



**POTENSI EKSTRAK DAUN SINGKONG (*Manihot esculenta*  
Crantz) TERHADAP PROFIL LEUKOSIT PERIFER  
MODEL TIKUS DISFUNSI OVARIUM DAN  
PERIODONTITIS**

**SKRIPSI**

Oleh  
**Lutfi Meiga Sari**  
**NIM 161610101066**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
2020**



**POTENSI EKSTRAK DAUN SINGKONG (*Manihot esculenta* Crantz)  
TERHADAP PROFIL LEUKOSIT PERIFER MODEL TIKUS  
DISFUNGSI OVARIUM DAN PERIODONTITIS**

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat  
untuk menyelesaikan Program Studi Pendidikan Kedokteran Gigi (S1)  
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran Gigi

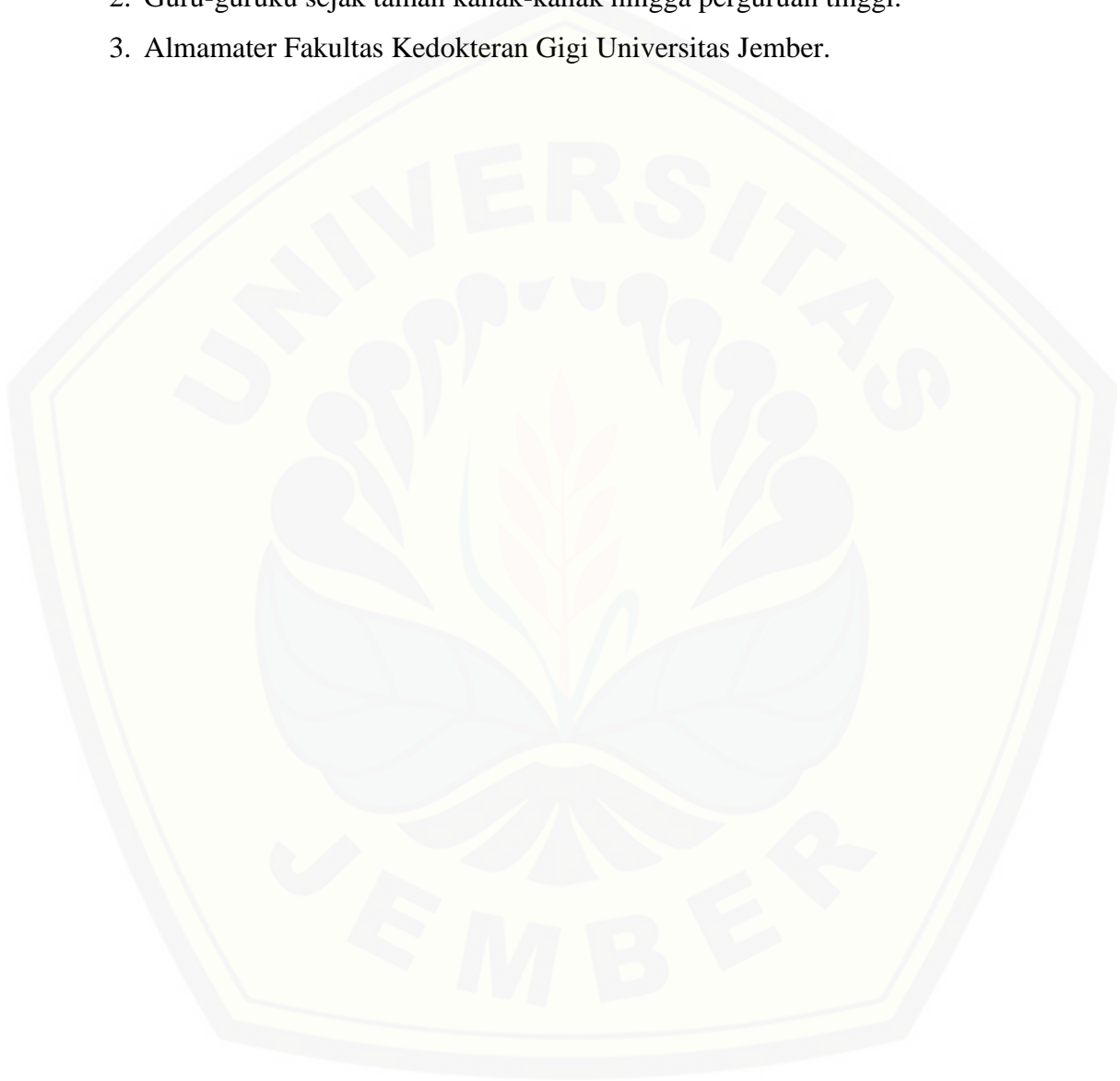
Oleh  
**Lutfi Meiga Sari**  
**NIM 161610101066**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
2020**

**PERSEMBAHAN**

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Kedua orang tua tercinta ayah Setyono dan ibu Insaroh
2. Guru-guruku sejak taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi.
3. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.



**MOTTO**

Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan  
(QS. Al-Insyirah: 6)



---

\* ) Departemen Agama RI. 2014. Al-Qur'an dan Terjemahannya. Jakarta: CV. Darus Sunnah

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

nama : Lutfi Meiga Sari

NIM : 161610101066

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Potensi Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) terhadap Profil Leukosit Perifer Model Tikus Disfungsi Ovarium dan Periodontitis” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 17 November 2020

Yang menyatakan,

Lutfi Meiga Sari

161610101066

**SKRIPSI**

**POTENSI EKSTRAK DAUN SINGKONG (*Manihot esculenta*  
Crantz) TERHADAP PROFIL LEUKOSIT PERIFER  
MODEL TIKUS DISFUNSI OVARIUM DAN  
PERIODONTITIS**

Oleh  
Lutfi Meiga Sari  
NIM 161610101066

Pembimbing :

Dosen Pembimbing Utama : drg. Zahara Meilawaty, M.Kes.  
Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Pudji Astuti, M.Kes.

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Potensi Ekstrak Daun Singkong (*Manihot Esculenta* Crantz) terhadap Profil Leukosit Perifer Model Tikus Disfungsi Ovarium dan Periodontitis” karya Lutfi Meiga Sari telah diuji dan disahkan pada :  
hari, tanggal : 17 November 2020  
tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Penguji Utama,

Penguji Anggota,

Dr. drg. Zahreni Hamzah, M.S.  
NIP 196104011985112001

drg. Swasthi Prasetyarini, M.Kes.  
NIP 198103212005012003

Pembimbing Utama,

Pembimbing Anggota,

drg. Zahara Meilawaty, M.Kes.  
NIP 198005272008122002

drg. Pudji Astuti, M.Kes.  
NIP 196810201996012001

Mengesahkan  
Dekan,

drg. R Rahardyan Parnaadji M.Kes.Sp.Pros.  
NIP 196901121996011001

## RINGKASAN

**Potensi Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) terhadap Profil Leukosit Perifer Model Tikus Disfungsi Ovarium dan Periodontitis;** Lutfi Meiga Sari, 161610101066; 2020; 119 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Disfungsi ovarium merupakan keadaan ovarium yang mengalami kegagalan dalam sekresi hormon seks steroid. Penurunan sekresi hormon terutama estrogen dapat memicu peningkatan sitokin proinflamasi seperti IL-1, IL-6 dan TNF- $\alpha$  yang berperan dalam resorpsi tulang dan reaksi inflamasi periodontal. Salah satu mikroorganisme yang dapat menyebabkan periodontitis adalah bakteri *Porphyromonas gingivalis*. Induksi bakteri *P.gingivalis* dapat menginduksi terjadinya inflamasi dengan melibatkan sekresi sitokin proinflamasi, sehingga meningkatnya infiltrasi PMN. Salah satu *drug of choice* dari periodontitis adalah metronidazole. Penggunaan metronidazole secara sistemik dapat mengakibatkan sakit kepala, mual, dan mulut kering. Oleh karena itu diperlukan bahan alternatif dari alam yang memiliki efek terapi antiinflamasi. Salah satu tanaman yang memiliki efek antiinflamasi adalah daun Singkong. Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui potensi ekstrak daun Singkong sebagai antiinflamasi terhadap profil leukosit model tikus disfungsi ovarium dan periodontitis.

Jenis penelitian ini merupakan eksperimental laboratoris dengan *the post test only control group design*. Sampel penelitian merupakan tikus betina yang dibagi menjadi dua kelompok besar yakni kelompok disfungsi ovarium dan kelompok periodontitis. Masing-masing kelompok dibagi menjadi 3 sub kelompok yang diterapi menggunakan aquades, metronidazole dan ekstrak daun Singkong. Setiap tikus diambil darahnya melalui plexus infraorbitalis pada hari ke 0, hari ke-28, hari ke-31 dan hari ke-35. Darah yang diambil selanjutnya dilakukan perhitungan jumlah menggunakan kamar hitung dan perhitungan jenis dengan cara visual.



Data penelitian dilakukan analisis secara statistik. Berdasarkan hasil uji *Shapiro-Wilk* dan Uji *Levene* didapatkan data berdistribusi normal dan homogen pada jumlah leukosit model tikus disfungsi ovarium dan periodontitis; neutrofil model tikus disfungsi ovarium dan periodontitis; serta limfosit dan monosit pada model tikus disfungsi ovarium. Data yang berdistribusi normal dan homogen selanjutnya diuji menggunakan *Two way repeated measure anova*. Kelompok yang memiliki  $p < 0.05$  kemudian dilakukan uji *Least Significant Difference*. Data yang tidak berdistribusi normal dilakukan uji menggunakan uji *Friedman*, namun tidak dilakukan uji lanjutan karena tidak ada perbedaan yang bermakna.

Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat penurunan profil leukosit perifer (jumlah leukosit, neutrofil, dan limfosit) pada model tikus disfungsi ovarium dan periodontitis yang diberi ekstrak daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz). Hal ini menunjukkan bahwa daun Singkong dapat berperan sebagai antiinflamasi.

## PRAKATA

Puji syukur kehadiran ALLAH SWT, atas limpahan rahmat, hidayah, serta karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Potensi Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) terhadap Profil Leukosit Perifer Model Tikus Disfungsi Ovarium dan Periodontitis**” Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat penyelesaian pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

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

1. Kedua orang tua saya, Ayah Setyono dan Ibu Insaroh atas doa, dukungan dan motivasi yang diberikan.
2. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Pros, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
3. drg. Zahara Meilawaty, M.Kes., selaku Dosen Pembimbing Utama sekaligus dosen proyek penelitian Ekstrak Daun Singkong yang telah banyak meluangkan waktu, pikiran, dukungan, dan perhatiannya dalam membimbing dan menuntun saya dalam menyelesaikan skripsi ini.
4. drg. Pudji Astuti, M.Kes., selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang telah banyak meluangkan waktu, pikiran, dukungan, dan perhatiannya dalam membimbing dan menuntun saya dalam menyelesaikan skripsi ini.
5. Dr. drg. Zahreni Hamzah, M.S., selaku Dosen Penguji Ketua yang telah memberikan kritik dan saran serta telah meluangkan waktu, perhatian, dan bimbingan hingga terselesainya skripsi ini;
6. drg. Swasthi Prasetyarini, M.Kes., selaku Dosen Penguji Anggota yang telah memberikan kritik dan saran serta telah meluangkan waktu, perhatian, dan bimbingan hingga terselesainya skripsi ini;
7. drg. Yani Corvianindya Rahayu, M.KG., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan, arahan, dan motivasi dalam perjalanan studi penulis selama menjadi mahasiswa;

8. drg. Agustin Wulan Suci D., MDSc dan drg. Amandia Dewi Permana Shita, M.Biomed selaku dosen proyek penelitian Ekstrak Daun Singkong yang telah memberikan pengarahan dan masukan dalam menyelesaikan skripsi ini.
9. Staf Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yaitu Mas Agus dan Bu Indri yang banyak membantu selama jalannya penelitian.
10. Seluruh dosen dan staf akademik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember atas dukungan, dan motivasi sehingga skripsi ini dapat terselesaikan
11. Teman-teman proyek penelitian Ekstrak Daun Singkong: Paramudibta, Dhesya, Amalia dan Ajeng yang telah memberi bantuan berupa tenaga, pikiran dan waktu dalam penelitian.
12. Teman-teman bimbingan tugas akhir: Savira, Raquel dan Julia yang telah memberikan motivasi serta saran untuk menyelesaikan skripsi ini.
13. Teman-teman Tutorial G yang telah memberikan motivasi serta saran untuk menyelesaikan skripsi ini.
14. Semua teman-teman angkatan 2016 Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
15. Semua pihak yang terlibat baik secara langsung maupun tidak langsung yang turut mendukung dalam doa dan memberikan motivasi.

Penulis juga menerima semua kritik dan saran yang membangun dari semua pihak untuk melengkapi dan menyempurnakan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak.

Jember, 17 November 2020

Penulis

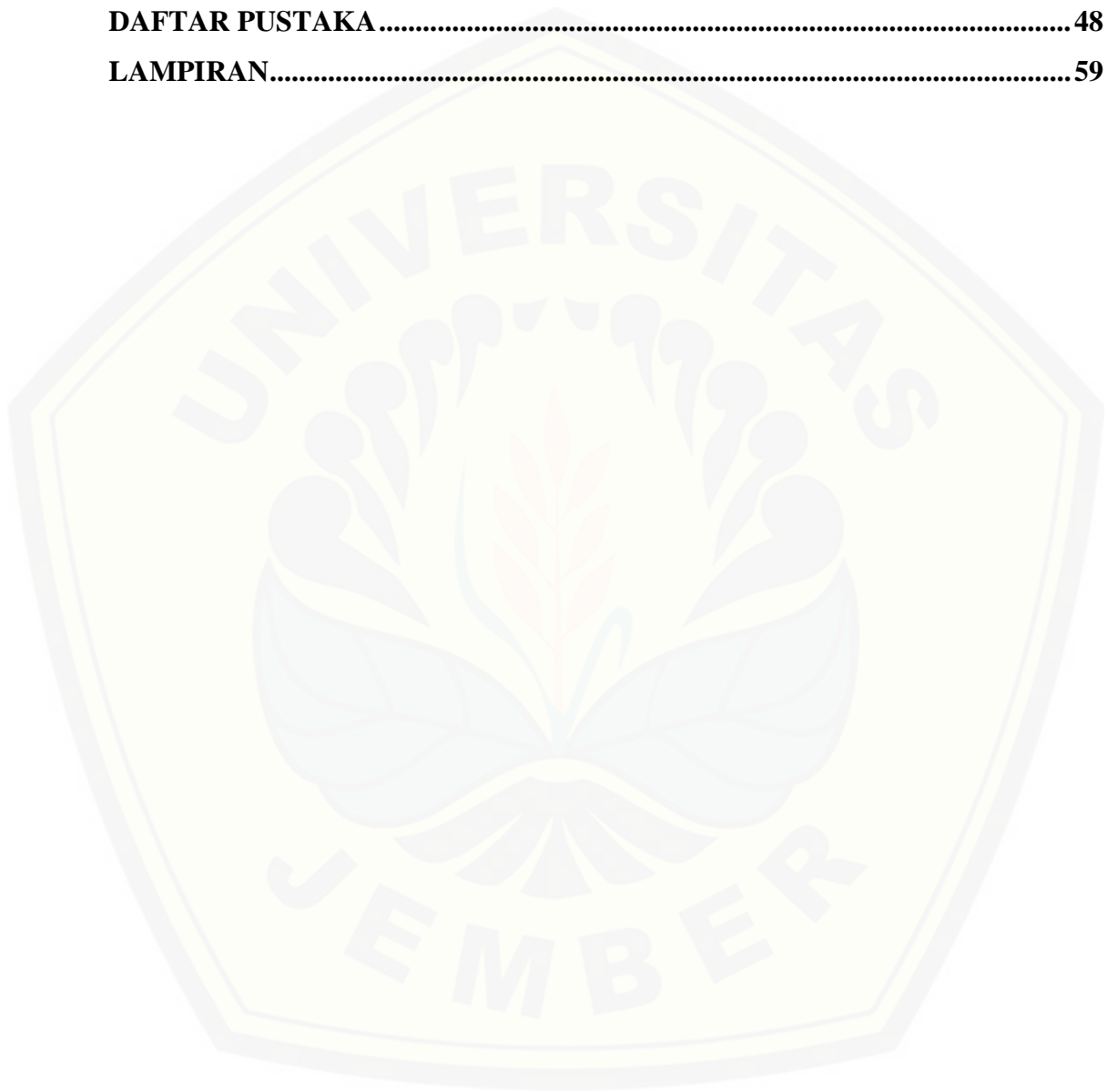
**DAFTAR ISI**

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN .....</b>	<b>ii</b>
<b>HALAMAN MOTTO .....</b>	<b>iii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN.....</b>	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN.....</b>	<b>v</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN.....</b>	<b>vi</b>
<b>RINGKASAN .....</b>	<b>vii</b>
<b>PRAKATA.....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xv</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xvi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xvii</b>
<b>BAB 1 PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Latar Belakang.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Rumusan Masalah .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Tujuan.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Manfaat.....</b>	<b>3</b>
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Tanaman Singkong .....</b>	<b>4</b>
2.1.1 Kandungan dan Manfaat Daun Singkong .....	5
<b>2.2 Disfungsi Ovarium .....</b>	<b>7</b>
<b>2.3 Periodontitis.....</b>	<b>8</b>
2.3.1 Definisi .....	8
2.3.2 Etiologi .....	9
<b>2.4 Inflamasi .....</b>	<b>11</b>
2.4.1 Inflamasi Akut .....	11
2.4.2 Inflamasi Kronik .....	11

<b>2.5 Leukosit.....</b>	<b>12</b>
2.5.1 Neutrofil .....	12
2.5.2 Eosinofil .....	13
2.5.3 Basofil .....	14
2.5.4 Monosit .....	14
2.5.5 Limfosit .....	15
2.5.6 Jumlah Leukosit Darah Tepi dan Faktor-faktor yang Mempengaruhi .....	16
<b>2.6 Hubungan antara Disfungsi Ovarium dengan Periodontitis .....</b>	<b>16</b>
<b>2.7 Hubungan <i>P. gingivalis</i> terhadap Periodontitis dan Respon     Inflamasi .....</b>	<b>17</b>
<b>2.8 Metronidazole.....</b>	<b>17</b>
<b>2.8 Kerangka Konsep Penelitian .....</b>	<b>18</b>
<b>2.9 Penjelasan Kerangka Konsep .....</b>	<b>19</b>
<b>2.10 Hipotesis.....</b>	<b>20</b>
<b>BAB 3 METODE PENELITIAN.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Jenis Penelitian.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2 Rancangan Penelitian .....</b>	<b>21</b>
<b>3.3 Tempat dan Waktu Penelitian .....</b>	<b>21</b>
3.3.1 Tempat Penelitian.....	21
3.3.2 Waktu Penelitian .....	22
<b>3.4 Identifikasi Variabel Operasional .....</b>	<b>22</b>
3.4.1 Variabel Bebas.....	22
3.4.2 Variabel Terikat.....	22
3.4.3 Variabel Terkendali .....	22
<b>3.5 Definisi Operasional Penelitian .....</b>	<b>23</b>
3.5.1 Ekstrak Daun Singkong ( <i>Manihot esculenta</i> Crantz).....	23
3.5.2 Profil Leukosit Perifer .....	23
3.5.3 Tikus Disfungsi Ovarium .....	23
3.5.4 Tikus Periodontitis.....	23
<b>3.6 Populasi dan Sampel.....</b>	<b>24</b>
3.6.1 Populasi Penelitian .....	24

3.6.2 Kriteria Sampel.....	24
3.6.3 Besar Sampel Penelitian .....	24
3.6.4 Pengelompokkan Sampel .....	25
<b>3.7 Alat dan Bahan Penelitian.....</b>	<b>25</b>
3.7.1 Alat Penelitian .....	26
3.7.2 Bahan Penelitian.....	26
<b>3.8 Prosedur Penelitian.....</b>	<b>26</b>
3.8.1 <i>Ethical Clearence</i> .....	26
3.8.2 Identifikasi Tanaman .....	27
3.8.3 Pembuatan Ekstrak Daun Singkong .....	27
3.8.4 Pembuatan Media Kultur dan Uji Identifikasi <i>P. gingivalis</i> .....	27
3.8.5 Pembuatan Suspensi <i>P. gingivalis</i> .....	28
3.8.6 Persiapan Hewan Coba.....	28
3.8.7 Pembuatan Model Tikus Disfungsi Ovarium .....	28
3.8.8 Pembuatan Model Tikus Periodontitis .....	29
3.8.9 Aplikasi Ekstrak Daun Singkong .....	29
3.8.10 Pemberian Metronidazole .....	31
3.8.11 Tahap Pengambilan Darah Tepi .....	32
3.8.12 Pengisian Pipet Leukosit .....	32
3.8.13 Pengisian Kamar Hitung.....	32
3.8.14 Penghitungan Jumlah Total Leukosit .....	33
3.8.15 Pembuatan Sediaan Hapusan Darah.....	33
3.8.16 Prosedur Pengecatan Hapusan Darah.....	34
3.8.17 Penghitungan Jenis Leukosit .....	34
<b>3.9 Analisis Data.....</b>	<b>35</b>
<b>3.10 Alur Penelitian .....</b>	<b>36</b>
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>37</b>
<b>4.1 Hasil Penelitian.....</b>	<b>37</b>
4.1.1 Hitung Jumlah dan Jenis Model Tikus Disfungsi Ovarium dan Periodontitis.....	37
4.1.2 Gambaran Mikroskopis Jenis Leukosit .....	39
4.1.3 Analisis Data .....	40

4.2 Pembahasan.....	43
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>47</b>
5.1 Kesimpulan.....	47
5.2 Saran .....	47
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>48</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>59</b>



**DAFTAR TABEL**

No.	Judul	Halaman
3.1	Tabel Konversi Dosis Hewan Coba dan Manusia .....	30
4.1	Perhitungan Rata-rata Jumlah dan Jenis Leukosit Model Tikus Disfungsi Ovarium .....	37
4.2	Perhitungan Rata-rata Jumlah dan Jenis Leukosit Model Tikus Periodontitis .....	38
4.3	Hasil Analisis Data Model Tikus Disfungsi Ovarium .....	40
4.4	Jumlah Leukosit Model Tikus Disfungsi Ovarium Antar-hari .....	41
4.5	Jumlah Neutrofil Model Tikus Disfungsi Ovarium Antar-hari .....	41
4.6	Jumlah Limfosit Model Tikus Disfungsi Ovarium Antar-hari .....	42
4.7	Hasil Analisis Data Model Tikus Periodontitis .....	42



**DAFTAR GAMBAR**

No.	Judul	Halaman
2.1	Tanaman singkong .....	4
2.2	Struktur kimia flavonoid .....	6
2.3	Gambaran klinis periodontitis .....	8
2.4	Gambaran bakteri <i>P. gingivalis</i> .....	9
2.5	Inflamasi akut dan kronis .....	12
2.6	Neutrofil .....	13
2.7	Eosinofil .....	13
2.8	Basofil .....	14
2.9	Monosit .....	15
2.10	Limfosit .....	15
2.11	Kerangka Konsep .....	18
4.1	Jenis sel leukosit dan morfologinya .....	39
4.2	Diagram neutrofil dan limfosit model tikus disfungsi ovarium antar-perlakuan .....	41
4.3	Diagram jumlah leukosit model tikus periodontitis antar-perlakuan .....	43

**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
LAMPIRAN 3.1 Alat dan bahan penelitian .....	59
LAMPIRAN 3.2 <i>Ethical clearance</i> .....	62
LAMPIRAN 3.3 Surat keterangan identifikasi tumbuhan .....	63
LAMPIRAN 3.4 Surat ijin penelitian .....	64
LAMPIRAN 3.5 Surat keterangan uji identifikasi dan gambaran mikroskopis <i>P. gingivalis</i> .....	67
LAMPIRAN 3.6 Foto prosedur penelitian.....	68
LAMPIRAN 4.1 Data hasil pengamatan .....	70
LAMPIRAN 4.2 Analisis data .....	76

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Disfungsi ovarium merupakan kegagalan fungsi ovarium dalam sekresi hormon seks steroid. Kondisi disfungsi ovarium dapat terjadi pada wanita menopause maupun pada wanita usia produktif yang disebut dengan *Premature Ovarian Insufficiency* (Kanj dkk., 2017). *Premature Ovarian Insufficiency* (POI) dapat terjadi secara spontan karena idiopatik, kelainan genetik, autoimun, dan adanya infeksi. POI juga dapat terjadi akibat induksi seperti bilateral ovariectomi, kemoterapi, dan emboli pembuluh darah pada pelvis (Torrealday dkk, 2017).

