



**ANALISIS ANTIINFLAMASI GEL FLAVONOID DAUN
TEMPAKAU KASTURI PADA MODEL TIKUS
PERIODONTITIS**

SKRIPSI

Oleh

**Radityo Indra Winarno
NIM 151610101028**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2020**



**ANALISIS ANTIINFLAMASI GEL FLAVONOID DAUN
TEBAKAU KASTURI PADA MODEL TIKUS
PERIODONTITIS**

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

**Radityo Indra Winarno
NIM 151610101028**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2020**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT, atas segala limpahan karunia dan rahmat-Nya yang teramat besar;
2. Nabi Muhammad SAW, atas segala tuntunan dan kasihnya kepada seluruh umatnya;
3. Ayahanda Anang Tri Winarno dan Ibunda RA Kus Indarti atas doa dan dukungannya;
4. Keluarga besar saya atas doa dan dukungannya;
5. Dosen pembimbing dan dosen penguji atas dukungannya;
6. Guru-guruku sejak bangku taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi, terima kasih telah membimbing dan memberi ilmu;
7. Teman-teman angkatan 2015, yang telah berjuang bersama-sama di almamater tercinta ini;
8. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang selalu saya banggakan;

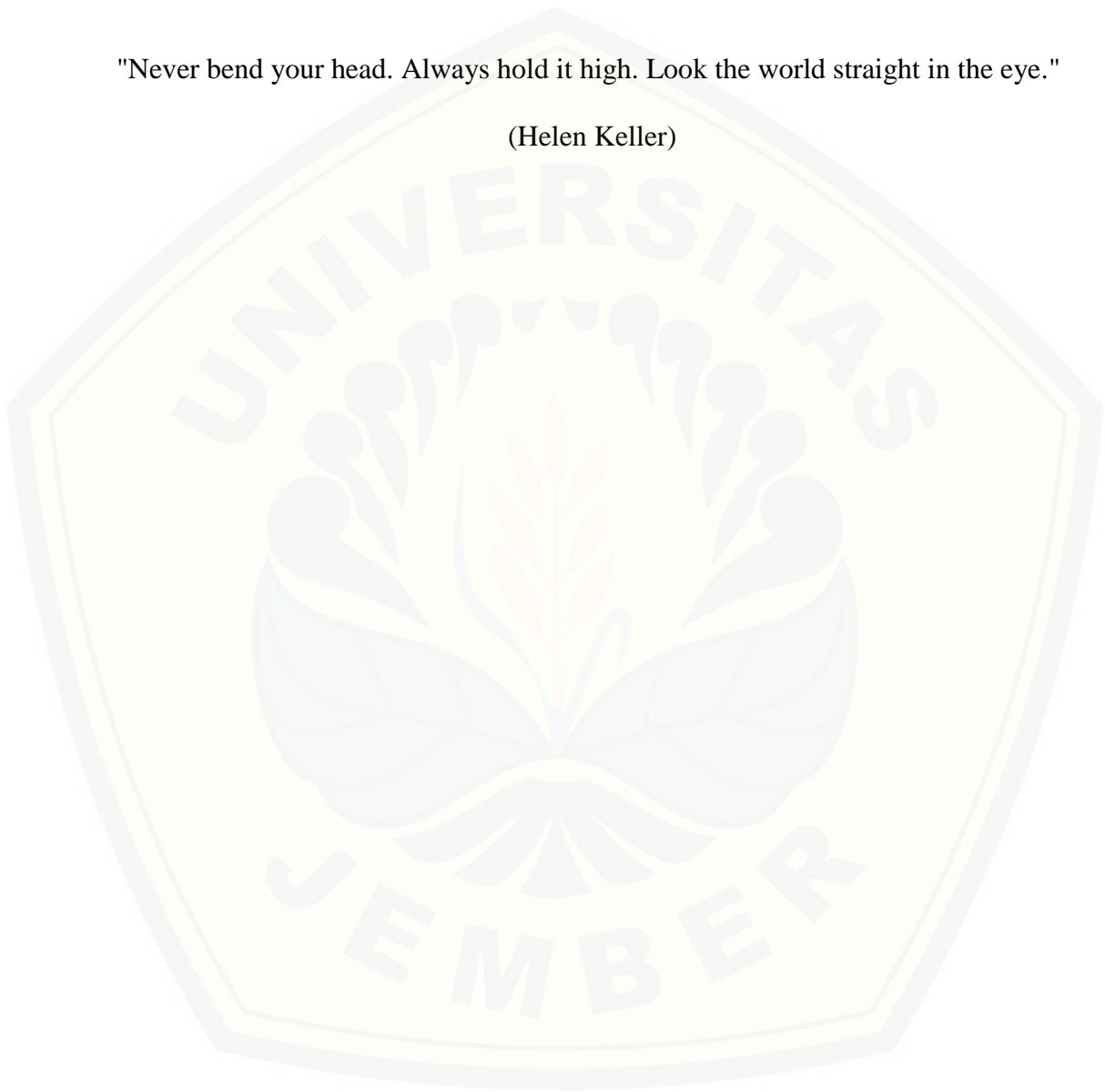
MOTTO

“Janganlah kamu berduka cita, sesungguhnya Allah selalu bersama kita.”

(Q.S At-Taubah: 40)

"Never bend your head. Always hold it high. Look the world straight in the eye."

(Helen Keller)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Radityo Indra Winarno

NIM : 151610101028

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya tulis yang berjudul “Analisis Antiinflamasi Gel Flavonoid Daun Tembakau Kasturi pada Model Tikus Periodontitis” adalah benar-benar karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan hasil karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan saya tidak benar.

Jember, 5 Juli 2020

Yang menyatakan,

Radityo Indra Winarno
NIM 151610101028

SKRIPSI

**ANALISIS ANTIINFLAMASI GEL FLAVONOID DAUN TEMBAKAU
KASTURI PADA MODEL TIKUS PERIODONTITIS**

Oleh

Radityo Indra Winarno

NIM 151610101028

Pembimbing:

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

Dosen Pembimbing Pendamping : Dr. drg. I Dewa Ayu Susilawati, M.Kes

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Analisis Antiinflamasi Gel Flavonoid Daun Tembakau Kasturi pada Model Tikus Periodontitis” telah diuji dan disahkan pada:

Hari, tanggal : Rabu, 1 Juli 2020

Tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Penguji Ketua,

Penguji Anggota,

Drg. Budi Yuwono, M.Kes
NIP 196709141999031002

Prof. drg. Mei Syafriadi, MDSc., PhD., Sp.PMM (k)
NIP 196805291994031003

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,

Dr. drg. Banun Kusumawardani, M.Kes
NIP 197005091999032001

Dr. drg. I Dewa Ayu Susilawati, M.Kes
NIP 196109031986022001

Mengesahkan

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi

Universitas Jember,

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

RINGKASAN

Analisis Antiinflamasi Gel Flavonoid Daun Tembakau Kasturi pada Model Tikus Periodontitis; Radityo Indra Winarno, 151610101028; 2020; 106 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Tembakau merupakan salah satu komoditas perkebunan terbesar di Kabupaten Jember yang mempunyai banyak kandungan kimia salah satunya flavonoid. Flavonoid mempunyai efek antiinflamasi salah satunya dengan menurunkan ekspresi TNF- α . TNF- α merupakan sitokin proinflamasi utama pada proses destruksi tulang yang merupakan salah satu tanda dari penyakit periodontitis. *Porphyromonas gingivalis* merupakan mikroorganisme utama yang berperan penting dalam periodontitis dengan memproduksi lipopolisakarida. TLR-4 merupakan reseptor utama untuk lipopolisakarida. Interaksi TLR-4 dengan lipopolisakarida akan memicu ekspresi dari sitokin proinflamasi seperti TNF- α . Terapi penunjang perawatan periodontal menggunakan bahan kimiawi diaplikasikan secara topikal pada permukaan gingiva salah satunya dalam bentuk gel. Penggunaan obat kimia jangka panjang dapat menimbulkan efek samping bagi tubuh sehingga diperlukan bahan alternatif yang lebih aman dan alami. Tujuan penelitian ini ialah untuk menganalisis gel flavonoid daun tembakau kasturi sebagai antiinflamasi terhadap sel inflamasi yang mengekspresikan TNF- α pada model tikus periodontitis. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan pengetahuan mengenai pengaruh gel flavonoid daun tembakau kasturi terhadap sel inflamasi yang mengekspresikan TNF- α pada model tikus periodontitis, dapat dimanfaatkan untuk mengembangkan gel flavonoid daun tembakau kasturi sebagai obat antiinflamasi pada penyakit periodontitis.

Jenis penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental laboratoris. Sampel yang digunakan yaitu tikus *sprague dawley* dengan jenis kelamin jantan sebanyak 105 ekor dengan berat badan 200-250 gram. Pemaparan lipopolisakarida selama 14 hari dengan injeksi di bagian palatal gigi molar pertama kiri agar hewan tersebut mengalami kondisi periodontitis. Gel flavonoid daun tembakau kasturi dengan konsentrasi 640 $\mu\text{g/ml}$, 320 $\mu\text{g/ml}$, 160 $\mu\text{g/ml}$, 80 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$ diberikan secara topikal yang diberikan selama 1 hari, 3 hari, 7 hari, 14

hari dan 21 hari. Setelah dilakukan pemrosesan jaringan dilakukan pewarnaan menggunakan imunohistokimia dan diamati secara manual yaitu menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x dengan 3 lapang pandang dimana menunjukkan ekspresi TNF-*a* yang positif ditandai dengan warna kecoklatan pada sel inflamasi, setelah itu dilakukan analisis data dengan uji normalitas, uji homogenitas, uji MANOVA dan uji *Games-Howell*.

Hasil penelitian pada model tikus periodontitis yang diberi gel flavonoid menunjukkan adanya pengaruh yang signifikan pada sel inflamasi yang mengekspresikan TNF-*a* pada kelompok 1, kelompok 2 dan kelompok 6. Hasil penelitian juga menunjukkan terdapat pengaruh yang signifikan kelompok konsentrasi terhadap semua waktu paparan. Kelompok dengan pemberian gel flavonoid memiliki jumlah sel inflamasi yang mengekspresikan TNF-*a* yang lebih rendah daripada kelompok tanpa pemberian gel flavonoid daun tembakau kasturi. Penurunan jumlah sel inflamasi yang mengekspresikan TNF-*a* terjadi pada hari ke-1, ke-3, ke-7, ke-14 dan semakin menurun pada hari ke-21.

Kesimpulan pada penelitian ini adalah gel flavonoid daun tembakau kasturi dapat berpengaruh terhadap sel inflamasi yang mengekspresikan TNF-*a*. Semakin tinggi konsentrasi gel flavonoid daun tembakau kasturi, maka semakin rendah sel inflamasi yang mengekspresikan TNF-*a*.

Saran yang dapat diberikan yaitu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai besar ekspresi TNF-*a* yang dikeluarkan akibat pemberian gel flavonoid daun tembakau kasturi dan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh gel flavonoid terhadap ekspresi sitokin selain TNF-*a*.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Analisis Antiinflamasi Gel Flavonoid Daun Tembakau Kasturi pada Model Tikus Periodontitis”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

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

1. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Prost, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
2. Dr. drg. Banun Kusumawardani, M.Kes dan Dr. drg. I Dewa Ayu Susilawati, M.Kes, selaku Dosen Pembimbing Utama dan Dosen Pembimbing Pendamping yang telah meluangkan waktu, pikiran, perhatian, dan kesabaran selama penyusunan skripsi ini;
3. drg. Budi Yuwono, M.Kes dan Prof. drg. Mei Syafriadi, MDSc., PhD., Sp.PMM (k) selaku Dosen Penguji Ketua dan Dosen Penguji Anggota yang telah bersedia menguji dan memberikan masukan hingga terselesaikannya skripsi ini;
4. drg. Dwi Kartika Apriyono, M.Kes, selaku Dosen Pembimbing Akademik yang selalu memberikan bimbingan dan motivasi kepada penulis selama menjadi mahasiswa;
5. Ayahanda Anang Tri Winarno dan Ibunda RA. Kus Indarti atas doa dan dukungannya;
6. Keluarga besar atas doa dan dukungannya;
7. Devina Yulia Putri yang selalu memberikan doa, bantuan dan dukungannya;
8. Seluruh staf di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang membantu dalam penyelesaian administrasi penulisan skripsi ini;
9. Pak Bagus selaku teknisi Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Jember, Bu Itus selaku teknisi Laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Jember, yang telah banyak membantu selama penelitian berlangsung;

10. Teman sejawat sejak SMA, Wenny Agestin, Agis Dwi Aprili, Fiona Budi Amarta Domini, Ibana Rabbiatul, Alodia Geralda, Luaily Rizqon atas dukungan dan semangatnya;
11. Teman-teman sejawat yang sudah satu per satu membantu saya, mulai dari Dani Agam, Reizy Abdillah, Moch. Bahrul Ulum, I Putu Swastikawan, dan lain-lain.
12. Teman-teman seperjuangan FKG Universitas Jember angkatan 2015. Terima kasih atas kebersamaan, dukungan, dan doa kalian selama ini;
13. Semua pihak yang telah membantu baik moril, materiil, serta memberikan kritik dan saran selama penyusunan skripsi ini yang tidak bisa disebutkan satu per satu;

Karya ini masih jauh dari sempurna, untuk ini penulis mengharapkan saran dan kritikan dari berbagai pihak sehingga skripsi ini dapat menjadi lebih baik. Akhirnya penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan kontribusi lebih untuk kemajuan ilmu pengetahuan di masa yang akan datang

Jember, 5 Juli 2020

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PEMBIMBING	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
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	5
2.1.1 Morfologi Daun Tembakau	5
2.2 Tembakau Kasturi	6
2.2.1 Kandungan Daun Tembakau Kasturi	7
2.3 Flavonoid	8
2.4 Periodontitis	9
2.5 Lipopolisakarida.....	10
2.6 Mekanisme Respon Imun pada Periodontitis.....	13
2.7 TNF-α.....	14
2.8 Sel Inflamasi.....	17
2.8.1 Neutrofil.....	17

2.8.2	Limfosit.....	18
2.8.3	Makrofag.....	19
2.9	Pengaruh Flavonoid sebagai Antiinflamasi	19
2.10	Imunohistokimia.....	20
2.10.1	Antibodi.....	21
2.10.2	Kromogen.....	22
2.10.3	<i>Counterstain</i>	23
2.11	Kerangka Konseptual	24
2.12	Hipotesis	24
BAB 3.	METODE PENELITIAN.....	25
3.1	Jenis Penelitian	25
3.2	Rancangan Penelitian.....	25
3.3	Tempat Penelitian.....	25
3.4	Waktu Penelitian	26
3.5	Populasi dan Sampel Penelitian	26
3.5.1	Populasi Penelitian	26
3.5.2	Kriteria dan Sampel Penelitian.....	26
3.5.3	Besar Sampel.....	26
3.6	Variabel Penelitian	27
3.6.1	Variabel Bebas	27
3.6.2	Variabel Terkait.....	27
3.6.3	Variabel Terkendali.....	27
3.7	Definisi Operasional.....	27
3.7.1	Flavonoid.....	27
3.7.2	Tikus Periodontitis	27
3.7.3	Ekspresi TNF- α	28
3.8	Pengelompokan Sampel Penelitian.....	28
3.9	Alat dan Bahan Penelitian.....	29
3.9.1	Alat Penelitian	29
3.9.2	Bahan Penelitian.....	30
3.10	Prosedur Penelitian	31

3.10.1 Tahap Persiapan	31
3.10.2 Prosedur Ekstraksi Flavonoid Bebas Nikotin Daun Tembakau kasturi	32
3.10.3 Prosedur Pembuatan Gel Flavonoid Daun Tembakau Kasturi Bebas Nikotin	33
3.10.4 Persiapan Hewan Coba.....	33
3.10.5 Pemaparan LPS <i>P. gingivalis</i> Pada Tikus Sprague Dawley.....	33
3.10.6 <i>Euthanasia</i> Hewan Coba.....	33
3.10.7 Pengambilan Sampel Sediaan	34
3.10.8 Proses Pembuatan Sediaan dan Pemeriksaan Imunohistokimia.....	35
3.11 Analisis Data	37
3.12 Alur Penelitian.....	38
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	39
4.1 Hasil Penelitian	39
4.2 Analisis Data	43
4.2.1 Uji Normalitas dan Uji Homogenitas	43
4.2.2 Uji <i>Multivariate Anova</i> dan <i>Bonferroni</i>	43
4.3 Pembahasan	44
BAB 5. PENUTUP	48
5.1 Kesimpulan.....	48
5.2 Saran.....	48
DAFTAR PUSTAKA.....	49
LAMPIRAN.....	59

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Karakteristik Tembakau Kasturi 1 dan Kasturi 2	7
Tabel 4.1 Hasil perhitungan rata-rata jumlah sel inflamasi yang mengekspresikan TNF- α pada model tikus periodontitis setelah diberi gel flavonoid daun tembakau kasturi	41



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tanaman tembakau dan klasifikasi daun tembakau berdasarkan letak daun pada batang.....	6
Gambar 2.2 Tembakau Kasturi 1 dan 2	7
Gambar 2.3 Struktur umum flavonoid	8
Gambar 2.4 Struktur golongan flavonoid.....	8
Gambar 2.5 Ekspresi <i>Toll-Like Receptor</i> pada jaringan periodontal	12
Gambar 2.6 Sinyal Transduksi <i>Toll-Like Receptor 4</i>	13
Gambar 2.7 Skema sistem imun pada periodontitis.....	14
Gambar 2.8 Mekanisme TNF- <i>a</i> terhadap Periodontitis	16
Gambar 2.9 Sel Neutrofil	18
Gambar 2.10 Sel Limfosit.....	19
Gambar 2.11 Sel Makrofag.....	19
Gambar 4.1 Gambaran histologis gigi molar tikus dengan perbesaran 40x (gambar A) dan perbesaran 1000x (gambar B).....	40
Gambar 4.2 Diagram batang jumlah rata-rata sel inflamasi yang mengekspresikan TNF- <i>a</i> pada hari ke-1, 3, 7, 14, 21 pada model tikus periodontitis setelah diberi gel flavonoid daun tembakau kasturi.....	42

DAFTAR LAMPIRAN

1. Alat dan Bahan Penelitian.....	59
1.1 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Gel Flavonoid Daun Tembakau Kasturi dan Metronidazole.....	59
1.2 Alat dan Bahan Hewan Coba dan Dekalsifikasi Jaringan.....	60
1.3 Alat dan Bahan Pemrosesan Jaringan dan Pembuatan Parafin Blok.....	61
1.4 Alat dan Bahan Pembuatan Preparat.....	61
1.5 Alat dan Bahan Pewarnaan Jaringan dan Pengamatan Preparat Jaringan	62
1.6 Gambaran Radiografi Tikus Periodontitis	64
2. Rata-rata Jumlah Sel Inflamasi yang Mengekspresikan TNF- α	65
3. Analisis Data.....	70
3.1 Uji Normalitas <i>Kolmogorov-Smirnov</i>	70
3.2 Uji Homogenitas <i>Levene</i>	70
3.3 Uji <i>Multivariate Anova (MANOVA)</i>	71
3.4 Uji <i>Games-Howell</i>	71
4. Hasil Gambar Preparat Histologi	75
5. Sertifikat <i>Ethical Clearance</i>	99
6. Surat Identifikasi Tumbuhan	100
7. Surat Pemakaian Lipopolisakarida	101
8. Katalog LPS <i>P.gingivalis</i> Sigma-Aldrich SMB00610.....	102
9. Katalog TNF-alpha ABBIOTEC Cat. No.: 251690.....	103
10. Surat Izin Penelitian	104

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Periodontitis merupakan penyakit peradangan kronis yang menyebabkan kerusakan progresif pada ligamen periodontal dan tulang alveolar sehingga dapat mengakibatkan kehilangan gigi (Newman *et al.*, 2015). Salah satu bakteri patogen utama yang menyebabkan penyakit periodontal adalah *Porphyromonas gingivalis* (Hajishengallis *et al.*, 2012). *Porphyromonas gingivalis* merupakan bakteri Gram-negatif yang berperan penting dalam virulensi biofilm dan inflamasi jaringan (Hajishengallis *et al.*, 2011; Andriani, 2012). *Porphyromonas gingivalis* memproduksi beberapa faktor virulensi sehingga dapat menyerang jaringan periodontal seperti ekstraseluler protease, fimbriae dan lipopolisakarida (Yilmaz, 2008).

Lipopolisakarida merupakan komponen terbesar dari membran luar bakteri Gram-negatif, yang dikenal sebagai *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) (Nijland, 2014). Lipopolisakarida merupakan salah satu faktor yang terlibat dalam inflamasi dan kerusakan tulang (Ozaki *et al.*, 2009). TLR merupakan *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) yang mengenali molekul dari mikroorganisme pada sistem imun (Gumus, 2016). Banyak PAMPs telah diketahui dapat berinteraksi dengan TLR. Salah satunya yaitu TLR-4 yang dapat mengenali lipopolisakarida (Lu *et al.*, 2008). Interaksi TLR dengan PAMPs dapat memicu ekspresi dari sitokin proinflamasi seperti TNF- α pada sistem imun (Lu *et al.*, 2008). Neutrofil, limfosit, dan makrofag akan mengekspresikan mediator kimia seperti sitokin TNF- α (Roudsari *et al.*, 2009). TNF- α merupakan sitokin utama pada respon inflamasi terhadap bakteri gram negatif dan mikroba lainnya. TNF- α disintesis sebagai tipe II protein polipeptida transmembran dengan 233 *amino acid residues* (26 kDa) pada permukaan luar atau diproses untuk melepaskan 17-kD dalam bentuk terlarut (Horiuchi *et al.*, 2010). TNF- α merupakan sitokin proinflamasi utama pada proses destruksi tulang. TNF- α menyebabkan destruksi tulang dengan cara bekerja secara langsung dalam diferensiasi dan maturasi osteoklas (Kuczkowski *et al.*, 2011).

Terapi penunjang perawatan periodontal menggunakan bahan kimiawi diaplikasikan secara topikal pada permukaan gingiva salah satunya dalam bentuk gel. 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).

Penelitian yang telah dilakukan oleh 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) dan aksi antibakteri flavonoid rendah nikotin daun tembakau kasturi jauh lebih baik dibandingkan metronidazole (obat antimikroba). Penelitian pendahuluan yang dilakukan Sonia (2017) menunjukkan bahwa ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi dengan konsentrasi 2,5 µg/ml, 40 µg/ml dan 640 µg/ml dapat menghambat ekspresi TLR-4 yang distimulasi oleh lipopolisakarida.

Tembakau (*Nicotiana tabaccum L.*) merupakan komoditi unggulan Kabupaten Jember. Menurut Badan Pusat Statistik tahun 2015 menunjukkan tingkat produksi tembakau di Kabupaten Jember sebesar 18.511 ton. Tembakau jenis Kasturi merupakan jenis tembakau yang banyak dibudidayakan di daerah Jember dan Bondowoso (Jawa Timur) (Soekarno, 2008). Daun tembakau secara umum hanya dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan rokok akan tetapi daun tembakau juga memiliki kandungan bahan aktif yang bermanfaat (Taiga dan Friday, 2009; Bakht *et al.*, 2012). Salah satu bahan aktif yang bermanfaat yaitu flavonoid. Komposisi flavonoid daun tembakau antara lain apigenin, quercetin, dan rutin sekitar 1,5%, 0,5%, dan 0,6% (Fathiazad *et al.*, 2006).

Flavonoid merupakan metabolit sekunder yang memiliki senyawa polifenol dan terdapat dalam hampir semua tumbuhan (Panche *et al.*, 2016). Flavonoid memiliki aktivitas biologis sebagai antiinflamasi (Kumar *et al.*, 2013), aktivitas

antioksidan, antibakteri, antijamur, inhibisi enzim, aktivitas antialergi, dan aktivitas antitumor sitotoksik (Sari dan Shofi, 2011; Lipinski, 2011). Menurut penelitian yang dilakukan Jantrawut *et al.* (2017) bahwa kandungan flavonoid dapat menurunkan sekresi TNF- α . Menurut penelitian yang dilakukan oleh Halim *et al.* (2015) bahwa ekstrak *Nannochloropsis oculata* yang mengandung flavonoid mampu menurunkan kadar TNF- α pada tikus yang diinduksi bakteri *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* penyebab periodontitis. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Meilawaty dan Kusumawardani (2016) bahwa ekstrak flavonoid daun singkong dapat menurunkan ekspresi TNF- α .

Penelitian mengenai analisis gel flavonoid daun tembakau kasturi sebagai antiinflamasi terhadap sel inflamasi yang mengekspresikan TNF- α pada model tikus periodontitis belum pernah dilakukan. Berdasarkan latar belakang tersebut, penulis ingin meneliti analisis gel flavonoid daun tembakau kasturi sebagai antiinflamasi terhadap sel inflamasi yang mengekspresikan TNF- α pada model tikus periodontitis. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dimanfaatkan dan dikembangkan sebagai acuan bahan dasar pembuatan gel periodontal yang memiliki efek antiinflamasi.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, didapatkan rumusan masalah yaitu apakah gel flavonoid daun tembakau kasturi sebagai antiinflamasi berpengaruh terhadap sel inflamasi yang mengekspresikan TNF- α pada model tikus periodontitis?

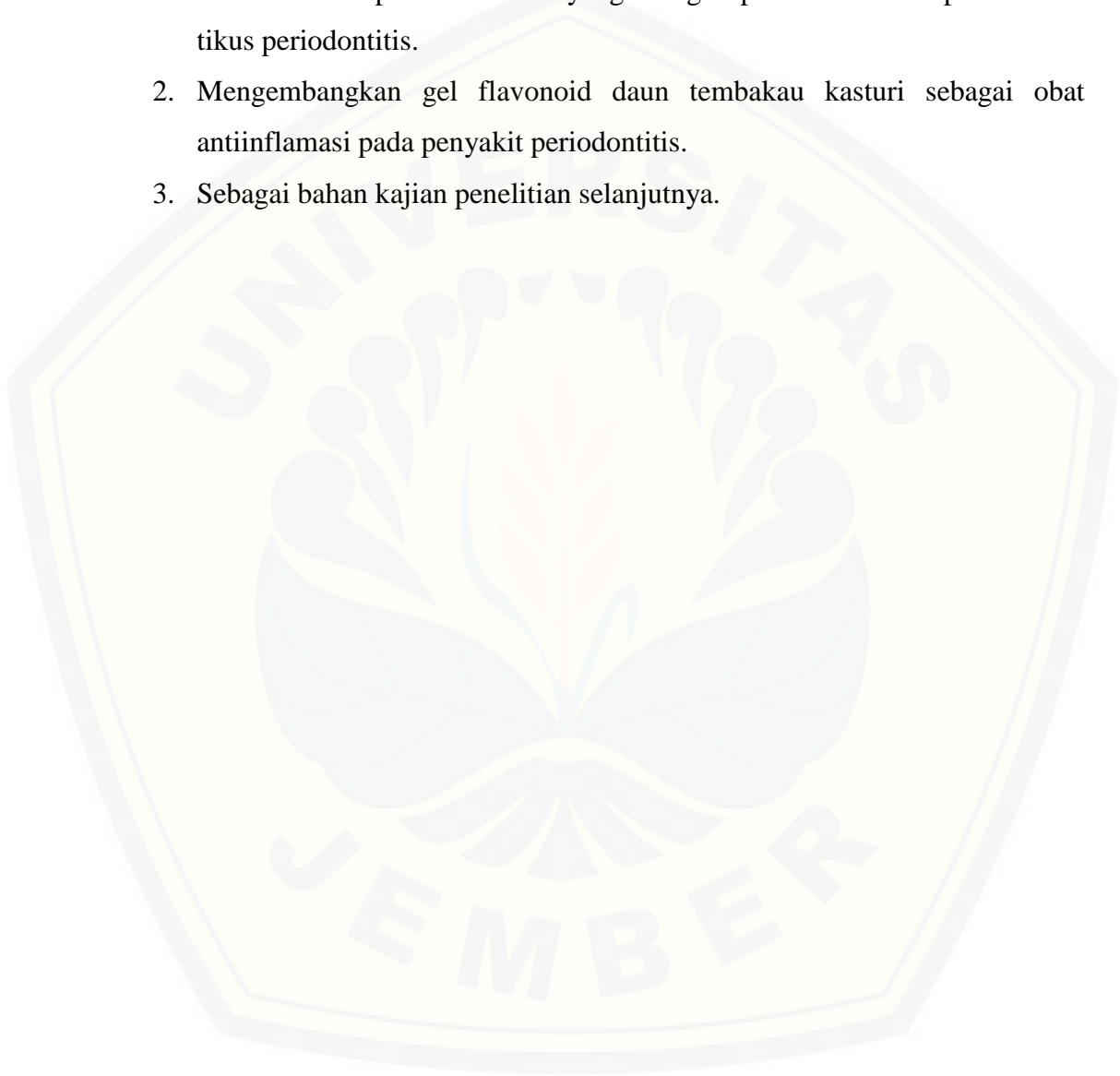
1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini ialah untuk menganalisis gel flavonoid daun tembakau kasturi sebagai antiinflamasi terhadap sel inflamasi yang mengekspresikan TNF- α pada model tikus periodontitis

1.4 Manfaat Penelitian

Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat sebagai berikut :

1. Memberikan pengetahuan mengenai pengaruh gel flavonoid daun tembakau kasturi terhadap sel inflamasi yang mengekspresikan TNF- α pada model tikus periodontitis.
2. Mengembangkan gel flavonoid daun tembakau kasturi sebagai obat antiinflamasi pada penyakit periodontitis.
3. Sebagai bahan kajian penelitian selanjutnya.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tembakau

Tembakau adalah tanaman perkebunan yang tidak termasuk dalam kelompok tanaman pangan. Pemanfaatan tembakau di Indonesia masih terkonsentrasi pada industri rokok dan cerutu (Ardhiarisca *et al.*, 2015).

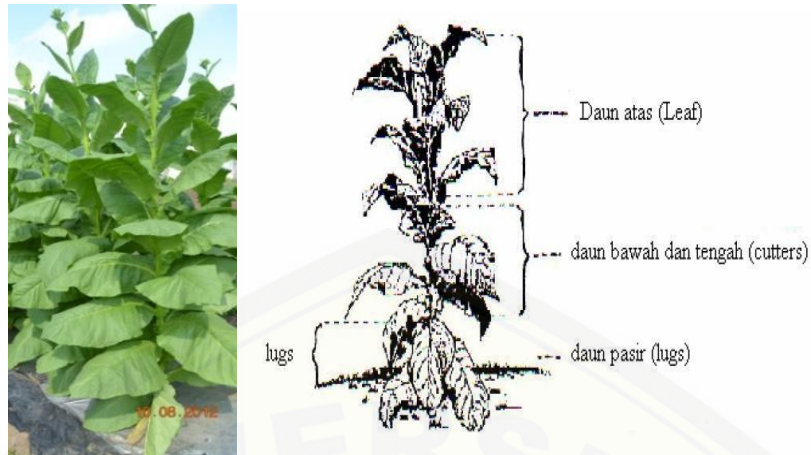
Berdasarkan Surat Keterangan Identifikasi UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi No. 1304/IPH.6/HM/IX/2015, menerangkan tanaman tembakau diklasifikasikan sebagai berikut:

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</i> L.

