



**VIABILITAS SEL NEUTROFIL YANG DIINKUBASI DENGAN
EKSTRAK DAUN SINGKONG (*Manihot esculenta*) DAN
DIPAPAR LIPOPOLISAKARIDA (LPS)**

SKRIPSI

Oleh

Nugraheni Tri Rahayu

NIM 111610101057

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER**

2015



**VIABILITAS SEL NEUTROFIL YANG DIINKUBASI DENGAN
EKSTRAK DAUN SINGKONG (*Manihot esculenta*) DAN
DIPAPAR LIPOPOLISAKARIDA (LPS)**

SKRIPSI

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

Oleh

Nugraheni Tri Rahayu

NIM 111610101057

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER**

2015

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Orang tua tercinta, Haryadi (alm), Titik Sri Adiyani & Sulama yang selalu memberikan semangat, motivasi dan doa agar saya menjadi lebih baik.
2. Kakak-kakak yang saya sayangi Indrati dan Herlina yang selalu memberikan dukungan, motivasi dan doa.
3. Dosen-dosen FKG UNEJ yang membimbing dan mendidik saya selama menempuh pendidikan dokter gigi.
4. Agama, bangsa dan negara, serta almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

MOTO

Orang-orang hebat di bidang apapun bukan baru bekerja karena mereka terinspirasi, namun mereka terinspirasi karena mereka lebih suka bekerja. Mereka tidak menyia-nyiakkan waktu untuk menunggu inspirasi. *)

Orang-orang sukses telah belajar membuat diri mereka melakukan hal yang harus dikerjakan ketika hal itu memang harus dikerjakan, entah mereka menyukainya atau tidak. **)

*Builds your dreams, or someone else will hire you to build theirs. ***)*

*) Ernest Newman (1868-1959)

**) Aldous Huxley (1894-1963)

***) Farrah Gray (1984-)

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama: Nugraheni Tri Rahayu

NIM: 111610101057

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Viabilitas Sel Neutrofil yang Diinkubasi dengan Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta*) dan Dipapar Lipopolisakarida (LPS)” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 30 April 2015

Yang menyatakan,

Nugraheni Tri Rahayu

NIM 111610101057

SKRIPSI

**VIABILITAS SEL NEUTROFIL YANG DIINKUBASI DENGAN EKSTRAK
DAUN SINGKONG (*Manihot esculenta*) DAN DIPAPAR
LIPOPOLISAKARIDA (LPS)**

Oleh

Nugraheni Tri Rahayu

NIM 111610101057

Pembimbing

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

Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Pudji Astuti, M.Kes

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Viabilitas Sel Neutrofil yang Diinkubasi dengan Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta*) dan Dipapar Lipopolisakarida (LPS)” telah diuji dan disahkan pada:

Hari, tanggal : Kamis, 30 April 2015

Tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Dosen Penguji Ketua

Dosen Penguji Anggota

drg. Depi Praharani, M.Kes

NIP 196801221997022001

DR. drg. Sri Hernawati, M.Kes

NIP 197007052003122001

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Anggota

drg. Zahara Meilawaty, M.Kes

NIP 198005272008122002

drg. Pudji Astuti, M.Kes

NIP 196810201996012001

Mengesahkan

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi

drg. Hj. Herniyati, M.Kes

NIP 195909061985032001

RINGKASAN

Viabilitas Sel Neutrofil yang Diinkubasi dengan Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta*) dan Dipapar Lipopolisakarida (LPS); Nugraheni Tri Rahayu, 111610101057; 2015: 56 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Inflamasi merupakan suatu respon fisiologis terhadap kerusakan jaringan akibat infeksi, toksin bakteri, maupun adanya antigen yang menstimulasi respon imunologis. Salah satu penyebab terjadinya inflamasi adalah lipopolisakarida (LPS) yaitu endotoksin pada bakteri Gram negatif.

Ketika terjadi invasi bakteri ke dalam tubuh, neutrofil sebagai garis pertahanan tubuh yang pertama akan melakukan kemotaksis ke tempat bakteri berada. Neutrofil akan membunuh bakteri dengan membentuk fagolisosom dan mengeluarkan oksidan seperti hidrogen peroksida, nitrogen monoksida, dan radikal oksigen. Apabila oksidan yang dikeluarkan neutrofil berlebihan, dan fagolisosom gagal membunuh bakteri, maka proses ini akan menyebabkan neutrofil lisis dan fungsi selnya rusak, sehingga viabilitas sel neutrofil tidak dapat dipertahankan.

Tanaman obat sebagai terapi alternatif mempunyai efek samping yang lebih kecil dibandingkan obat kimia. Contoh tanaman obat yang dapat digunakan untuk mengatasi peradangan adalah daun singkong. Daun singkong memiliki kandungan flavonoid, saponin, *tannin*, dan vitamin C. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa flavonoid, *tannin*, dan vitamin C berfungsi sebagai antioksidan yang dapat meningkatkan viabilitas sel neutrofil karena dapat menurunkan tingkat reaksi oksidasi ketika terjadi proses inflamasi, sedangkan saponin yang berinteraksi dengan bakteri akan meningkatkan permeabilitas membran sel bakteri sehingga bakteri lisis.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui viabilitas sel neutrofil yang diinkubasi dengan ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta*) dan dipapar lipopolisakarida (LPS).

Jenis penelitian adalah eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian adalah *the post-test only control group design*. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium *Bio Science* Rumah Sakit Gigi dan Mulut Universitas Jember. Sampel yang digunakan adalah isolat neutrofil yang dibagi menjadi empat kelompok perlakuan yaitu, kelompok I adalah isolat neutrofil tanpa inkubasi ekstrak daun singkong dan paparan LPS (kontrol negatif), kelompok II adalah isolat neutrofil dengan paparan LPS (kontrol positif), kelompok III adalah isolat neutrofil yang diinkubasi ekstrak daun singkong 12,5% dan dipapar LPS (P1), dan kelompok IV adalah isolat neutrofil yang diinkubasi ekstrak daun singkong 25% dan dipapar LPS (P2).

Hasil penelitian menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antar semua kelompok penelitian, kecuali pada kelompok kontrol negatif dan kelompok P1.

Kesimpulan hasil penelitian ini, ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta*) dapat meningkatkan viabilitas sel neutrofil yang dipapar LPS dan viabilitas sel neutrofil pada kelompok dengan inkubasi ekstrak daun singkong 25% lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok inkubasi ekstrak daun singkong 12,5%.

PRAKATA

Puji syukur atas kehadiran Allah SWT, atas berkat limpahan rahmat dan hidayahNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “Viabilitas Sel Neutrofil yang Diinkubasi dengan Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta*) dan Dipapar Lipopolisakarida (LPS)”. Tak lupa shalawat dan salam selalu tercurahkan kepada junjungan kita Nabi Muhammad SAW yang telah menjadi tauladan bagi umatnya. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat penyelesaian pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran Gigi.

Penulis menyadari bahwa dalam menyelesaikan karya tulis ini tidak lepas dari bimbingan dan bantuan berbagai pihak. Untuk itu pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Orang tua, Haryadi (alm), Titik Sri Adiyani dan Sulama atas semangat, motivasi, nasehat, doa yang selalu menyertai, limpahan cinta dan kasih sayang serta dukungan moril yang tiada batas;
2. drg. Zahara Meilawaty, M.Kes selaku Dosen Pembimbing Utama dan drg. Pudji Astuti, M.Kes selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang telah bersedia memberikan bimbingan, pengarahan, tenaga dan waktu dengan penuh kesabaran dalam penulisan skripsi ini;
3. drg. Depi Praharani, M.Kes selaku Dosen Penguji Utama dan DR. drg. Sri Hernawati, M.Kes selaku Dosen Penguji Anggota, atas kritik dan saran untuk kesempurnaan skripsi ini;
4. drg. Herniyati, M.Kes selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, drg. Rahardyan Parnaadji, M.Kes, Sp.Pros selaku Pembantu Dekan 1 Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember dan drg. Abdul Rochim, M.Kes, MMR selaku Dosen Pembimbing Akademik;
5. Seluruh dosen FKG UNEJ atas bimbingan dan pengarahan selama menempuh pendidikan di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;

6. Analis Laboratorium *Bio Science* RSGM UNEJ, Mas Erwan dan Mbak Aziza yang telah membantu selama penelitian;
7. Kakak-kakak yang saya sayangi, Indrati dan Herlina atas semangat, motivasi, doa dan nasehatnya agar saya selalu menjadi lebih baik;
8. Kakek Suyoto dan Nenek Mutmainah (almh) tercinta dan seluruh keluarga besar yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu atas semangat, motivasi, nasihat, dan doa;
9. Aprilianto Tegar Suminar, atas segala bentuk kasih sayang, semangat, motivasi, dan doanya selama ini;
10. Teman-teman pejuang di Laboratorium *Bio Science* RSGM UNEJ, Tari dan Dinda yang telah saling memotivasi;
11. Sahabat-sahabat Ria Anugrah, Harish, Danang, Lita, Fitria Krisna, Adin, Tiara yang telah memberikan inspirasi, semangat, nasehat, doa, dan perhatian;
12. Teman-teman seperjuangan FKG 2011 untuk semua bantuan, kerjasama, kebersamaan, canda tawa dan suka duka selama menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
13. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini masih jauh dari sempurna, maka dari itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun dari semua pihak agar skripsi ini dapat lebih baik dan bermanfaat.

