinflamasi ini akan memicu reaksi adhesi dan kolonisasi dari sel-sel inflamasi pada endotel yang diperantarai oleh molekul adhesi yang akan menyebabkan sel-sel inflamasi keluar dari vaskuler dan menuju jaringan untuk menghancurkan serta menetralkan bakteri dan produknya. Jika sel inflamasi tidak mampu mengatasi bakteri dan produknya maka bakteri dan produknya ini akan menginvasi sistem vaskuler yang berpotensi menjadi aterosklerosis (Cotti *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2013; Newman *et al.*, 2015).

Penatalaksanaan periodontitis melalui *scaling* dan *root planing* serta dibantu dengan pemberian obat. Salah satu obat antiinflamasi yang digunakan adalah ibuprofen. Ibuprofen bekerja dengan cara menghambat enzim siklooksigenase. Penggunaan jangka panjang ibuprofen memiliki efek samping yaitu dapat menyebabkan masalah gastrointestinal, gangguan ginjal dan pendarahan akibat terganggunya agregasi platelet (Chin *et al.*, 2008; Newman *et al.*, 2015). Oleh karena itu perlu dicari lagi penggunaan obat antiinflamasi yang memiliki efek samping lebih kecil serta mudah diaplikasikan yaitu obat herbal, salah satunya berasal dari daun singkong. Salah satu sediaan untuk mempermudah aplikasi obat dalam poket periodontal adalah bentuk sediaan gel. Sediaan gel ini mampu meningkatkan daya *bioavailability* dari obat (Sukmawati, 2010).

Singkong (*Manihot esculenta*) merupakan tanaman yang mudah tumbuh di Indonesia. Salah satu bagian tanaman singkong yang bermanfaat adalah daun singkong. Daun singkong memiliki efek antiinflamasi terutama kandungan flavonoidnya. Penelitian sebelumnya membuktikan bahwa ekstrak flavonoid daun singkong telah terbukti menurunkan aktivitas inflamasi (Sukrasno *et al.*, 2007; Rosiana *et al.*, 2013; Nisa *et al.*, 2013; Meilawaty, 2016). Oleh karena itu yang ingin penulis teliti adalah infiltrasi sel inflamasi pada gingiva tikus yang diinduksi periodontitis setelah pemberian gel ekstrak flavonoid daun singkong (*Manihot esculenta*) konsentrasi 25% dan 50%

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dinyatakan di atas, maka didapatkan rumusan masalah yaitu: Bagaimana infiltrasi sel inflamasi pada gingiva tikus yang diinduksi periodontitis setelah pemberian gel ekstrak flavonoid daun singkong (*Manihot esculenta*) konsentrasi 25% dan 50%?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian eksperimental ini bertujuan untuk mengetahui infiltrasi sel inflamasi pada gingiva tikus yang diinduksi periodontitis setelah pemberian gel ekstrak flavonoid daun singkong (*Manihot esculenta*) konsentrasi 25% dan 50%.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian yang diharapkan penulis dapat tercapai melalui penelitian ini adalah:

- 1.4.1 Dapat meningkatkan pengetahuan tentang pengaruh ekstrak flavonoid dalam daun singkong (*Manihot esculenta*) sebagai antiinflamasi terhadap infiltrasi sel inflamasi terutama dalam kasus periodontitis sehingga dapat menunjang proses penyembuhan dan pencegahan periodontitis secara herbal.
- 1.4.2 Dapat menjadi dasar untuk penelitian-penelitian selanjutnya terkait dengan pengobatan alternatif herbal terutama dalam pengobatan periodontitis.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Periodontitis

2.1.1 Definisi

Periodontitis merupakan keadaan peradangan (inflamasi) pada jaringan penyangga gigi yang disebabkan oleh akumulasi bakteri plak yang menghasilkan kehancuran terutama pada ligamen periodontal dan tulang alveolar yang ditandai dengan pemeriksaan klinis kedalaman *probing*, adanya resesi gingiva dan dapat juga keduanya. Secara klinis dapat ditandai adanya kehilangan perlekatan jaringan periodontal yang dideteksi melalui kedalaman *probing* yang juga terkait dengan tanda resesi gingiva. Kehilangan perlekatan ini sering bersamaan dengan terbentuknya poket dan perubahan baik densitas maupun ketinggian dari tulang alveolar. Untuk tanda klinis inflamasi seperti pendarahan saat *probing*, perubahan gingiva, dan kegoyangan gigi tidak selalu mengindikasikan adanya kehilangan perlekatan (Cotti *et al.*, 2010; Newman *et al.*, 2015).

2.1.2 Etiologi

Penyebab periodontitis bisa dikatakan multi faktor namun yang menjadi penyebab utamanya adalah akumulasi bakteri plak yang sebagian besar merupakan bakteri gram negatif subgingiva misalnya *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola*, dan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Aktivitas dari bakteri dan produk yang dihasilkan inilah yang mampu mengakibatkan kehilangan perlekatan jaringan periodontal dan mendestruksi tulang alveolar bahkan gigi tanggal prematur dengan cara bakteri memproduksi senyawa toksik dan enzim melalui proses inflamasi pada jaringan periodontal (Shibli *et al.*, 2008; Wolf dan Lamster, 2011).

Menurut AAP terdapat 2 faktor yang meningkatkan resiko periodontitis yaitu (*American Academy of Periodontology*, 2004; Manson dan Eley, 2004; Newman *et al.*, 2015):

- (a) Sistemik merupakan faktor keadaan tubuh pasien yang mengacu pada keadaan patologi yang mempengaruhi respon imun jaringan seperti diabetes melitus, *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) dan kelainan imunologis, kelainan darah, dan faktor genetik serta keadaan fisiologi seperti usia dan hormonal.
- (b) Lokal merupakan faktor keadaan disekitar jaringan penyangga gigi yang dapat meningkatkan memperparah periodontitis oleh karena meningkatkan akumulasi plak seperti restorasi *overhanging*, karies gigi, maloklusi, penggunaan dan desain piranti ortodontik atau prostetik yang salah, trauma dan merokok.

2.1.3 Gejala Klinis

Dalam perkembangan penyakit periodontal dikenal 3 tahapan periodontitis dengan gejala klinis sebagai berikut (Lambert dan Northridge, 2008; Obiechina, 2011):

(a) *Early / Mild periodontitis*

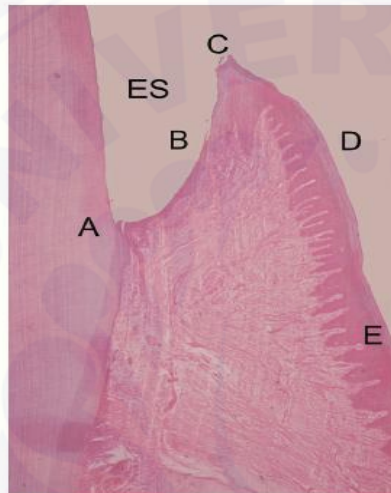
Memiliki gejala klinis seperti: adanya pendarahan saat *probing* dan pembesaran gingiva, pengukuran kedalaman *probing* 3-4 mm, sudah tampak resesi gingiva, nafas bau (*halitosis*), serta resorpsi tulang alveolar horizontal ringan pada pemeriksaan radiografi.

(b) *Moderate periodontitis*

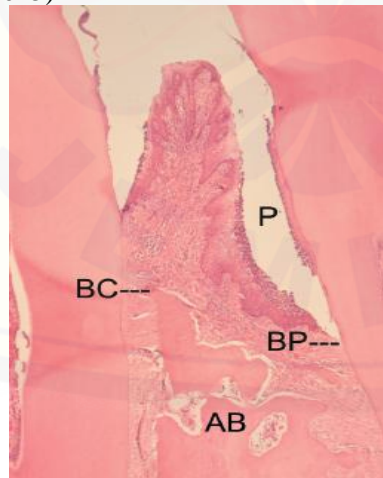
Memiliki gejala klinis seperti: pengukuran kedalaman *probing* 4-6 mm, pendarahan pada saat *probing*, kegoyangan gigi yang lebih parah dan menunjukkan keterlibatan furkasi, dengan pemeriksaan radiografi menunjukkan resorpsi yang lebih jauh serta perbandingan mahkota dan akar/*Crown Root Ratio* (CRR) menunjukkan 1:1

(c) *Advance / Severe periodontitis*

Memiliki gejala klinis seperti: pengukuran kedalaman *probing* lebih dari 6 mm, keterlibatan furkasi kelas III, kegoyangan parah bahkan tanggal, akar gigi terbuka sehingga sensitif terhadap rangsang termal dan secara radiografi tampak kehilangan tulang alveolar horizontal maupun vertikal serta perbandingan mahkota dan akar/*Crown Root Ratio* (CRR) 2:1



Gambar 2.1: Gambaran histologi gingiva yang sehat ditandai dengan melekatnya epitel *junctional* pada *Cemento Enamel Junction* (CEJ). Dengan keterangan: Epitel *junctional* (A ke B); Epitel sulcular (B ke C); *free gingiva* (C ke D); *attached gingival* (D ke E) (Sumber: Newman *et al.*,2015)



Gambar 2.2: Gambaran histologi periodontitis pada interproximal ditandai dengan bermigrasinya epitel *junctional* ke arah apikal. Dengan keterangan: poket periodontal (P); tulang alveolar (AB); dasar poket (BP); puncak tulang alveolar (BC) (Sumber: Newman *et al.*,2015)

2.2 Inflamasi

2.2.1 Pengertian

Inflamasi atau peradangan merupakan respon pertahanan tubuh atas terjadinya suatu *injury* dari benda yang tidak dikenal tubuh termasuk ancaman infeksi bakteri, trauma, autoimun, virus, dan toksin. Respon inflamasi melakukan tugasnya dengan menghancurkan, dan menetralkan dari agen-agen asing tersebut kemudian meregenerasi ulang tempat terjadinya *injury* tersebut. Meskipun demikian dalam prosesnya, peradangan juga menghasilkan kerusakan jaringan terkait dengan berbagai reaksi kimia yang dihasilkan baik oleh bakteri maupun oleh sel-sel inflamasi itu sendiri (Newman *et al.*, 2015).

2.2.2 Jenis Respon inflamasi

Respon inflamasi dapat dibagi menjadi 2 yaitu (Gambar 2.3) (Kumar *et al.*, 2013):

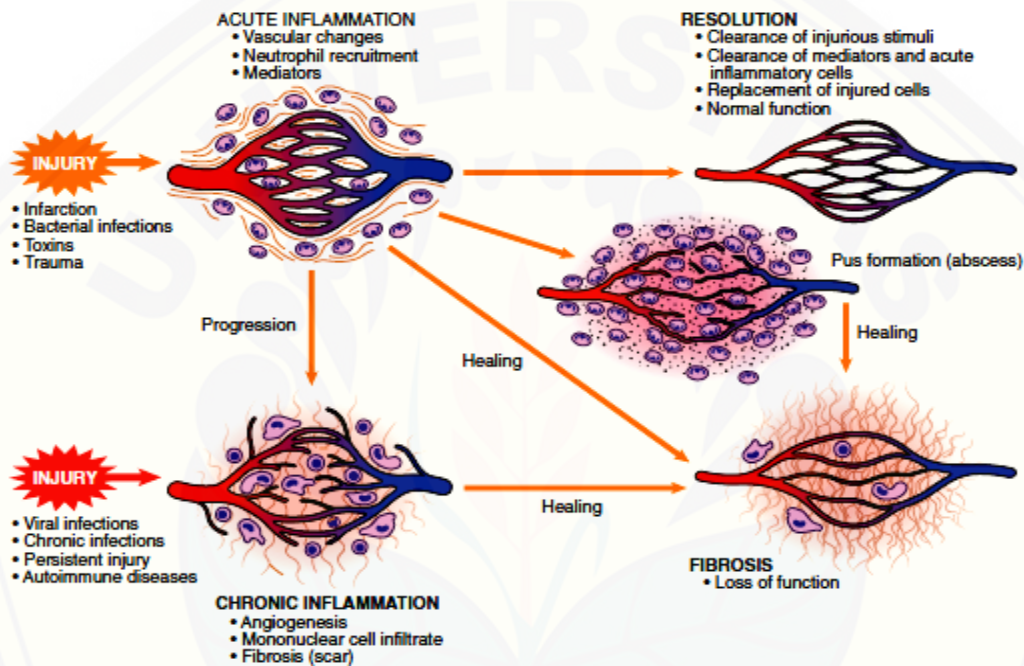
(a) Inflamasi Akut

Merupakan respon awal dari tubuh terhadap *injury* dengan mengirimkan leukosit yang ditandai dengan perubahan vaskuler dari mengecilnya lumen pembuluh darah (vasokonstriksi) sesaat menjadi lebih besar sehingga meningkatkan aliran darah (vasodilatasi) dan perubahan struktural dengan peningkatan permeabilitas vaskuler agar protein plasma lebih mudah meninggalkan sirkulasi, serta emigrasi leukosit terutama neutrofil menjadi terakumulasi dan terfokus pada *injury*.