Pada kondisi disfungsi ovarium terjadi penurunan sekresi hormon seks steroid ovarium terutama estrogen dan progesteron. Hal ini terjadi akibat hilangnya aktivitas atau tidak berfungsinya folikel ovarium sehingga menyebabkan menurunnya sekresi hormon tersebut. Penurunan konsentrasi hormon seks steroid dalam tubuh terutama estrogen dapat berdampak pada kesehatan umum terutama sebagai kelainan somatik / urogenital dan vasomotor (Wratsangka, 2011).

Pada wanita ditemukan adanya hubungan antara perubahan hormonal dengan penyakit periodontal. Menopause dapat berperan sebagai faktor resiko terjadinya penyakit periodontal (Soejono dkk, 2016). Perubahan estrogen, progesteron, dan hormon wanita lainnya telah dilaporkan memiliki efek pada IL-1, IL-6, dan sekresi TNF- $\alpha$  yang merupakan sitokin proinflamasi yang berperan dalam resorpsi tulang dan reaksi inflamasi periodontal (Lee dkk, 2018).

Salah satu bakteri gram negatif yang dapat menyebabkan periodontitis adalah *Porphyromonas gingivalis*. Interaksi dari bakteri *P.gingivalis* dengan respon imun host juga dapat mengakibatkan gangguan inflamasi pada jaringan periodontal yakni periodontitis. Salah satu komponen yang terdapat pada lapisan dinding bakteri gram negatif adalah lipopolisakarida (LPS). LPS pada *P.gingivalis* merupakan salah satu faktor virulensi, dapat menginduksi inflamasi yang melibatkan sitokin pro-inflamasi diantaranya interleukin-1 (IL-1) dan tumor

necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) . IL-1 berperan dalam menginduksi *polymorphonuclear* leukosit (PMN) untuk bergerak menuju daerah infeksi, sedangkan TNF-  $\alpha$  berperan dalam menghambat apoptosis dari PMN, yang mengakibatkan meningkatnya infiltrasi PMN dapat dilihat pada setiap tahap periodontitis (Wati dkk, 2014). Pada pasien dengan periodontitis juga ditemukan perubahan komponen seluler dan molekul darah perifer karena adanya inflamasi pada jaringan periodontal (Mysak dkk, 2017).

Profil leukosit merupakan salah satu parameter yang penting untuk mengetahui keadaan suatu organisme. Profil leukosit dapat menjadi indikator terjadinya inflamasi. Pemeriksaan profil leukosit, meliputi jumlah leukosit maupun diferensial leukosit (neutrofil, limfosit, monosit, eosinofil dan basofil). Inflamasi dapat menyebabkan peningkatan jumlah leukosit dan neutrofilia (Tjendradjaja, 2011; Anwar, 2015; Indriani, 2017)

Salah satu *drug of choice* untuk periodontitis adalah *metronidazole*. *Metronidazole* efektif terhadap bakteri anaerob seperti *P.gingivalis*. Pemberian *metronidazole* dapat dilakukan secara sistemik. Terdapat efek samping dari pemberian *metronidazole* secara sistemik seperti sakit kepala , mual, mulut kering, dan berasa logam di mulut (Seiler dan Herold, 2005). Banyaknya efek samping yang telah disebutkan, maka penelitian menggunakan bahan alam diharapkan dapat menjadi solusi untuk meminimalkan efek samping tersebut.

Salah satu bahan alam yang mempunyai efek terapi yakni daun Singkong (*Manihot esculenta*). Kandungan yang terdapat dalam daun Singkong yaitu air, fosfor, karbohidrat, kalsium, vitamin C, protein, lemak, vitamin B1, zat besi, flavonoid, saponin, tanin dan triterpenoid (Rikomah dkk, 2017). Senyawa flavonoid utama yang terkandung dalam daun Singkong yakni rutin. Rutin merupakan glikosida kuersetin dengan disakarida yang terdiri dari glukosa dan shamnosa (Warditiani dkk, 2015).

Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa daun Singkong dapat berpotensi sebagai antiinflamasi. Hal ini telah dibuktikan oleh penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Nisa dkk (2013) bahwa daun Singkong memiliki efek antiinflamasi yang mirip dengan obat kimia aspirin. Efek ini diduga karena

adanya kandungan flavonoid dan saponin yang terdapat pada daun Singkong dapat menghambat siklus siklooksigenase. Tanin juga dapat berperan sebagai antiinflamasi (Santi, 2015). Berdasarkan penelitian oleh Nurdiana dkk (2013) membuktikan bahwa ekstrak daun Singkong berpotensi dalam menurunkan sel neutrofil pada proses penyembuhan luka.

Berdasarkan uraian di atas, ekstrak daun Singkong diduga juga mempunyai efek antiinflamasi pada tikus betina disfungsi ovarium dan periodontitis. Oleh karena itu peneliti ingin meneliti profil leukosit perifer pada model tikus betina disfungsi ovarium dan periodontitis yang diterapi dengan ekstrak daun Singkong (*Manihot esculenta*).

## 1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas maka permasalahan yang dapat dirumuskan yaitu: Bagaimanakah potensi ekstrak daun Singkong (*Manihott esculenta* Crantz) terhadap profil leukosit tikus betina disfungsi ovarium dan periodontitis?

## 1.3. Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui bagaimana profil leukosit tikus betina disfungsi ovarium dan periodontitis setelah diberi ekstrak daun Singkong (*Manihott esculenta* Crantz).

## 1.4. Manfaat

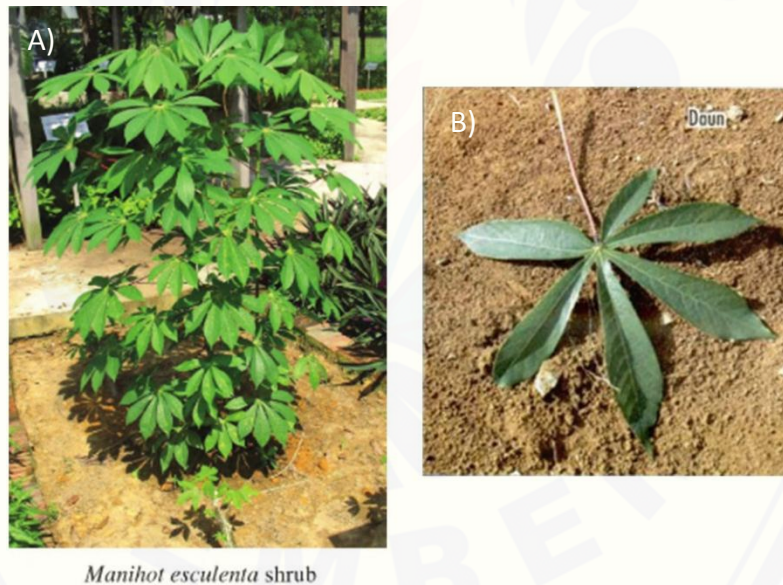
Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat diantaranya :

1. Memberikan informasi ilmiah tentang profil leukosit perifer pada model tikus betina disfungsi ovarium dan periodontitis yang diterapi dengan ekstrak daun Singkong (*Manihot esculenta*).
2. Memberikan informasi ilmiah tentang pemanfaatan daun Singkong sebagai antiinflamasi pada model tikus betina disfungsi ovarium dan periodontitis.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tanaman Singkong

Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) merupakan anggota famili *Euphorbiaceae* yang banyak dijumpai di daerah Asia, termasuk Indonesia. Tanaman singkong merupakan tanaman dikotil dan proses penyerbukannya bersifat silang. Tanaman ini dapat tumbuh setinggi 1-4 m dengan daun yang dapat membelah menjadi 5 hingga 9 lembar daun. Warna batangnya bervariasi, tergantung kulit luarnya. Warna batang yang masih muda umumnya hijau. Warna batang akan berubah menjadi keputih-putihan, kelabu, hijau kelabu atau coklat kelabu saat batang telah tua (Rukmana, 2002). Gambar dari tanaman singkong dapat dilihat pada gambar 2.1.



Gambar 2.1 A) Tanaman singkong. B) daun Singkong. (Purwono dan Purnamawati, 2007; Koh dkk, 2009)

Dalam sistematika (taksonomi) tumbuhan, tanaman singkong diklasifikasikan sebagai berikut :

*Kingdom* : *Plantae*

*Divisio* : *Spermatophyta*

*Sub Divisio* : *Angiospermae*

*Classis* : *Dicotyledoneae*  
*Ordo* : *Euphorbiales*  
*Familia* : *Euphorbiaceae*  
*Genus* : *Manihot*  
*Spesies* : *Manihot esculenta Crantz.*; *Manihot utilissima Pohl.*

(ITIS, 2019)

### 2.1.1 Kandungan dan Manfaat Daun Singkong

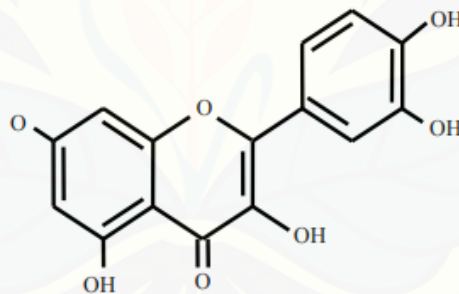
Bagian tanaman singkong yang umum dimanfaatkan oleh masyarakat adalah bagian umbi sementara pemanfaatan bagian daun masih terbatas sebagai sayuran terutama bagian pucuk. Selain itu terdapat sebagian masyarakat yang mempercayai daun Singkong memiliki berbagai manfaat untuk pengobatan penyakit. Daun Singkong dipercaya dapat mengobati rematik, asam urat, anemia, konstipasi, serta untuk meningkatkan daya tahan tubuh (Tersono, 2006). Berdasarkan uji fitokimia, daun Singkong mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, fenolik, tannin, dan saponin (Hasim dkk, 2016). Selain itu, penelitian lain juga menyebutkan bahwa dalam 100 gram daun Singkong (*Manihot esculenta*) mengandung 73 kal Kalori; 6,8 gram protein; 1,2 gram lemak; 13,0 gram karbohidrat; 165 mg kalsium; 54 mg fosfor; 2,0 gr zat besi; 11.000 SI vitamin A; 0,12 mg Vitamin B1; 275.000 mg vitamin C dan 77,2 gr air (Rukmana, 2002).

#### a. Vitamin C

Vitamin C atau asam askorbat merupakan vitaimin yang bersifat larut dalam air, berwarna putih, dan membentuk kristal. Pada penelitian yang dilakukan oleh Yendriwati (2006) menyebutkan bahwa kandungan vitamin C pada daun Singkong sangat tinggi. Konsumsi vitamin C yang tidak teratur dapat menyebabkan defisiensi yang menimbulkan manifestasi dalam rongga mulut karena lemahnya jaringan periodontal gigi (Yendriwati, 2006).

## b. Flavonoid

Flavonoid merupakan salah satu metabolit sekunder penting pada tumbuhan yang berperan memberi warna, rasa pada biji, bunga, serta aroma pada buah. Selain itu flavonoid juga dapat berperan untuk melindungi tumbuhan dari pengaruh lingkungan, sebagai antimikroba serta melindungi dari paparan sinar UV. Flavonoid adalah yang merupakan turunan dari *2-phenyl-benzyl-γ-pyrone* dengan biosintesis menggunakan jalur fenilpropanoid. Flavonoid dibagi menjadi beberapa subkelompok berdasarkan substitusi karbon pada gugus aromatik sentral (C). Ada tujuh kelas dari flavonoid alami yaitu flavanon, flavon, flavonol, isoflavon, chalcones, aurones, dan proanthocyanidins (Redha, 2010). Mekanisme aktivitas antiinflamasi dari flavonoid dapat melalui beberapa jalur yaitu dengan menghambat aktivitas enzim COX dan lipooksigenase, menghambat akumulasi leukosit, menghambat degranulasi neutrofil serta menghambat pelepasan histamin (Nijveltd dkk., 2001).



Gambar 2.2 Struktur kimia flavonoid (Redha, 2010)

## c. Triterpenoid

Triterpenoid merupakan senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari enam satuan isoprene. Triterpenoid secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon C<sub>30</sub> asiklik, yaitu skualena. Senyawa ini berstruktur siklik, kebanyakan berupa alkohol, aldehida atau asam karboksilat (Salmiwanti, 2016).



d. Saponin

Senyawa saponin merupakan senyawa glikosida kompleks yaitu terdiri dari senyawa hasil kondensasi suatu gula dengan suatu senyawa hidroksil organik yang apabila dihidrolisis akan menghasilkan gula (glikon) dan non-gula (aglikon). Saponin disebut sebagai surfaktan alami (nama saponin diambil dari sifat utama ini yaitu “sapo” dalam bahasa latin yaitu sabun (Hawley, 2004 dan Calabria, 2008). Saponin dapat diperoleh dari tumbuhan melalui metode ekstraksi.

e. Tannin

Tannin merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman dan disintesis oleh tanaman (Jayanegara dan Sofyan, 2008). Tannin dibagi menjadi dua kelompok yaitu tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi. Tannin memiliki peranan biologis yang kompleks mulai dari pengendap protein dan juga dapat berfungsi sebagai antioksidan biologis (Hagerman, 2002).

## 2.2 Disfungsi Ovarium

Disfungsi ovarium merupakan kegagalan fungsi folikel ovarium dalam memproduksi estrogen secara progresif. Disfungsi ovarium biasa terjadi pada wanita menopause (Goodman dkk, 2011). Menopause merupakan berhentinya siklus menstruasi untuk selamanya bagi wanita yang sebelumnya mengalami menstruasi sebagai akibat dari hilangnya aktivitas folikel ovarium. Usia seorang wanita yang mengalami menopause sangat bervariasi. Hal ini sangat bergantung pada berbagai faktor yang mempengaruhinya seperti keturunan, kesehatan umum dan pola kehidupan. Rata-rata seorang wanita akan mengalami menopause sekitar usia 45 sampai 50 tahun. Namun, menopause juga mungkin terjadi pada wanita yang menjalani operasi pengangkatan ovarium (Ulfah, 2017). Pada wanita yang mengalami pengangkatan ovarium (ovariektomi) juga terjadi penurunan hormon estrogen (Parker dkk, 2009).

Disfungsi ovarium juga dapat terjadi pada wanita usia produktif, kondisi ini disebut *Premature Ovarian Insufficiency* (POI). Etiologi POI belum diketahui atau idiopatik, namun beberapa peneliti mempertimbangkan berbagai aspek yang mungkin berhubungan dengan POI, yakni kelainan genetik, gangguan metabolisme, autoimunitas, prosedur iatrogenik dan faktor lingkungan (Rudnicka, 2018).

Selain itu, disfungsi ovarium juga dapat terjadi karena infeksi lipopolisakarida (LPS) bakteri gram negatif. LPS merangsang makrofag untuk mengeluarkan sitokin, yang menghambat fungsi ovarium (Agrawal, 2011). Penelitian lain juga menyebutkan bahwa LPS bakteri gram negatif juga dapat menghambat steroidogenesis (Yoo dkk, 2016). Steroidogenesis merupakan proses pembentukan hormon steroid. Jika steroidogenesis terhambat, maka produksi hormon steroid seperti estrogen juga akan menurun (Syarif dkk, 2016).

## 2.3 Periodontitis

### 2.3.1 Definisi

Salah satu penyakit yang sering terjadi di rongga mulut adalah penyakit periodontal. Di Indonesia penyakit periodontal menduduki urutan kedua utama dengan prevalensi penyakit periodontal pada semua kelompok usia, di Indonesia sebesar 96,58% (Hanifah dkk., 2018). Periodontitis adalah proses inflamasi pada jaringan periodontal yang disebabkan oleh kelompok mikroorganisme spesifik yang menyebabkan kerusakan ligamen periodontal dan tulang alveolar yang ditandai dengan pembentukan poket, resesi maupun keduanya (Newman dkk, 2015). Gambaran klinis periodontitis dapat dilihat pada gambar 2.3.



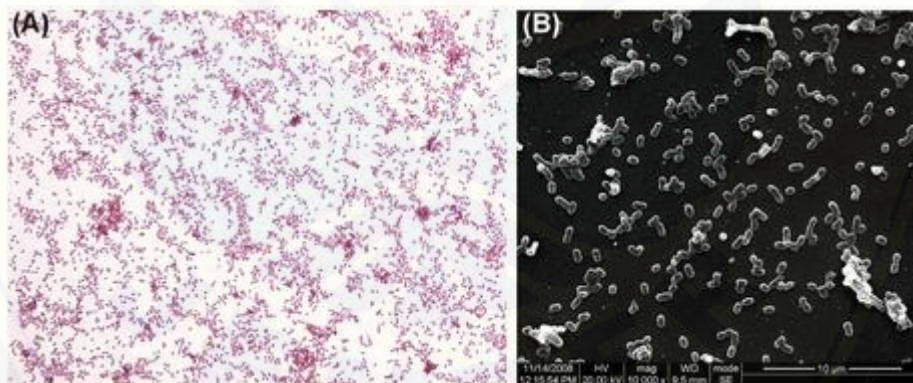
Gambar 2.3 Gambaran klinis periodontitis (Newman dkk, 2015)

### 2.3.2 Etiologi

#### a. Faktor utama

Penyebab utama dari penyakit periodontal adalah adanya bakteri pada plak. Bakteri plak, terutama pada subgingiva dapat berpenetrasi pada junctional epithelium dan menyebabkan kerusakan jaringan periodontal. Bakteri subgingiva yang dapat menyebabkan periodontitis diantaranya adalah *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, and *Prevotella intermedia* (Torrungruang dkk, 2015). Diantara bakteri subgingiva yang lain, bakteri *P. gingivalis* merupakan “key pathogen” dari penyakit periodontal (Newman dkk., 2015).

*P. gingivalis* merupakan bakteri anaerob gram negatif berbentuk kokobasil dengan panjang 0.5 - 2 $\mu$ m, pleomorfik, tidak berspora serta tidak mempunyai alat gerak (*non motile*) (Samaranayake, 2002). Lapisan dinding bakteri gram negatif ini mengandung tiga komponen lapisan yakni lipoprotein, peptidoglikan dan lipopolisakarida (Sriyono dan Andriani, 2013). Gambaran bakteri *P. gingivalis* dapat dilihat dalam gambar 2.4.



Gambar 2.4 (A) bakteri *Porphyromonas gingivalis* (pewarnaan gram). (B) *P. gingivalis* (Scanning Electron Microscope; SEM) (Zhou dan Li, 2015)

Secara taksonomi, bakteri *P. gingivalis* diklasifikasikan sebagai berikut (Pratiwi, 2012) :

*Kingdom* : *Eubacteria*

*Superphylum* : *Bacteroidetes / Chlorabi group*

*Phylum* : *Bacteroidetes*

*Class* : *Bacteroides*  
*Ordo* : *Bacteroidales*  
*Family* : *Porphyromonadaceae*  
*Genus* : *Porphyromonas*  
*Species* : *Porphyromonas gingivalis*

Salah satu komponen dinding sel dari *P. gingivalis* yakni lipopolisakarida (LPS) merupakan stimulan yang kuat untuk memicu respon host. LPS memiliki potensi kuat sebagai simulator inflamasi bila diinjeksikan secara in vivo karena LPS mampu menembus ke dalam jaringan dan bertindak sebagai endotoksin sehingga menyebabkan peradangan pada jaringan dan dapat berlanjut menyebabkan kerusakan tulang (Kumar dkk., 2007).

#### b. Faktor predisposisi

Selain terjadi akibat faktor utama yakni bakteri plak, penyakit periodontal juga disebabkan karena adanya faktor predisposisi. Faktor predisposisi dapat bersifat lokal seperti restorasi gigi yang tidak tepat, kavitas karies, tumpukan sisa makanan, geligi tiruan sebagian lepasan yang desainnya tidak baik yang dapat berperan sebagai faktor retensi plak. Sedangkan faktor predisposisi yang bersifat sistemik misalnya: faktor genetik, nutrisi, hematologi, dan hormonal (Eley dkk, 2004).

Kesehatan jaringan periodontal pada wanita berkaitan dengan perubahan hormonal yang dialami. Hormon seksual berpengaruh pada fisiologi jaringan periodontal, perkembangan penyakit periodontal dan penyembuhan luka. Berkurangnya kadar estrogen pada fase menopause dapat menyebabkan peningkatan resorpsi tulang alveolar, kehilangan perlekatan jaringan periodontal, peningkatan keparahan penyakit periodontal dan kehilangan gigi. Keparahan penyakit periodontal wanita menopause lebih tinggi dibandingkan wanita belum menopause (Arina, 2008). Reseptor estrogen dapat ditemukan pada osteoblast-like cell yang berperan langsung dalam pembentukan tulang. Berkurangnya hormon estrogen dapat mengakibatkan berkurangnya densitas tulang alveolar (Ramamurthy, 2015).