Jember, 30 April 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Tanaman Singkong	5
2.1.1 Klasifikasi	5
2.1.2 Morfologi	5
2.1.3 Habitat	6
2.1.4 Manfaat dan Kandungan	7
2.2 Lipopolisakarida (LPS)	9
2.3 Neutrofil	11
2.3.1 Morfologi	11

2.3.2 Membran Sel	13
2.3.3 Fungsi	14
2.4 Viabilitas	15
2.5 Manfaat Ekstrak Daun Singkong terhadap Viabilitas Sel	15
2.6 Kerangka Konsep	17
2.7 Hipotesis	17
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN	18
3.1 Jenis Penelitian	18
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	18
3.3 Variabel Penelitian	18
3.3.1 Variabel Bebas	18
3.3.2 Variabel Terikat	18
3.3.3 Variabel Terkendali	18
3.4 Sampel Penelitian	19
3.4.1 Kriteria Sampel	19
3.4.2 Jumlah Sampel	19
3.4.3 Penggolongan Sampel	20
3.5 Definisi Operasional	20
3.5.1 Neutrofil	20
3.5.2 Viabilitas Sel Neutrofil	20
3.5.3 Ekstrak Daun Singkong	21
3.5.4 Lipopolisakarida (LPS)	21
3.6 Alat dan Bahan Penelitian	21
3.6.1 Alat Penelitian	21
3.6.2 Bahan Penelitian	21
3.7 Prosedur Penelitian	22
3.7.1 Kriteria Daun Singkong	22
3.7.2 Sterilisasi Alat	22
3.7.3 Prosedur Pembuatan Ekstrak Daun Singkong	22

3.7.4 Pengambilan Sampel Darah	24
3.7.5 Pembuatan Larutan Lipopolisakarida (LPS)	24
3.7.6 Prosedur Isolasi Neutrofil	24
3.7.7 Prosedur Uji Viabilitas	26
3.8 Analisis Data	27
3.9 Alur Penelitian	28
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	29
4.1 Hasil	29
4.2 Analisis Data	32
4.3 Pembahasan	34
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	39
5.1 Kesimpulan	39
5.2 Saran	39
DAFTAR PUSTAKA	40
LAMPIRAN	44

DAFTAR TABEL

	Halaman
4.1 Hasil Perhitungan Rata-rata dan Standar Deviasi Viabilitas Neutrofil	31
4.2 Analisis Statistik Viabilitas Neutrofil pada Kelompok Perlakuan dan Kelompok Kontrol dengan <i>One-Way ANOVA</i>	33
4.3 Hasil Uji LSD Rata-rata Viabilitas Neutrofil yang Dipapar LPS dan Diinkubasi Ekstrak Daun Singkong	33

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Tanaman Singkong	6
2.2 Komponen Dinding Sel Bakteri Gram Negatif	9
2.3 Neutrofil (perbesaran 100x)	12
2.4 Neutrofil <i>Drumstick</i> pada Wanita (perbesaran 100x)	13
2.5 Struktur Membran Sel Neutrofil	14
2.6 Kerangka Konsep Penelitian	17
3.1 Alur Penelitian	28
4.1 Preparat LPS dan Neutrofil (perbesaran 400x)	29
4.2 Preparat Hapus Isolasi Neutrofil (pewarnaan giemsa perbesaran 400x)	30
4.3 Gambaran Mikroskopis Neutrofil yang Hidup dan Mati.....	30
4.4 Diagram Batang Rata-rata Viabilitas Neutrofil yang Diinkubasi Ekstrak Daun Singkong dan Dipapar Lipopolisakarida (LPS)	32

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Surat Keterangan Identifikasi Tanaman Singkong	44
B. Surat Hasil Pengujian Ekstrak Daun Singkong	45
C. <i>Informed Consent</i>	46
D. Data Hasil Penelitian Rata-rata Viabilitas Neutrofil	47
E. Hasil Analisis Data Statistik	49
F. Foto Hasil Penelitian Viabilitas Neutrofil	51
G. Alat dan Bahan Penelitian	53

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Inflamasi merupakan suatu respon fisiologis terhadap kerusakan jaringan akibat infeksi, toksin (produk bakteri yang merusak sel atau jaringan *host*), atau adanya antigen yang menstimulasi respon imunologis (Brooker, 2008). Proses inflamasi dapat terjadi akibat pengaruh dari endotoksin bakteri Gram negatif, yaitu lipopolisakarida (LPS) yang berfungsi untuk integritas struktur bakteri dan melindungi bakteri dari sistem pertahanan imun *host* (Meilawaty, 2013).

Di dalam rongga mulut sering terjadi kelainan berupa timbulnya peradangan terutama pada jaringan pendukung gigi yang disebut dengan periodontitis. Periodontitis sebagian besar berhubungan dengan bakteri Gram negatif yang menyebabkan kerusakan progresif pada ligamen periodontal dan tulang alveolar disertai dengan peningkatan kedalaman poket, resesi, maupun keduanya (Newman *et al.*, 2012). Bakteri Gram negatif yang berperan dalam periodontitis antara lain *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter rectus*, dan *Porphyromonas gingivalis* (Felicia, 2014). Bakteri ini dapat menghasilkan sejumlah faktor virulensi, termasuk fimbriae, kapsul, enzim protease, dan LPS.

LPS banyak menimbulkan efek biologis yang dapat menginduksi penyakit periradikuler, dikarenakan memiliki antigen non spesifik yang tidak dapat dinetralkan dengan sempurna oleh antibodi. Ketika LPS dilepas dari dinding sel, LPS disebut endotoksin yang mampu berdifusi melintasi dentin (Walton, 2008). LPS merusak jaringan secara tidak langsung dengan cara menstimulasi sel radang dan sel *host* lainnya untuk menghasilkan mediator inflamasi, seperti sitokin pro-inflamasi yang akan menginduksi prostaglandin E₂, interleukin-1beta (IL-1 β), serta tumor nekrosis faktor-alpha (TNF- α). Mediator inflamasi tersebut apabila dikeluarkan dalam jumlah berlebihan akan menyebabkan kerusakan jaringan (Felicia, 2014).

Pada saat terjadi invasi bakteri, neutrofil adalah garis pertahanan pertama tubuh yang akan melakukan kemotaksis ke tempat bakteri berada. Neutrofil dapat menggunakan dua cara dalam membunuh bakteri, yaitu menggunakan mekanisme non oksidatif dan oksidatif. Mekanisme non oksidatif adalah mekanisme neutrofil dalam membunuh bakteri tanpa membutuhkan oksigen, yang akan membentuk fagolisosom untuk membunuh bakteri. Mekanisme oksidatif merupakan mekanisme neutrofil dalam membunuh bakteri dengan membutuhkan oksigen, neutrofil akan distimulasi untuk mengeluarkan oksidan seperti hidrogen peroksida, nitrogen monoksida, dan radikal oksigen (Newman *et al.*, 2012). Apabila oksidan yang dikeluarkan berlebihan dan mekanisme non oksidatif gagal, neutrofil akan lisis dan fungsi sel neutrofil akan rusak. Hal ini dapat menyebabkan viabilitas sel neutrofil tidak dapat dipertahankan, sehingga perlu dilakukan upaya untuk mempertahankan viabilitas sel neutrofil.

Dewasa ini penggunaan tanaman sebagai obat herbal semakin banyak di masyarakat. Menurut WHO, 80% penduduk Afrika dan 40% penduduk China telah memanfaatkan obat tradisional untuk mengatasi masalah kesehatan. Asia dan Amerika Latin juga telah menggunakan obat tradisional secara meluas akibat dari sejarah dan kepercayaan turun-temurun (WHO, 2003). WHO juga merekomendasikan penggunaan obat tradisional untuk pemeliharaan kesehatan masyarakat, pencegahan dan pengobatan penyakit, terutama untuk penyakit kronis, penyakit degeneratif, dan kanker. Penggunaan obat tradisional lebih menguntungkan dibandingkan dengan obat modern, karena obat tradisional memiliki beberapa kelebihan, antara lain: efek sampingnya relatif rendah jika digunakan dengan tepat, pemakaian disesuaikan dengan indikasi, cara penggunaan mengikuti petunjuk yang telah ditetapkan (Wijayakusuma, 2008).

Salah satu tanaman yang ada di sekitar kita dan dapat dimanfaatkan sebagai obat adalah singkong (*Manihot esculenta*). Tanaman ini berasal dari Brazil dan termasuk famili *Euphorbiaceae* dengan genus *Manihot*. Salah satu bagian dari tanaman singkong yang bermanfaat adalah daunnya, daun singkong mengandung

vitamin A dan C, zat besi, serta kalsium yang dosisnya rata-rata lebih tinggi dibandingkan dengan sayuran daun lainnya. Di dalam daun singkong juga ditemukan adanya senyawa flavonoid, saponin dan *tannin* (Kardinan dan Kusuma, 2004). Flavonoid adalah senyawa antioksidan yang lebih kuat dibandingkan vitamin E yang berfungsi sebagai antiinflamasi, saponin merupakan senyawa berbentuk glikosida yang berfungsi sebagai imunostimulator, dan *tannin* adalah antioksidan kuat berjenis polifenol dari kelompok flavonoid yang mencegah atau menetralkan efek radikal bebas yang merusak, antiperadangan dan antikanker (*anticarcinogenic*) (Yuliarti, 2009).

