



**PENGARUH EKSTRAK FLAVONOID DAUN TEMBAKAU KASTURI
TERHADAP EKSPRESI *TOLL-LIKE RECEPTOR 4* PADA KULTUR
SEL OSTEOLAS YANG DIPAPAR LIPOPOLISAKARIDA**

SKRIPSI

Oleh:
Sani Sonia
NIM 131610101090

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER**

2017



**Pengaruh Ekstrak Flavonoid Daun Tembakau Kasturi Terhadap
Ekspresi *Toll-Like Receptor 4* pada Kultur Sel Osteoblas
Yang Dipapar Lipopolisakarida**

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

Sani Sonia

NIM 131610101090

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS JEMBER

2017

PERSEMBAHAN

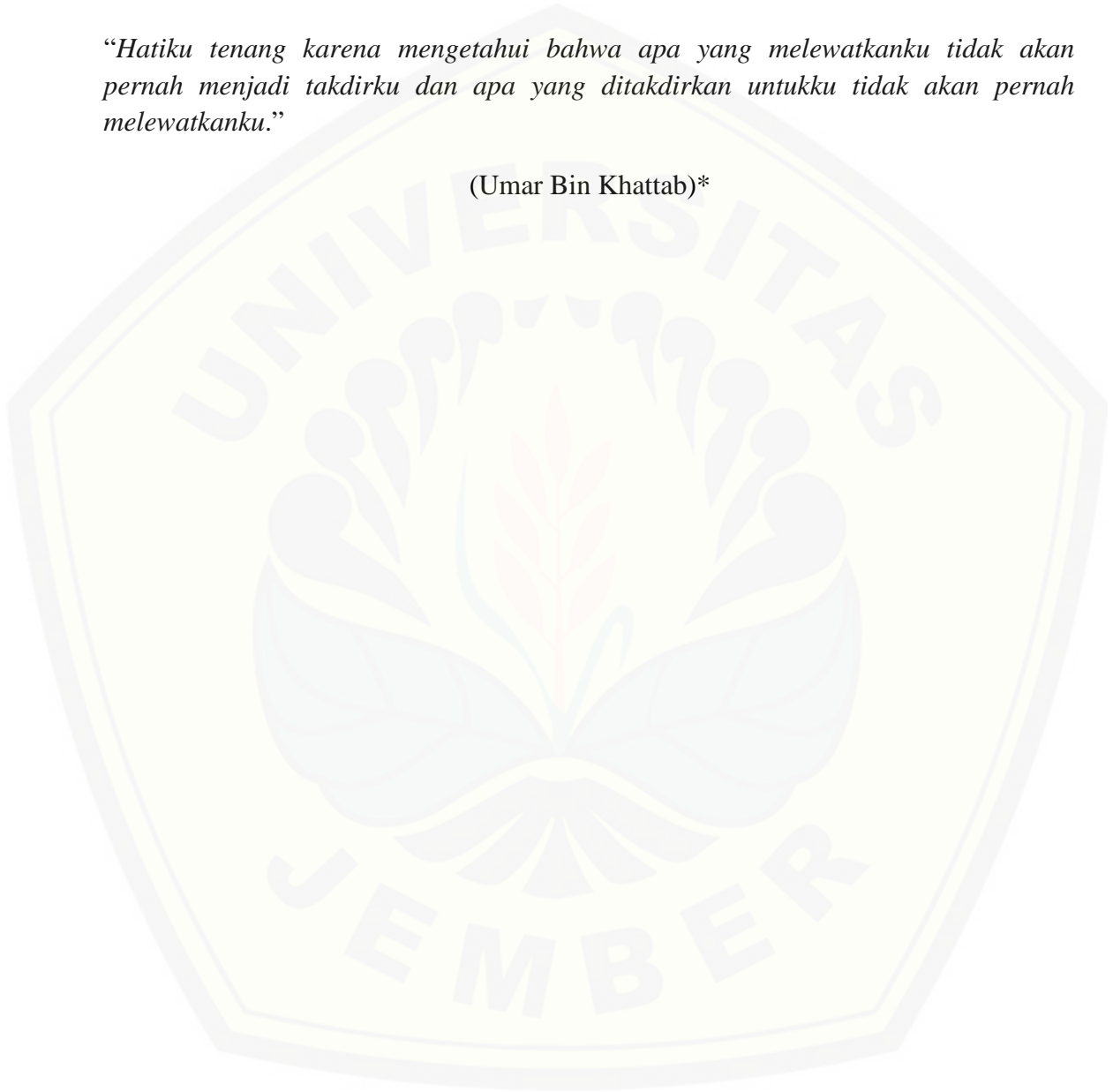
Karya tulis ini saya persembahkan untuk:

1. Bangsa Indonesia;
2. Almamater saya Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
3. Ibu Yuyun Yuniangsih dan Alm. Bapak saya Ayi Hidayat yang saya cintai;
4. Dosen pembimbing dan dosen penguji yang selalu saya jadikan panutan;
5. Guru-guru saya sejak SD sampai dengan perguruan tinggi yang saya banggakan.

MOTTO

“Hatiku tenang karena mengetahui bahwa apa yang melewatkanmu tidak akan pernah menjadi takdirku dan apa yang ditakdirkan untukku tidak akan pernah melewatkanmu.”

(Umar Bin Khattab)*



*) Umar Bin Khattab

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Sani Sonia

NIM : 131610101090

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Pengaruh Ekstrak Flavonoid Daun Tembakau Kasturi terhadap Ekspresi *Toll-Like Receptor 4* pada Kultur Sel Osteoblas yang Dipapar Lipopolisakarida” adalah benar-benar hasil karya saya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya plagiasi. 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, 13 September 2017

Yang menyatakan,

Sani Sonia

NIM. 131610101090

SKRIPSI

**PENGARUH EKSTRAK FLAVONOID DAUN TEMBAKAU KASTURI
TERHADAP EKSPRESI *TOLL-LIKE RECEPTOR 4* PADA
KULTUR SEL OSTEOLAS YANG DIPAPAR
LIPOPOLISAKARIDA**

Oleh

Sani Sonia

NIM 131610101090

Dosen Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. drg. Banun Kusumawardani, M.Kes

Dosen Pembimbing Anggota : drg. Agustin Wulan Suci D, MDSc

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Pengaruh Ekstrak Flavonoid Daun Tembakau Kasturi terhadap Ekspresi *Toll-Like Receptor 4* pada Kultur Sel Osteoblas yang Dipapar Lipopolisakarida” telah diuji dan disahkan pada:

Hari, tanggal : Rabu, 13 September 2017

Tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Dosen Penguji Utama

Dosen Penguji Anggota

Drg. Nuzulul Hikmah, M.Biomed

NIP 198107172008012017

Dr. drg. Sri Hernawati, M.Kes

NIP 197007052003122001

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Anggota

Dr. drg. Banun Kusumawardani, M.Kes

NIP 197005091999032001

drg. Agustin Wulan Suci D., MDSc

NIP 197908142008122003

Mengesahkan

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember,

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

NIP 196901121996011001

RINGKASAN

Pengaruh Ekstrak Flavonoid Daun Tembakau Kasturi terhadap Ekspresi *Toll-Like Receptor 4* pada Kultur Sel Osteoblas yang Dipapar Lipopolisakarida; Sani Sonia; 131610101090; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

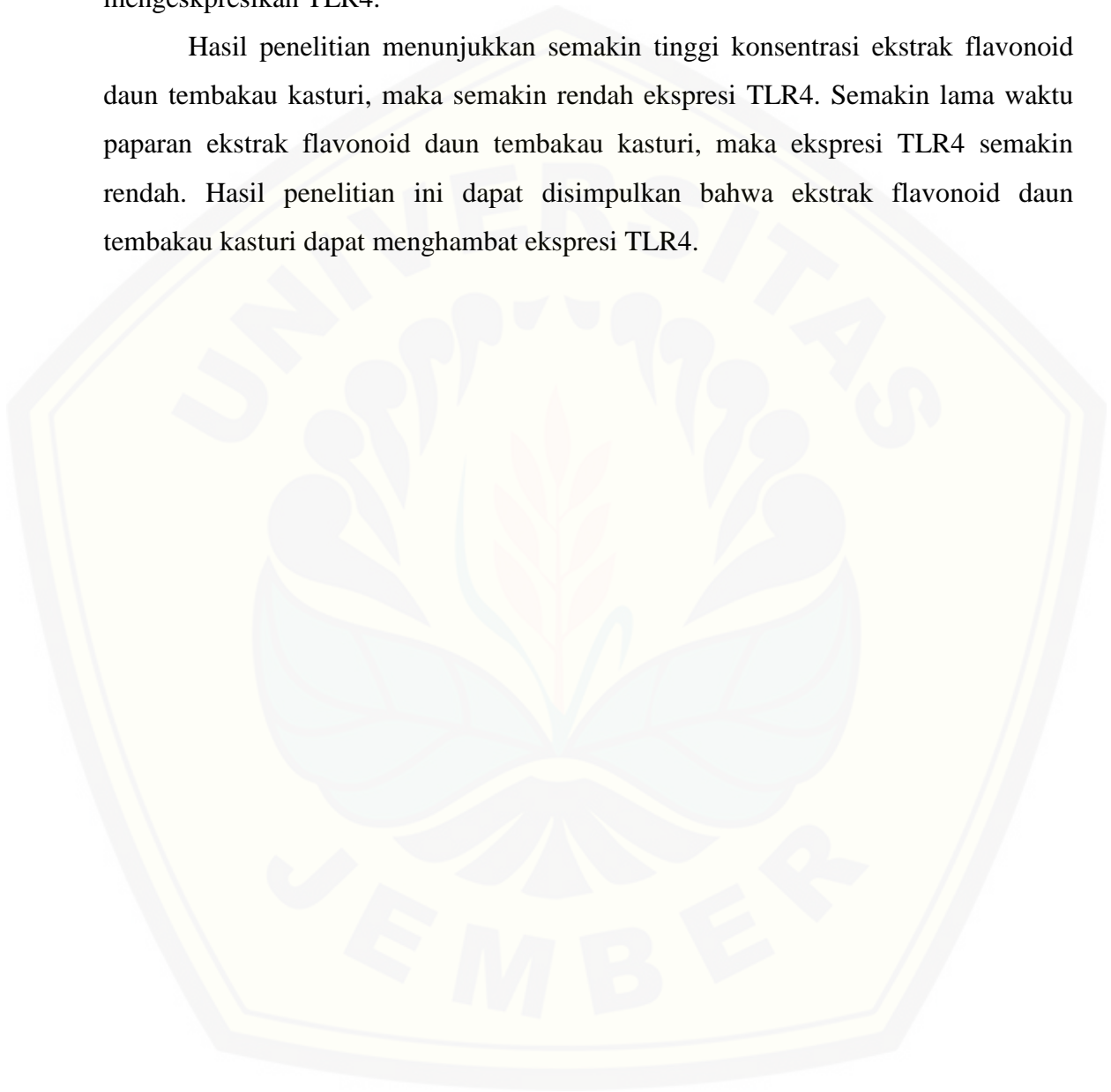
Toll-Like Receptor 4 (TLR4) merupakan *pattern recognition receptors* (PRRs) yang dapat mengenali lipopolisakarida (LPS) dari bakteri Gram-negatif. Pengenalan LPS oleh TLR4 pada sel osteoblas dapat mengakibatkan teraktivasi sinyal transduksi yang menyebabkan produksi sitokin proinflamasi. Produksi berlebihan dari sitokin proinflamasi karena stimulasi kronik dari TLR4 dapat menyebabkan destruksi jaringan dan kerusakan tulang yang parah.

Daun tembakau kasturi memiliki bahan aktif yang bermanfaat bagi tubuh manusia antara lain flavonoid. Flavonoid dapat bekerja sebagai antibakteri, antioksidan dan antiinflamasi. Flavonoid dapat menghambat terjadinya inflamasi. Mekanismenya yaitu menghambat aktivitas enzim dari metabolisme asam arakidonat seperti fosfolipase A₂, siklooksigenase, lipoksigenase dan sintesis NO serta menghambat aktivasi NF-κB. Penghambatan aktivitas enzim tersebut oleh flavonoid mengakibatkan penurunan produksi dari asam arakidonat, prostaglandin, leukotrin, nitrat oksida yang merupakan mediator inflamasi. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui pengaruh ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi sebagai antiinflamasi terhadap ekspresi TLR4 pada kultur sel osteoblas yang dipapar LPS.

Untuk mengetahui adanya ekspresi TLR4 pada kultur sel dilakukan uji imunositokimia. Uji imunositokimia dilakukan pada kultur sel osteoblas pada pertumbuhan sel 80% konfluen. Sebelum uji imunositokimia dilakukan, prosedur panen sel dan penghitungan sel dilakukan di bawah mikroskop inverted dan counter. Uji imunositokimia dilakukan pada sel osteoblas dengan kepadatan $2,5 \times 10^4$ sel/1000μl yang diberi ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi dengan konsentrasi 640 μg/ml, 40 μg/ml dan 0,25 μg/ml dan dipaparkan LPS 10 μg/ml yang kemudian

diinkubasi selama 24 jam dan 72 jam. Ekspresi TLR4 ditunjukkan dengan warna coklat pada membran sel osteoblas dan warna ungu pada membran sel bila tidak mengeskpresikan TLR4.

Hasil penelitian menunjukkan semakin tinggi konsentrasi ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi, maka semakin rendah ekspresi TLR4. Semakin lama waktu paparan ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi, maka ekspresi TLR4 semakin rendah. Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi dapat menghambat ekspresi TLR4.



PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala anugerah dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengaruh Ekstrak Flavonoid Daun Tembakau Kasturi terhadap Ekspresi *Toll-Like Receptor 4* pada Kultur Sel Osteoblas yang Dipapar Lipopolisakarida”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan dan bimbingan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan ucapan terimakasih kepada:

1. Allah SWT atas berkat dan rahmat-Nya saya dapat menyelesaikan skripsi ini;
2. Kedua orang tua saya tercinta, Ibu Yuyun Yuniangsih dan Alm. Ayi Hidayat yang tak kenal lelah mendoakan, memberi dukungan, perhatian, serta kasih sayang yang teramat tulus selama ini;
3. Saudara saya yang tersayang teh Rini, teh Keke, teh Silvi, Adel dan Agan yang selalu mendoakan dan menyayangi saya setulus hati;
4. Keluarga besar saya yang senantiasa memberikan dukungan, doa dan kasih sayang kepada saya dalam menempuh pendidikan di Jember;
5. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M. Kes. Sp. Prost, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
6. Dr. drg. Banun Kusumawardani, M.Kes selaku Dosen Pembimbing Utama dan Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan, saran, motivasi, meluangkan waktunya sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik, serta melibatkan penulis dalam penelitiannya;
7. drg. Agustin Wulan Suci D, MDSc selaku Dosen Pembimbing Pendamping telah memberikan bimbingan, saran, motivasi, meluangkan waktunya sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik;

8. drg. Nuzulul Hikmah, M.Biomed selaku Dosen Penguji Ketua yang telah memberi kritik, saran dan motivasi sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
9. Dr. drg. Sri Hernawati, M.Kes selaku Dosen Penguji Anggota yang telah memberi kritik, saran dan motivasi sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
10. Drg. Dwi Warna Aju F, M.Kes selaku dosen dalam tim penelitian yang telah membantu dalam penelitian skripsi ini.
11. Teman satu penelitian saya Kharissah dan Nurin yang banyak memberi masukan, memberi semangat, dan bantuan pada skripsi saya.
12. Staf Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada
13. Staf Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
14. Sahabat-sahabat saya Andi Muslim, Nawang, Elissa, Rachel, Asti yang selalu senantiasa menemani dan menyemangati di jember;
15. Teman yang telah membantu saya selama penyusunan skripsi Emastari, Meirisa, dan Lusi.
16. Teman-teman KKN 121 yang telah memberikan saya semangat dalam mengerjakan skripsi;
17. Seluruh teman-teman FKG UNEJ angkatan 2013 yang belum saya sebutkan diatas terimakasih atas solidaritasnya, bantuan, semangat yang diberikan selama ini. Kalian semua luar biasa;
18. Semua pihak yang turut terlibat baik secara langsung maupun tidak langsung yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, terimakasih untuk kalian semua.

Jember, 13 September 2017

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Tembakau (Nicotiana Tobaccum L.)	5

2.1.1 Taksonomi Tembakau.....	5
2.1.2 Tembakau Kasturi	5
2.1.3 Kandungan Daun Tembakau Kasturi	7
2.2 Flavonoid	8
2.2.1 Struktur Flavonoid	8
2.2.2 Flavonoid sebagai antiinflamasi	9
2.2.3 Pemanfaatan Flavonoid	10
2.3 Lipopolisakaida.....	10
2.4 Toll-Like Receptors.....	11
2.4.1 Klasifikasi TLR	12
2.4.2 Toll-Like Receptor 4	12
2.5 Sel Osteoblas	14
2.6 Hipotesis Penelitian	15
2.7 Kerangka Konsep	16
BAB 3. METODE PENELITIAN	17
3.1 Jenis Penelitian	17
3.2 Tempat Penelitian	17
3.3 Waktu Penelitian	17
3.4 Variabel Penelitian	17
3.5 Definisi Operasional	18
3.6 Alat dan Bahan Penelitian	18
3.6.1 Kriteria Populasi	18

3.6.2 Kelompok Sampel	18
3.7 Alat dan Bahan Penelitian.....	19
3.7.1 Alat Penelitian	19
3.7.2 Bahan Penelitian.....	20
3.8 Prosedur Penelitian	21
3.8.1 Tahap Persiapan	21
3.8.2 Prosedur Ekstraksi Flavonoid	21
3.8.3 Prosedur Panen Sel dan Penghitungan Sel	22
3.8.4 Imunositokimia	22
3.8 Analisis Data	24
3.9 Alur Penelitian	25
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN	26
4.1 Hasil Penelitian	26
4.2 Analisis Data	27
4.3 Gambaran Mikroskop	28
4.3.1 Kelompok Paparan 24 jam	28
4.3.2 Kelompok Paparan 72 jam	29
4.4 Pembahasan	29
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN	33
5.1 Kesimpulan	33
5.2 Saran	33
DAFTAR PUSTAKA	34

DAFTAR TABEL

2.1 Karakteristik Tembakau Kasturi 1 dan Kasturi 2 di Jember	7
2.2 Kandungan Polifenol pada tembakau menurut Burley	7
2.3 Mekanisme Anti Inflamasi dari Flavonoid	9
2.4 Klasifikasi TLR	12
4.1 Hasil Uji Mann-Whitney Test kelompok 24 jam	27
4.2 Hasil Uji Mann-Whitney Test kelompok 72 jam	28

DAFTAR GAMBAR

2.1 Tanaman tembakau dan klasifikasi daun tembakau.....	7
2.2 Tembakau Kasturi 1 dan 2	7
2.3 Struktur umum flavonoid.....	8
2.4 Struktur golongan flavonoid	8
2.5 Ekspresi Toll-Like Receptor di jaringan periodontal.....	12
2.6 Sinyal Transduksi Toll-Like Receptor4.....	13
2.7 Sel Osteoblas	14
4.1 Diagram hasil penghitungan ekspresi TLR4.....	26
4.2 Gambar ekspresi TLR4 pada kelompok 24 jam.....	28
4.3 Gambar ekspresi TLR4 pada kelompok 72 jam.....	29

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran A Surat Keterangan Identifikasi Daun Tembakau	38
Lampiran B Surat Keterangan Ethical Clearence	39
Lampiran C Penghitungan Pengenceran Konsentrasi Ekstrak Flavonoid.....	40
Lampiran D Penghitungan Rerata Ekspresi TLR4 pada kelompok 24 jam dan 72 jam	41
Lampiran E Analisis Data	44
Lampiran F Kultur Sel Osteoblas	52
Lampiran G Bahan dan Alat Penelitian	54
Lampiran H Prosedur Penelitian	58

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Periodontitis merupakan penyakit peradangan kronis yang ditandai oleh inflamasi gingiva dan resorpsi tulang alveolar. Periodontitis sering disebabkan oleh infeksi bakteri gram negatif termasuk Lipopolisakarida (LPS) bakteri Gram-negatif (Kikuchi *et al.*, 2016). LPS merupakan komponen terbesar dari membran luar bakteri Gram-negatif, yang dikenal sebagai *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) (Nijland, 2014). LPS merupakan salah satu faktor yang terlibat dalam inflamasi dan kerusakan tulang (Ozaki *et al.*, 2009).

Toll-Like Receptors (TLR) merupakan *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) yang mengenali molekul dari mikroorganisme pada sistem imun alami (Gumus, 2016). Interaksi TLR dapat memicu ekspresi dari sitokin proinflamasi pada sistem imun alami. Banyak PAMPs telah diketahui dapat berinteraksi dengan TLR. Salah satunya yaitu TLR4 yang dapat mengenali LPS (Lu *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2002). TLR4 berfungsi sebagai sensor utama bawaan untuk LPS dari bakteri Gram-negatif (Sun *et al.*, 2008).

Dilaporkan bahwa TLR4 dapat diekspresikan oleh sel osteoblas tikus. Interaksi TLR4 dengan LPS pada sel osteoblas dapat menyebabkan kerusakan tulang yang parah (Tominari *et al.*, 2015). LPS menyebabkan kerusakan tulang dengan menstimulasi osteoblas untuk mensekresikan Interleukin-6 (IL-6) yang mengakibatkan teraktivasinya osteoklas sehingga terjadi resorpsi tulang alveolar yang merupakan salah satu karakteristik periodontitis (Kikuchi *et al.*, 2016).

Berdasarkan Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) tahun 2007, prevalensi penduduk Indonesia yang mempunyai masalah gigi dan mulut termasuk penyakit periodontal yaitu 23,4% (Depkes RI., 2008). Prevalensi tersebut mengalami kenaikan menjadi 25,9% sesuai dengan hasil Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) tahun 2013 (Depkes RI., 2013). Terapi penunjang perawatan periodontal menggunakan bahan kimiawi diaplikasikan secara topikal pada permukaan gigi dan gusi dalam bentuk

pasta gigi, gel, obat kumur, *spray*, chip, permen karet dan bahan irigasi. Akan tetapi, penggunaan obat kimia jangka panjang dapat menimbulkan efek samping bagi tubuh sehingga diperlukan bahan alternatif yang lebih aman dan alami. Obat herbal memiliki efek samping yang sangat rendah, dan memiliki kelebihan berupa khasiat farmakologis sehingga *World Health Organization* (WHO) menganjurkan untuk memanfaatkan obat herbal sebagai bahan alami untuk memelihara kesehatan (Katno, 2008).

Daun tembakau merupakan hasil pertanian yang menjadi komoditi ekspor Kabupaten Jember, dengan angka produksi pada tahun 2012 mencapai 31.284 ton (BPS, 2012). Penelitian ini menggunakan tembakau jenis Kasturi yang merupakan jenis tembakau yang banyak dibudidayakan di daerah Jember dan Bondowoso (Jawa Timur) (Susilowati, 2006). Sebelumnya, daun tembakau Kasturi hanya dimanfaatkan sebagai bahan baku rokok. Namun, mengingat bahaya rokok dan kebijakan pemerintah mengenai pelarangan merokok, maka perlu dilakukan berbagai upaya diversifikasi daun tembakau yang mendorong pemanfaatan daun tembakau tidak hanya untuk rokok tetapi sebagai bahan obat-obatan.

Penelitian pendahuluan yang dilakukan oleh Putri (2014) menunjukkan ekstrak etanol daun tembakau Kasturi (*Nicotiana tabaccum*) memiliki daya antibakteri terhadap bakteri *Porphyromonas gingivalis* dengan konsentrasi 40%, 60%, 80%, dan 100%. Selanjutnya, penelitian Fatimah (2016) menunjukkan kandungan ekstrak flavonoid rendah nikotin daun tembakau Kasturi (*Nicotiana tabaccum L*) memiliki daya antibakteri yang kuat terhadap bakteri *Porphyromonas gingivalis* (bakteri Gram-negatif) dengan konsentrasi 320 µg/ml, 160 µg/ml, dan 80 µg/ml. Aksi antibakteri flavonoid rendah nikotin daun tembakau kasturi berdasarkan hasil penelitian Fatimah (2016) jauh lebih baik dibandingkan metronidazol (obat antimikroba). Uji sitotoksisitas yang dilakukan oleh Rizky (2016) menggunakan MTT *assay* menunjukkan ekstrak flavonoid rendah nikotin daun tembakau kasturi (*Nicotiana tabaccum L*) dengan konsentrasi 1,25 µg/ml, 2,5 µg/ml, 80 µg/ml, dan 320 µg/ml tidak bersifat toksik pada kultur sel fibroblas gingiva manusia.

Flavonoid memiliki aktivitas biologis sebagai antiinflamasi (Kumar *et al.*, 2013). Flavonoid bekerja sebagai antiinflamasi yaitu dengan menghambat pelepasan asam arakidonat dengan memblokir jalur fosfolipase A₂, jalur siklooksigenase, dan jalur lipooksigenase (Gomes *et al.*, 2008). Flavonoid menghambat inflamasi dengan cara menghambat ekspresi dari isoform dari sintesis oksida nitrat, siklooksigenase dan lipooksigenase yang bertanggung jawab terhadap produksi dari oksida nitrat, prostanoid, leukotrin dan mediator inflamasi lainnya seperti sitokin, kemokin atau molekul adhesi (Kumar *et al.*, 2013).

Penelitian tentang pengaruh ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi (*Nicotiana tabaccum L.*) sebagai antiinflamasi terhadap ekspresi TLR4 pada kultur osteoblas belum pernah dilakukan. Berdasarkan latar belakang tersebut penelitian ini akan menganalisis pengaruh ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi (*Nicotiana tabaccum L.*) terhadap ekspresi TLR4 pada kultur sel osteoblas yang dipapar LPS, sehingga hasil penelitian ini diharapkan dapat dimanfaatkan dan dikembangkan sebagai salah satu alternatif pemilihan bahan herbal untuk pembuatan obat kumur dan gel periodontal antiinflamasi sebagai pencegahan dan terapi penyakit periodontal.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang penelitian yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan permasalahan, yaitu apakah ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi (*Nicotiana tabaccum L.*) sebagai antiinflamasi berpengaruh terhadap ekspresi TLR4 pada kultur sel osteoblas yang dipapar LPS?

1.3 Tujuan

Untuk mengetahui pengaruh ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi (*Nicotiana tabaccum L.*) sebagai antiinflamasi terhadap ekspresi TLR4 pada kultur sel osteoblas yang dipapar LPS.

1.4 Manfaat penelitian

a. Manfaat teoritis

Memberikan pengetahuan mengenai daya antiinflamasi ekstrak flavonoid daun tembakau Kasturi (*Nicotiana tabaccum L*) berpengaruh terhadap ekspresi TLR4 pada kultur sel osteoblas yang dipapar LPS.

b. Manfaat praktis

Mengembangkan ekstrak flavonoid daun tembakau Kasturi (*Nicotiana tabaccum L*) sebagai salah satu alternatif pemilihan bahan herbal untuk pembuatan obat kumur dan gel periodontal antiinflamasi untuk pencegahan dan terapi penyakit periodontal.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tembakau (*Nicotiana Tobaccum L*)

Tembakau adalah tanaman musiman yang tergolong dalam tanaman perkebunan. Daun tembakau berbentuk bulat, ujungnya meruncing, tulang daunnya menyirip dan bagian tepinya agak bergelombang seta memiliki permukaan yang licin. Jumlah daun dalam satu tanaman kurang lebih sekitar 18 sampai 32 helai dan tumbuh berseling-seling mengelilingi batang (Cahyono, 1998). Daun tembakau secara umum di klasifikasikan berdasarkan letaknya pada batang, yang dimulai dari urutan bawah ke atas, yaitu: daun pasir (*zand blad/lugs*), kaki (*voet blad/cutters*), tengah (*midden blad/leaf*), dan atas (*top blad/tips*) seperti pada gambar 2.1 (Susilowati, 2006).