## 2.4. Inflamasi

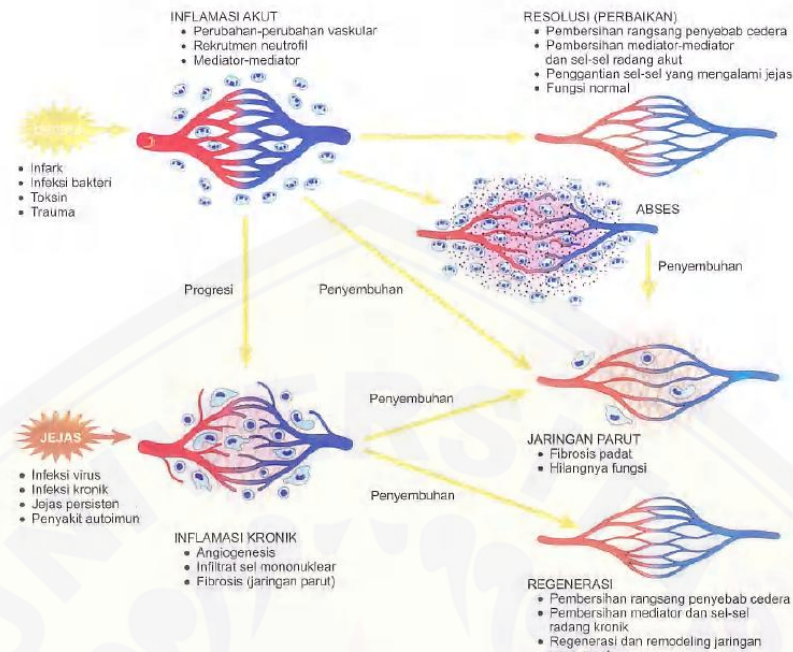
Inflamasi adalah suatu respon non-spesifik terhadap invasi benda asing atau kerusakan jaringan yang terutama dilakukan oleh sel fagosit (neutrofil dan makrofag). Tujuan dari proses inflamasi adalah membaawa fagosit dan protein plasma ke tempat invasi atau kerusakan untuk menghancurkan agen-agen asing, membersihkan debris serta mempersiapkan proses penyembuhan dan perbaikan (Sherwood, 2014). Respon Inflamasi terjadi dalam dua fase yaitu akut dan kronik (Gambar 2.5) (Kumar dkk, 2007) :

### 2.4.1 Inflamasi Akut

Inflamasi akut merupakan respon cepat yang dilakukan oleh tubuh terhadap agen infeksi dan kerusakan jaringan. Inflamasi akut dapat berlangsung dalam beberapa menit atau jam dan berlangsung selama beberapa jam sampai beberapa hari. Karakteristik dari inflamasi akut yaitu terjadinya dilatasi pembuluh darah untuk meningkatkan aliran darah, peningkatan permeabilitas mikrovaskular, emigrasi leukosit dari mikrosirkulasi, serta akumulasi sel leukosit pada lokasi jejas dan aktivitasnya untuk mengeliminasi antigen. Pada proses inflamasi akut terjadi infiltrasi sel imun predominan neutrofil (Kumar dkk, 2007).

### 2.4.2 Inflamasi Kronik

Inflamasi kronik merupakan kondisi lanjutan dari inflamasi akut yang tidak diatasi sehingga antigen masih menetap di jaringan dan mengganggu proses penyembuhan normal. Inflamasi kronik dikarakteristikan dengan adanya infiltrasi sel mononuclear diantaranya makrofag, limfosit dan sel plasma. Sel inflamasi dan mediator inflamasi meningkat karena adanya kerusakan jaringan yang persisten. Pada kondisi ini terjadi perbaikan jaringan melalui *tissue replacement* disertai dengan angiogenesis (Kumar dkk, 2007).



Gambar 2.5 :Inflamasi akut dan kronis (Kumar dkk, 2007)

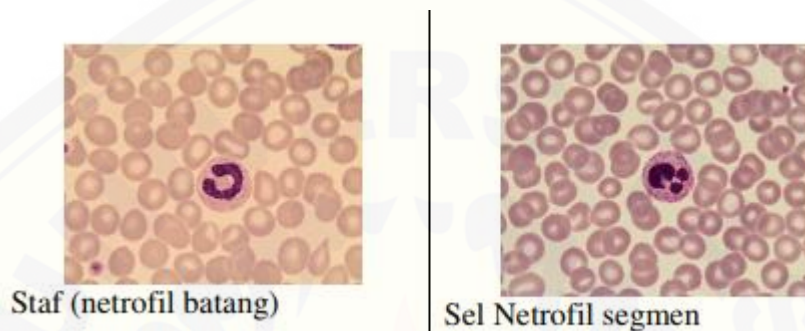
## 2.5 Leukosit

Leukosit merupakan sel darah putih yang berperan dalam melawan infeksi. Leukosit dapat keluar dari pembuluh darah dan bergerak ke tempat yang mengalami invasi atau mengalami kerusakan. Leukosit terbagi atas dua kategori utama bergantung pada gambaran nukleus dan ada tidaknya granula dalam sitoplasma. Neutrofil, eosinofil, dan basofil dikategorikan sebagai granulosit (sel mengandung granula) dan polimorfonukleus (bentuk inti beragam). Sedangkan monosit dan limfosit dikategorikan sebagai agranulosit (sel tidak memiliki granula) serta mononukleus (berinti satu) (Sherwood, 2014).

### 2.5.1 Neutrofil

Neutrofil merupakan jenis sel leukosit yang terbanyak dalam peredaran darah. Neutrofil normal berukuran 14-15  $\mu\text{m}$ , sitoplasmanya tidak berwarna (eosinofilik) mengandung banyak granula kecil dan halus. Ada dua macam jenis neutrofil yaitu neutrofil jenis stab (batang) dan neutrofil segmen. Pada neutrofil stab, inti sel melekuk dengan ukuran yang sama, berbentuk seperti huruf U.

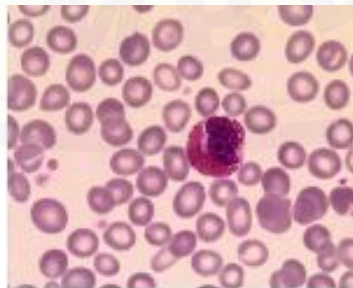
Sedangkan pada neutrofil segmen, inti sel memiliki 2-5 lobus yang dihubungkan oleh benang kromatin (Gambar 2.6). Neutrofil diproduksi di dalam sumsum tulang, kemudian beredar ke dalam peredaran darah selama 6-10 jam sebelum berpindah menuju jaringan yang mempunyai usia 1-2 hari. Fungsi neutrofil adalah sebagai sel fagosit yang bergerak secara khusus ke tempat infeksi dimana neutrofil akan menelan, membunuh dan menghancurkan bakteri (Firani, 2018).



Gambar 2.6 Neutrofil (Santosa, 2010)

### 2.5.2 Eosinofil

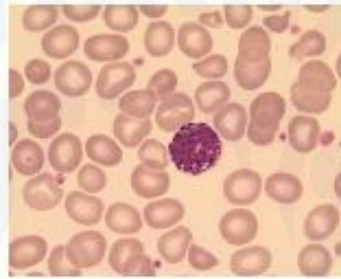
Eosinofil merupakan sel yang memiliki nukleus 2 lobus dengan sitoplasma dipenuhi granula berwarna kemerahan yang disebut granula eosinofilik (Gambar 2.7). Jumlah eosinofil adalah 1-2% dari total leukosit. Eosinofil diproduksi di dalam sumsum tulang dan bersirkulasi dalam peredaran darah selama 1 hari sebelum bermigrasi ke jaringan. Eosinofil dapat bertahan hidup selama 8-12 hari. Eosinofil berperan dalam proses fagositosis dan membunuh mikroorganisme terutama parasit (D' Hiru, 2013; Firani, 2018).



Gambar 2.7 : Eosinofil (Santosa, 2010)

### 2.5.3 Basofil

Basofil merupakan sel yang memiliki inti sel berlobus dan sitoplasma yang dipenuhi dengan granula kasar berwarna ungu-biru (Gambar 2.8). Jumlah basofil 0,5-1% dari total leukosit. Basofil diproduksi di dalam sumsum tulang dan bersirkulasi dalam peredaran darah selama beberapa hari sebelum bermigrasi ke jaringan. Basofil berperan dalam respon inflamasi dan alergi terutama reaksi hipersensitivitas serta berperan dalam pertahanan tubuh terhadap infeksi parasit (D' Hiru, 2013; Firani, 2018).

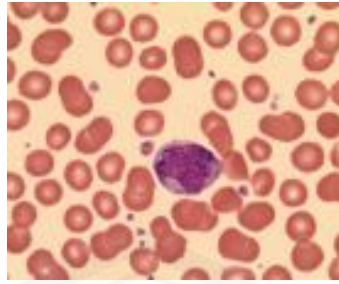


Gambar 2.8 : Basofil (Santosa, 2010)

### 2.5.4 Monosit

Monosit merupakan jenis sel darah yang memiliki ukuran paling besar. Monosit memiliki inti berlobus berbentuk seperti ginjal, sitoplasma yang luas berwarna biru-keabuan (Gambar 2.9). Monosit ditemukan sekitar 5-7% dari total leukosit. Monosit dapat berdiferensiasi menjadi makrofag pada jaringan. Selain itu, monosit juga dapat berdiferensiasi menjadi berbagai sel khusus untuk organ yang berbeda. Monosit dan makrofag mempunyai peranan penting dalam mempengaruhi imunitas tubuh dengan cara merespon rangsangan kemotaktik, bersifat fagositik dan menghancurkan sel tubuh yang mengalami kerusakan bahkan kematian, menghadirkan antigen pada limfosit, serta mensekresikan sitokin yang mempengaruhi sel tubuh lainnya termasuk sel-sel darah dan prekursornya (D' Hiru, 2013; Firani, 2018).

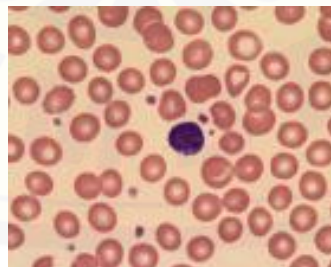




Gambar 2.9 : Monosit (Santosa, 2010)

#### 2.5.5 Limfosit

Limfosit merupakan jenis sel leukosit urutan kedua setelah neutrofil yang banyak beredar dalam peredaran darah. Jumlah limfosit sekitar 25%-33% dari jumlah lekosit total. Limfosit berukuran lebih kecil daripada neutrofil. Limfosit berinti bulat atau oval yang dikelilingi dengan sitoplasma yang jernih berwarna biru muda pucat (Gambar 2.10). Limfosit berasal dari sel induk pluripotensial di dalam sumsum tulang dan bermigrasi ke jaringan limfoid. Terdapat 2 jenis limfosit yaitu limfosit B dan limfosit T. Limfosit B menghasilkan antibodi yang beredar dalam darah dan bertanggung jawab dalam imunitas humoral (diperantarai antibodi). Suatu antibodi berikatan dengan benda asing yang mengandung antigen spesifik dan menandainya untuk dihancurkan. Limfosit T tidak memproduksi antibodi, sel ini secara langsung mengeluarkan berbagai zat kimia yang digunakan untuk menghancurkan sel sasarannya. Proses ini dinamakan imunitas seluler ((D' Hiru, 2013; Sherwood, 2014; Firani, 2018).



Gambar 2.10 : Limfosit (Santosa, 2010)

### 2.5.6 Jumlah Leukosit Darah Tepi dan Faktor-faktor yang Mempengaruhi

Dalam darah manusia normal, jumlah leukosit berkisar antara 4000-11.000 sel/mm<sup>3</sup> (Bakhri, 2018). Jumlah leukosit dapat naik dan turun sesuai dengan keadaan. Jumlah leukosit dapat meningkat yang biasa disebut leukositosis, sebaliknya dapat menurun disebut leukopenia (Sofro, 2012).

Leukosit dapat mengalami peningkatan apabila kelenjar adrenal dirangsang secara farmakologis maupun fisiologis. Stimulasi fisiologis seperti olah raga, stress, pemaparan terhadap suhu yang ekstrim dapat mengakibatkan peningkatan jumlah leukosit dengan cara pengeluaran epinefrin. Selain itu peningkatan jumlah leukosit juga dapat disebabkan karena terjadi infeksi. Pada kondisi ini jumlah sel leukosit meningkat dan tubuh mengalami gangguan dalam memproduksi leukosit, hal ini menyebabkan tubuh kita rentan diserang penyakit (Tim Matrix, 2009).

Selain itu jumlah leukosit juga dapat menurun sebagai akibat dari berbagai kondisi seperti infeksi virus, penyakit atau kerusakan sumsum tulang, radiasi, atau kemoterapi. Penyakit sistemik yang parah misalnya lupus eritematosus, penyakit tiroid, sindrom Cushing juga dapat menyebabkan penurunan jumlah leukosit. Dalam hal ini semua atau salah satu jenis sel saja yang dapat terpengaruh (Corwin, 2009).

## 2.6 Hubungan antara Disfungsi Ovarium dengan Periodontitis

Kondisi disfungsi ovarium dapat mengakibatkan berkurangnya sekresi hormon terutama estrogen. Dengan berkurangnya sekresi estrogen dapat mempengaruhi keratinisasi pada gingiva, tercermin pada beberapa penyakit gingiva. Selain itu pada kondisi disfungsi ovarium juga terdapat adanya kecenderungan terjadinya osteoporosis dimana osteoporosis merupakan salah satu faktor resiko untuk perkembangan penyakit periodontal (periodontitis) (Erawati dkk, 2003).

## 2.7 Hubungan *P.gingivalis* terhadap Periodontitis dan Respon Inflamasi

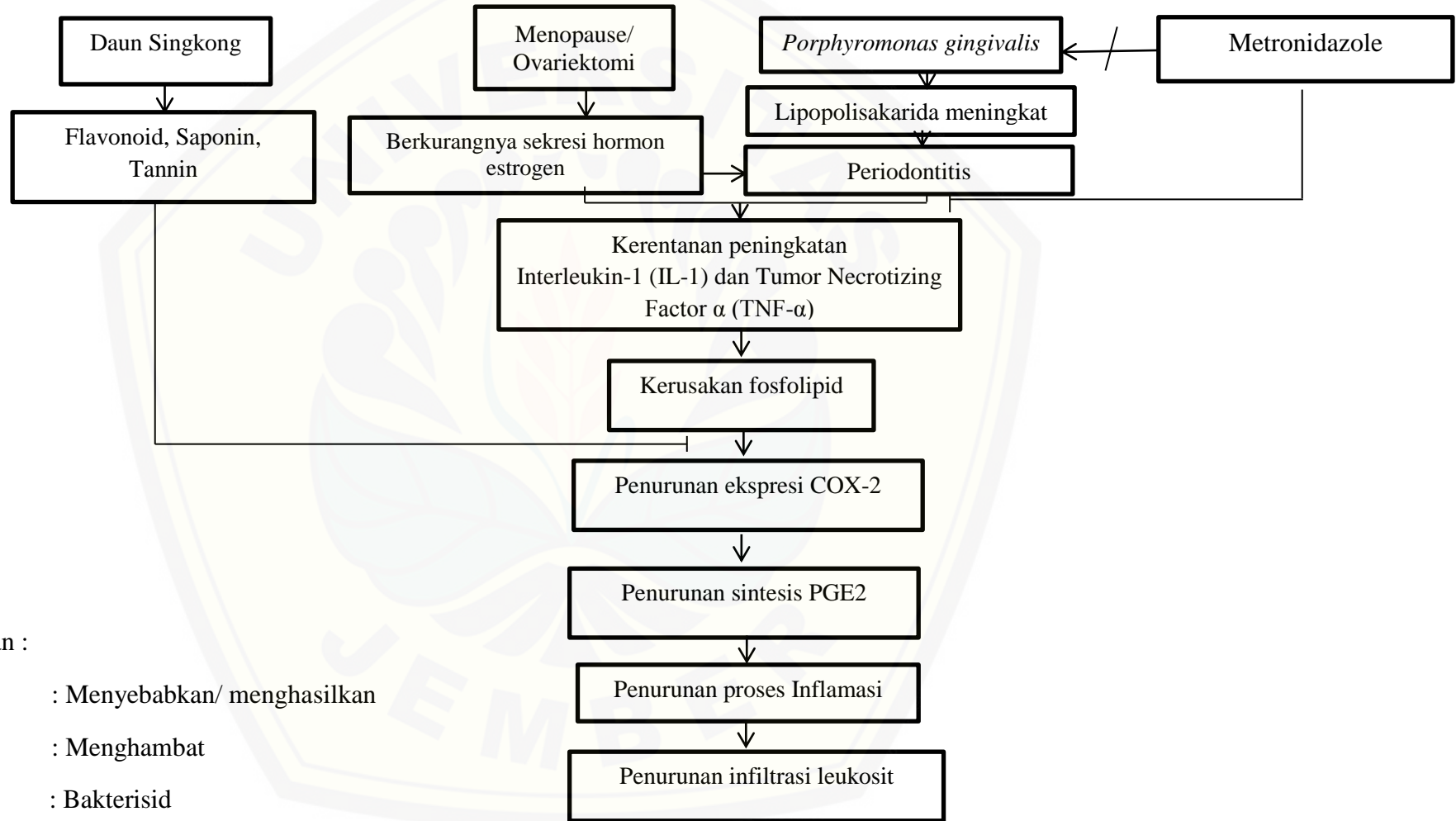
Respons peradangan awal dimulai saat *P.gingivalis* mengeluarkan endotoksin berupa LPS. LPS yang dilepaskan berikatan dengan *lipoliskarida binding protein* (LBP). Ikatan kedua komponen tersebut membentuk suatu kompleks molekul. Komplek molekul ini akan dikenali oleh CD14 yang berada dipermukaan sel target, kemudian dikenali oleh makrofag melalui reseptor TLR4. Reseptor inilah yang akan mengaktifkan makrofag sebagai respons imun adaptif dengan pembentukan sitokin proinflamatori antara lain IL-1 dan TNF- $\alpha$ . Interleukin-1 dan TNF- $\alpha$  yang dihasilkan oleh makrofag dapat menyebabkan rusaknya fosfolipid dari membran sel epitel gingiva, fibroblas, sel mast, neutrofil. Rusaknya fosfolipid membran dapat memicu metabolisme asam arakhidonat oleh kerja enzim fosfolipase A2. Hal tersebut mengakibatkan siklooksigenase (COX-2) meningkat dan akan meningkatkan sintesis PGE2. Peningkatan sintesis PGE2 menyebabkan peningkatan vasodilatasi dan permeabilitas endothelium yang berakibat meningkatkan infiltrasi sel inflamasi (Prasetya dkk., 2014).

## 2.8 Metronidazole

Metronidazole merupakan senyawa nitroimidazole dengan spektrum luas yang efektif terhadap infeksi bakteri. Metronidazole digunakan dalam penyakit periodontal karena metronidazole mampu bereaksi terhadap bakteri anaerobik kokus dan bakteri anaerob batang gram positif serta negatif (Pejcic, 2011; Tedjasulaksana, 2016). Molekul metronidazole dapat berinteraksi dengan molekul DNA. Molekul metronidazole dapat menyebabkan hilangnya struktur helix DNA dan putusnya untai DNA, sehingga terjadi penghambatan sintesa DNA dan matinya sel (Seiler dan Herold, 2005; Lofmark dkk., 2010).

Metronidazole juga dapat berperan sebagai antiinflamasi. Mekanisme metronidazole sebagai antiinflamasi berhubungan dengan adhesi sel leukosit dengan endotel. Metronidazole juga dapat sebagai antiinflamasi melalui mekanisme penghambatan sitokin pro-inflamasi seperti IL-1, IL-6, dan IL-8 (Shakir dkk., 2016).

2. 9 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 2.11 Kerangka Konsep

## 2.10 Penjelasan Kerangka Konsep

Disfungsi ovarium merupakan kegagalan fungsi folikel ovarium dalam memproduksi estrogen secara progresif, yang biasa terjadi pada wanita menopause (Goodman dkk, 2011). Estrogen memiliki peran terhadap proses inflamasi. Defisiensi estrogen dapat mengakibatkan kerentanan peningkatan mediator proinflamasi seperti IL-1, IL-6 dan TNF- $\alpha$ . Selain itu estrogen juga memiliki peran untuk menghambat migrasi leukosit khususnya neutrofil dan monosit ke jaringan yang mengalami inflamasi (Straub, 2007). Dengan berkurangnya sekresi estrogen dapat mempengaruhi keratinisasi pada gingiva, tercermin pada beberapa penyakit gingiva. Selain itu pada kondisi disfungsi ovarium juga terdapat adanya kecenderungan terjadinya osteoporosis dimana osteoporosis merupakan salah satu faktor resiko untuk perkembangan penyakit periodontal (periodontitis) (Erawati dkk, 2003).

*P.gingivalis* mengeluarkan endotoksin berupa lipopolisakarida (LPS). LPS yang dilepaskan dapat memicu terjadinya peningkatan sitokin proinflamasi seperti IL-1, IL-6 dan TNF- $\alpha$ . Interleukin-1 dan TNF- $\alpha$  yang dihasilkan oleh makrofag dapat menyebabkan rusaknya fosfolipid dari membran sel epitel gingiva, fibroblas, sel mast, neutrofil. Peningkatan mediator inflamasi dapat menyebabkan peningkatan migrasi leukosit (Arfan, 2016). Hal-hal tersebut di atas bisa menyebabkan terjadinya periodontitis. Periodontitis merupakan keadaan inflamasi pada jaringan penyangga gigi. Periodontitis dapat menyebabkan kerusakan progresif pada ligamen periodontal dan tulang alveolar, menyebabkan kedalaman probing meningkat, resesi, atau keduanya (Newman dkk., 2012).

Metronidazole merupakan salah satu *drug of choice* untuk periodontitis. Metronidazole dapat berperan sebagai antibiotika maupun sebagai antiinflamasi. Mekanisme metronidazole sebagai antibiotika adalah berinteraksi dengan molekul DNA bakteri yang menyebabkan hilangnya struktur helix DNA dan putusya untai DNA, sehingga terjadi penghambatan sintesa DNA dan matinya sel (Seiler dan Herold, 2005; Lofmark dkk., 2010). Mekanisme metronidazole sebagai antiinflamasi berhubungan dengan adhesi sel leukosit dengan endotel. Metronidazole juga dapat sebagai antiinflamasi melalui mekanisme penghambatan

sitokin pro-inflamasi seperti IL-1, IL-6, dan IL-8 (Shakir dkk., 2016). Penggunaan metronidazole dapat menimbulkan efek samping seperti sakit kepala, mual, mulut kering, dan berasa logam di mulut (Seiler dan Herold, 2005; Lofmark dkk., 2010).