Akibat dari inflamasi akut ini antara lain: *Resolusi* yaitu jika *injury* sesaat dan tempat yang terbatas tidak akan mengakibatkan kerusakan jaringan yang berarti (minimal), Pembentukan jaringan parut (*fibrosis*) yang terjadi apabila regenerasi jaringan kurang baik, Inflamasi akut dapat berlanjut menjadi inflamasi kronis yang terjadi apabila respon inflamasi terus berlangsung setara dengan regenerasinya sehingga menjadi inflamasi yang berkepanjangan.

(b) Inflamasi kronis

Merupakan kelanjutan inflamasi akut yang disebut juga inflamasi berkepanjangan oleh karena dapat terjadi dalam durasi minggu hingga tahun. Inflamasi kronis ditandai dengan (1) *Infiltrasi mononuclear cell* seperti makrofag, limfosit, dan sel plasma, (2) *Destruksi* jaringan oleh sel radang, (3) *Repair* yang melibatkan pembentukan pembuluh darah baru (*angiogenesis*) dan *fibrosis*.



Gambar 2.3: Inflamasi akut dan Inflamasi kronis (Sumber: Kumar *et al.*, 2013).

2.2.3 Sel-sel inflamasi dalam periodontitis dan karakteristiknya

(a) Neutrofil

Neutrofil disebut juga *polimorfonuclear* (PMN) merupakan sel darah putih yang sangat penting oleh karena termasuk pertahanan pertama dalam imun bawaan manusia serta kandungan yang terbanyak yakni sekitar 65%-75% diantara sel-sel darah putih lainnya dalam darah. Sel ini dinamai neutrofil oleh karena dalam pewarnaan Wright diamati hampir tidak memiliki warna (*neutral*), berdiameter 12-14 μm dan termasuk sel yang elastis sehingga mudah dan cepat dalam menembus endotel. Neutrofil yang berada dalam jaringan tidak dapat kembali dalam sirkulasi

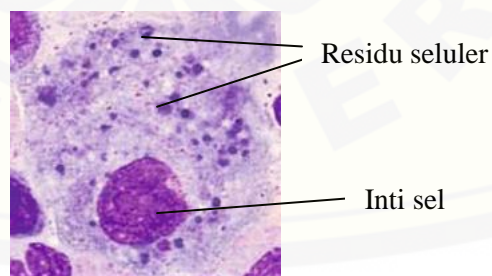
melainkan tetap hidup hingga 1-2 hari (Amulic *et al.*, 2012; Srinivasan, 2013; Newman *et al.*, 2015).



Gambar 2.4: Gambaran histologis Neutrofil jenis segmen (Sumber: Löffler *et al.*, 2005)

(b) Makrofag

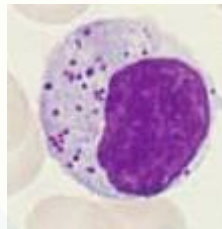
Makrofag memiliki fungsi utama dalam fagositosis. Makrofag menelan mikroorganisme dan partikel yang memasuki tubuh. Jika makrofag menjumpai benda yang berukuran besar, makrofag-makrofag bersatu untuk membentuk sel besar dengan 100 nukleus atau lebih yang disebut dengan *multinucleated giant cell*. Dalam keadaan sehat, makrofag merupakan fase akhir dari monosit yang bermigrasi ke jaringan. Makrofag biasanya mulai terjadi peningkatan pada hari ke-3 hingga hari ke-7 dalam proses *injury*. Makrofag berukuran 15-30 μm , bentuk tidak teratur, inti lonjong atau bentuk ginjal letak eksentrik. Makrofag mensintesis $\text{TNF-}\alpha$ dan $\text{IL-1}\beta$, ternyata juga mampu mengeluarkan matriks ekstraseluler yang berperan dalam regenerasi jaringan seperti kolagen, elastin, dan fibronektin (Wikesjö dan Selvig, 1999; Kumar *et al.*, 2013; Newman *et al.*, 2015).



Gambar 2.5: Gambaran Histologis Makrofag dengan residu selulernya (Sumber: Löffler *et al.*, 2005)

(c) Limfosit

Limfosit merupakan kekebalan tubuh adaptif yang terdiri dari tiga jenis sel berbeda yaitu limfosit T, limfosit B, dan dendritik sel. Secara keseluruhan sel-sel tersebut berkembang dari stem sel hemopoetik, *T-cell Reseptor* (TCR), *B-cell Reseptor* (BCR), dan molekul MHC (*Major Histocompatibility Complex*). Gambaran histologis memiliki ukuran 6-8 mikron, sitoplasma agak basofilik, inti besar dengan kromatin padat. Sel ini dapat berdiferensiasi menjadi pembunuh sel target terinfeksi (Limfosit T sitotoksik), sel-sel pembantu (Limfosit T-helper), dan menjadi antibodi sel plasma (Limfosit B) (Harjana, 2011; Kumar *et al.*, 2013). Limfosit terutama limfosit T muncul secara bermakna pada hari ke-5 hingga hari ke-7 (Diegelmann dan Evans, 2004).



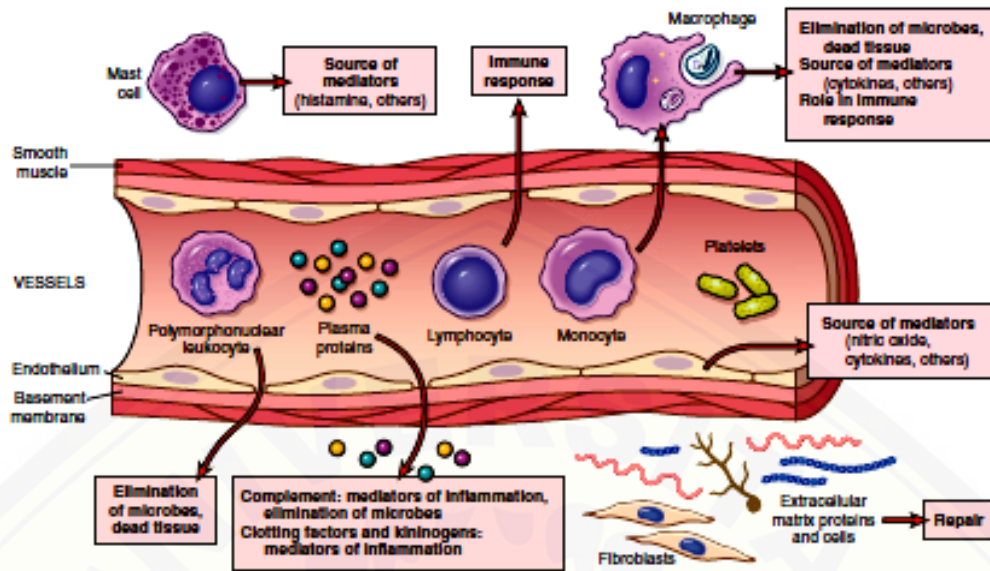
Gambar 2.6: Gambaran histologis limfosit (Sumber: Löffler *et al.*, 2005)

2.3 Hubungan Lipopolisakarida (LPS) dalam Periodontitis dan Respon inflamasi

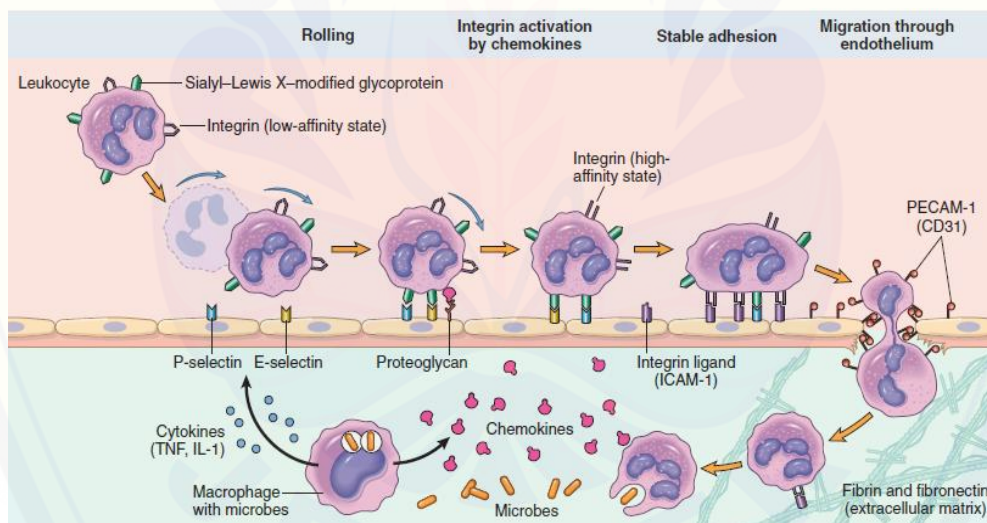
Penyakit Periodontitis disebabkan oleh faktor utamanya yakni bakteri plak dan produknya. Bakteri gram negatif beserta produknya antara lain *Pathogen/Microbe-Associated Molecular Patterns* (PAMPs atau MAMPs) dan termasuk juga lipopolisakarida (LPS), lipoprotein, dan peptidoglikan pada permukaan sel bakteri merupakan pemeran utama dalam patogenesis penyakit periodontal dan melalui proses bakteremi yakni kondisi dimana bakteri menginvasi sistem vaskuler khususnya sel endotel melalui bagian yang terbuka atau terinfeksi dalam hal ini adalah periodontal yang dapat juga diperoleh melalui prosedur dental. (Mealey dan Perry, 2006; Lidar *et al.*, 2009; Agus dan Yanti, 2010; Lockhart *et al.*, 2012, Herath *et al.*, 2013; Newman *et al.*, 2015).

Produk bakteri yaitu Lipopolisakarida (LPS) memiliki struktur yang bervariasi pada beberapa bakteri tergantung bioaktivitasnya, namun yang mempengaruhi aktivitas LPS adalah rantai lipid A nya (Stöver *et al.*, 2004). Pada gambar 2.9 tampak bahwa pada jaringan, LPS yang direspon oleh GF (*Gingiva Fibroblast*) dengan menginduksi COX-2 (*Cyclooxygenase-2*) yang kemudian meningkatkan sintesis dari PGE₂ (Prostaglandin E₂) tidak hanya oleh fibroblas tapi juga oleh makrofag, osteoklas dan osteoblas. PGE₂ inilah yang mengaktifasi jalur sinyal intraseluler mayor yakni NF_Kβ (*Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer β cell*) dimana sinyal ini awalnya masih tidak aktif pada sitoplasma dan terikat pada inhibitor kappa β (I_Kβ). Stimulasi oleh LPS menyebabkan I_Kβ kinase (IKKα dan IKKβ) teraktivasi sehingga terjadi fosforilasi protein I_Kβ yang menyebabkan degradasi dan melepaskan ikatan NF_Kβ dengan I_Kβ. Hal tersebut menyebabkan translokasi nukleus dan mengaktifasi transkripsi beberapa gen termasuk sitokin inflamasi. Kemudian sitokin ini akan memasuki respon endotel (Kersh, 2007; Bhoj dan Chen, 2009; Newman *et al.*, 2015).

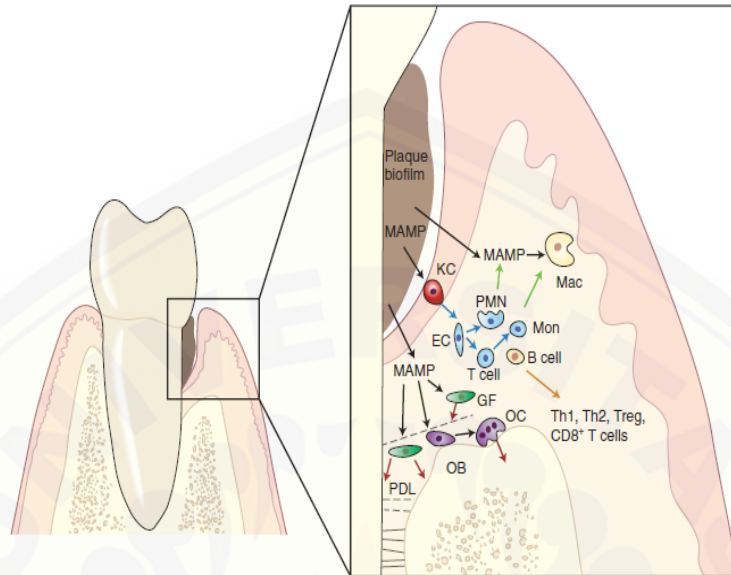
Pada respon endotel terdapat peningkatan ekspresi molekul adhesi *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1), *endotelial cell adhesion molecule-1* (ECAM-1) dan *vaskular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) yang merangsang akumulasi dan adhesi (perlekatan) sel-sel leukosit lainnya pada permukaan dalam dinding arteri melalui ikatan integrin. Kemudian sel endotel mengalami pelebaran jarak antar sel sehingga terjadi kebocoran vaskuler yang kemudian menyebabkan migrasi dari sel-sel leukosit kedalam jaringan seperti pada gambar 2.7 dan 2.8 (Kumar *et al.*, 2013; Newman *et al.*, 2015).