2.1.1 Taksonomi Tembakau

Berdasarkan Surat Keterangan Identifikasi UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi No. 1304/IPH.6/HM/IX/2015, menerangkan tanaman tembakau diklasifikasikan sebagai berikut:

Divisio	: <i>Magnoliophyta</i>
Klas	: <i>Magnoliopsida</i>
Sub Klas	: <i>Asteridae</i>
Ordo	: <i>Solanales</i>
Famili	: <i>Solanaceae</i>
Sub Famili	: <i>Nicotianae</i>
Genus	: <i>Nicotianae</i>
Spesies	: <i>Nicotiana tabacum L.</i>

2.1.2 Tembakau Kasturi

Tembakau Kasturi merupakan jenis tembakau yang diolah secara krosok (*leaf type*) yang dibudidayakan pada musim kemarau yang dikenal dengan istilah *Voor Ogot* (VO). Berdasarkan pengeringannya tembakau kasturi termasuk tipe Burley karena pengeringannya di bawah sinar matahari langsung (Susilowati, 2006). Tembakau kasturi banyak dibudidayakan didaerah Kabupaten Jember dan

Bondowoso Provinsi Jawa Timur (Susilowati, 2006). Daun tembakau merupakan hasil pertanian yang menjadi komoditi ekspor Kabupaten Jember, dengan angka produksi pada tahun 2012 mencapai 31.284 ton (BPS, 2012). Jenis Tembakau Kasturi umumnya diusahakan di Kabupaten Jember adalah Tembakau Kasturi 1 dan Kasturi 2 seperti pada gambar 2.2 (Djajadi, 2015). Kasturi 1 dan Kasturi 2 merupakan hasil pemuliaan tanaman yang dilakukan pada tahun 2007 berdasarkan SK Mentan No:132/Kpts/SR.120/2/ 2007 dan No: 33/Kpts/SR.120/2/2007 (Herminingsih, 2014). Karakteristik kedua varietas dijelaskan pada Tabel 2.1.



Gambar 2.1 Tanaman tembakau dan klasifikasi daun tembakau dan klasifikasi daun tembakau berdasarkan letak daun pada batang (Sumber: Susilowati, 2006)



Gambar 2.2 Tembakau kasturi I dan 2 (Sumber: Djajadi, 2015)

Tabel 2.1 Karakteristik Tembakau Kasturi 1 dan Kasturi 2 di Kabupaten Jember
(balittas.go.id, 2012)

Karakteristik	Kasturi 1	Kasturi 2
Asal varietas	Seleksi massa postif Kasturi Mawar, jember	Seleksi massa positif Kasturi Ledokombo
Bentuk daun	Lonjong	Lonjong
Ujung daun	Meruncing	Meruncing
Tepi daun	Rata	Licin
Permukaan daun	Rata	Rata
Phylotaxi	2/5, putar ke kiri	2/5, putar ke kiri
Indeks daun	0,486	0,529
Jumlah daun	16-19 lembar	17-19 lembar
Produksi	1,75 ton krosok/ha	1,75 ton krosok/ha
Indeks mutu	81,75 + 0,98	82,40 + 1,03
Kadar nikoton	3,21 + 0,08	3,54 + 0,04

2.1.3 Kandungan Daun Tembakau Kasturi

Daun tembakau mengandung bahan aktif yang bermanfaat sebagai antibakteri. Putri *et al.*, (2014) menyatakan bahwa ekstrak etanol daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) efektif sebagai antibakteri terhadap bakteri *Porphyromonas gingivalis*. Selanjutnya, Fatimah (2016) menyatakan kandungan ekstrak flavonoid rendah nikotin daun tembakau Kasturi (*Nicotiana tabaccum L*) memiliki daya antibakteri yang kuat terhadap bakteri *Porphyromonas gingivalis* (bakteri Gram-negatif). Daun tembakau kaya akan polifenol yang menentukan warna dan kualitas daun (Karabegovic *et al.*, 2011). Polifenol termasuk tanin, kumarin, flavonid, dan turunan dari polifenol merupakan metabolisme sekunder dari tumbuhan tembakau (Xie *et al.*, 2011).

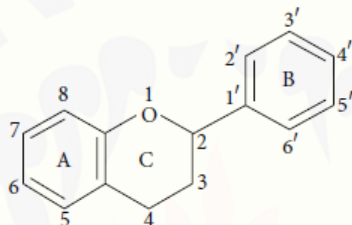
Tabel 2.2 Kandungan Polifenol pada Tembakau Burley menurut Xie (2011)

Senyawa	Kandungan pada Tembakau Burley
Asam 5-O-caffeoylquinic	0.008%
Asam Klorogenik	0.024%
Asam 4-o-caffeoylquinic	0.013%
Asam Kafeat	0.007%
Skopoletin	0.005%
Rutin	0.024%
Kaempferol-3-rutinoside	0.004%

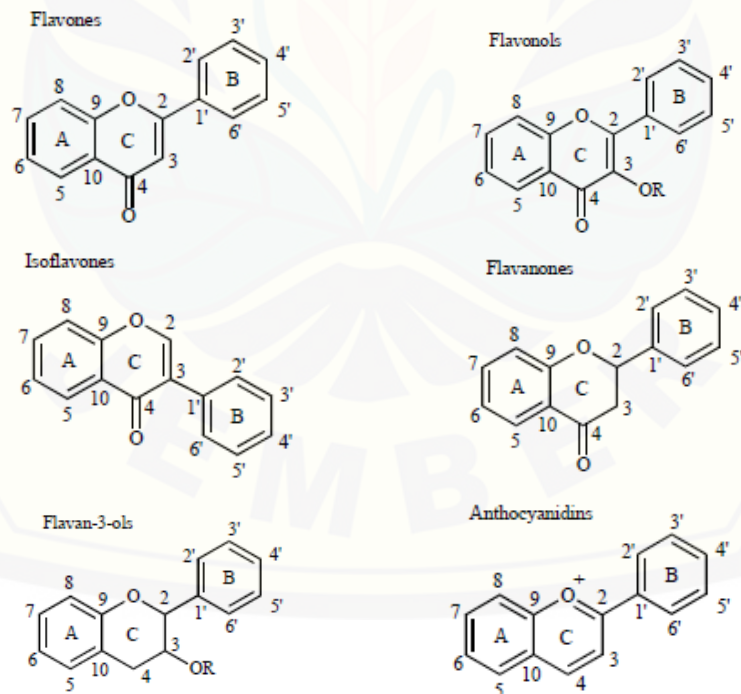
2.2 Flavonoid

2.2.1 Struktur Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa alami yang mempunyai struktur C₆-C₃-C₆ mengandung dua cincin aromatik yang dihubungkan dengan tiga rantai karbon seperti pada gambar 2.3 (Kumar *et al.*, 2013). Flavonoid terdiri dari enam golongan yaitu flavonol, flavon, flavanon, flavanol, isoflavon, dan antosianidin seperti pada gambar 2.4 (Gomez, 2008). Flavonoid mempunyai manfaat untuk kesehatan yaitu berperan sebagai antibakteri, antioksidan dan antiinflamasi (Lopez *et al.*, 2016).



Gambar 2.3 Struktur Umum Flavonoid (Sumber: Kumar *et al.*, 2013)



Gambar 2.4 Struktur Golongan Flavonoid (Sumber: Gomez, 2008)

2.2.2 Flavonoid sebagai Antiinflamasi

Inflamasi adalah proses biologis normal untuk merespon kerusakan jaringan, infeksi mikroba patogen, dan iritasi kimia. Inflamasi diawali oleh migrasi sel imun dari pembuluh darah serta mengeluarkan mediator pada daerah kerusakan. Proses ini diikuti oleh pembentukan sel inflamasi yang mengeluarkan ROS, RNS, dan sitokin inflamasi untuk mengeliminasi patogen asing dan untuk perbaikan kerusakan jaringan. Pada keadaan normal, inflamasi berlangsung cepat dan dapat sembuh sendiri tetapi dapat berlangsung lama apabila terdapat gangguan kronis (Kumar *et al.*, 2013).

Proses inflamasi dipengaruhi oleh aktivitas enzim regulator seperti protein tyrosin kinase, protein kinase C, fosfodiesterase, fosfolipase A₂, lipooksigenase, dan siklooksigenase. Siklooksigenase adalah enzim yang memainkan peran penting sebagai mediator inflamasi dan terlibat dalam pelepasan asam arakidonat, berperan untuk biosintesis dari prostaglandin dan prostasiklin. Pelepasan asam arakidonat dianggap sebagai titik awal dari respon inflamasi secara umum (Rathee *et al.*, 2009).

Flavonoid dapat menghambat terjadinya inflamasi. Mekanismenya yaitu menghambat aktivitas enzim dari metabolisme asam arakidonat seperti fosfolipase A₂, siklooksigenase, lipooksigenase, dan sintesis nitrat oksida (NO). Penghambatan aktivitas enzim tersebut oleh flavonoid mengakibatkan penurunan produksi dari asam arakidonat, prostaglandin, leukotrin, dan nitrat oksida yang merupakan mediator inflamasi (Kim *et al.*, 2004). Hasil penelitian beberapa flavonoid menunjukkan aktivitasnya sebagai antinflamasi secara *in vitro* dijelaskan pada tabel 2.3.

Tabel 2.3 Mekanisme Anti Inflamasi dari Flavonoid menurut Rathee *et al.*, (2009)

Flavonoid	Mekanisme antiinflamasi
Kuersetin	Menghambat aktivitas siklooksigenase dan lipooksigenase
Apigenin	Menghambat sintesis prostaglandin dan produksi IL-6
Kurkumin	Menurunkan regulasi siklooksigenase dan ekspresi iNOS
Hesperidin, diosmin	Menghambat susunan dari prostaglandin
Amentoflavon	Menghambat fosfolipase A ₂

2.2.3 Pemanfaatan Flavonoid

Pemanfaatan flavonoid pada kedokteran gigi menurut Sabir (2003), antara lain: (1) bidang periodontologi kedokteran gigi yaitu untuk pengobatan periodontitis dimana terjadi inflamasi pada jaringan periodontal. Flavonoid sebagai antiinflamasi berperan dalam memperkuat dinding pembuluh darah kapiler sehingga perdarahan dapat terhenti. Flavonoid juga bersifat antiinflamasi menekan sintesis prostaglandin yang diketahui merupakan mediator inflamasi sehingga jaringan gingiva kembali normal. (2) Pada bidang bedah mulut, flavonoid berperan dalam mempercepat proses penyembuhan luka pasca pencabutan gigi dengan meningkatkan proliferasi sel fibroblas dan produksi serabut kolagen. Selain itu, flavonoid mengurangi rasa sakit pasca pencabutan dengan cara menghambat jalur siklooksigenase dan fosfolipase A₂ sehingga sintesis prostaglandin akan berkurang. (3) dibidang konservasi gigi flavonoid berperan dalam regenerasi pulpa gigi dengan menginduksi terbentuknya jembatan dentin.

Flavonoid juga ditemukan dalam tanaman tembakau, Rizky (2016) menyatakan bahwa ekstrak flavonoid rendah nikotin daun tembakau kasturi dengan konsentrasi 1,25 µg/ml; 2,5 µg/ml; 80 µg/ml; dan 320 µg/ml tidak memberikan efek penghambatan pada pertumbuhan sel fibroblas gingiva manusia. Hal ini diduga karena flavonoid tidak bersifat toksik pada sel normal. Flavonoid bersifat toksik pada sel kanker, dan tidak toksik atau sedikit toksik pada sel normal (Middleton *et al.*, 2000; Nijveldt *et al.*, 2001).

2.3 Lipopolisakarida

Lipopolisakarida (LPS) merupakan komponen terbesar dari membran luar bakteri Gram-negatif, yang dikenal sebagai *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs). LPS terdiri dari tiga bagian yang berbeda, dari membran dalam ke membran luar yaitu lipid A, inti, dan antigen O (Nijland, 2014). Lipid A melindungi kerusakan dari struktur protein. Lipid A tersusun atas rantai panjang fosfolipid dengan *hydroxyfatty acids*. Lipid A berikatan dengan Inti ke rantai O yang

dihubungkan oleh gula 3-deoxy-D-manno-2-octulosonate. Inti polisakarida yang melekat pada Lipid A merupakan bagian yang bertanggung jawab terhadap toksisitas bakteri Gram- negatif (Wang *et al.*, 2002).

LPS merupakan suprastruktur utama bakteri Gram-negatif dalam membangun integritas struktural bakteri dan melindungi bakteri dari pertahanan imunitas host (Murray and Wilton, 2003). Peran LPS adalah pengatur permeabilitas membran, pelindung dan penghalang *impermeable* bagi masuknya komponen berbahaya kedalam sel bakteri serta terlibat dalam mekanisme pertahanan bakteri dari lingkungan yang kurang baik (Newman *et al.*, 2001).

LPS merupakan faktor penting untuk mediasi respon imun bawaan yang memulai perubahan inflamasi selama periodontitis. Sebagai mediator inflamasi LPS menginduksi sel host untuk mensekresi sitokin proinflamasi seperti tumor nekrosis faktor- α (TNF- α), interferon- β (IFN- β), dan protein inflamasi seperti induksi sintesis NO (iNOS) (Zhang *et al.*, 2008). LPS dapat meningkatkan akses ke jaringan gingival, mengawali dan menimbulkan inflamasi yang menyebabkan sitokin proinflamasi dengan kadar tinggi yang kemudian akan mengakibatkan teraktivasinya osteoklas sehingga terjadi destruksi jaringan ikat gingiva, ligamen periodontal, dan resorpsi tulang alveolar (Roelan, 2002).