Salah satu bahan alam yang mempunyai efek terapi adalah Daun Singkong. Kandungan flavonoid, saponin dan tannin dalam daun Singkong dapat berperan sebagai antiinflamasi. Mekanisme aktivitas antiinflamasi dari flavonoid dapat melalui beberapa jalur yaitu dengan menghambat aktivitas enzim COX dan lipooksigenase, menghambat akumulasi leukosit, menghambat degranulasi neutrofil serta menghambat pelepasan histamin (Nijveltd dkk., 2001), sehingga dengan adanya kandungan flavonoid, saponin dan tannin dalam daun Singkong pada penelitian ini diharapkan dapat menurunkan proses inflamasi dengan indikator penurunan jumlah akumulasi profil leukosit.

## **2.10 Hipotesis**

Hipotesis dalam penelitian ini yaitu: Profil leukosit model tikus disfungsi ovarium/ ovariectomi dan model tikus periodontitis yang diinduksi bakteri *P. gingivalis* akan mengalami penurunan setelah diberi ekstrak daun Singkong.

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris. Jenis penelitian ini dipilih karena baik sampel maupun perlakuan lebih terkendali, terukur dan pengaruh pemberian perlakuan lebih dapat dipercaya (Notoadmodjo, 2010).

### 3.2. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini menggunakan *the post-test only control group design*, yakni dilakukan pengukuran atau pengamatan pada kelompok kontrol dan perlakuan pada waktu yang telah ditentukan setelah diberi suatu perlakuan (Notoadmodjo, 2010). Rancangan penelitian ini digunakan untuk mengetahui perbedaan antara kelompok perlakuan dan kontrol (Sugiyono, 2009).

### 3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

#### 3.3.1. Tempat Penelitian

- a. Identifikasi tanaman singkong dilakukan di UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi, Kabupaten Pasuruan, Jawa Timur.
- b. Pembuatan ekstrak daun Singkong (*Manihot esculenta*) dilakukan di Laboratorium Analisa Terpadu Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.
- c. Perlakuan hewan coba (ovariektomi, induksi *P.gingivalis*, pemberian ekstrak daun Singkong dan pemberian *metronidazole*) dilakukan di Laboratorium Farmakologi Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

- d. Pembuatan preparat hapusan darah dan perhitungan jumlah leukosit dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

### 3.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan Januari – Maret 2020.

## 3.4 Identifikasi Variabel Operasional

### 3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz).

### 3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah jumlah dan jenis leukosit hapusan darah tepi.

### 3.4.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini sebagai berikut :

- a. Kriteria sampel
- b. Bakteri *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277)
- c. Prosedur disfungsi ovarium dengan metode ovariektomi
- d. Ekstrak daun Singkong (*Manihot esculenta*) 179,2 mg/grBB sebanyak 2 ml diberikan dua kali sehari secara per oral
- e. Dosis metronidazole 2,25 mg/kgBB diberikan secara per oral 2 kali sehari
- f. Makanan (turbo) dan minuman tikus secara *ad libitum*
- g. Ukuran kandang 40 cm x 60 cm x 15 cm dengan ventilasi yang cukup, 1 kandang berisi 3 tikus dan dibersihkan setiap 3 hari sekali



### 3.5 Definisi Operasional Penelitian

#### 3.5.1 Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz)

Ekstrak daun Singkong merupakan daun Singkong yang diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% selama 3 hari dan dilakukan pengadukan setiap 24 jam. Selanjutnya, larutan dipekatkan dengan *rotary evaporator* menjadi sebuah ekstrak daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz).

#### 3.5.2 Profil Leukosit Perifer

Pengukuran profil leukosit meliputi penghitungan jumlah total dan hitung jenis leukosit (basofil, eosinofil, neutrofil, limfosit dan monosit). Darah diambil dari aliran darah tepi/perifer melalui plexus infraorbital. Pengambilan darah dilakukan pada saat normal sebelum diberi perlakuan (Hari ke-0), setelah diberi perlakuan (Hari ke-28), 3 hari setelah diberi terapi (Hari ke-31), dan 7 hari setelah diberi terapi (Hari ke-35). Metode penghitungan jumlah leukosit yang digunakan dalam penelitian ini adalah dengan metode bilik hitung. Metode penghitungan jenis leukosit menggunakan metode visual. Penghitungan jumlah dan jenis leukosit dilakukan oleh tiga orang pengamat. Hasil yang diperoleh dari tiga orang pengamat tersebut kemudian dijumlahkan dan dirata-rata.

#### 3.5.3 Tikus Disfungsi Ovarium

Disfungsi ovarium merupakan keadaan ovarium tidak dapat berfungsi dalam memproduksi estrogen secara progresif. Salah satu tindakan yang dapat menyebabkan disfungsi ovarium adalah ovariectomi. Ovariectomi pada hewan coba dimaksudkan sebagai hewan model defisiensi estrogen yang kondisinya menyerupai wanita menopause.

#### 3.5.4 Tikus Periodontitis

Periodontitis merupakan keadaan peradangan yang terjadi di jaringan periodontal. Pada penelitian ini pembuatan model tikus periodontitis dilakukan dengan cara induksi *P. gingivalis*. Induksi dilakukan dengan cara menginjeksikan

*P.gingivalis strain ATCC 33277* dengan konsentrasi  $2 \times 10^9$  pada sulkus gingiva sebanyak 0,05ml di bukal dan lingual molar bawah kiri. Injeksi dilakukan setiap tiga hari sekali selama 19 hari menggunakan *tuberculine syringe* dengan ukuran jarum 30 gauge.

### 3.6 Populasi dan Sampel

#### 3.6.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian yang digunakan adalah tikus putih galur *Sprague Dawley* betina dan belum pernah digunakan untuk penelitian

#### 3.6.2 Kriteria Sampel

Kriteria sampel pada penelitian ini adalah :

- Tikus strain *Sprague Dawley* berjenis kelamin betina
- Umur 2-3 bulan
- Berat badan  $\pm 200$  gram
- Tikus dalam keadaan sehat ditandai dengan gerakan aktif dari tikus

#### 3.6.3 Besar Sampel Penelitian

Jumlah sampel minimum dihitung dengan berdasarkan perhitungan MEAD (Singh, 2014):

$$E = N - B - T$$

Dengan keterangan:

E : Derajat kebebasan analysis of variance, dengan kisaran nilai (10-20)

N : Jumlah Sampel dalam penelitian (dikurangi 1)

B : Blocking component menggambarkan pengaruh lingkungan yang diperbolehkan dalam penelitian (dikurangi 1)

T: Jumlah Kelompok perlakuan (dikurangi 1)

$$E = N - B - T$$

$$\geq 10 = (N-1) - 0 - (6-1)$$

$$\geq 10 = N - 1 - 5$$

$$N \geq 16$$

$$E = N - B - T$$

$$\leq 20 = (N-1) - 0 - (6-1)$$

$$\leq 20 = N - 1 - 5$$

$$N \leq 26$$

Hasil perhitungan sampel menggunakan rumus MEAD didapatkan N=16-26 yang kemudian dibagi menjadi 6 kelompok penelitian. Jumlah sampel minimal setiap kelompok yang dapat digunakan adalah 3-4 sampel. Pada penelitian ini menggunakan 3 sampel setiap kelompok.

#### 3.6.4 Pengelompokan Sampel

Sampel sebanyak 18 ekor tikus *Sprague Dawley* betina dibagi menjadi 6 kelompok sebagai berikut:

- a) Kelompok perlakuan 1 (P1) merupakan kelompok tikus yang dilakukan ovariectomi terdiri dari 9 ekor tikus:
  - 1) Kelompok K- (3 ekor tikus) tikus diberi aquades
  - 2) Kelompok K+ (3 ekor tikus) tikus diberi metronidazole
  - 3) Kelompok P (3 ekor tikus) tikus diberi ekstrak daun Singkong (*Manihot esculenta*)
- b) Kelompok perlakuan 2 (P2) merupakan kelompok tikus yang diinduksi bakteri *Porphyromonas gingivalis* terdiri dari 9 ekor tikus:
  - 1) Kelompok K- (3 ekor tikus) tikus diberi aquades
  - 2) Kelompok K+ (3 ekor tikus) tikus diberi metronidazole
  - 3) Kelompok P (3 ekor tikus) tikus diberi ekstrak daun Singkong (*Manihot esculenta*)

Setiap kelompok dilakukan pengambilan darah pada hari ke 0, hari ke 28, hari ke 31 (setelah 3 hari pemberian ekstrak daun Singkong), hari ke 35 (setelah 7 hari pemberian perlakuan).

### 3.7 Alat dan Bahan Penelitian

Gambar dokumentasi alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian terdapat dalam Lampiran 3.1.

### 3.7.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah 6 kandang tikus termasuk tempat makan dan minum, neraca digital (Ohaus), masker, *handscoon*, kayu berukuran 2x2 cm, syringe kecil kapasitas 1 ml, *rat dental chair*, tabung reaksi, sentrifuge, kawat ose, *autoclave*, *spektrofotometer*, *shakerbath*, *rotary evaporator*, inkubator, blender, mortar, *tuberculine syringe*, sonde, pinset, scalpel, pot, lampu spiritus, *object glass* dan *deck glass*, mikroskop binokuler, benang jahit, *disposable syringes* 3 ml, gunting, pipet leukosit beserta aspiratornya, kamar hitung Neubauer, mangkok keramik, tabung darah.

### 3.7.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah 18 ekor tikus *Sprague Dawley* betina, aquadest steril, media BHI-B, media BHI-A, vitamin K, *metronidazole*, hemin, *yeast extract*, bakteri *Porphyromonas gingivalis*, ekstrak flavonoid daun Singkong (*Manihot esculenta*), *metronidazole*, Ketamin (KTM 1000), buffer formalin, *chloroform*, asam formic 10%, etanol 70%, 80%, 95%, 100%, gliserin, betadine, darah tikus, giemsa, larutan turk, *Ethyl Diamine Tetracetic Acid* (EDTA), methanol, minyak emersi, dan larutan *xylol*, kertas saring, makanan tikus (turbo).

## 3.8 Prosedur Penelitian

### 3.8.1 *Ethical Clearence*

Penelitian dilakukan setelah pengajuan *ethical clearence* kepada bagian etika dan advokasi Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta untuk mendapatkan perizinan pelaksanaan penelitian. Penelitian dilakukan berdasarkan surat No.00358/KKEP/FKG-UGM/EC/2020 (Lampiran 3.2).

### 3.8.2 Identifikasi Tanaman

Identifikasi tanaman dalam penelitian ini dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) melalui Balai Konservasi Tumbuhan (BKT) Kebun Raya Purwodadi-Pasuruan. Identifikasi dilakukan untuk memastikan bahwa tanaman yang digunakan adalah benar daun Singkong (Lampiran 3.3).

### 3.8.3 Pembuatan Ekstrak Daun Singkong

Daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) yang digunakan pada penelitian ini berasal dari daerah Kreongan, Kabupaten Jember. Daun Singkong dipetik mulai dari daun ke-5 dari pucuk sebanyak 450 gram. Daun Singkong dicuci bersih, lalu dipotong kecil-kecil dan dikeringkan dengan cara dianginkan pada suhu ruang dan tidak terkena cahaya matahari secara langsung. Daun Singkong dikeringkan di oven pada suhu 40°C selama 24 jam penuh. Berat daun Singkong kering setelah dilakukan pengovenan menjadi 238,54 gram. Daun Singkong kering selanjutnya dihaluskan dan diayak menggunakan ayakan 80 maze sehingga didapatkan serbuk halus dengan berat 207,25 gram. Serbuk halus daun Singkong dimaserasi dengan etanol 96% dengan rasio simplisia : pelarut sebesar 1 : 6 (250 gram : 1.5 liter) selama 3 hari dan dilakukan pengadukan setiap 24 jam. Larutan dipekatkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu 50°C dan putaran 90 rpm sehingga menjadi ekstrak daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) berbentuk semi solid dengan dosis 179,2 mg/kgBB sebanyak 20 gram.

### 3.8.4 Pembuatan Media Kultur dan Uji Identifikasi *Porphyromonas gingivalis*

*P. gingivalis* yang digunakan pada penelitian adalah *strain* ATCC 33277. Pembuatan media kultur *P. gingivalis* menggunakan BHI-A yang diperkaya hemin dan vitamin K. Pertama, BHI-A sebanyak 3,7 gram dan 10 cc aquadest dicampur dalam tabung erlemeyer kemudian diaduk hingga homogen. Setelah homogen, tabung ditutup menggunakan kapas dan disterilkan pada *autoclave* pada suhu 121 °C selama 15 menit. Selanjutnya ditambahkan 1µl vitamin K, 5 µl hemin dan 50µl ekstrak *yeast* lalu dihomogenkan. Dilakukan uji sterilisasi media BHI-A dengan memasukkan media ke dalam inkubator dengan suhu 37°C selama

24 jam. Selanjutnya, media di tuangkan pada petridish tidak bersekat dan ditunggu sampai padat. Satu ose *P. gingivalis* jenis ATCC 33277 murni diinokulasikan dalam petridish dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 2x24 jam (Pratiwi dkk., 2015). Setelah itu dilanjutkan identifikasi bakteri yang dilakukan dengan membuat sediaan hapusan bakteri dan dilakukan pewarnaan Gram. Identifikasi bakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember (Lampiran 3.5).

### 3.8.5 Pembuatan Suspensi *Porphyromonas gingivalis*

Sebelum pembuatan suspensi *P. gingivalis*, dilakukan pembuatan media cair sebanyak 10 ml, yaitu dari 0,37 gram BHI-B, 1 µl vitamin K, 5 µl hemin serta 50 µl ekstrak *yeast*. Kemudian pada media cair diberi satu ose *P. gingivalis* yang berasal dari pembiakan media agar BHI-A. Suspensi *P. gingivalis* yang didapat lalu dimasukkan desiccator dan diinkubasi selama 2x24 jam (Fitriyana dkk, 2013)

### 3.8.6 Persiapan Hewan Coba

Persiapan hewan coba dilakukan dengan mengadaptasikan hewan coba terhadap tempat dan makanan seminggu sebelum diberi perlakuan.

### 3.8.7 Pembuatan Model Tikus Disfungsi Ovarium (Ovariektomi)

Ovariektomi pada model tikus perlakuan 1 dimulai dari desinfeksi meja operasi dengan *spraying* alkohol 70% di seluruh meja operasi. Kemudian tikus dianestesi dengan *xylazine* dan ketamine 0,2 mL secara *intramuscular* di daerah femur dengan perbandingan 1:1. Tikus kemudian diletakkan di atas papan bedah setelah tikus lemas dan tertidur. Rambut di daerah lateral abdomen hingga punggung dan daerah ujung bawah *costae* 12 hingga bagian proksimal femur dicukur. Selanjutnya, dilakukan insisi longitudinal sepanjang 1-2 cm pada kulit di daerah punggung dengan jarak dari tulang vertebra yaitu 1,5-2 cm dan jarak dari tulang femur bagian proksimal sebesar 1,5-2 cm. Kedalaman insisi dilakukan hingga mencapai lapisan lemak di bawah kulit. Bagian lemak ditarik keluar dan ovarium (berbentuk granul) diangkat. Tuba falopi bagian distal dijepit

menggunakan klem arteri, lalu diikat dan dipotong. Bekas insisi dijahit menggunakan teknik *simple suture*. Luka pasca pembedahan diolesi dengan *povidon iodine* kemudian tikus diletakkan di kandang dan diberi makan, serta minum (Jimenez, 2014).

#### 3.8.8 Pembuatan Model Tikus Periodontitis

Injeksi bakteri *P. gingivalis* pada model tikus perlakuan 2 dilakukan dengan cara menginjeksikan *P. gingivalis* pada sulkus gingiva 0,05ml di bukal dan lingual molar bawah kiri, diberikan tiga hari sekali selama 19 hari menggunakan *tuberculine syringe* dengan ukuran jarum 30 *gauge* (Kusumawardani, 2012). Gambaran klinis terjadinya periodontitis berupa warna kemerahan, perubahan kontur, serta perdarahan pada gingiva. Tikus yang telah mengalami perubahan klinis selanjutnya dilakukan pengambilan secara acak untuk mewakili semua sampel dan dieuthanasia untuk diambil rahangnya. Rahang yang telah diambil kemudian difiksasi dalam larutan alkohol 70% dan dilakukan rontgen periapikal untuk melihat adanya resorpsi tulang alveolar pada interdental gigi tikus (Sari dkk., 2018).

#### 3.8.9 Aplikasi Ekstrak Daun Singkong

Setelah tikus mengalami periodontitis dan disfungsi ovarium yang diakibatkan oleh prosedur ovariectomi, maka diaplikasikan ekstrak daun Singkong dosis 179,2 mg/kgBB dalam bentuk larutan diberikan secara per oral sebanyak 2 ml setiap 2 kali sehari secara per oral.

#### **Penghitungan dosis**

Dosis ekstrak daun Singkong yang diberikan kepada tikus, dilakukan konversi dosis hewan coba dengan manusia. Konversi dosis hewan coba dan manusia menggunakan Tabel Konversi menurut Laurence dan Bachrach (1964) yang disajikan dalam Tabel 3.1 (Wiyandani, 2016).

Tabel 3.1 Tabel Konversi Dosis Hewan Coba dan Manusia menurut Laurence dan Bachrach (Wiyandani, 2016).

	Mencit 20 gr	Tikus 200 gr	Marmot 400 gr	Kelinci 1,5 kg	Kucing 2 kg	Kera 4 kg	Anjing 12 kg	Manusia 70 kg
Mencit 20 gr	1.0	7.0	12.25	27.8	29.7	64.1	124.2	387.9
Tikus 200 gr	0.14	1.0	1.74	3.9	4.2	9.2	17.8	56.0
Marmot 400 gr	0.08	0.57	1.0	2.25	2.4	5.2	10.2	31.5
Kelinci 1,5 kg	0.04	0.25	0.44	1.0	1.08	2.4	4.5	14.2
Kucing 2 kg	0.03	0.23	0.41	0.92	1.0	2.2	4.1	13.0
Kera 4 kg	0.016	0.11	0.19	0.42	0.45	1.0	1.9	6.1
Anjing 12 kg	0.008	0.06	0.1	0.22	0.24	0.52	1.0	3.1
Manusia 70 kg	0.0026	0.018	0.031	0.07	0.076	0.16	0.32	1.0

Penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Nisa dkk. (2013) didapatkan hasil bahwa ekstrak daun Singkong memiliki efek yang baik pada dosis 25,6 mg/kgBB mencit. Berdasarkan penelitian tersebut maka digunakan dosis yang sama dengan dikonversikan pada dosis tikus, sebagai berikut :

Dosis ekstrak daun sigkong pada mencit : 25,6 mg/kgBB

Dosis ekstrak daun Singkong pada tikus : 25,6 mg/kgBB x konstanta konversi  
mencit ke tikus

: 25,6 mg/kgBB x 7,0

: 179,2 mg/kgBB tikus (1000 gram)

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

$$\frac{179,2 \text{ mg}}{X} = \frac{1000 \text{ gram}}{200 \text{ gram}}$$

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

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

Dosis untuk per gram BB tikus adalah sebagai berikut:

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



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

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

Untuk volume pemberian ekstrak daun Singkong adalah sebagai berikut:

Volume pemberian	: 0,02 ml/gram BB tikus
------------------	-------------------------

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

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

Pelarut yang digunakan untuk melarutkan ekstrak adalah propilen glikol 10%, yaitu 10 mg propilen glikol dengan 1 ml aquades.

Jadi, pada setiap pembuatan ekstrak untuk 1 kali sondasi mengandung komposisi: 8,96 mg ekstrak daun Singkong –1 ml aquades –10 mg propilen glikol.

### 3.8.10 Pemberian Metronidazole

Setelah tikus mengalami periodontitis dan disfungsi ovarium yang diakibatkan oleh prosedur ovariektomi, sebagai kontrol positif maka diaplikasikan metronidazole. Dosis metronidazole pada manusia adalah 500 mg. Sehingga, dosis untuk tikus dengan berat  $\pm 200$  mg (menurut tabel 3.1 konversi dosis hewan coba manusia) :

$$\begin{aligned} \text{Dosis metronidazole pada tikus} &= \text{Konstanta konversi manusia ke tikus} \times \text{dosis} \\ &\quad \text{metronidazole pada manusia} \\ &= 0.018 \times 500 \text{ mg} \\ &= 9 \text{ mg}/200\text{gr BB} \end{aligned}$$

Dosis untuk tikus per gram BB

$$9 \text{ mg} = 200 \text{ gr}$$

$$1 \text{ gr} = \frac{9 \text{ mg}}{200 \text{ gr}}$$

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

Volume pemberian	: 0,02 ml/gram BB tikus
------------------	-------------------------

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

Untuk melarutkan metronidazole digunakan CMC 0,5%

CMC 0,5% berarti 0,5 gram dalam 100 ml air

500 mg = 100 ml

5 ml = 1 ml

Sehingga dalam melarutkan 2,25 mg metronidazole dibutuhkan 1 ml aquades dan 5 mg CMC 0,5%.

#### 3.8.11 Tahap Pengambilan Darah Tepi

Pengambilan darah dilakukan sebelum tikus diberi perlakuan, pada hari ke-28, hari ke-31 dan pada hari ke-35. Sebelum dilakukan pengambilan darah tepi, model tikus harus dipuasakan selama 8 jam terlebih dahulu. Pengambilan sampel darah dilakukan pada plexus infraorbital sekitar 1,5-2 cc (Dharmayanti dkk, 2017). Darah yang terambil dimasukkan perlahan ke dalam botol dan ditambahkan antikoagulan EDTA dan darah segera dikocok perlahan dengan gerakan melingkar di atas meja supaya tercampur rata (Nuarita dkk, 2012)

#### 3.8.12 Pengisian Pipet Leukosit

Darah yang telah tercampur rata dengan antikoagulan selanjutnya dihisap ke dalam pipet sampai tepat pada garis tanda 0,5. Kelebihan darah yang melekat pada ujung pipet dihapus. Ujung pipet dimasukkan dalam larutan turk sambil menahan darah pada garis tanda tadi. Pipet dipegang dengan sudut 45° dan larutan turk dihisap perlahan-lahan sampai garis tanda 11. Pipet diangkat dari cairan, ujung pipet ditutup dengan ujung jari dan karet penghisap dilepas. Pipet kemudian dikocok selama 15-30 detik (Nuarita dkk, 2012).