Daun singkong berkhasiat sebagai antioksidan, meningkatkan daya tahan tubuh terhadap serangan penyakit, dan mencegah penyakit tulang. Selain itu, juga berkhasiat sebagai antikanker, mencegah konstipasi dan anemia (Adi, 2008). Beberapa penelitian yang telah dilakukan, menyebutkan bahwa kandungan flavonoid, saponin, dan *tannin* sebagai antioksidan mampu meningkatkan viabilitas sel neutrofil karena dapat menurunkan tingkat reaksi oksidasi ketika terjadi proses inflamasi (Pendyala dkk., 2008).

Berdasarkan khasiat dan kandungan bahan-bahan yang terdapat pada daun singkong, peneliti ingin mengetahui potensi ekstrak daun singkong terhadap viabilitas sel neutrofil yang dipapar LPS dengan konsentrasi ekstrak 12,5% dan 25%. Penentuan konsentrasi berdasarkan penelitian bahwa ekstrak daun singkong konsentrasi 12,5% dan 25% dapat memodulasi sel monosit yang diinduksi LPS (Meilawaty, 2013) dan berdasarkan hasil *trial*, pada konsentrasi 50%, viabilitas sel neutrofil yang dipapar LPS menunjukkan rata-rata yang lebih rendah dibandingkan kontrol positif maupun konsentrasi 12,5% dan 25%, oleh karena itu dalam penelitian ini konsentrasi yang digunakan adalah 12,5% dan 25%.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas, maka permasalahan yang dapat dirumuskan antara lain sebagai berikut:

1. Apakah ekstrak daun singkong dapat meningkatkan viabilitas sel neutrofil yang dipapar LPS?
2. Bagaimana perbedaan viabilitas sel neutrofil yang dipapar LPS dan diinkubasi dengan ekstrak daun singkong konsentrasi 12,5%, 25%, dan yang hanya dipapar LPS saja?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian yang dilakukan adalah:

1. Mengetahui efek ekstrak daun singkong dalam meningkatkan viabilitas sel neutrofil yang dipapar LPS.
2. Mengetahui perbedaan viabilitas sel neutrofil yang dipapar LPS dan diinkubasi dengan ekstrak daun singkong konsentrasi 12,5%, 25%, dan yang hanya dipapar LPS saja.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang dapat diambil dari penelitian ini adalah:

1. Memberikan informasi ilmiah tentang pemanfaatan daun singkong sebagai alternatif tanaman obat antiinflamasi yang dapat dimanfaatkan secara luas.
2. Sebagai acuan untuk penelitian lebih lanjut mengenai pemanfaatan daun singkong di bidang kesehatan, khususnya di bidang kedokteran gigi.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Singkong

2.1.1 Klasifikasi

Taksonomi tanaman singkong diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Subkingdom	: <i>Tracheobionta</i>
Super Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Divisi	: <i>Magnoliophyta</i>
Kelas	: <i>Magnoliopsida</i>
Sub Kelas	: <i>Rosidae</i>
Ordo	: <i>Euphorbiales</i>
Famili	: <i>Euphorbiaceae</i>
Genus	: <i>Manihot</i>
Spesies	: <i>Manihot esculenta Crantz</i> (Plantamor, 2012).

2.1.2 Morfologi

Bagian tubuh tanaman singkong terdiri dari batang, daun, bunga, dan umbi. Batang tanaman singkong berkayu, beruas-ruas dengan ketinggian bisa mencapai lebih dari 3 meter. Warna batang bervariasi, ketika masih muda umumnya berwarna hijau dan setelah tua maka bisa berubah menjadi keputih-putihan, kelabu, atau hijau kelabu. Batang berlubang, berisi empulur berwarna putih, lunak, dengan struktur seperti gabus (Suprapti, 2005).

Daun singkong memiliki tangkai panjang dan helaian daunnya menjari. Setiap tangkai mempunyai daun sekitar 5 - 9 helai, dengan tangkai berwarna kuning, hijau atau merah (Gambar 2.1). Daun singkong biasanya mengandung racun sianida atau asam biru terutama daun yang masih muda (pucuk) (Rukmana, 2002).

Bunga tanaman singkong berumah satu dengan penyerbukan silang sehingga jarang berbuah. Umbinya merupakan akar yang menggelembung dan berfungsi sebagai tempat penampung cadangan makanan. Bentuk umbi biasanya bulat memanjang, terdiri atas: kulit luar tipis (ari), berwarna kecoklat-coklatan (kering); kulit dalam agak tebal berwarna keputih-putihan (basah); dan daging berwarna putih atau kuning (tergantung varietasnya) yang mengandung sianida dengan kadar yang berbeda (Suprpti, 2005).



Gambar 2.1 Tanaman Singkong

Sumber: <http://tumbuhansekitarkita.wordpress.com/>

2.1.3 Habitat

Singkong merupakan tanaman perdu yang berasal dari Amerika Selatan dan tersebar pada lembah sungai Amazon. Penyebarannya hampir ke seluruh dunia antara lain India, Afrika, Madagaskar, dan China. Di Indonesia daerah yang memiliki penyebaran paling banyak dari tanaman singkong berada di Jawa, Lampung, dan Nusa Tenggara Timur. Umumnya tanaman singkong dapat tumbuh subur di daerah yang berketinggian 1200 meter di atas permukaan laut, dengan ketinggian tanaman bisa mencapai 3 meter atau lebih (Rukmana, 2002).

Tanaman singkong dapat tumbuh dengan baik pada daerah dengan iklim dan keadaan tanah memenuhi syarat untuk pertumbuhan tanaman singkong. Syarat tersebut yaitu memiliki curah hujan antara 1.500-2.500 mm/ tahun, suhu udara

minimal 10 °C dan kelembaban udara optimal antara 60-65%. Sinar matahari dibutuhkan sekitar 10 jam/ hari terutama untuk kesuburan daun dan perkembangan umbinya. Keadaan tanah yang sesuai adalah tanah yang berstruktur remah, gembur, tidak terlalu liat, tidak terlalu poros dan kaya akan bahan organik dengan derajat keasaman (pH) tanah berkisar antara 4,8-8,0 dengan pH ideal 5,8 (Hidayah, 2011).

2.1.4 Manfaat dan Kandungan

Singkong merupakan sumber karbohidrat bagi sekitar 300 juta orang yang bermukim di daerah beriklim tropis. Selain sebagai sumber makanan (selain umbi, daun singkong biasa digunakan sebagai lalapan), singkong juga bermanfaat sebagai sumber tepung bagi perusahaan tekstil, fermentasi alkohol, serta bahan baku untuk *nonalcoholic-fermented food*, misalnya tempe. Sedangkan batang tanaman singkong bermanfaat sebagai alternatif obat penyembuhan pada luka infeksi. Di Indonesia, singkong memiliki peran penting sebagai makanan pokok ke-3 setelah padi dan jagung. Singkong juga dapat digunakan sebagai makanan ternak, peran singkong menjadi semakin besar berkaitan dengan daya gunanya di bidang industri, baik industri kecil, menengah, maupun industri besar, tidak terbatas pada industri di dalam negeri, tetapi juga di negara lain sebagai komoditas ekspor andalan (Suprapti, 2005).

Menurut pakar tanaman obat, Hembing Wijayakusuma, efek farmakologis dari tanaman singkong adalah sebagai antioksidan, antikanker, antitumor, dan menambah nafsu makan. Bagian yang umum dipakai dari tanaman ini adalah umbi dan daunnya. Selain sebagai makanan, daun singkong ini juga memiliki khasiat sebagai obat, diantaranya obat rematik, sakit kepala, demam, luka, cacingan, disentri, rabun senja, beri-beri, dan bisa digunakan untuk meningkatkan stamina (Elshabrina, 2013). Daun singkong yang mengandung vitamin C dan kalsium yang tinggi sangat baik untuk meningkatkan kesuburan dan memenuhi kebutuhan gizi ibu hamil. Selain itu daun singkong juga termasuk salah satu sayuran hijau yang dapat melancarkan ASI. Daun singkong yang dikonsumsi secara rutin juga dapat mencegah penimbunan lemak di

dinding pembuluh darah yang bisa berdampak pada serangan jantung (Elshabrina, 2013).

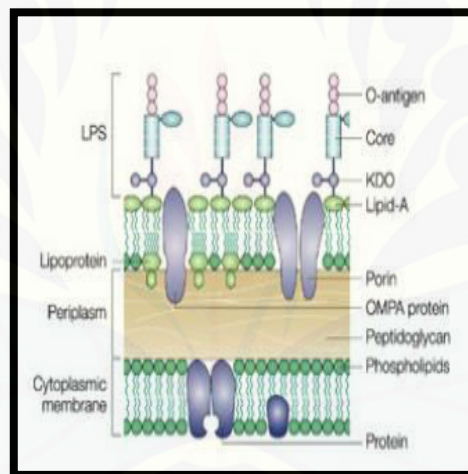
Singkong menyediakan energi sebesar 160 kKalori dengan jumlah karbohidrat 38,06 gram, protein 1,36 gram, lemak 0,28 gram, serat 1,8 gram, folat 27 mg, vitamin C 20,6 mg, dan vitamin K 1,9 mg dalam 100 gram singkong mentah. Sedangkan pada daun singkong mengandung berbagai macam zat yang dibutuhkan oleh tubuh, diantaranya adalah vitamin A dan C serta kalsium dengan dosis yang cukup tinggi (Adi, 2008). Dalam 100 gram daun singkong mengandung 73 kKalori, 6,8 gram protein, 1,2 gram lemak, 13,0 gram karbohidrat, 165 mg kalsium, 54 mg fosfor, 2,0 gram zat besi, 11.000 SI vitamin A, 0,12 mg vitamin B1, 275.000 mg vitamin C, dan 77,2 gram air (Rukmana, 2002).