Gambar 2.7: Ilustrasi respon inflamasi dalam vaskuler (Sumber: Kumar *et al.*, 2013).



Gambar 2.8: Ilustrasi aktivasi leukosit (Sumber: Kumar *et al.*, 2013).



Gambar 2.9: Respon inflamasi dalam periodontitis. Keterangan gambar: *MAMP*, *Microbial-associated molecular pattern*; *RANKL*, *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*; *IL-8*, *interleukin-8*; *KC*, *keratinocyte*; *DC*, *dendritic cell*; *Mac*, *macrophage*; *GF*, *gingival fibroblast*; *PDL*, *periodontal ligament fibroblast*; *OB*, *osteoblast*; *OC*, *osteoclast*; *EC*, *endothelial cell*; *PMN*, *polymorphonuclear neutrophil*; *Mon*, *monocyte*; *T cell*, *T lymphocyte*; *B cell*, *B lymphocyte*. (Sumber: Newman *et al.*, 2015)

2.4 Singkong (*Manihot esculenta* atau *Manihot utilissima*)

2.4.1 Definisi, perkembangan, dan karakteristik singkong

Menurut Kamus Besar Bahasa Indonesia (KBBI) arti kata singkong disebut juga ubi kayu adalah tanaman yang hidup di daerah tropis, umbinya ada yang manis dan ada pula yang pahit, daunnya banyak mengandung protein dan biasa disayur atau direbus sebagai lalap.

Asal tanaman singkong pertama kali dikenal di Amerika Selatan kemudian dikembangkan pada masa prasejarah di Brasil dan Paraguay. Di Indonesia, singkong diperkenalkan oleh orang Portugis pada abad ke-16 dari Brasil dan mulai ditanam secara komersial sekitar tahun 1810. Di Indonesia, umbinya dikenal luas sebagai makanan pokok penghasil karbohidrat dan daunnya sebagai sayuran (Agoes, 2010).

Tanaman ini merupakan tanaman berkayu dengan arah pertumbuhan yang tegak, memiliki daun tunggal atau majemuk, menyebar dan berhadapan dengan daun penumpu menyerupai kelenjar atau menjari dari 5 hingga 9 belahan lembar daun. Untuk bunganya berkelamin tunggal, berumah satu atau dua, susunan yang beragam. Tanaman ini juga termasuk akar tunggang disamping akar serabut dari dasar yang lurus. Ubinya berkembang dari penebalan sekunder akar serabut adventif tersebut dengan bentuk bervariasi namun paling banyak dijumpai bentuk silinder meruncing bahkan beberapa memiliki cabang (Rubatzky dan Yamaguchi, 1998; Tjitrosoepomo, 2002).

2.4.2 Klasifikasi Singkong

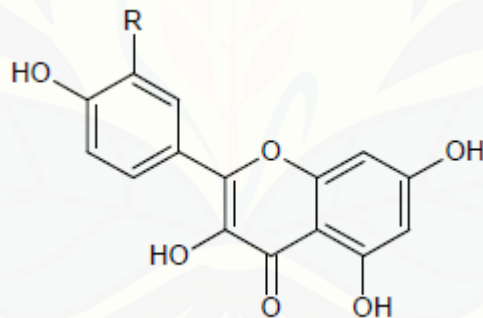


Gambar 2.10: Daun singkong (Meilawaty, 2016)

- Kingdom : *Plantae*
Divisio : *Spermatophyta* (tumbuhan berbiji)
Sub Divisio : *Angiospermae* (berbiji tertutup)
Classis : *Dicotyledoneae*
Ordo : *Euphorbiales*
Familia : *Euphorbiaceae*
Genus : *Manihot*
Spesies : *Manihot utilissima* Pohl.; *Manihot esculenta* Crantz sin.
(Rukmana, 2002; Steenis, 2005; Tjitrosoepomo, 2005)

2.4.3 Kandungan dan manfaat flavonoid Daun Singkong

Daun singkong telah diteliti memiliki kandungan flavonoid, triterpenoid, saponin, dan tanin. Kadar flavonoid dalam daun singkong dapat mencapai 881,33 mg RE/g (miligram *Rutin Equivalen* per gram) (Dewi, 2014). Di dalam daun singkong mengandung vitamin A dalam bentuk β -karoten yang berdasarkan penelitian sebelumnya (Meiliana *et al.*, 2014) menunjukkan kadar 7953,4 $\mu\text{g}/100\text{ g BDD}$ (Bahan Dapat Dimakan) pada daun singkong yang direbus garam pada suhu $96,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 15 menit, B1 dan C sebanyak 275 mg per 100 gram, kalsium, kalori, fosfor, protein, lemak, hidrat arang, dan zat besi. Menurut hasil penelitian, daun singkong termasuk jenis sayuran yang banyak mengandung flavonoid. Kandungan utama flavonoid daun singkong adalah golongan flavonoid rutin yang merupakan glikosida kuersetin dengan disakarida yang terdiri dari glukosa dan shamnosa (Sukrasno *et al.*, 2007; Agoes, 2010; Nurdiana, 2013).



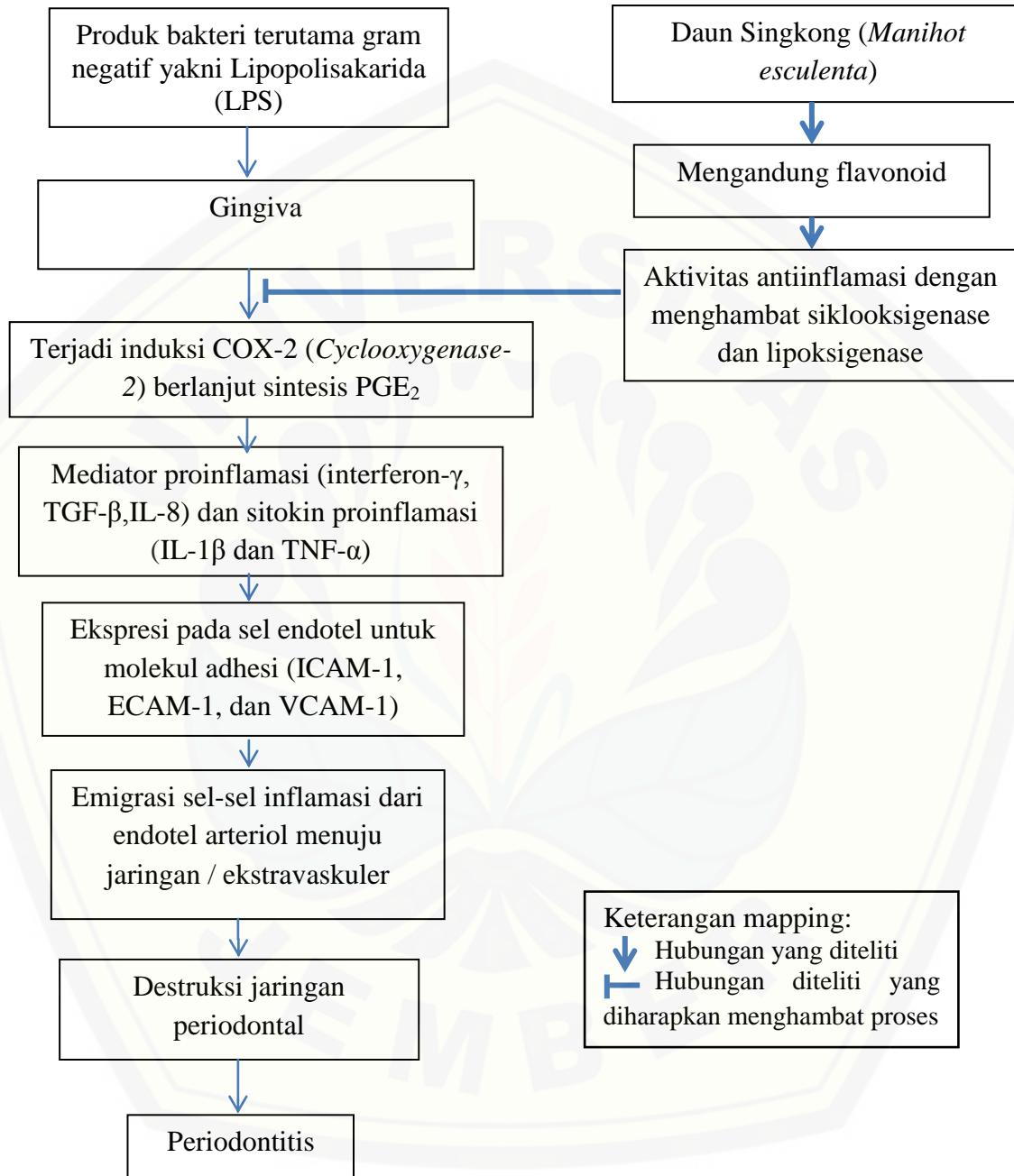
Gambar 2.11: Struktur kimia kuersetin (Vidak *et al.*, 2015)

Dalam penelitian ini lebih dikhususkan mengenai flavonoid daun singkong yang telah diketahui sebagai antiinflamasi dan antibakteri melalui siklus siklooksigenase dan lipoksigenase yang kemudian mampu menurunkan jumlah sel inflamasi serta adanya perbaikan kualitas jaringan ikat dan epitel, kemudian sebagai antioksidan yang merupakan senyawa pereduksi yang baik, menghambat banyak reaksi oksidasi, baik secara enzim maupun non enzim, sebagai penampung yang baik radikal hidroksi dan superoksida dengan demikian melindungi lipid membrane

terhadap reaksi yang merusak. Selain itu flavonoid mempunyai aktivitas sebagai antialergi, antithrombosis, bahkan juga memiliki aktivitas sebagai analgesik dengan dosis optimal 25,6 mg/kg bb (Desrini *et al.*, 2011; Lipinski, 2011).



2.5 Kerangka konsep Penelitian



Gambar 2.12: Kerangka Konsep Penelitian

2.6 Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini yaitu: Gel ekstrak flavonoid daun singkong (*Manihot esculenta*) konsentrasi 25% dan 50% dapat mengurangi infiltrasi sel inflamasi pada gingiva tikus yang diinduksi periodontitis.



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris (Notoatmodjo, 2005).

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *the post test only control group design* yaitu melakukan pengukuran atau observasi pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pada waktu yang telah ditentukan (Notoatmodjo, 2005).

3.3 Tempat dan Waktu

3.3.1 Tempat Penelitian

Penelitian diawali dengan membuat ekstrak flavonoid daun singkong (*Manihot esculenta*) di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang. Selanjutnya adalah pembuatan gel ekstrak flavonoid daun singkong (*Manihot esculenta*) dibuat di Laboratorium Teknologi Sedia Likuida Bagian Farmasetika, Fakultas Farmasi Universitas Jember. Pembuatan LPS dilakukan di Laboratorium Bioscience Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Perlakuan terhadap hewan coba dilakukan di Laboratorium Fisiologi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember. Pemrosesan jaringan dan pengamatan secara mikroskopis dilakukan di Laboratorium Histologi Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember.

3.3.2 Waktu Penelitian

Periode penelitian ini dilakukan pada bulan November 2016-Februari 2017.

3.4 Identifikasi Variabel Operasional

3.4.1 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah gel ekstrak flavonoid daun singkong (*Manihot esculenta*) dengan konsentrasi 25 % dan 50%.

3.4.2 Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah sel-sel inflamasi pada gingiva gigi molar pertama kanan rahang bawah tikus.

3.4.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini sebagai berikut:

- a) Kriteria sampel meliputi galur tikus, jenis kelamin, berat badan, umur, dan kondisi fisik.
- b) LPS Bakteri *E. Coli* (*Sigma* ATCC 25922).
- c) Dosis gel ekstrak flavonoid daun singkong (*Manihot esculenta*) sebanyak 0,05 ml, diberikan sebanyak dua kali sehari.
- d) Makanan (*turbo*) dan minuman tikus secara *ad libitum*.
- e) Ukuran kandang 40 cm x 60 cm x 15 cm dengan ventilasi yang cukup, 1 kandang berisi 3 tikus dan dibersihkan setiap 3 hari sekali.

3.5 Definisi Operasional Penelitian

3.5.1 Gel Ekstrak Flavonoid Daun Singkong (*Manihot esculenta*)

Gel ekstrak flavonoid daun singkong (*Manihot esculenta*) adalah sediaan ekstrak daun singkong dalam bentuk semi padat yang digunakan sebagai bahan aplikasi topikal pada tikus periodontitis dengan konsentrasi 25% dan 50%.

3.5.2 Tikus Periodontitis

Model tikus merupakan tikus wistar jantan yang diinduksi LPS *E. Coli* (*Sigma* ATCC 25922) pada gingiva bagian lingual dan bukal gigi molar pertama

kanan bawah dengan dosis 0,05 ml dan disuntikkan menggunakan tuberculine *syringe* dengan ukuran jarum 30 gauge (Ionel, 2015). Periodontitis ditunjukkan secara radiografi (lampiran H gambar 13) dan histologi dengan adanya sel-sel inflamasi.