#### 3.8.13 Pengisian Kamar Hitung

Meletakkan kamar hitung yang bersih diletakkan dengan kaca penutupnya yang terpasang mendatar di atas meja. Pipet yang sudah terisi dikocok terus menerus selama 3 menit. Semua cairan yang ada di dalam batang kapiler pipet dibuang (3 atau 4 tetes) . Setela itu, segera ujung pipet disentuhkan dengan sudut

30° pada permukaan kamar hitung dengan menyinggung pinggir kaca penutup. Kamar hitung dibiarkan terisi cairan perlahan-lahan dengan daya kapilaritasnya sendiri dan dibiarkan selama 2 atau 3 menit supaya leukosit-leukosit dapat mengendap (Nuarita dkk, 2012).

#### 3.8.14 Penghitungan Jumlah Total Leukosit

Kamar hitung dengan bidang bergarisnya diletakkan di bawah lensa obyektif dengan perbesaran 10x dengan posisi meja mikroskop datar dan diafragma dikecilkan. Fokus mikroskop diarahkan pada garis-garis bagi agar leukosit-leukosit jelas terlihat. Dihitung semua leukosit yang terdapat dalam keempat bidang besar pada sudut-sudut seluruh permukaan yang dibagi. Menghitung dimulai dari sudut kiri atas, terus ke kanan, kemudian turun ke bawah dan dari kanan ke kiri, lalu turun lagi ke bawah dan dimulai lagi dari kiri ke kanan. Cara seperti ini dilakukan pada keempat bidang besar (Bakhri, 2018).

Jumlah semua leukosit yang dihitung dalam keempat bidang itu dibagi 4 yang menunjukkan jumlah leukosit dalam 0,1 µl darah. Angka tersebut dikalikan dengan 10 (untuk tinggi) dan 20 (untuk pengenceran) agar didapat jumlah leukosit dalam 1 µl darah. Secara singkat, jumlah leukosit yang dihitung dikalikan 50 = jumlah leukosit per µl darah (Nuarita dkk, 2012). Penghitungan jumlah total leukosit dilakukan oleh 3 pengamat. Jumlah dari 3 pengamat dijumlah lalu dirata-rata untuk mendapatkan perhitungan jumlah leukosit.

#### 3.8.15 Pembuatan Sediaan Hapusan Darah

Setetes darah yang telah diambil diletakkan 1 cm dari satu ujung dari *object glass*. Gelas penghapus dipegang hingga membuat sudut  $\pm 30^\circ$  dengan *object glass* dan tetesan darah tadi terletak di dalam sudut tersebut. Gelas penghapus ini digeserkan ke arah tetesan darah, sehingga menyentuh tetesan darah dan dibiarkan merata antara ujung gelas penghapus dan *object glass*. Secara cepat gelas penghapus digeserkan ke arah yang bertentangan dengan arah pertama, dengan demikian darah tadi akan merata di atas *object glass* sebagai lapisan yang

tipis. Hapusan ini kemudian segera dikeringkan dengan menggerak-gerakkannya di udara atau dapat dipakai kipas angin (Nuarita dkk, 2012).

#### 3.8.16 Prosedur Pengecatan Hapusan Darah

Pengecatan hapusan darah pada penelitian ini menggunakan Giemsa. Hapusan darah yang telah dibuat difiksasi menggunakan methanol dengan cara meneteskan methanol ke atas preparat dan dibiarkan selama 5 menit. Sisa methanol dibuang. Hapusan darah kemudian diteteskan larutan giemsa sampai semua apusan tergenang dan dibiarkan selama 15 menit. Preparat yang telah selesai digenangi giemsa selama 15 menit kemudian dibilas dengan air dan dikeringkan di udara (Priyana, 2010).

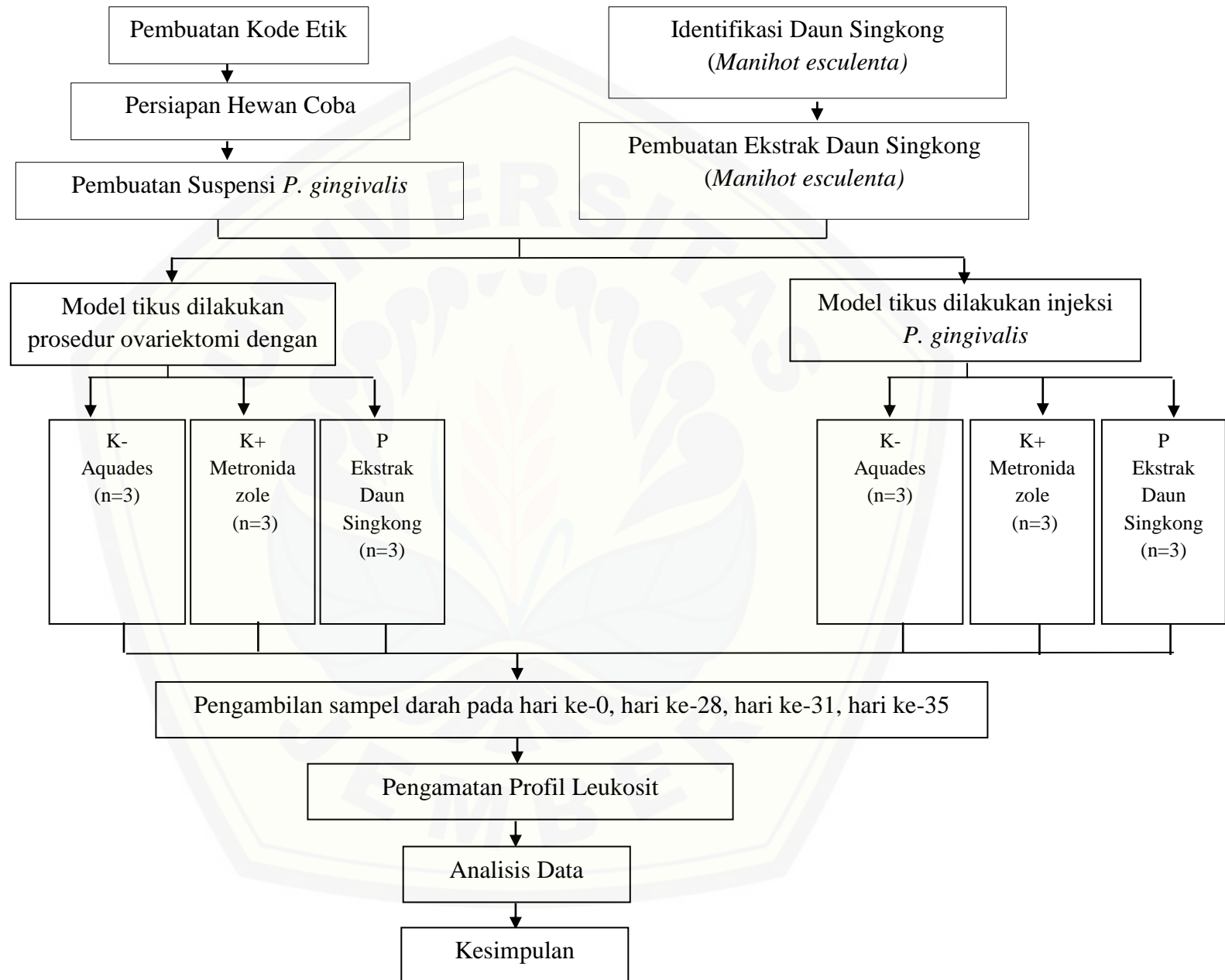
#### 3.8.17 Penghitungan Jenis Leukosit

Perhitungan jenis leukosit diawali dengan memilih sediaan yang cukup tipis dengan persebaran leukosit yang merata. Penghitungan dimulai pada pinggir atas sediaan dan pindah ke pinggir bawah dengan menggunakan micromanipulator mikroskop. Pada pinggir bawah lapangan digeser ke kanan agak lebih banyak dari lebarnya lapangan imersi, kemudian ke arah pinggir atas lagi. Sesampai di pinggir atas digeser ke kanan lagi dan kemudian ke arah pinggir bawah. Dilakukan terus-menerus sampai 100 sel leukosit dihitung menurut jenisnya (Nuarita dkk, 2012). Penghitungan ini dilakukan oleh tiga orang pengamat. Kemudian hasil pengamatan oleh tiga orang pengamat tersebut dijumlahkan dan dirata-rata.

### 3.9 Analisis Data

Penelitian ini menggunakan *software SPSS 26 for windows*. Penelitian ini menggunakan uji metode *Two-way repeated measure ANOVA* karena pada penelitian ini dilakukan pengambilan data yang dilakukan secara berulang dan mempunyai 2 variabel independen. Data yang diperoleh dari hasil pengamatan terlebih dahulu dilakukan uji normalitas dengan menggunakan tes *Shapiro Wilk*. Uji homogenitas menggunakan tes *Levene*. Pada data jumlah leukosit, neutrofil, limfosit dan monosit model tikus disfungsi ovarium serta jumlah leukosit dan neutrofil model tikus periodontitis diuji menggunakan *Two-way repeated measure ANOVA* ( $p < 0.05$ ), dan dilanjutkan uji *Least Significant Difference* ( $p < 0.05$ ) untuk mengetahui kelompok manakah yang memiliki perbedaan bermakna. Pada data basofil dan eosinofil model tikus disfungsi ovarium serta basofil, eosinofil, limfosit dan monosit model tikus periodontitis diuji statistik non parametrik menggunakan *Friedmann test* ( $p < 0.05$ ).

3. 10 Alur Penelitian



## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa terjadi penurunan profil leukosit perifer model tikus disfungsi ovarium dan periodontitis yang diberi ekstrak daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz).

### 5.2 Saran

1. Perlu adanya penelitian lebih lanjut dengan dosis lain pada ekstrak daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz).
2. Perlu adanya penelitian lebih lanjut menggunakan ekstrak flavonoid, saponin dan tannin pada daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz).

## DAFTAR PUSTAKA

- Agrawal V., M.K. Jaiswal, dan Y.K. Jaiswal. 2011. Lipopolysaccharide induces alterations in ovaries and serum level of progesterone and  $17\beta$ -estradiol in the mouse. *Elsevier Ltd* . 95(4): 1471–1474.
- Anwar, N. I. 2015. Pengaruh Status Istirahat terhadap Profil Darah Sapi Bali Sebelum Pemotongan di RPH Antang Makassar. *Skripsi*. Makassar: Progam Studi Kedokteran Hewan Universitas Hasanuddin.
- Arfan,P. F. P. dan Wijayahadi, N. 2016. Pengaruh Pemberian Ekstrak Produk X Sebagai Antiinflamasi pada Tikus Jantan Galur Wistar. *Skripsi*. Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Arina, Y. M. D. 2008. Immunoekspresi Reseptor Estrogen  $\alpha$  pada Poket Periodontal Lebih Banyak daripada Reseptor Estrogen  $\beta$ . *Indonesian Journal of Dentistry 2008*. 15(1 ): 50-56.
- Ariyanti, H. dan E. Apriliana. 2016. Pengaruh Fitoestrogen terhadap Gejala Menopause. *Majority*. 5(5): 1- 5.
- Baeza, I., N. M. D. Castro, L. Arranz, J. Fdez-Tresguerres, M. D. Fuente. 2011. Ovariectomy causes immunosenescence and oxi-inflamm-ageing in peritoneal leukocytes of aged female mice similar to that in aged males. *Biogerontology*. 12(3):227-238
- Bakhri, S. 2018. Analisis Jumlah Leukosit dan Jenis Leukosit pada Individu yang Tidur dengan Lampu Menyala dan yang Dipadamkan. *Jurnal Media Analis Kesehatan*. 1(1): 83-91.
- Bidne, K. L., M. J. Dickson, J. W. Ross, L. H. Baumgard, dan A. F. Keating. 2018. Disruption of female reproductive function by endotoxins. *Reproduction*. 155(4): 169-181.
- Calabria, L. M. 2008. The isolation and characterization of triterpene saponins from silphium and the shemosystematic and biological significance of saponins in the asteraceae. *Disertasi*. The University of Texas at Austin.



- Chen, Y., Y. Zhang, G. Zhao, C. Chen, P. Yang, S. Ye, dan X. Tan. 2016. Difference in Leukocyte Composition between Women before and after Menopausal Age, Distinc Sexual Dimorphism. *PLoS ONE*. 11(9): 1-10.
- Corwin, E. J. 2009. *Handbook of Pathophysiology* 3rd Ed, Diterjemahkan oleh: Nike Budhi Subekti. Jakarta : EGC.
- D'Hiru. 2013. *Live Blood Analysis Setetes Darah Anda Dapat Mengungkapkan Status Kesehatan dan Penyakit yang Mengancam Anda*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.
- Dharmayanti, A. W. S., T. Ermawati., B. Febrianto. Ovarian Failure Affected Leukocytes Profile in Peripheral Blood and Gingival Fluid (In vivo study). *Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Conference in Health Sciences November 4-5 2017*. Universitas Jenderal Soedirman: 128-136.
- Dzikro, A. 2012. Pengaruh Pemberian Kurma Tahnik terhadap Jumlah Total Leukosit, Persentase Jumlah Monosit dan Limfosit Darah serta Titer Antibodi Mencit. *Skripsi*. Jakarta : Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Jakarta.
- Eley B. M. dan J. D., Manson. 2004. *Periodontics*. 5<sup>th</sup> edition. Edinburgh: Wright.
- Elvina, L. 2018. Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Etanol Kulit Mangga (*Magnifera Indica L.*) Indramayu pada Mencit Jantan Galur Swiss Terinduksi Karagenin 1%. *Skripsi*. Yogyakarta : Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma.
- Erawati, J., I. Sukardi, dan D. Nurul. 2006. Pertimbangan Periodontal pada Wanita Usia Menopause. *Maj. Ked. Gi*. 13(2)222-225.
- Firani, N. K. 2018. *Mengenal Sel-Sel Darah dan Kelainan Darah*. Malang : Tim UB Press.

- Fitriyana, N., Y. M. D. Arina, H. Harmono, dan I. Susilawati. 2013. Pemaparan Bakteri *Porphyomonas gingivalis* Mempengaruhi Produksi Superoksid Neutrofil. *Dentofasial*. 12(3):152-157.
- Fitriyani, A., L. Winarti, S. Muslichah, dan Nuri. 2011. Uji Antiinflamasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum Ruiz & Pav*) pada tikus putih. *Majalah Obat Tradisional*. 16(1) : 34-42.
- Fuadiyah, D., R. Ratnawati, dan B. A. Soebijakto. 2017. Pengaruh Lama Paparan LPS (Lipopolisakarida) *Porphyromonas gingivalis* sebagai Induktor Periodontitis terhadap Kadar LDL dan HDL Tikus Wistar. *E-prodenta Journal of Dentistry*. 1(2): 54-67.
- Gandasoebrata, R. 2007. *Penuntun Laboratorium Klinik*. Jakarta : Penerbit Dian Rakyat.
- Goodman, N. F., R.H. Cobin, S. B. Ginzburg, I. A. Katz, dan D. E. Woode. 2011. American Association of Clinical Endocrinologists Medical Guidelines for Clinical Practice for The Diagnosis and Treatment of Menopause. *Endocrine Practice*. 17(6): 1-25.
- Hagerman, A. E. 2002. *The Tannin Handbook*. Department of Chemistry and Biochemistry Miami University.
- Handajani, F. dan S. Prabowo. 2019. Peran Ekstrak *Sargassum duplicatum* terhadap Penurunan Edema Sendi Pergelangan Kaki Tikus dengan Arthritis Ajuvan yang Terpajan Stresor Dingin. *eJKI*. 7(2): 137-142.
- Hanifah, F., S. E. S. Kawengian., dan E. Tambunan. 2018. Hubungan antara Status Gizi dengan Gingivitis pada Mahasiswa Program Studi Pendidikan Dokter Gigi Universitas Sam Ratulangi. *Jurnal e-GiGi (eG)*. 6(1): 27-33.
- Hasim, S. Falah, dan L. K. Dewi. 2016. Pengaruh Perebusan Daun Singkong (*Manihot esculenta crantz*) terhadap Kadar Total Fenol, Flavonoid dan Aktivitas Antioksidannya. *Current Biochemistry*. 3(3): 116-127.

Hawley T. S., dan R. G. Hawley. 2004. *Flow cytometry protocols*. New Jersey: Humana Press Inc.

Hidayati N.A., S Listyawati, dan A. D. Setyawan. 2008. Kandungan kimia dan uji antiinflamasi ekstrak etanol *Lantana camara* L. pada tikus putih (*Rattus norvegicus* L.) jantan. *J Bioteknologi*. 5(1): 10-17.

Indriani, M. 2017. Pengaruh Konsentrasi pH Buffer Giemsa terhadap Morfologi Leukosit pasa Preparat Sumsum Tulang. Skripsi. Semarang: Fakultas Keperawatan Universitas Muhamadiyah Semarang.

ITIS.2019.*Manihot esculenta* Crantz.[https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=503688#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=503688#null) [29 April 2019].

Jayanegara, A., H. P. S. Makkar, dan K. Becker. 2009. Emisi metana dan fermentasi rumen in vitro ransum hay yang mengandung tanin murni pada konsentrasi rendah. *Media Peternakan*. 32 (3): 184-194.

Jimenez, A. 2014. *Rodent Ovariectomy Standard Operating Procedure*. United Kingdom: McGill.

Kanj, R. V., N. A. Ofei-Tengkorang, M. Altaye, C. M. Gordon. 2017. Evaluation and Management of Primary Ovarian Insufficiency in Adolescents and Young Adults. *Journal Pediatric and Adolescent Gynecology*. 31(1): 13-18.

Khotimah, S. N. dan A. Muhtadi. Review Artikel: Beberapa Tumbuhan yang Mengandung Senyawa Aktif Antiinflamasi. *Farmaka Suplemen*. 14(2): 28-40.

Kiswari, R. 2014. *Hematologi dan Transfusi*. Jakarta: Erlangga

Koh, H. L., C. T. Kian, dan T. C. Hoon. 2009. *A Guide to Medicinal Plants: An Illustrated, Scientific and Medicinal Approach*. Singapore: World Scientific Publishing.

- Kovanen, V., P. Aukee, K. Kokko, T. Finni, I. M. Tarkka, T. Tammelin, U. M. Kujala, S. Sipila, dan Laakkonen. 2018. Design and protocol of Estrogenic Regulation of Muscle Apoptosis (ERMA) study with 47 to 55-year-old women's cohort: novel results show menopause-related differences in blood count. *Menopause*. 25(9) : 1-13.
- Krehmeier, U., M. Bardenheuer, G. Voggenreiter, U. Obertacke, F. U. Schade, dan M. Majetschak. 2002. Effects of antimicrobial agents on spontaneous and endotoxin-induced cytokine release of human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Infect Chemother*. 8(2): 194-197.
- Krismariono, A. 2009. Pengaruh antiinflamasi ibuprofen pada perawatan enlargement gingivitis. *Periodontic Journal*. 1(1): 6-9.
- Kumar V. R., Cotran, Robbins dan Stanley. 2007. *Buku Ajar Patologi Robbins 7<sup>th</sup>* ed. Terjemahan oleh Pendit Brahm U. Jakarta: EGC.
- Kusumawardani, B. 2012. Dampak Infeksi *Porphyromonas gingivalis* pada Jaringan Periodontal Maternal terhadap Pertumbuhan Janin : Analisis Pengaruh Ekspresi TLR-2, TLR-4, TNF, IL-10 dan capcase-3 pada Plasenta Tikus terhadap Penurunan Berat Plasenta, Berat Janin dan Panjang Janin. *Disertasi*. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Lee, Y. H., S. M. Kim, dan E. Ahn. 2018. Relationship between Early Menopause and Periodontal Disease in Korean Postmenopausal Women. *J Dent Hyg Sci*. 18(5): 312-318.
- Lofmark, S., Edlund C., dan Nord C.E. 2010. Metronidazole Is Still the Drug of Choice for Treatment of Anaerobic Infections. *Clinical Infectious Diseases* 50(1):16-23.
- Meilawaty, Z. 2013. Efektifitas Ekstrak Daun Singkong (*Manihot utilisima*) terhadap ekspresi COX-2 pada Monosit yang Dipapar LPS *E.coli*. *Dent J (Maj. Ke. Gigi)*.46(4): 196-201.
- Meilawaty, Z. dan B. Kusumawardani. 2016. Effect Of Cassave Leaf Flavonoid Extract on TNF- $\alpha$  Expressions in Rat Models Suffering from Periodontitis. *Dent J (Maj. Ke. Gigi)*. 49(3): 137-142.

- Molloy, E. J., A. J. O'neill, J. J. Grantham, M. Sheridan-Pereira, J.M. Fitzpatrick, dan D.W. Webb. 2003. Sex-specific alterations in neutrophils apoptosis: the role of estradiol and progesterone. *Blood*. 102(7): 2563-2569.
- Mysak, J., S. Podzimek, J. Vasakova, J. Mazanek, A. Vinsu, dan J. Duskova. 2017. C-reactive protein in patients with aggressive periodontitis. *J Dent Sci*. 12(4): 368–374.
- Nasution, A. M., M. T. Kamaluddin, dan Theodorus. 2017. Efek Antiinflamasi Ekstrak Air Daun Mali-Mali (*Leea indica*) terhadap Jumlah Leukosit pada Tikus Putih Jantan Galur Wistar. *Majalah Kedokteran Sriwijaya, Th. 49* no 3: 110-117
- Newman, M. G., H. H. Takei, P.R. Klokkevold dan F.A. Carranza. 2015. *Carranza's Clinical Periodontology* 1th Ed. Canada: Elsevier.
- Nicu, E. A., U. V. D. Velden, R. Niewuland, V. Everts, dan B. G. Loos. 2008. Elevated Platelet and Leukocyte Response to Oral Bacteria in Periodontitis, *Journal of Thrombosis and Hemostasis*. 7:162-170.
- Nisa, V. M., Z. Meilawaty, dan P. Astuti. 2013. Efek Pemberian Ekstrak Daun Singkong (*manihot esculenta*) terhadap Proses Penyembuhan Luka Gingival Tikus (*Rattus norvegicus*). *Artikel Ilmiah Hasil Penelitian Mahasiswa 2013*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Nijveldt, R. J., E. V. Nood, D. E. V. Hoorn, P. G. Boelens, K. V. Norren, dan P. A. V. Leeuwen. 2001. Flavonoids : a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*. 74(4): 418-425.
- Nuarita, R., D. Praharani, dan B. Kusumawardani. 2012. Pengaruh Penyakit Periodontal Selama Masa Kehamilan terhadap Jumlah Total Leukosit dan Hitung Jenis Leukosit. *Stomatognatic (J. K. G Unej)*. 9(3): 125 – 130.
- Nurdiana, A. R. 2013. Potensi ekstrak daun Singkong (*Manihot Esculanta*) terhadap jumlah neutrofil pada proses penyembuhan luka tikus wistar

(*Rattus norvegicus*). *Skripsi*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Parker, W. H., V. Jacoby, D. Shoupe, dan W. Rocca. 2009. Effect of Bilateral Oophorectomy on Women's Long-term Health. *Women's Health*. 5(5): 565–576.