2.4 Toll Like Receptors

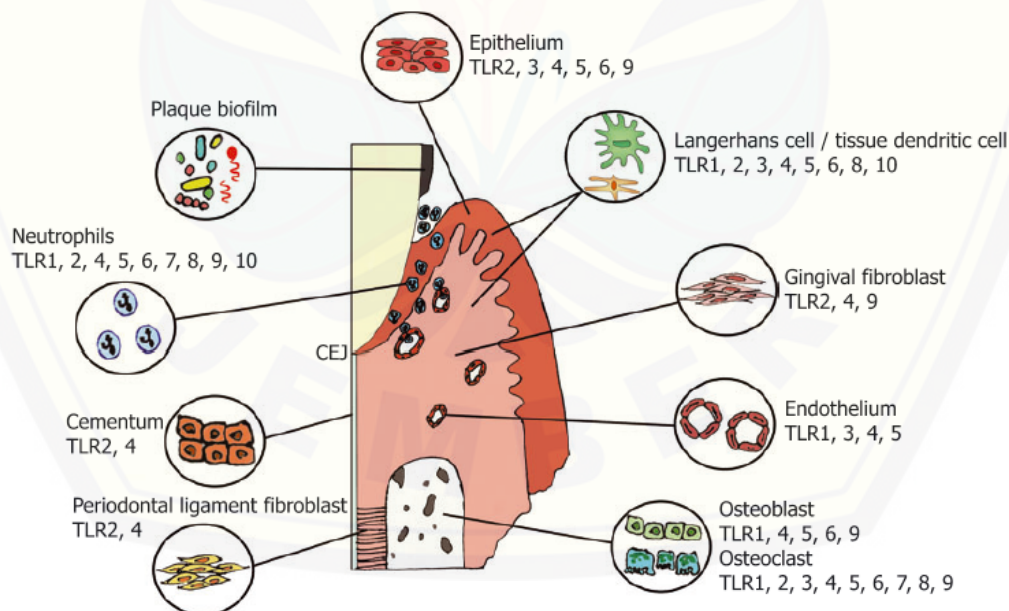
Produk gen Toll pertama kali di temukan pada tahun 1985 dan menggambarkan peran penting untuk perkembangan embrio dari dorsal, *Drosophila*. Pada tahun 1991 *Toll like receptors* (TLR) pertama berhasil diidentifikasi pada manusia. TLR merupakan *Pattern Recognition Receptors* (PRR) yang mengenali molekul dari mikroorganisme pada sistem imun alami (Gumus, 2016). TLR telah terbukti memainkan peran penting pada pengenalan respon imun alami dan aktivasi seluler dalam menanggapi invasi patogen (Aswapati *et al.*, 2012). Interaksi TLR dapat memicu ekspresi dari sitokin proinflamasi pada sistem imun alami (Lu *et al.*, 2008).

2.4.1 Klasifikasi TLR

Lebih dari sepuluh TLR telah berhasil diidentifikasi pada manusia dan tikus (Wang *et al.*, 2002). Klasifikasi TLR menurut Takeda *et al.*, (2005) dijelaskan pada Tabel 2.4 dan ekspresi TLR pada jaringan periodontal (Mahanonda *et al.*, 2000) pada Gambar 2.5.

Tabel 2.4 Klasifikasi Toll Like Receptor menurut Takeda *et al.* (2005)

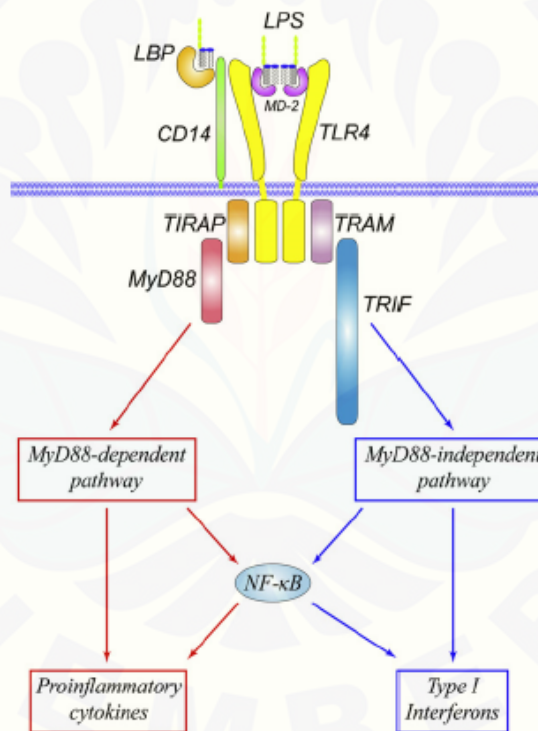
TLR	Ligan	Spesies
TLR1 + TLR2	<i>Triacyl Lipopeptides</i>	Bakteri
TLR2	Lipoprotein dan peptidoglikan	Bakteri Gram-positif
TLR3	dsDNA	Virus
TLR4	Lipopolisakarida	Bakteri Gram-negatif
TLR5	Flagelin	Bakteri
TLR6 + TLR2	<i>Diacyl lipopeptidas</i>	Mikoplasma
TLR7	ssRNA	Virus
TLR8	ssRNA	Virus
TLR9	DNA	Bakteri, Virus, plasmodium



Gambar 2.5 Ekspresi *Toll-Like Receptor* Jaringan Periodontal (Mahanonda *et al.*, 2000).

2.4.2 Toll Like Receptor-4

Toll Like Receptor 4 (TLR4) berfungsi sebagai sensor utama bawaan untuk LPS bakteri Gram-negatif (Sun *et al.*, 2008). TLR4 akan teraktivasi oleh LPS dengan konsentrasi yang rendah karena LPS berperan sebagai *immunoactivator* (Takeda *et al.*, 2005). Setelah pengenalan dengan LPS, TLR4 mengalami oligomerisasi dan mengerahkan adaptor hilir melalui interaksi dengan domain reseptor *Toll-inteleukin-1* (TIR-1). Domain TIR merupakan tanda untuk sinyal transduksi (Lu *et al.*, 2008). Sinyal transduksi dijelaskan pada Gambar 2.6 (Lu *et al.*, 2008).



Gambar 2.6 Sinyal Transduksi Toll Like Receptor-4 (Lu *et al.*, 2008).

Sinyal TLR4 dibagi menjadi dua jalur yaitu *MyD88 dependent* dan *MyD88 independent* (*TRIF dependent*). Berdasarkan hasil studi jalur *MyD88 dependent* menunjukkan peran untuk ekspresi sitokin proinflamatori sedangkan jalur *MyD88 independent* memediasi induksi dari gen Interferon-1 (Lu *et al.*, 2008).

TLR4 memainkan peran penting terhadap respon imun alami. Produksi berlebihan dari sitokin proinflamasi karena stimulasi kronik dari TLR dapat menyebabkan destruksi jaringan (Hans *et al.*, 2011). Pada jaringan periodontal, TLR4 dapat diekspresikan oleh fibroblas gingiva, fibroblas ligamen periodontal dan osteoblas (Leite *et al.*, 2014). Telah dilaporkan bahwa TLR4 dapat diekspresikan oleh sel osteoblas tikus. Osteoblas berfungsi untuk mensintesis komponen matriks tulang dan mengontrol resorpsi tulang oleh osteoklas. Interaksi TLR4 dengan LPS pada sel osteoblas dapat menyebabkan kerusakan tulang yang parah (Tominari *et al.*, 2015).

2.5 Sel osteoblas

Osteoblas merupakan sel yang berbentuk kubus atau kolumnar dalam keadaan aktif sedangkan dalam keadaan tidak aktif osteoblas akan berbentuk pipih (Einhorn, 1996; Kierszenbaum, 2002). Osteoblas berfungsi untuk menginisiasi dan mengontrol proses mineralisasi osteoid (Kierszenbaum, 2002). Osteoblas berkembang dari osteoprogenitor yang terdapat dibagian dalam periosteum dan sumsum tulang (Orwoll, 2003).



Gambar 2.7 Kultur sel osteoblas yang berasal dari kalvaria tikus pembesaran 100x.

Osteoblas merupakan sel pembentuk tulang yang memainkan peran penting dalam mengatur diferensiasi dan aktivasi dari osteoklas, sel yang meresorpsi tulang. Remodeling tulang diatur oleh keseimbangan osteoblas dan osteoklas. Produk bakteri dan mediator host seperti *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) dapat menghambat pembentukan tulang oleh osteoblas dan menstimulasi aktivitas osteoklas yang

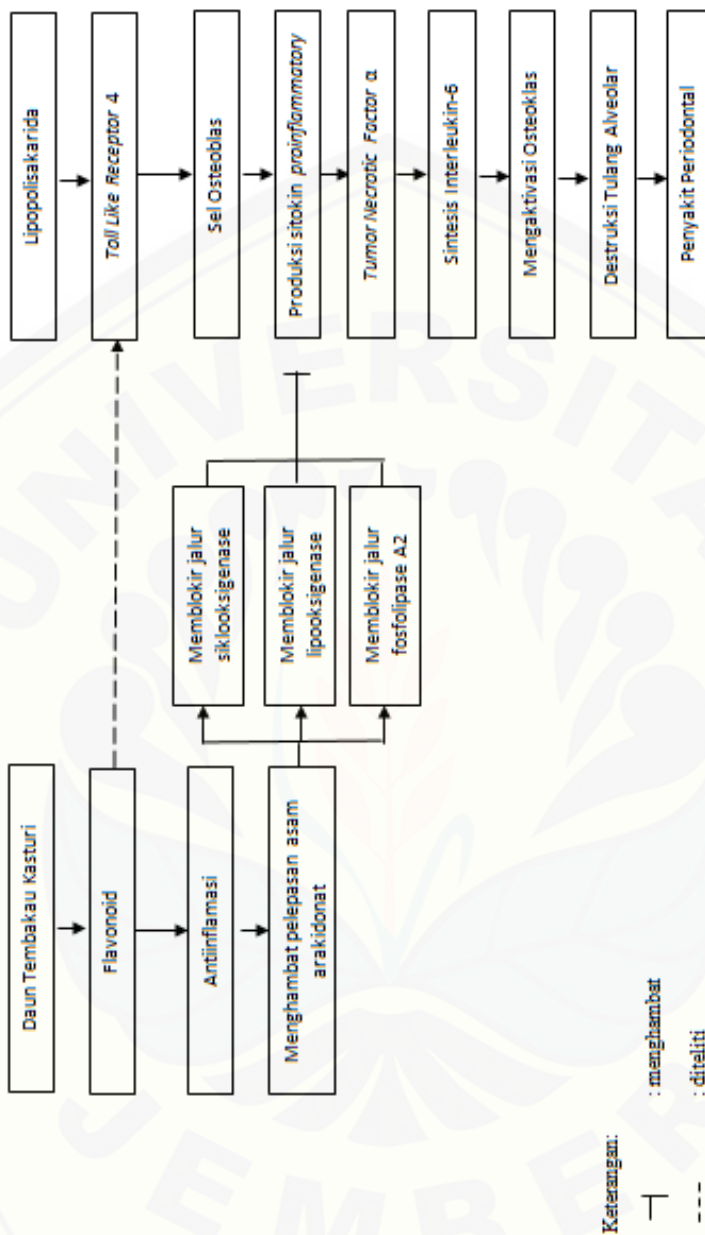
menyebabkan resorpsi tulang. Sinyal TLR4 menstimulasi sel osteoblas tikus untuk memproduksi TNF- α (Mahanonda dan Sathit, 2000).

Osteoblas mampu mensekresikan mediator inflamasi seperti sitokin proinflamasi seperti TNF α , *colony stimulating factor*, dan kemokin. TNF α mampu mensintesis sel inflamasi yang dapat mensintesis Interleukin-6 yang dapat mengaktifasi osteoklas. Paparan bakteri seperti lipopolisakarida dapat menstimulasi osteoblas untuk mensekresikan Interleukin-6 (IL-6) yang mengakibatkan teraktifasinya osteoklas sehingga terjadi resorpsi tulang alveolar yang merupakan salah satu karakteristik periodontitis (Kikuchi *et al.*, 2016). Interaksi TLR4 dengan LPS pada sel osteoblas dapat menyebabkan kerusakan tulang yang parah (Tominari *et al.*, 2015).

2.6 Hipotesis

Ekstrak Flavonoid daun tembakau Kasturi (*Nicotiana tobaccum L.*) menghambat ekspresi TLR4 pada kultur sel osteoblas yang dipapar lipopolisakarida.

2.7 Kerangka Konseptual



Gambar 2.8 Kerangka Konseptual

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *the post test only control group design* untuk mengetahui perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan dan kontrol.

3.2 Tempat Penelitian

- a. Pembuatan Kultur Sel Osteoblas dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada.
- b. Uji Imunositokimia dilakukan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

3.3 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2017 s.d Maret 2017

3.4 Variabel Penelitian

- a. Variabel bebas
Ekstrak flavonoid daun tembakau ^{Kasturi} (*Nicotiana tabaccum L*) dengan konsentrasi 640 µg/ml, 40 µg/ml, 2,5 µg/ml.
- b. Variabel terikat
Ekpresi *Toll Like Receptors-4*
- c. Variabel terkendali
Daun tembakau kasturi yang sesuai kriteria sampel, sel osteoblas yang sesuai kriteria dan paparan LPS.

3.5 Definisi Operasional

- a. Ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi (*Nicotiana tabaccum L*) adalah ekstrak flavonoid dari daun tembakau Kasturi berkualitas rendah yang diambil

pada daun bagian bawah kemudian diekstraksi menggunakan metode ekstraksi hidrolisis dan refluks yang dimodifikasi.

- b. Kultur Sel Osteoblas berasal dari *stock* kultur yang disediakan laboratorium parasitologi fakultas kedokteran universitas gadjah mada dengan kriteria sel osteoblast berasal dari kalvaria tikus neonatal berusia 2-4 hari dengan jenis kelamin laki-laki atau perempuan.
- c. Ekspresi TLR4 merupakan ekspresi suatu protein TLR4 pada kultur sel osteoblas menggunakan uji imunositokimia yang apabila terekspresi akan tampak membran selnya berwarna kecoklatan yang diamati dibawah mikroskop perbesaran 400x dihitung per 100 sel.
- d. Lipopolisakarida adalah komponen membran luar dari bakteri Gram-negatif *E.coli* yang dipaparkan dengan konsentrasi 10 µg/ml selama 24 jam dan 72 jam.