3.5.3 Infiltrasi sel-sel inflamasi

Infiltrasi sel-sel inflamasi didapatkan dengan menghitung neutrofil, makrofag, limfosit pada daerah jaringan ikat pada sulkus gingiva tikus dan kemudian diberi pewarnaan *Haematoxilin Eosin* (HE), kemudian diamati di bawah mikroskop yang diukur dengan *software image raster* dengan perbesaran 400x pada lapang pandang terpilih pada 1 potongan kemudian hasilnya dijumlah dan dirata-rata antara 3 pengamat.

3.6 Populasi dan Sampel

3.6.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian yang digunakan adalah tikus putih dari galur Wistar (*Rattus norvegicus*) jantan dan belum pernah digunakan untuk penelitian.

3.6.2 Kriteria Sampel

Kriteria sampel pada penelitian ini adalah :

- a. Tikus strain Wistar berjenis kelamin jantan
- b. Umur 2-3 bulan
- c. Berat badan \pm 200 gram
- d. Tikus dalam keadaan sehat ditandai dengan gerakan aktif dari tikus

3.6.3 Besar Sampel Penelitian

Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah berdasarkan rumus Federer (Federer, 1955).

$$(t-1) \times (r-1) \geq 15$$

Dimana t adalah jumlah kelompok perlakuan dan r merupakan jumlah replikasi. Penelitian ini akan menggunakan tiga kelompok perlakuan sehingga:

$$(9-1) \times (r-1) \geq 15$$

$$8 \times (r-1) \geq 15$$

$$8r-8 \geq 15$$

$$r \geq 2,88 \text{ (3)}$$

Jadi sampel yang digunakan minimal 3 ekor per kelompok perlakuan.

3.7 Alat dan Bahan Penelitian

3.7.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan untuk penelitian ini adalah sebagai berikut, 8 kandang tikus termasuk tempat makan dan tempat minum, neraca digital (Ohaus), masker, sarung tangan latex, potongan kayu 2x2 cm, *syringe* kecil kapasitas 1 ml (Terumo, Jepang), *rat dental chair*, tabung reaksi, sentrifuge, kawat ose, *decycator*, inkubator, *spektrofotometer*, *shakerbath*, *rotary evaporator*, blender, mortar, tuberculine *syringe*, sonde, pinset, scalpel, pot, lampu spiritus, *microtom* (Tissue-Tek, Jepang), *object glass* dan *deck glass*, *waterbath*, kuas kecil, kompor listrik (Maspion, Indonesia), mikroskop cahaya (Olympus, Jepang), optilab (OptiLab Advance, Indonesia), *software image raster* (OptiLab Advance, Indonesia).

3.7.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah sebagai berikut: 27 ekor tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*), aquadest steril, media BHI-B, media BHI-A, vitamin K, hemin, *yeast extract*, LPS *E. Coli* (*Sigma ATCC 25922*), gel ekstrak flavonoid daun singkong (*Manihot esculenta*) 25% dan 50%, gel plasebo, Ketamin (KTM 1000), buffer formalin, *chloroform*, asam formic 10%, *xylol*, alkohol 70%, 80%, 95%, 100%, gliserin, *meyer egg albumin*, *Embedding Paraffin* (Paraplast Plus), minyak emersi, pewarnaan *Hematoxilin Eosin (HE)*, *enthelan*, kertas saring, makanan tikus wistar (turbo).

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Ethical Clearence

Sebelum dilakukan penelitian, dilakukan pengurusan *etichal clearance* untuk prosedur perlakuan terhadap hewan coba di Unit Etika dan Advokasi, Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

3.8.2 Persiapan Hewan Coba

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

3.8.3 Pembagian Kelompok Perlakuan

Hewan coba yang telah diadaptasikan akan dibagi menjadi 9 subkelompok dalam 3 kelompok besar.

Pembagian kelompok sebagai berikut :

- a) Kelompok 1 kontrol (9 ekor tikus) merupakan kelompok tikus yang diinduksi LPS *E. Coli* selama 2 minggu.
 - 1) Kelompok 1.1 (3 ekor tikus) tikus didekapitasi pada hari ke-1.
 - 2) Kelompok 1.2 (3 ekor tikus) tikus didekapitasi pada hari ke-7.
 - 3) Kelompok 1.3 (3 ekor tikus) tikus didekapitasi pada hari ke-14.
- b) Kelompok 2 (9 ekor tikus) merupakan kelompok yang diinduksi LPS *E. Coli* selama 2 minggu dan diaplikasi topikal gel ekstrak flavonoid daun singkong (*Manihot esculenta*) konsentrasi 25%.
 - 4) Kelompok 2.1 (3 ekor tikus) tikus didekapitasi pada hari ke-1.
 - 5) Kelompok 2.2 (3 ekor tikus) tikus didekapitasi pada hari ke-7.
 - 6) Kelompok 2.3 (3 ekor tikus) tikus didekapitasi pada hari ke-14.
- c) Kelompok 3 (9 ekor tikus) merupakan kelompok yang diinduksi LPS *E. Coli* selama 2 minggu dan diaplikasi topikal gel ekstrak flavonoid daun singkong (*Manihot esculenta*) konsentrasi 50%.
 - 7) Kelompok 3.1 (3 ekor tikus) tikus didekapitasi pada hari ke-1.

- 8) Kelompok 3.2 (3 ekor tikus) tikus didekapitasi pada hari ke-7.
- 9) Kelompok 3.3 (3 ekor tikus) tikus didekapitasi pada hari ke-14.

3.8.4 Pembuatan Model Tikus Periodontitis

Model tikus periodontitis adalah tikus wistar jantan yang diinduksi dengan LPS *E. Coli* pada gingiva bagian lingual dan bukal gigi molar pertama kanan bawah dengan dosis masing - masing bagian 0,05 ml dan diberikan 3 hari sekali selama 2 minggu menggunakan tuberculine *syringe* dengan ukuran jarum 30 gauge (Ionel, 2015).

3.8.5 Pembuatan Ekstrak Flavonoid Daun Singkong

Daun Singkong (*Manihot esculenta*) yang digunakan berasal dari daerah Tempurejo, Kabupaten Jember. Dipetik pada daun ke-5 dari pucuk sebanyak 450 gram dicuci bersih, dipotong kecil-kecil dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan selama 2 hari di dalam ruangan dengan suhu ruang, yang tidak terkena sinar matahari secara langsung, kemudian dioven selama 24 jam dalam suhu 40⁰C. Setelah dikeringkan dengan oven, berat daun singkong kering menjadi 238,54 gram. Daun yang kering tersebut diselep, kemudian diayak dengan ayakan 80 maze sehingga didapatkan serbuk halus sebanyak 207,25 gram. Setelah itu, serbuk daun dimaserasi dengan etanol 96% selama 3 hari dan dilakukan pengadukan setiap 24 jam. Selanjutnya, larutan tersebut dipekatkan dengan rotavapor (*rotary evaporator*) dengan suhu 50⁰C dan putaran 90 rpm menjadi ekstrak daun Singkong (*Manihot esculenta*) dengan konsentrasi 100%, sebanyak 20 gram.

Ekstrak kasar daun singkong sebanyak 20 gram selanjutnya ditambahkan etanol absolut sebanyak 100 ml kemudian diultrasonik selama 10 menit. Setelah itu ditambahkan 10 ml H₃PO₄ 5%, kemudian dipanaskan pada suhu 80⁰C selama 30 menit, lalu dibiarkan selama 8 jam. Selanjutnya, lapisan atas yang terbentuk diambil kemudian dilakukan filtrasi vaccum. Filtrat diekstrak dengan petroleum eter sebanyak 10 ml (diulang sebanyak 3 kali). Hasil ekstrak dioven pada suhu 60⁰C, untuk

mengurangi kadar etanol ditambahkan air sampai volume 5 ml. Tahapan selanjutnya tambahkan Acetonitrile sebanyak 20 ml, sonifikasi selama 5 menit. Setelah itu disentrifuge pada 4000 rpm selama 5 menit. Lapisan atas yang terbentuk diambil dan dikeringkan, sehingga menjadi hasil ekstrak flavonoid daun singkong. Hasil ekstrak flavonoid daun singkong diuji menggunakan LC-MS/MS untuk mengetahui kadar flavonoidnya (Sun, 2013).

3.8.6 Pembuatan Gel Ekstrak Flavonoid Daun Singkong

Pembuatan gel dilakukan di Laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Jember. Proses pembuatan basis gel dimulai dengan Carbopol, dikembangkan dalam air panas dalam mortir, kemudian diaduk hingga homogen, selanjutnya ditambahkan trietanolamin (TEA) sedikit-sedikit sampai terbantu massa gel. Ekstrak flavonoid daun singkong dicampurkan dengan tween 20 hingga homogen. Campuran ekstrak dan tween 20 tersebut selanjutnya dicampurkan ke dalam basis gel dan diaduk sampai homogen (Sun, 2013).

3.8.7 Aplikasi Topikal Gel Ekstrak Flavonoid Daun Singkong

Setelah tikus mengalami periodontitis, maka diaplikasikan pemberian gel ekstrak flavonoid daun singkong 25% dan 50%. Gel ekstrak flavonoid daun singkong diaplikasikan secara topikal pada daerah sulkus gingiva gigi molar pertama kanan rahang bawah 1 kali sehari selama 1,7, dan 14 hari.

3.8.8 Pengambilan Sampel Penelitian

Masing-masing tiga ekor tikus putih pada kelompok I, II, dan III didekapitasi pada hari ke-1, ke-7, dan ke-14 setelah pemaparan LPS. Dekapitasi dilakukan dengan cara *euthanasia* dengan cara memasukkan tikus kedalam toples tertutup yang diberi eter. Lalu dilakukan pengambilan jaringan pada bagian kanan rahang bawah dari gigi molar pertama sampai molar ketiga. Setelah itu sampel dimasukkan ke dalam buffer formalin selama 24 jam agar jaringan yang akan diamati tidak rusak.

3.8.9 Tahap Dekalsifikasi Jaringan

Sampel yang telah dimasukkan ke dalam buffer formalin selanjutnya dilakukan dekalsifikasi. Proses dekalsifikasi menggunakan larutan asam format yang berguna untuk menghilangkan garam-garam kalsium dari jaringan tulang dan gigi sebelum pembedahan, sehingga tulang dan gigi menjadi lebih lunak dan memudahkan dalam pembedahan. Tahap dekalsifikasi meliputi :

- a) Sampel yang telah direndam dalam formalin 10% dicuci dengan air bersih yang mengalir pelan selama 30 menit.
- b) Kemudian dimasukkan ke dalam larutan asam formic 10% selama 14 hari dan dilakukan vibrasi setiap hari agar proses dekalsifikasi merata.
- c) Setelah itu dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan sisa bahan dekalsifikasi. (Tim Patologi Anatomi FKG Unej, 2007).

3.8.10 Pembuatan Sediaan Histologi

Setelah melalui tahap dekalsifikasi, selanjutnya merupakan tahap pembuatan sediaan histologi. Tahapan ini diawali proses dehidrasi, *clearing* dan impregnasi dengan mencelupkan jaringan ke dalam larutan. Dehidrasi dengan cara merendam dalam alkohol bertingkat dengan konsentrasi 70%, 80%, 90%, Absolut (100%) I, Absolut (100%) II, Absolut (100%) III untuk menghilangkan air dalam jaringan. Pada tiap konsentrasi direndam secara berturut-turut selama 60 menit. Kemudian *clearing* dengan cara merendam dalam larutan *xylol* I, *xylol* II, dan *xylol* III, masing-masing selama 60 menit. Kemudian impregnasi melalui proses infiltrasi parafin dalam oven dengan suhu 60 °C, dengan cara bertahap. Sediaan dimasukkan ke dalam parafin murni I, II, dan III masing-masing selama 60 menit (Tim Patologi Anatomi FKG Unej, 2007).

Setelah melalui proses dehidrasi, *clearing*, dan impregnasi, tahap pembuatan sediaan histologi berikutnya adalah sebagai berikut :

A. Pembuatan blok (*embedding*)

1. Persiapan alat cetak dari logam yang berbentuk balok bersiku yang ditempatkan diatas permukaan kaca. Alat cetak diolesi dengan gliserin untuk mempermudah pemisahan alat cetak dengan blok parafin yang telah setting.
2. Parafin cair dalam dua wadah, yaitu parafin untuk *embedding* dan parafin sebagai media penyesuaian temperatur jaringan yang akan ditanam.
3. Parafin cair untuk *embedding* dituangkan ke dalam cetakan hingga penuh setinggi permukaan, lalu jaringan ditanamkan pada posisi yang sesuai dan diusahakan jaringan yang menempel pada dasar cetakkan dalam kondisi rata.
4. Bila parafin sudah setting, cetakkan dilepaskan dan blok parafin diberi label dan siap dilakukan pemotongan. (Tim Patologi Anatomi FKG Unej, 2007).