2.1.1 Morfologi Daun Tembakau

Tembakau terdiri dari beberapa bagian yaitu akar, batang, daun, bunga dan buah. Daun tembakau berbentuk bulat lonjong, ujungnya meruncing, tulang daunnya menyirip dan bagian tepinya agak bergelombang serta memiliki permukaan yang licin. Daun tembakau memiliki tangkai yang melekat pada batang, kedudukan daunnya mendatar atau tegak. Ukuran dan ketebalan daun tergantung jenis varietas tembakau dan lingkungan tempat tumbuhnya (Ardhiarisca *et al.*, 2015).

Daun tembakau secara umum diklasifikasikan 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*) (Susilowati, 2006).



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

2.2 Tembakau Kasturi

Tembakau Kasturi merupakan salah satu tanaman tembakau yang dibudidayakan pada musim kemarau atau dikenal dengan istilah *Voor Oogst* (VO) yaitu dengan cara pengeringan menggunakan sinar matahari. Pengolahan tembakau kasturi dalam bentuk lembaran-lembaran daun (Hanum, 2008). Kabupaten Jember merupakan salah satu sentra perkebunan tembakau di Jawa Timur. Menurut Badan Pusat Statistik tahun 2015 menunjukkan tingkat produksi tembakau di Kabupaten Jember sebesar 18.511 ton. Dinas Perkebunan Provinsi Jawa Timur (2013) menyatakan bahwa tembakau kasturi adalah salah satu diantara berbagai jenis tembakau dengan areal pada tahun 2012 seluas 13.150 hektar dengan produksi sebesar 15.161 ton serta produktivitas rata - rata 915,6 kg per hektar.

Jenis Tembakau Kasturi yang umum diusahakan di Kabupaten Jember adalah Tembakau Kasturi 1 dan Kasturi 2 seperti pada gambar 2.2 (Djajadi, 2015). Kasturi 1 dan Kasturi 2 adalah 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 2.2 Tembakau Kasturi 1 dan 2 (Sumber : Djajadi, 2015)

Tabel 2.1 Karakteristik Tembakau Kasturi 1 dan Kasturi 2

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

Sumber : <http://balittas.litbang.pertanian.go.id>

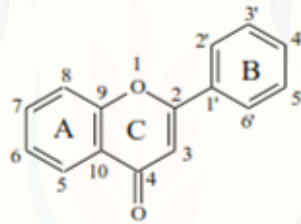
2.2.1 Kandungan Daun Tembakau Kasturi

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). Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa daun tembakau bagian atas dan tengah mengandung alkaloid, flavonoid, terpenoid dan steroid, sedangkan daun tembakau bagian bawah hanya mengandung alkaloid, flavonoid dan terpenoid (Rusli *et al.*, 2011). Komposisi flavonoid daun tembakau antara lain apigenin, quercetin, dan rutin sekitar 1,5%, 0,5%, dan 0,6% (Fathiazad *et al.*, 2006).

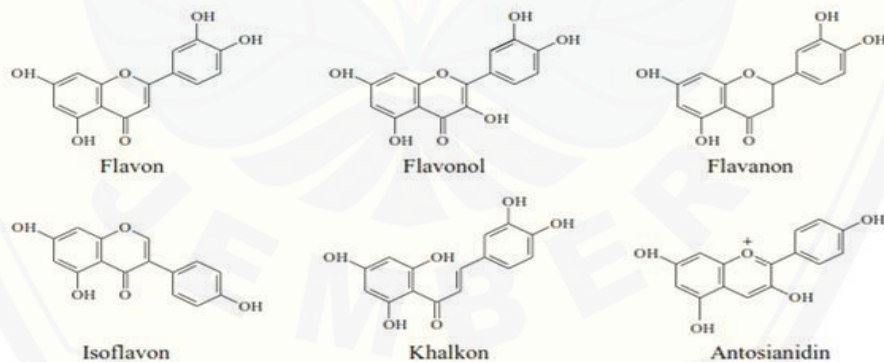
2.3 Flavonoid

Flavonoid berasal dari kata flavon atau fenil 2 kromosom yang mempunyai kerangka dasar γ piron. Flavonoid merupakan senyawa emetabolit sekunder yang ada pada tanaman. Flavonoid termasuk golongan senyawa fenolik yang terdiri atas satu cincin aromatik A, satu cincinaromatik B, dan cincin tengah yang berupa heterosiklik. Cincin tengah mengandung oksigen yang mana bentuk teroksidasi cincin tersebut menentukan sifat, khasiat dan sebagai dasar pembagian sub kelompok flavonoid seperti pada gambar 2.3 (Redha, 2010).

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 : Sabir, 2003)



Gambar 2.4 Struktur golongan flavonoid (Sumber : Sabir, 2003)

Flavonoid terdapat pada tumbuhan dan produk terkait seperti propolis dan madu (Havsteen, 2002). Pada daun, flavonoid berguna sebagai fungsi fisiologis tumbuhan, yaitu menjaganya dari jamur dan radiasi UV-B. Flavonoid juga berguna dalam fotosintesis, transfer energi, kinerja hormon pertumbuhan, mengontrol

respirasi, morfogenesis, dan penentuan jenis kelamin tumbuhan (Cushnie, 2005). Flavonoid merupakan golongan terbesar dari fenol yang mampu mendenaturasi protein dan berfungsi sebagai antibakter, antijamur dan antiinflamasi (Taiga dan Friday, 2009; Bakh *et al.*, 2012).

Flavonoid mengakibatkan kerusakan membran sitoplasma dengan mengurangi fluiditas dari membran (Tsuchiya, 2000), menyebabkan kebocoran, serta dengan menghasilkan hidrogen peroksida (Arakawa dkk., 2004). Sedangkan sistem kerjanya dalam menghambat sintesis asam nukleat adalah dengan menghambat topoisomerase (Navaro *et al.*, 2005; Gradisar *et al.*, 2007). Metabolisme energi pada bakteri juga dihambat dengan menghambat sintesis ATP (Chinnam *et al.*, 2010).

2.4 Periodontitis

Periodontitis merupakan suatu penyakit inflamasi destruktif pada jaringan penyangga gigi yang disebabkan oleh mikroorganisme spesifik, yang menghasilkan kerusakan lanjut ligamen periodontal dan tulang alveolar dengan terbentuknya poket, resesi gingiva, maupun keduanya (Saini *et al.*, 2010). Periodontitis diawali akumulasi plak dan keberadaan bakteri seperti *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *P. Melaninogenica* dan *Tannerella forsythia*, tetapi faktor yang berasal dari hospes menentukan patogenesis dan kecepatan perkembangan penyakit. Penyakit ini ditandai oleh kerusakan ligamen periodontal pada tepi servikal, resorpsi tulang alveolar, dan proliferasi epitel penghubung ke arah apikal di bawah *cementum-enamel junction* (CEJ) (Mitchell *et al.*, 2012).

1) Periodontitis Kronis

Periodontitis kronis yaitu bentuk periodontitis yang paling umum ditemui. Periodontitis kronis ini lebih sering terjadi pada orang dewasa, tapi juga dapat ditemukan pada anak-anak. Periodontitis kronis dihubungkan dengan adanya akumulasi plak dan kalkulus, penyakit ini

memiliki rentang progresi yang lambat hingga sedang (Newman *et al.*, 2015).

2) Periodontitis Agresif

Periodontitis agresif berbeda dengan periodontitis kronis dalam hal kecepatan progresi penyakit yang terlihat pada individu yang sehat. Periodontitis agresif biasanya dijumpai selama atau dalam jangka waktu singkat selama pubertas dan dapat ditemui juga selama dekade kedua dan ketiga usia (10-30 tahun). Penyakit ini dapat terjadi secara lokal (*localized juvenile periodontitis*) atau general (*generalized juvenile periodontitis*) (Newman *et al.*, 2015).

2.5 Lipopolisakarida

Lipopolisakarida merupakan komponen terbesar dari membran luar bakteri Gram-negatif, yang dikenal sebagai *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) (Nijland, 2014). Lipopolisakarida merupakan salah satu faktor yang terlibat dalam infamasi dan kerusakan tulang (Ozaki *et al.*, 2009).

Secara molekuler, lipopolisakarida terdiri atas tiga bagian, yaitu lipid A, inti polisakarida, dan antigen O. Lipid A merupakan komponen hidrofilik yang terdapat dalam membran luar bakteri, sedangkan inti polisakarida dan antigen O terdapat pada permukaan sel bakteri (Uematsu dan Akira, 2008).

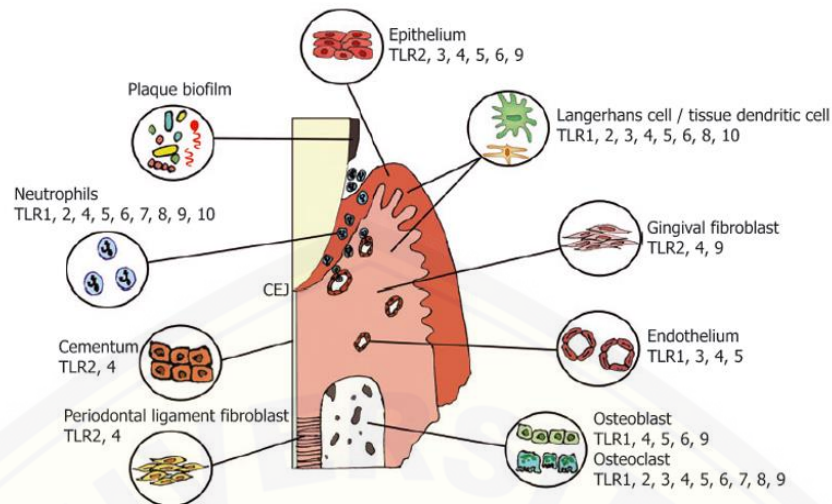
Lipid A melindungi kerusakan dari struktur protein. Lipid A tersusun atas rantai panjang fosfolipid dengan *hydroxyfatty acids*. Lipid A berikatan dengan Inti ke rantai O yang dihubungkan oleh gula *3-deoxy-D-manno-2-octulosonate*. Inti polisakarida yang melekat pada Lipid A merupakan bagian yang bertanggung jawab terhadap toksisitas bakteri Gram- negatif (Wang *et al.*, 2002).

Lipopolisakarida merupakan suprastruktur utama bakteri Gram-negatif dalam membangun integritas struktural bakteri dan melindungi bakteri dari pertahanan imunitas host (Murray dan Wilton, 2003). Peran lipopolisakarida adalah pengatur permeabilitas membran, pelindung dan penghalang impermeable bagi masuknya komponen berbahaya ke dalam sel bakteri serta terlibat dalam

mekanisme pertahanan bakteri dari lingkungan yang kurang baik (Newman *et al.*, 2015).

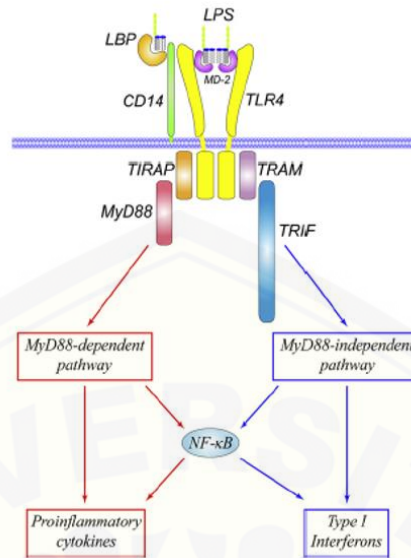
Lipopolisakarida merupakan faktor penting untuk mediasi respon imun bawaan yang memulai perubahan inflamasi selama periodontitis. Sebagai mediator inflamasi lipopolisakarida menginduksi sel host untuk mensekresi sitokin proinflamasi seperti tumor nekrosis faktor- α (TNF- α), interferon- β (IFN- β), dan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

Toll-Like Receptors (TLR) merupakan *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) yang mengenali molekul dari mikroorganisme pada sistem imun (Gumus, 2016). *Toll-Like Receptors* telah terbukti memainkan peran penting pada pengenalan respon imun dan aktivasi seluler dalam menanggapi invasi patogen (Aswapati *et al.*, 2012). Interaksi *Toll-Like Receptors* dapat memicu ekspresi dari sitokin proinflamasi pada sistem imun (Lu *et al.*, 2008). *Toll-like receptor* dapat mengenali struktur molekul umum dari mikroorganisme yang dikenal sebagai PAMPs (*pathogen-associated molecular pattern*) (Nijland, 2014). *Signaling receptor* bertemu dengan PAMPs menstimulasi sekresi menghasilkan sitokin. Banyak PAMPs telah diketahui dapat berinteraksi dengan *Toll-like receptor*. Ekspresi *Toll-Like Receptor* jaringan periodontal dapat dilihat pada gambar 2.5.



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

Toll-like receptor 4 dapat mengenali lipopolisakarida (Lu *et al.*, 2008). *Toll-like receptor 4* diekspresikan di berbagai tipe sel dari sistem imun seperti neutrofil, limfosit, sel mast, makrofag dan sel dendritik (Ma'at, 2009). *Toll-Like Receptor 4* (TLR4) berfungsi sebagai sensor utama bawaan untuk lipopolisakarida bakteri gram-negatif (Sun *et al.*, 2008). *Toll-Like Receptor 4* akan teraktivasi oleh lipopolisakarida dengan konsentrasi yang rendah karena lipopolisakarida berperan sebagai *immunoactivator* (Takeda *et al.*, 2005). Setelah pengenalan dengan lipopolisakarida, *Toll-Like Receptor 4* mengalami oligomerisasi dan mengerahkan adaptor hilir melalui interaksi dengan domain reseptor *Toll-inteleukin-1* (TIR-1). Domain *Toll-inteleukin-1* merupakan tanda untuk sinyal transduksi (Lu *et al.*, 2008). Sinyal transduksi dijelaskan pada gambar 2.6 (Lu *et al.*, 2008).



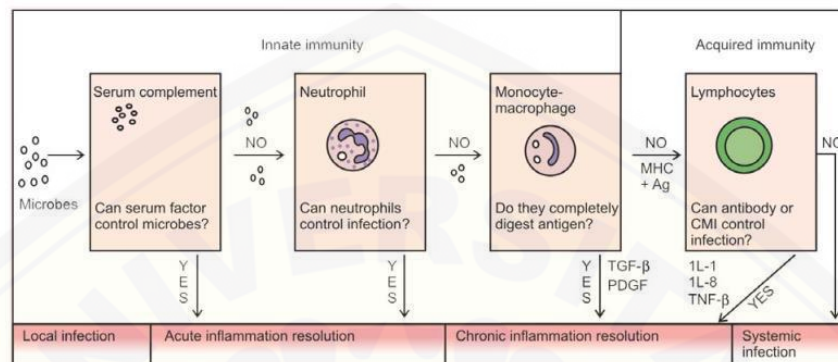
Gambar 2.6 Sinyal Transduksi Toll-Like Receptor 4 (Sumber : Lu *et al.*, 2008)

Sinyal Toll-Like Receptor 4 dibagi menjadi dua jalur yaitu *MyD88 dependent* dan *MyD88 independent (TRIF dependent)*. Berdasarkan hasil studi jalur *MyD88 dependent* menunjukkan peran untuk ekspresi sitokin proinflamatori seperti TNF- α sedangkan jalur *MyD88 independent* memediasi induksi dari gen *Interferon-1* (Lu *et al.*, 2008). Toll-Like Receptor 4 memainkan peran penting terhadap respon imun. Produksi berlebihan dari sitokin proinflamasi karena stimulasi kronik dari Toll-Like Receptor dapat menyebabkan destruksi jaringan (Hans *et al.*, 2011).

2.6 Mekanisme Respon Imun pada Periodontitis

Periodontitis merupakan inflamasi gingiva ke jaringan yang lebih dalam dari membran periodonsium. Periodontitis biasanya berkembang dari gingivitis yang sudah terjadi, walaupun tidak semua gingivitis berkembang menjadi periodontitis. Perubahan komposisi dan potensi patogenik dari mikroorganisme plak terhadap faktor resistensi pejamu dan jaringan sekitarnya menentukan perubahan dari gingivitis menjadi periodontitis dan keparahan kerusakan jaringan periodontal (Rehman dan Salama, 2004).

Sistem imun dapat berperan menguntungkan dan merugikan. Beberapa komponen dari sistem imun aktif dalam penyakit periodontal. Sistem imun mempengaruhi kolonisasi bakteri, invasi bakteri, kerusakan jaringan, serta penyembuhan (Reddy *et al.*, 2011)



Gambar 2.7 Skema sistem imun pada periodontitis (Sumber : Reddy *et al.*, 2011).

Limfosit pada periodontitis berperan sebagai sistem imun spesifik setelah sistem imun alami tidak dapat menyelesaikan infeksi. Diawali dengan bakteri yang menginvasi ke dalam jaringan periodontal kemudian direspon dengan protein komplemen, apabila protein komplemen tidak dapat mengontrol infeksi maka netrofil akan membantu mengontrol infeksi. Apabila netrofil tidak dapat mengontrol infeksi maka makrofag akan lebih berperan dalam mengontrol infeksi, apabila makrofag dapat secara menyeluruh menghancurkan antigen maka terjadi inflamasi kronis, tetapi jika makrofag tidak dapat secara menyeluruh menghancurkan antigen maka limfosit berperan untuk mengontrol infeksi, apabila limfosit dapat mengontrol infeksi maka penyelesaian inflamasi kembali ke fase kronis, akan tetapi apabila limfosit tidak dapat mengontrol infeksi maka infeksi akan menyebar dan menjadi infeksi sistemik (Reddy *et al.*, 2011).

Transisi dari gingivitis menuju periodontitis dihubungkan dengan perubahan komposisi bakteri plak atau perubahan pada pertahanan tubuh. Inflamasi ini terjadi dengan banyak bakteri patogen, infiltrasi sel inflamasi, kemudian inflamasi dapat menjadi progresif dan menyebabkan kerusakan parah jaringan sekitar ditandai dengan keterlibatan sel limfosit T dan sel limfosit B sebagai efek melawan antigen (Reddy *et al.*, 2011). Menurut Saraf (2006)

menyatakan bahwa keberadaan sel makrofag dan sel limfosit yang berlebih dapat menimbulkan destruksi pada jaringan. Kerusakan jaringan yang terjadi adalah efek samping mekanisme pertahanan untuk eliminasi bakteri. Selain itu kerusakan jaringan merupakan dampak dari jumlah *cell mediated immune response* yang berlebih, seperti limfosit. Limfosit dikatakan normal pada manusia dengan persentase 20-40% (Reddy *et al.*, 2011).

Ketidakeimbangan antara antigen dengan sel imun termasuk jumlah limfosit yang berlebih dapat menyebabkan kerusakan jaringan (Marsh *et al.*, 2009). Sel limfosit dapat mengeluarkan IL-1, subklas IL-1 α dan IL-1 β merupakan stimulator kuat kerusakan jaringan ikat. IL-1 merangsang pelepasan PGE2 dari fibroblas, monosit dan menstimulasi sekresi enzim matrix metalloproteinase yang dapat merusak jaringan (Reddy *et al.*, 2011). Selain itu menurut Marsh *et al.* (2009) imunitas seluler akan menyebabkan sel limfosit T mengeluarkan sitokin yang memodulasi aktifitas makrofag, kemudian makrofag yang teraktivasi juga mengeluarkan sitokin seperti TNF- α , IFN- γ dan IL-1. Kedua TNF- α dan IL-1 dapat menginduksi pelepasan enzim kolagenase dari berbagai macam sel jaringan ikat seperti fibroblas sehingga menyebabkan resorpsi tulang serta kerusakan jaringan sekitar.

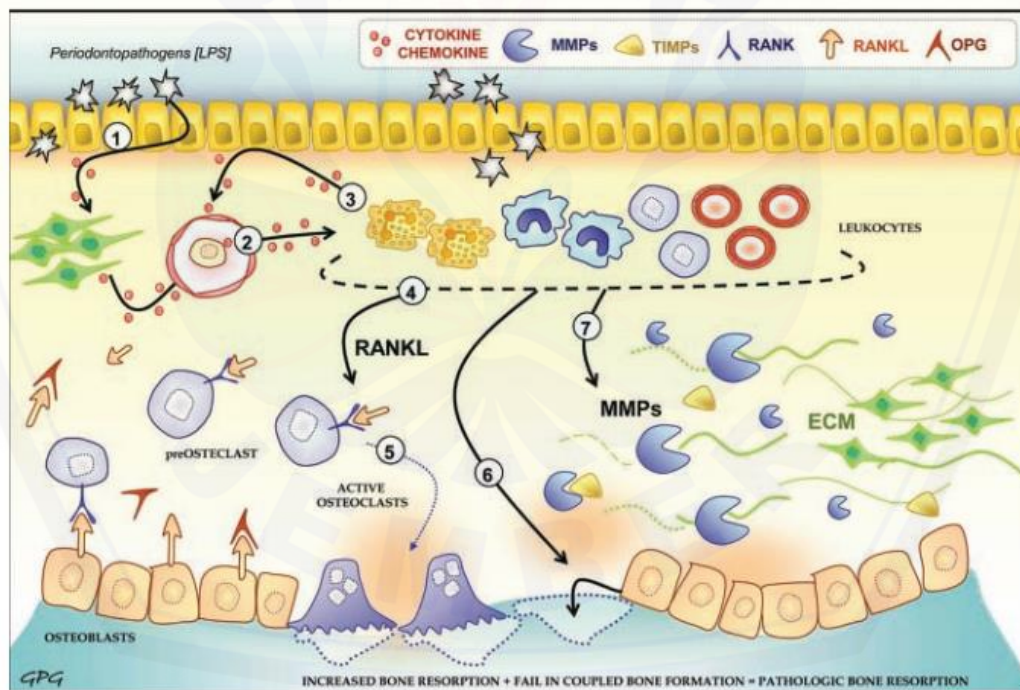
2.7 TNF- α

Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) merupakan sitokin utama pada respon inflamasi terhadap bakteri Gram negatif dan mikroba lainnya. TNF- α disintesis sebagai tipe II protein polipeptida transmembran dengan 233 *amino acid residues* (26 kDa) pada permukaan luar atau diproses untuk melepaskan 17-kD dalam bentuk terlarut (Horiuchi *et al.*, 2010).

Infeksi yang berat dapat memicu produksi TNF dalam jumlah besar yang menimbulkan reaksi sistemik. Sumber utama TNF- α ialah fagosit mononuklear dan sel T yang diaktifkan antigen, sel NK, dan sel mast. Lipopolisakarida merupakan rangsangan poten terhadap makrofag untuk menyekresi TNF. IFN- γ yang diproduksi sel T dan sel NK juga merangsang makrofag antara lain meningkatkan sintesis TNF (Baratawidjaya dan Rengganis, 2010).

TNF- α mempunyai beberapa fungsi dalam proses inflamasi, yaitu dapat meningkatkan peran pro trombotik dan merangsang molekul adhesi dari sel leukosit serta menginduksi sel endotel, berperan dalam mengatur aktivitas makrofag dan respon imun dalam jaringan dengan merangsang faktor pertumbuhan dan sitokin lain, berfungsi sebagai regulator dari hematopoetik serta komitogen untuk sel T dan sel B serta aktivitas sel neutrofil dan makrofag. TNF- α juga memiliki fungsi tambahan yang menguntungkan termasuk peranannya dalam respon imun terhadap bakteri, virus, jamur, dan invasi parasit (Soeroso A, 2007).

Patogenesis infeksi melalui mekanisme sel-sel fagosit, seperti neutrofil, limfosit, dan makrofag akan memicu pelepasan mediator kimia seperti sitokin TNF- α yang berperan pada terjadinya penyakit periodontal (Roudsari *et al.*, 2009)



Gambar 2.8 Mekanisme TNF- α terhadap Periodontitis (Sumber : Garlet, 2010)

Pengenalan Lipopolisakarida oleh sel inflamasi jaringan periodontal seperti neutrofil, makrofag, limfosit sehingga terjadi inflamasi awal yang menghasilkan produksi sitokin proinflamasi salah satunya TNF- α dan kemokin

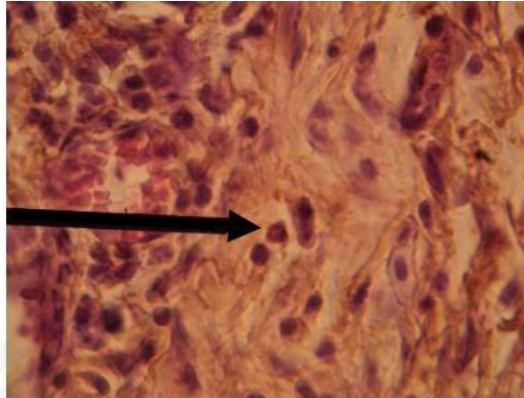
yang bertindak dalam infiltrasi leukosit ke jaringan periodontal. Begitu berada di jaringan, aktivasi leukosit mengarah ke produksi proinflamasi sitokin dan kemokin lebih lanjut yang berkontribusi pada migrasi leukosit. Selain sitokin, leukosit juga menghasilkan sejumlah besar RANKL, peningkatan kadar RANKL menghasilkan ketidakseimbangan dalam kadar OPG sehingga menghasilkan karakteristik resorpsi tulang yang meningkat. Mediator inflamasi yang diproduksi oleh leukosit juga mengganggu formasi tulang yang diharapkan dapat menangkal peningkatan aktivitas osteoklastik. Akhirnya, reaksi inflamasi kronis juga menghasilkan ketidakseimbangan yang signifikan dalam rasio MMP / TIMP sehingga terlihat kerusakan ECM (matriks ekstraseluler) jaringan periodontal lunak dan jaringan periodontal termineralisasi (Garlet, 2010).

2.8 Sel Inflamasi

Sel inflamasi yang mengekspresikan TNF- α antara lain : neutrofil, makrofag, limfosit.

2.7.1 Neutrofil

Sel neutrofil adalah sel darah putih pertama yang melakukan migrasi dari pembuluh darah ke tempat cedera. Fungsi neutrofil adalah untuk memfagositosis bakteri dan debris selular. Neutrofil polimorfonuklear (PMN) tertarik ke daerah inflamasi oleh faktor kemotaktik, yang dihasilkan oleh bakteri, komplemen (C5a), produk jalur lipooksigenase (5-HETE dan leuktotrien B4) dan sitokin. Neutrofil juga melepaskan zat-zat kimia yang menarik sel darah putih lain ke tempat peradangan, dengan proses yang disebut kemotaksis. Sel ini mempunyai inti bersegmen dalam bentuk bermacam-macam, seperti kacang, tapal kuda, dan lain-lain. Sel ini memiliki diameter 10-12 μm . Segmen/lobus dari inti berkisar 2-4 buah. Inti terisi penuh oleh butir-butir khromatin padat sehingga sangat mengikat zat warna basa menjadi biru atau ungu (Effendi, 2003).

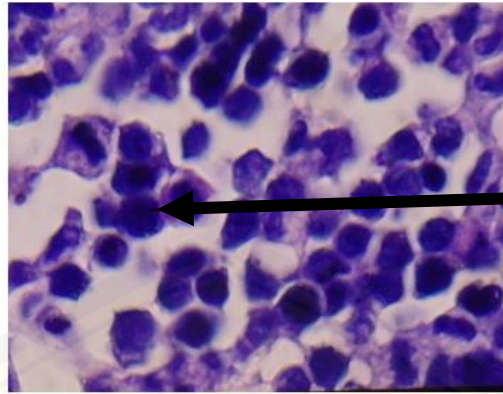


Gambar 2.9 Sel Neutrofil (Sumber : Shiella, 2012)

2.7.2 Limfosit

Limfosit termasuk dalam leukosit agranular karena didalam sitoplasma tidak ditemukan granula. Limfosit pada umumnya memiliki inti bulat seperti kacang. Dalam sirkulasi sering ditemukan limfosit besar dan limfosit kecil. Limfosit besar merupakan bentuk limfosit yang belum dewasa, disebut sebagai *prolimfosit* (Effendi, 2003).

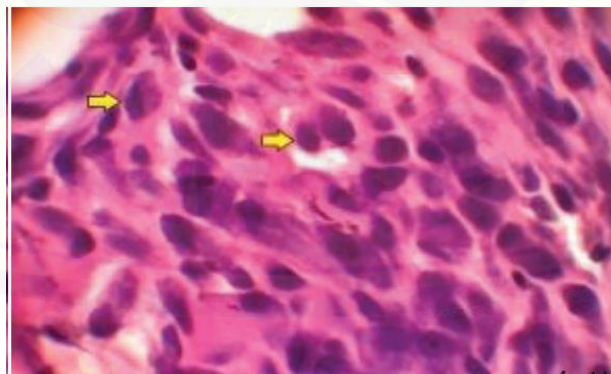
Adanya perbedaan bentuk maupun fungsi limfosit dikarenakan sifat limfosit yang mampu menerobos jaringan atau organ lunak di dalam tubuh. Fungsi utama limfosit adalah merespon terhadap antigen dengan membentuk antibodi. limfosit di bedakan menjadi 3 tipe sel yaitu sel B, sel T dan sel null. Sel B ini jumlahnya hanya sedikit dan berperan dalam respon imunitas humoral karena sel B memproduksi antibodi. Sel T jumlahnya mencapai 70 sampai 75% dari limfosit. Sel ini diproduksi oleh timus dan berperan dalam imunitas seluler. Sel null memiliki dua tipe *cell mediated-cytotoxicity* yaitu sel N-K (*natural killer function*) dan sel K (*antibody-dependent cellularcytotoxicity*) (Sugiono *et al.*, 2003).



Gambar 2.10 Sel Limfosit (Sumber : Nizar, 2012)

2.7.3 Makrofag

Makrofag merupakan sel jaringan yang berasal dari monosit dalam sirkulasi setelah beremigrasi dari aliran darah. Pada saat mencapai jaringan ekstrasvaskular, monosit berubah menjadi makrofag, dan mampu mengadakan fagositosis terhadap bakteri dan sisa-sisa sel dalam jumlah yang besar. Sel ini berukuran 10 sampai 30 μm dan umumnya memiliki inti lonjong atau berbentuk ginjal yang terletak eksentris. Makrofag yang teraktivasi menyebabkan ukuran sel bertambah besar, kandungan enzim lisosom menjadi meningkat, metabolismenya lebih aktif, dan kemampuan membunuh mikroorganismenya lebih besar dan menghasilkan berbagai mediator seperti proinflamatori (IL-1, IL-6 dan TNF) (Effendi, 2003).