Daun singkong mengandung mineral, asam amino essensial, dan protein. Protein yang terdapat dalam daun singkong mengandung asam metionin sehingga baik untuk memenuhi kebutuhan protein dalam tubuh. Di dalam tubuh, protein nabati dari daun singkong berfungsi sebagai unsur pembangun sel dan komponen enzim yang penting. Kandungan asam amino di dalam daun singkong sangat diperlukan oleh tubuh baik untuk mengubah karbohidrat menjadi energi, membantu pemulihan kulit dan tulang, meningkatkan daya ingat, mood, kinerja otak dan metabolisme asam amino lain. Klorofil yang terdapat dalam daun singkong juga memiliki daya antioksidan dan antikanker yang sangat bermanfaat untuk tubuh. Kandungan serat pada daun singkong cukup tinggi sehingga dapat membantu melancarkan buang air besar (Elshabrina, 2013).

Selain itu daun singkong mengandung *tannin* yang dapat digunakan sebagai anti cacing (*anthelmintic*) karena dapat meningkatkan daya tahan saluran pencernaan terhadap organisme parasit. Daun singkong juga mengandung senyawa glukosida sianogenik yang tersebar hampir di semua jaringan tanaman yang terdiri dari linamarin dan lotaustralin. Linamarin jika terhidrolisis akan membentuk asam sianida (HCN) yang bersifat mudah larut dan menguap (Askurrahman, 2010).

2.2 Lipopolisakarida (LPS)

Lipopolisakarida merupakan suatu ikatan molekul kompleks antara senyawa lipid dan polisakarida. Menurut Todar (2012), dinding sel bakteri Gram negatif terdiri dari: lipopolisakarida (LPS), *outer membrane protein* (OMP A), *pore protein* (PP), *lipoprotein* (LP), *nutrient binding protein* (BP), *periplasmic space* (PPS), *peptidoglycan* (PG), *carrier protein* (CP), dan *cytoplasmic membrane* (CM) (Gambar 2.2). LPS banyak ditemukan pada membran sel luar semua bakteri Gram negatif, berupa gabungan antara lipid A dan inti polisakarida, terikat pada rantai sisi polisakarida O yang terdiri dari berbagai unit gula berulang yang berbeda untuk setiap organisme Gram negatif spesifik (Isselbacher dkk., 2000).



Gambar 2.2 Komponen Dinding Sel Bakteri Gram Negatif.

Sumber: <http://textbookofbacteriology.net/structure.html>

Lay dan Hastowo (dalam Friskawati, 2001) menyatakan fungsi dari LPS adalah sebagai berikut:

1. Sebagai penahan pertama; jika terdapat bahan yang akan masuk ke dalam sel maka bahan tersebut harus melalui lapisan ini. Lapisan luar ini permeabel bagi molekul yang kecil namun tidak permeabel terhadap enzim atau molekul besar lainnya. Ini menunjukkan bahwa LPS akan menahan enzim yang terletak di luar lapisan peptidoglikan sehingga tidak akan meninggalkan sel. Enzim tersebut terletak dalam ruang periplasma.

2. Dalam ruangan periplasma terdapat protein pengikat yang bukan merupakan enzim tetapi mempunyai sifat mengikat ke suatu zat tertentu. Protein pengikat ini kemudian membawa zat tersebut ke molekul pembawa yang terikat pada membran (*membrane bound carrier*). Protein pengikat tidak ditemukan pada bakteri Gram positif, bakteri ini juga tidak memiliki LPS dan ruang periplasma.
3. Sebagai penahan yang bersifat impermeabel terhadap enzim yang berperan dalam pertumbuhan dinding sel. Selain itu, membran luar juga berfungsi dalam mencegah kerusakan sel terhadap enzim dan bahan kimia yang dapat merusak sel. Lisozim mampu merusak bakteri Gram positif, namun tidak pada bakteri Gram negatif karena lapisan membran luar mencegah terjadinya kerusakan akibat enzim tidak dapat menembus membran.
4. LPS bersifat toksin dan disebut endotoksin oleh karena merupakan bagian dari sel dan hanya dilepaskan sewaktu lisis.

Peran LPS pada membran luar bakteri adalah sebagai penghalang lewatnya zat-zat dengan berat molekul rendah dan molekul hidrofilik, menghambat kerusakan berbagai sel bakteri oleh komponen serum dan sel fagosit, berperan sebagai adhesin yang digunakan dalam kolonisasi sel *host*, dan peran terakhir adalah variasi dalam struktur LPS menyediakan keberadaan strain antigenik yang berbeda dari patogen yang mungkin dapat memotong respon imunologi sebelumnya untuk strain terkait. Toksisitas LPS terkait dengan komponen lipid (Lipid A) dan imunogenesitas dikaitkan dengan komponen polisakarida. LPS memunculkan berbagai respon inflamasi pada *host* dan mengaktifkan komplemen melalui jalur alternatif. Namun jika dibandingkan dengan eksotoksin bakteri, maka endotoksin kurang kuat dan kurang spesifik dalam tindakannya, karena tidak bekerja secara enzimatik (Todar, 2012).

Pada manusia, LPS akan mengikat protein yang mengikat lipid (LBP) dalam serum yang mentransfer ke CD14 pada membran sel, kemudian mentransfer ke protein lain yaitu MD2, dan bergabung dengan *Toll-like receptor-4* (TLR4). Hal ini akan memicu sinyal untuk makrofag atau sel endotel untuk memproduksi sitokin pro-

inflamasi dan *nitric oxide* yang menyebabkan terjadinya karakteristik *shock endotoxic*. Di dalam sel monosit dan makrofag, ada tiga jenis peristiwa yang dipicu selama interaksi mereka dengan LPS, yaitu:

1. Produksi sitokin, termasuk IL-1, IL-6, IL-8, *tumor necrosis factor* (TNF) dan *platelet-activating factor*. Hal ini akan merangsang produksi prostaglandin dan leukotrin yang merupakan mediator kuat peradangan dan syok septik yang menyertai endotoksin toksemia.
2. Aktivasi kaskade komplemen. C3A dan C5A menyebabkan pelepasan histamin (menyebabkan vasodilatasi) dan mempengaruhi kemotaksis neutrofil dan akumulasi. Hasilnya adalah terjadi peradangan.
3. Aktivasi kaskade koagulasi. Aktivasi awal Hageman faktor (pembekuan darah faktor XII) dapat mengaktifkan beberapa sistem humoral sehingga:
 - a. Terjadi koagulasi intravaskuler dan trombosis secara meluas yang mengakibatkan habisnya trombosit dan berbagai faktor pembekuan darah sehingga terjadilah perdarahan internal.
 - b. Aktivasi jalur komplemen alternatif (menyebabkan peradangan).
 - c. Aktivasi plasmin yang menyebabkan terjadinya fibrinolisis dan perdarahan.
 - d. Aktivasi kinin bradikinin dan peptida vasoaktif lainnya yang menyebabkan hipotensi (Todar, 2012).

LPS juga mampu menstimulasi sel makrofag untuk mensintesis IL1- β . IL1- β mampu menyebabkan destruksi jaringan dengan meningkatkan produksi matriks metalloproteinase yang akan menstimulasi terbentuknya osteoklas serta meningkatkan terjadinya resorpsi tulang (Meilawaty, 2013).

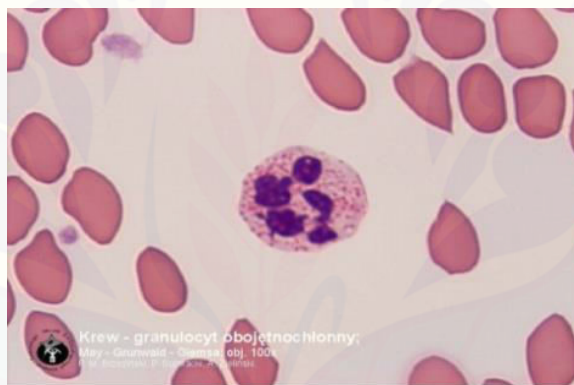
2.3 Neutrofil

2.3.1 Morfologi

Neutrofil merupakan sel yang paling banyak di antara sel leukosit lainnya, yaitu sekitar 60 sampai 70%, yang dibuat di dalam sumsum tulang dan bersifat fagositosis.

Neutrofil sering disebut sebagai sel polimorfonuklear (*polymorphonuclear*, PMN) atau neutrofil tersegmentasi karena karakteristiknya yang tersegmentasi dari inti sel berlobus ganda. Granula neutrofil berwarna merah muda dalam sitoplasmanya. Diameternya $7\mu\text{m}$ dalam darah, dan mencapai $9\mu\text{m}$ sampai $12\mu\text{m}$ dalam hapusan darah kering (Sloane, 2003).