3.6 Kriteria Populasi dan Kelompok Sampel

3.6.1 Kriteria Populasi

Penelitian ini menggunakan kultur sel osteoblas yang diperoleh dengan kriteria yaitu sel osteoblast berasal dari kalvaria tikus neonatal berusia 2-4 hari dengan jenis kelamin laki-laki atau perempuan.

3.6.2 Kelompok Sampel

Pada penelitian ini sampel dibagi menjadi 5 kelompok. Dengan masing-masing kelompok dibuat duplikasi. Konsentrasi 640 µg/ml; 40 µg/ml; dan 2,5 µg/ml digunakan sebagai dasar konsentrasi uji berdasarkan hasil penelitian pendahuluan mengenai uji sitotoksitas ekstrak flavonoid rendah nikotin daun tembakau Kasturi (Rizky, 2016). Pengelompokkan tersebut yaitu:

- a. Kelompok O : Kultur sel osteoblas ditambahkan media kultur tanpa dipapar LPS.
- b. Kelompok OL : Kultur sel osteoblas ditambahkan media kultur dan dipapar LPS 10 µg/ml.

- c. Kelompok OLF1 : kultur sel osteoblas diinkubasi ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi dengan konsentrasi 640 $\mu\text{g/ml}$ dan dipapar LPS10 $\mu\text{g/ml}$.
- d. Kelompok OLF2 : kultur sel osteoblas diinkubasi ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi dengan konsentrasi 40 $\mu\text{g/ml}$ dan dipapar LPS10 $\mu\text{g/ml}$.
- e. Kelompok OLF3 : kultur sel osteoblas diinkubasi ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi dengan konsentrasi 2,5 $\mu\text{g/ml}$ dan dipapar LPS10 $\mu\text{g/ml}$.

3.7 Alat dan Bahan penelitian

3.7.1 Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu:

1. Timbangan
2. *Vacuum filter*
3. Sentrifuge
4. *Syringe 5ml*
5. *Handscoon*
6. Masker
7. Bekker Glass
8. *Conical tube*
9. Vortex
10. Mikropipet
11. *Eppendorf*
12. Rak *Eppendorf*
13. *Syringe filter*
14. *Blue tip*
15. *Yellow tip*
16. Label
17. Tissue

18. Gunting steril
19. Pinset
20. *Petridisk*
21. *Laminar flow*
22. Bekker glass
23. *Hemacytometer*
24. *Counter*
25. Inkubator karbon dioksida 5% suhu 37°C
26. Pipet
27. Mikroskop inverted
28. Coverslip
29. 24-Microwell Plate

3.7.2 Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu:

- a. Daun tembakau kasturi
- b. HCL 1 M
- c. Etanol 80%
- d. Petroleum eter 50 ml
- e. Acetonitrile 20 mL
- f. Media kultur : DMEM (*Dulbecco minimal Essential Medium*)
- g. PBS (*Phospat Buffer Saline*)
- h. DMSO (*Dimetilsulfoxide*)
- i. Bubuk Lipopolisakarida dari bakteri E.coli
- j. Antibodi monoklonal TLR4
- k. Antibodi Sekunder (biontynyl goat Anti-polivalent)
- l. Antibodi Sekunder Streptavidin
- m. DAB Chromogen
- n. Mayer's Haemosiklin
- o. Lem Entellan
- p. Aquades

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Tahap Persiapan

Persiapan dimulai dengan mengajukan *ethical clearance* ke bagian etikadan advokasi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta untuk mendapatkan perijinan penelitian pelaksanaan penelitian.

3.8.2 Prosedur Ekstraksi Flavonoid Daun Tembakau Kasturi

Proses mengekstrak diawali dengan menyediakan daun tembakau Kasturi segar yang telah dicuci bersih dan dikeringkan dengan cara kering angin selama tiga hari pada suhu kamar. Daun tembakau Kasturi yang sudah dikeringkan tersebut kemudian dioven menggunakan oven, selama tiga hari dengan suhu (40-50)°C. Daun tembakau kasturi yang sudah kering dihaluskan menggunakan blender. Daun tembakau kasturi yang sudah dihaluskan ditimbang sebanyak 100 gram, lalu dimasukkan ke dalam labu alas bulat. Untuk proses hidrolisis, tambahkan 500 ml HCl 1M. Hidrolisis yang dilakukan menggunakan metode ekstraksi refluks selama dua jam pada suhu 80°C. Hasil dari refluks disaring menggunakan *vacuum filter*. Bagian yang lolos penyaringan atau bagian yang lebih kecil molekulnya dibuang. Bahan yang berbentuk padat atau komponen yang lebih besar molekulnya disebut *Slurry*. *Slurry* ditambahkan lagi ke dalam labu alas bulat dan ditambahkan lagi dengan HCl 500 ml serta dilakukan pengadukan. Penyaringan dilakukan kembali menggunakan *vacuum filter*. *Slurry* selanjutnya dicuci dengan menggunakan HCl 250 ml, dan dimasukkan lagi ke dalam labu bulat. Selanjutnya dilakukan pengambilan ekstrak flavonoid, yaitu dengan cara *slurry* ditambahkan etanol 80% sebanyak 500 ml, dan dilakukan metode refluks pada suhu 80°C selama satu jam. Setelah satu jam dilakukan refluks, hasil disaring dengan menggunakan *vacuum filter* dan dicuci menggunakan etanol 80% sebanyak 200 ml. Cairan hasil refluks dan pencucian tadi selanjutnya didiamkan selama delapan jam. Cairan yang telah didiamkan selama delapan jam akan memisah menjadi endapan dan bagian cair. Selanjutnya, bagian cair dilakukan lagi pengekstrakan untuk memisahkan lateks dan gum dengan pelarut petroleum eter sebanyak 50ml. Lapisan paling atas dibuang, dan ekstraksi diulang

sebanyak tiga kali. Hasil ekstraksi kemudian dikeringkan sampai volume ± 10 ml, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi dengan ditambahkan acetonitril sebanyak 20 ml. Metode ini digunakan untuk membersihkan komponen gula dan komponen pengotor yang masih tertinggal. Sentrifugasi dilakukan selama sepuluh menit pada 400 rpm. Lapisan paling atas hasil dari sentrifugasi diambil dan dikeringkan, kemudian dilakukan pengujian menggunakan metode *LC-MS/MS*. Ekstraksi selesai dan diperoleh ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi (Rizky, 2016).

3.8.2.1 Pengenceran Ekstrak Flavonoid Daun Tembakau Kasturi

Penelitian ini menggunakan ekstrak flavonoid daun tembakau Kasturi, yang diencerkan di dalam *laminar air flow* dan dalam keadaan steril. Pengenceran dilakukan dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Rohaya, 2014):

$$V1.M1=V2.M2$$

V1 : Volume awal ekstrak flavonoid daun tembakau

M2 : Konsentrasi awal ekstrak flavonoid daun tembakau

V2 : Volume akhir ekstrak flavonoid daun tembakau

M2 : Konsentrasi akhir ekstrak flavonoid daun tembakau

3.8.3 Prosedur Panen Sel dan Penghitungan Sel

Panen sel dilakukan setelah sel 80% konfluen, yaitu dengan cara media dibuang dengan menggunakan mikropipet pada disk, lalu sel dicuci dengan PBS steril. Tambahkan tripsin 0,25 % sebanyak 1 ml secara merata untuk melepaskan sel dan kemudian diinkubasi dalam inkubator karbondioksida 5%, pada suhu 37°C selama tiga hingga lima menit. Media kultur dimasukkan $\pm 2-3$ ml untuk menginaktifkan tripsin. Sel diresuspensi dengan pipet sampai semua sel terlepas tidak menggerombol. Sel diamati dibawah mikroskop. Resuspensi kembali apabila ada sel yang menggerombol. Sel ditransfer kedalam *conical tube* baru. DMEM ditambahkan sebanyak $\pm 2-3$ ml. sel diresuspensi kembali. Panenan sel diambil 10 μ l yang dipipetkan ke *hemacytometer*. Sel dihitung dibawah mikroskop inverted dengan *counter* (Rizky, 2016).

a. Jumlah sel dihitung/ml dengan rumus (CCRC, 2009):

$$\text{Jumlah sel yang dihitung/ml} = \frac{\sum \text{sel pada kamar A+B+C+D} \times 10^4}{4}$$

b. Menghitung jumlah total sel yang diperlukan

Setiap satu well diperlukan $2,5 \times 10^4$ sel, maka jumlah sel yang diperlukan dalam 24 well adalah 6×10^5 sel (Gasper, 2002).

c. Besar volume panen sel yang diperlukan (dalam mL) dihitung menggunakan rumus (CCRC, 2009):

$$\text{Volume panen sel} = \frac{\text{Jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{Jumlah sel yang dihitung/ml}}$$

3.8.4 Imunositokimia

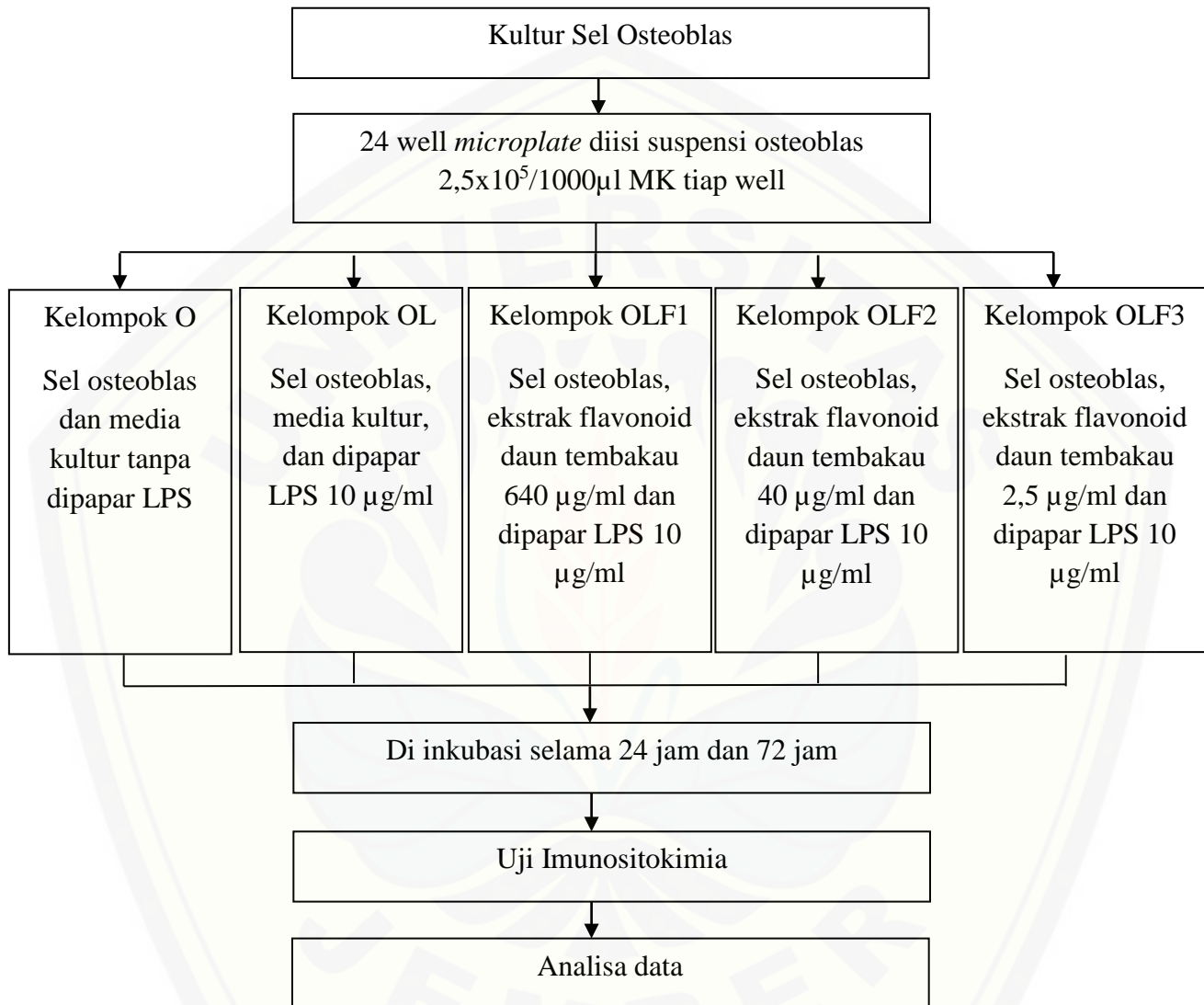
Sel osteoblas dengan konsentrasi $2,5 \times 10^4$ sel/1000 μ l MK dimasukkan pada *plastic microplate* 24 wells yang didasarnya telah diberi cover slip poly-L-lysine. Kemudian diberi media kultur, sehingga terdapat 1000 μ l suspensi sel diatas coverslip poly-L-lysine dan diinkubasi dengan inkubator dengan 5% CO₂ semalaman pada suhu 37 °C. Setelah inkubasi, media kultur dibuang. Sel osteoblas dilakukan perlakuan sesuai kelompok perlakuan. Pada kelompok kontrol negatif, sel diberi media kultur sebanyak 1000 μ l. Pada kelompok kontrol positif, sel diberi media kultur 500 μ l dan diberi LPS dengan konsentrasi 10 μ g/ml sebanyak 500 μ l. Pada kelompok perlakuan sel diberi ekstrak flavonoid konsentrasi 640 μ g/ml; 40 μ g/ml; dan 2,5 μ g/ml sebanyak 500 μ l dan LPS 500 μ l. Diinkubasi dalam inkubator dengan 5% CO₂, pada suhu 37°C selama 24 dan 72 jam. Sampel sel osteoblas pada cover slip yang telah diberikan perlakuan dicuci dua kali dengan PBS. Difiksasi dengan 300 μ l methanol selama sepuluh menit, kemudian dicuci dengan PBS dan aquades. Ditetaskan larutan hidrogen peroksida 3% didiamkan selama sepuluh menit. Dicuci menggunakan PBS tiga kali masing-masing selama lima menit. Kemudian, diaplikasikan antibodi monoklonal TLR4 dengan perbandingan 1:500 (1 μ l antibodi + 500 μ l PBS), diinkubasi semalaman pada suhu 4 °C. Dicuci dengan PBS sebanyak tiga

kali, masing-masing selama lima menit. Ditetesi antibodi sekunder biontinyl goat Anti-polivalent sebanyak satu tetes, didiamkan selama satu jam. Dicuci dengan PBS sebanyak tiga kali, masing-masing selama lima menit. Diaplikasi satu tetes antibodi sekunder Streptavidin Peroxidase, didiamkan selama tiga puluh menit. Dicuci dengan PBS sebanyak tiga kali, masing-masing selama lima menit. Ditetesi satu tetes pewarna kromogen 1,3-Diamino Benzidin (DAB), didiamkan selama sepuluh menit. Kemudian, dicuci dengan PBS sebanyak tiga kali, masing-masing selama lima menit. Setelah itu, direndam menggunakan aquades sepuluh menit. Dilakukan counterstain dengan *Mayer's hematoxylin* satu tetes selama 45 detik. Direndam menggunakan aquades sepuluh menit. Kemudian, *coverslip* diambil menggunakan jarum dan pinset lalu dikeringkan diatas tissue. *Object glass* diberi lem entellan, cover slip yang sudah kering ditaruh diatas *object glass* dengan posisi terbalik. Ekspresi TLR4 ditunjukkan oleh osteoblas yang dinding selnya berwarna coklat, pengamatan dilakukan di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali dengan dibagi empat lapang pandang dihitung per 100 sel. Penghitungan dilakukan dengan tiga kali ulangan (CCRC, 2009).