Gambar 2.11 Sel Makrofag (Sumber : Rahmawati, *et al* 2018)

2.9 Pengaruh Flavonoid sebagai Antiinflamasi

Flavonoid telah terbukti baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Mekanisme

flavonoid dalam menghambat terjadinya inflamasi melalui 2 cara, yaitu dengan menghambat pelepasan asam arakidonat dan sekresi enzim lisosom dari sel netrofil dan sel endotel, kemudian menghambat fase proliferasi dan fase eksudasi dari proses inflamasi. Flavonoid konsentrasi tinggi dapat menghambat pelepasan asam arakidonat dan sekresi enzim lisosom dari membran dengan memblok jalur siklooksigenase, jalur lipoksigenase, dan fosfolipase A2, sementara pada konsentrasi rendah hanya memblok jalur lipoksigenase. Terhambatnya pelepasan asam arakidonat dari sel inflamasi akan menyebabkan kurang tersedianya substrat arakidonat bagi jalur siklooksigenase dan jalur lipoksigenase, yang pada akhirnya akan menekan jumlah prostaglandin, prostasiklin, endoperoksida, tromboksan disatu sisi dan asam hidroperoksida, asam hidroksieikosatetraenoat, leukotrin disisi lainnya (Sabir, 2003). Menurut (Kim *et al.*, 2004) salah satu faktor terpenting flavonoid sebagai bahan antiinflamasi adalah menghambat *eicosanoid-generating enxymes*, termasuk diantaranya phospholipase A2, siklooksigenase, dan lipoksigenase.

Pada penelitian lain menunjukkan kandungan flavonoid juga mempunyai sifat antiinflamasi dengan menghambat produksi dan pelepasan mediator inflamasi (Dos santos *et al.*, 2006). Polifenol secara spesifik dapat mempengaruhi tyrosin dan *serin-threonin protein kinase*, dimana enzim tersebut berpengaruh terhadap proses aktivasi proliferasi sel limfosit T dan aktivasi sel limfosit B, sehingga dapat mengontrol jumlah limfosit yang terlibat dalam inflamasi (Hussain *et al.*, 2016). Selain berpengaruh terhadap proliferasi sel T yang berkaitan dengan fosforilasi tyrosin, flavonoid juga menunjukkan efek pada produksi sel inflamasi dengan menghambat β -glucuronidase dan lisozim yang dilepaskan oleh netrofil. Flavonoid secara signifikan juga menghambat pelepasan asam arakidonat, TNF- α , IL-1 dan IL-6 dari membran sel (Hussain *et al.*, 2016).

2.10 Imunohistokimia

Immunohistochemistry (IHC) adalah gabungan histologi/sitologi dan imunologi. Pemeriksaan imunohistokimia memiliki kemampuan yang tinggi

untuk memisahkan, menseleksi, dan bersifat spesifik. Pemeriksaan ini untuk mendeteksi adanya antigen, hal ini dikarenakan adanya ikatan spesifik antara antigen dan antibodi (Ambari, 2003). Hasil reaksi antigen dan antibodi ini dapat diidentifikasi pada spesimen karena antibodi diikat oleh suatu penanda yang dapat divisualisasikan, sehingga dapat menandai keberadaan bahan aktif tersebut di dalam jaringan. Untuk divisualisasikan hasil interaksi antara antigen dan antibodi dapat dilakukan dengan berbagai macam cara, dimana cara yang paling sering digunakan ialah dengan konjugasi antibodi dengan enzim seperti peroksidase. Selain itu juga dapat digunakan fluorophore seperti fluorescen atay rhodamin. Untuk mempelajari morfologi sel, sel dalam jaringan difiksasi kemudian dilokalisasi diantara sel dan divisualisasikan dengan mikroskop elektro atau mikroskop cahaya (Rantam, 2003). Dengan menggunakan mikroskop optik, keberadaan antigen di dalam sel dapat dideteksi, baik di dalam sitoplasma, inti sel dan axon pada sel-sel syaraf, juga pada jaringan, ekstraseluler. Imunohistokimia dapat menandai keberadaan suatu bahan aktif di dalam jaringan, sel-sel mana saja yang menghasilkan, juga dapat mendeteksi dimana bahan aktif tersebut diakumulasi (Nurhidayat, 2002). Selain dapat mendeteksi dan melokalisasi bahan-bahan aktif tersebut, sekaligus dapat memperlihatkan keadaan jaringan di tempat keberadaan bahan aktif tersebut secara utuh. Bahan aktif tersebut dapat berupa protein, karbohidrat, asam nukleat, lemak, bahan-bahan alami lainnya serta bahan sintesis (Setijanto, 2002).

2.10.1 Antibodi

Antibodi merupakan bahan pokok imunohistokimia dalam mendeteksi suatu bahan aktif. Molekul antibodi memiliki bentuk seperti huruf Y, dimana kedua tangannya mempunyai sisi ikat dari antibodi yaitu Fab. Terdapat 2 macam antibodi yaitu antibodi monoklonal dan antibodi poliklonal. Antibodi monoklonal adalah suatu antibodi yang murni mengandung satu jenis antibodi untuk satu sisi antigenik (epitop) yang khas dari antigen tersebut. Antibodi monoklonal ini mempunyai spesifitas yang tinggi karena hanya akan mengikat satu jenis antigenik saja dari antigen tersebut, sehingga penggunaan antibodi ini sangat

rawan terhadap kehilangan antigenik pada antigen yang akan diikat. Antibodi monoklonal biasa digunakan untuk reagen diagnostik dan untuk keperluan penelitian imunohistokimia dengan spesifitas yang sempit, sehingga tidak terjadi reaksi silang dengan antigen lain. Pada proses fiksasi preparat yang umumnya menggunakan formalin dapat mempengaruhi keberadaan epitop yang dapat bereaksi dengan antibodi tersebut, sehingga jika epitop yang spesifik terhadap antibodi tersebut hilang karena proses fiksasi, maka ikatan antara antibodi dan antigen tidak dapat terjadi. Biasanya pada pewarnaan imunohistokimia, titer antibodi monoklonal lebih tinggi dibandingkan dengan antibodi poliklonal (Nurhidayat, 2002).

Antibodi poliklonal merupakan campuran antibodi-antibodi yang berasal dari beberapa antigenik spesifik dari suatu antigen, sehingga antibodi ini lebih toleran terhadap kehilangan satu atau lebih antigenik spesifik akibat proses yang dilalui preparat tersebut. Antibodi poliklonal memiliki spesifitas yang lebih rendah dibandingkan dengan antibodi monoklonal, namun afinitasnya dalam berikatan dengan antigen lebih tinggi. Ikatan antara antigen dan antibodi masih mungkin terjadi dengan antigenik yang masih tersisa pada antigen tersebut. Proses pembuatan antibodi ini relatif murah dan lebih mudah dibandingkan dengan antibodi monoklonal, dan umumnya lebih stabil terhadap perubahan pH dari medianya. Namun terdapat kemungkinan terjadinya reaksi silang dengan antigen yang lain karena antibodi ini berasal dari beberapa antigenik spesifik dari antigen. Berbeda dengan antibodi monoklonal yang tidak memungkinkan terjadi reaksi silang dengan antigen yang lain (Nurhidayat, 2002).

2.10.2 Kromogen

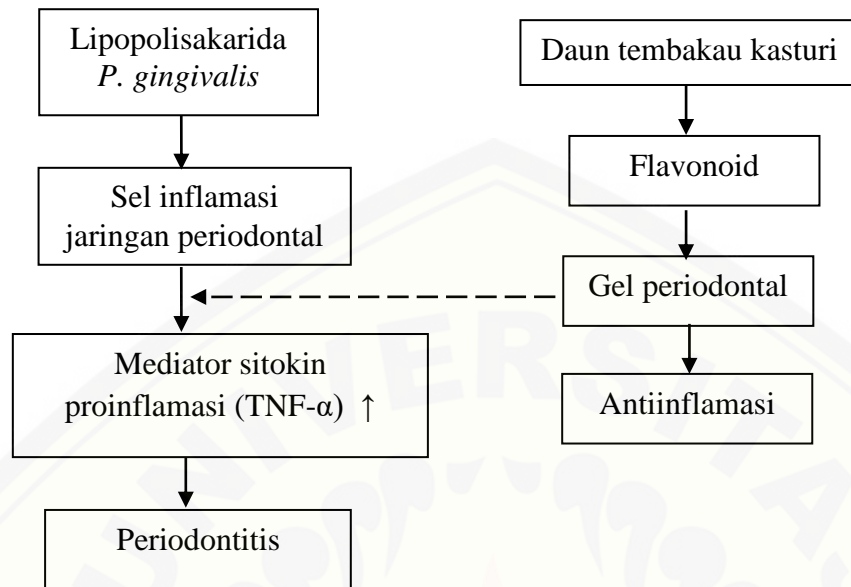
Kromogen ialah suatu bahan yang dapat memvisualisasikan substansi penanda pada ikatan immunokompleks pada pewarnaan IHC. Bahan ini biasanya dicampurkan dengan substrat dari enzim penanda sebelum digunakan. Bahan kromogen yang sering digunakan adalah *3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride* (DAB). Molekul ini didalam larutan dalam konsentrasi terlarut, tidak berwarna dan mengendap berupa massa coklat gelap bila teroksidasi. Endapan ini tidak larut

dalam alkohol. Hal ini memungkinkan seksion conterstained dengan hematoxylin, dehidrasi dengan ethanol, dan cleared dengan xylene dan ditutup dengan coverslip (Sudiana, 2005).

2.10.3 *Counterstain*

Counterstain bertujuan untuk memvisualisaikan detail jaringan selain bagian yang terwarnai secara imunohistokimia. Jika bagian sitoplasma yang terwarnai menggunakan IHC, maka dilakukan *counterstain* pada inti sel sedangkan apabila bagian yang terwarnai adalah inti sel, maka dilakukan *counterstain* pada sitoplasma sel. Bahan yang biasa digunakan adalah haematoxilin. Pewarnaan imunohistokimia disertai dengan *counterstain* dapat menunjukkan detail lokasi immunopositif disertai detail jaringan sekitarnya (Nurhidayat, 2002).

2.11 Kerangka Konseptual



Keterangan :

----- : menghambat

2.12 Hipotesis

Gel flavonoid daun tembakau kasturi menurunkan TNF- α pada sel inflamasi jaringan periodontal tikus periodontitis

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental laboratoris. Sampel maupun perlakuan diharapkan terkendali, terukur dan pengaruh perlakuan dapat dipercaya. Penelitian jenis ini ialah penelitian yang bertujuan untuk mencari hubungan sebab akibat dengan memanipulasi atau mengintervensi variabel dalam satu atau lebih kelompok serta mengendalikan faktor yang dapat mempengaruhi hubungan sebab akibat, kemudian membandingkannya dengan kelompok kontrol yang tidak dilakukan perlakuan atau dimanipulasi (Notoadmojo, 2010).

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan ialah *post test only control group design* yang merupakan rancangan penelitian yang memungkinkan peneliti untuk mengetahui efek perlakuan dan tanpa perlakuan pada unit eksperimen (Notoadmojo, 2010).

3.3 Tempat Penelitian

- a. Pembuatan ekstrak flavonoid bebas nikotin daun tembakau dilakukan di Laboratorium *Center for Development of Advanced Sciences and Technology* (CDAST), Universitas Jember.
- b. Pembuatan gel periodontal dilakukan di Laboratorium Biofarmasetika, Fakultas Farmasi, Universitas Jember.
- c. Uji *in vivo* pada tikus jenis *sprague dawley* dilakukan di Laboratorium *Center for Development of Advanced Sciences and Technology* (CDAST), Universitas Jember.
- d. Pemrosesan jaringan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- e. Prosedur pengamatan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

3.4 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September 2018 – Juni 2019.

3.5 Populasi dan Sampel Penelitian

3.5.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian adalah hewan coba tikus *sprague dawley* dengan jenis kelamin jantan.

3.5.2 Kriteria Sampel Penelitian

Kriteria sampel dalam penelitian ini meliputi:

- a. Tikus jantan jenis sprague dawley
- b. Umur 3-4 bulan
- c. Berat badan 200-250 gram
- d. Kondisi sehat ditandai dengan gerakan yang aktif dari tikus dan tidak ada cacat fisik.

3.5.3 Besar sampel

Besar sampel penelitian yang digunakan ditentukan dengan menggunakan rumus Frederer:

$$t(n-1) > 15$$

Keterangan:

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah ulangan pada masing-masing kelompok

$$7(n-1) > 15$$

$$7n - 7 > 15$$

$$7n > 15 + 7$$

$$7n > 22$$

$$n > 3,14$$

Berdasarkan perhitungan rumus diatas, maka sampel yang digunakan tiap kelompok sebanyak 3 ekor tikus ($n > 3,14$) dan jumlah kelompok yang digunakan adalah 7 kelompok dengan 5 waktu paparan yaitu hari ke-1, ke-3, ke-7, ke-14, ke-

21 sehingga penelitian ini menggunakan 105 ekor tikus.

3.6 Variabel Penelitian

3.6.1 Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah gel flavonoid dengan konsentrasi 640 µg/ml, 320 µg/ml, 160 µg/ml, 80 µg/ml, 40 µg/ml.

3.6.2 Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah sel yang mengekspresikan TNF-*a*

3.6.3 Variabel terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini antara lain:

- a. Pemilihan hewan coba meliputi jenis hewan coba, jenis kelamin hewan coba, umur hewan coba, berat badan hewan coba.
- b. Pemeliharaan hewan coba meliputi pemberian makan dan minum, jenis makan dan minum serta pembersihan hewan kandang
- c. Bahan dan dosis anastesi
- d. Waktu evaluasi
- e. Metode pemeriksaan

3.7 Definisi Operasional

3.7.1 Flavonoid

Flavonoid adalah zat yang terkandung dalam daun Tembakau Kasturi yang diambil pada bagian daun bawah atau koseran, kemudian diekstraksi menggunakan metode maserasi dan metode fraksinasi yang menghasilkan ekstrak flavonoid bebas nikotin. Ekstrak flavonoid daun Tembakau Kasturi akan dibuat dalam bentuk gel. Daun tembakau yang digunakan berasal dari Kecamatan Pakusari, Kabupaten Jember, Jawa Timur.

3.7.2 Tikus Periodontitis

Tikus periodontitis adalah hewan coba yang diberikan perlakuan berupa pemaparan lipopolisakarida setiap 2 hari sekali selama 14 hari dengan

injeksi sulkular pada sulkus gingiva di bagian palatal gigi molar pertama kiri rahang atas agar hewan tersebut mengalami kondisi periodontitis. Lipopolisakarida yang digunakan berasal dari bakteri *Porphyromonas gingivalis* (Sigma-Aldrich SMB00610)

3.7.3 Ekspresi TNF- α

Ekspresi TNF- α muncul pada sel inflamasi (neutrofil, makrofag dan limfosit) yang terletak di area gingiva bagian palatal daerah sulkus gingiva dengan memberikan reaksi positif terhadap antibodi monoklonal TNF- α (sitoplasma sel terwarnai coklat) dan dihitung secara manual oleh 3 pengamat menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x.

3.7.3 Sel inflamasi

Sel inflamasi yang diamati terdiri dari neutrofil, makrofag dan limfosit. Sel tersebut dilihat dari karakteristik yang dimiliki. Neutrofil mempunyai inti bersegmen dalam bentuk bermacam-macam, seperti kacang atau tapal kuda. Makrofag umumnya memiliki inti lonjong atau berbentuk ginjal yang terletak eksentris. Limfosit pada umumnya memiliki inti bulat seperti kacang dan pada sitoplasmanya tidak ditemukan granula.

3.8 Pengelompokan Sampel Penelitian

Hewan coba yang telah diadaptasi selama 1 minggu dan telah dipapar lipopolisakarida selama 14 hari kemudian dikelompokkan menjadi 7 kelompok yang terbagi dalam kelompok kontrol negatif yaitu tikus yang dipapar lipopolisakarida tanpa diberi gel flavonoid, kelompok kontrol positif yaitu tikus yang dipapar lipopolisakarida kemudian diberi gel *metronidazole* 15% dan kelompok perlakuan yaitu tikus yang dipapar lipopolisakarida kemudian diberi gel flavonoid, dengan pembagian kelompok sebagai berikut:

1. Kelompok 1 (15 ekor) merupakan tikus yang dipapar lipopolisakarida selama 14 hari kemudian diberi gel flavonoid dengan konsentrasi 640 $\mu\text{g/ml}$ selama 1 hari, 3 hari, 7 hari, 14 hari, 21 hari.

2. Kelompok 2 (15 ekor) merupakan tikus yang dipapar lipopolisakarida selama 14 hari kemudian diberi gel flavonoid dengan konsentrasi 320 $\mu\text{g/ml}$ selama 1 hari, 3 hari, 7 hari, 14 hari, 21 hari.
3. Kelompok 3 (15 ekor) merupakan tikus yang dipapar lipopolisakarida selama 14 hari kemudian diberi gel flavonoid dengan konsentrasi 160 $\mu\text{g/ml}$ selama 1 hari, 3 hari, 7 hari, 14 hari, 21 hari
4. Kelompok 4 (15 ekor) merupakan tikus yang dipapar lipopolisakarida selama 14 hari kemudian diberi gel flavonoid dengan konsentrasi 80 $\mu\text{g/ml}$ selama 1 hari, 3 hari, 7 hari, 14 hari, 21 hari.
5. Kelompok 5 (15 ekor) merupakan tikus yang dipapar lipopolisakarida selama 14 hari kemudian diberi gel flavonoid dengan konsentrasi 40 $\mu\text{g/ml}$ selama 1 hari, 3 hari, 7 hari, 14 hari, 21 hari.
6. Kelompok 6 (15 ekor) merupakan tikus yang dipapar lipopolisakarida selama 14 hari kemudian diberi gel *metronidazole* 15% selama 1 hari, 3 hari, 7 hari, 14 hari, 21 hari.
7. Kelompok 7 (15 ekor) merupakan tikus yang dipapar lipopolisakarida selama 14 hari tanpa diberi gel flavonoid selama 1 hari, 3 hari, 7 hari, 14 hari, 21 hari.

3.9 Alat dan Bahan Penelitian

3.9.1 Alat Penelitian:

- a. Blender
- b. Rak appendorf
- c. Vacuum filter
- d. *Laminar flow*
- e. *Centrifuge*
- f. *Counter*
- g. *Shaker*
- h. *Magnetic stir*
- i. *Rotary evaporator*

- j. Tabung *appendorf*
- k. Botol duran
- l. *Conical tube*
- m. Vortex
- n. Timbangan analitik
- o. Gelas ukur
- p. Mortar dan alu
- q. *Homogenizing mixer*
- r. Kandang peliharaan hewan coba
- s. Tempat makan dan minum hewan coba
- t. *Disposable spuit* 1 cc, syringe modifikasi
- u. Pinset
- v. Papan bedah
- w. Scalpel
- x. Gunting
- y. *Beaker glass*
- z. Pipet, mikropipet
- aa. Mikroskop cahaya
- bb. Kamera
- cc. Kertas saring
- dd. Label identitas
- ee. *Deck glass* dan *object glass*
- ff. Sarung tangan dan masker
- gg. Alat cetak blok paraffin
- hh. Mikrotom

3.9.2 Bahan Penelitian :

- a. Daun Tembakau Kasturi
- b. HCl 1 M (500 ml, 250 ml)
- c. Methanol 80%
- d. DMSO (*DimetilSulfoxide*)

- e. *Stopper reagent* (SDS 10% dalam 0,1 N HCl)
- f. Carbopol 1%, TEA 3%, Propilenglicol 3%
- g. Tikus sprague dawley berjenis kelamin jantan
- h. Pakan tikus merk AD-2 dan minum
- i. Bahan anestetikum : Ketamin
- j. Lipopolisakarida
- k. Etanol absolut
- l. Paraffin
- m. Alkohol 70%, 80%, 96% dan absolut
- n. *Xylol*
- o. *Phosphate buffer saline* (PBS)
- p. *Peroxidase blocking solution*
- q. *Prediluted blocking serum*
- r. *Horseradish peroxidase* (HRP)
- s. *Diaminobenzidine tetrahydrochloride* (DAB)
- t. Buffer fosfat
- u. *Aquadest*
- v. Entelan
- w. Buffer neutral formalin 10%
- x. *Hematoxylin*
- y. Antibodi primer TNF- α
- z. Antibodi sekunder biotin
- aa. Cotton pallate

3.10 Prosedur Penelitian

3.10.1 Tahap Persiapan

Persiapan dimulai dengan identifikasi daun tembakau kasturi yang kemudian dilakukan pengambilan ekstrak.

3.10.2 Prosedur Ekstraksi Flavonoid Bebas Nikotin Daun Tembakau Kasturi

Daun tembakau yang sudah dikeringkan lalu dihancurkan dengan menggunakan blender sampai menjadi serbuk. Serbuk daun tembakau ditimbang sebesar 50 gram dan ditempatkan pada tabung erlenmeyer. Tambahkan methanol sampai volume pada tabung erlenmeyer 400 ml, tutup mulut tabung dengan kertas alumunium. Aduk larutan pada *Orbital Shaker* dengan kecepatan 150 rpm selama 24 jam. Setelah 24 jam, larutan disaring dan dituang pada *beaker glass* dengan menggunakan corong yang dilapisi kertas saring. Letakkan larutan pada lemari asam yang bertujuan untuk menguapkan bahan kimia berkonsentrasi tinggi selama 2,5 jam hingga volume larutan menjadi 300 ml. Ambil 250 ml larutan lalu homogenkan larutan pada alat stir selama 6 menit. Ambil larutan sebanyak 50 ml dan pisahkan pada beaker glass yang lebih kecil diamkan sampai larutan menguap bertujuan untuk mempermudah pengukur hasil ekstrak per 50 gram tembakau. Sisa larutan dengan volume 200 ml pada tabung erlenmeyer dilakukan fraksinasi dengan menambahkan larutan hexane 20 ml. Aduk dengan menggunakan *magnetic stir* selama 10 menit maka akan terbentuk dua lapisan. Ambil lapisan pertama dengan menggunakan pipet dan pindahkan pada *beaker glass* lain.

Tambahkan hexane 20 ml pada lapisan kedua dalam tabung erlenmeyer, lalu lakukan proses fraksinasi sebanyak 15x. Lapisan pertama yang didapatkan dari proses fraksinasi dievaporating dengan *rotary evaporator* sampai didapatkan larutan yang mengental. Diperoleh sebanyak 20 ml.

Pembuatan HCl pekat 37% dengan menggunakan rumus:

$$37\% \times V = 10\% + 100 \text{ ml}$$

$$V = \frac{1000}{37} = 27,027 \text{ ml}$$

Membuat HCL 10% 100 ml dengan menambahkan 73 ml aquades pada 27 ml HCl pekat 37%. Ambil larutan hasil *evaporating* sebanyak 10 ml dalam tabung erlenmeyer, tambahkan 20 ml HCl 10% . Tambahkan aquades sebanyak 10 ml dan ethyl asetate 20 ml. Fraksinasi sebanyak 3x dengan *magnetic stir* hingga didapatkan 2 lapisan. Lapisan paling atas adalah larutan kaya fenol, sedangkan lapisan kedua merupakan larutan kaya nikotin. Uji dragendorf untuk mengetes

kandungan nikotin pada larutan lapisan pertama yang kaya fenol. Larutan akan berwarna kuning jika bebas nikotin dan akan berwarna orange jika masih mengandung nikotin.

3.10.3 Prosedur Pembuatan Gel Flavonoid Daun Tembakau Kasturi Bebas Nikotin

Sintesis gel flavonoid yaitu ekstrak flavonoid dengan konsentrasi 320 $\mu\text{g/ml}$, 160 $\mu\text{g/ml}$, 80 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, dan 10 $\mu\text{g/ml}$ dalam DMSO 1%. Selanjutnya pembuatan dilusi *Carbopol 940* dan *aquades* (0,1:50). Campuran ini diaduk perlahan hingga homogen dan membentuk massa gel yang kental. Hidrogel dituang ke dalam petridish dan dibiarkan semalam untuk stabilisasi. Gel yang mengandung metronidazol konsentrasi 15% sebagai kelompok kontrol.

3.10.4 Persiapan Hewan Coba

Sebanyak 105 ekor tikus *sprague dawley* jantan diadaptasi selama 7 hari. Selama proses adaptasi, tikus diberi makan dan minum secara bebas setiap hari. Hal ini bertujuan untuk mengurangi stres hewan coba dan memperoleh keseragaman sebelum dilakukan penelitian (homogenitas) serta memenuhi kriteria penelitian.

3.10.5 Pemaparan Lipopolisakarida Pada Tikus Sprague Dawley.

Pemaparan lipopolisakarida dilakukan setelah fase adaptasi setiap 2 hari sekali selama 14 hari dengan injeksi sulkular pada sulkus gingiva di bagian palatal gigi molar pertama kiri rahang atas. Dengan catatan setelah berjalan 14 hari, salah satu ekor tikus dianestesi dengan ketamin. Kemudian tikus tersebut dibawa ke Laboratorium Radiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk mengetahui hewan coba tersebut telah mengalami periodontitis.

3.10.6 *Euthanasia* Hewan Coba

Hewan coba pada seluruh kelompok dikorbankan sehari setelah perlakuan, perlakuan selama 1 hari dikorbankan pada hari ke-2, perlakuan

selama 3 hari dikorbankan pada hari ke-4, perlakuan selama 7 hari dikorbankan pada hari ke-8, perlakuan selama 14 hari dikorbankan pada hari ke-15, perlakuan selama 21 hari dikorbankan pada hari ke-22 masing- masing sebanyak 3 ekor tikus dari tiap kelompok dilakukan *euthanasia*. *Euthanasia* hewan coba dilakukan dengan menggunakan injeksi ketamin over dosis yaitu 120-150 mg/kg BB secara intraperitonium (Etten, 2015). Rahang atas dipotong dengan melakukan insisi mulai dari sudut mulut ke sudut mulut sampai rahang atas terlepas dari rahang bawah.

3.10.7 Pengambilan Sampel Sediaan

Pemotongan rahang atas dengan menggunakan *knable* tang, gunting dan *scalpel*. Pemotongan jaringan ini dilakukan di atas papan bedah. Jaringan yang diambil untuk penelitian harus segar yang artinya jaringan diambil secepat mungkin setelah hewan coba di *euthanasia* (Muntiha, 2001). Jaringan difiksasi dengan menggunakan larutan *buffer* formalin 10% selama 24 jam untuk mencegah terjadinya autolisis, mempertahankan morfologi serta mencegah pertumbuhan jamur dan bakteri. Setelah difiksasi jaringan dicuci dengan air mengalir selama 1,5 jam untuk menghilangkan sisa bahan fiksasi.

3.10.8 Proses Pembuatan Sediaan dan Pemeriksaan Imunohistokimia

Tahap yang pertama adalah proses dekalsifikasi untuk melepaskan bahan anorganik dalam tulang tanpa merusak protein. Dekalsifikasi dilakukan dengan memakai larutan EDTA 10% selama 30 hari. Proses dekalsifikasi dapat dikatakan telah selesai jika jaringan yang ada sudah lunak. Ciri-ciri tulang terdekalsifikasi ialah strukturnya menjadi fleksibel, transparan, dan mudah ditusuk/digores (Muntiha, 2001)

Tahap yang kedua dilakukan pemrosesan jaringan yaitu dehidrasi, *clearing* dan impregnasi menggunakan alat *tissue processing* (Tissue-Tek). Dehidrasi jaringan dimaksudkan untuk mengeluarkan air yang terkandung dalam jaringan dengan menggunakan cairan dehidran seperti etanol atau iso propyl alkohol. Cairan dehidran kemudian dibersihkan dari dalam jaringan dengan menggunakan

reagen pembersih (*clearing agent*) yaitu xylol. Reagen pembersih ini akan diganti dengan parafin dengan cara dimasukkan dalam larutan parafin cair sehingga parafin terpenetrasi ke dalam jaringan; proses ini disebut impregnasi. Parafin yang digunakan mempunyai titik cair 56-58°C (Sakura Finetek Japan, 2018)

Tahap yang ketiga adalah pembuatan blok jaringan (*embedding*). *Embedding* adalah proses penanaman jaringan ke dalam suatu bahan *embedding* meliputi *paraffin*, *cellulose*, dan *tissue text*. Pada penelitian ini menggunakan paraffin TD (56⁰ – 60⁰ C). Tahapan *embedding* yaitu menyiapkan kaset dan *base mould*, jaringan yang berada di dalam *embedding cassette* dipindahkan ke dalam dasar *base mold* dengan menggunakan pinset, letakkan kaset diatas base mould yang sudah terisi jaringan, kemudian diisi dengan parafin cair (Anondo, 2015).

Tahapan selanjutnya dilakukan proses pemotongan jaringan dengan menyiapkan pisau mikrotom yang dibersihkan terlebih dahulu menggunakan kasa atau kertas saring yang dibasahi dengan *xylol* arah tegak lurus. Kemudian, mengatur ketebalan sayatan mikrotom yaitu 5 mikron. Pemotongan jaringan dilakukan dengan arah bukal-palatal pada jaringan yang telah diletakkan pada holder mikrotom. Potongan jaringan yang diperlukan adalah terdapat bentukan gigi dan tulang alveolar utuh. Potongan jaringan yang telah memenuhi kriteria, diambil dengan kuas dan diletakkan di atas permukaan air *waterbath* dengan temperatur 56⁰-58⁰C hingga sayatan jaringan mekar. Sayatan yang telah mekar diambil dengan obyek glass kemudian dikeringkan di atas hot plate, dan dimasukkan dalam oven dengan suhu sekitar 30⁰-35⁰C minimal selama 12 jam (Tim Patologi Anatomi FKG UNEJ, 2007).