Pfeilschifter, J., R. Köditz, M. Pfohl, dan H. Schatz. 2002. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocr Rev*. 23(1):90–119

Pilsakova, L., I. Riecanaky, dan F. Jagla. 2010. The Physiological Actions of Isoflavone Phytoestrogens. *Physiological Research*. 59(5) :651-664.

Prasetya, R. C., N. Purwanti, dan T. Haniastuti. 2014. Infiltrasi Neutrofil pada Tikus dengan Periodontitis setelah Pemberian Ekstrak Etanolik Kulit Manggis. *Maj Ked Gi*. 21(1) : 33-38.

Pratiwi, L. 2012. Adhesi *Porphyromonas gingivalis* pada Neutrofil yang Diinkubasi Ekstrak Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*). *Skripsi*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Pratiwi, E. W., D. Praharani., D. M. Y. Arina. 2015. Daya Hambat Ekstrak Daun Pepaya (*Carica papaya L*) terhadap Adhesi Bakteri *Porphyromonas gingivalis* pada Neutrofil. *E-Journal Pustaka Kesehatan*. 3(2): 193-198.

Priyana, A. 2010. *Patologi Klinik untuk Kurikulum Pendidikan Dokter Berbasis Kompetensi*. Jakarta: Universitas Trisakti.

Purwono dan H. Purnamawati. 2007. *Budidaya 8 Jenis Tanaman*. Jakarta :Penebar Swadaya.

Puspaningrum, E. F., R. Hendari, dan R. Mujayanto. 2015. Ekstrak Cymbopogon Citratus Dan Eugenia Aromaticum Efektif Untuk Penyembuhan Gingivitis. *ODONTO Dental Journal*. 2(2): 47-51.

- Ramamurthy, J. 2015. Role of Estrogen and Progesteron in Periodontium. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 6(4): 1540-1547.
- Rathee, P., H. Chaudhary, S. Rathee, D. Rathee, V. Kumar, dan K. Kohli. 2009. Mechanism of Action of Flavonoids as Anti-inflammatory Agents: A Review. *Inflammation & Allergy - Drug Targets*. 8(3) : 229-235.
- Redha, A. 2010. Flavonoid: Struktur, Sifat Antioksidatif Dan Peranannya Dalam Sistem Biologis. *Jurnal Belian*. 9(2): 196 – 202.
- Ridwan, E. 2013. Etika Pemanfaatan Hewan Percobaan dalam Penelitian Kesehatan. *J Indon Med Assoc*. 63(3): 112-116.
- Rikomah, S. E., Elmitra dan D. G. Yunita. 2017. Efek Ekstrak Etanol Daun Singkong (Manihot Utilissima Pohl) sebagai Obat Alternatif Anti Rematik terhadap Rasa Sakit pada Mencit. *Jurnal Ilmiah Manuntung*. 3(2): 133-138.
- Rudnicka, E., J. Kruzewska, K. Klicka, J. Kowalczyk, M. Grymowicz, J. Skorska, W. Pieta, dan R. Smolarczyk. 2018. Premature Ovarian Insufficiency-aetiopathology, epidemiology and diagnostic evaluation. *Menopause Rev* 2018. 17(3) : 105-108.
- Rukmana, R. 2002. *Ubi Kayu, Budi Daya dan Pascapanen* Cetakan 6. Yogyakarta: Kanisius.
- Rusyanti, Y. 2014. Analisis Kadar Interleukin-8 pada Periodontitis Agresif. *IJAS*. 4(3) : 154-161.
- Salmiwanti. 2016. Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder Fraksi N-Heksana Daun Pegagan (*Centella Asiatica L. Urban*) Dan Uji Antibakteri Terhadap *Mycobacterium Tuberculosis*. *Skripsi*. Makassar : Fakultas Sains Dan Teknologi UIN Alauddin Makassar.
- Samaranayake, L. P. 2002. *Essential Microbiology for Dentistry*. Toronto: Churcill Livingstone Elsevier.

- Sari, D. S., C. Lestari, dan S. Yandi. 2018. Pengaruh Pemberian Asam Usnat terhadap Jumlah Sel Osteoblas pada Tikus Periodontitis. *Jurnal B-Dent*. 5(2): 124-134.
- Santi, T. D. 2015. Uji Toksisitas Akut dan Efek Antiinflamasi Ekstrak Metanol dan Ekstrak *n*-Heksana Daun Pepaya (*Carica papaya* L). *Pharm Sci Res*. 2(2): 101-114.
- Santosa, B. 2010. Differential Counting Berdasarkan Zona Baca Atas dan Bawah pada Preparat Darah Apus. *Porsiding Seminar Nasional Unimus*: 55-59.
- Santoso, S., B. Rachmawati, dan D. Retnoningrum. 2018. Perbedaan Jumlah Leukosit, Neutrofil dan Limfosit Absolut pada Penderita DM tipe 2 Terkontrol dan Tidak Terkontrol. *Jurnal Kedokteran Diponegoro*. 7(2):854-862.
- Seiler J. S. dan Herold R.W. 2005. The Use of Systemic Antibiotics in the Treatment of Aggressive Periodontal Disease. *Journal of General Dentistry* 53(2):155-159.
- Shakir, L., A. Javeed, M. Ashraf, dan A. Riaz. 2010. Metronidazole and the Immune System. *Pharmazine*. 66(6): 393-398.
- Singh, A. S. dan M. B. Masuku. 2014. Sampling Techniques & Determination of Sample Size in Applied Statistics Research: an Overview. *IJEEM*. 2(11): 1-22.
- Sherwood, L. 2014. *Fisiologi Manusia: dari Sel ke Sistem* Ed. 8. Jakarta : EGC.
- Sendy, V. A. A., P. Pujiastuti, dan T. Ermawati. 2014. Daya Antibakteri Ekstrak Daun Sirih Merah (*Pipper crocatum*) Terhadap *Porphyromonas gingivalis*. *Artikel Ilmiah Hasil Penelitian Mahasiswa 2014*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Soejono, S., H. S. Susanto, A. Udiyono, dan M. S. Adi. 2016. Gambaran Penyakit Periodontal pada Wanita Menopause di Puskesmas Srandol, Kota Semarang. *Jurnal Kesehatan Masyarakat (e-Journal)*. 4(4): 465-469.



Sofro, A. S. M. 2012. *Darah*. Yogyakarta : Pustaka Pelajar.

Sriyono, R. A. N. dan I. Andriani. 2013. Daya Antibakteri Ekstrak Etanol Kulit Manggis (*Garcinia Mangostana* Linn.) Terhadap Bakteri *Porphyromonas gingivalis*. *IDJ*. 2(2): 76 -82.

Straub, R. H. 2007. The Complex Role of Estrogens in Inflammation. *Endocrine Reviews*. 28(5): 521–574.

Sudewo, B. 2010. *Basmi Penyakit dengan Sirih Merah*. Jakarta: Agromedia Pustaka.

Sugiyono. 2009. *Metode Penelitian Kuantitatif, Kualitatif dan R&D*. Bandung: Alfabeta.

Sun, D. 2013. Simultaneous Determination Of Four Flavonoids and One Phenolic Acid in Rat Plasma by LC-MS/MS and its Application to A Pharmacokinetic Study After Oral Administration of the Herba *Desmodii styracifolii* Extract. *Journal of Chromatography*. 932: 66-73.

Syarif, R. A., S. K. Soejono, E. Meiyanto, dan M. S. H. Wahyuningsih. 2016. Efek Kurkumin terhadap Sekresi Estrogen dan Ekspresi Reseptor Estrogen  $\beta$  Kultur Sel Granulosa Babi Folikel Sedang. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 29(1): 32-38.

Tedjasulaksana, R. 2016. Metronidasol sebagai Salah Satu Obat Pilihan untuk Periodontitis Marginalis. *Dental Health Journal* 4(1):19-23.

Tersono, L. A. 2006. *Tanaman Obat dan Jus Untuk Asam Urat dan Rematik*. Jakarta : AgroMedia Pustaka.

Tim Matrix. 2009. *Seri Panduan Belajar dan Evaluasi Biologi*. Jakarta: Grasindo.

- Tjendradjaja, T. M. 2011. Leukosit Sebagai Salah Satu Parameter Kesehatan Rusa Timor (*Cervus timorensis*) di Usaha Penangkaran Rusa Timor Kecamatan Dawe Kabupaten Kudus. *Skripsi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Torrealdy, S., P. Kodaman, dan L. Pal. 2017. Premature Ovarian Insufficiency - an update on recent advances in understanding and management. *F1000 Research* 2017. 6: 1-15.
- Torruangruang, K., S. Jitpakdeebordin, O. Charatkulangkun, dan Y. Gleebua. 2015. Porphyromonas gingivalis, Aggregatibacter actinomycetemcomitans, and Treponema denticola / Prevotella intermedia Co-Infection Are Associated with Severe Periodontitis in a Thai Population. *PLoS ONE*. 10(8):1-13.
- Ulfah, M. 2017. Hubungan Usia dan Lama Menopause dengan Tingkat Kecemasan Wanita Menopause. *Journal of Issues in Midwifery*. 1(1): 1-18.
- Wati, S. M., Istiati, dan P. Soesilawati. 2014. Characterization of lactoferrin in gingival crevicular fluid of chronic periodontitis patient. *Dent. J. (Maj. Ked. Gigi)*. 47(3) : 141–145.
- Warditiani, N. K., L. P. Larasanty, dan I. Damanik. 2015. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol 70% Daun Singkong (*Manihot utilissima Pohl*) terhadap Kadar Gula Darah Mencit Jantan Galur Balb/C yang Diinduksi Aloksan. *Jurnal Farmasi Udayana*. 4(1) :61-64.
- Wiyandani, A. M. 2016. Pengaruh Ekstrak Daun Asam Jawa (*Tamarindus indica L.*) terhadap Kadar Gula Darah Mencit (*Mus musculus L.*) Jantan Diabetes Mellitus dan Pemanfaatannya sebagai Buku Ilmiah Populer. *Skripsi*. Jember: Program Studi Pendidikan Biologi Universitas Jember.
- Wratsangka, R. 2011. Soy isoflavone supplementation tends to improve specific immune responses in postmenopausal women. *Univ Med* . 30(3):162-72.
- Yendriwati. 2006. Kebutuhan vitamin C dan pengaruhnya terhadap kesehatan tubuh dan rongga mulut. *Dentika Dental Journal*. 2(1): 78-83.

- Yoo, D. K., dan S. H. Lee. 2016. Effect of Lipopolysaccharide (LPS) Exposure on the Reproductive Organs of Immature Female Rats. *Dev. Reprod.* 20(2): 113-121.
- Yuniarti, W. M., I. S. Yudaniayanti, dan N. Triakoso. 2009. Gambaran histopatologik ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*) pasca ovariohisterektomi dengan suplemen kalsium karbonat dosis tinggi. *J. Peneliti Med. Eksakta.* 8(1): 31-38.
- Zahra, Amira Puri dan N. Carolia. 2017. Obat Anti-inflamasi Non-steroid (OAINS): Gastroprotektif vs Kardiotoxik. *Majority.* 6(3) : 153-158.
- Zhou, X. dan Y. Li. 2015. *Atlas of Oral Microbiology: From Healthy Microflora to Disease.* USA : Elsevier.

LAMPIRAN

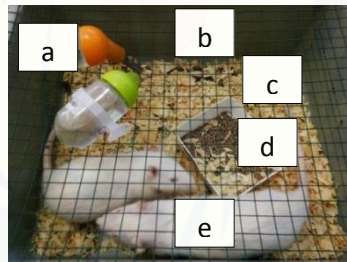
LAMPIRAN 3.1. Alat dan bahan penelitian

1. Pembuatan ekstrak daun Singkong



Keterangan: a) Daun Singkong (*Manihot Esculenta crantz*); b) Etanol 96%; c) Rotary evaporator.

2. Adaptasi hewan coba



Keterangan: a) Tempat minum; b) Kandang; c) Sekam; d) Tempat makan; e) Tikus.

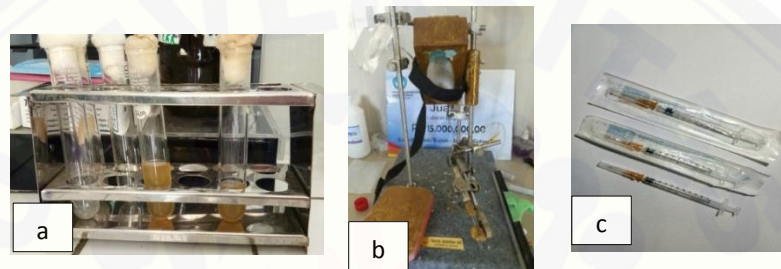
3. Pembuatan model tikus disfungsi ovarium dengan cara ovariektomi





Keterangan: a) Masker; b) *Handsocon*; c) Silet; d) *Handle Blade*; e) *Surgical Blade*; f) Benang dan Jarum Jahit; g) Alkohol 70%; h) Betadine; i) Antibiotik.

#### 4. Induksi *Porphyromonas gingivalis*



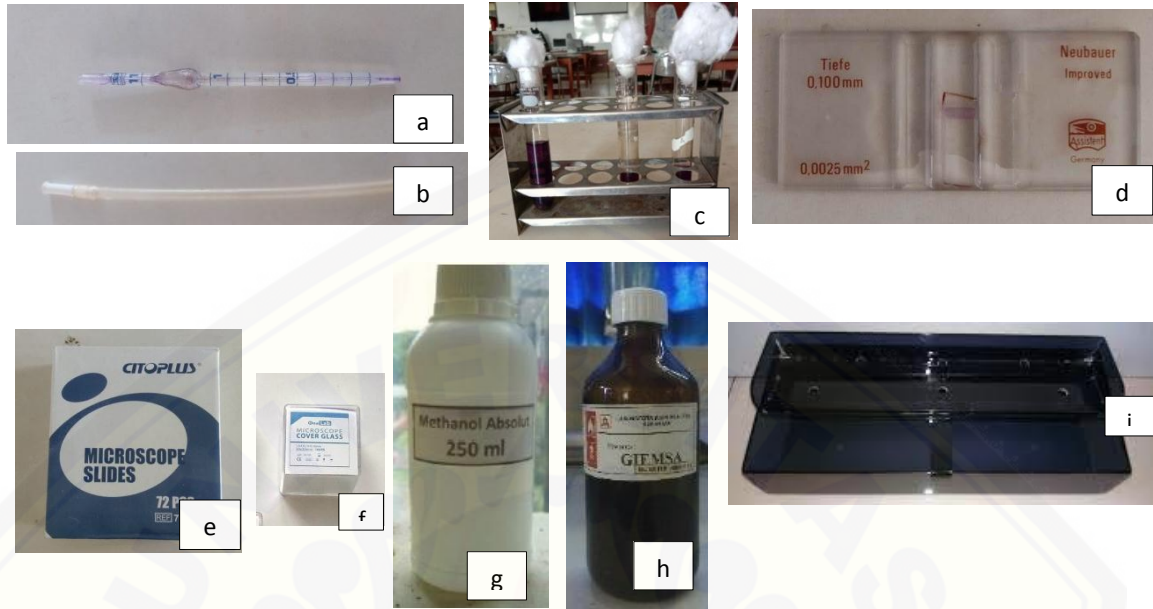
Keterangan: a) Suspensi bakteri *Porphyromonas gingivalis* ; b) *Rat dental chair*; c) Syringe.

#### 5. Pengambilan darah



Keterangan: a) Botol darah ; b) Antikoagulan EDTA; c) Pipet Hematokrit

## 6. Pembuatan preparat hitung jumlah dan jenis leukosit






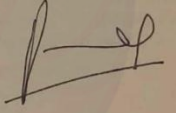
Keterangan: a) Pipet leukosit; b) Selang pengisap; c) Larutan turk; d) Kamar hitung e) Object glass; f) Cover glass; g) Metanol; h) Giemsa; i) Rak pewarnaan

## 7. Pengamatan



Mikroskop binokuler

LAMPIRAN 3.2. *Ethical Clearance*

 <p><b>KOMISI ETIK PENELITIAN</b>  <b>FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS GADJAH MADA</b>          Sekretariat: Fakultas Kedokteran Gigi UGM Jl. Denta Sekip Utara Yogyakarta          Telp. 081239447900</p>	
<p><b>KETERANGAN KELAIKAN ETIK PENELITIAN</b>  <b>("ETHICAL CLEARANCE")</b>          No.00358/KKEP/FGK-UGM/EC/2020</p>	
<p>Setelah Tim Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada mempelajari dengan seksama rancangan penelitian yang diusulkan:</p>	
Judul	: POTENSI EKSTRAK DAUN SINGKONG ( <i>Manihot esculenta</i> ) TERHADAP PROFIL LEUKOSIT PERIFER MODEL TIKUS DISFUNGSI OVARIUM DAN PERIODONTITIS
Peneliti Utama	: Lutfi Meiga Sari
Penanggung Jawab Medis	: drg. Zahara Meilawaty, M.Kes
Unit/Lembaga	: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
Lokasi Penelitian	: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
Waktu Penelitian	: Januari 2020 – Selesai
<p>Maka dengan ini menyatakan bahwa penelitian tersebut telah memenuhi syarat atau laik etik.</p>	
	Yogyakarta, 28 Januari 2020
Wakil Dekan Bidang Penelitian, Pengabdian Kepada Masyarakat dan Kerjasama	Ketua Komisi Etik Penelitian FKG UGM
 	
drg. Trianna Wahyu Utami, M.DSc., Ph.D	Prof. Dr.drg. Pinandi Sri Pudyani, SU., Sp.Ort(K)

## LAMPIRAN 3.3. Surat keterangan identifikasi tumbuhan



LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA  
(INDONESIAN INSTITUTE OF SCIENCES)  
BALAI KONSERVASI TUMBUHAN  
KEBUN RAYA PURWODADI  
Jl. Raya Surabaya - Malang Km. 65 Purwodadi - Pasuruan 67163  
Telp. (+62 343) 615033, Faks. (+62 341) 426046  
website : <http://www.krpurwodadi.lipi.go.id>

**SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TUMBUHAN**

No: \ 41 /IPH.06/HM/X/2019

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

Nama : drg. Zahreni Hamzah M.S.  
NIP : 196104011985112001  
Instansi : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember  
Tanggal material diterima : 15 Oktober 2019

Telah diidentifikasi/determinasi berdasarkan koleksi herbarium dan koleksi kebun serta referensi ilmiah, dengan hasil sebagai berikut :

Kingdom : Plantae  
Division : Magnoliophyta  
Class : Magnoliopsida  
Subclass : Rosidae  
Ordo : Euphorbiales  
Family : Euphorbiaceae  
Genus : Manihot  
Species : *Manihot esculenta* Crantz

## Referensi:

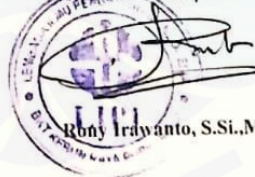
1. Backer CA & Bakhuizen van den Brink RC. 1963. Flora of Java Vol.II. NVP Noordhoff, Groningen, The Netherlands. Hal. 496
2. Cronquist A. 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press, New York, USA. Hal. XV
3. M. Flach dan F. Rumawas. 1996 (esd) PROSEA ( Plants Resources of South-East Asia ) No 9: Plants yielding non-seed carbohydrates Hal.109

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Purwodadi, 28 Oktober 2019

An. Kepala

Kepala Seksi Eksplorasi dan Koleksi Tumbuhan



Rony Irawanto, S.Si., M.T.



## LAMPIRAN 3.4. Surat ijin penelitian

## 3.4.1. Surat Ijin Laboratorium Hewan



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

Nomor : 6348/UN.25.8/IL/2019  
Perihal : Ijin penelitian

15 OCT 2019

Kepada Yth.  
Ketua Bagian Biomedik  
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember  
Di Jember

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

1. Nama : Lutfi Meiga Sari
2. NIM : 161610101066
3. Semester / Tahun : 2019/2020
4. Fakultas : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
5. Alamat : Jln. Brantas XII No. 156
6. Judul Penelitian : Potensi Senyawa Flavonoid Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta L.*) terhadap Profil Leukosit Perifer Model Tikus Betina Disfungsi Ovarium yang Diinduksi *Porphyromonas gingivalis*
7. Lokasi Penelitian : Laboratorium Farmakologi Ruang Hewan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
8. Data / alat yang dipinjam : -
9. Waktu : Oktober 2019 s/d Januari 2020
10. Tujuan Penelitian : Untuk Mengetahui Kemampuan Senyawa Flavonoid Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta L.*) terhadap Profil Leukosit Perifer Model Tikus Betina Disfungsi Ovarium yang Diinduksi *Porphyromonas gingivalis*
11. Dosen Pembimbing : 1. drg. Zahara Meilawaty, M.Kes  
2. drg. Pudji Astuti, M.Kes

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih



Masniari Novita, M.Kes, Sp. OF (K)  
NIP. 196811251999032001

## 3.4.2. Surat Ijin Laboratorium Mikrobiologi



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

Nomor : C.348 /UN.25.8/TL/2019  
Perihal : Ijin penelitian

15 OCT 2019

Kepada Yth.  
Ketua Bagian Biomedik  
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember  
Di Jember

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

1. Nama : Lutfi Meiga Sari
2. NIM : 161610101066
3. Semester / Tahun : 2019/2020
4. Fakultas : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
5. Alamat : Jln. Brantas XII No. 156
6. Judul Penelitian : Potensi Senyawa Flavonoid Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta L.*) terhadap Profil Leukosit Perifer Model Tikus Betina Disfungsi Ovarium yang Diinduksi *Porphyromonas gingivalis*
7. Lokasi Penelitian : Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
8. Data / alat yang dipinjam : Autoklaf, Inkubator, Oven dll
9. Waktu : Oktober 2019 s/d Januari 2020
10. Tujuan Penelitian : Untuk Mengetahui Kemampuan Senyawa Flavonoid Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta L.*) terhadap Profil Leukosit Perifer Model Tikus Betina Disfungsi Ovarium yang Diinduksi *Porphyromonas gingivalis*
11. Dosen Pembimbing : 1. drg. Zahara Meilawaty, M.Kes  
2. drg. Pudji Astuti, M.Kes

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih



Dr. drg. Masniari Novita, M.Kes, Sp. OF (K)  
NIP. 196811251999032001

## 3.4.3. Surat Ijin Laboratorium Patologi Klinik



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

Nomor : 639 g /UN.25.8/TL/2019  
Perihal : Ijin penelitian

15 OCT 2019

Kepada Yth.  
Ketua Bagian Biomedik  
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember  
Di Jember

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

1. Nama : Lutfi Meiga Sari
2. NIM : 161610101066
3. Semester / Tahun : 2019/2020
4. Fakultas : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
5. Alamat : Jln. Brantas XII No. 156
6. Judul Penelitian : Potensi Senyawa Flavonoid Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta L.*) terhadap Profil Leukosit Perifer Model Tikus Betina Disfungsi Ovarium yang Diinduksi *Porphyromonas gingivalis*
7. Lokasi Penelitian : Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
8. Data / alat yang dipinjam : Mikroskop, dll
9. Waktu : Oktober 2019 s/d Januari 2020
10. Tujuan Penelitian : Untuk Mengetahui Kemampuan Senyawa Flavonoid Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta L.*) terhadap Profil Leukosit Perifer Model Tikus Betina Disfungsi Ovarium yang Diinduksi *Porphyromonas gingivalis*
11. Dosen Pembimbing : 1. drg. Zahara Meilawaty, M.Kes  
2. drg. Pudji Astuti, M.Kes

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih



Marniari Novita, M.Kes, Sp. OF (K)  
NIP. 196811251999032001

**LAMPIRAN 3.5. Surat keterangan uji identifikasi dan gambaran mikroskopis *P. gingivalis***



LABORATORIUM MIKROBIOLOGI  
BAGIAN BIOMEDIKKEDOKTERAN GIGI  
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER

---

**SURAT KETERANGAN**

Sehubungan dengan keperluan penelitian yang dilakukan oleh :

Nama : Lutfi Meiga Sari  
NIM : 161610101066  
Fakultas : Kedokteran Gigi

Kami menerangkan bahwa identifikasi terhadap isolat bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 dengan menggunakan pengecatan Gram dan diamati secara mikroskopis menunjukkan hasil "coccobacillus Gram negatif".