3.9 Analisis Data

Data penelitian diuji normalitasnya menggunakan uji kolmogorv-smirnov dengan ($p \geq 0,05$) dan diuji homogenitasnya menggunakan uji *Levene-Test* dengan ($p \leq 0,05$). Hasil penelitian menunjukkan data berdistribusi normal dan tidak homogen yang selanjutnya dilakukan uji beda menggunakan uji *Kruskall-Wallis* untuk mengetahui perbedaan ekspresi TLR4 berdasarkan konsentrasi dan dilakukan uji *independent t-test* untuk mengetahui perbedaan ekspresi TLR4 berdasarkan waktu. Dilanjutkan dengan uji *Mann-whitney* dengan ($p \leq 0,05$).

3.8 Alur penelitian



BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi dapat menghambat ekspresi TLR4. Semakin tinggi ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi, maka semakin rendah ekspresi TLR4. Semakin lama waktu paparan ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi, maka ekspresi TLR4 semakin rendah.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan saran yang dapat diberikan adalah sebagai berikut :

1. Perlu adanya penelitian lebih lanjut untuk mengetahui mekanisme ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi dalam menghambat jalur aktivasi TLR4.
2. Perlu adanya penelitian lebih lanjut untuk mengetahui potensi ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi sebagai agen antiinflamasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Aswapati, N. W., A. Chayasadam, R. Surarit, W. Pitiphat, J. A. Boch, T. Nagasawa, I. Ishikawa, dan Y. Izumi. 2013. Induction of Toll Like Receptor Expression by *Porphyromonas gingivalis*. *J periodontal*, **84**(7): 1010-8.
- Bakker, A. D., dan K. N. Jenneke. 2012. Osteoblast Isolation from Murine Calvaria and Long Bones. *Methods Mol Biol*, 816:19-29.
- Cahyono, B. 1998. *Tembakau, Budidaya dan Analisis Tani*. Yogyakarta: Kaninus.
- Cano, J., M. M. Cladera, J. Lagunas, dan M. Castell. 2014. Flavonoids Affect Host-Microbiota Crosstalk through TLR Modulation. *Antioxidants*, **3**(4): 649-670.
- Chun, W. M., K. S. I. Yap, M. T. Kho, N. H. Ismail, K. Yusoff, K. Shaari, S. Y. Chin, dan E. S. H. Lim. 2016. Mechanisms Underlying the Anti-Inflammatory Effects of *Clinacanthus nutans* Lindau Extracts: Inhibition of Cytokine Production and Toll-Like Receptor-4 Activation. *Front Pharmacol*, **7**: 7.
- CCRC, 2009. *Standard Operating Procedure*, Cancer Chemoprevention Research Cancer Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Fatimah, I. 2016. Pengaruh Ekstrak Flavonoid Rendah Nikotin Limbah Daun Tembakau Kasturi (*Nicotiana Tabacum L.*) Terhadap Pertumbuhan Mikroba Rongga Mulut. Skripsi. Jember: Universitas Jember.
- Gomes, A., F. Eduarda, L. F. C. Jose, M. Lurdes, dan M. Luisa. 2008. Molecular Mechanisms of Anti-Inflammatory Activity Mediated by Flavonoids. *Curr Med Chem*, **15**(16): 1586-1605.
- Gumus, P. 2016. The Role of TLRs in The Pathogenesis Of Periodontal Diseases. *J.Dent. Sci. Ther*, **1**(1): 3-6.
- Hans, M., dan V. M. Hans. 2011. Toll-Like Receptors and Their Dual Role In Periodontitis: A Review. *Journal of Oral Science*, **53**(3) 263-271.
- Herminingsih, H. 2014. Hubungan Adaptasi Petani Terhadap Perubahan Iklim Dengan Produktivitas Tembakau pada Lahan Sawah dan Tegalan di Kabupaten Jember. JSEP Vol. 7 No. 2 November 2014, P: 31-44.
- Hidayati, N. A., S. Listyawati, dan A. D. Setyawan. 2008. Kandungan kimia dan Uji Antiinflamasi Ekstrak Etanol *Lantana Camara L.* pada tikus putih Jantan. *Bioteknologi*, **5**(1): 10-17.

- Huang, H., Z. Cheng, H. Shi, W. Xin, T. T. Wang, dan L. L. Yu. 2011. Isolation and Characterization of Two Flavonoids, Engeletin and Astilbin, from The Leaves of *Engelhardia Roxburghiana* and Their Potential Anti-Inflammatory Properties. *J Agric Food Chem.* **59**(9): 4562-9.
- Ibeagha, A. E. M., J. W. Lee, A. E. Ibeagha, D. D. Bannerman, M. J. Paape, dan X. Zhao. 2008. Bacterial Lipopolysaccharide Induces Increased Expression of Toll-like Receptor (TLR) 4 and Downstream TLR Signaling Molecules in Bovine Mammary Epithelial Cell. *Vet Res*, **39**(2):11.
- Karabegovic, I. T., B. Vlada, dan L. Miodrag. 2011. Ultrasound-Assisted Extraction Of Total Phenols and Flavonoid From Dry Tobacco (*Nicotiana Tabacum*) Leaves. *Natural Product Communication*, **6**(12):1855-6.
- Katno. 2008. Tingkat manfaat, keamanan dan Efektivitas Tanaman Obat dan Obat Tradisional. Diterbitkan oleh Balai Besar Penelitian dan Pengembangan. Jawa Tengah.
- Kim, H.P., K. H. Son, H. W. Chang, dan S. K. Sam. 2004. Anti-inflammatory Plants flavonoid and Cellular Action Mechanisms. *J Pharmacol Sci*, **96**: 229-245.
- Kumar, S., dan A. K. Pandey. 2013. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids. *The scientific world journal*, 2013.
- Kikuchi, T., M. Tetsuya, T. Naotoke, M. Akio, T. Shigehisa, M. Masanori, Y. Genta, H. Toshimitsu, N. Toshihide, dan Y. Yasunobu. 2001. Gene Expression of Osteoclast Differentiation Factor Is Induced by Lipopolysacchride in Mouse Osteoblast Via Toll-Like Receptors. *J immunol*, 166:3574-3579.
- Leite, F. R. M., S. G. Aquino, M. R. Guimaraes, J. A. Cirelli, dan C. R. Junior. 2014. RANKL expression is differentially modulated by TLR2 and TLR4 signaling in fibroblasts and osteoblasts. *Immunologi innovation*, **1**:2.
- Lopez, N. L., P. Erick, L. Dulce, dan J. Basilio. 2016. Flavonoid As Cytokine Modulators: A Possible Therapy For Inflammation-Related Disease. *Molecular Sciences*, 921.
- Li JP, Y Chen, CHC Ng, ML Fung, A Xu, Cheng SWT dan WK Leung. 2014. Differential Expression Of Toll-Like Receptors 4 in Healthy and Diseased Human Gingiva. **49**: 845-854.
- Lu, Y. C., C. Y. Wen, dan S. Pamela. 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, **42**: 145-151.

- Mahanonda, R., dan S. Pichyangkul. 2007. Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. *Periodontology 2000*, **43**: 41-55.
- Middleton, E. J. R., C. Kandaswami, dan T. C. Theoharides. 2000. The Effect of Plant Flavonoids on Mamalian cell: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, **52**(4): 673-751.
- Nijland, R., T. Hofland, dan J. A. G. Van Strijp. 2014. Recognition of LPS by TLR4: Potential for Anti-inflammatory Therapies. *Marine Drugs*, **12**(7): 4260-4273.
- Nijveldt, R. J., E. V. Nood, D. E. C van Hoorn, P. G. Boelens, K. van Norren, dan P. A. M. Van Leeuwan. 2001. Flavonoid: A Review of Probable Mechanism of Action and Potential Applications. *J. Clinic Nutrition*, **74**: 418-425.
- Nishiya, T., dan A.L. Defranco. 2004. Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization properties of the Toll-Like receptors. *J Biol Chem*, **279**(18); 190008-17.
- Ozaki, Y., T. Ukai, dan M. Yamaguchi. 2009. Locally administrated T cells from mice immunized with Lipopolysaccharide (LPS) accelerate LPS-induced bone resorption. *Bone*, **44**(6): 1169-76.
- Putri, R. H. 2015. "Daya Hambat Ekstrak etanol daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) terhadap pertumbuhan mikroba rongga mulut". *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.
- Putu, N. L. H. M. 2011. Probiotik Menurunkan Ekspresi TLR2 dan Aktifasi NF- κ B p50 pada Sel Mononuklear Darah Mencit yang Terpajan Lipopolisakarida E.Coli. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. **26**(3);136-144.
- Rathee, P., C. Hema, dan S. Rathee. 2009. Mechanism of action of Flavonoid as Anti-inflammatory Agents: A review. *Inflammation and allergy*, **8**: 229-235.
- Rizky, F. 2016. " Uji Sitotoksisitas Ekstrak Flavonoid Rendah Nikotin Limbah Daun Tembakau Kasturi (*Nicotiana tabacum* L) pada kultur sel fibroblast gingiva manusia". *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.
- Sabir, A. 2003. Pemanfaatan Flavonoid di Bidang Kedokteran Gigi. *Maj Ked Gigi (Dental Journal)*; Edisi khusus Temu ilmiah Nasional III: 81-7.
- Serafini, M., I. Peluso, dan A. Raguzzini. 2010. Antioxidants and the immune system Flavonoid as anti-inflammatory agents. *Proceedings of the nutrition society*, **69**: 273-278

- Steffen, M. J., S. C. Holt, dan J. L. Ebersole. 2000. Porphyromonas Gingivalis Induction Of Mediator and Cytokine Secretion by Human Gingival Fibroblast. *Oral Microbial Immunol*, **15**: 172-180.
- Sun, Y., R. Shu, M. Z. Zhang, dan A. P. Wu. 2008. Toll-Like Receptor 4 Signaling Plays A Role in Triggering Periodontal Infection. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **52**(3): 362-369.
- Susilowati, E. Y. 2006. "Identifikasi Nikotin dari Daun Tembakau (Nicotiana Tabacum) Kering dan Uji Efektivitas Ekstrak daun tembakau sebagai insektisida penggerak batang padi (scirpophaga innonata)". Skripsi. Semarang: Universitas Negeri Semarang.
- Takeda, K., dan S. Akira. 2005. Toll-Like Receptors in Innate Immunity. *Int. Immunol*, **17**(1): 1-14.
- Tominari, T., C. Matsumoto, K. Watanabe, H. Michiko, Florian MWC, M.Chisato, dan I. Masaki. 2015. Epigallocatechin gallate (EGCG) suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory bone resorption and protects against alveolar bone loss in mice. *FEBS Open Bio*, **5**: 522-527.
- Wang, P. L., dan K. Ohura. 2002. Porphyromonas Gingivalis Lipopolysaccharide Signaling in Gingival Fibroblasts CD14 and Toll Like Receptors. *Crit Rev Oral Biol Med*, **13**(2): 132-142.
- Wu, H., G. Zhao, K. Jiang, C. Li, C. Qiu, dan G. Dheng. 2016. Engeletin alleviates lipopolysaccharide- induce endometritis in mice by inhibiting TLR4-mediated NF- κ B activation. *Food Chem*, **64**(31): 6171-8.
- Xie, F., A. Yu, D. Hou, L. Huimin, Li D, dan Z. Shusheng. 2011. Rapid and Sensitive Analysis of Eight Polyphenols in Tobacco by Rapid Resolution Liquid Chromatogaph. *Analytical Chemistry*, **2**: 929-933.
- Zhang, D., L. Chen, S. Li, Z. Gu dan J. Yan. 2008. Lipopolysaccharide(LPS) of Porphyromonas Gingivalis Induced IL-1 β , TNF- α and IL-6 Production by THP-1 Cell Way Different from That of Escherichia coli LPS. *Innate Immunity*, **14**(2):99-107.