Prosedur selanjutnya yaitu pengecatan jaringan dengan *Haematoksilin Eosin* (HE) dan imunohistokimia. Sediaan dilakukan deparafinisasi preparat menggunakan larutan *xylol* sebanyak tiga kali, masing-masing selama 10 menit. Rehidrasi menggunakan etanol absolut sebanyak 3 kali, masing-masing selama 10 menit kemudian inkubasi preparat selama 24 jam dengan suhu 3⁰C. Keluarkan preparat hingga uap menghilang. Cuci preparat menggunakan aquadest sebanyak tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Pengecatan dengan *Haematoksilin Eosin* (HE) menggunakan *Mayer's Hematoylin* selama 15 menit kemudian

cuci dengan air mengalir selama 20 menit. Beri Eosin selama 15 detik – 2 detik. Dehidrasi menggunakan alkohol 95% dan alkohol absolut selama 2-3 menit. *Clearing* menggunakan xylol selama 3 menit. Mounting menggunakan entelan. Pengecatan imunohistokimia dilakukan setelah deparafinisasi dan rehidrasi, bersihkan *object glass* kemudian tetesi preparat dengan *peroxidase blocking solution* sebanyak 2 tetes kemudian inkubasi pada suhu ruang selama 40 menit. Cuci preparat menggunakan *phosphate buffer saline* (PBS) sebanyak tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Bersihkan *object glass* kemudian tetesi preparat dengan *prediluted blocking serum* sebanyak 100 μ l menggunakan mikropipet kemudian inkubasi dengan suhu 3⁰C selama 24 jam. Cuci preparat menggunakan *phosphate buffer saline* (PBS) sebanyak tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Rendam preparat dalam antibodi monoklonal TNF- α (abbiotec Cat. No.: 251690) dengan dilusi 1:100 sebanyak 80 μ l menggunakan mikropipet kemudian inkubasi dengan suhu 3⁰C selama 24 jam. Cuci preparat dengan *phosphatase buffer saline* (PBS) sebanyak tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Rendam preparat dengan antibodi sekunder sebanyak 2 tetes kemudian inkubasi pada suhu ruang selama 60 menit. Cuci preparat dengan *phosphatase buffer saline* (PBS) sebanyak tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Rendam preparat dengan *horseradish peroxidase* (HRP) sebanyak 2 tetes kemudian inkubasi pada suhu ruang selama 40 menit. Cuci preparat dengan *phosphatase buffer saline* (PBS) selama 5 menit. Aliri preparat dengan *aquadest*. Rendam preparat dengan *diaminobenzidine tetrahydrochloride* (DAB) sebanyak 100 μ l menggunakan mikropipet selama 15 menit kemudian bilas dengan *aquadest*. Tetesi preparat dengan *hematoxylin* selama 2 menit sebanyak 2 tetes. Cuci preparat dengan air mengalir. Inkubasi pada suhu 60⁰C selama 24 jam Bersihkan preparat lalu tetesi dengan *mounting media* kemudian ditutup dengan *cover glass*.

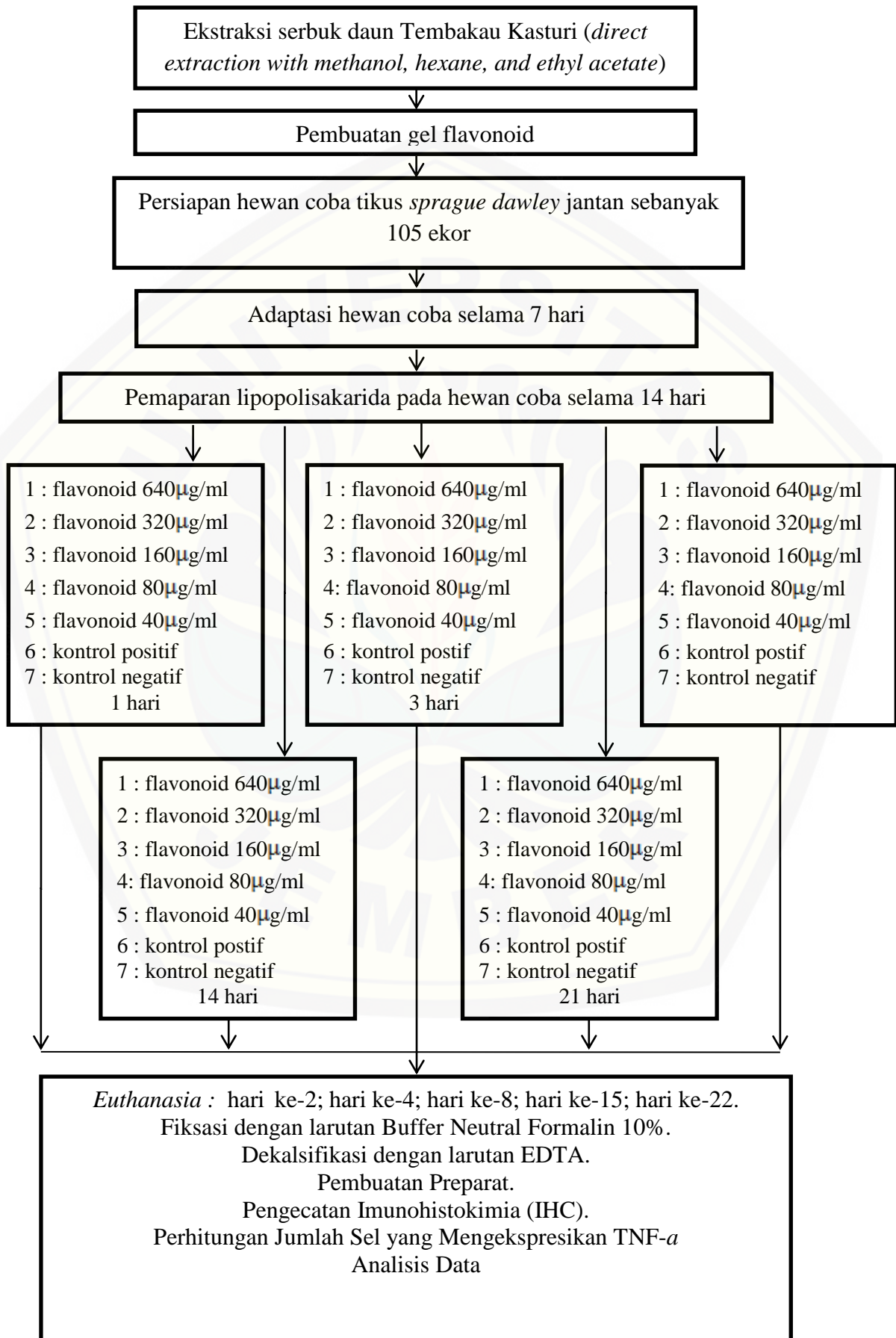
Tahapan yang terakhir adalah pengamatan sel inflamasi yang terdapat ekspresi TNF- α dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x pada sel inflamasi (neutrofil, makrofag, limfosit) pada gingiva bagian palatal daerah sulkus gingiva yang terekspresi TNF- α . Pengamatan diamati oleh 3 pengamat untuk menghindari subjektivitas.

3.11 Analisis Data

Pada penelitian ini, data yang didapat dianalisis menggunakan uji normalitas Kolmogorov Smirnov dan uji homogenitas Levene. Data selanjutnya dilakukan uji MANOVA (*Multivariate ANOVA*). Uji Post Hoc dilakukan dengan uji *Games-Howell*.



3.12 Alur Penelitian



BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Gel flavonoid daun tembakau kasturi dapat menurunkan TNF- α pada sel inflamasi jaringan periodontal tikus periodontitis. Semakin tinggi konsentrasi gel flavonoid daun tembakau kasturi, maka semakin rendah sel inflamasi yang mengekspresikan TNF- α .

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka peneliti dapat memberikan saran sebagai berikut :

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai besar ekspresi TNF- α yang dikeluarkan akibat pemberian gel flavonoid daun tembakau kasturi.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh gel flavonoid terhadap ekspresi sitokin selain TNF- α .

DAFTAR PUSTAKA

- Ambari, E. 2003. Deteksi Antigen Toxoplasma dengan teknik Imunohistokimia pada Abortus Spontan. *Tesis*. Fakultas Kedokteran. Semarang.
- Andriani, I. 2012. Efektivitas antara *scaling root planing* (srp) dengan dan tanpa pemberian ciprofloxacin per oral pada penderita periodontitis. *IDJ*. 1(2): 70-81.
- Anondo, I.K. 2015. Teknik Praktis untuk Jaringan Sel. Bali: CV Dharma Sandi.
- Arakawa, H., Maeda, M., Akabo, S., Shimamura, T. 2004. Role Of Hidrogen Peroxide In Bacterial Action Of Catechin, *Bio Pharm Bull*: 27: 277-81.
- Ardhiarisca, O., Merry, M.D.U., Tanti, K. 2015. The Formulation of Development Strategy Tobacco agroindustrial in Jember Using SWOT Analysis. *Jurnal Teknologi Pertanian*. 16(1)
- 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
- Badan Pusat Statistik Kabupaten Jember, <https://jemberkab.bps.go.id/statictable/2015/03/12/79/luas-panen-rata-rataproduksi-dan-total-produksi-tembakau-voor-oogst-kasturi-menurutkecamatan-2013.html> (diakses pada 15 April 2018).
- Bakht, J., Azra., dan M. Shafi. 2012. Antimicrobial activity of nicotiana tabacum using different solvents extracts. Pakistan: Khyber Pukhtum Khwa Agricultural University. 44(1): 459-463.
- Balittas. 2014. <http://balittas.litbang.pertanian.go.id/index.php/produk/varietas-unggul/tembakau>. (diakses pada 16 April 2018)
- Baratawidjaya, K.G, Rengganis, I. 2010. *Imunologi Dasar (Edisi ke 9)*. Jakarta:FKUI; p.

226.

- Chekalina, N., Burmak, Y., Petrov, Y., Borisova, Z., Manusha, Y., Kazakov, Y., et al. 2018. Quercetin reduces the transcriptional activity of NF- κ B in stable coronary artery disease. *Indian Heart J.* 70, 593–597.
- Chinnam, N., Dadi, P. K., Sobri, S. A., Ahmad, M., Kabir, M. A., Ahmad, Z. 2010. Dietary Bioflavonoids Inhibit Escherichia Coli ATP Synthase In A Differential Manner, *Int J Bio Macromol*: 46: 478-86.
- 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 AntiInflammatory Effects of Clinacanthus nutans Lindau Extracts: Inhibition of Cytokine Production and Toll-Like Receptor-4 Activation. *Front Pharmacol*, 7 : 7.
- Cushnie, T.P., dan Lamb, A. J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26: 343–356.
- Dinas Perkebunan Provinsi Jawa Timur. 2013. *Mekanisme Pengolahan Tanah dan Pasca Panen Tembakau Kasturi. Januari*. Surabaya: Dinas Perkebunan Provinsi Jawa Timur.
- Djajadi, 2015. Tobacco Diversity In Indonesia. *Journal of Biological Research*. 20: 27-32
- Dos Santos., M. Almeida, M. Lopes, dan Souza. 2006. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 29:2236 – 2240.
- Effendi, Z. 2003. Peranan Leukosit Sebagai Anti Inflamasi Alergik dalam Tubuh. Sumatera Utara: Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara
- Etten V. 2015. *Recommended Methods Of Anesthesia, Analgesia, And Euthanasia For Laboratory Animal Species*. Albert Einstein College Of Medicine Institute For Animal Studies
- Fassihi A., Sabet R., 2008, Qsar study of p56lck protein tyrosine kinase inhibitory activity

- of flavonoids derivatives using MLR and GA-PLS. *Int.J.Mol.Sci*,1876-1892
- Fathiazad, F., A. Delazar., R. Amiri., dan S. D. Sarker. 2006. Extraction of Flavonoids and Quantification of Rutin from waste Tobacco Leaves. *Iranian Journal of Pharmaceutical*. 3: 222-227.
- Fatimah, I. 2016. Pengaruh Ekstrak Flavonoid Rendah Nikotin Limbah Daun Tembakau Kasturi (*Nicotiana Tabacum L.*) Terhadap Pertumbuhan Mikroba Rongga Mulut. *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.
- Garlet, G. P. 2010. Destructive and Protective Roles of Cytokines in Periodontitis: A Re-appraisal from Host Defense and Tissue Destruction Viewpoints, *J Dent Res*. 89(12):1349-1363
- Gomez, 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.
- Gradisar, H., Pristovsek,P., Plaper, A., Jeralar, R. 2007. Greentea Catechins Inhibit Bacterial DNA Gyrase by Interaction With Its ATP Binding Site. *J Med Chem*: 50: 264-71
- Gumus, P. 2016. The Role of TLRs in The Pathogenesis Of Periodontal Diseases. *J.Dent. Sci. Ther*. 1(1): 3-6.
- Hajishengallis, G., Darveau, R.P., Curtis, M.A. 2012. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol*. 10(10):717-25.
- Halim, O., Revianti, S., Wedarti, Y.R. 2015. Pengaruh Pemberian Ekstrak *Nannochloropsis oculata* Terhadap Penurunan Kadar TNF- α pada Tikus yang Diinduksi Bakteri *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Jurnal Kedokteran Gigi Denta*. 9(1)
- 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.
- Hanum, C. 2008. *Teknik Budidaya Tanaman*. Departemen Pendidikan Nasional. Jakarta

- Haveles, E.B. 2007. *Applied Pharmacology for The Dental Hygienist. 5th Ed. Missouri: Mosby Elsevier*
- Havsteen, B. H. 2002. The Biochemistry and Medical Significance Of The Flavonoids, *Pharmacol Ther: 29: 67-202.*
- Herminingsih, Hesti. 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.*
- Horiuchi, T., Mitoma, H., Harashima, S., Tsukamoto, H., Shimoda, T. 2010. Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford). 49(7): 1215–1228.*
- 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.*
- Hussain T., B. Tan, Y. Yin, F. Blachier, M. C. B. Tossou, dan N. Rahu. 2016. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us?. *Hindawi Publishing Corporation. 16:1-9.*
- Jantrawut, P., Phongpradist R., Muller, M., Viernstein, H., 2017. Enhancement of anti-inflammatory activity of polyphenolic flavonoid rutin by encapsulation. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences. 30(5):1521-1527*
- 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.
- 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.
- Kim, H., Son, K. H., Chang, H. W., dan Kang, S. S. 2004. Antiinflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences*. 96: 229–245.
- Kuczkowski J, Sakowicz-Burkiewicz M, Iżycka-Świeszewska E, Mikaszewski B, Pawełczyk T. 2011. Expression of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 α , interleukin-6 and interleukin-10 in chronic otitis media with bone osteolysis. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 73(2):93-9.
- Kumar, S., dan A. K. Pandey. 2013. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids. *The scientific world journal*.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Aster, J.C., 2015. *Buku Ajar Patologi Robbins*, Edisi 9, Elsevier Saunders, Singapura.
- Lipinski, B. 2011. Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease. *Review Article: Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 11: 1-9.
- 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.
- Lu, Y. C., C. Y. Wen, dan S. Pamela. 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 42: 145-151.
- Ma'at, S. 2009. *Toll-like Receptor (TLR)*. Cet.1. Surabaya:Airlangga University Press
- Mahanonda, R., dan S. Pichyangkul. 2007. Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. *Periodontology 2000*, 43: 41-55
- Marsh, P. D., M. V. Martin, M. A. O Lewis, dan D. W. Williams. 2009. *Oral Microbiology Fifth Edition*. St. Louis: Elsevier Saunders
- Meilawaty, Z and Kusumawardani, B. 2016. Effect of Cassave leaf flavonoid extract on

- TNF- α expressions in rat models suffering from periodontitis. *Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi)*. 49(3): 137–142
- Mitchell, L., D. A. Mitchell, dan L. McCaul. 2009. *Handbook of Clinical Dentistry 5TH Edition*. Oxford: Oxford University Press. Terjemahan oleh Purwanto dkk. 2012. Kedokteran Gigi Klinik Edisi 5. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Muntiha, M. 2001. *Teknik Pembuatan Histopatologi dari Jaringan Hewan dengan Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin (HE)*. Temu Teknis Fungsional Non Peneliti. Bogor: Balai Penelitian Veteriner.
- Murray, J.A and Wilton, J.M.A. 2003. LPS from Periodontal Pathogen P.Gingivalis Prevents Apoptosis of HL60-Derived Neutrophils In Vitro, *Infect Immun*.71(12)
- Navaro-Martinez, M. D., Navaro, Peran E., Cabezas-Herrera J., Ruiz-Gomez, J., Garcia-Canovas, F., Rodriguez-Lopez, J. N. 2005. Antifolate Activity Of Epigallocatechin Gallate Against *Stenotrophomonas maltophilia*, *Antimicrob Agent Chemother*: 49: 2941-20.
- Newman, M., H. H. Takei and F. A. Carranza. 2015. *Carranza's Clinical Periodontology*. 12TH Edition. St. Louis: Elsevier Saunders.
- Nieman DC, Henson DA, David M, Murphy EA, Jenkins DP, Gross SJ, Carmichael MD, Quindry JC, Dumke CL, Utter AC, McAnulty SR, McAnulty LS, Triplett NT, Mayer EP, 2007, Quercetin influence on exercise-induced changes in plasma cytokines and leukocyte cytokine mRNA. *Jappphysiol*, 1728-1735.
- 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., Nood, E.V., Hoorn, D.E.C., Boelens P.G., Norren K.V., dan Leeuwen, P.A.M. 2010. Flavonoids : A Review of Probable mechanisms of Action and Potential Application. *Am J Clin Nutr*. 74 : 418-425.
- Nizar, M. 2012. Pemberian Probiotik Terhadap Jumlah Sel Limfosit Gingiva Tikus Wistar Jantan Yang Diinduksi Lipopolisakarida *E. Coli*. *Skripsi*. Jember: Universitas

Jember.

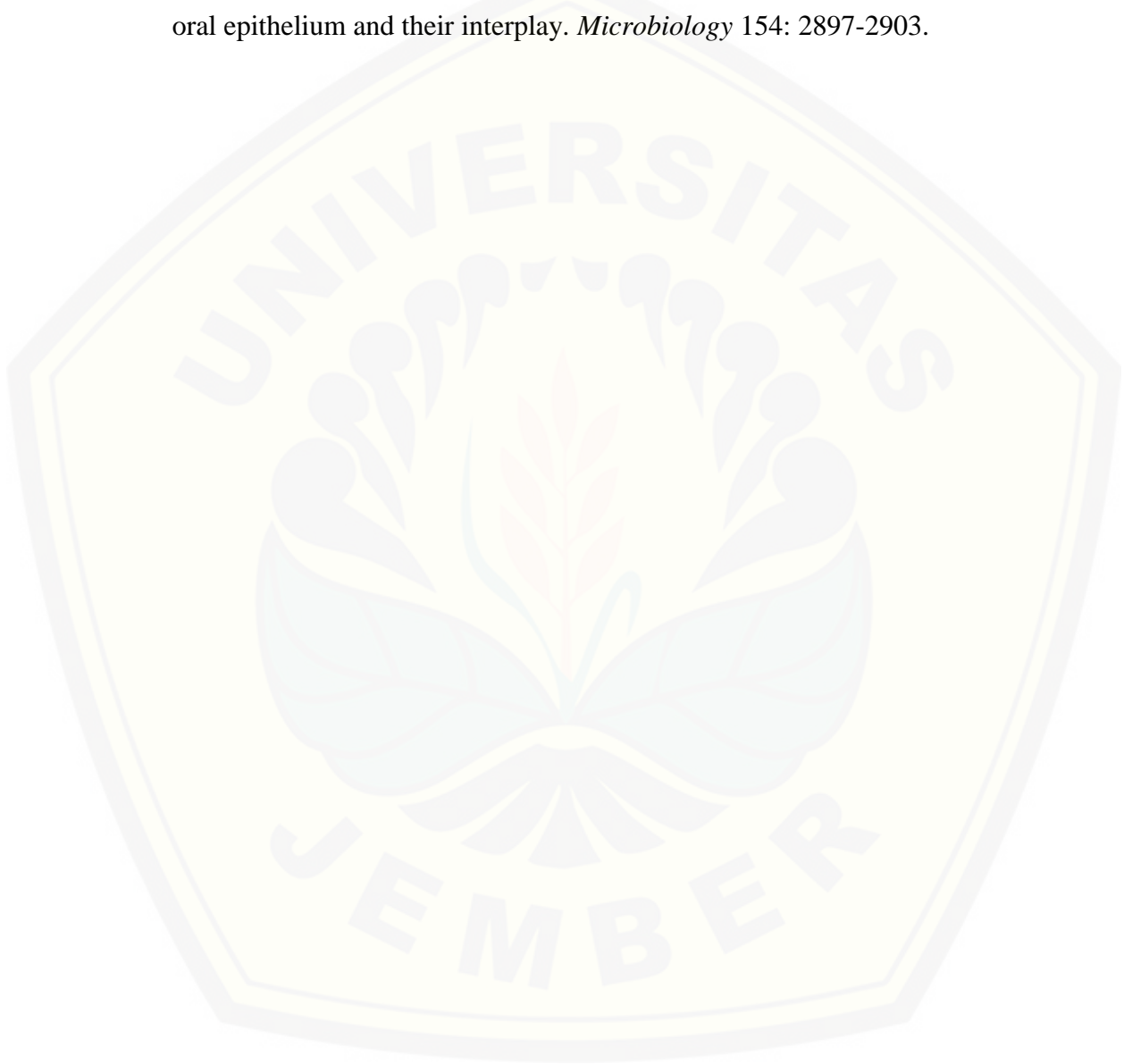
- Notoatmojo, S. 2010. *Metodologi Penelitian. (Edisi Revisi)*. Jakarta: PT. Rineka Pustaka
- Nurhidayat. 2002. *Deteksi Bahan Aktif dengan Metode Immunohistokimia*. Institut Pertanian Bogor: Bagian Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan.
- Ozaki, Y., T. Ukai, dan M. Yamaguchi. 2009. Locally administrated T cells from mice immunized with Lipopolysaccharide (LPS) accelerate LPS-induced bone resorption. *Bone*. 44(6): 1169-76.
- Panche, A.N., Diwan, A.D., Chandra, S.R. 2016. Flavonoids: an Overview. *J Nutr Sci*. 5:e47
- Rahmawati, A., Pargaputri, A.F., Karsini, I. 2018. Pengaruh Pemberian Ekstrak Alga Coklat Jenis *Sargassum Sp.* Terhadap Jumlah Makrofag Pada Proses Penyembuhan Ulkus Traumatikus. *Jurnal Kedokteran Gigi*. 12(1):72-81
- Rantam, F. A. 2003. *Metode Immunologi*. Surabaya: Airlangga University Press. 9- 80
- Reddy, S. 2011. *Essential of Clinical Periodontology and Periodontics*. 3rd Edition. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publisher.
- Redha, Abdi. Flavonoid: Struktur, 2010. Sifat Antioksidan dan Peranannya dalam Sistem Biologis. *Jurnal Berlian*. 9(2): 196-202.
- Rehman, M M., Salama, R P. 2004. Association between periodontal disease and cardiovascular disease. *Pakistan Journal of Medical Sciences*. 20(2)
- Roeslan B.O.2002. *Imunologi Oral. Kelainan di Dalam Rongga Mulut*. Jakarta. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Indonesia.
- Roudsari, F.V., Ayati, S., Ayatollahi, H., Esmaily, H., Hasanzadeh, M., Shahabian, M., Ali, L.P. 2009. Comparison of maternal serum Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) in severe and mild preeclampsia versus normal pregnancy. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. 7(4): 153-156
- Rusli, M. S., Suryani., dan Puspita, P. E. 2011. Antibacterial Activity of Temanggung

- Tobacco Extract Variety Genjah Kemloko. *Skripsi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Sabir A, 2003. Pemanfaatan flavonoid di bidang kedokteran gigi. *Maj Ked Gigi (Dental Journal)*; Edisi Khusus Temu Ilmiah Nasional III: 81–7.
- Saini, R., Saini, S., Sharma S. 2010. Nanotechnology: The Future Medicine. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*. 3(1):32-33
- Sakura Finetek Japan, 2018. Standar Operation Procedure (Tissue-Tek VIP 5 Jr.)
- Saraf, S. 2006. *Text Book of Oral Pathology. First Edition*. New Delhi: Jaypee Brother Medical Publisher Ltd
- Sari, F.P., dan M. S. Shofi. 2011. Ekstraksi zat aktif antimikroba dari tanaman yodium (*jatropha multifida linn*) sebagai bahan baku alternatif antibiotik alami. *Technical Report*. Universitas Diponegoro, Semarang.
- Setijanto, H. 2002. *Teknik Mempelajari Biologi Sel; Identifikasi Beberapa Substansi atau Senyawa yang Terlibat Dalam Metabolisme Sel*. Fakultas kedokteran hewan universitas airlangga. Surabaya
- Shiella, M.Y.M. 2012. Efek Pemberian Probiotik *Lactobacillus Casei* terhadap Jumlah Sel Polimorfonuklear Neutrofil Gingiva Tikus Wistar Jantan yang Diinduksi Lipopolisakarida. *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.
- Soekarno, Hari. 2008. *Identifikasi Potensi Dan Peluang Tembakau Di Wilayah Eks Karesidenan Besuki*. Lembaga Penelitian Universitas Jember. Jember
- Soeroso, Y., M. Octovia, dan R. Salim. 2014. *Perkembangan Terapi Periodontal Non Bedah Pada Periodontitis Kronis*. Jakarta: Badan Penerbit FKUI.
- Sonia, Sani. 2017. Pengaruh Ekstrak Flavonoid Daun Tembakau Kasturi Terhadap Ekspresi Toll-Like Receptor 4 pada Kultur Sel Osteoblas yang Dipapar Lipopolisakarida. *Skripsi*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Sudiana, I Ketut. 2005. *Teknologi Ilmu Jaringan dan Imunohistokimia*. Jakarta:Sagung Seto.36 – 47.

- Sudiono J. Kurniadhi B. Hendrawan A. Djimantoro. 2003. *Buku Ilmu patologi*. Jakarta : EGC: 81-93
- 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 Efektifitas Ekstrak Daun Tembakau sebagai Insektisida Penggerak Batang Padi (*Scirpophaga innonata*)". *Skripsi*. Semarang: Universitas Negeri Semarang.
- Taiga, A., dan Friday, E. 2009. Variations in Phytochemical Properties of Selected Fungicidal Aqueous Extracts of Some Plant Leaves in Kogi State, Nigeria. *AENSI*. 3 (3): 407-409.
- Takeda, K., dan S. Akira. 2005. Toll-Like Receptors in Innate Immunity. *Int. Immunol*, 17(1): 1-14.
- Takeda, K., dan S. Akira. 2005. Toll-Like Receptors in Innate Immunity. *Int. Immunol*, 17(1): 1-14
- Tim Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. 2007. *Petunjuk Praktikum Patologi Anatomi Degenerasi dan Inflamasi*. Jember. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Uematsu, S., dan S. Akira. 2008. *Toll-Like Receptors (TLRs) and Their Ligands*. Handbook of Experimental Pharmacology 183. 1-21.
- 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-κB 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.