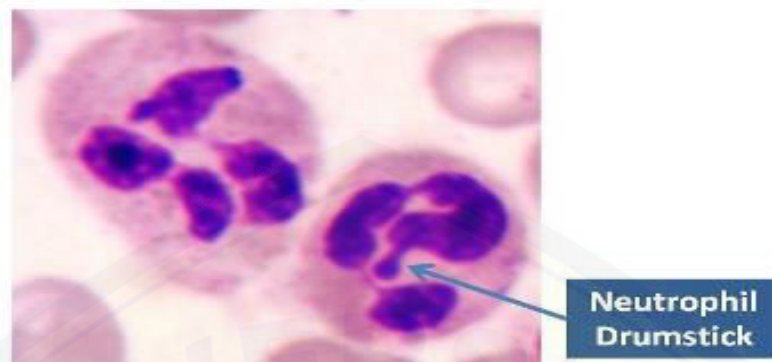
Neutrofil memiliki jumlah nukleus yang khas, biasanya terdiri dari dua lobus atau lebih yang saling berhubungan melalui benang tipis. Jumlah lobus nukleus ini tergantung (antara lain) dari usianya. Sel muda nukleusnya berbentuk lonjong atau memanjang yang biasa disebut sel batang. Sedangkan neutrofil yang sudah tua memiliki lima atau lebih lobus nukleus (Gambar 2.3).



Gambar 2.3 Neutrofil (perbesar 100x)

Sumber: <http://www.umed.pl/>

Kromatin nukleus berupa gumpalan padat yang berada di tepian dan biasanya tidak dijumpai anak nukleus. Pada neutrofil wanita, kromatin yang mewakili kromosom-X padat dapat membentuk lobus tambahan kecil yang biasa disebut *drumstick* (Gambar 2.4), sehingga dapat ditetapkan seks genetik seseorang dengan mengamati adanya tambahan lobus pada nukleus sejumlah besar neutrofil. Pada sediaan hapusan darah sitoplasma neutrofil terlihat bertitik-titik oleh granul spesifik sangat halus yang berafinitas rendah terhadap pewarnaan. Sedangkan pada mikrograf elektron, granul neutrofil terlihat tersebar luas pada sitoplasma, tetapi cenderung tidak terdapat pada zona ektoplasma tipis yang kaya filamen aktin yang berguna untuk gerak ameboid sel-sel ini (Fawcett, 2002).



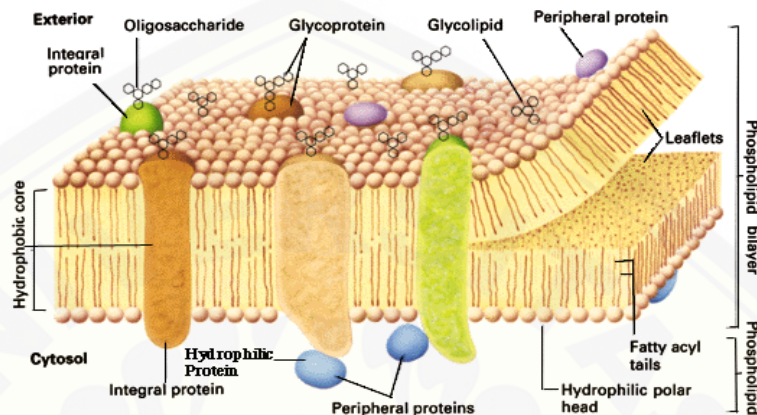
Gambar 2.4 Neutrofil *Drumstick* pada Wanita (perbesaran 100X)
Sumber: <http://allaboutblood.com/>

2.3.2 Membran Sel

Semua sel dibatasi oleh membran sel. Membran ini tidak tampak pada sediaan tipis yang dilihat dengan mikroskop cahaya, namun dengan mikroskop elektron tampak sebagai garis tipis padat dengan ketebalan 8,5 sampai 10 nm mengelilingi tepi sel. Membran sel terdiri atas lapisan biomolekuler ganda (*bilayer*) fosfolipid (Gambar 2.5) yang mengambang dan di dalamnya mengandung molekul-molekul protein yang berpecah dan dapat bergerak bebas. Membran sel mempunyai sifat permeabel selektif sehingga memungkinkan difusi ion dan gas dalam larutan masuk dan keluar sel, tetapi mencegah masuknya kebanyakan molekul yang lebih besar secara pasif (Fawcett, 2002).

Membran sel berfungsi sebagai pelindung sel karena dapat menjadi pembatas antara isi sel dengan bagian luar sel, sebagai pengatur kehidupan sel dengan cara melakukan pertukaran zat dari dan ke dalam sel, serta sebagai reseptor adanya rangsangan dari luar sel. Membran sel neutrofil merupakan suatu lapisan yang terdiri dari beberapa saluran membran, protein perekat yang berfungsi sebagai reseptor untuk berbagai ligan (molekul yang mengikat protein spesifik) pompa ion, dan ektoenzim (enzim yang terletak di permukaan luar sel). Selain itu, membran sel neutrofil juga memiliki reseptor untuk faktor kemotaktik yang berfungsi untuk

melakukan pergerakan ke tempat terjadinya infeksi oleh mikroorganisme (Sacher, 2004).



Gambar 2.5 Struktur Membran Sel Neutrofil
Sumber: <http://praptoedi.wordpress.com/>

2.3.3 Fungsi

Fungsi utama neutrofil adalah pertahanan tubuh berupa migrasi ke berbagai tempat infeksi dan peradangan, pengenalan dan pengolahan antigen asing, fagositosis dan pemusnahan, serta melakukan pencernaan terhadap debris jaringan dan mikroorganisme (Sacher, 2004). Neutrofil sangat fagositik dan sangat aktif. Sel ini sampai di jaringan yang terinfeksi untuk menyerang dan menghancurkan bakteri, virus, atau agen penyebab cedera lainnya (Sloane, 2003). Ketika terjadi infeksi oleh mikroorganisme, jumlah neutrofil akan meningkat dan selanjutnya sel neutrofil akan bergerak menerobos dinding pembuluh darah dan menyerang bakteri (memakannya). Kemampuan neutrofil bergerak menuju tempat infeksi atau peradangan juga diatur oleh rangsangan atraksi yang disebut faktor kemotaktik, yang dibebaskan oleh bakteri atau jaringan yang rusak. Membran sel neutrofil mempunyai reseptor untuk faktor-faktor ini yang akan memicu perubahan metabolik di dalam neutrofil (Sacher, 2004).

Neutrofil menggunakan tiga strategi utama untuk melawan dan membunuh mikroba patogen yaitu fagositosis, degranulasi, dan pembentukan *Neutrophil Extracellular Trap* (NET). Pada proses fagositosis, neutrofil menelan mikroba ke

dalam ruang fagosolitik atau disebut fagosom yang dibatasi oleh membran sel, kemudian lisosom dan fagosom menyatu membentuk fagolisosom yang nantinya proses ini menyebabkan terjadinya penghancuran terhadap bakteri. Sedangkan pada proses degranulasi, neutrofil melepaskan granula *protease* untuk menghancurkan bakteri, namun menyebabkan kerusakan pada sel pejamu (Yunanto dkk., 2012).

2.4 Viabilitas

Viabilitas merupakan kemampuan suatu sel untuk tumbuh dan mempertahankan hidupnya. Sel yang hidup memiliki membran sel yang utuh sehingga akan terlihat berbentuk bulat, jernih dan berwarna lebih terang apabila dilakukan pengamatan dengan menggunakan mikroskop. Sedangkan sel yang telah mati akan berwarna gelap dan bentuknya menyusut (tidak bulat lagi) karena isi sel yang berupa sitoplasma telah keluar (lisis) (Yuwono, 2011).

Penentuan viabilitas sel neutrofil didasarkan pada integritas membran sel. Karena sel yang telah mati umumnya terjadi perubahan permeabilitas membran sel atau kerusakan integritas membran sel sehingga membran selnya bisa ditembus oleh pewarnaan tertentu seperti *trypan blue*. Sedangkan sel yang memiliki kemampuan hidup tidak akan menyerap warna karena memiliki membran sel yang impermeabel terhadap *trypan blue*. Sel yang hidup akan berwarna jernih dan sel yang mati akan berwarna kebiruan karena menyerap warna (Dewi, 2007).