LAMPIRAN

A. Surat Keterangan Identifikasi Daun Tembakau (*Nicotiana Tabacum L.*)

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. 1209 /IPH.6/HM/IX/2015

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

drg. Agustin Wulan Suci D, MDSC NIP : 197908142008122003

Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, datang di UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi pada tanggal 10 September 2015, berdasarkan buku PROSEA (Plants Resources of South-East Asia) No 16; Stimulants, editor H.A.M. van der Vossen dan M. Wessel, tahun 2000, halaman 91 nama ilmiahnya adalah :

Genus : *Nicotiana*
Species : *Nicotiana tabacum L.*

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

Divisio : *Magnoliophyta*
Class : *Magnoliopsida*
Subclass : *Asteridae*
Ordo : *Solanales*
Family : *Solanaceae*

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

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



Deden Mudiarta, S.Hut, M.Si

B. Surat Keterangan *Ethical Clearance*

**UNIT ETIKA DAN ADVOKASI**
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS GADJAH MADA
Sekretariat: Fakultas Kedokteran Gigi UGM Jl. Denta Sekip Utara Yogyakarta
Telp. 081239447900

KETERANGAN KELAIKAN ETIK PENELITIAN
("ETHICAL CLEARANCE")
No.00968/KKEP/FGK-UGM/EC/2017

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

Judul : **PENGARUH EKSTRAK FLAVONOID DAUN TEMBAKAU KASTURI TERHADAP EKSPRESI *TOLL-LIKE RECEPTOR 4* PADA KULTUR SEL OSTEOLAS YANG DIPAPAR LIPOPOLISAKARIDA**

Peneliti Utama : Sani Sonia

Penanggung Jawab Medis : Dr. drg. Banun Kusumawardani, M.Kes

Unit/Lembaga : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Lokasi Penelitian : Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM

Waktu Penelitian : Januari 2017 – Selesai

Maka dengan ini menyatakan bahwa penelitian tersebut telah memenuhi syarat atau laik etik.

Yogyakarta, 30 Januari 2017

Wakil Dekan Bidang Akademik dan Kemahasiswaan Ketua Komisi Etik Penelitian FKG UGM


drg. Tetiana Haniastuti, M.Kes., Ph.D.


drg. Suryono, SH., M.M., Ph.D

C. Penghitungan Pengenceran Konsentrasi Ekstrak Flavonoid Limbah Daun Tembakau Kasturi (*Nicotiana Tabacum L.*)

a. Pengenceran Lipopolisakarida

$$\begin{aligned}V_1 \cdot N_1 &= V_2 \cdot N_2 \\13\text{ml} \cdot 20\mu\text{g/ml} &= V_2 \cdot 5000 \mu\text{g/ml} \\V_2 &= 52 \mu\text{l}\end{aligned}$$

kemudian ditambahkan 13 ml media kultur.

b. Pengenceran ekstrak flavonoid 640 $\mu\text{g/ml}$

$$\begin{aligned}V_1 \cdot N_1 &= V_2 \cdot N_2 \\4\text{ml} \cdot 1280 \mu\text{g/ml} &= V_2 \cdot 100.000 \mu\text{g/ml} \\V_2 &= 51,2 \text{ nl}\end{aligned}$$

kemudian ditambahkan 3,9488nl media kultur.

c. Pengenceran ekstrak flavonoid 40 $\mu\text{g/ml}$

$$\begin{aligned}V_1 \cdot N_1 &= V_2 \cdot N_2 \\4\text{ml} \cdot 80 \mu\text{g/ml} &= V_2 \cdot 100.000 \mu\text{g/ml} \\V_2 &= 3,2 \text{ nl}\end{aligned}$$

kemudian ditambahkan 3.996,8 nl media kultur.

d. Pengenceran ekstrak flavonoid 2,5 $\mu\text{g/ml}$

$$2,5 \mu\text{g/ml} \times 2 = 5 \mu\text{g/ml}$$

menggunakan perbandingan dengan kelompok flavonoid 80 $\mu\text{g/ml}$ maka 1 : 16, diambil 250 nl sampel 80 $\mu\text{g/ml}$ kemudian ditambahkan media kultur 3750nl.

D. Penghitungan Rerata Ekspresi Toll-Like Receptor 4 pada Kultur Sel Osteoblas yang Diberi Ekstrak Flavonoid Daun Tembakau Kasturi dan Dipapar Lipopolisakarida Selama 24 Jam dan 72 Jam.

D.1 Kelompok Paparan 24 Jam

A. Osteoblas tanpa paparan LPS

Lapang Pandang	Pengamat 1	Pengamat 2	Pengamat 3	Rata-Rata
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0

B. Osteoblas yang dipapar LPS

Lapang Pandang	Pengamat 1	Pengamat 2	Pengamat 3	Rata-Rata
1	20	15	12	16
2	16	15	15	15
3	18	15	16	16
4	16	17	12	15

C. Osteoblas yang diberi ekstrak flavonoid 640 μ g/ml dan dipapar LPS.

Lapang Pandang	Pengamat 1	Pengamat 2	Pengamat 3	Rata-Rata
1	4	4	6	5
2	5	5	7	6
3	5	5	6	6
4	5	5	5	5

D. Osteoblas yang diberi ekstrak flavonoid 40 μ g/ml dan dipapar LPS.

Lapang Pandang	Pengamat 1	Pengamat 2	Pengamat 3	Rata-Rata
1	11	11	11	11
2	13	12	12	12
3	12	11	14	12
4	8	6	8	7

E. Osteoblas yang diberi ekstrak flavonoid 2,5 μ g/ml dan dipapar LPS.

Lapang Pandang	Pengamat 1	Pengamat 2	Pengamat 3	Rata-Rata
1	11	9	8	9
2	17	12	14	14
3	18	11	13	14
4	8	8	9	8

D.2 Kelompok Paparan 72 Jam

A. Osteoblas tanpa paparan LPS

Lapang Pandang	Pengamat 1	Pengamat 2	Pengamat 3	Rata-Rata
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0

B. Osteoblas yang dipapar LPS

Lapang Pandang	Pengamat 1	Pengamat 2	Pengamat 3	Rata-Rata
1	16	16	17	16
2	15	14	15	15
3	16	17	15	16
4	16	16	15	16

C. Osteoblas yang diberi ekstrak flavonoid 640 μ g/ml dan dipapar LPS.

Lapang Pandang	Pengamat 1	Pengamat 2	Pengamat 3	Rata-Rata
1	0	0	1	0
2	4	4	6	5
3	2	1	2	2
4	4	5	6	5

D. Osteoblas yang diberi ekstrak flavonoid 40 μ g/ml dan dipapar LPS.

Lapang Pandang	Pengamat 1	Pengamat 2	Pengamat 3	Rata-Rata
1	13	6	8	9
2	10	8	8	9
3	3	3	4	3
4	0	4	3	2

E. Osteoblas yang diberi ekstrak flavonoid 2,5 μ g/ml dan dipapar LPS.

Lapang Pandang	Pengamat 1	Pengamat 2	Pengamat 3	Rata-Rata
1	10	6	7	8
2	12	10	9	10
3	5	4	6	5
4	5	5	7	6

E. Analisis Data

E.1 Hasil Uji *Kolmogorov-Smirnov*

a. Kelompok Paparan 24 Jam

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
Jumlah osteoblas		
N		40
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	17.1750
	Std. Deviation	10.33016
	Absolute	.232
Most Extreme Differences	Positive	.232
	Negative	-.119
Kolmogorov-Smirnov Z		1.466
Asymp. Sig. (2-tailed)		.027

b. Kelompok Paparan 72 Jam

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
Jumlah osteoblas		
N		40
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	17.1750
	Std. Deviation	10.33016
	Absolute	.232
Most Extreme Differences	Positive	.232
	Negative	-.119
Kolmogorov-Smirnov Z		1.466
Asymp. Sig. (2-tailed)		.027

E.2 Hasil Uji Homogenitas menggunakan *Levene Test*

a. Kelompok Paparan 24 Jam

Test of Homogeneity of Variances			
Jumlah sel osteoblas			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.307	4	35	.021

b. Kelompok Paparan 72 Jam

Test of Homogeneity of Variances			
Jumlah osteoblas			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.307	4	35	.021

E.3 Hasil Uji *Kruskal Wallis*

a. Kelompok Paparan 24 Jam

Test Statistics^{a,b}	
JUMLAHOSTEOBLAS1	
Chi-Square	25.871
df	4
Asymp. Sig.	.000

b. Kelompok Paparan 72 Jam

Test Statistics^{a,b}	
JUMLAHOSTEOBLAS1	
Chi-Square	23.096
df	3
Asymp. Sig.	.000

E.4 Hasil Uji *Mann-Whitney*

E.4.1 Osteoblas dengan Osteoblas dipapar LPS

a. Kelompok Paparan 24 Jam

Test Statistics^a	
JUMLAHOSTEOBLAS1	
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	36.000
Z	-3.378
Asymp. Sig. (2-tailed)	.001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 ^b

b. Kelompok Paparan 72 Jam

Test Statistics ^a	
	JUMLAHOSTEOBLAS1
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	36.000
Z	-3.378
Asymp. Sig. (2-tailed)	.001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 ^b

E.4.2 Osteoblas dengan Osteoblas yang Diberi Flavonoid konsentrasi 640 µg/ml

a. Kelompok Paparan 24 Jam

Test Statistics ^a	
	JUMLAHOSTEOBLAS1
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	36.000
Z	-3.373
Asymp. Sig. (2-tailed)	.001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 ^b

b. Kelompok Paparan 72 Jam

Test Statistics ^a	
	JUMLAHOSTEOBLAS1
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	36.000
Z	-3.373
Asymp. Sig. (2-tailed)	.001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 ^b

E.4.3 Osteoblas dengan Osteoblas yang diberi flavonoid konsentrasi 40 µg/ml

a. Kelompok Paparan 24 Jam

Test Statistics ^a	
	JUMLAHOSTEOBLAS1
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	36.000
Z	-3.366
Asymp. Sig. (2-tailed)	.001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 ^b

b. Kelompok Paparan 72 Jam

Test Statistics ^a	
	JUMLAHOSTEOBLAS1
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	36.000
Z	-3.366
Asymp. Sig. (2-tailed)	.001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 ^b

E.4.4 Osteoblas dengan Osteoblas yang diberi flavonoid konsentrasi 2,5 µg/ml

a. Kelompok Paparan 24 Jam

Test Statistics ^a	
	JUMLAHOSTEOBLAS1
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	36.000
Z	-3.368
Asymp. Sig. (2-tailed)	.001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 ^b

b. Kelompok Paparan 72 Jam

Test Statistics ^a	
	JUMLAHOSTEOBLAS1
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	36.000
Z	-3.368
Asymp. Sig. (2-tailed)	.001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 ^b

E.4.5 Osteoblas yang dipapar LPS dengan Osteoblas yang diberi flavonoid konsentrasi flavonoid 640 µg/ml.

a. Kelompok Paparan 24 Jam

Test Statistics ^a	
	JUMLAHOSTEOBLAS1
Mann-Whitney U	5.000
Wilcoxon W	41.000
Z	-2.872
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.003 ^b

b. Kelompok Paparan 72 Jam

Test Statistics ^a	
	JUMLAHOSTEOBLAS1
Mann-Whitney U	5.000
Wilcoxon W	41.000
Z	-2.872
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.003 ^b

E.4.6 Osteoblas yang dipapar LPS dengan Osteoblas yang diberi flavonoid konsentrasi flavonoid 40 µg/ml

a. Kelompok Paparan 24 Jam

Test Statistics ^a	
	JUMLAHOSTEOBLAS1
Mann-Whitney U	32.000
Wilcoxon W	68.000
Z	.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^b

b. Kelompok Paparan 72 Jam

Test Statistics ^a	
	JUMLAHOSTEOBLAS1
Mann-Whitney U	32.000
Wilcoxon W	68.000
Z	.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^b

E.4.7 Osteoblas yang dipapar LPS dengan Osteoblas yang diberi flavonoid konsentrasi flavonoid 2,5 µg/ml.

a. Kelompok Paparan 24 Jam

Test Statistics ^a	
	JUMLAHOSTEOBLAS1
Mann-Whitney U	27.000
Wilcoxon W	63.000
Z	-.533
Asymp. Sig. (2-tailed)	.594
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.645 ^b

b. Kelompok Paparan 72 Jam

Test Statistics ^a	
	JUMLAHOSTEOBLAS1
Mann-Whitney U	27.000
Wilcoxon W	63.000
Z	-.533
Asymp. Sig. (2-tailed)	.594
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.645 ^b

E.4.8 Osteoblas yang diberi flavonoid konsentrasi flavonoid 640 $\mu\text{g/ml}$ dan dipapar LPS 72 Jam dengan Osteoblas yang diberi flavonoid konsentrasi flavonoid 40 $\mu\text{g/ml}$.

a. Kelompok Paparan 24 Jam

Test Statistics ^a	
	JUMLAHOSTEOBLAS1
Mann-Whitney U	8.500
Wilcoxon W	44.500
Z	-2.484
Asymp. Sig. (2-tailed)	.013
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.010 ^b

b. Kelompok Paparan 72 Jam

Test Statistics ^a	
	JUMLAHOSTEOBLAS1
Mann-Whitney U	8.500
Wilcoxon W	44.500
Z	-2.484
Asymp. Sig. (2-tailed)	.013
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.010 ^b

E.4.9 Osteoblas yang diberi flavonoid konsentrasi flavonoid 640 $\mu\text{g/ml}$ dan dipapar LPS 72 Jam dengan Osteoblas yang diberi flavonoid konsentrasi flavonoid 2,5 $\mu\text{g/ml}$.

a. Kelompok Paparan 24 Jam

Test Statistics ^a	
	JUMLAHOSTEOBLAS1
Mann-Whitney U	7.000
Wilcoxon W	43.000
Z	-2.643
Asymp. Sig. (2-tailed)	.008
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.007 ^b

b. Kelompok Paparan 72 Jam

Test Statistics ^a	
	JUMLAHOSTEOBLAS1
Mann-Whitney U	7.000
Wilcoxon W	43.000
Z	-2.643
Asymp. Sig. (2-tailed)	.008
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.007 ^b

E.4.10 Osteoblas yang diberi flavonoid konsentrasi flavonoid 640 $\mu\text{g/ml}$ dan dipapar LPS 72 Jam dengan Osteoblas yang diberi flavonoid konsentrasi flavonoid 2,5 $\mu\text{g/ml}$.

a. Kelompok Paparan 24 Jam

Test Statistics ^a	
	JUMLAHOSTEOBLAS1
Mann-Whitney U	31.500
Wilcoxon W	67.500
Z	-.053
Asymp. Sig. (2-tailed)	.958
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.959 ^b

b. Kelompok Paparan 72 Jam

Test Statistics ^a	
JUMLAHOSTEOBLAS1	
Mann-Whitney U	31.500
Wilcoxon W	67.500
Z	-.053
Asymp. Sig. (2-tailed)	.958
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.959 ^b