B. Pemotongan jaringan menggunakan mikrotom

1. Blok parafin diletakkan pada mikrotom.
2. Pisau mikrotom harus dalam keadaan bersih, kemudian memasang pisau mikrotom pada posisinya.
3. Mengatur ketebalan sayatan antara 4-6 mikron.
4. Memindahkan hasil potongan berupa pita tipis menggunakan kuas ke atas permukaan air dalam *waterbath* dengan temperatur tetap 56°C - 58°C agar sayatan jaringan dapat mengembang dengan baik.
5. Hasil sayatan diseleksi dan dipindahkan di atas *object glass* yang telah diolesi *mayer egg albumin* dan diberi label sesuai dengan label jaringan yang dipotong.
6. Sediaan jaringan dibiarkan kering dengan *hotplate* suhu 30°C - 35 °C selama minimal 12 jam dan selanjutnya dilakukan tahap pengecatan jaringan (Tim Patologi Anatomi FKG Unej, 2007).

C. Tahap pengecatan

Proses pengecatan jaringan menggunakan *Hematoxylin Eosin* tahapannya adalah deparafinisasi, dehidrasi I, pengecatan utama, pengecatan

pembanding, dehidrasi II, dan *clearing*. Proses deparafinasi dilakukan dengan cara merendam dalam larutan *xylol* I, *xylol* II, dan *xylol* III, masing-masing selama 2-3 menit. Selanjutnya adalah proses dehidrasi dengan cara merendam dalam alkohol dengan konsentrasi absolut (100%) I, absolut (100%) II, alkohol 95% I dan alkohol 95% II. Pada tiap konsentrasi direndam secara berturut-turut selama 3 menit. Kemudian diirigasi dengan air mengalir selama 10 menit. Proses berikutnya adalah aplikasi cat utama yaitu *Mayer's Hematocyclin* selama 15 menit, lalu diirigasi dengan air mengalir selama 15 menit. Setelah itu dilakukan aplikasi cat pembanding yaitu *Eosin* selama 2 menit. Tahap selanjutnya adalah dehidrasi kembali dengan cara merendam dalam alkohol bertingkat dengan konsentrasi 95% I, 95% II, absolut (100%) I, dan absolut (100%) II. Pada tiap konsentrasi direndam secara berturut-turut selama 2-3 menit. Tahap pengecatan diakhiri dengan *clearing* menggunakan *xylol* I, *xylol* II, dan *xylol* III masing-masing selama 3 menit (Tim Patologi Anatomi FKG Unej, 2007).

D. *Mounting* dengan entelan lalu tutup dengan *deck glass*

Setelah pewarnaan selesai, slide ditempatkan di atas kertas tisu pada tempat datar, ditetesi dengan bahan *mounting* yaitu entelan dan ditutup dengan *deck glass* tanpa terbentuk gelembung udara. Kemudian dilakukan pemberian label pada preparat histologi.

E. Pengamatan Histologis

Proses penghitungan sel-sel inflamasi secara histologis diambil dari gambaran histologis dari jaringan ikat *sulcular* dan *junctional* gingiva yang diperiksa dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran obyektif 400x untuk kemudian hitung sel-sel inflamasi dari tiap jenisnya.

F. Tahap Penghitungan jumlah sel-sel inflamasi pada jaringan ikat *sulcular* dan *junctional* gingiva

Data penelitian diperoleh dari pengamatan sediaan histologis dari tiap kelompok. Pengamatan sediaan histologi menggunakan mikroskop cahaya

(Olympus) dengan bantuan OptiLab dengan perbesaran 400x dan dilakukan oleh 3 orang pengamat pada lapang pandang yang sama. Penghitungan sel-sel inflamasi dilakukan dengan pengamatan tanda-tanda histologis dari tiap jenis sel sesuai karakteristiknya dalam pewarnaan HE. Pengamatan ini menggunakan *software image raster* potongan di lapang pandang terpilih kemudian dihitung secara manual lalu hasilnya dijumlah dan dirata-rata.

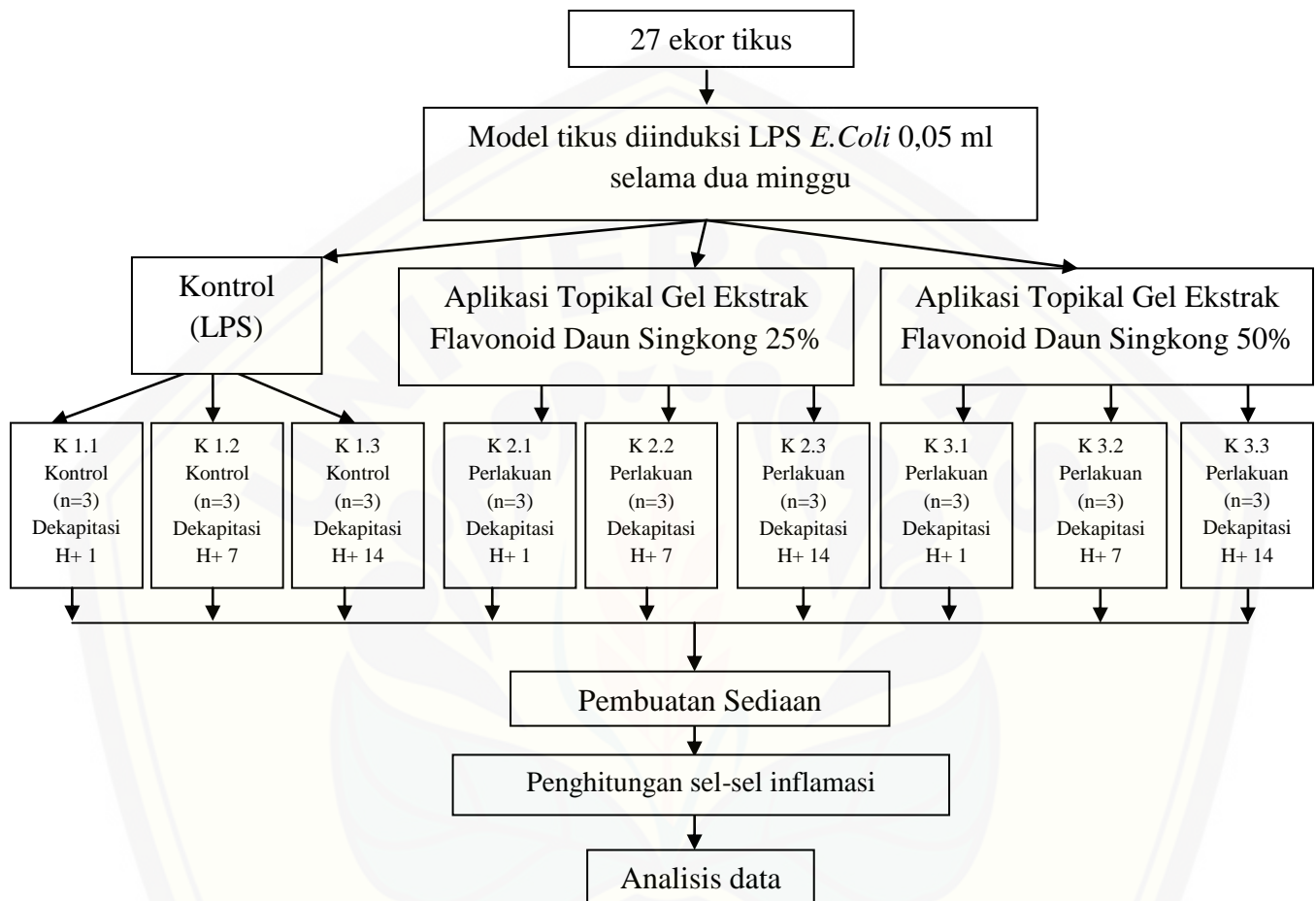


Gambar 3.1: Gambaran Histologis (perbesaran 40x) daerah yang akan diamati yakni daerah jaringan ikat *sulcular* dan *junctional* dari gingiva tikus yang diinduksi periodontitis (kotak hitam)

3.9 Analisis data

Data hasil penelitian disajikan dalam rata-rata jumlah tiap jenis sel inflamasi, kemudian dilakukan uji normalitas menggunakan *Shapiro-wilk* untuk mengetahui normalitas data, lalu uji homogenitas menggunakan *Levene Test*. Hasil uji data yang terdistribusi normal dan homogen dilakukan uji parametrik *Two Way Anova* dengan tingkat kepercayaan 95% ($p < 0,05$) kemudian dilanjutkan dengan uji *Least Significant Difference*. Hasil uji data tidak terdistribusi normal dan tidak homogen dilakukan uji non parametrik *Friedman* dengan tingkat kepercayaan 95% ($p < 0,05$) kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* (Dahlan, 2009).

4.0 Alur Penelitian



Gambar 3.2: Bagan Alur Penelitian

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Gel ekstrak flavonoid daun singkong (*Manihot esculenta*) konsentrasi 25% tidak efektif dalam menurunkan infiltrasi sel neutrofil dan makrofag pada hari ke-7, serta limfosit pada hari ke-7 dan 14
2. Gel ekstrak flavonoid daun singkong (*Manihot esculenta*) konsentrasi 50% tidak berbeda signifikan dalam menurunkan infiltrasi sel neutrofil pada hari ke-1 dan hari ke-14, makrofag pada hari ke-1 dan ke-14, serta limfosit hari ke- 14

5.2 Saran

Berdasarkan metode dan hasil penelitian dapat disarankan :

1. Perlu dilakukan penelitian tentang gel ekstrak flavonoid daun singkong (*Manihot esculenta*) terhadap indikator lain misalnya fibroblas dalam proses penyembuhan periodontitis.
2. Perlu dilakukan penelitian tentang efek lain dari ekstrak flavonoid daun singkong, seperti antioksidan dan antibakteri.
3. Perlu dilakukan penelitian mengenai senyawa lain dalam daun singkong sebagai antiinflamasi terhadap penyembuhan periodontitis.

DAFTAR PUSTAKA

- Agoes, A. 2010. *Tanaman Obat Indonesia*. Salemba Medica. Palembang
- Agus, S., Yanti, R. 2010. *Penyakit Periodontal dan Penyakit Jantung Koroner (Aterosklerosis)*. Bandung : UNPAD
- American Academy of Periodontology. 2004. Periodontal Diseases of Children and Adolescents. *Reference Manual V 37 No 6*. p.352.
- Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G.L., *et al.* Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. *Annu. Rev. Immunol.* 2012. 30:459–89.
- Bhoj, V. G., & Chen, Z. J. 2009. Ubiquitylation in innate and adaptive immunity. *Nature*, 458(7237), 430–437.
- Boyapati L, Wang HL. 2007. The role of stress in periodontal disease and wound healing. *Periodontol 2000* 44:195-210.
- Caldwell, G.A. 1945. Secondary Infection of Wounds. *Annals of Surgery*. Published before Annual Meeting of the American Surgical Assosiation Vol 122, No.4.p.641-651
- Chin, Y.W., Jung, H.A., Chai, H., Keller, W.J., Kinghorn, A.D. Xanthones with quinone reductase-inducing activity from the fruits of *Garcinia mangostana* (Mangosteen). *Phytochem.* 2008; 69: 754–8.
- Cotti, E., Dessi Cristina, Piras Alessandra, Mercurio Guisepe. 2010. Can a chronic dental infection be considered a cause of cardiovascular disease? A Review of The Literature. *International Journal of Cardiology* : Elsevier.
- Dahlan, S. 2009. *Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan*. Jakarta: Salemba Merdeka.
- Desrini, Dayi, Miladiyah. 2011. Analgesic activity of Ethanolic extract of *Manihot esculenta Crantz* leaves in mice. <http://www.univmed.org>. *Universa Medicina*. Vol. 30 No. 1
- Dewi, L. K. 2014. *Kadar total senyawa fenolik, flavonoid, dan aktivitas antioksidan ekstrak air dan ekstrak metanol daun singkong (Manihot esculenta crantz)*. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.