Yilmaz, O. 2008. The chronocles of Porphyromonas gingivalis: the microbium, the human oral epithelium and their interplay. *Microbiology* 154: 2897-2903.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Alat dan Bahan Penelitian

1.1 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Gel Flavonoid Daun Tembakau Kasturi dan Metronidazole



Daun Tembakau Kering



Propilenglicol 3%



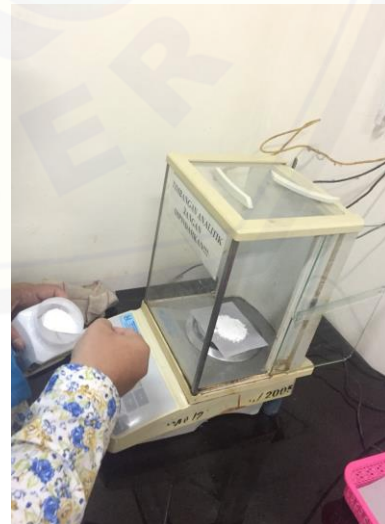
TEA 3%



Carbopol 1%



Aquadest



Timbangan Analitik



Blender



Serbuk Daun
Tembakau Kasturi



DMSO



Metronidazole

1.2 Alat dan Bahan Hewan Coba dan Dekalsifikasi Jaringan



Tikus *Sprague-Dawley*



Tempat Jaringan



EDTA

1.3 Alat dan Bahan Pemrosesan Jaringan dan Pembuatan Parafin Blok



Tissue Processing



Inkubator



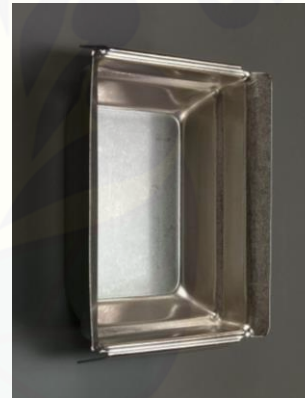
Freezer



Paraffin



Kaset



Base Mould

1.4 Alat dan Bahan Pembuatan Preparat



Mikrotom



Waterbath 37°C



Hot Plate

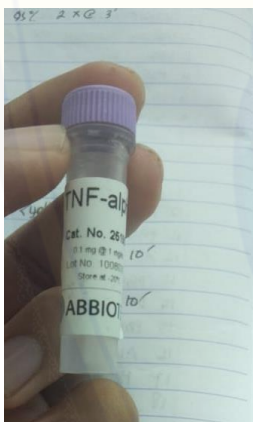


Object Glass



Xylol

1.5 Alat dan Bahan Pewarnaan Jaringan dan Pengamatan Preparat Jaringan



Antibodi TNF- α



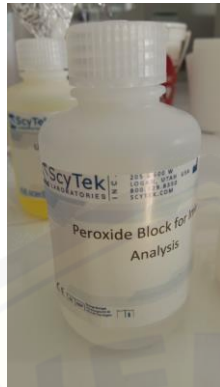
Oven



Mikropipet



Prediluted Blocking Serum



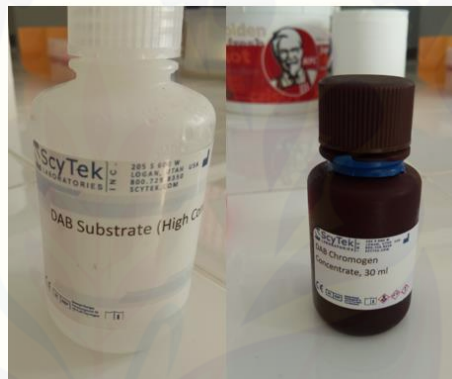
Peroxidase Blocking Solution



Antibodi Sekunder Biotin



Xylo dan Etanol Absolut



Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB)



Horseradish Peroxidase (HRP)



Mayer's Hematoxylin



Bluing Reagent



Entelan



Mikroskop Cahaya

1.6 Gambaran Radiografi Tikus Periodontitis



Resorpsi Tulang
Alveolar

Lampiran 2. Rata-rata Jumlah Sel inflamasi yang Mengekspresikan TNF- α

Kelompok	Pengamat			Jumlah	Rata-rata	Rata-rata Akhir
	1	2	3			
Hari ke-1						
1	21	20	21	62	20,66667	20,77778
1	22	20	21	63	21	
1	22	21	19	62	20,66667	
2	22	23	20	65	21,66667	21,88889
2	23	21	22	66	22	
2	22	23	21	66	22	
3	24	23	22	69	23	22,44444
3	22	22	22	66	22	
3	22	24	21	67	22,33333	
4	23	24	24	71	23,66667	22,88889
4	23	22	22	67	22,33333	
4	22	23	23	68	22,66667	
5	24	24	23	71	23,66667	23,11111
5	23	22	22	67	22,33333	
5	24	23	23	70	23,33333	
6	19	21	21	61	20,33333	19,77778
6	19	20	19	58	19,33333	
6	20	19	20	59	19,66667	
7	25	26	24	75	25	25,22222222

7	24	26	25	75	25	
7	26	25	26	77	25,66667	
Hari ke-3						
1	22	21	19	62	20,66667	20,44444
1	19	20	21	60	20	
1	21	21	20	62	20,66667	
2	23	21	21	65	21,66667	21,77778
2	22	21	22	65	21,66667	
2	23	22	21	66	22	
3	23	24	21	68	22,66667	22,11111
3	22	21	21	64	21,33333	
3	24	22	21	67	22,33333	
4	22	22	22	66	22	22,55556
4	23	23	22	68	22,66667	
4	24	23	22	69	23	
5	24	23	24	71	23,66667	22,88889
5	23	22	22	67	22,33333	
5	23	23	22	68	22,66667	
6	18	18	20	56	18,66667	19,22222
6	18	20	19	57	19	
6	20	20	20	60	20	
7	24	26	25	75	25	25
7	26	25	25	76	25,33333	

7	24	24	26	74	24,66667	
Hari ke-7						
1	20	20	19	59	19,66667	20,11111
1	21	21	21	63	21	
1	20	20	19	59	19,66667	
2	21	20	22	63	21	21,44444
2	22	23	21	66	22	
2	22	21	21	64	21,33333	
3	22	23	22	67	22,33333	21,88889
3	22	21	21	64	21,33333	
3	23	22	21	66	22	
4	22	21	22	65	21,66667	22,11111
4	22	24	21	67	22,33333	
4	23	22	22	67	22,33333	
5	22	22	23	67	22,33333	22,55556
5	23	22	22	67	22,33333	
5	24	23	22	69	23	
6	19	19	20	58	19,33333	18,77778
6	18	17	20	55	18,33333	
6	18	19	19	56	18,66667	
7	25	25	25	75	25	24,88889
7	26	24	24	74	24,66667	
7	25	24	26	75	25	

Hari ke-14						
1	19	20	19	58	19,33333	19,77778
1	20	19	21	60	20	
1	20	20	20	60	20	
2	21	20	22	63	21	21,11111
2	21	21	22	64	21,33333	
2	22	21	20	63	21	
3	23	21	21	65	21,66667	21,44444
3	23	21	21	65	21,66667	
3	22	21	20	63	21	
4	23	22	21	66	22	21,88889
4	23	23	21	67	22,33333	
4	22	21	21	64	21,33333	
5	22	23	23	68	22,66667	22,22222
5	23	21	22	66	22	
5	22	22	22	66	22	
6	18	19	19	56	18,66667	18,11111
6	18	18	19	55	18,33333	
6	17	17	18	52	17,33333	
7	24	24	25	73	24,33333	24,66667
7	25	25	24	74	24,66667	
7	26	24	25	75	25	

Hari ke-21						
1	20	19	19	58	19,33333	19,22222
1	19	19	20	58	19,33333	
1	18	20	19	57	19	
2	21	20	21	62	20,66667	20,88889
2	20	20	22	62	20,66667	
2	22	21	21	64	21,33333	
3	22	21	20	63	21	21,11111
3	22	23	21	66	22	
3	21	20	20	61	20,33333	
4	22	21	21	64	21,33333	21,55556
4	23	20	23	66	22	
4	20	22	22	64	21,33333	
5	23	22	23	68	22,66667	22
5	21	21	22	64	21,33333	
5	22	23	21	66	22	
6	18	18	19	55	18,33333	17,77778
6	17	17	18	52	17,33333	
6	18	17	18	53	17,66667	
7	25	23	26	74	24,66667	24,44444
7	25	25	23	73	24,33333	
7	26	23	24	73	24,33333	

Lampiran 3. Analisis Data

3.1 Uji Normalitas Kolmogorov-Smirnov

	Kelompok 1A	Kelompok 2A	Kelompok 3A	Kelompok 4A	Kelompok 5A	Kelompok 6A	Kelompok 7A	Kelompok 1B	Kelompok 2B
N	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Normal Parameters ^a									
Mean	20.7778	21.8889	22.4444	22.8889	23.1111	19.7778	25.2222	20.4444	21.7778
Std. Deviation	.19245	.19245	.50918	.69389	.69389	.50918	.38490	.38490	.19245
Most Extreme Differences									
Absolute	.385	.385	.253	.292	.292	.253	.385	.385	.385
Positive	.385	.282	.253	.292	.212	.253	.385	.282	.385
Negative	-.282	-.385	-.196	-.212	-.292	-.196	-.282	-.385	-.282
Kolmogorov-Smirnov Z	.667	.667	.438	.506	.506	.438	.667	.667	.667
Asymp. Sig. (2-tailed)	.766	.766	.991	.960	.960	.991	.766	.766	.766

a. Test distribution is Normal.

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

Kelompok 3B	Kelompok 4B	Kelompok 5B	Kelompok 6B	Kelompok 7B	Kelompok 1C	Kelompok 2C	Kelompok 3C	Kelompok 4C	Kelompok 5C	Kelompok 6C	Kelompok 7C	Kelompok 1D
3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
22.1111	22.5556	22.8889	19.2222	25.0000	20.1111	21.4444	21.8889	22.1111	22.5556	18.7778	24.8889	19.7778
.69389	.50918	.69389	.69389	.33333	.76980	.50918	.50918	.38490	.38490	.50918	.19245	.38490
.292	.253	.292	.292	.175	.385	.253	.253	.385	.385	.253	.385	.385
.212	.196	.292	.292	.175	.385	.253	.196	.282	.385	.253	.282	.282
-.292	-.253	-.212	-.212	-.175	-.282	-.196	-.253	-.385	-.282	-.196	-.385	-.385
.506	.438	.506	.506	.303	.667	.438	.438	.667	.667	.438	.667	.667
.960	.991	.960	.960	1.000	.766	.991	.991	.766	.766	.991	.766	.766

Kelompok 2D	Kelompok 3D	Kelompok 4D	Kelompok 5D	Kelompok 6D	Kelompok 7D	Kelompok 1E	Kelompok 2E	Kelompok 3E	Kelompok 4E	Kelompok 5E	Kelompok 6E	Kelompok 7E
3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
21.1111	21.4444	21.8889	22.2222	18.1111	24.6667	19.2222	20.8889	21.1111	21.5556	22.0000	17.7778	24.4444
.19245	.38490	.50918	.38490	.69389	.33333	.19245	.38490	.83887	.38490	.66667	.50918	.19245
.385	.385	.253	.385	.292	.175	.385	.385	.219	.385	.175	.253	.385
.385	.282	.196	.385	.212	.175	.282	.385	.219	.385	.175	.253	.385
-.282	-.385	-.253	-.282	-.292	-.175	-.385	-.282	-.189	-.282	-.175	-.196	-.282
.667	.667	.438	.667	.506	.303	.667	.667	.380	.667	.303	.438	.667
.766	.766	.991	.766	.960	1.000	.766	.766	.999	.766	1.000	.991	.766

3.2 Uji Homogenitas Levene

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

	F	df1	df2	Sig.
kelompok1	4.615	4	10	.023
kelompok2	2.000	4	10	.171
kelompok3	.587	4	10	.680
kelompok4	.566	4	10	.693
kelompok5	.561	4	10	.696
kelompok6	.312	4	10	.864
kelompok7	.583	4	10	.682

3.3 Uji Multivariate Anova (MANOVA)

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
hari	kelompok1	4.341	4	1.085	5.635	.012
	kelompok2	2.178	4	.544	5.250	.015
	kelompok3	3.363	4	.841	2.270	.134
	kelompok4	3.363	4	.841	3.243	.060
	kelompok5	2.519	4	.630	1.848	.196
	kelompok6	7.896	4	1.974	5.670	.012
	kelompok7	1.081	4	.270	3.042	.070

3.4 Uji Games-Howell

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(i) kelompok	(j) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
harike1	640%	320%	-1.1111'	.15713	.015	-1.8947	-.3275
		160%	-1.6667	.31427	.090	-3.8112	.4778
		80%	-2.1111	.41574	.116	-5.2427	1.0204
		40%	-2.3333	.41574	.094	-5.4649	.7982
		metronidazole	1.0000	.31427	.264	-1.1445	3.1445
		kontrol negatif	-4.4444'	.24845	.002	-5.9564	-2.9325
	320%	640%	1.1111'	.15713	.015	.3275	1.8947
		160%	-.5556	.31427	.637	-2.7001	1.5890
		80%	-1.0000	.41574	.441	-4.1316	2.1316
		40%	-1.2222	.41574	.323	-4.3538	1.9093
		metronidazole	2.1111	.31427	.052	-.0334	4.2556
		kontrol negatif	-3.3333'	.24845	.005	-4.8452	-1.8214
	160%	640%	1.6667	.31427	.090	-.4778	3.8112
		320%	.5556	.31427	.637	-1.5890	2.7001
		80%	-.4444	.49690	.954	-3.0475	2.1586
		40%	-.6667	.49690	.808	-3.2697	1.9364
		metronidazole	2.6667'	.41574	.021	.5934	4.7399
		kontrol negatif	-2.7778'	.36851	.014	-4.6918	-.8638
	80%	640%	2.1111	.41574	.116	-1.0204	5.2427
		320%	1.0000	.41574	.441	-2.1316	4.1316
		160%	.4444	.49690	.954	-2.1586	3.0475
		40%	-.2222	.56656	.999	-3.0476	2.6031
		metronidazole	3.1111'	.49690	.028	.5081	5.7141
		kontrol negatif	-2.3333	.45812	.072	-4.9996	.3329
40%	640%	2.3333	.41574	.094	-.7982	5.4649	
	320%	1.2222	.41574	.323	-1.9093	4.3538	
	160%	.6667	.49690	.808	-1.9364	3.2697	

	80%		.2222	.56656	.999	-2.6031	3.0476	
	metronidazole		3.3333'	.49690	.022	.7303	5.9364	
	kontrol negatif		-2.1111	.45812	.094	-4.7774	.5552	
metronidazole	640%		-1.0000	.31427	.264	-3.1445	1.1445	
	320%		-2.1111	.31427	.052	-4.2556	.0334	
	160%		-2.6667'	.41574	.021	-4.7399	-.5934	
	80%		-3.1111'	.49690	.028	-5.7141	-.5081	
	40%		-3.3333'	.49690	.022	-5.9364	-.7303	
	kontrol negatif		-5.4444'	.36851	.001	-7.3584	-3.5305	
	kontrol negatif	640%		4.4444'	.24845	.002	2.9325	5.9564
	320%		3.3333'	.24845	.005	1.8214	4.8452	
	160%		2.7778'	.36851	.014	.8638	4.6918	
	80%		2.3333	.45812	.072	-.3329	4.9996	
	40%		2.1111	.45812	.094	-.5552	4.7774	
	metronidazole		5.4444'	.36851	.001	3.5305	7.3584	
harike3	640%	320%		-1.3333	.24845	.070	-2.8452	.1786
		160%		-1.6667	.45812	.170	-4.3329	.9996
		80%		-2.1111'	.36851	.036	-4.0251	-.1971
		40%		-2.4444	.45812	.064	-5.1107	.2218
		kontrol negatif		1.2222	.45812	.333	-1.4440	3.8885
	320%	640%		1.3333	.24845	.070	-.1786	2.8452
		160%		-.3333	.41574	.965	-3.4649	2.7982
		80%		-.7778	.31427	.409	-2.9223	1.3667
		40%		-1.1111	.41574	.377	-4.2427	2.0204
		kontrol negatif		2.5556	.41574	.078	-.5760	5.6871
	160%	640%		1.6667	.45812	.170	-.9996	4.3329
		320%		.3333	.41574	.965	-2.7982	3.4649
		80%		-.4444	.49690	.954	-3.0475	2.1586
		40%		-.7778	.56656	.796	-3.6031	2.0476
	metronidazole		2.8889'	.56656	.046	.0635	5.7143	
	kontrol negatif		-2.8889'	.44444	.044	-5.6404	-.1374	
	80%		2.1111	.36851	.036	-.1971	4.0251	
	320%		.7778	.31427	.409	-1.3667	2.9223	
	160%		.4444	.49690	.954	-2.1586	3.0475	
	40%		-.3333	.49690	.987	-2.9364	2.2697	
	metronidazole		3.3333'	.49690	.022	.7303	5.9364	
	kontrol negatif		-2.4444'	.35136	.023	-4.3574	-.5315	
40%	640%	320%		2.4444	.45812	.064	-.2218	5.1107
		320%		1.1111	.41574	.377	-2.0204	4.2427
		160%		.7778	.56656	.796	-2.0476	3.6031
		80%		.3333	.49690	.987	-2.2697	2.9364
		kontrol negatif		3.6667'	.56656	.020	.8413	6.4920
	metronidazole	640%		-1.2222	.45812	.333	-3.8885	1.4440
		320%		-2.5556	.41574	.078	-5.6871	.5760
		160%		-2.8889'	.56656	.046	-5.7143	-.0635
		80%		-3.3333'	.49690	.022	-5.9364	-.7303
		40%		-3.6667'	.56656	.020	-6.4920	-.8413
	kontrol negatif		-5.7778'	.44444	.007	-8.5293	-3.0262	
kontrol negatif	640%		4.5556'	.29397	.001	3.0731	6.0380	
	320%		3.2222'	.22222	.003	1.9505	4.4939	
	160%		2.8889'	.44444	.044	.1374	5.6404	
	80%		2.4444'	.35136	.023	.5315	4.3574	
	40%		2.1111	.44444	.098	-.6404	4.8626	
	metronidazole		5.7778'	.44444	.007	3.0262	8.5293	
harike7	640%	320%		-1.3333	.53287	.361	-4.2234	1.5568
		160%		-1.7778	.53287	.192	-4.6679	1.1123
		80%		-2.0000	.49690	.142	-5.0238	1.0238
		40%		-2.4444	.49690	.087	-5.4683	.5794
		kontrol negatif		1.3333	.53287	.361	-1.5568	4.2234
	320%	640%		-4.7778'	.45812	.026	-8.3172	-1.2383
		640%		1.3333	.53287	.361	-1.5568	4.2234
		160%		-.4444	.41574	.910	-2.5177	1.6288
		80%		-.6667	.36851	.603	-2.5807	1.2473
		40%		-1.1111	.36851	.233	-3.0251	.8029

	metronidazole	2.6667'	.41574	.021	.5934	4.7399	
	kontrol negatif	-3.4444'	.31427	.016	-5.5890	-1.2999	
160%	640%	1.7778	.53287	.192	-1.1123	4.6679	
	320%	.4444	.41574	.910	-1.6288	2.5177	
	80%	-.2222	.36851	.993	-2.1362	1.6918	
	40%	-.6667	.36851	.603	-2.5807	1.2473	
	metronidazole	3.1111'	.41574	.012	1.0379	5.1844	
	kontrol negatif	-3.0000'	.31427	.022	-5.1445	-.8555	
80%	640%	2.0000	.49690	.142	-1.0238	5.0238	
	320%	.6667	.36851	.603	-1.2473	2.5807	
	160%	.2222	.36851	.993	-1.6918	2.1362	
	40%	-.4444	.31427	.778	-2.0117	1.1228	
	metronidazole	3.3333'	.36851	.008	1.4193	5.2473	
	kontrol negatif	-2.7778'	.24845	.009	-4.2897	-1.2659	
40%	640%	2.4444	.49690	.087	-.5794	5.4683	
	320%	1.1111	.36851	.233	-.8029	3.0251	
	160%	.6667	.36851	.603	-1.2473	2.5807	
	80%	.4444	.31427	.778	-1.1228	2.0117	
	metronidazole	3.7778'	.36851	.005	1.8638	5.6918	
	kontrol negatif	-2.3333'	.24845	.015	-3.8452	-.8214	
metronidazole	640%	-1.3333	.53287	.361	-4.2234	1.5568	
	320%	-2.6667'	.41574	.021	-4.7399	-.5934	
	160%	-3.1111'	.41574	.012	-5.1844	-1.0379	
	80%	-3.3333'	.36851	.008	-5.2473	-1.4193	
	40%	-3.7778'	.36851	.005	-5.6918	-1.8638	
	kontrol negatif	-6.1111'	.31427	.004	-8.2556	-3.9666	
kontrol negatif	640%	4.7778'	.45812	.026	1.2383	8.3172	
	320%	3.4444'	.31427	.016	1.2999	5.5890	
	160%	3.0000'	.31427	.022	.8555	5.1445	
	80%	2.7778'	.24845	.009	1.2659	4.2897	
	40%	2.3333'	.24845	.015	.8214	3.8452	
	metronidazole	6.1111'	.31427	.004	3.9666	8.2556	
harike14	640%	320%	-1.3333	.24845	.070	-2.8452	1.786
	160%	1.6667'	.31427	.044	-3.2339	3.2339	

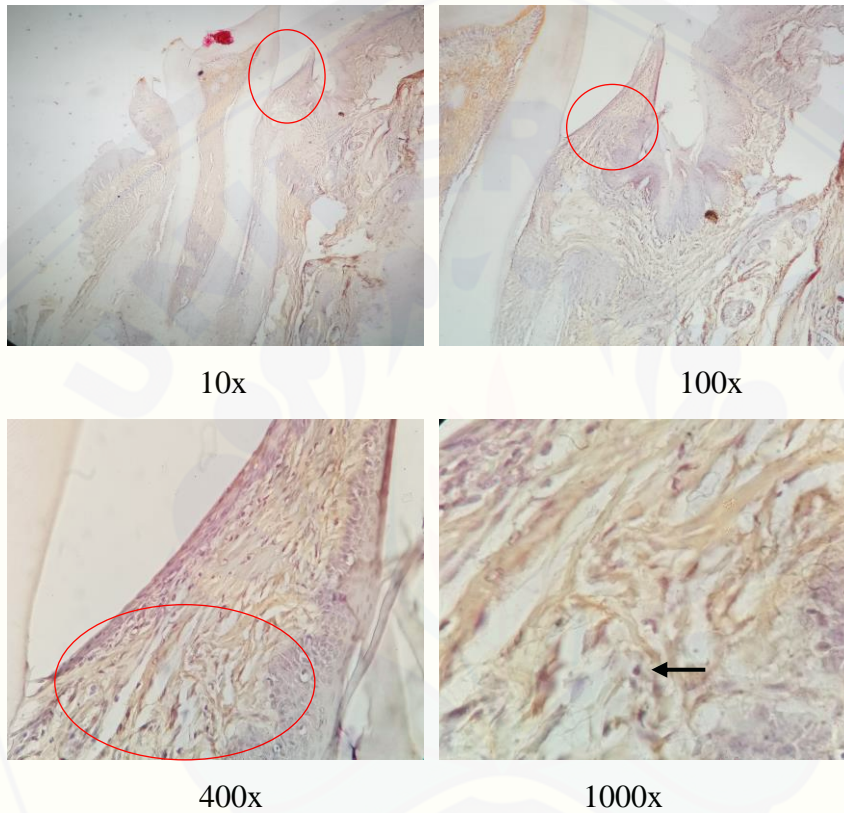
	80%	-1.6667'	.31427	.041	-3.2339	3.2339
	40%	-2.1111'	.36851	.036	-4.0251	-1.971
	metronidazole	-2.4444'	.31427	.010	-4.0117	-.8772
	kontrol negatif	1.6667	.45812	.170	-.9996	4.3329
	kontrol negatif	-4.8889'	.29397	.001	-6.3713	-3.4065
320%	640%	1.3333	.24845	.070	-1.786	2.8452
	160%	-.3333	.24845	.806	-1.8452	1.1786
	80%	-.7778	.31427	.409	-2.9223	1.3667
	40%	-1.1111	.24845	.110	-2.6230	.4008
	metronidazole	3.0000	.41574	.055	-.1316	6.1316
	kontrol negatif	-3.5556'	.22222	.002	-4.8273	-2.2838
160%	640%	1.6667'	.31427	.041	.0994	3.2339
	320%	.3333	.24845	.806	-1.1786	1.8452
	80%	-.4444	.36851	.862	-2.3584	1.4695
	40%	-.7778	.31427	.352	-2.3450	.7895
	metronidazole	3.3333'	.45812	.026	.6671	5.9996
	kontrol negatif	-3.2222'	.29397	.003	-4.7046	-1.7398
80%	640%	2.1111'	.36851	.036	.1971	4.0251
	320%	.7778	.31427	.409	-1.3667	2.9223
	160%	.4444	.36851	.862	-1.4695	2.3584
	40%	-.3333	.36851	.952	-2.2473	1.5807
	metronidazole	3.7778'	.49690	.015	1.1747	6.3808
	kontrol negatif	-2.7778'	.35136	.016	-4.6907	-.8648
40%	640%	2.4444'	.31427	.010	.8772	4.0117
	320%	1.1111	.24845	.110	-.4008	2.6230
	160%	.7778	.31427	.352	-.7895	2.3450
	80%	.3333	.36851	.952	-1.5807	2.2473
	metronidazole	4.1111'	.45812	.014	1.4448	6.7774
	kontrol negatif	-2.4444'	.29397	.009	-3.9269	-.9620
metronidazole	640%	-1.6667	.45812	.170	-4.3329	.9996
	320%	-3.0000	.41574	.055	-6.1316	.1316
	160%	-3.3333'	.45812	.026	-5.9996	-.6671
	80%	-3.7778'	.49690	.015	-6.3808	-1.1747
	40%	-4.1111'	.45812	.014	-6.7774	-1.4448

	kontrol negatif	-6.5556'	.44444	.005	-9.3071	-3.8040
kontrol negatif	640%	4.8889'	.29397	.001	3.4065	6.3713
	320%	3.5556'	.22222	.002	2.2838	4.8273
	160%	3.2222'	.29397	.003	1.7398	4.7046
	80%	2.7778'	.35136	.016	.8648	4.6907
	40%	2.4444'	.29397	.009	.9620	3.9269
	metronidazole	6.5556'	.44444	.005	3.8040	9.3071
harike21 640%	320%	-1.6667'	.24845	.038	-3.1786	-.1548
	160%	-1.8889	.49690	.213	-5.7987	2.0209
	80%	-2.3333'	.24845	.015	-3.8452	-.8214
	40%	-2.7778	.40062	.059	-5.7630	.2074
	metronidazole	1.4444	.31427	.124	-.7001	3.5890
	kontrol negatif	-5.2222'	.15713	.000	-6.0058	-4.4386
320%	640%	1.6667'	.24845	.038	.1548	3.1786
	160%	-.2222	.53287	.999	-3.5863	3.1419
	80%	-.6667	.31427	.471	-2.2339	.9006
	40%	-1.1111	.44444	.372	-3.6545	1.4323
	metronidazole	3.1111'	.36851	.010	1.1971	5.0251
	kontrol negatif	-3.5556'	.24845	.005	-5.0675	-2.0436
160%	640%	1.8889	.49690	.213	-2.0209	5.7987
	320%	.2222	.53287	.999	-3.1419	3.5863
	80%	-.4444	.53287	.962	-3.8085	2.9196
	40%	-.8889	.61864	.768	-4.0611	2.2833
	metronidazole	3.3333'	.56656	.043	.1570	6.5097
	kontrol negatif	-3.3333	.49690	.070	-7.2431	.5765
80%	640%	2.3333'	.24845	.015	.8214	3.8452
	320%	.6667	.31427	.471	-.9006	2.2339
	160%	.4444	.53287	.962	-2.9196	3.8085
	40%	-.4444	.44444	.926	-2.9879	2.0990
	metronidazole	3.7778'	.36851	.005	1.8638	5.6918
	kontrol negatif	-2.8889'	.24845	.008	-4.4008	-1.3770
40%	640%	2.7778	.40062	.059	-.2074	5.7630
	320%	1.1111	.44444	.372	-1.4323	3.6545
	160%	.8889	.61864	.768	-2.2833	4.0611
	80%	.4444	.44444	.926	-2.0990	2.9879
	metronidazole	4.2222'	.48432	.009	1.7138	6.7306
	kontrol negatif	-2.4444	.40062	.077	-5.4297	.5408
metronidazole	640%	-1.4444	.31427	.124	-3.5890	.7001
	320%	-3.1111'	.36851	.010	-5.0251	-1.1971
	160%	-3.3333'	.56656	.043	-6.5097	-.1570
	80%	-3.7778'	.36851	.005	-5.6918	-1.8638
	40%	-4.2222'	.48432	.009	-6.7306	-1.7138
	kontrol negatif	-6.6667'	.31427	.003	-8.8112	-4.5222
kontrol negatif	640%	5.2222'	.15713	.000	4.4386	6.0058
	320%	3.5556'	.24845	.005	2.0436	5.0675
	160%	3.3333	.49690	.070	-.5765	7.2431
	80%	2.8889'	.24845	.008	1.3770	4.4008
	40%	2.4444	.40062	.077	-.5408	5.4297
	metronidazole	6.6667'	.31427	.003	4.5222	8.8112

Lampiran 4. Hasil Gambar Preparat Histologi

Hari ke-1

Kelompok 1 : tikus yang dipapar LPS *P. gingivalis* selama 14 hari kemudian diberi gel flavonoid dengan konsentrasi 640 $\mu\text{g/ml}$.



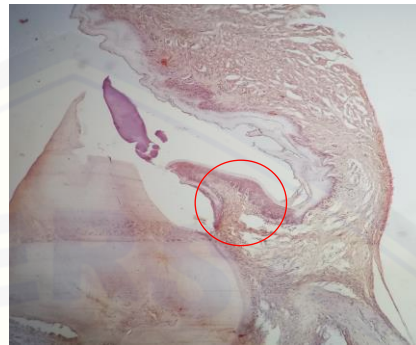
Keterangan :

- a) Tanda panah hitam : sel inflamasi , b) Lingkaran merah : daerah yang diamati

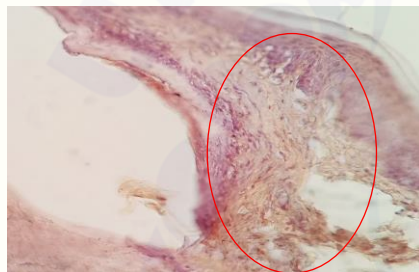
Kelompok 2 : tikus yang dipapar LPS *P. gingivalis* selama 14 hari kemudian diberi gel flavonoid dengan konsentrasi 320 µg /ml.



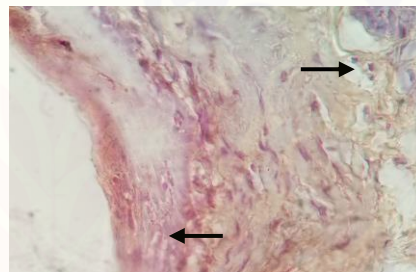
10x



100x



400x



1000x

Keterangan :

a) Tanda panah hitam : sel inflamasi , b) Lingkaran merah : daerah yang diamati

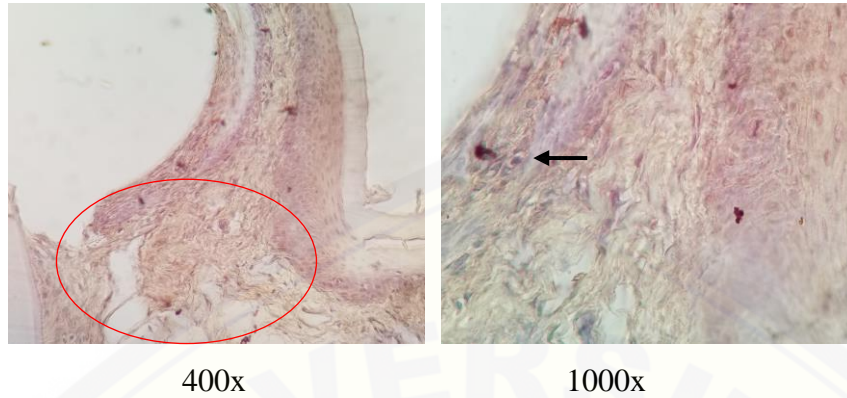
Kelompok 3 : tikus yang dipapar LPS *P. gingivalis* selama 14 hari kemudian diberi gel flavonoid dengan konsentrasi 160 µg /ml.



10x



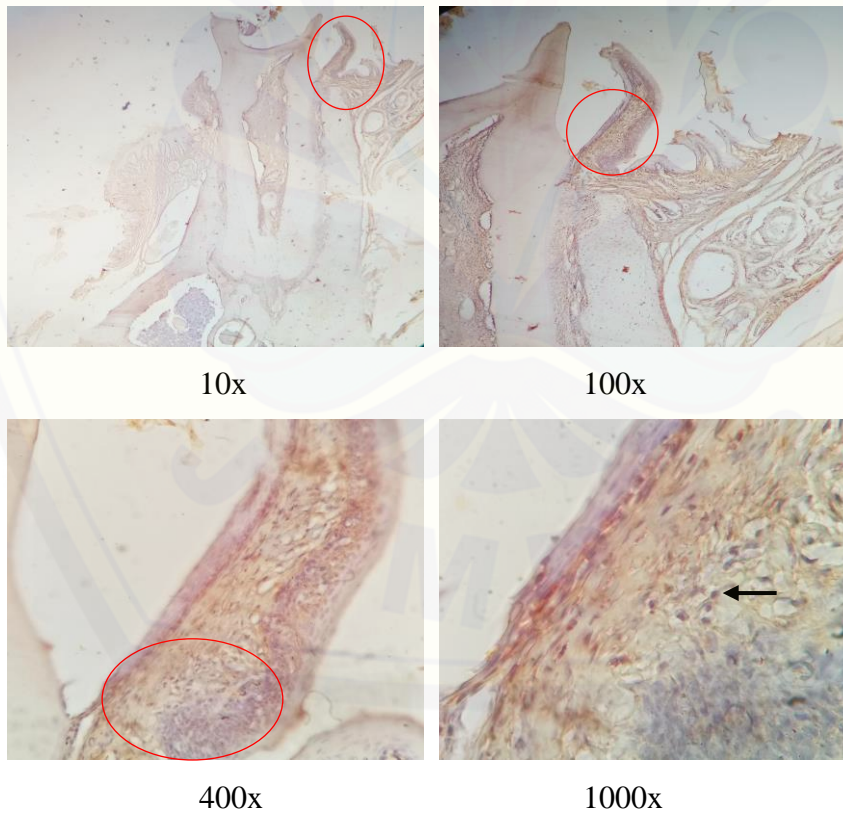
100x



Keterangan :

a) Tanda panah hitam : sel inflamasi , b) Lingkaran merah : daerah yang diamati

Kelompok 4 : tikus yang dipapar LPS *P. gingivalis* selama 14 hari kemudian diberi gel flavonoid dengan konsentrasi 80 $\mu\text{g/ml}$.