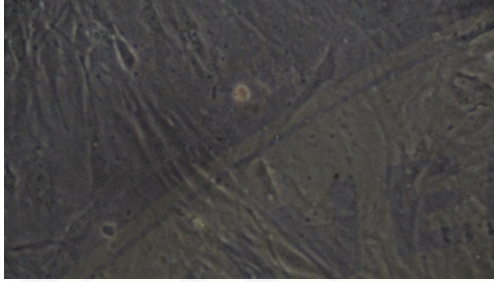
E.5 Hasil Uji t-Test

One-Sample Test
Test Value = 0

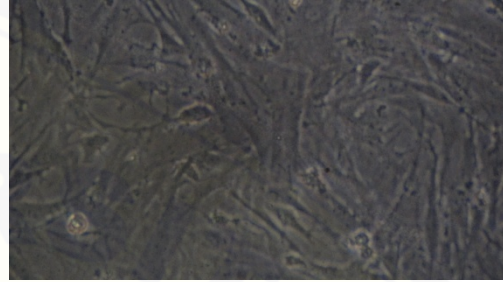
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
JUMLAH OSTEOLAS	12.145	79	.000	15.86250	13.2627	18.4623

F. Gambar Kultur Sel Osteoblas

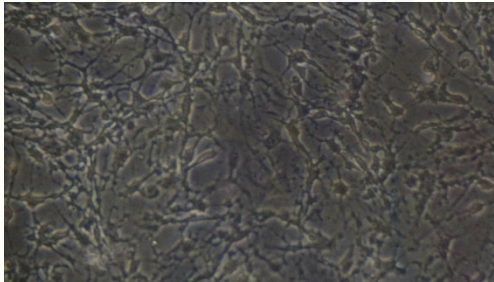
a. Kelompok 24 Jam



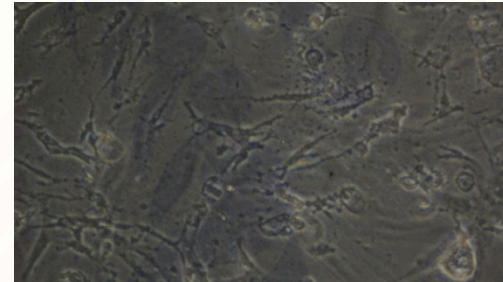
Kelompok O



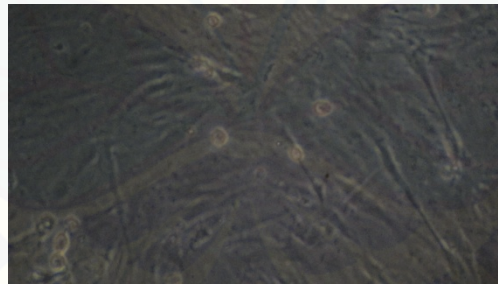
Kelompok OL



Kelompok OLF1

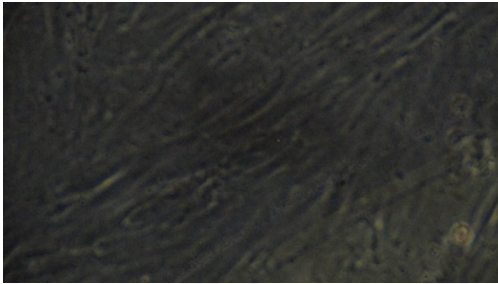


Kelompok OLF2

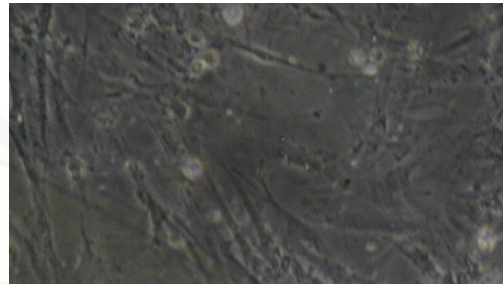


Kelompok OLF3

b. Kelompok 72 Jam



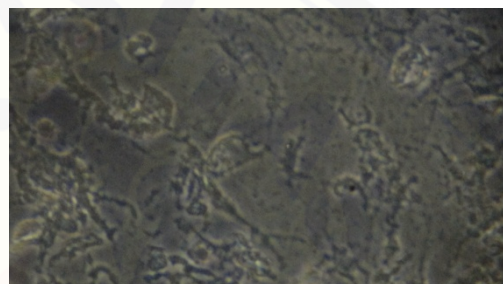
Kelompok O



Kelompok OL



Kelompok OLF1






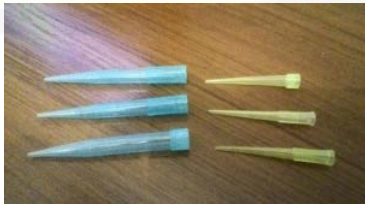




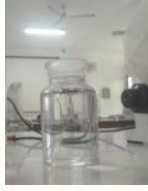

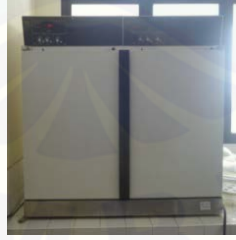

Kelompok OLF2


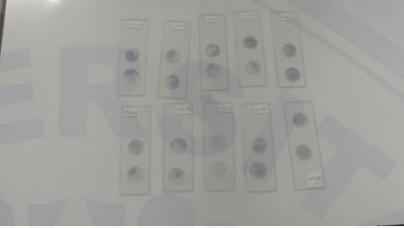










Kelompok OLF3

G. Bahan dan Alat Penelitian

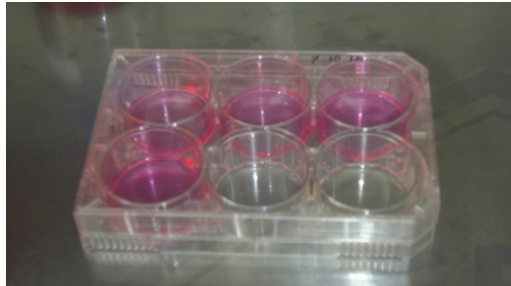
Bahan dan Alat	Keterangan
Timbangan	
Conical tube	
Mikropipet	
Rak Eppendorf	
Eppendorf	
Blue dan Yellow tip	

<p>Pinset</p>	
<p>Petridish</p>	
<p>Bekker glass</p>	
<p>Pipet</p>	
<p>Inkubator</p>	
<p>Mikroskop inverted</p>	

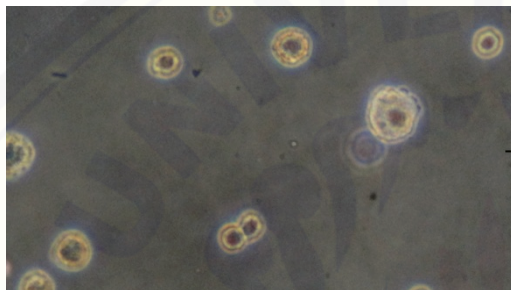
<p>24-Mikrowell Plate</p>	
<p>Object glass</p>	
<p>DAB Chromogen</p>	
<p>DAB Substrat Buffer</p>	
<p>Lem Entellan</p>	

<p>Streptavidin</p>	
<p>Larutan PBS</p>	
<p>Media Kultur</p>	
<p>Antibodi Primer</p>	
<p>Mayer's hematoxylin</p>	

H. Prosedur Penelitian



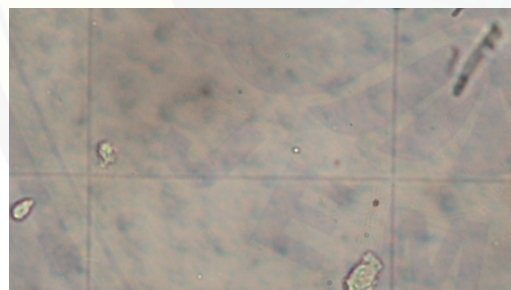
Panen sel



Sel osteoblas yang ada di media panen



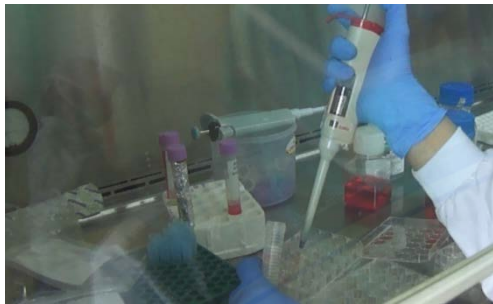
Sel yang sudah di transfer ke conical tube, dimasukkan kedalam kamar hitung



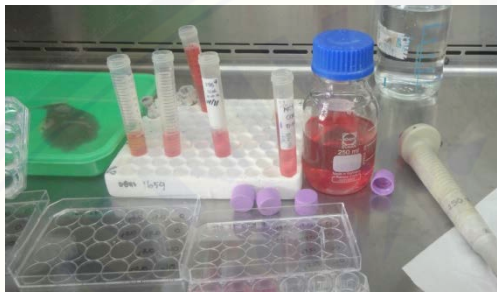
Sel osteoblas yang terhitung dikamar hitung.



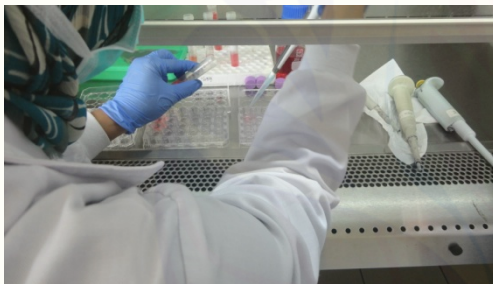
Coverslip dimasukkan ke dalam microwell plate untuk perlekatan sel.



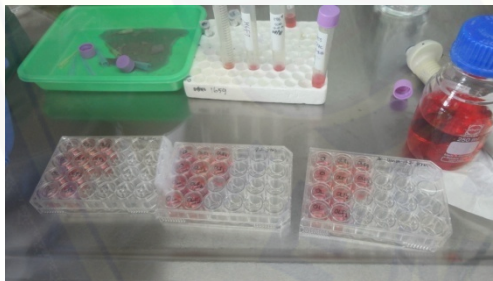
Sel osteoblas dimasukkan ke dalam 24 *microwell plate* yang dasarnya telah diberi coverslip.



Dilakukan pengenceran LPS dan ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi.



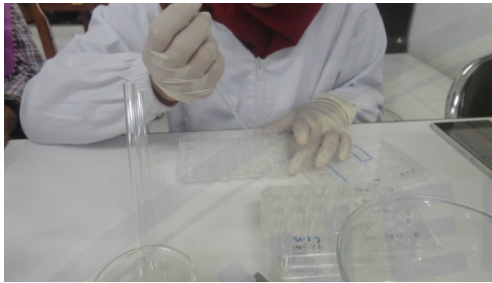
Dilakukan perlakuan pada osteoblast sesuai kelompok perlakuan.



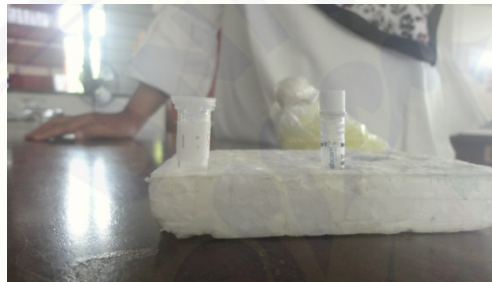
Sel selesai dilakukan perlakuan, diinkubasi selama 24 jam dan 72 jam.



Sel dilakukan fiksasi menggunakan methanol, sel diberi aquades 10 menit.



Dicuci menggunakan PBS
tiga kali.



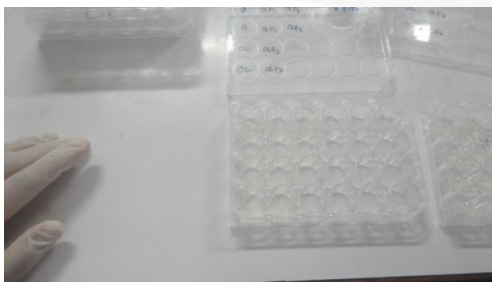
Dilakukan pengenceran
antibodi primer.



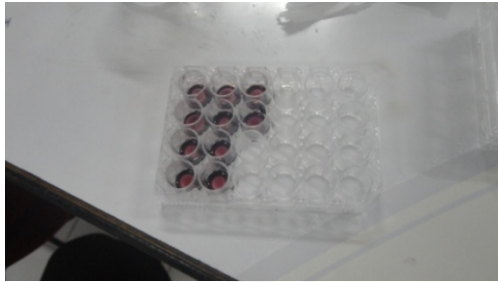
Diberi antibodi primer
kemudian diinkubasi
semalaman.



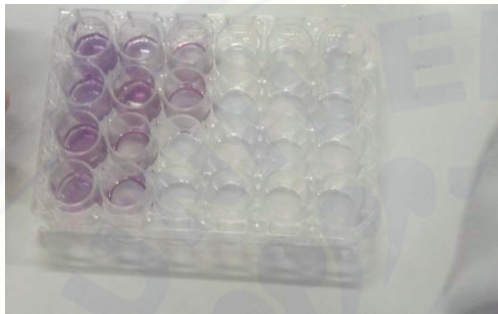
Diberi Antibodi Sekunder
Biotinilated



Diberi Antibodi Sekunder
Streptavidin



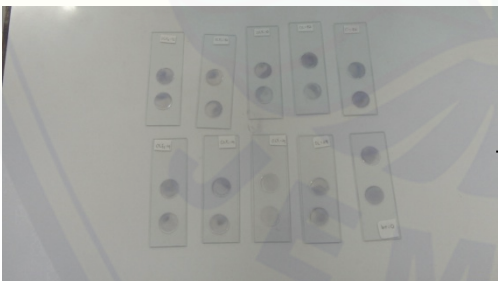
Diberi *Mayer's hematoxylin*
Satu tetes



Direndam Aquades sepuluh
menit



Coverslip dikeluarkan dari
microwellplate lalu
dikeringkan



Coverslip diletakkan pada
object glass yang telah
diberi lem entellan.