2.5 Manfaat Ekstrak Daun Singkong terhadap Viabilitas Sel

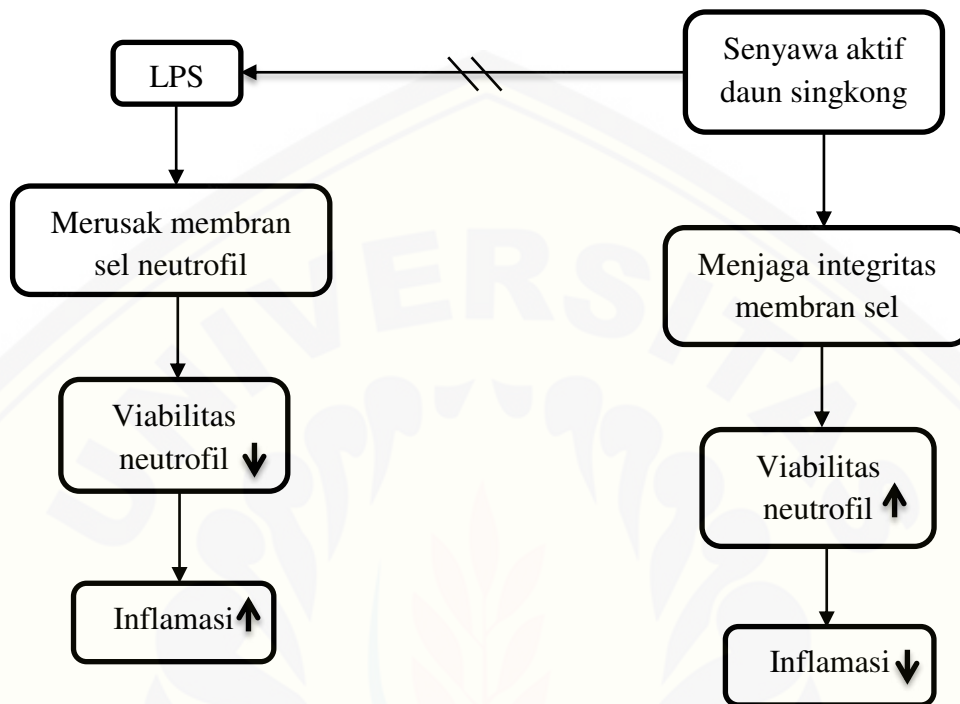
Berdasarkan penelitian yang dilakukan Yuslinda dkk. (2012), diketahui bahwa ekstrak daun singkong memiliki aktivitas antioksidan tertinggi dibandingkan dengan sayuran hijau lainnya disebabkan karena kemampuannya menangkap radikal bebas dan oksigen aktif. Penelitian lain yang dilakukan oleh Anggritasari (2011) yang menguji kualitatif antioksidan ekstrak daun singkong menyebutkan bahwa kandungan kimia flavonoid dalam daun singkong sangat tinggi dan membuktikan bahwa daun

singkong dapat digunakan sebagai antioksidan atau penangkal radikal bebas. Dalam berbagai penelitian tersebut telah dijelaskan bahwa daun singkong memiliki khasiat antioksidan. Kandungan yang diduga berperan dalam menunjang viabilitas sel neutrofil adalah flavonoid, saponin, dan *tannin*.

Flavonoid merupakan kelompok senyawa fenol yang mampu mengikat protein sehingga dapat mengganggu proses metabolisme bakteri, selain itu juga akan melindungi membran lipid terhadap reaksi yang merusak. Saponin merupakan zat yang dapat meningkatkan permeabilitas membran sehingga akan terjadi hemolisis sel apabila saponin berinteraksi dengan sel bakteri, saponin juga memiliki efek anti bakterial dan pertahanan terhadap aktivitas mikroba patogen. Sedangkan *tannin* mampu mencegah atau menetralkan efek radikal bebas yang merusak (Harimukti, 2013).

Vitamin C yang terdapat dalam ekstrak daun singkong diduga juga berpengaruh dalam meningkatkan viabilitas sel neutrofil. Hal ini dikarenakan adanya daya antioksidan, yang membuat vitamin C mampu bereaksi dengan radikal bebas dan membuat radikal bebas non aktif (Yuslinda dkk., 2012).

2.6 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 2.6 Kerangka konsep.

Keterangan:

- > : menyebabkan/ mempengaruhi
- //> : menghambat

2.7 Hipotesis

Berdasarkan tinjauan pustaka di atas, maka dapat dirumuskan hipotesis bahwa: ekstrak daun singkong dapat meningkatkan viabilitas sel neutrofil yang dipapar LPS dan viabilitas pada ekstrak konsentrasi 25% lebih tinggi dibandingkan konsentrasi 12,5%.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental *in vitro*. Penelitian *in vitro* dilakukan di laboratorium. Pada penelitian eksperimental, peneliti melakukan perlakuan terhadap sel neutrofil berupa paparan lipopolisakarida (LPS) dan inkubasi dengan ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta*). Rancangan penelitian yang dilakukan adalah *the post-test only control group design* yaitu pengambilan data penelitian hanya setelah diberikan perlakuan dan data dibandingkan dengan kelompok kontrol yang tidak diberikan perlakuan (Notoatmodjo, 2005).

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium *Bioscience* Rumah Sakit Gigi dan Mulut Universitas Jember dan Laboratorium Taksonomi UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi pada bulan Oktober – November tahun 2014.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta*) konsentrasi 12,5% dan 25%.

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah viabilitas sel neutrofil.

3.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah kriteria sampel, prosedur pengambilan sampel, teknik pengamatan sampel, metode ekstraksi daun singkong, konsentrasi lipopolisakarida (LPS), dan teknik pemeriksaan neutrofil.

3.4 Sampel Penelitian

3.4.1 Kriteria Sampel

Sampel penelitian adalah isolat neutrofil yang diambil dari darah vena perifer orang dewasa sehat laki-laki yang tidak mempunyai riwayat kelainan darah (berdasarkan hasil anamnesa) dan tidak merokok serta telah menandatangani persetujuan untuk menjadi subjek penelitian (*informed consent*) (Delita, 2012).

3.4.2 Jumlah Sampel

Jumlah sampel yang digunakan untuk tiap kelompok dalam penelitian ini dihitung dengan menggunakan rumus dari Daniel (2005), sebagai berikut:

$$n = \frac{z^2 \sigma^2}{d^2}$$

Keterangan:

n = besar sampel tiap kelompok

σ = standar deviasi sampel

d = kesalahan yang masih dapat ditolerir, diasumsikan $\sigma = d$

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

Perhitungannya adalah sebagai berikut:

$$\begin{aligned} n &= \frac{z^2 \sigma^2}{d^2} \\ &= \frac{(1,96)^2 \sigma^2}{d^2} \\ &= (1,96)^2 \\ &= 3,84 \\ &= 4 \end{aligned}$$

Dari hasil perhitungan yang telah didapatkan, diperoleh jumlah sampel minimal yang digunakan dalam penelitian ini adalah 4 sampel untuk tiap kelompok. Penelitian ini menggunakan 20 sampel yang terbagi dalam 4 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 5 sampel.

3.4.3 Penggolongan sampel

Sampel penelitian digolongkan dalam 4 kelompok, yaitu:

- a. Kelompok I (isolat neutrofil tanpa paparan LPS dan inkubasi ekstrak daun singkong sebagai kelompok kontrol negatif)
- b. Kelompok II (isolat neutrofil dipapar LPS sebagai kontrol positif)
- c. Kelompok III (isolat neutrofil dipapar LPS dan diinkubasi ekstrak daun singkong konsentrasi 12,5% sebagai perlakuan 1)
- d. Kelompok IV (isolat neutrofil dipapar LPS dan diinkubasi ekstrak daun singkong konsentrasi 25% sebagai perlakuan 2)

3.5 Definisi Operasional

3.5.1 Neutrofil

Neutrofil adalah salah satu jenis sel darah putih yang terbanyak, berbentuk bulat dengan sitoplasma bergranul warna merah muda. Nukleusnya terdiri dari dua lobus atau lebih yang saling berhubungan melalui benang tipis. Kromatin nukleus berupa gumpalan padat yang berada di tepian dan biasanya tidak dijumpai anak nukleus.

3.5.2 Viabilitas Sel Neutrofil

Viabilitas sel neutrofil adalah kemampuan sel neutrofil untuk bertahan hidup. Viabilitas sel neutrofil dapat dilihat dengan menggunakan mikroskop, sel yang viabel akan terlihat berwarna bening dan jernih karena tidak menyerap warna *trypan blue*, sedangkan sel yang tidak viabel (mati) akan terlihat berbentuk tidak bulat lagi dan berwarna lebih gelap karena menyerap warna *trypan blue* (Dewi, 2007).

3.5.3 Ekstrak Daun Singkong

Ekstrak daun singkong merupakan daun singkong yang diekstrak dengan metode maserasi menggunakan etanol 95%, lalu diencerkan menggunakan akuades steril sesuai dengan konsentrasi yang diujikan, yaitu 12,5% dan 25%.

3.5.4 Lipopolisakarida (LPS)

Lipopolisakarida (LPS) atau endotoksin adalah suatu komponen membran luar dari bakteri Gram negatif yang berfungsi untuk integritas struktur sel bakteri dan melindungi bakteri dari sistem pertahanan imun *host* (Meilawaty, 2013). LPS yang digunakan berasal dari bakteri *Eschericia coli* yang didapat dari CV Kristalindo Biolab Surabaya dengan merk Sigma.

3.6 Alat dan Bahan Penelitian

3.6.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: timbangan digital (Boeco, Jerman), oven, *blender* (Philip, China), pengayak, maserator, kertas saring (Whatman), *rotavapour* (Heidolph, Jerman), *disposable syringe* 10ml (Terumo, Philippine), *tourniquet* (One Med), tabung falcon 15ml (Thermo Scientific), tabung heparin, *centrifuge* (Eppendorf Centrifuge 5810 R, Jerman), pipet mikro (Human, Jerman), vortex (Labinco L46, China), *micro plate 12 well* (Costar), *cover glass*, *object glass* (Citoplus, China), *incubator shaker* (Labtech, USA), rak tabung, *blue/yellow tip* (Serena), gelas ukur, mikroskop *inverted* (Olympus 1x51, Jerman), *handscoon* (Everglove, USA), masker (Evo Plusmed), dan *laminar flow cabinet* (Dwyer, USA).