Mengetahui,  
Kepala Bagian Biomedik Kedokteran Gigi



(drg. Amandia Dewi Permana Shita, M.Biomed)  
NIP.198006032006042002

Penanggung Jawab Lab. Mikrobiologi



(drg. Pujiana Endah Lestari, M.Kes)  
NIP. 197608092005012002

**LAMPIRAN 3.6. Foto prosedur penelitian****1. Pembuatan ekstrak daun Singkong**

Keterangan : a) Penimbangan daun Singkong kering yang telah diangin-anginkan selama 7 hari; b) Penghalusan daun Singkong; c) Daun Singkong yang telah halus dimasukkan dalam wadah kaca untuk persiapan pengadukan; d) Persiapan etanol 96% sebagai pelarut; e) Pengadukan dilakukan setiap 24 jam selama 3 hari f) Hasil maserasi; g) Larutan dimasukkan dalam *rotary evaporator*; h) Ekstrak daun Singkong.

**2. Pembuatan Model Tikus Disfungsi Ovarium dengan Metode Ovariectomi**

**3. Pembuatan Model Tikus Periodontitis Induksi *P.gingivalis***



**4. Aplikasi Ekstrak Daun Singkong**



**5. Pengambilan darah dan pembuatan preparat**



**LAMPIRAN 4.1. Data hasil pengamatan****Jumlah Leukosit Model Tikus Disfungsi Ovarium (sel/mm<sup>3</sup>)**

No	Treatment	Hari			
		Normal (Hari ke 0)	Hari ke 28	Treatment 3 hari (Hari ke 31)	Treatment 7 hari (Hari ke 35)
1	Aquadex	6650	6050	5500	11300
		6750	6000	5000	10200
		7750	7500	5900	10000
2	Metronidazole	8750	6000	5850	8700
		7150	4700	4850	8650
		7950	6300	5000	9000
3	Ekstrak Daun Singkong	6950	7650	10450	8650
		7500	4900	9550	8550
		7200	6250	7000	6750

**Basofil Model Tikus Disfungsi Ovarium (%)**

No	Treatment	Hari			
		Normal (Hari ke 0)	Hari ke 28	Treatment 3 hari (Hari ke 31)	Treatment 7 hari (Hari ke 35)
1	Aquadex	0	0	0	0
		1	0	0	0
		1	0	0	0
2	Metronidazole	1	0	0	0
		0	0	0	0
		1	0	0	0
3	Ekstrak Daun Singkong	0	0	0	0
		0	0	0	0
		0	0	0	0

**Eosinofil Model Tikus Disfungsi Ovarium (%)**

No	Treatment	Hari			
		Normal (Hari ke 0)	Hari ke 28	Treatment 3 hari (Hari ke 31)	Treatment 7 hari (Hari ke 35)
1	Aquades	3	2	0	1
		2	2	0	2
		2	2	0	2
2	Metronidazole	3	2	0	0
		2	2	0	3
		3	2	0	0
3	Ekstrak Daun Singkong	2	3	1	1
		1	1	1	0
		1	1	1	2

**Neutrofil Model Tikus Disfungsi Ovarium (%)**

No	Treatment	Hari			
		Normal (Hari ke 0)	Hari ke 28	Treatment 3 hari (Hari ke 31)	Treatment 7 hari (Hari ke 35)
1	Aquades	62	49	44	47
		60	44	38	29
		62	58	40	37
2	Metronidazole	63	44	26	31
		59	42	24	30
		60	45	30	30
3	Ekstrak Daun Singkong	59	40	41	50
		52	39	35	57
		55	36	35	53



**Limfosit Model Tikus Disfungsi Ovarium (%)**

No	Treatment	Hari			
		Normal (Hari ke 0)	Hari ke 28	Treatment 3 hari (Hari ke 31)	Treatment 7 hari (Hari ke 35)
1	Aquades	32	45	54	52
		34	50	60	64
		32	45	56	56
2	Metronidazole	31	49	74	68
		33	51	75	65
		32	50	66	60
3	Ekstrak Daun Singkong	35	55	57	48
		42	56	63	40
		38	58	60	40

**Monosit Model Tikus Disfungsi Ovarium (%)**

No	Treatment	Hari			
		Normal (Hari ke 0)	Hari ke 28	Treatment 3 hari (Hari ke 31)	Treatment 7 hari (Hari ke 35)
1	Aquades	3	4	2	0
		3	4	2	5
		3	5	4	5
2	Metronidazole	2	4	0	1
		6	5	1	2
		4	3	4	0
3	Ekstrak Daun Singkong	4	2	1	1
		5	4	1	3
		6	5	4	5

**Jumlah Leukosit Model Tikus Periodontitis (sel/mm<sup>3</sup>)**

No	Treatment	Hari			
		Normal (Hari ke 0)	Hari ke 28	Treatment 3 hari (Hari ke 31)	Treatment 7 hari (Hari ke 35)
1	Aquades	8900	9450	11000	11400
		9700	10100	10650	10650
		8800	8900	11400	11050
2	Metronidazole	9400	10800	8900	7400
		8350	9900	9000	7800
		5550	10400	6600	8900
3	Ekstrak Daun Singkong	5950	10400	10850	7800
		10150	10250	8750	8450
		5450	11950	8300	9900

**Basofil Model Tikus Periodontitis (%)**

No	Treatment	Hari			
		Normal (Hari ke 0)	Hari ke 28	Treatment 3 hari (Hari ke 31)	Treatment 7 hari (Hari ke 35)
1	Aquades	0	0	0	0
		0	0	0	0
		0	0	0	0
2	Metronidazole	0	1	0	0
		0	0	0	0
		0	0	0	0
3	Ekstrak Daun Singkong	1	0	0	0
		0	1	0	0
		0	0	0	0

**Eosinofil Model Tikus Periodontitis (%)**

No	Treatment	Hari			
		Normal (Hari ke 0)	Hari ke 28	Treatment 3 hari (Hari ke 31)	Treatment 7 hari (Hari ke 35)
1	Aquades	1	1	0	1
		1	0	1	0
		1	1	1	0
2	Metronidazole	0	2	0	0
		0	3	2	3
		0	2	1	1
3	Ekstrak Daun Singkong	0	3	0	2
		0	3	0	1
		0	1	1	1

**Neutrofil Model Tikus Periodontitis (%)**

No	Treatment	Hari			
		Normal (Hari ke 0)	Hari ke 28	Treatment 3 hari (Hari ke 31)	Treatment 7 hari (Hari ke 35)
1	Aquades	52	54	57	42
		50	59	68	42
		52	66	66	45
2	Metronidazole	53	58	51	38
		48	52	40	49
		50	57	53	33
3	Ekstrak Daun Singkong	50	65	61	51
		50	53	35	44
		57	60	58	53

**Limfosit Model Tikus Periodontitis (%)**

No	Treatment	Hari			
		Normal (Hari ke 0)	Hari ke 28	Treatment 3 hari (Hari ke 31)	Treatment 7 hari (Hari ke 35)
1	Aquades	42	42	43	54
		39	39	30	58
		40	31	30	55
2	Metronidazole	43	38	44	61
		46	44	57	57
		40	38	44	65
3	Ekstrak Daun Singkong	41	31	36	40
		45	40	50	53
		50	37	38	45

**Monosit Model Tikus Periodontitis (%)**

No	Treatment	Hari			
		Normal (Hari ke 0)	Hari ke 28	Treatment 3 hari (Hari ke 31)	Treatment 7 hari (Hari ke 35)
1	Aquades	5	5	0	3
		8	2	1	0
		5	2	3	0
2	Metronidazole	2	1	5	1
		4	1	1	5
		7	3	0	1
3	Ekstrak Daun Singkong	6	1	3	7
		3	3	1	2
		1	2	3	1

**LAMPIRAN 4.2. Analisis data****F.1. Jumlah Leukosit Model Tikus Disfungsi Ovarium**

- **Uji Normalitas Shapiro Wilk**

**Tests of Normality**

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Jumlah Leukosit_Ovx	.080	36	.200*	.963	36	.260

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

a. Lilliefors Significance Correction

- **Uji Homogenitas**

**Mauchly's Test of Sphericity<sup>a</sup>**

Measure: MEASURE\_1

Within Subjects Effect	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	Df	Sig.	Epsilon <sup>b</sup>		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Lower-bound
Treatment	.220	1.514	2	.469	.562	.782	.500
Hari	.000	.	5	.	.445	1.000	.333
Treatment * Hari	.000	.	20	.	.280	1.000	.167

Tests the null hypothesis that the error covariance matrix of the orthonormalized transformed dependent variables is proportional to an identity matrix.

a. Design: Intercept

Within Subjects Design: Treatment + Hari + Treatment \* Hari

b. May be used to adjust the degrees of freedom for the averaged tests of significance. Corrected tests are displayed in the Tests of Within-Subjects Effects table.

- Uji Two-way Repeated Measures Anova

### Tests of Within-Subjects Effects

Measure: MEASURE\_1

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Treatment	Sphericity Assumed	3127222. 222	2	1563611.111	1.165	.399	.368
	Greenhouse- Geisser	3127222. 222	1.124	2783285.419	1.165	.395	.368
	Huynh-Feldt	3127222. 222	1.564	1999526.497	1.165	.398	.368
	Lower-bound	3127222. 222	1.000	3127222.222	1.165	.393	.368
Error(Treat ment)	Sphericity Assumed	5367777. 778	4	1341944.444			
	Greenhouse- Geisser	5367777. 778	2.247	2388710.581			
	Huynh-Feldt	5367777. 778	3.128	1716061.913			
	Lower-bound	5367777. 778	2.000	2683888.889			
Hari	Sphericity Assumed	45643611 .111	3	15214537.037	17.661	.002	.898
	Greenhouse- Geisser	45643611 .111	1.335	34188196.746	17.661	.030	.898
	Huynh-Feldt	45643611 .111	3.000	15214537.037	17.661	.002	.898
	Lower-bound	45643611 .111	1.000	45643611.111	17.661	.052	.898
Error(Hari)	Sphericity Assumed	5168888. 889	6	861481.481			
	Greenhouse- Geisser	5168888. 889	2.670	1935812.987			
	Huynh-Feldt	5168888. 889	6.000	861481.481			
	Lower-bound	5168888. 889	2.000	2584444.444			

Treatment * Hari	Sphericity Assumed	36040555 .556	6	6006759.259	12.515	.000	.862
	Greenhouse- Geisser	36040555 .556	1.680	21452025.940	12.515	.029	.862
	Huynh-Feldt	36040555 .556	6.000	6006759.259	12.515	.000	.862
	Lower-bound	36040555 .556	1.000	36040555.556	12.515	.071	.862
Error(Treat ment*Hari)	Sphericity Assumed	5759444. 444	12	479953.704			
	Greenhouse- Geisser	5759444. 444	3.360	1714065.581			
	Huynh-Feldt	5759444. 444	12.000	479953.704			
	Lower-bound	5759444. 444	2.000	2879722.222			

- Uji Lanjutan LSD

**Hari**

**Pairwise Comparisons**

Measure: MEASURE\_1

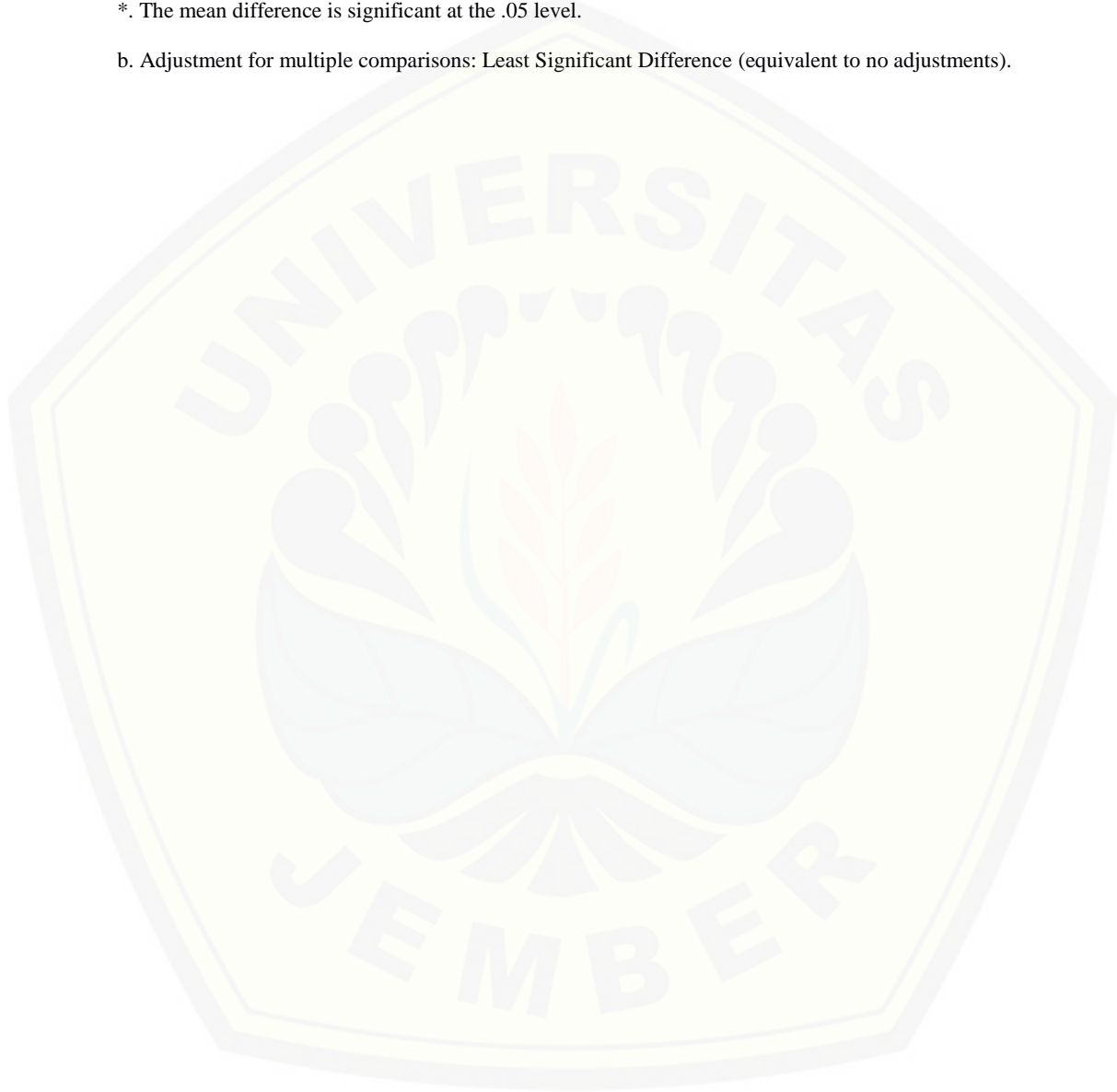
(I) Hari	(J) Hari	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. <sup>b</sup>	95% Confidence Interval for Difference <sup>b</sup>	
					Lower Bound	Upper Bound
Normal	Hari_ke_28	1255.556	339.435	.066	-204.915	2716.026
	Hari_ke_31	838.889	436.774	.195	-1040.398	2718.176
	Hari_ke_35	-1683.333*	367.801	.045	-3265.854	-100.812
Hari_ke_28	Normal	-1255.556	339.435	.066	-2716.026	204.915
	Hari_ke_31	-416.667	589.805	.553	-2954.394	2121.061
	Hari_ke_35	-2938.889*	587.393	.038	-5466.238	-411.540
Hari_ke_31	Normal	-838.889	436.774	.195	-2718.176	1040.398
	Hari_ke_28	416.667	589.805	.553	-2121.061	2954.394
	Hari_ke_35	-2522.222*	120.313	.002	-3039.889	-2004.556

Hari_ke_35	Normal	1683.333*	367.801	.045	100.812	3265.854
	Hari_ke_28	2938.889*	587.393	.038	411.540	5466.238
	Hari_ke_31	2522.222*	120.313	.002	2004.556	3039.889

Based on estimated marginal means

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).





**F.2. Basofil Model Tikus Disfungsi Ovarium**

- **Uji Normalitas Shapiro Wilk**

**Tests of Normality**

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Basofil_Ovx	.444	36	.000	.522	36	.000

Lilliefors Significance Correction

- **Uji Friedmann-Test**

**Treatment**

**Hypothesis Test Summary**

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distributions of Aqaudes, Metronidazole and Ekstrak_Daun_Singko ng are the same.	Related-Samples Friedman's Two-Way Analysis of Variance by Ranks	.368	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .050.

**Hari**

**Hypothesis Test Summary**

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	distributions of Normal, ke_28, Hari_ke_31 and ke_35 are the same.	ed-Samples Friedman's Two-Analysis of Variance by Ranks	.112	n the null thesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .050.

### F.3. Eosinofil Model Tikus Disfungsi Ovarium

- Uji Normalitas Shapiro Wilk

#### Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Eusinofil_Ovx	.250	36	.000	.887	36	.002

a. Lilliefors Significance Correction

- Uji Friedmann-Test

#### Treatment

#### Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distributions of Aqaudes, Metronidazole and Ekstrak_Daun_Singkong are the same.	Related-Samples Friedman's Two-Way Analysis of Variance by Ranks	.584	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .050.

#### Hari

#### Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distributions of Normal, Hari_ke_28, Hari_ke_31 and Hari_ke_35 are the same.	Related-Samples Friedman's Two-Way Analysis of Variance by Ranks	.060	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .050.

#### F.4. Neutrofil Model Tikus Disfungsi Ovarium

- Uji Normalitas Shapiro Wilk

##### Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Neutrofil_Ovx	.144	36	.057	.949	36	.094

a. Lilliefors Significance Correction

- Uji Homogenitas

##### Mauchly's Test of Sphericity<sup>a</sup>

Measure: MEASURE\_1

Within Subjects Effect	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	Df	Sig.	Greenhouse-Geisser	Epsilon <sup>b</sup>	
						Huynh-Feldt	Lower-bound
Treatment	.396	.927	2	.629	.623	1.000	.500
Hari	.000	.	5	.	.358	.440	.333
Treatment * Hari	.000	.	20	.	.289	1.000	.167

Tests the null hypothesis that the error covariance matrix of the orthonormalized transformed dependent variables is proportional to an identity matrix.

a. Design: Intercept

Within Subjects Design: Treatment + Hari + Treatment \* Hari

b. May be used to adjust the degrees of freedom for the averaged tests of significance. Corrected tests are displayed in the Tests of Within-Subjects Effects table.

- Uji Two-way Repeated Measures Anova

##### Tests of Within-Subjects Effects

Measure: MEASURE\_1

Source		Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Treatment	Sphericity Assumed	342.889	2	171.444	9.380	.031	.824
	Greenhouse-Geisser	342.889	1.247	275.020	9.380	.070	.824
	Huynh-Feldt	342.889	2.000	171.444	9.380	.031	.824
	Lower-bound	342.889	1.000	342.889	9.380	.092	.824
	Error(Treatment)	Sphericity Assumed	73.111	4	18.278		

	Greenhouse-Geisser	73.111	2.494	29.320			
	Huynh-Feldt	73.111	4.000	18.278			
	Lower-bound	73.111	2.000	36.556			
Hari	Sphericity Assumed	2921.000	3	973.667	255.854	.000	.992
	Greenhouse-Geisser	2921.000	1.074	2719.305	255.854	.003	.992
	Huynh-Feldt	2921.000	1.320	2212.116	255.854	.001	.992
	Lower-bound	2921.000	1.000	2921.000	255.854	.004	.992
Error(Hari)	Sphericity Assumed	22.833	6	3.806			
	Greenhouse-Geisser	22.833	2.148	10.628			
	Huynh-Feldt	22.833	2.641	8.646			
	Lower-bound	22.833	2.000	11.417			
Treatment * Hari	Sphericity Assumed	1083.333	6	180.556	10.450	.000	.839
	Greenhouse-Geisser	1083.333	1.736	624.125	10.450	.035	.839
	Huynh-Feldt	1083.333	6.000	180.556	10.450	.000	.839
	Lower-bound	1083.333	1.000	1083.333	10.450	.084	.839
Error(Treatment*Hari)	Sphericity Assumed	207.333	12	17.278			
	Greenhouse-Geisser	207.333	3.472	59.724			
	Huynh-Feldt	207.333	12.000	17.278			
	Lower-bound	207.333	2.000	103.667			

- Uji Lanjutan LSD

**Treatment****Pairwise Comparisons**

Measure: MEASURE\_1

(I) Treatment	(J) Treatment	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. <sup>b</sup>	95% Confidence Interval for Difference <sup>b</sup>	
					Lower Bound	Upper Bound
Aquades	Metronidazole	7.167*	1.641	.049	.104	14.229
	Ekstrak_Daun_Singkong	1.500	2.291	.580	-8.359	11.359
Metronidazole	Aquades	-7.167*	1.641	.049	-14.229	-.104
	Ekstrak_Daun_Singkong	-5.667*	1.093	.035	-10.369	-.964
Ekstrak_Daun_Singkong	Aquades	-1.500	2.291	.580	-11.359	8.359
Singkong	Metronidazole	5.667*	1.093	.035	.964	10.369

Based on estimated marginal means

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

**Hari****Pairwise Comparisons**

Measure: MEASURE\_1

(I) Hari	(J) Hari	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. <sup>b</sup>	95% Confidence Interval for Difference <sup>b</sup>	
					Lower Bound	Upper Bound
Normal	Hari_ke_28	15.000*	1.262	.007	9.570	20.430
	Hari_ke_31	24.333*	.192	.000	23.505	25.161
	Hari_ke_35	18.667*	.192	.000	17.839	19.495
Hari_ke_28	Normal	-15.000*	1.262	.007	-20.430	-9.570
	Hari_ke_31	9.333*	1.155	.015	4.365	14.302
	Hari_ke_35	3.667	1.388	.118	-2.304	9.638
Hari_ke_31	Normal	-24.333*	.192	.000	-25.161	-23.505
	Hari_ke_28	-9.333*	1.155	.015	-14.302	-4.365
	Hari_ke_35	-5.667*	.385	.005	-7.323	-4.011

Hari_ke_35	Normal	-18.667*	.192	.000	-19.495	-17.839
	Hari_ke_28	-3.667	1.388	.118	-9.638	2.304
	Hari_ke_31	5.667*	.385	.005	4.011	7.323

Based on estimated marginal means

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).