- Diegelmann, R. F dan Evans, M. C. 2004. Wound Healing: An Overview of Acute Fibrotic and Delayed Healing. *Bioscience* 9: 283-289.
- Djais, A.I. 2006. Periodontitis sebagai Faktor Resiko Jantung Koroner Aterosklerosis. *J. PDGI*, 56(2): 53-59.
- Federer WT. 1955. *Experimental Design: Theory and Application*. Oxford & IBH .London, Publishing Company.
- Fitria, E. 2006. Kadar IL-1B dan IL-8 sebagai Penanda Periodontitis, Faktor Resiko Kelahiran Prematur. *J. PDGI*, 56(2): 60-64.
- Godbout JP, Glaser R . 2006. Stress-induced immune dysregulation: implications for wound healing, infectious disease and cancer. *J Neuroimmune Pharmacol* 1:421-427.
- Harjana, T. 2011. *Buku Ajar Histologi*. Yogyakarta: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Yogyakarta
- Herath, T. D. K., Darveau, R. P., Seneviratne, C. J., Wang, C., Wang, Y., & Jin, L. 2013. Tetra- and penta-acylated lipid A. Structures of Porphyromonas gingivalis LPS differentially activate TLR4-mediated NF- κ B signal transduction cascade and immuno-inflammatory response in human gingival fibroblasts. *PLoS One*, 8, e58496
- Hollman, P.C.; de Vries, J.H.; van Leeuwen, S.D.; Mengelers, M.J.; Katan, M.B. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.* 1995, 62, 1276–1282.
- Indraswary, Recita. 2011. *Efek Konsentrasi Ekstrak Buah Adas (Foeniculum vulgare Mill) Topikal Pada Epitelisasi Penyembuhan Luka Gingiva Labial Tikus Sprague Dwaley In Vivo*. Majalah Universitas Sultan Agung. Semarang.
- Ionel, Anca *et al.* 2015. Periodontal Disease Induced in Wistar Rats Experimental Study. *International Journal of the Bioflux Society* Volume 7 Issue 2.
- KEMENKES RI. 2012. *Pedoman usaha kesehatan gigi sekolah (UKGS)*. Jakarta : Kementerian Kesehatan RI.
- Kersh, G.J. 2007. *Encyclopedia of Life Sciences*. USA: John Wiley & Sons, Ltd.
- Kumar, V., Abul K. Abbas, Jon C. Aster. 2013. *Robbins Basic Pathology*, 9th Edition. Philadelphia : Elsevier Saunders.
- Kurniawati A. Hubungan kehamilan dan kesehatan periodontal. *J Biomed Unej* 2005; II(2): 43-51.

- Lambert, I.B. dan Northridge, M.E. 2008. *Improving Oral Health for Elderly*. New York: Springer Science+Business Media, LLC.
- Lidar, M., Lipschitz, N., Langevitz, P., Shoenfeld, Y. 2009. The Infectious Etiology Of Vasculitis. *World of Journal Gastroentol*. Vol. 42: 432-438.
- Lipinski, B. 2011, Hydroxyl Radical and Its Scavengers in Health and Disease, *Oxid. Med. Cell. Longev*
- Lockhart, P.B., Bolger, A.F., Papanou, P.N. 2012. Periodontal Disease and Atherosclerotic Vascular Disease: Does The Evidence Support An Independent Association. *Circulation*. Vol. 125: 2520-2544.
- Löffler, H., Rastetter, J., Haferlach, T. 2005. *Atlas of Clinical Hematology*, 6th revised Edition. Germany : Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Manson, J.D., Eley, B.M. 2004. *Periodontics*. Edinburgh, London : Elsevier.
- Mealey, B.L., Perry, R.K. 2006. *Periodontal Medicine : Impact of Periodontal Infection on Systemic Health*. Philadelphia: W. B. Saunder Company.
- Meilawaty, Z. 2013. Efektifitas Ekstrak Daun Singkong (*Manihot utilisma*) terhadap ekspresi COX-2 pada monosit yang dipapar LPS *E.coli*. *Dent. J. (Maj. Ked. Gigi)*, Volume 46, Number 4: 196–201.
- Meilawaty, Z. 2016. Efektifitas Ekstrak Flavonoid Daun Singkong Sebagai Bahan Dasar Gel Antiinflamasi Terhadap Ekspresi TNF- α Pada Tikus Wistar Periodontitis Yang Diinduksi LPS *E.coli*. *Journal of Dentistry*.
- Meiliana, Roekistiningsih, Endang Sutjiati. 2014. Pengaruh Proses Pengolahan Daun Singkong (*Manihot Esculenta Crantz*) Dengan Berbagai Perlakuan Terhadap Kadar B-Karoten. *Indonesian Journal of Human Nutrition*, Volume 1 Edisi 1 : 23 - 34
- Nair, M., Mahajan, S., Reynolds, J., Aalinkeel, R., Nair, H., Schwartz, S and Kandaswami, C. 2006. The flavonoid Quercetin Inhibits Proinflammatory Cytokine (*Tumor Necrosis Factor Alpha*) Gene Expression in Normal Peripheral Blood Mononuclear.
- Newman, M.G., Takei, H.H., Klokkevold, P.R., Carranza, F.A. 2015. *Carranza's Clinical Periodontology*, 12th Edition. Missouri : Elsevier Saunders.
- Nisa, V.M., Meilawaty, Z., Astuti, P. 2013. Efek Pemberian Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta*) Terhadap Proses Penyembuhan Luka Gingiva Tikus (*Rattus norvegicus*). *Artikel Ilmiah Hasil Penelitian Mahasiswa 2013*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

- Notoatmodjo, S. 2005. *Metodologi Penelitian Kesehatan Cetakan Ketiga*. Jakarta: Rineka Pustaka.
- Nurdiana, A.R. 2013. Uji ekstrak daun singkong (*manihot esculenta*) Terhadap jumlah neutrofil pada proses Penyembuhan luka tikus (*rattus norvegicus*). Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
- Obiechina, N. 2011. *Understanding Periodontitis: A Comprehensive Guide to Periodontal Disease for Dentists, Dental Hygienists, and Dental Patients*. USA: AuthorHouse.
- Rosalina, D., Martodiharjo, S., Listiawan, M.Y. 2010. *Staphylococcus aureus* sebagai Penyebab Tersering Infeksi Sekunder pada Semua Erosi Kulit Dermatosis Vesikobulosa . *Berkala Ilmu Kesehatan Kulit & Kelamin* Vol. 22 No. 2.p.102-108.
- Rosiana, D.N., Iin Eliana, T., Sulistyani, E. 2013. Efek Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta*) Terhadap Ketebalan Regenerasi Epitel Lesi Traumatik Pada Mencit BALB/C Jantan. *Artikel Ilmiah Hasil Penelitian Mahasiswa* 2013. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Ross, J.A. Maternal diet and infant leukemia: A role for DNA topoisomerase II inhibitors?. *Int. J. Cancer Suppl.* 1998, 11, 26–28.
- Rubatzky, V.E dan Yamaguchi. 1998. *Sayuran Dunia, Prinsip, Produksi, dan Gizi*. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Rukmana, R. 2002. *Ubi Kayu, Budi Daya dan Pascapanen*. Cetakan 6. Yogyakarta: Kanisius.
- Sanz M, Lau L, Herrera D, *et al.* Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 1034-47.
- Shibli JA, Melo L, Ferrari DS, *et al.* Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clin Oral Implants Res.* 2008, 19:975.
- Shimoi, K.; Yoshizumi, K.; Kido, T.; Usui, Y.; Yumoto, T. Absorption and urinary excretion of quercetin, rutin, and alphag-rutin, a water soluble flavonoid, in rats. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 2785–2789.
- Srinivasan, P.C. 2013. Neutrophils-the Sentinels of Periodontal Innate Immunity. *J Clin Cell Immunol.* <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9899.S13-002> [16 Agustus 2016].

- Stöver, A.G. *et al.*, 2004. *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 279, No. 6. pp. 4440–4449. USA: The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.
- Sukmawati, A., dan Suprpto. 2010. Efek Berbagai Peningkat Penetrasi Terhadap Penetrasi Perkulatan Gel Natrium Diklofenak Secara In Vitro. *Jurnal Penelitian Sains & Teknologi*, Vol. 11, No. 2, 2010: 117 – 125.
- Sukrasno, K.R., Wirasutisna dan Fidrianny, I. 2007. *Pengaruh Perebusan terhadap Kandungan Flavonoid dalam Daun Singkong*. *Jurnal Obat Bahan Alam* Vol. 6 No. 2. Jakarta.
- Sun, Dongxiao, *et al.* 2013. Simultaneous Determination of Four Flavonoids and One Phenolic Acid in Rat Plasma by LC–MS/MS and Its Application to A Pharmacokinetic Study After Oral Administration of The Herba *Desmodii Styracifolii* Extract. *Journal of Chromatography. B* 932: 66–73.
- Tim Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. 2007. *Petunjuk Prkatikum Patologi Anatomi Degenerasi dan Inflamasi*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Tjitrosoepomo, G. 2002. *Taksonomi Tumbuhan*. Yogyakarta : Universitas Gadjah Mada.
- Triyono, B. 2005. *Perbedaan Tampilan Kolagen di Sekitar Luka Insisi Pada Tikus Wistar Yang Diberi Infiltrasi Penghilang Nyeri Levobupivakain dan Yang Tidak Diberi Levobupivakain*. Tesis. Tidak diterbitkan. Program Magister Biomedik dan PPDS Universitas Diponegoro, Semarang.
- Tuhuteru, D.R. *et al.* 2014. Status Kebersihan Gigi dan Mulut Pasien Poliklinik Gigi Puskesmas Paniki Bawah Manado. *Jurnal e-GiGi (eG)*, Volume 2, Nomor 2. Manado: Universitas Sam Ratulangi.
- Van Steenis, C.G.G.J. 2005. *Flora*. Jakarta : Erlangga.
- Vidak, M., Rozman, D., Komel, R. 2015. Effects of Flavonoids from Food and Dietary Supplements on Glial and Glioblastoma Multiforme Cells. *Molecules* 2015, 20, 19406-19432
- Wikesjö, U.M.E dan Selvig, K.A. Periodontal wound healing and regeneration. *Periodontol 2000* 1999: 19: 21–39.
- Wolf, D.L. dan Lamster, I.B. 2011. Contemporary Concept in The Diagnosis of Periodontal Disease. *Elsevier Inc*: 47-61.

Yuwono, Hendro Sudjono. 2012. *Penggunaan Serbuk Kopi Robusta untuk Mengobati Luka*. Bandung: Fakultas Kedokteran Universitas Padjajaran.



Lampiran A. 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 : 1.032/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 :

PENGARUH PEMBERIAN GEL EKSTRAK FLAVONOID DAUN SINGKONG (*Monihot esculenta*) KONSENTRASI 25% DAN 50% TERHADAP JUMLAH SEL INFLAMASI PADA GINGIVA TIKUS YANG DIINDUKSI PERIODONTITIS

Nama Peneliti Utama : Adriano Joshua (NIM.131610101065)
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.

Jember, 3 NOV 2016

dr. Rini Riyanti, Sp.PK

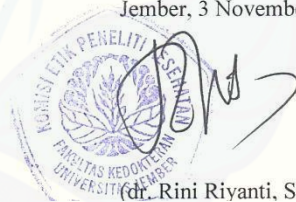
Tanggapan Anggota Komisi Etik

Diisi oleh Anggota Komisi Etik, berisi tanggapan sesuai dengan butir-butir isian diatas dan telaah terhadap Protokol maupun dokumen kelengkapan lain.

Saran Komisi Etik :


- Pemilihan, perawatan, perlakuan, pengorbanan dan pemusnahan hewan coba mengacu pada Pedoman Etik Penelitian Kesehatan.
- Perlakuan injeksi untuk mengiduksi periodontitis dilakukan oleh orang yang terampil (dilakukan secara cepat dan tepat agar tidak melukai hewan coba).daun singkong agara didapatkan kadar yang sesuai
- Mohon diperhatikan kontrol kualitas pembuatan preparat jaringan agar didapatkan preparat yang memenuhi syarat pembacaan
- Pengamatan preparat jaringan dilakukan oleh orang yang kompeten, minimal oleh 2 orang pengamat dengan metode blinding.
- Mohon diperhatikan pembuangan limbah medis dan limbah B3 agar tidak mencemari lingkungan

Jember, 3 November 2016





(dr. Rini Riyanti, Sp.PK)

Lampiran B. Surat Identifikasi Tanaman



**LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
(INDONESIAN INSTITUTE OF SCIENCES)
UPT BALAI KONSERVASI TUMBUHAN
KEBUN RAYA PURWODADI**

JL. Raya Surabaya - Malang Km. 65 Purwodadi - Pasuruan 67163
Telp. (+62 343) 615033, (+62 341) 426046, Faks. (+62 343) 615033, (+62 341) 426046
website: <http://www.krpurwodadi.lipi.go.id>

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI
No. 1303 /IPH.6/HM/IX/2015

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

drg. Zahara Meilawaty, M.Kes, NIP : 198005272008122002

Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember , datang di UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi pada tanggal 10 September 2015, berdasarkan buku Flora of Java, karangan C.A. Backer dan R.C. Bakhuizen van den Brink jr., volume I, tahun 1963, halaman 496 dan buku PROSEA (Plants Resources of South-East Asia) No 9; Plants yielding non-seed carbohydrates, editor M. Flach dan F. Rumawas, tahun 1996, halaman 107 nama ilmiahnya adalah :


Genus : *Manihot*
Species : *Manihot esculenta* Crantz

Adapun menurut buku An Integrated System of Classification of Flowering plants, karangan Arthur Cronquist tahun 1981, halaman XVI, klasifikasinya adalah sebagai berikut :

Divisio : *Magnoliophyta*
Class : *Magnoliopsida*
Subclass : *Rosidae*
Ordo : *Euphorbiales*
Family : *Euphorbiaceae*

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Purwodadi, 14 September 2015
An. Kepala
Kepala Seksi Konservasi Ex-situ,



Deden Mudiiana, S.Hut, M.Si

Lampiran C. Surat Keterangan Pembuatan Gel

KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS FARMASI
Jl. Kalimantan I/2 Kampus Tegalboto, Telp/Fax (0331) 324736
Jember - 68121

SURAT KETERANGAN

Nomor : 9/B/Farm/XII/2016

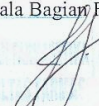
Yang bertanda tangan di bawah ini Kepala Laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Jember, menerangkan dengan sesungguhnya bahwa:

Nama : Ferdina Recky
Tempat/Tanggal Lahir : Kab. Semarang, 21 Maret 1994
NIM : 131610101052
Judul Penelitian : Efek Ekstrak Flavonoid Daun Singkong (*Manihot esculenta*)
Konsentrasi 25% dan 50% terhadap Ketebalan Epitel Gingiva Tikus yang Diinduksi Lipopolisakarida

Telah melakukan penelitian yang dilaksanakan di Laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Jember pada tanggal 1 November sd 10 November 2015.