3.6.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: LPS bakteri *Eschericia coli* (Sigma), darah vena perifer, daun singkong, *histopague* 1119 (Sigma), *ficoll hypaque gradient* (MP Biomedicals, USA), *Giemsa stain* (Lab. Bio Analitika, Indonesia),

trypan blue (Gibco, USA), *medium complete/ M199* (Gibco, USA), *etanol 95%*, alkohol (One Med), *fungizone amphotencin B/* antijamur (Gibco, USA), *penicillin-streptomycin solution stabilized/* antibakteri (Gibco, USA), methanol absolut, minyak emersi, akuades steril (Otsuka), heparin (BD Franklinlakes NJ, USA), *Rosewell Park Memorial Institute/ RPMI* (Gibco, USA) dan *Hank's Balanced Salt Solution/ HBSS* (Gibco, USA).

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Kriteria Daun Singkong

Daun singkong yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari daerah Danau Toba, Kecamatan Summersari, Jember. Kriteria yang dipakai adalah daun yang masih muda, yaitu yang berwarna hijau, utuh dan berada di bagian tengah pohon. Pengambilan daun yang masih muda bertujuan untuk mendapatkan kandungan zat-zat kimia secara maksimal, dan pada bagian tengah pohon bertujuan untuk menghindari kandungan sianida yang berlebihan pada daun yang terlalu muda (Miladiyah *et al.*, 2011). Selanjutnya dilakukan identifikasi di UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi, Pasuruan (*Purwodadi Botanic Garden*).

3.7.2 Sterilisasi Alat

Semua peralatan yang akan digunakan dicuci bersih kemudian disterilkan di dalam oven dengan suhu 121 °C selama 15 menit untuk peralatan yang terbuat dari bahan kaca dan logam seperti tabung falcon, gelas ukur dan lain-lain. Sedangkan untuk alat yang terbuat dari bahan yang tidak tahan panas dilakukan sterilisasi dengan menggunakan alkohol agar terbebas dari invasi bakteri.

3.7.3 Prosedur Pembuatan Ekstrak Daun Singkong Konsentrasi 12,5% dan 25%

Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode maserasi. Daun singkong yang telah dibersihkan kemudian dipotong kecil-kecil dan selanjutnya diangin-anginkan. Setelah itu daun singkong tersebut dikeringkan dalam oven pada suhu 45 - 50 °C

selama ± 3 hari dan dihaluskan dengan menggunakan *blender* sampai menjadi serbuk, kemudian dilakukan pengayakan hingga menghasilkan serbuk halus dengan total sebanyak 300 gram serbuk daun.

Serbuk halus daun singkong dimaserasi menggunakan pelarut etanol 95% dengan perbandingan serbuk : pelarut = 1 : 10 selama 2 hari sambil diaduk setiap 6 jam sekali, kemudian didiamkan sampai 18 jam untuk selanjutnya dilakukan penyaringan. Selanjutnya, larutan tersebut dipekatkan dengan *rotavapour* (*rotary evaporator*) dengan suhu 50 °C dan putaran 90 rpm sehingga menjadi ekstrak daun singkong dengan konsentrasi 100%. Ekstrak daun singkong dapat disimpan dalam kulkas dan siap digunakan setelah dilakukan pengenceran dengan akuades steril sesuai dengan konsentrasi yang akan digunakan pada penelitian, yaitu 12,5% dan 25%.

Untuk mendapatkan konsentrasi yang diinginkan, maka pengenceran dilakukan dengan menggunakan rumus berikut:

$$N1 \times V1 = N2 \times V2$$

Keterangan:

N1 : Kadar konsentrasi awal

N2 : Kadar konsentrasi akhir

V1 : Volume awal

V2 : Volume akhir

Cara pengenceran:

Untuk memperoleh ekstrak daun singkong 12,5% sebanyak 2 ml:

$$100 \% \times V1 = 12,5 \% \times 2$$

$$V1 = \frac{12,5 \% \times 2}{100 \%}$$

$$V1 = \frac{25}{100}$$

$$V1 = 0,25 \text{ ml}$$

Jadi ekstrak daun singkong 100% harus diencerkan dengan menambahkan akuades sebanyak 1,75 ml ke dalam 0,25 ml ekstrak daun singkong 100%.

Untuk memperoleh ekstrak daun singkong 25% sebanyak 2 ml:

$$100 \% \times V_1 = 25 \% \times 2$$

$$V_1 = \frac{25 \% \times 2}{100 \%}$$

$$V_1 = \frac{50}{100}$$

$$V_1 = 0,5 \text{ ml}$$

Jadi ekstrak daun singkong 100% harus diencerkan dengan menambahkan akuades sebanyak 1,5 ml ke dalam 0,5 ml ekstrak daun singkong 100%.

3.7.4 Pengambilan Sampel Darah

Pengambilan sampel darah sebanyak 6 ml dari darah vena perifer subjek yang sehat (vena mediana cubiti) setelah orang tersebut menandatangani *informed consent*. Pengambilan darah dengan menggunakan *disposable syringe* secara intravena, kemudian darah tersebut dibagi ke dalam dua tabung yang telah diberi heparin sebagai antikoagulan.

3.7.5 Prosedur Pembuatan Larutan Lipopolisakarida (LPS)

Larutan lipopolisakarida dibuat dengan cara mencampurkan bubuk LPS dan akuades steril sebagai pelarut dengan perbandingan serbuk : pelarut = 1 : 1. Pada penelitian ini, bubuk LPS yang digunakan sebanyak 4 gram dengan pelarut sebanyak 4 ml. Bubuk LPS dilarutkan dalam tabung reaksi yang berisi aquades, kemudian tabung digoyang-goyangkan dan didiamkan selama 30 detik.

3.7.6 Prosedur Isolasi Neutrofil

Isolasi neutrofil dilakukan dengan menggunakan metode *ficoll hypaque centrifugation* (Azzahra *et al.*, 2014). Sebanyak 6 ml darah diambil dari vena perifer subyek, lalu di bagi ke dalam 2 tabung dengan jumlah masing-masing 3 ml,

kemudian dimasukkan ke dalam tabung heparin dan digoyang-goyangkan agar tidak menggumpal. *Histopague* 3 ml disiapkan, dimasukkan pada tabung falcon dan ditambahkan 3 ml *ficoll* diatas *histopague* dengan cara dilapiskan secara hati-hati pada dinding falcon dengan sudut 45°, kemudian lapiskan darah sebanyak 3 ml pada tabung falcon secara perlahan. Setelah itu, lakukan sentrifugasi dengan kecepatan 1900 rpm selama 30 menit pada suhu 18-26°C, hasilnya akan terbentuk 6 lapisan berturut-turut dari atas ke bawah, yaitu: plasma, monosit, *ficoll*, neutrofil, *histopague*, dan eritrosit. Neutrofil dipindahkan ke dalam tabung falcon lainnya, kemudian ditambahkan HBSS, dengan perbandingan neutrofil : HBSS = 1 : 1 dan disentrifugasi lagi dengan kecepatan 1700 rpm selama 10 menit pada suhu 18-26°C hingga terbentuk endapan pada dasar tabung falcon. Supernatan (lapisan yang berada di bagian atas) diaspirasi dan ditambahkan HBSS sebanyak 2000 µl, kemudian dilakukan *pipetting* sampai homogen secara hati-hati. Lakukan sentrifugasi kedua dengan kecepatan 1700 rpm selama 10 menit pada suhu 18-26°C, setelah itu sedikit suspensi neutrofil diambil dan diamati populasi sel dibawah mikroskop *inverted* dengan perbesaran 400X.

Suspensi neutrofil dilapiskan ke dalam *micro plate* (12 well) yang dasarnya telah diberi *cover slip*, tiap *well* 100 µl, selain itu juga menyiapkan satu buah *plate* yang diberi neutrofil 50 µl untuk pengecatan Giemsa. Kemudian suspensi neutrofil diinkubasi selama 15 menit dengan suhu 37°C, ditambahkan antijamur *fungizone amphotencin B* sebanyak 5 µl dan antibakteri *penicillin-streptomycin solution stabilized* sebanyak 20 µl agar terhindar dari kontaminasi mikroorganisme, kemudian *pipetting*. Ditambahkan juga *medium complete* (M199 dan RPMI) 1000 µl setiap *well* lalu diinkubasi lagi selama 30 menit dengan suhu 37°C, dan isolat neutrofil siap untuk uji lebih lanjut. Selanjutnya dilakukan pengecatan Giemsa untuk melihat isolat neutrofil dengan prosedur sebagai berikut: menyiapkan *object glass* yang dasarnya telah diberi *cover slip* dan mengambil 50 µl neutrofil untuk pengecatan Giemsa. Kemudian 50 µl suspensi neutrofil dilapiskan pada *object glass*, diinkubasi selama 15 menit, kemudian ditambahkan 500 µl HBSS secara perlahan-lahan dari tepi *object*

glass dan diinkubasi selama 30 menit dalam *incubator shaker* pada suhu 37°C. Selanjutnya diresuspensi dengan HBSS, kemudian difiksasi dengan methanol absolut dan dilakukan pengecatan Giemsa, dibiarkan selama 10 menit. Setelah itu Giemsa dibuang, kemudian dicuci dengan akuades, dibiarkan mengering, dan dilakukan pengamatan di bawah mikroskop.