Keterangan :

a) Tanda panah hitam : sel inflamasi , b) Lingkaran merah : daerah yang diamati

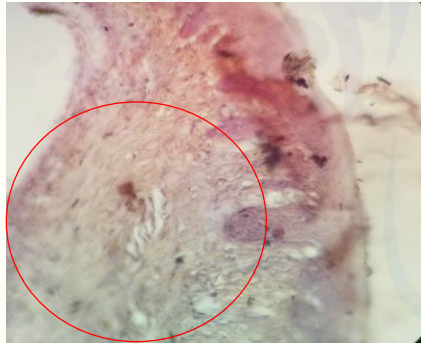
Kelompok 5 : tikus yang dipapar LPS *P. gingivalis* selama 14 hari kemudian diberi gel flavonoid dengan konsentrasi 40 µg /ml.



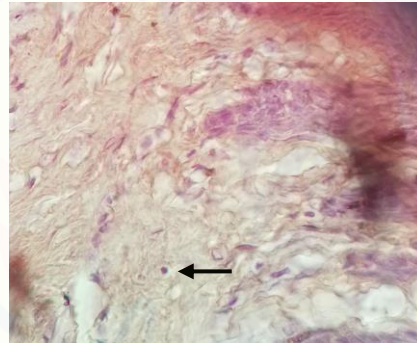
10x



100x



400x

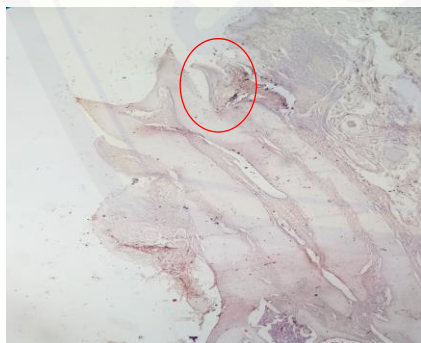


1000x

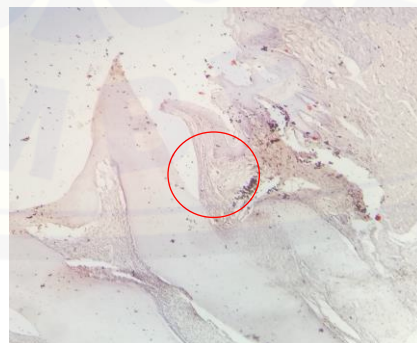
Keterangan :

a) Tanda panah hitam : sel inflamasi , b) Lingkaran merah : daerah yang diamati

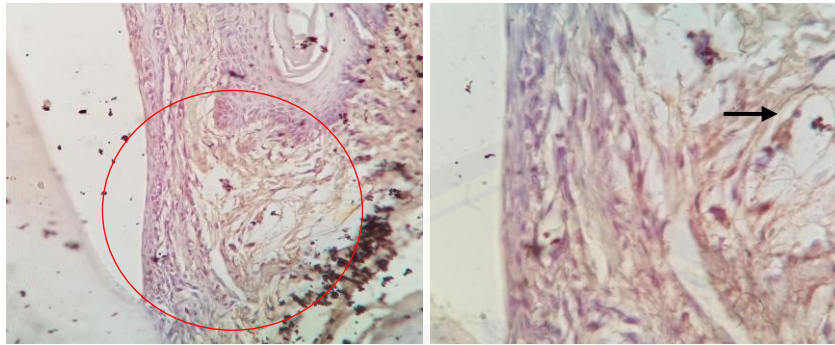
Kelompok 6 : tikus yang dipapar LPS *P. gingivalis* selama 14 hari kemudian diberi gel metronidazole 15%.



10x



100x



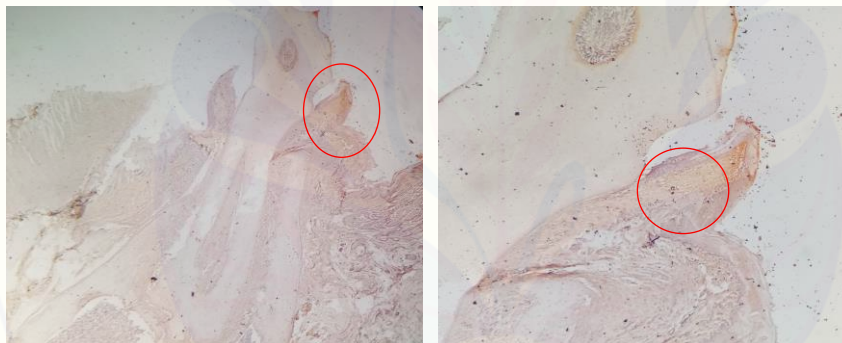
400x

1000x

Keterangan :

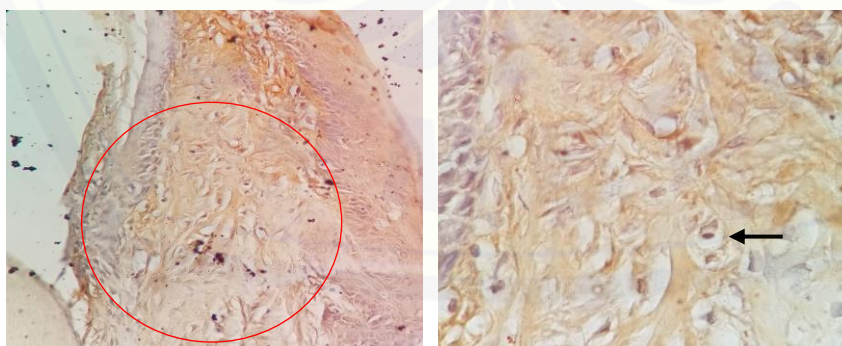
a) Tanda panah hitam : sel inflamasi , b) Lingkaran merah : daerah yang diamati

Kelompok 7 : tikus yang dipapar LPS *P. gingivalis* selama 14 hari tanpa diberi gel flavonoid.



10x

100x



400x

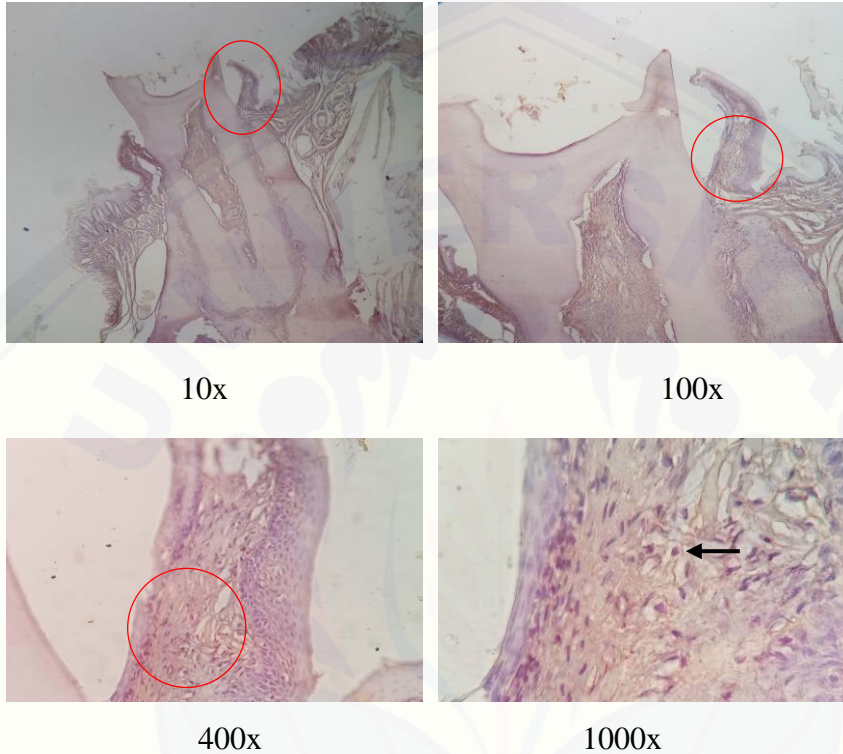
1000x

Keterangan :

a) Tanda panah hitam : sel inflamasi , b) Lingkaran merah : daerah yang diamati

Hari ke-3

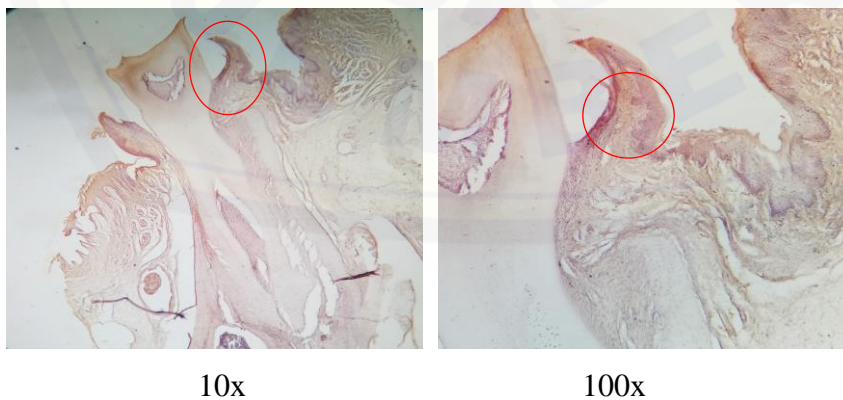
Kelompok 1 : tikus yang dipapar LPS *P. gingivalis* selama 14 hari kemudian diberi gel flavonoid dengan konsentrasi 640 $\mu\text{g/ml}$.

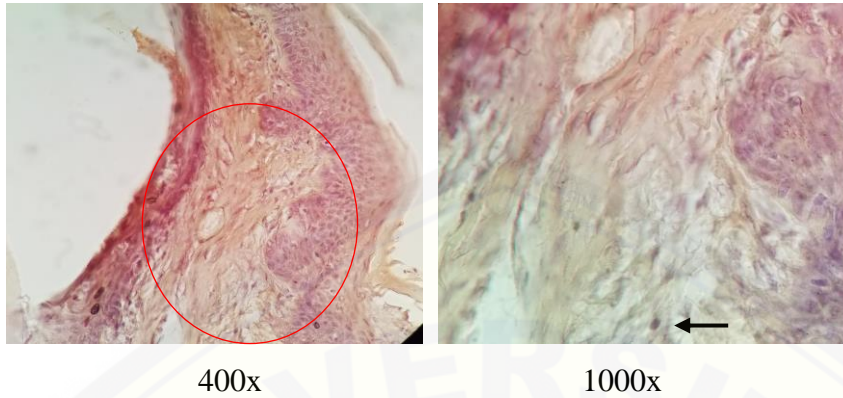


Keterangan :

a) Tanda panah hitam : sel inflamasi , b) Lingkaran merah : daerah yang diamati

Kelompok 2 : tikus yang dipapar LPS *P. gingivalis* selama 14 hari kemudian diberi gel flavonoid dengan konsentrasi 320 $\mu\text{g/ml}$.

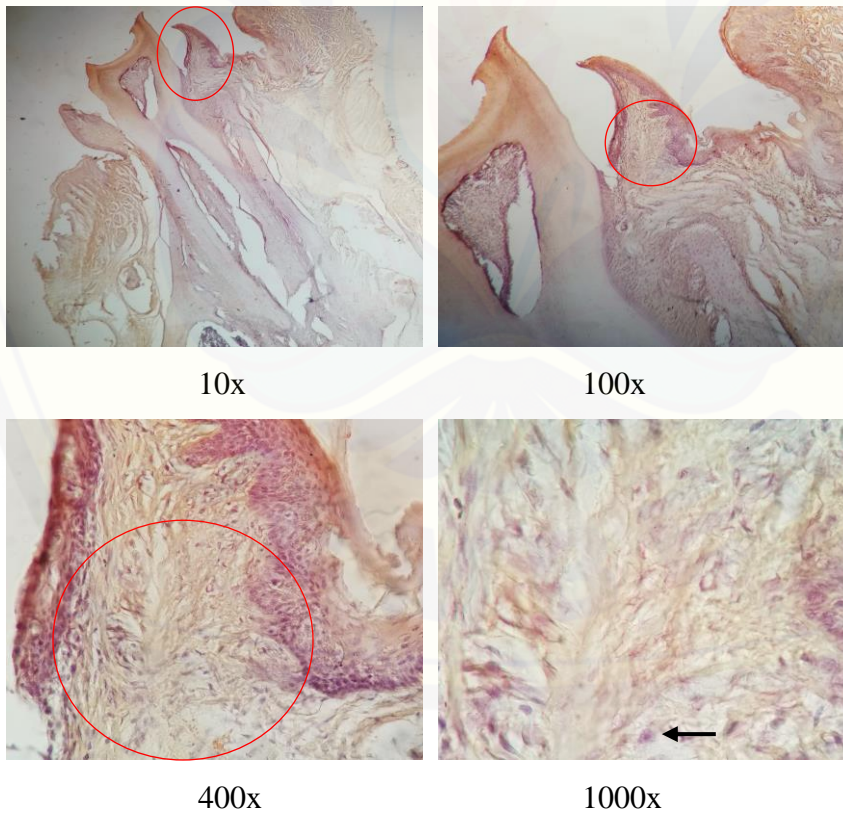




Keterangan :

- a) Tanda panah hitam : sel inflamasi , b) Lingkaran merah : daerah yang diamati

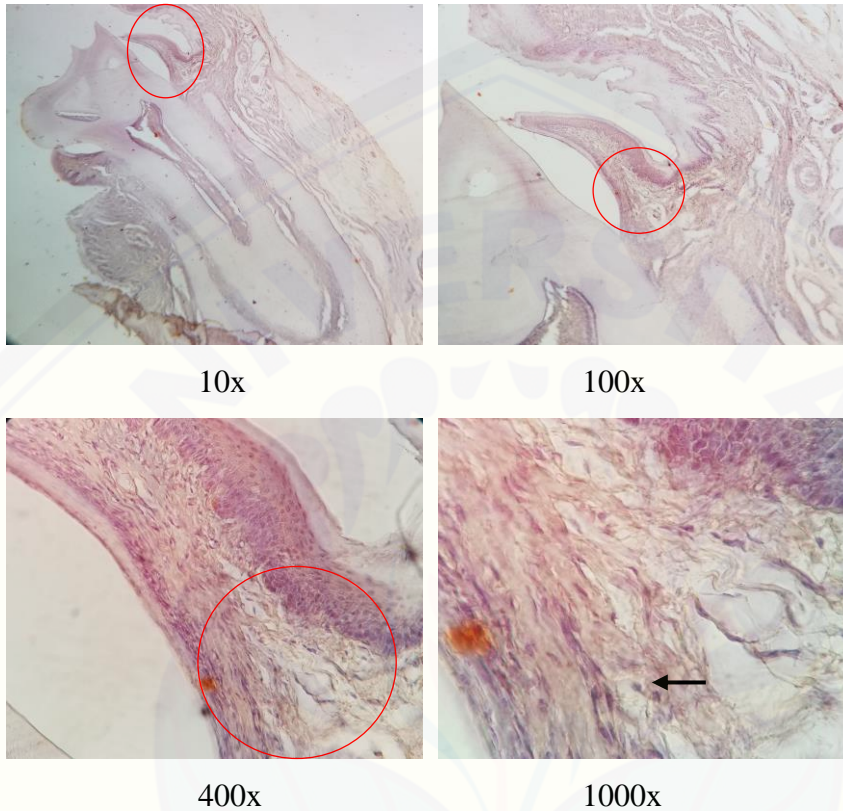
Kelompok 3 : tikus yang dipapar LPS *P. gingivalis* selama 14 hari kemudian diberi gel flavonoid dengan konsentrasi 160 $\mu\text{g/ml}$.



Keterangan :

- a) Tanda panah hitam : sel inflamasi , b) Lingkaran merah : daerah yang diamati

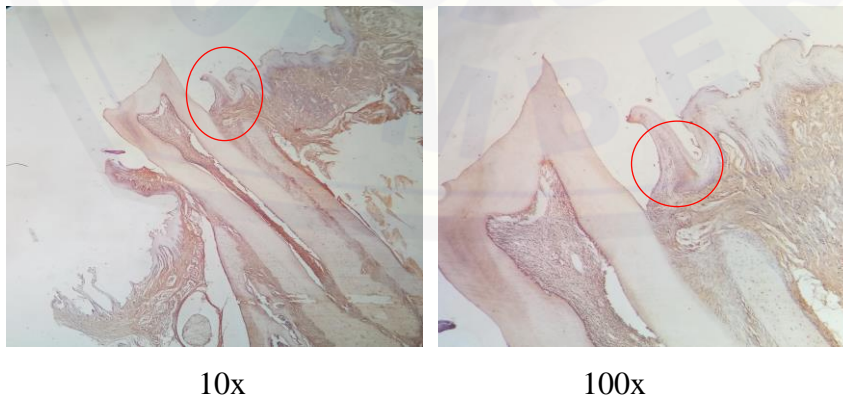
Kelompok 4 : tikus yang dipapar LPS *P. gingivalis* selama 14 hari kemudian diberi gel flavonoid dengan konsentrasi 80 µg /ml.

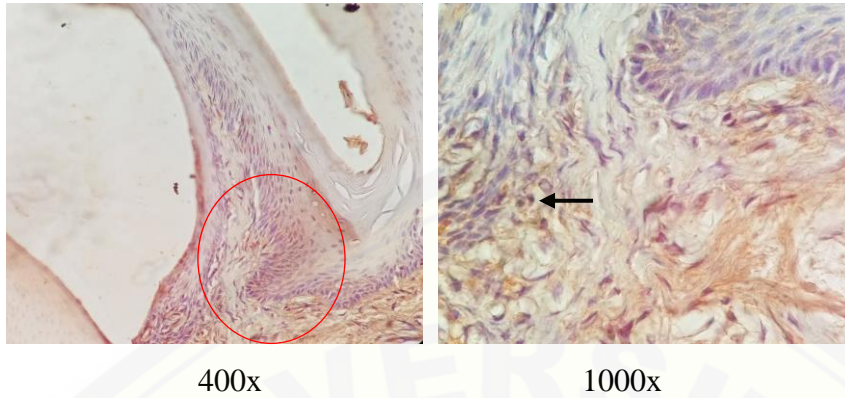


Keterangan :

a) Tanda panah hitam : sel inflamasi , b) Lingkaran merah : daerah yang diamati

Kelompok 5 : tikus yang dipapar LPS *P. gingivalis* selama 14 hari kemudian diberi gel flavonoid dengan konsentrasi 40 µg /ml.

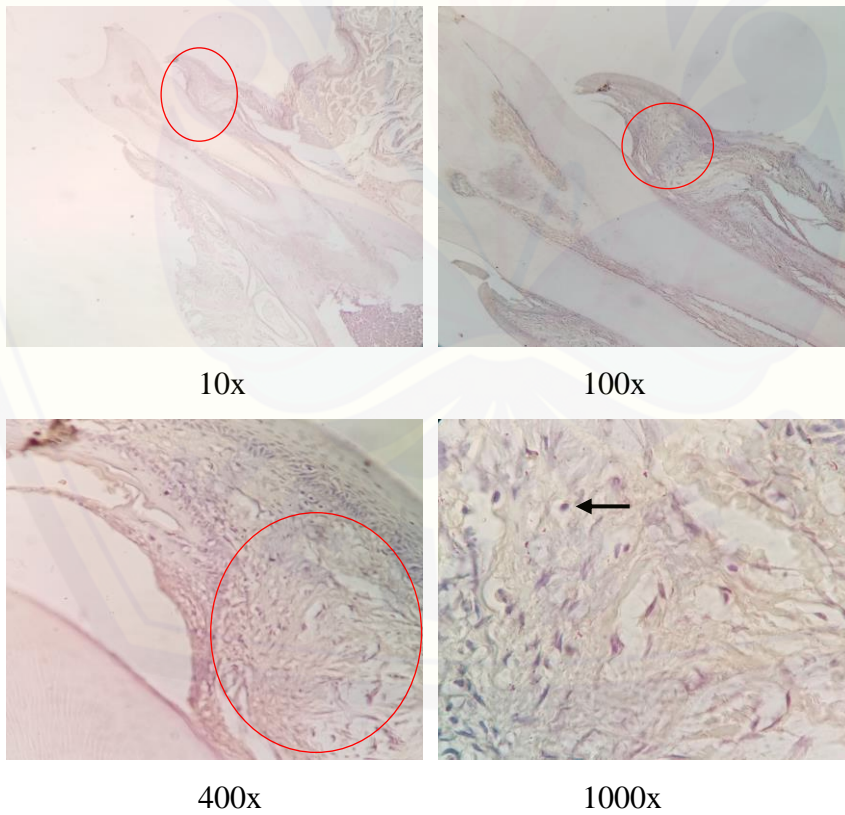




Keterangan :

a) Tanda panah hitam : sel inflamasi , b) Lingkaran merah : daerah yang diamati

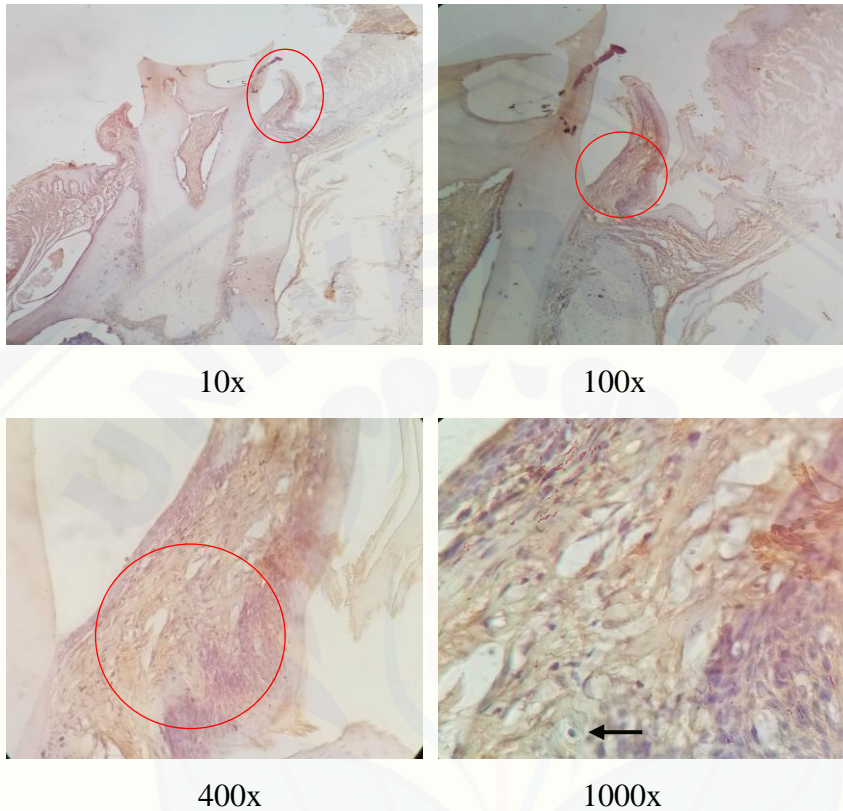
Kelompok 6 : tikus yang dipapar LPS *P. gingivalis* selama 14 hari kemudian diberi gel metronidazole 15%.



Keterangan :

a) Tanda panah hitam : sel inflamasi , b) Lingkaran merah : daerah yang diamati

Kelompok 7 : tikus yang dipapar LPS *P. gingivalis* selama 14 hari tanpa diberi gel flavonoid.

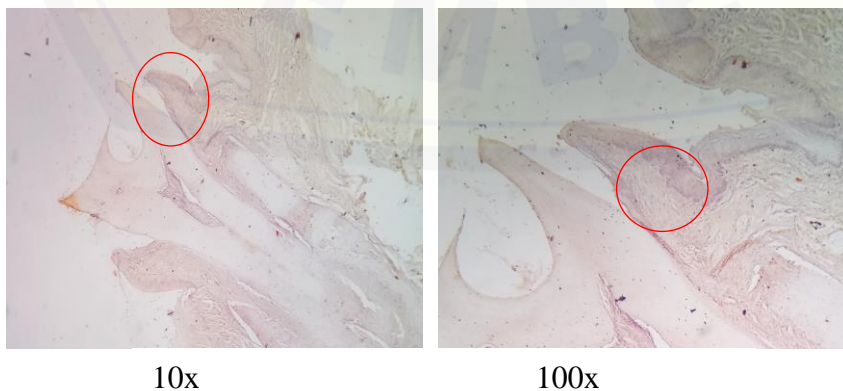


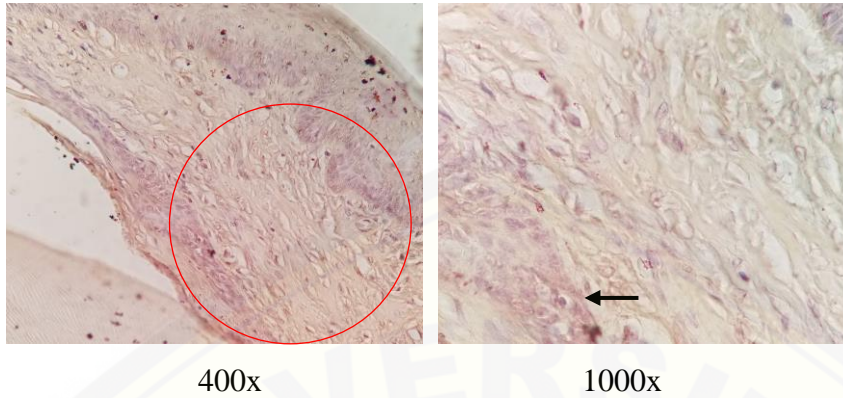
Keterangan :

a) Tanda panah hitam : sel inflamasi , b) Lingkaran merah : daerah yang diamati

Hari ke-7

Kelompok 1 : tikus yang dipapar LPS *P. gingivalis* selama 14 hari kemudian diberi gel flavonoid dengan konsentrasi 640 $\mu\text{g/ml}$.

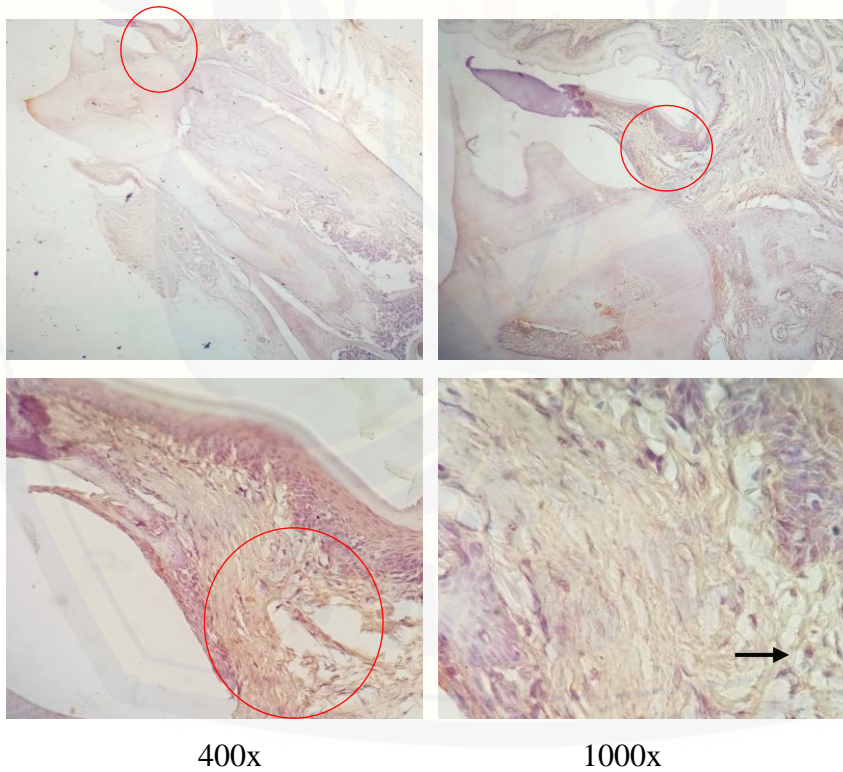




Keterangan :

- a) Tanda panah hitam : sel inflamasi , b) Lingkaran merah : daerah yang diamati

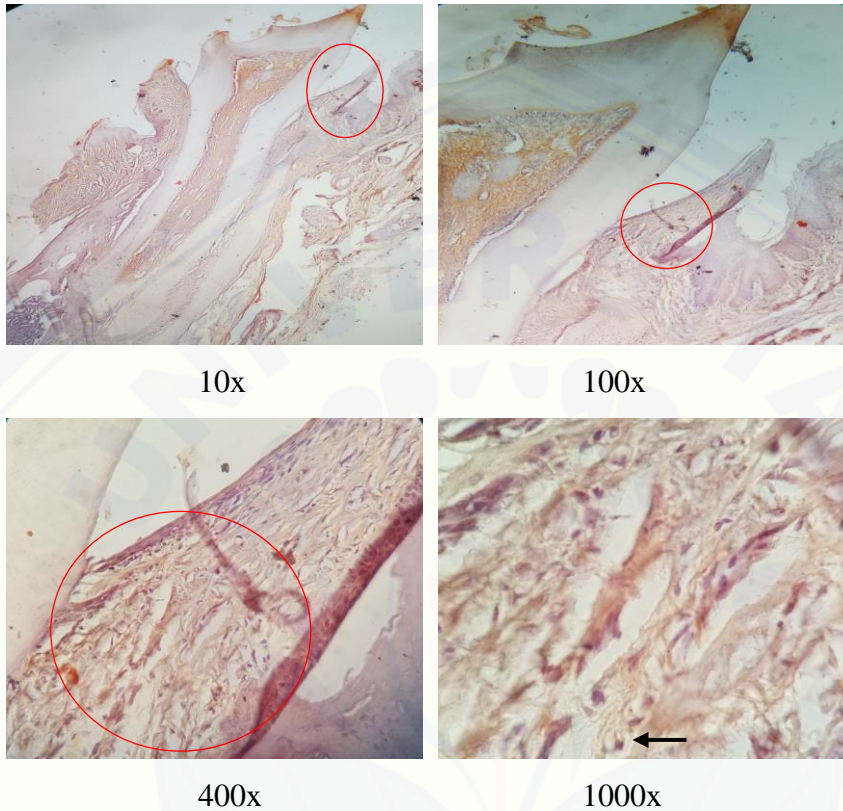
Kelompok 2 : tikus yang dipapar LPS *P. gingivalis* selama 14 hari kemudian diberi gel flavonoid dengan konsentrasi 320 µg /ml.