**F.5. Limfosit Model Tikus Disfungsi Ovarium**

□ **Uji Normalitas Shapiro Wilk**

**Tests of Normality**

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Limfosit_Ovx	.111	36	.200*	.983	36	.830

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

Lilliefors Significance Correction

• **Uji Homogenitas**

**Mauchly's Test of Sphericity<sup>a</sup>**

Measure: MEASURE\_1

Within Subjects Effect	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	df	Sig.	Greenhouse-Geisser	Epsilon <sup>b</sup>	
						Huynh-Feldt	Lower-bound
Treatment	.714	.337	2	.845	.777	1.000	.500
Hari	.000	.	5	.	.533	1.000	.333
Treatment * Hari	.000	.	20	.	.243	.733	.167

Tests the null hypothesis that the error covariance matrix of the orthonormalized transformed dependent variables is proportional to an identity matrix.

a. Design: Intercept

Within Subjects Design: Treatment + Hari + Treatment \* Hari

b. May be used to adjust the degrees of freedom for the averaged tests of significance. Corrected tests are displayed in the Tests of Within-Subjects Effects table.

• **Uji Two-way Repeated Measures Anova**

**Tests of Within-Subjects Effects**

Measure: MEASURE\_1

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Treatment	Sphericity Assumed	262.889	2	131.444	10.057	.028	.834
	Greenhouse-Geisser	262.889	1.555	169.068	10.057	.045	.834
	Huynh-Feldt	262.889	2.000	131.444	10.057	.028	.834
	Lower-bound	262.889	1.000	262.889	10.057	.087	.834

Error(Treatment)	Sphericity Assumed	52.278	4	13.069			
	Greenhouse-Geisser	52.278	3.110	16.810			
	Huynh-Feldt	52.278	4.000	13.069			
	Lower-bound	52.278	2.000	26.139			
Hari	Sphericity Assumed	3874.111	3	1291.370	201.835	.000	.990
	Greenhouse-Geisser	3874.111	1.598	2423.878	201.835	.000	.990
	Huynh-Feldt	3874.111	3.000	1291.370	201.835	.000	.990
	Lower-bound	3874.111	1.000	3874.111	201.835	.005	.990
Error(Hari)	Sphericity Assumed	38.389	6	6.398			
	Greenhouse-Geisser	38.389	3.197	12.009			
	Huynh-Feldt	38.389	6.000	6.398			
	Lower-bound	38.389	2.000	19.194			
Treatment * Hari	Sphericity Assumed	1060.222	6	176.704	17.484	.000	.897
	Greenhouse-Geisser	1060.222	1.459	726.468	17.484	.025	.897
	Huynh-Feldt	1060.222	4.399	240.988	17.484	.000	.897
	Lower-bound	1060.222	1.000	1060.222	17.484	.053	.897
Error(Treatment*Hari)	Sphericity Assumed	121.278	12	10.106			
	Greenhouse-Geisser	121.278	2.919	41.550			
	Huynh-Feldt	121.278	8.799	13.783			
	Lower-bound	121.278	2.000	60.639			



- Uji Lanjutan LSD

**Treatment****Pairwise Comparisons**

Measure: MEASURE\_1

(I) Treatment	(J) Treatment	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. <sup>b</sup>	95% Confidence Interval for Difference <sup>b</sup>	
					Lower Bound	Upper Bound
Aquades	Metronidazole	-6.167	1.805	.076	-13.932	1.598
	Esktrak_Daun_Si ngkong	-1.000	1.422	.555	-7.116	5.116
Metronidazole	Aquades	6.167	1.805	.076	-1.598	13.932
	Esktrak_Daun_Si ngkong	5.167*	1.121	.044	.343	9.991
Esktrak_Daun_Singkong	Aquades	1.000	1.422	.555	-5.116	7.116
	Metronidazole	-5.167*	1.121	.044	-9.991	-.343

Based on estimated marginal means

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

**Hari****Pairwise Comparisons**

Measure: MEASURE\_1

(I) Hari	(J) Hari	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. <sup>b</sup>	95% Confidence Interval for Difference <sup>b</sup>	
					Lower Bound	Upper Bound
Normal	Hari_ke_28	-16.667*	.333	.000	-18.101	-15.232
	Hari_ke_31	-28.444*	.909	.001	-32.358	-24.531
	Hari_ke_35	-20.444*	1.556	.006	-27.137	-13.751
Hari_ke_28	Normal	16.667*	.333	.000	15.232	18.101
	Hari_ke_31	-11.778*	1.160	.010	-16.769	-6.787
	Hari_ke_35	-3.778	1.544	.134	-10.419	2.864
Hari_ke_31	Normal	28.444*	.909	.001	24.531	32.358
	Hari_ke_28	11.778*	1.160	.010	6.787	16.769
	Hari_ke_35	8.000*	1.202	.022	2.829	13.171

Hari_ke_35	Normal	20.444*	1.556	.006	13.751	27.137
	Hari_ke_28	3.778	1.544	.134	-2.864	10.419
	Hari_ke_31	-8.000*	1.202	.022	-13.171	-2.829

Based on estimated marginal means

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).



## F.6. Monosit Model Tikus Disfungsi Ovarium

- Uji Normalitas Shapiro Wilk

### Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Monosit_Ovx	.139	36	.077	.969	36	.395

a. Lilliefors Significance Correction

- Uji Homogenitas

### Mauchly's Test of Sphericity<sup>a</sup>

Measure: MEASURE\_1

Within Subjects Effect	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	df	Sig.	Greenhouse-Geisser	Epsilon <sup>b</sup>	
						Huynh-Feldt	Lower-bound
Treatment	.035	3.348	2	.187	.509	.536	.500
Hari	.000	.	5	.	.533	1.000	.333
Treatment * Hari	.000	.	20	.	.236	.639	.167

Tests the null hypothesis that the error covariance matrix of the orthonormalized transformed dependent variables is proportional to an identity matrix.

a. Design: Intercept

Within Subjects Design: Treatment + Hari + Treatment \* Hari

b. May be used to adjust the degrees of freedom for the averaged tests of significance. Corrected tests are displayed in the Tests of Within-Subjects Effects table.

## Uji Two-way Repeated Measures Anova

### Tests of Within-Subjects Effects

Measure: MEASURE\_1

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Treatment	Sphericity Assumed	4.056	2	2.028	1.141	.406	.363
	Greenhouse-Geisser	4.056	1.018	3.984	1.141	.398	.363
	Huynh-Feldt	4.056	1.073	3.780	1.141	.399	.363
	Lower-bound	4.056	1.000	4.056	1.141	.397	.363
	Error(Treatment)	Sphericity Assumed	7.111	4	1.778		

	Greenhouse-Geisser	7.111	2.036	3.493			
	Huynh-Feldt	7.111	2.146	3.314			
	Lower-bound	7.111	2.000	3.556			
Hari	Sphericity Assumed	27.194	3	9.065	4.640	.053	.699
	Greenhouse-Geisser	27.194	1.600	16.999	4.640	.114	.699
	Huynh-Feldt	27.194	3.000	9.065	4.640	.053	.699
	Lower-bound	27.194	1.000	27.194	4.640	.164	.699
Error(Hari)	Sphericity Assumed	11.722	6	1.954			
	Greenhouse-Geisser	11.722	3.200	3.664			
	Huynh-Feldt	11.722	6.000	1.954			
	Lower-bound	11.722	2.000	5.861			
Treatment * Hari	Sphericity Assumed	13.722	6	2.287	1.604	.229	.445
	Greenhouse-Geisser	13.722	1.415	9.699	1.604	.323	.445
	Huynh-Feldt	13.722	3.836	3.577	1.604	.267	.445
	Lower-bound	13.722	1.000	13.722	1.604	.333	.445
Error(Treatment*Hari)	Sphericity Assumed	17.111	12	1.426			
	Greenhouse-Geisser	17.111	2.830	6.047			
	Huynh-Feldt	17.111	7.672	2.230			
	Lower-bound	17.111	2.000	8.556			

**F.7. Jumlah Leukosit Model Tikus Periodontitis**

- **Uji Normalitas Shapiro Wilk**

**Tests of Normality**

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Jumlah Leukosit_Perio	.102	36	.200*	.946	36	.079

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

Lilliefors Significance Correction

- **Uji Homogenitas**

**Mauchly's Test of Sphericity<sup>a</sup>**

Measure: MEASURE\_1

Within Subjects Effect	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	df	Sig.	Epsilon <sup>b</sup>		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Lower-bound
Treatment	.283	1.262	2	.532	.582	.895	.500
Hari	.000	.	5	.	.463	1.000	.333
Treatment * Hari	.000	.	20	.	.332	1.000	.167

Tests the null hypothesis that the error covariance matrix of the orthonormalized transformed dependent variables is proportional to an identity matrix.

a. Design: Intercept

Within Subjects Design: Treatment + Hari + Treatment \* Hari

b. May be used to adjust the degrees of freedom for the averaged tests of significance. Corrected tests are displayed in the Tests of Within-Subjects Effects table.

- **Uji Two-way Repeated Measures Anova**

**Tests of Within-Subjects Effects**

Measure: MEASURE\_1

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Treatment	Sphericity Assumed	16068888.889	2	8034444.444	13.065	.018	.867
	Greenhouse-Geisser	16068888.889	1.165	13794587.230	13.065	.054	.867
	Huynh-Feldt	16068888.889	1.790	8978695.708	13.065	.023	.867
	Lower-bound	16068888.889	1.000	16068888.889	13.065	.069	.867

Error(Treatment)	Sphericity Assumed	2459861.111	4	614965.278			
	Greenhouse-Geisser	2459861.111	2.330	1055852.987			
	Huynh-Feldt	2459861.111	3.579	687239.315			
	Lower-bound	2459861.111	2.000	1229930.556			
Hari	Sphericity Assumed	22783333.333	3	7594444.444	2.952	.120	.596
	Greenhouse-Geisser	22783333.333	1.388	16416440.497	2.952	.199	.596
	Huynh-Feldt	22783333.333	3.000	7594444.444	2.952	.120	.596
	Lower-bound	22783333.333	1.000	22783333.333	2.952	.228	.596
Error(Hari)	Sphericity Assumed	15434583.333	6	2572430.556			
	Greenhouse-Geisser	15434583.333	2.776	5560663.911			
	Huynh-Feldt	15434583.333	6.000	2572430.556			
	Lower-bound	15434583.333	2.000	7717291.667			
Treatment * Hari	Sphericity Assumed	20073333.333	6	3345555.556	2.470	.086	.553
	Greenhouse-Geisser	20073333.333	1.992	10074741.422	2.470	.201	.553
	Huynh-Feldt	20073333.333	6.000	3345555.556	2.470	.086	.553
	Lower-bound	20073333.333	1.000	20073333.333	2.470	.257	.553
Error(Treatment*Hari)	Sphericity Assumed	16251250.000	12	1354270.833			
	Greenhouse-Geisser	16251250.000	3.985	4078225.047			
	Huynh-Feldt	16251250.000	12.000	1354270.833			
	Lower-bound	16251250.000	2.000	8125625.000			

• Uji Lanjutan LSD

Pairwise Comparisons

Measure: MEASURE\_1

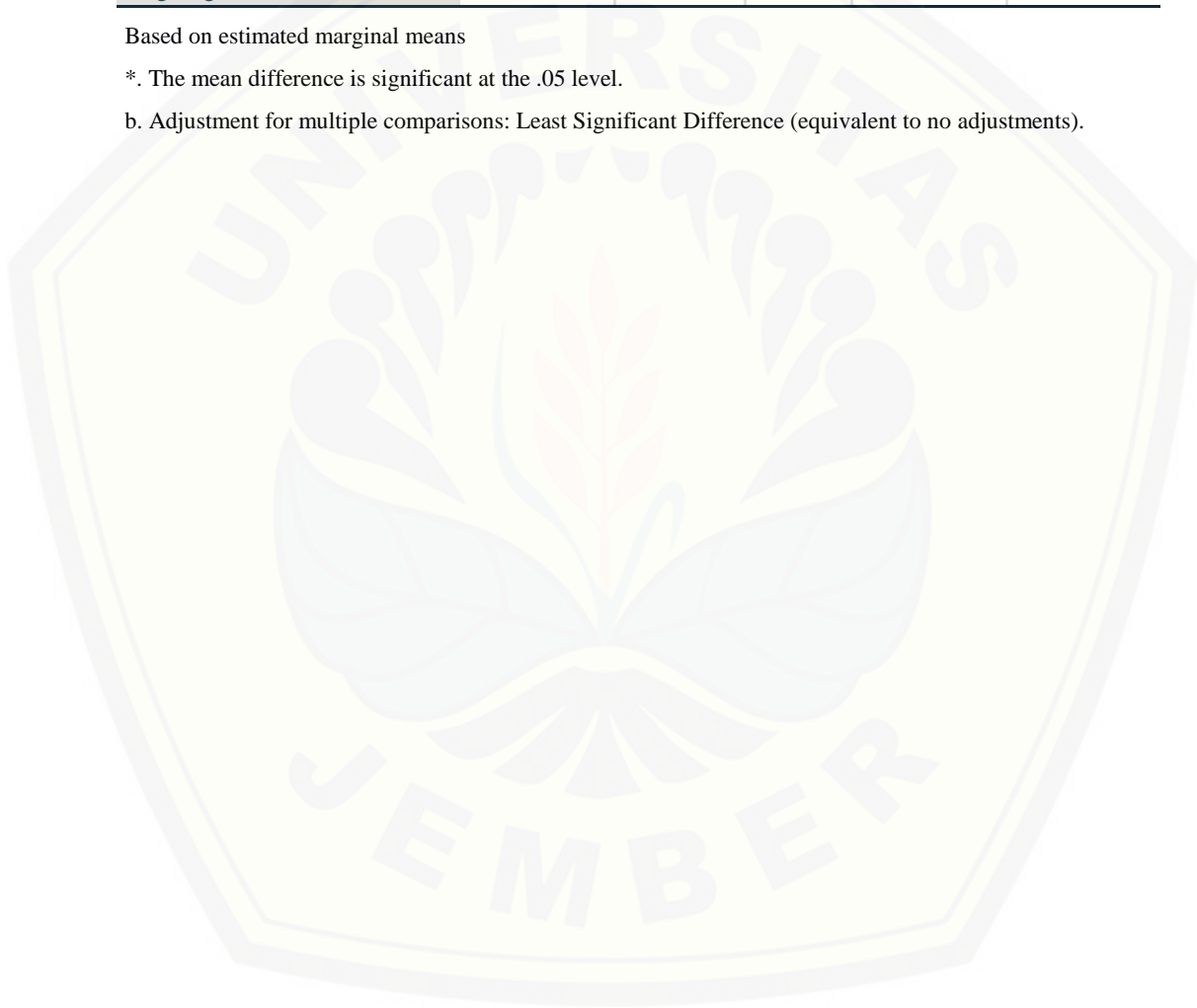
(I) Treatment	(J) Treatment	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. <sup>b</sup>	95% Confidence Interval for Difference <sup>b</sup>
---------------	---------------	-----------------------	------------	-------------------	---

		J)			Lower Bound	Upper Bound
Aquadex	Metronidazole	1583.333*	323.098	.039	193.155	2973.512
	Ekstrak_Daun_Singkong	1150.000*	162.500	.019	450.819	1849.181
Metronidazole	Aquadex	-1583.333*	323.098	.039	-2973.512	-193.155
	Ekstrak_Daun_Singkong	-433.333	420.338	.411	-2241.902	1375.235
Ekstrak_Daun_Singkong	Aquadex	-1150.000*	162.500	.019	-1849.181	-450.819
Singkong	Metronidazole	433.333	420.338	.411	-1375.235	2241.902

Based on estimated marginal means

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).



### F.8. Basofil Model Tikus Periodontitis

- Uji Normalitas Shapiro Wilk

#### Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Basofil_Perio	.417	36	.000	.625	36	.000

Lilliefors Significance Correction

- Uji Friedmann-Test  
Treatment

#### Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distributions of Aquades, Metronidazole and Ekstrak_Daun_Singkong are the same.	Related-Samples Friedman's Two-Way Analysis of Variance by Ranks	.223	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .050.

### Hari

#### Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distributions of Normal, Hari_ke_28, Hari_ke_31 and Hari_ke_35 are the same.	Related-Samples Friedman's Two-Way Analysis of Variance by Ranks	.194	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .050.



### F.9. Eosinofil Model Tikus Periodontitis

- Uji Normalitas Shapiro Wilk

#### Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Eusinofil_Perio	.417	36	.000	.625	36	.000

Lilliefors Significance Correction

- Uji Friedmann-Test

#### Treatment

#### Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distributions of Aqaudes, Metronidazole and Ekstrak_Daun_Singkong are the same.	Related-Samples Friedman's Two-Way Analysis of Variance by Ranks	.395	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .050.

#### Hari

#### Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distributions of Normal, Hari_ke_28, Hari_ke_31 and Hari_ke_35 are the same.	Related-Samples Friedman's Two-Way Analysis of Variance by Ranks	.153	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .050.

## F. 10. Neutrofil Model Tikus Periodontitis

- Uji Normalitas Shapiro Wilk

### Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Neutrofil_Perio	.107	36	.200*	.966	36	.333

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

a. Lilliefors Significance Correction

- Uji Homogenitas

### Mauchly's Test of Sphericity<sup>a</sup>

Measure: MEASURE\_1

Within Subjects Effect	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	df	Sig.	Greenhouse-Geisser	Epsilon <sup>b</sup>	
						Huynh-Feldt	Lower-bound
Treatment	.576	.551	2	.759	.702	1.000	.500
Hari	.000	.	5	.	.334	.337	.333
Treatment * Hari	.000	.	20	.	.252	.868	.167

Tests the null hypothesis that the error covariance matrix of the orthonormalized transformed dependent variables is proportional to an identity matrix.

a. Design: Intercept

Within Subjects Design: Treatment + Hari + Treatment \* Hari

b. May be used to adjust the degrees of freedom for the averaged tests of significance. Corrected tests are displayed in the Tests of Within-Subjects Effects table.

- Uji Two-way Repeated Measures Anova

### Tests of Within-Subjects Effects

Measure: MEASURE\_1

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Treatment	Sphericity Assumed	231.167	2	115.583	1.679	.296	.456
	Greenhouse-Geisser	231.167	1.405	164.567	1.679	.313	.456
	Huynh-Feldt	231.167	2.000	115.583	1.679	.296	.456
	Lower-bound	231.167	1.000	231.167	1.679	.324	.456

Error(Treatment)	Sphericity Assumed	275.333	4	68.833			
	Greenhouse-Geisser	275.333	2.809	98.005			
	Huynh-Feldt	275.333	4.000	68.833			
	Lower-bound	275.333	2.000	137.667			
Hari	Sphericity Assumed	961.556	3	320.519	13.758	.004	.873
	Greenhouse-Geisser	961.556	1.003	958.676	13.758	.065	.873
	Huynh-Feldt	961.556	1.012	950.104	13.758	.064	.873
	Lower-bound	961.556	1.000	961.556	13.758	.066	.873
Error(Hari)	Sphericity Assumed	139.778	6	23.296			
	Greenhouse-Geisser	139.778	2.006	69.680			
	Huynh-Feldt	139.778	2.024	69.057			
	Lower-bound	139.778	2.000	69.889			
Treatment * Hari	Sphericity Assumed	349.278	6	58.213	1.760	.190	.468
	Greenhouse-Geisser	349.278	1.513	230.895	1.760	.299	.468
	Huynh-Feldt	349.278	5.209	67.056	1.760	.205	.468
	Lower-bound	349.278	1.000	349.278	1.760	.316	.468
Error(Treatment*Hari)	Sphericity Assumed	396.889	12	33.074			
	Greenhouse-Geisser	396.889	3.025	131.184			
	Huynh-Feldt	396.889	10.417	38.099			
	Lower-bound	396.889	2.000	198.444			

### F.11. Limfosit Model Tikus Periodontitis

- Uji Normalitas Shapiro Wilk

#### Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Limfosit_Perio	.111	36	.200*	.939	36	.047

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

a. Lilliefors Significance Correction

- Uji Friedmann-Test

#### Treatment

#### Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distributions of Aqaudes, Metronidazole and Ekstrak_Daun_Singkong are the same.	Related-Samples Friedman's Two-Way Analysis of Variance by Ranks	.174	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .050.

#### Hari

#### Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distributions of Normal, Hari_ke_28, Hari_ke_31 and Hari_ke_35 are the same.	Related-Samples Friedman's Two-Way Analysis of Variance by Ranks	.072	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .050.

## F.12. Monosit Model Tikus Periodontitis

- Uji Normalitas Shapiro Wilk

### Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Monosit_Perio	.195	36	.001	.905	36	.005

a. Lilliefors Significance Correction

- Uji Friedmann-Test

### Treatment

#### Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distributions of Aquades, Metronidazole and Ekstrak_Daun_Singkong are the same.	Related-Samples Friedman's Two-Way Analysis of Variance by Ranks	.779	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .050.

### Hari

#### Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distributions of Normal, Hari_ke_28, Hari_ke_31 and Hari_ke_35 are the same.	Related-Samples Friedman's Two-Way Analysis of Variance by Ranks	.167	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .050.