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan seperlunya.

Jember, 13 Desember 2016
Kepala Bagian Farmasetika


Lusia Oktora R.K.S., SF., M.SC., Apt.
NIP. 197910032003122001

Lampiran D. Pengenceran Gel Ekstrak Flanonoid Daun Singkong

Dalam mengencerkan ekstrak flavonoid daun singkong menjadi berbagai konsentrasi dapat menggunakan rumus sebagai berikut (Syamsuni, 2006):

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

1. Untuk menghasilkan 100 ml larutan ekstrak flavonoid daun singkong konsentrasi 25%, maka banyak volume ekstrak flavonoid daun singkong 100% yang dibutuhkan :

$$V \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$25\% \times 100 \text{ ml} = V_2 \times 100\%$$

$$V_2 = 2500 \text{ ml} : 100$$

$$V_2 = 25 \text{ ml}$$

Ambil ekstrak flavonoid daun singkong 100% sebanyak 25 ml ke dalam tabung ukur dan ditambahkan propilen glikol 20 ml. Basis gel dibuat dengan mencampurkan *carbopol* 3 ml dan aquades 49 ml lalu ditambahkan trietolonamin 3 ml. Campuran ekstrak dan basis gel diaduk hingga homogen, selanjutnya gel tersebut disimpan ke dalam botol dan disimpan di lemari pendingin.

2. Untuk menghasilkan 100 ml larutan ekstrak flavonoid daun singkong konsentrasi 50%, maka volume ekstrak flavonoid daun singkong 100% yang dibutuhkan :

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$50\% \times 100 \text{ ml} = V_2 \times 100\%$$

$$V_2 = 5000 \text{ ml} : 100$$

$$V_2 = 50 \text{ ml}$$

Ambil ekstrak flavonoid daun singkong 100% sebanyak 50 ml ke dalam tabung ukur dan ditambahkan propilen glikol 20 ml. Basis gel dibuat dengan mencampurkan *carbopol* 3 ml dan aquades 24 ml lalu ditambahkan trietolonamin 3 ml. Campuran ekstrak dan basis gel diaduk hingga homogen, selanjutnya gel tersebut disimpan ke dalam botol dan disimpan di lemari pendingin.

Lampiran E. Tabel Hasil Pengamatan

NO.SA MPEL	PENGA MAT 1	PENGA MAT 2	PENGA MAT 3	RA TA2	NO.SA MPEL	PENGA MAT 1	PENGA MAT 2	PENGA MAT 3	RAT A2	NO.SA MPEL	PENGA MAT 1	PENGA MAT 2	PENGA MAT 3	RA TA2
11	21	25	24	23	24	23	22	25	23	34	10	10	11	10
	1	1	1	1		7	9	7	8		6	9	8	8
	0	1	0	0		15	15	12	14		0	0	2	1
12	33	30	26	30	25	18	20	15	18	36	14	16	10	13
	3	1	3	2		8	10	11	10		4	5	4	4
	0	0	0	0		6	5	7	6		4	2	3	3
13	22	20	25	22	29	5	6	8	6	39	13	15	12	13
	0	1	0	0		0	1	1	1		3	2	2	2
	0	0	0	0		3	2	1	2		1	2	0	1
14	29	31	25	28	21	22	16	20	19	31	11	14	10	12
	0	1	1	1		10	7	6	8		2	3	2	2
	0	0	0	0		18	17	15	17		3	2	3	3
15	14	13	16	14	22	20	16	15	17	38	11	10	7	9
	0	1	0	0		12	10	12	11		4	5	4	4
	0	0	0	0		14	8	10	11		7	6	6	6
16	22	20	23	22	23	17	16	17	17	35	6	16	17	13
	0	0	1	0		4	5	5	5		1	5	5	4
	0	0	0	0		10	7	8	8		2	7	8	6
17	16	20	15	17	26	22	18	19	20	32	11	12	8	10
	1	0	1	1		10	9	7	9		0	0	1	0
	0	0	0	0		12	15	14	14		3	2	2	2
18	8	6	10	8	27	16	15	19	17	33	13	15	16	15
	0	1	0	0		4	5	4	4		0	1	0	0
	0	0	0	0		5	3	5	4		2	2	0	1
19	29	25	21	25	28	34	30	28	31	37	7	8	5	7
	0	0	0	0		9	6	9	8		1	2	2	2
	0	0	0	0		20	17	16	18		1	0	1	1

Pengamat: 1. Adriano Joshua (131610101065); 2. Ferdina Recky (131610101052); 3. Maulana Akbari (131610101059)

[Handwritten signatures]

JEMBER

Lampiran F: Hasil Penghitungan Sel inflamasi pada hari ke-1, 7, dan 14

HARI 1	SAMPEL	LAPANG PANDANG 1	LAPANG PANDANG 2	JUMLAH	KETERANGAN	
LPS	K1(11.1a dan 11.2)	14	7	21	neutrofil	
		1	0	1	makrofag	
		0	0	0	limfosit	
	JUMLAH SEL TOTAL				22	*= panjang daerah kurang memadai
	K2(12)	29	4	33		
		3	0	3		
		0	0	0		
	JUMLAH SEL TOTAL				36	
	K3(13)	22	*	22		
		0	*	0		
0		*	0			
JUMLAH SEL TOTAL				22		
LPS+ 25%	SAMPEL	LAPANG PANDANG 1	LAPANG PANDANG 2	JUMLAH		
	K5(14)	21	8	29		
		0	0	0		
		0	0	0		
	JUMLAH SEL TOTAL				29	
	K6(15)	14	*	14		
		0	*	0		
		0	*	0		
	JUMLAH SEL TOTAL				14	
	K7(16)	10	12	22		
0		0	0			
0		0	0			
JUMLAH SEL TOTAL				22		
LPS+ 50%	SAMPEL	LAPANG PANDANG 1	LAPANG PANDANG 2	JUMLAH		
	K7(17)	16	*	16		
		1	*	1		
		0	*	0		
	JUMLAH SEL TOTAL				17	
	K8(18)	6	2	8		
0		0	0			
0		0	0			

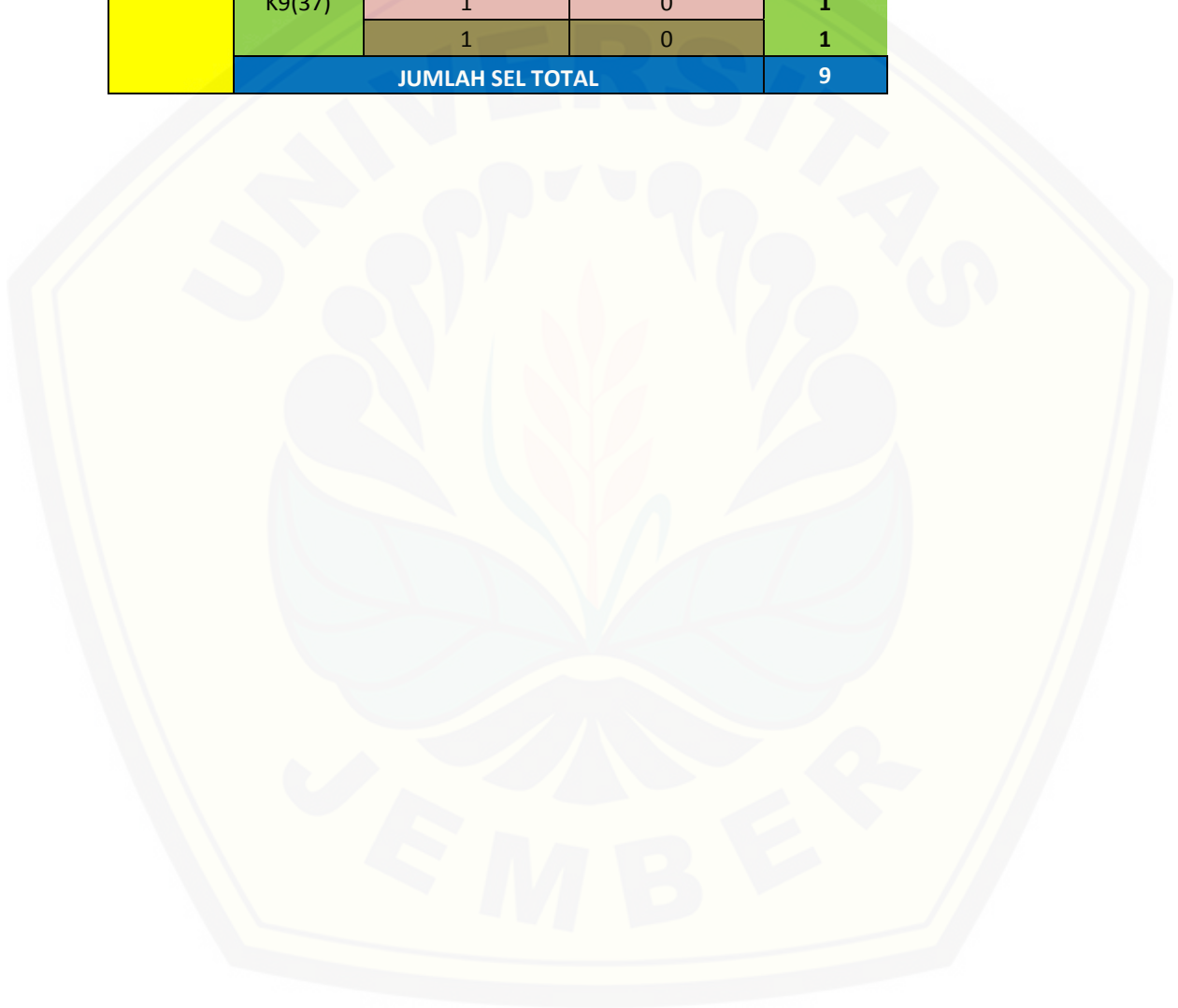
	JUMLAH SEL TOTAL			8
	K9(19)	20	9	29
		0	0	0
		0	0	0
JUMLAH SEL TOTAL			29	

HARI 7	SAMPEL	LAPANG PANDANG 1	LAPANG PANDANG 2	JUMLAH	KETERANGAN	
LPS	K1(24)	16	7	23	neutrofil	
		4	3	7	makrofag	
		6	9	15	limfosit	
	JUMLAH SEL TOTAL				45	*= panjang daerah kurang memadai
	K2(25)	11	7	18		
		4	4	8		
		4	2	6		
	JUMLAH SEL TOTAL				32	
	K3(29)	5	*	5		
		0	*	0		
		3	*	3		
	JUMLAH SEL TOTAL				8	
LPS+ 25%	K5(21)	18	4	22		
		7	3	10		
		17	1	18		
	JUMLAH SEL TOTAL				50	
	K6(22)	14	6	20		
		10	2	12		
		10	4	14		
	JUMLAH SEL TOTAL				46	
	K7(23)	10	7	17		
		3	1	4		
		8	2	10		
	JUMLAH SEL TOTAL				31	
LPS+ 50%	K7(26)	10	12	22		
		8	2	10		
		7	5	12		
	JUMLAH SEL TOTAL				44	
	K8(27)	16	*	16		

		4	*	4
		5	*	5
	JUMLAH SEL TOTAL			25
	K9(28)	19	15	34
		5	4	9
		10	10	20
	JUMLAH SEL TOTAL			63

HARI 14	SAMPEL	LAPANG PANDANG 1	LAPANG PANDANG 2	JUMLAH	KETERANGAN
LPS	K1(34)	7	3	10	neutrofil
		4	2	6	makrofag
		0	0	0	limfosit
	JUMLAH SEL TOTAL			16	*= panjang daerah kurang memadai
	K2(36)	9	5	14	
		2	2	4	
		1	3	4	
	JUMLAH SEL TOTAL			22	
	K3(39)	6	7	13	
		2	1	3	
0		1	1		
JUMLAH SEL TOTAL			17		
LPS+ 25%	SAMPEL	LAPANG PANDANG 1	LAPANG PANDANG 2	JUMLAH	
	K5(31)	7	4	11	
		1	1	2	
		3	0	3	
	JUMLAH SEL TOTAL			16	
	K6(38)	6	5	11	
		3	1	4	
		4	3	7	
	JUMLAH SEL TOTAL			22	
	K7(35)	6	*	6	
1		*	1		
2		*	2		
JUMLAH SEL TOTAL			9		
LPS+ 50%	SAMPEL	LAPANG PANDANG 1	LAPANG PANDANG 2	JUMLAH	
	K7(32)	5	6	11	
		0	0	0	