Keterangan :

- a) Tanda panah hitam : sel inflamasi , b) Lingkaran merah : daerah yang diamati

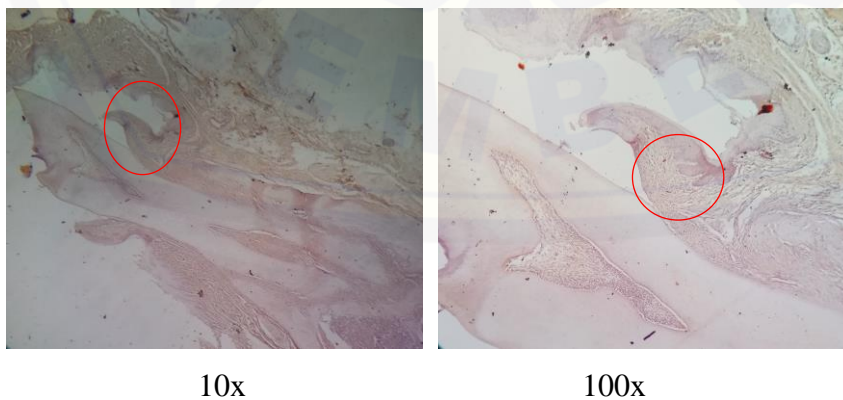
Kelompok 3 : tikus yang dipapar LPS *P. gingivalis* selama 14 hari kemudian diberi gel flavonoid dengan konsentrasi 160 µg /ml.

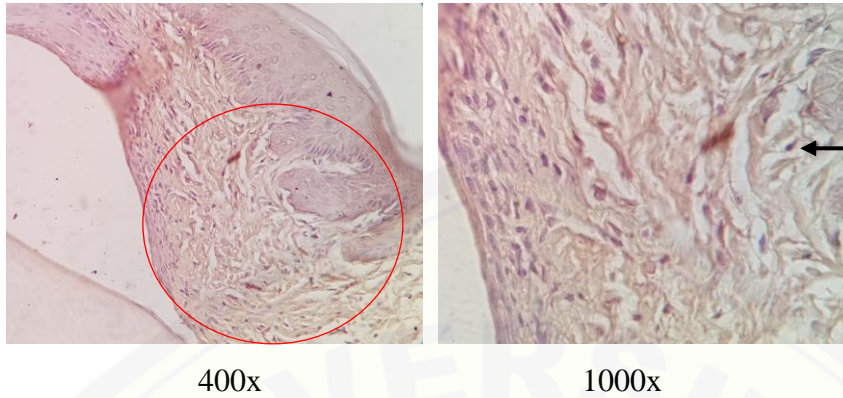


Keterangan :

a) Tanda panah hitam : sel inflamasi , b) Lingkaran merah : daerah yang diamati

Kelompok 4 : tikus yang dipapar LPS *P. gingivalis* selama 14 hari kemudian diberi gel flavonoid dengan konsentrasi 80 µg /ml.

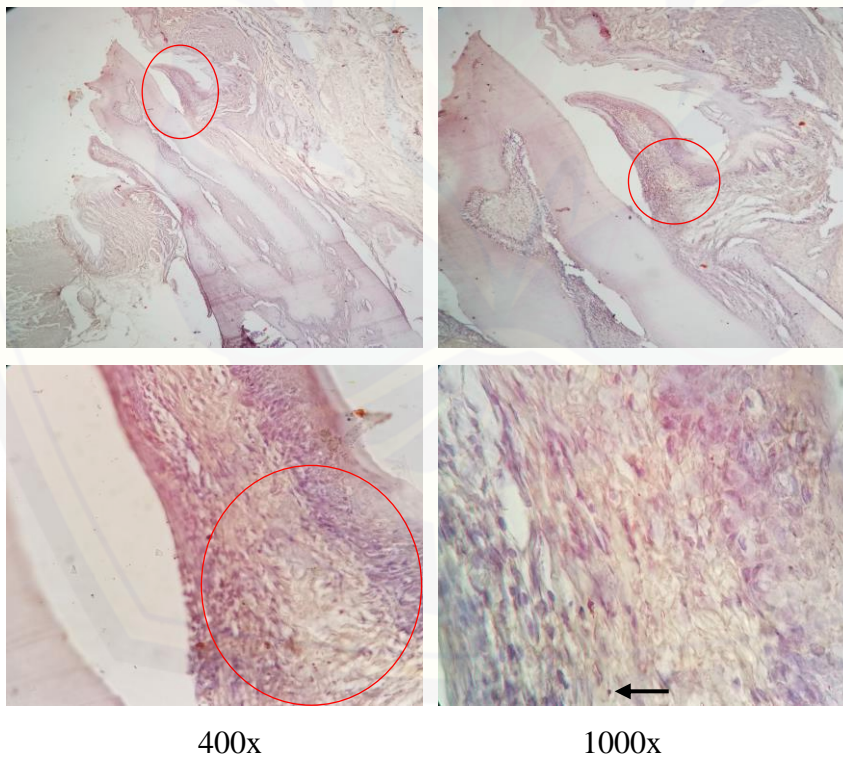




Keterangan :

- a) Tanda panah hitam : sel inflamasi , b) Lingkaran merah : daerah yang diamati

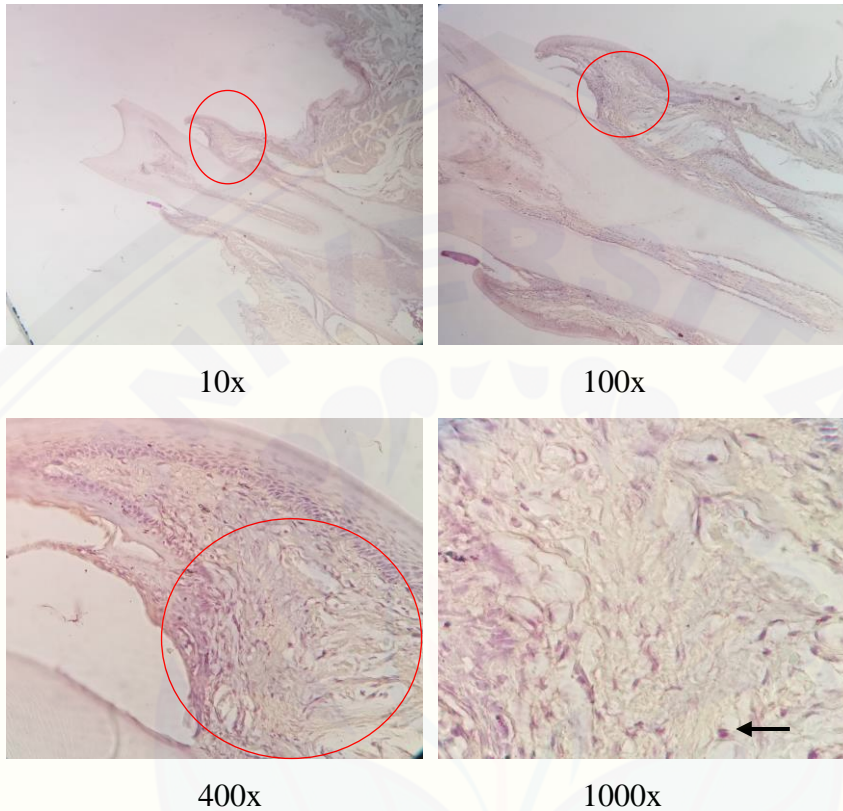
Kelompok 5 : tikus yang dipapar LPS *P. gingivalis* selama 14 hari kemudian diberi gel flavonoid dengan konsentrasi 40 $\mu\text{g/ml}$.



Keterangan :

- a) Tanda panah hitam : sel inflamasi , b) Lingkaran merah : daerah yang diamati

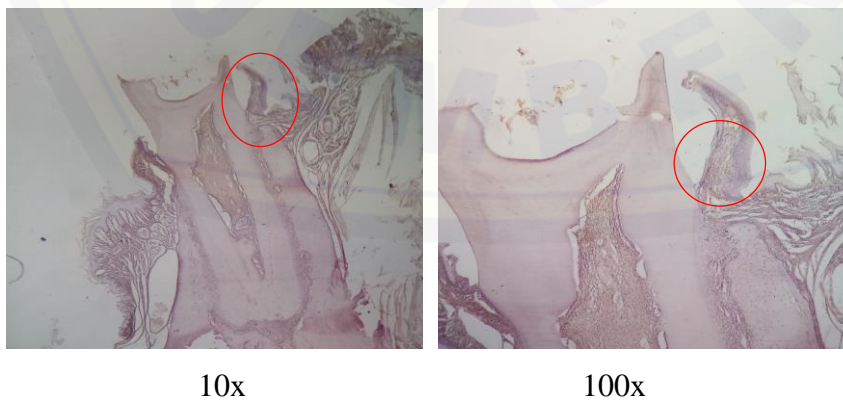
Kelompok 6 : tikus yang dipapar LPS *P. gingivalis* selama 14 hari kemudian diberi gel metronidazole 15%.

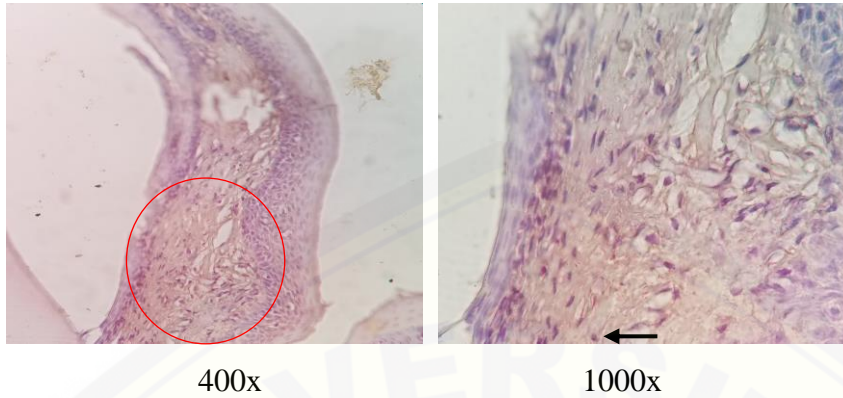


Keterangan :

a) Tanda panah hitam : sel inflamasi , b) Lingkaran merah : daerah yang diamati

Kelompok 7 : tikus yang dipapar LPS *P. gingivalis* selama 14 hari tanpa diberi gel flavonoid.



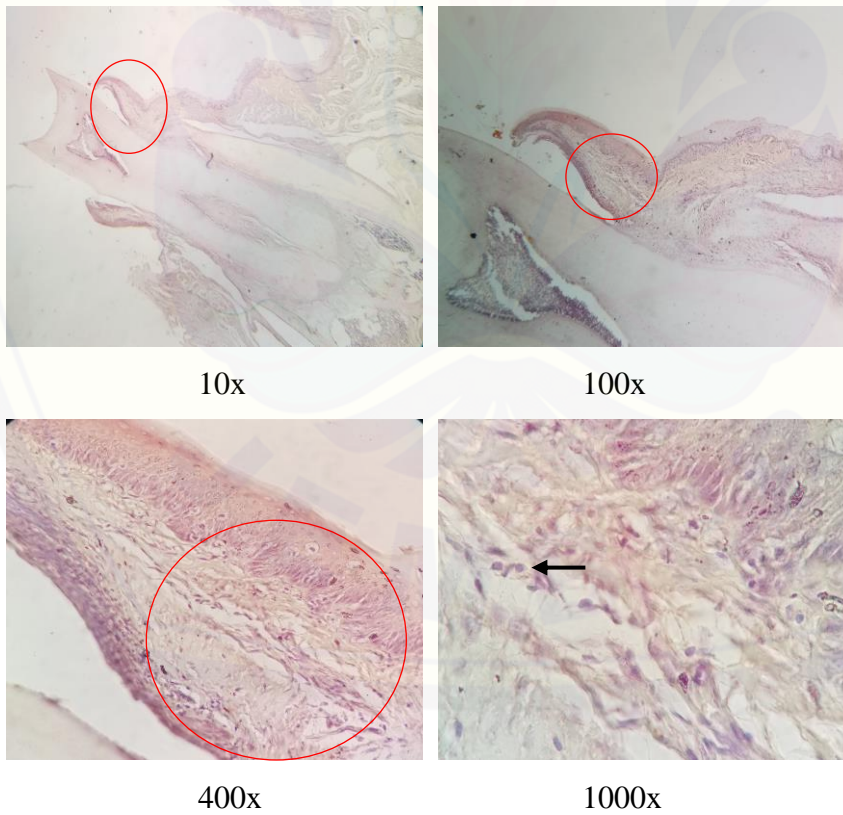


Keterangan :

a) Tanda panah hitam : sel inflamasi , b) Lingkaran merah : daerah yang diamati

Hari ke-14

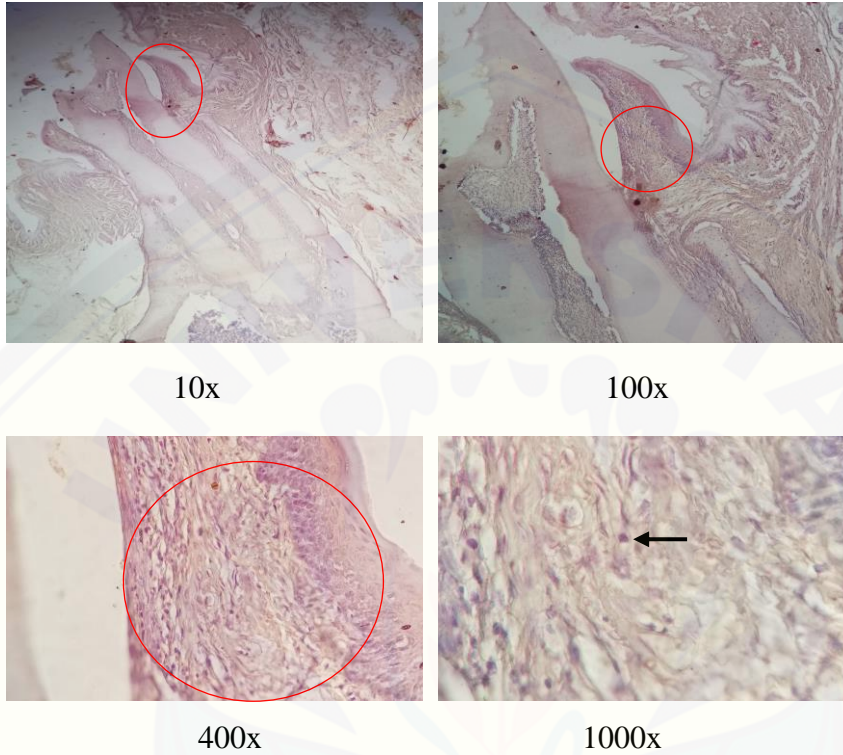
Kelompok 1 : tikus yang dipapar LPS *P. gingivalis* selama 14 hari kemudian diberi gel flavonoid dengan konsentrasi 640 $\mu\text{g/ml}$.



Keterangan :

a) Tanda panah hitam : sel inflamasi , b) Lingkaran merah : daerah yang diamati

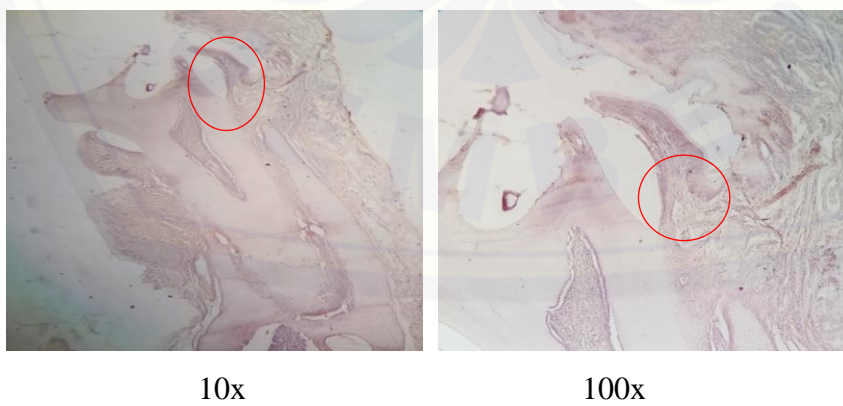
Kelompok 2 : tikus yang dipapar LPS *P. gingivalis* selama 14 hari kemudian diberi gel flavonoid dengan konsentrasi 320 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

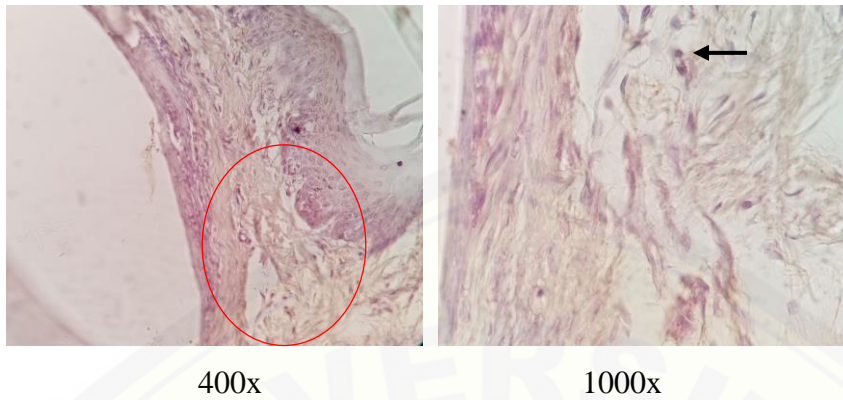


Keterangan :

a) Tanda panah hitam : sel inflamasi , b) Lingkaran merah : daerah yang diamati

Kelompok 3 : tikus yang dipapar LPS *P. gingivalis* selama 14 hari kemudian diberi gel flavonoid dengan konsentrasi 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

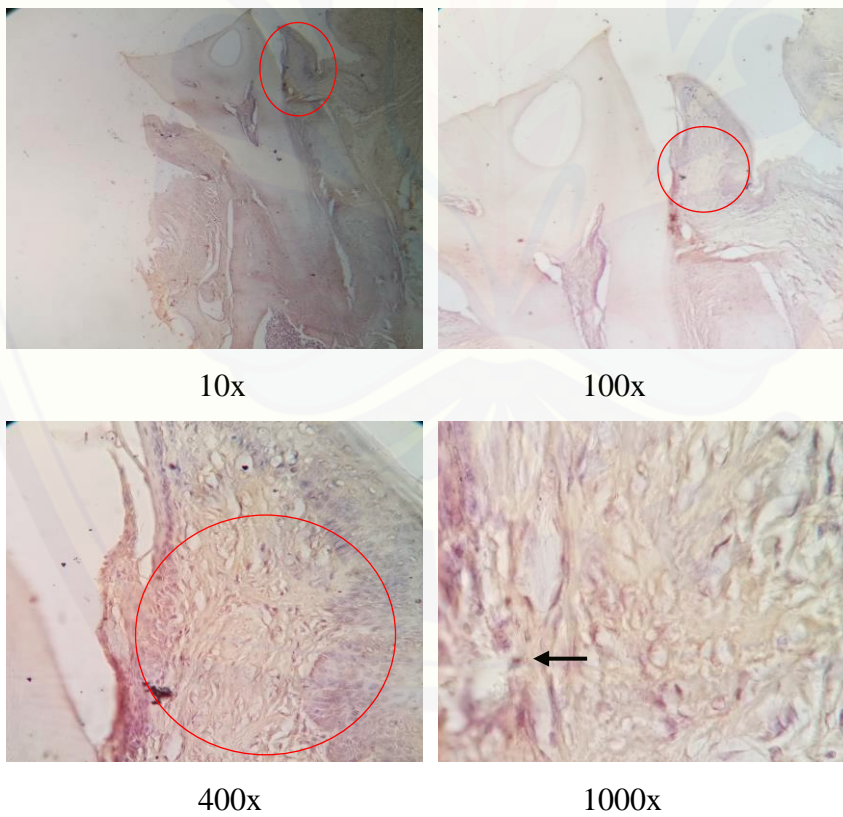




Keterangan :

- a) Tanda panah hitam : sel inflamasi , b) Lingkaran merah : daerah yang diamati

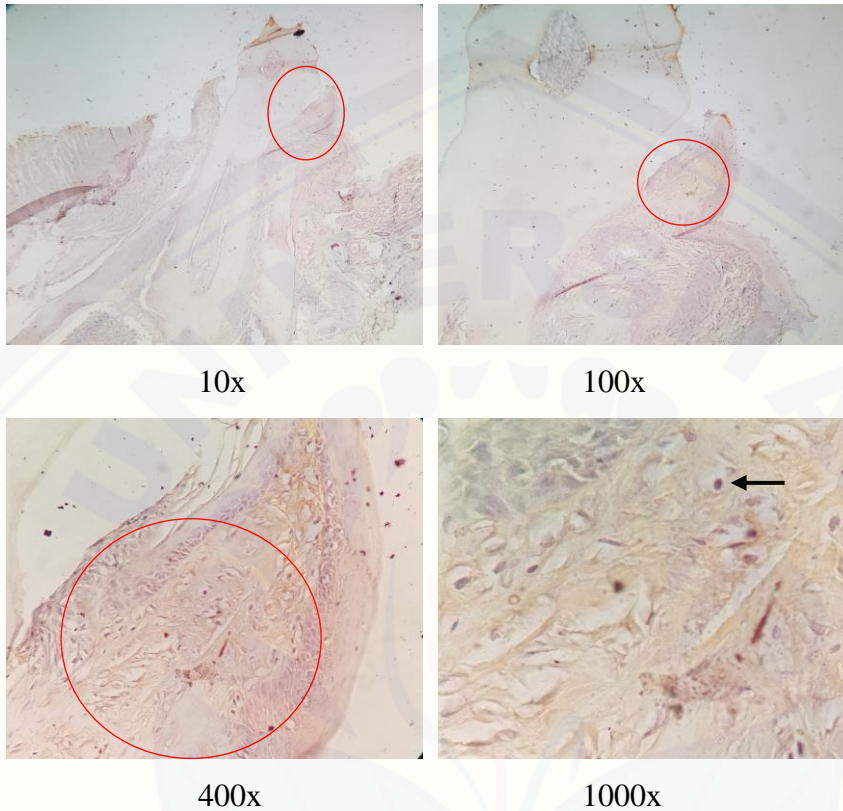
Kelompok 4 : tikus yang dipapar LPS *P. gingivalis* selama 14 hari kemudian diberi gel flavonoid dengan konsentrasi 80 µg /ml.



Keterangan :

- a) Tanda panah hitam : sel inflamasi , b) Lingkaran merah : daerah yang diamati

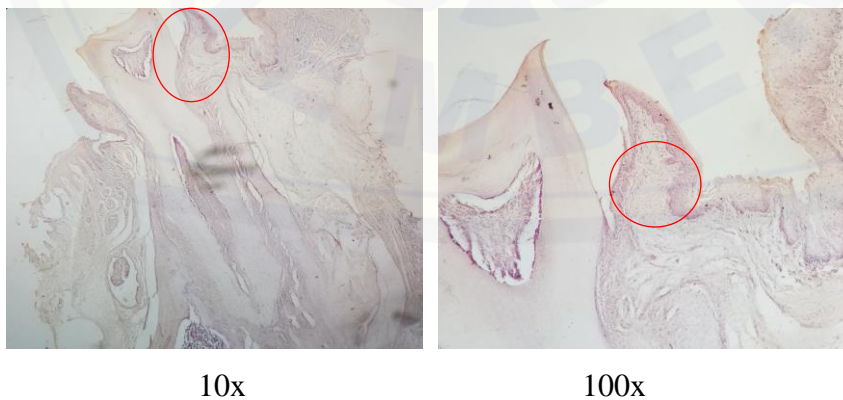
Kelompok 5 : tikus yang dipapar LPS *P. gingivalis* selama 14 hari kemudian diberi gel flavonoid dengan konsentrasi 40 µg µg /ml.

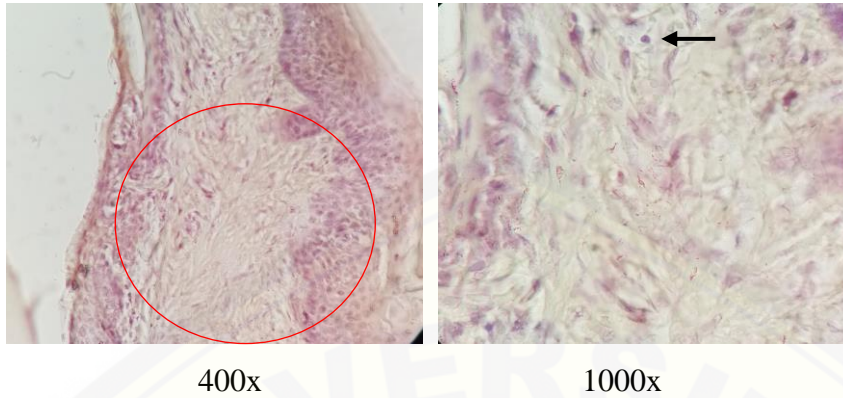


Keterangan :

a) Tanda panah hitam : sel inflamasi , b) Lingkaran merah : daerah yang diamati

Kelompok 6 : tikus yang dipapar LPS *P. gingivalis* selama 14 hari kemudian diberi gel metronidazole 15%.

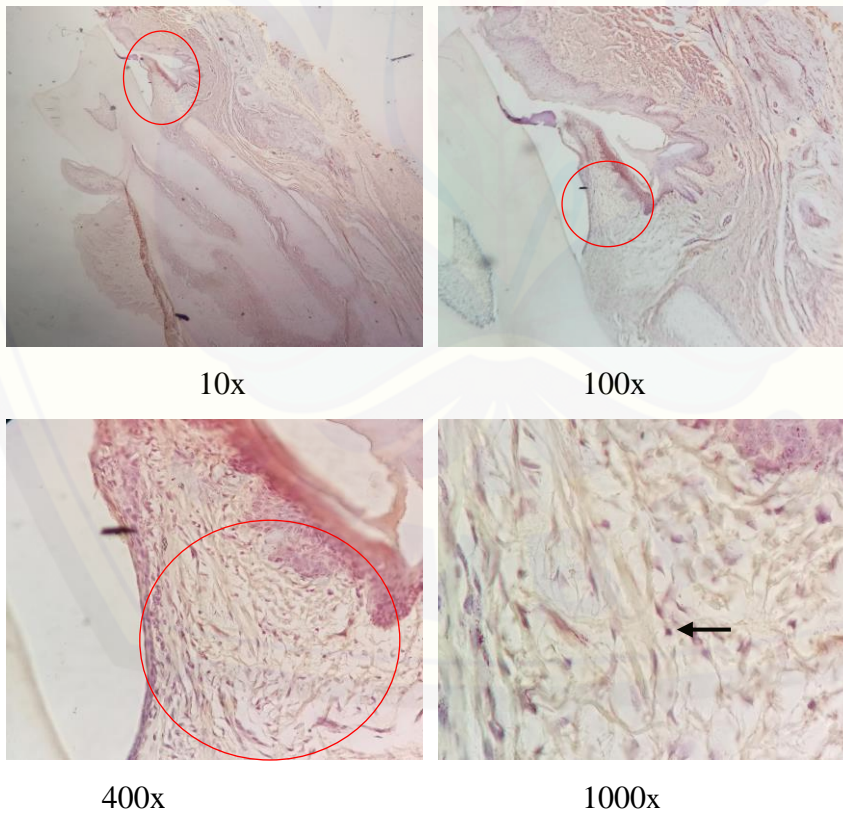




Keterangan :

- a) Tanda panah hitam : sel inflamasi , b) Lingkaran merah : daerah yang diamati

Kelompok 7 : tikus yang dipapar LPS *P. gingivalis* selama 14 hari tanpa diberi gel flavonoid.

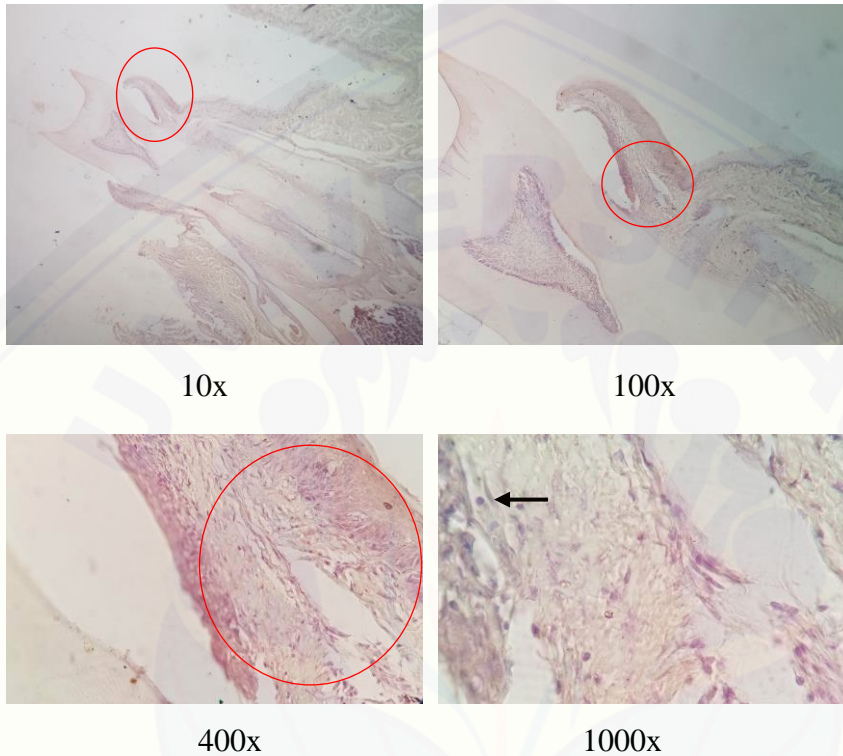


Keterangan :

- a) Tanda panah hitam : sel inflamasi , b) Lingkaran merah : daerah yang diamati

Hari ke-21

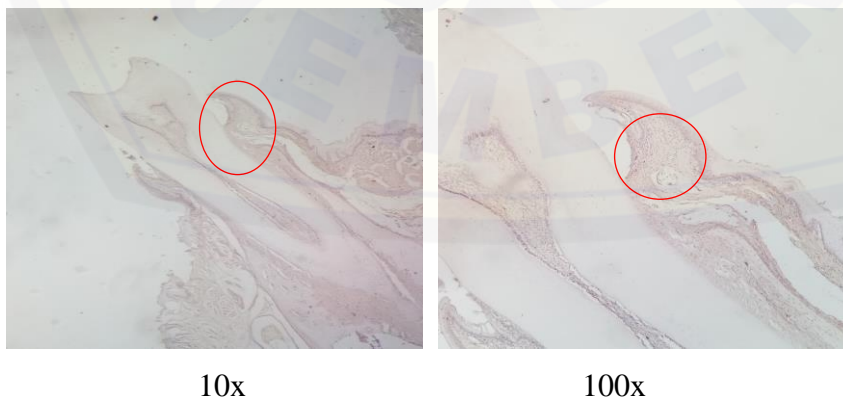
Kelompok 1 : tikus yang dipapar LPS *P. gingivalis* selama 14 hari kemudian diberi gel flavonoid dengan konsentrasi 640 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

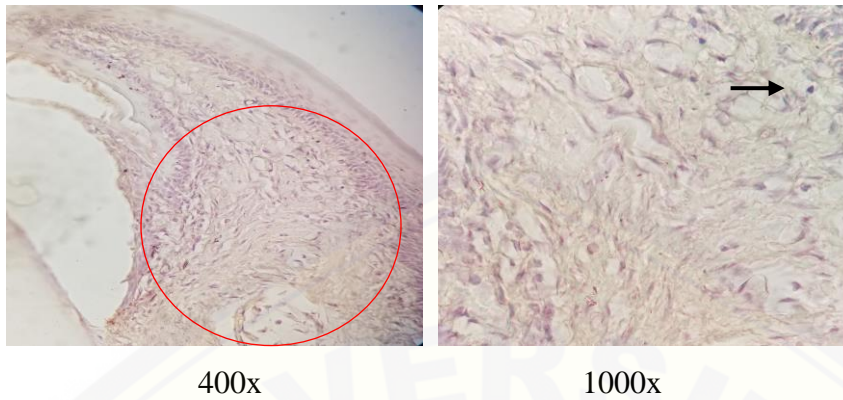


Keterangan :

a) Tanda panah hitam : sel inflamasi , b) Lingkaran merah : daerah yang diamati

Kelompok 2 : tikus yang dipapar LPS *P. gingivalis* selama 14 hari kemudian diberi gel flavonoid dengan konsentrasi 320 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

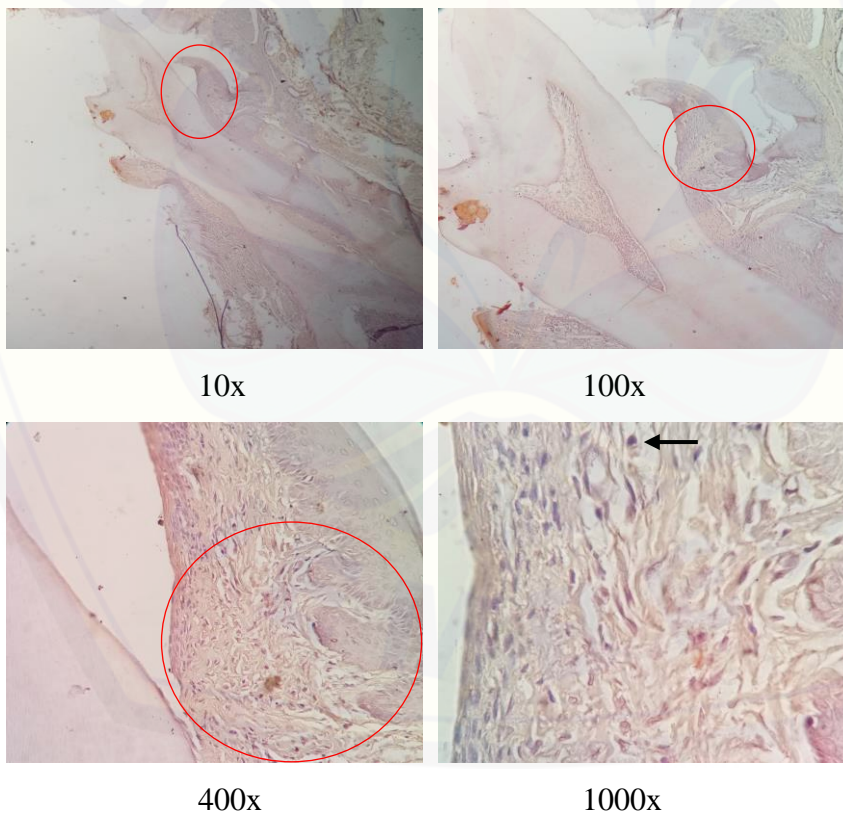




Keterangan :

a) Tanda panah hitam : sel inflamasi , b) Lingkaran merah : daerah yang diamati

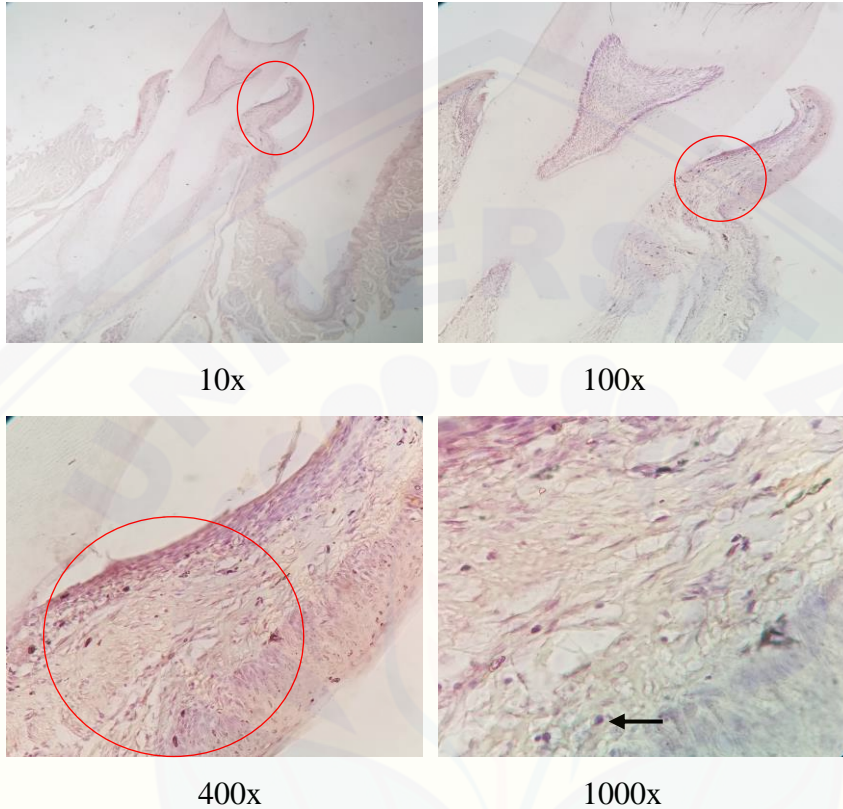
Kelompok 3 : tikus yang dipapar LPS *P. gingivalis* selama 14 hari kemudian diberi gel flavonoid dengan konsentrasi 160 $\mu\text{g/ml}$.



Keterangan :

a) Tanda panah hitam : sel inflamasi , b) Lingkaran merah : daerah yang diamati

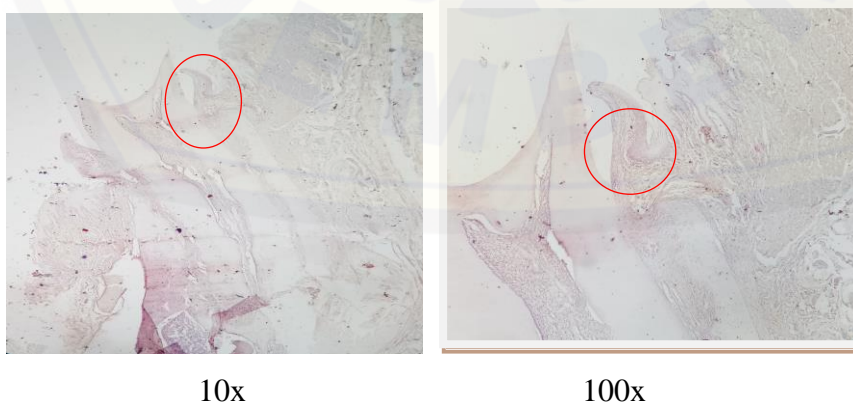
Kelompok 4 : tikus yang dipapar LPS *P. gingivalis* selama 14 hari kemudian diberi gel flavonoid dengan konsentrasi 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

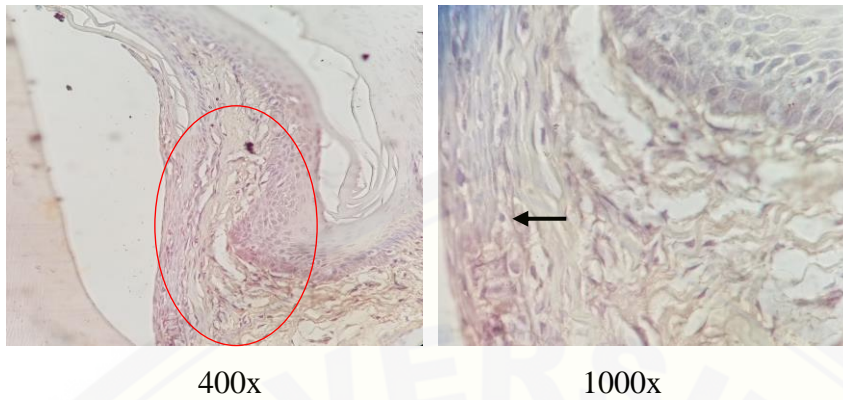


Keterangan :

a) Tanda panah hitam : sel inflamasi , b) Lingkaran merah : daerah yang diamati

Kelompok 5 : tikus yang dipapar LPS *P. gingivalis* selama 14 hari kemudian diberi gel flavonoid dengan konsentrasi 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

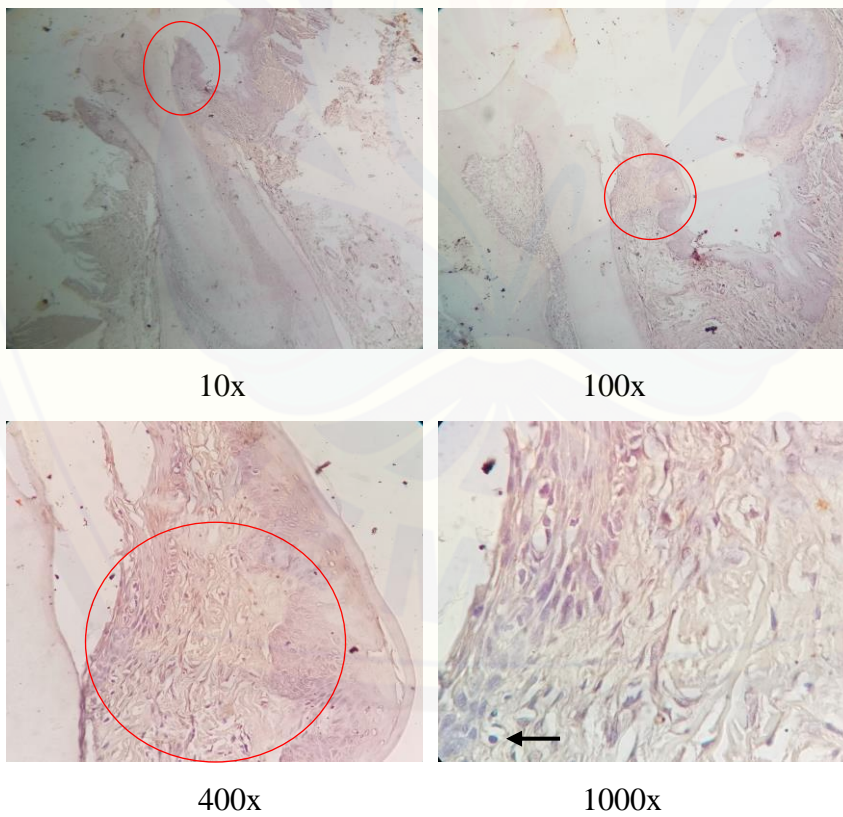




Keterangan :

a) Tanda panah hitam : sel inflamasi , b) Lingkaran merah : daerah yang diamati

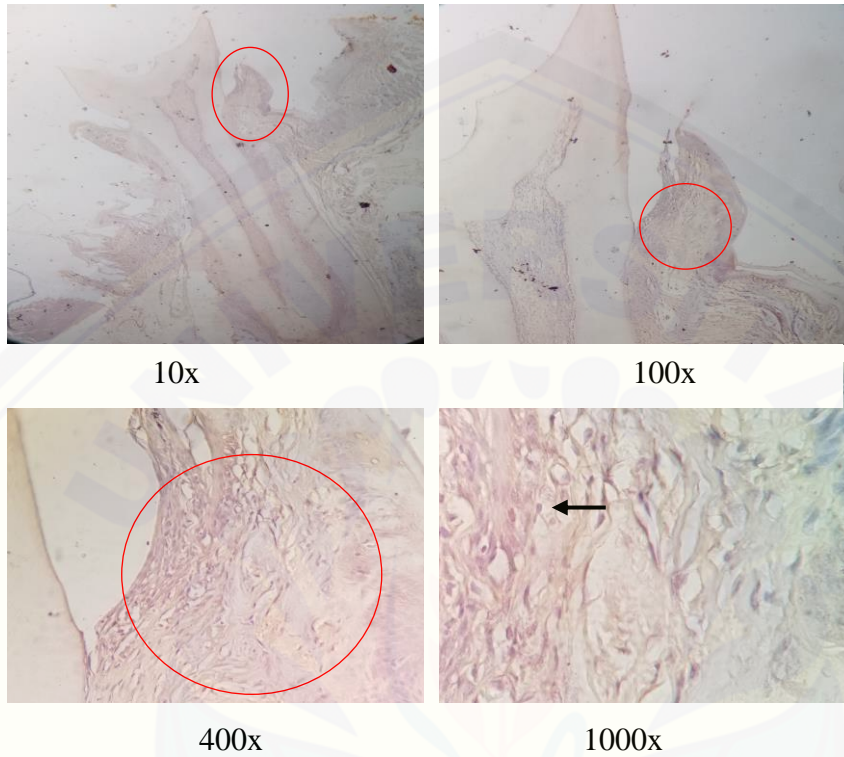
Kelompok 6 : tikus yang dipapar LPS *P. gingivalis* selama 14 hari kemudian diberi gel metronidazole 15%.



Keterangan :

b) Tanda panah hitam : sel inflamasi , b) Lingkaran merah : daerah yang diamati



Kelompok 7E : tikus yang dipapar LPS *P. gingivalis* selama 14 hari tanpa diberi gel flavonoid selama 21 hari.




Keterangan :

- a) Tanda panah hitam : sel inflamasi, b) Lingkaran merah : daerah yang diamati

Lampiran 5. Sertifikat *Ethical Clearance*

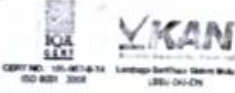
 KOMISI ETIKA PENELITIAN FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS GADJAH MADA Sekretariat: Fakultas Kedokteran Gigi UGM Jl. Denta Sekip Utara Yogyakarta Telp. 081239447900	
KETERANGAN KELAIKAN ETIK PENELITIAN ("ETHICAL CLEARANCE") No.001113/KKEP/FKG-UGM/EC/2017	
Setelah Tim Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada mempelajari dengan seksama rancangan penelitian yang diusulkan:	
Judul	: POTENSI FLAVONOID DAUN TEMBAKAU KASTURI SEBAGAI AGEN ANTI-INFLAMASI DAN AGEN TERAPI PENYEMBUH LUKA PERIODONTAL (Penelitian eksperimental laboratoris <i>in vitro</i> dan <i>in vivo</i>)
Peneliti Utama	: Dr. drg. Banun Kusumawardani, M.Kes
Anggota Penelitian	: 1. Endah Puspitasari, S.Farm., MSc., Apt 2. drg. Dwi Warna Aju Fatmawati, M.Kes
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	: Juni 2017 – Selesai
Maka dengan ini menyatakan bahwa penelitian tersebut telah memenuhi syarat atau laik etik.	
Wakil Dekan Bidang Penelitian, Pengabdian Kepada Masyarakat dan Kerjasama  	Yogyakarta, 15 Juni 2017 Ketua Komisi Etik Penelitian FKG UGM 
drg. Trianna Wahyu Utami, MSc., Ph.D	Prof. Dr.drg. Pinandi Sri Pudyani, SU., Sp.Ort(K)

Lampiran 6. Surat Identifikasi Tumbuhan



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. 1304 /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 Seksi Konservasi Ex-situ,




Deden Mudiana, S.Hut, M.Si

Lampiran 7. Surat Pemakaian Lipopolisakarida



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS JEMBER
RUMAH SAKIT GIGI DAN MULUT
Jl. Kalimantan 37 , Telp / Fax. (0331) 325041



=====

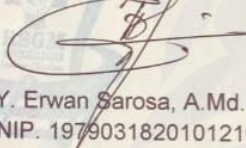
SURAT KETERANGAN

Menerangkan bahwa :

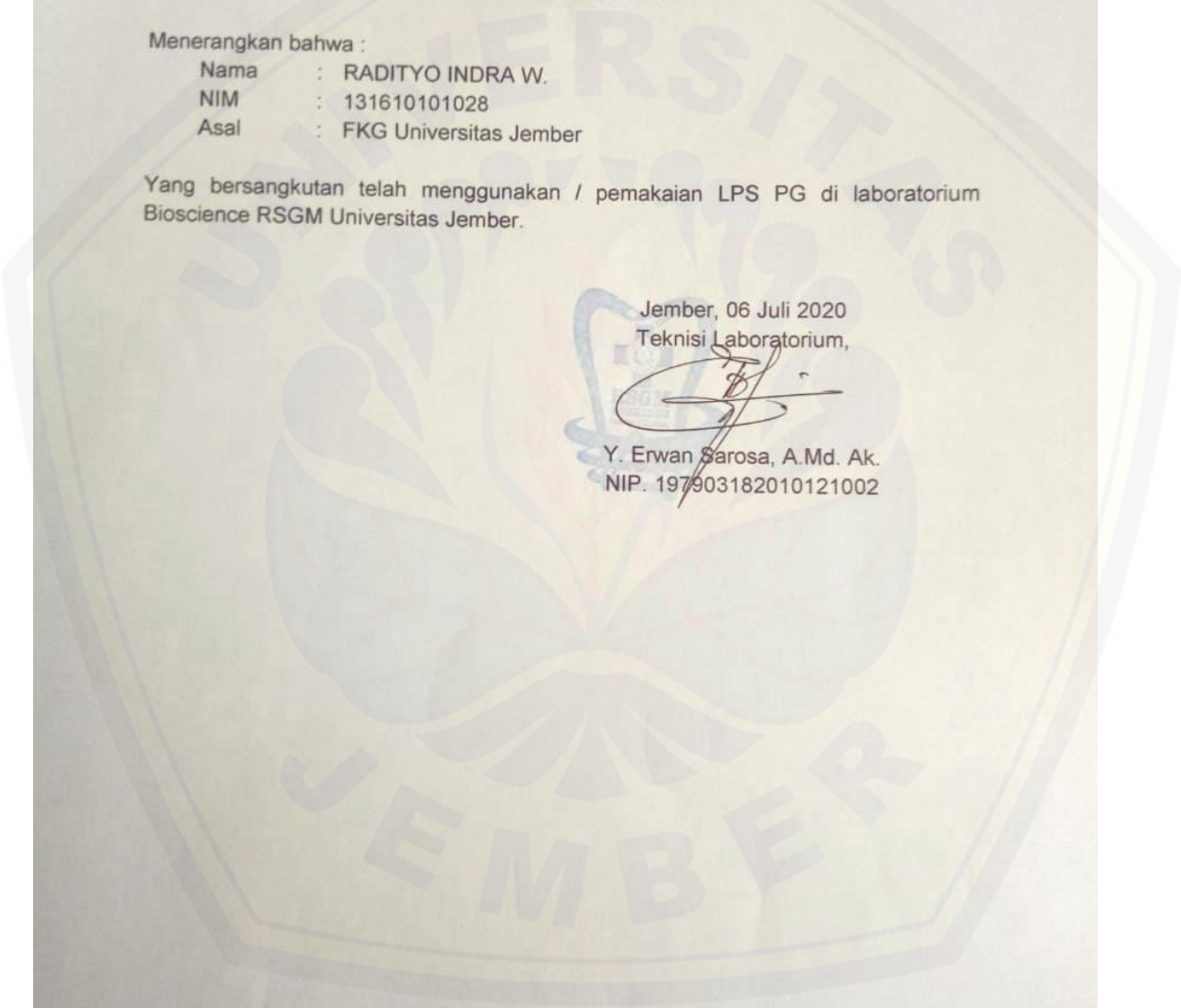
Nama : RADITYO INDRA W.
NIM : 131610101028
Asal : FKG Universitas Jember

Yang bersangkutan telah menggunakan / pemakaian LPS PG di laboratorium Bioscience RSGM Universitas Jember.

Jember, 06 Juli 2020
Teknisi Laboratorium,



Y. Erwan Sarosa, A.Md. Ak.
NIP. 197903182010121002



Lampiran 8. Katalog LPS *P.gingivalis* Sigma-Aldrich SMB00610

7/23/2020 Lipopolysaccharide from Porphyromonas gingivalis purified by phenol extraction | Sigma-Aldrich

Indonesia Home SMB00610 - Lipopolysaccharide from Porphyromonas gingivalis

SIGMA-ALDRICH

SMB00610 Sigma-Aldrich

Lipopolysaccharide from Porphyromonas gingivalis

purified by phenol extraction

Synonym: LPS

SDS

SKU-Pack Size	Availability	Pack Size	Price (SGD)	Quantity
SMB00610-1MG	Available to ship on 23.07.2020 - FROM 1 mg		466.00	0

[Bulk orders?](#) [ADD TO CART](#)

Product Recommendations

L6529
Sigma-Aldrich
Lipopolysaccharides from *Escherichia col...*
γ-irradiated, BioXtra, suitable for cell culture

L3024
Sigma-Aldrich
Lipopolysaccharides from *Escherichia col...*
purified by ion-exchange chromatography, TLR ligand tested

L4516
Sigma-Aldrich
Lipopolysaccharides from *Escherichia col...*
BioXtra, suitable for cell culture, γ-irradiated

L9143
Sigma-Aldrich
Lipopolysaccharides from *Pseudomonas aer...*
purified by phenol extraction

L2654
Sigma-Aldrich
Lipopolysaccharides from *Escherichia col...*
γ-irradiated, BioXtra, suitable for cell culture

Properties

Related Categories	Biochemicals and Reagents, Carbohydrates, Carbohydrates A to Z, Carbohydrates H-L, Complex Lipids, More...
Quality Level	200
biological source	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
form	powder
purified by	phenol extraction
impurities	53% Protein (Lowry)
shipped in	ambient
storage temp.	2-8°C

Lampiran 9. Katalog TNF-alpha ABBIOTEC Cat. No.: 251690


ABBIOTEC™
From Biology to Discovery™
TNF-alpha Antibody
Subcategory: Mouse Monoclonal Antibody

Cat. No.: 251690

Unit: 0.1 mg

Description:

Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) is a cytokine that binds to the TNF-R1 and TNF-R2 receptors. TNF-alpha is mainly secreted by macrophages and induces cell death of certain tumor cell lines. It is a potent pyrogen causing fever by direct action or by stimulation of IL-1 secretion, and therefore found in cachexia accompanying diverse cancers and infections. Genetic variations in TNF are associated with susceptibility to psoriatic arthritis and to HBV infection.

Isotype: Mouse IgG

Applications: E, IHC, IP, WB

Species Reactivity: H, M, R

Format: Each vial contains 0.1 mg IgG in 0.1 ml (1 mg/ml) of PBS pH7.4, 5 mg/ml BSA with 0.09% sodium azide.

Antibody was purified by Protein-G affinity chromatography.

Alternate Names: Tumor necrosis factor; TNF-alpha;

Tumor necrosis factor ligand superfamily member 2; TNF-a;

Cachectin; TNF; TNFA; TNFSF2

Accession No.: P01375

Antigen: Recombinant human TNF-alpha protein.

Application Notes: E: 1:500-1:1,000; WB: 1:100-1:500;

IHC: 1:100-1:500; IP: 1:100-1:500

Storage: Store at -20°C. Minimize freeze-thaw cycles.

Product is guaranteed one year from the date of shipment.

Product Citations: [1] Ock S. et al. 2015. Division of Endocrinology and Metabolism, Seoul. Jan;157(1):336-45. PMID: 26469138. [2] Lovett MC et al. 2014. Vet J. 200(2): 312-7. PMID# 24662024.[3] Moore S et al. 2014. Thesis. The Ohio State University. [4] Moore S et al. 2012. Elsevier. Veterinary Immunology and Immunopathology. 148(3-4):348-352. PMID# 22840733. [5] Tong H et al. 2011. Endocrine Biology. The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology. 294(3):445-452.PMID# 21308995.

For research use only, not for diagnostic or therapeutic procedures.

Lampiran 10. Surat Izin Penelitian



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

Nomor : 4719 /UN25.8.TL/2018
 Perihal : Izin Penelitian

29 NOV 2018

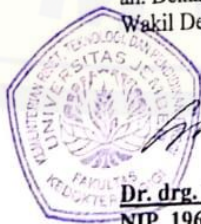
Kepada Yth
 Kepala Bagian Laboratorium Farmasi Klinik dan Komunitas
 Fakultas Farmasi Universitas Jember
 Di
 Jember

Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan izin penelitian bagi mahasiswa kami dibawah ini :

- | | | |
|----|-------------------------|--|
| 1 | Nama | : Radityo Indra W. |
| 2 | NIM | : 151610101028 |
| 3 | Semester/Tahun | : 2017/2018 |
| 4 | Fakultas | : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember |
| 5 | Alamat | : Perumahan Bumi Mangli Permai BB-10A Jember |
| 6 | Judul Penelitian | : Analisis Antiinflamasi Gel yang Mengandung Flavonoid Berasal dari Daun Tembakau Kasturi pada Model Tikus Periodontitis |
| 7 | Lokasi Penelitian | : Laboratorium Farmasi Klinik dan Komunitas Fakultas Farmasi Universitas Jember |
| 8 | Data/alat yang dipinjam | : Kandang tikus |
| 9 | Waktu | : November 2018 s/d Selesai |
| 10 | Tujuan Penelitian | : Untuk perlakuan tikus penelitian |
| 11 | Dosen Pembimbing | : 1. Dr. drg. Banun Kusumawardani, M.Kes
2. Dr. drg. I Dewa Ayu Susilawati, M.Kes |

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih

an. Dekan
 Wakil Dekan I,



Dr. drg. IDA Susilawati, M.Kes
 NIP. 196109031986022001



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

Nomor : 4721/UN25.8.TL/2018
Perihal : Izin Penelitian

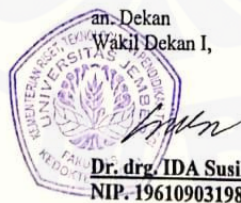
29 NOV 2018

Kepada Yth
Kepala Bagian Laboratorium Biomedik
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
Di
Jember

Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan izin penelitian bagi mahasiswa kami dibawah ini :

- 1 Nama : Radityo Indra W.
- 2 NIM : 151610101028
- 3 Semester/Tahun : 2017/2018
- 4 Fakultas : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
- 5 Alamat : Perumahan Bumi Mangli Permai BB-10A Jember
- 6 Judul Penelitian : Analisis Antiinflamasi Gel yang Mengandung Flavonoid Berasal dari Daun Tembakau Kasturi pada Model Tikus Periodontitis
- 7 Lokasi Penelitian : Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
- 8 Data/alat yang dipinjam : Mould base, Mikroskop
- 9 Waktu : November 2018 s/d Selesai
- 10 Tujuan Penelitian : Untuk pemrosesan jaringan
- 11 Dosen Pembimbing : 1. Dr. drg. Banun Kusumawardani, M.Kes
2. Dr. drg. I Dewa Ayu Susilawati, M.Kes

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih



an-Dekan
Wakil Dekan I,

Dr. drg. IDA Susilawati, M.Kes
NIP. 196109031986022001



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

Nomor : 4720/UN25.8.TL/2018
Perihal : Izin Penelitian

29 NOV 2018

Kepada Yth
Kepala Bagian Laboratorium Bioscience
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
Di
Jember

Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan izin penelitian bagi mahasiswa kami dibawah ini :

- | | | |
|----|-------------------------|--|
| 1 | Nama | : Radityo Indra W. |
| 2 | NIM | : 151610101028 |
| 3 | Semester/Tahun | : 2017/2018 |
| 4 | Fakultas | : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember |
| 5 | Alamat | : Perumahan Bumi Mangli Permai BB-10A
Jember |
| 6 | Judul Penelitian | : Analisis Antiinflamasi Gel yang Mengandung
Flavonoid Berasal dari Daun Tembakau Kasturi
pada Model Tikus Periodontitis |
| 7 | Lokasi Penelitian | : Laboratorium Bioscience Fakultas Kedokteran
Gigi Universitas Jember |
| 8 | Data/alat yang dipinjam | : Alat shaking (150rpm) |
| 9 | Waktu | : September 2018 s/d Selesai |
| 10 | Tujuan Penelitian | : Untuk shaking jaringan |
| 11 | Dosen Pembimbing | : 1. Dr. drg. Banun Kusumawardani, M.Kes
2. Dr. drg. I Dewa Ayu Susilawati, M.Kes |

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih



an Dekan
Wakil Dekan I,

Dr. drg. IDA Susilawati, M.Kes
NIP. 196109031986022001

82

LEMBAR DISPOSISI
BAGIAN BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS JEMBER

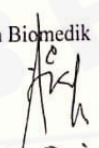
Surat Dari : FKG Unej .
 Nomor Surat :
 Tanggal Surat :
 Perihal : Izin Penelitian .

Tanggal Terima :
 Nomor Agenda :
 Disposisi Kepada : 1. Kalab/PJMK
 2. Koordinator Hewan Coba
 3. PLP Laboratorium

Isi Disposisi :
 Proposal penelitian telah diterima. Selanjutnya mahasiswa berikut ini:

- Nama/NIM : Radityo Indra
- Fakultas : Kedokteran Gigi
- Jurusan : Parodontologi
- Judul penelitian : Analisis Antiinflamasi Gel yang Mengandung Flavoroid berasal dari Tembakau Kasturi pada Model Tikus Periodontitis.

Dapat melaksanakan penelitian di Laboratorium Histologi sampai selesai.

Jember,
 Mengetahui,
 Ketua Bagian Biomedik

 (drg. Amanda Dewi F.S, M. Biomed)