		0	3	3
	JUMLAH SEL TOTAL			14
K8(33)		7	6	13
		0	0	0
		1	1	2
	JUMLAH SEL TOTAL			15
K9(37)		5	2	7
		1	0	1
		1	0	1
	JUMLAH SEL TOTAL			9



Lampiran G. Hasil Uji Statistik

Uji Normalitas Neutrofil

Tests of Normality

Bahan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Neutrofil LPS	,174	9	,200*	,961	9	,808
LPS + Dn Singkong 25%	,154	9	,200*	,955	9	,750
LPS + Dn Singkong 50%	,142	9	,200*	,955	9	,746

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Uji Homogenitas Neutrofil

Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Neutrofil	Based on Mean	,583	2	24	,566
	Based on Median	,580	2	24	,568
	Based on Median and with adjusted df	,580	2	22,306	,568
	Based on trimmed mean	,595	2	24	,560

Anova Univariat Neutrofil

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Bahan	1	LPS	9
	2	LPS + Dn Singkong 25%	9
	3	LPS + Dn Singkong 50%	9
Hari	1	Hari ke-1	9
	2	Hari ke-7	9
	3	Hari ke-14	9

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Neutrofil

Bahan	Hari	Mean	Std. Deviation	N
LPS	Hari ke-1	75,3333	11,93035	3
	Hari ke-7	47,3333	25,96793	3
	Hari ke-14	37,0000	5,19615	3
	Total	53,2222	22,49321	9
LPS + Dn Singkong 25%	Hari ke-1	64,3333	21,00794	3
	Hari ke-7	53,0000	4,35890	3
	Hari ke-14	34,0000	5,56776	3
	Total	50,4444	17,29242	9
LPS + Dn Singkong 50%	Hari ke-1	50,0000	25,51470	3
	Hari ke-7	67,0000	22,11334	3
	Hari ke-14	31,6667	12,01388	3
	Total	49,5556	23,56433	9
Total	Hari ke-1	63,2222	20,72907	9
	Hari ke-7	55,7778	19,29882	9
	Hari ke-14	34,2222	7,47960	9
	Total	51,0741	20,52002	27

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Neutrofil

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	5709,185 ^a	8	713,648	2,452	,054
Intercept	70431,148	1	70431,148	242,001	,000
Bahan	65,852	2	32,926	,113	,894
Hari	4083,185	2	2041,593	7,015	,006
Bahan * Hari	1560,148	4	390,037	1,340	,293
Error	5238,667	18	291,037		
Total	81379,000	27			
Corrected Total	10947,852	26			

a. R Squared = ,521 (Adjusted R Squared = ,309)

Uji Normalitas Makrofag

Tests of Normality

Bahan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Makrofag LPS	,238	9	,149	,876	9	,142
LPS + Dn Singkong 25%	,198	9	,200*	,891	9	,203
LPS + Dn Singkong 50%	,285	9	,034	,757	9	,006

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Uji Homogenitas Makrofag

Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Makrofag	Based on Mean	,035	2	24	,966
	Based on Median	,047	2	24	,955
	Based on Median and with adjusted df	,047	2	22,417	,955
	Based on trimmed mean	,036	2	24	,964

Uji Friedman Parameter Makrofag Faktor Bahan

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
LPS	9	12,00	10,512	1	29
LPS + Ekstrak Flavonoid Daun Singkong 25%	9	11,78	11,054	1	34
LPS + Ekstrak Flavonoid Daun Singkong 50%	9	8,11	10,374	0	26

Ranks

	Mean Rank
LPS	2,28
LPS + Ekstrak Flavonoid Daun Singkong 25%	2,17
LPS + Ekstrak Flavonoid Daun Singkong 50%	1,56

Test Statistics^a

N	9
Chi-Square	3,161
df	2
Asymp. Sig.	,206

a. Friedman Test

Uji Friedman Parameter Makrofag Faktor Hari

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Hari ke-1	9	2,00	2,062	0	7
Hari ke-7	9	20,89	9,675	2	34
Hari ke-14	9	9,00	6,928	1	23

Ranks

	Mean Rank
Hari ke-1	1,17
Hari ke-7	2,83
Hari ke-14	2,00

Test Statistics^a

N	9
Chi-Square	13,235
df	2
Asymp. Sig.	,001

a. Friedman Test

Uji Mann-Whitney Parameter Makrofag

Hari ke-1 dan ke-7

Ranks

	Hari	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Makrofag	Hari ke-1	9	5,33	48,00
	Hari ke-7	9	13,67	123,00
	Total	18		

Test Statistics^b

	Makrofag
Mann-Whitney U	3,000
Wilcoxon W	48,000
Z	-3,337
Asymp. Sig. (2-tailed)	,001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Hari

Hari ke-1 dan ke-14**Ranks**

Hari	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Makrofag Hari ke-1	9	6,56	59,00
Hari ke-14	9	12,44	112,00
Total	18		

Test Statistics^b

	Makrofag
Mann-Whitney U	14,000
Wilcoxon W	59,000
Z	-2,391
Asymp. Sig. (2-tailed)	,017
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,019 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Hari

Hari ke-7 dan ke-14**Ranks**

Hari	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Makrofag Hari ke-7	9	12,78	115,00
Hari ke-14	9	6,22	56,00
Total	18		

Test Statistics^b

	Makrofag
Mann-Whitney U	11,000
Wilcoxon W	56,000
Z	-2,618
Asymp. Sig. (2-tailed)	,009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,008 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Hari

Uji Normalitas Limfosit**Tests of Normality**

Bahan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Limfosit LPS	,278	9	,044	,710	9	,002
LPS + Dn Singkong 25%	,171	9	,200*	,901	9	,257
LPS + Dn Singkong 50%	,292	9	,026	,723	9	,003

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Uji Homogenitas Neutrofil**Test of Homogeneity of Variance**

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Limfosit Based on Mean	,686	2	24	,513
Based on Median	,367	2	24	,696
Based on Median and with adjusted df	,367	2	19,421	,697
Based on trimmed mean	,643	2	24	,535

Uji Friedman Parameter Limfosit Faktor Bahan**Descriptive Statistics**

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
LPS	9	9,00	13,647	0	42
LPS + Ekstrak Flavonoid Daun Singkong 25%	9	16,78	17,064	0	50
LPS + Ekstrak Flavonoid Daun Singkong 50%	9	13,33	19,774	0	53

Ranks

	Mean Rank
LPS	1,89
LPS + Ekstrak Flavonoid Daun Singkong 25%	2,50
LPS + Ekstrak Flavonoid Daun Singkong 50%	1,61

Test Statistics^a

N	9
Chi-Square	4,963
df	2
Asymp. Sig.	,084

a. Friedman Test

Uji Friedman Parameter Limfosit Faktor Hari

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Hari ke-1	9	,11	,333	0	1
Hari ke-7	9	31,11	16,662	6	53
Hari ke-14	9	7,89	6,294	2	19

Ranks

	Mean Rank
Hari ke-1	1,00
Hari ke-7	3,00
Hari ke-14	2,00

Test Statistics^a

N	9
Chi-Square	18,000
df	2
Asymp. Sig.	,000

a. Friedman Test

Uji Mann-Whitney Parameter Limfosit**Hari ke-1 dan ke-7****Ranks**

Hari	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Limfosit Hari ke-1	9	5,00	45,00
Hari ke-7	9	14,00	126,00
Total	18		

Test Statistics^b

	Limfosit
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	45,000
Z	-3,742
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Hari

Hari ke-1 dan ke-14**Ranks**

Hari	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Limfosit Hari ke-1	9	5,00	45,00
Hari ke-14	9	14,00	126,00
Total	18		

Test Statistics^b

	Limfosit
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	45,000
Z	-3,744
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Hari

Hari ke-7 dan ke-14**Ranks**

	Hari	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Limfosit	Hari ke-7	9	13,11	118,00
	Hari ke-14	9	5,89	53,00
	Total	18		

Test Statistics^b

	Limfosit
Mann-Whitney U	8,000
Wilcoxon W	53,000
Z	-2,871
Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,003 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Hari

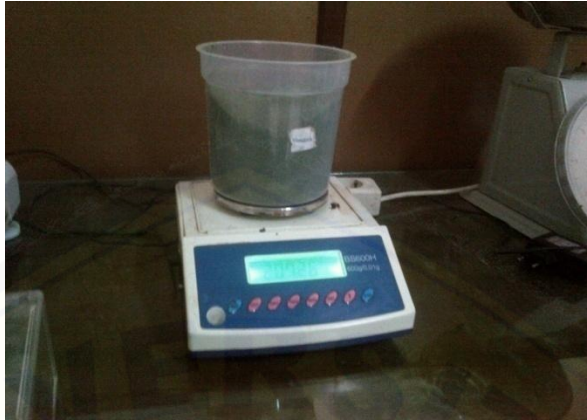
Lampiran H. Foto Penelitian



Gambar 1. Daun singkong kering (setelah dioven)



Gambar 2. Proses Penyelepan dan pengayakan daun singkong



Gambar 3. Hasil serbuk kering daun singkong



Gambar 4. Proses pencampuran serbuk kering dengan etanol 96%



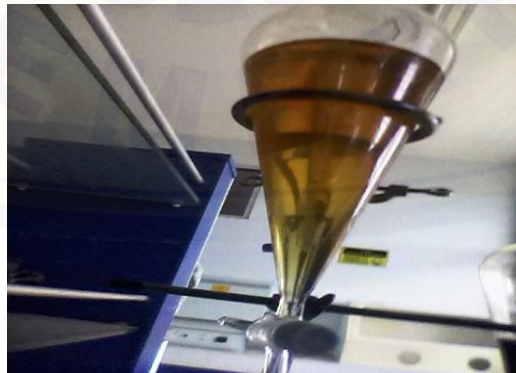
Gambar 5. Hasil pencampuran serbuk kering dengan etanol 96%



Gambar 6. Proses ultrasonik ekstrak daun singkong setelah penambahan etanol



Gambar 7. Proses pemanasan pada suhu 80 °C setelah penambahan H₃PO₄ 5%



Gambar 8. Proses ekstraksi filtrate dengan Petroleum Eter



Gambar 9. Hasil ekstrak flavonoid daun singkong



Gambar 10. Hasil gel ekstrak flavonoid daun singkong 50% dan 25%



Gambar 11. Foto penyuntikan LPS pada tikus



Gambar 12. Periodontitis pada tikus secara klinis



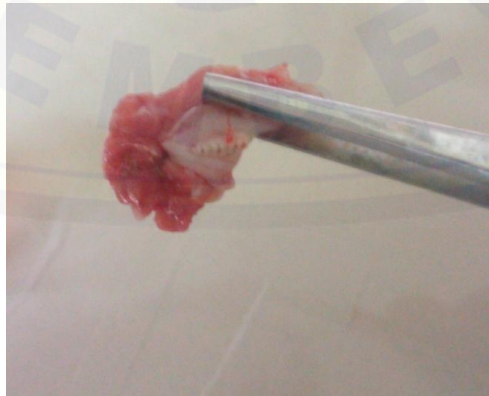
Gambar 13. Radiograf periodontitis pada tikus



Gambar 14. Aplikasi gel pada tikus



Gambar 15. Proses dekapitasi tikus



Gambar 16. Jaringan gingiva hasil proses dekapitasi yang diambil

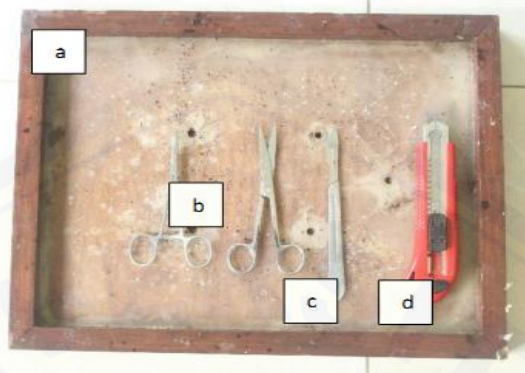


Gambar 17. Pemotongan jaringan untuk pembuatan sediaan histologi



Gambar 18. Pewarnaan sediaan histologi

Lampiran I. Alat dan Bahan Penelitian



Gambar I.1 a. Papan fiksasi b. Gunting jaringan c. Scalpel d. *cutter*



Gambar I.2 *Dental rat chair*



Gambar I.3 Sonde



Gambar I.4 a. Kloroform b. Kapas c. tempat busus



Gambar I.5 inkubator



gambar I.6 Kompor listrik



Gambar I.7 Mikrotom



Gambar I.8 Waterbath



Gambar I.9 Slidewarmer



Gambar I.10 Mikroskop



Gambar I.11 Optilab



Gambar I.12 PBS Formalin