3.7.7 Prosedur Uji Viabilitas Neutrofil

Prosedur uji viabilitas neutrofil dilakukan dengan cara menyiapkan *cover slip* yang diletakkan pada *micro plate 12 well* sesuai jumlah sampel dan menambahkan masing-masing 100 µl sel neutrofil pada tiap *well*, kemudian diinkubasi selama 15 menit dengan suhu 37°C. Setelah itu ditambahkan perlakuan sesuai kelompok. Kelompok II yaitu kelompok kontrol positif yang dipapar LPS, kelompok III ditambahkan dengan ekstrak daun singkong 12,5% sebanyak 100 µl pada masing-masing sampel, sedangkan kelompok IV ditambahkan dengan ekstrak daun singkong konsentrasi 25% sebanyak 100 µl pada masing-masing sampel. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama ± 15 menit dan diresuspensi dengan 50 µl HBSS. Selanjutnya dilakukan pemaparan dengan LPS sebanyak 5 µl per *well*, diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C. Satu-persatu *well* kemudian diberi *trypan blue* 50 µl diratakan memenuhi *cover slip*. Segera setelah itu, dilakukan pemotretan (di bawah mikroskop *inverted*) proses pemotretan harus dilakukan dalam waktu 3-5 menit, apabila melebihi waktu tersebut sel akan mati dan mengurangi jumlah sel yang hidup. Sel neutrofil yang berwarna putih bening atau tidak menyerap pewarnaan *trypan blue* dihitung sebagai sel neutrofil yang hidup.

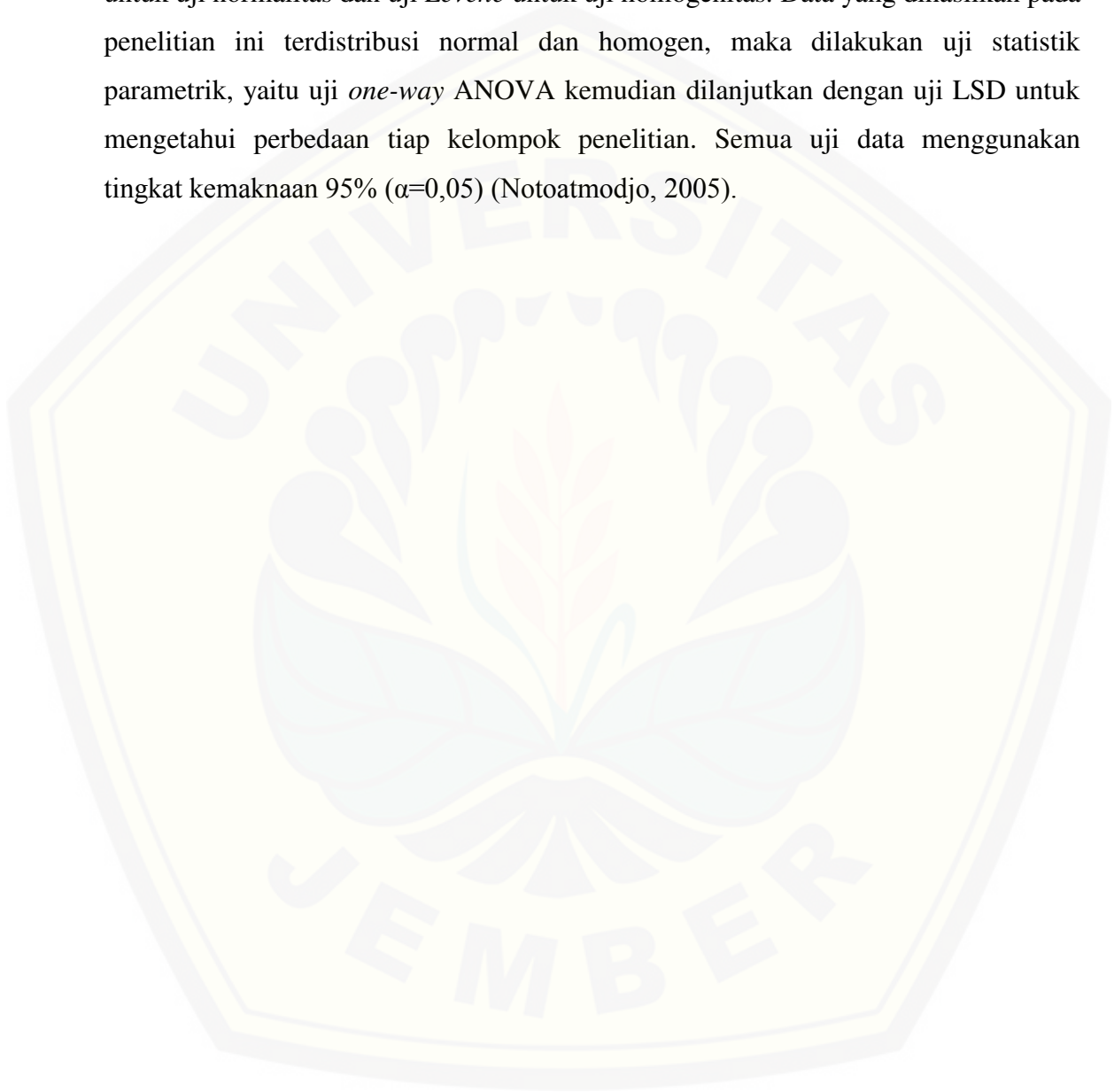
3.7.8 Penghitungan Viabilitas Neutrofil

Penghitungan viabilitas dilakukan dengan menggunakan mikroskop *inverted* pada 4 lapang pandang dengan perbesaran 400 kali pada setiap sampel. Persentase viabilitas neutrofil diperoleh dengan menggunakan rumus:

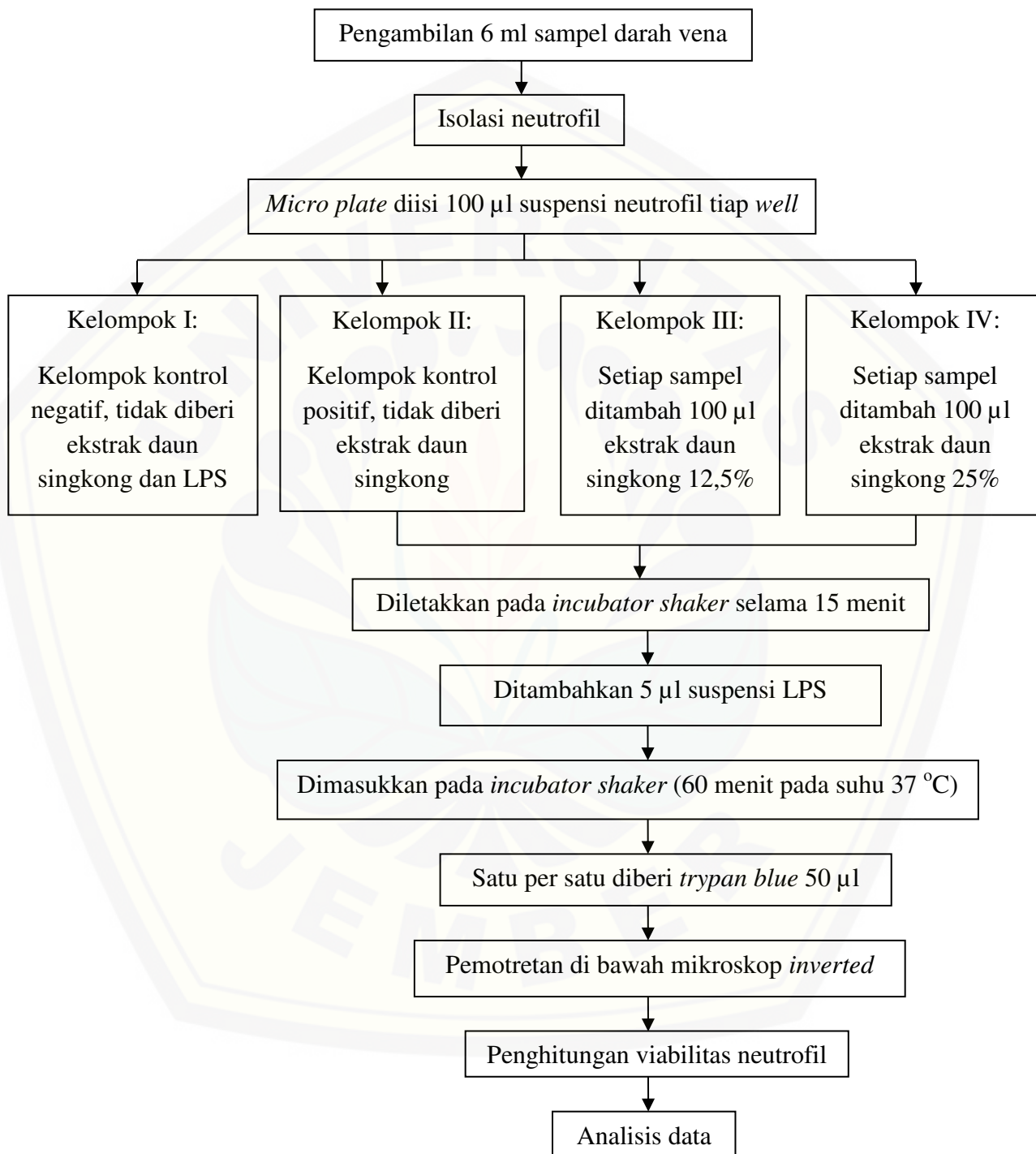
$$\text{Viabilitas sel (\%)} = \frac{\text{Jumlah sel neutrofil yang viabel}}{\text{Jumlah sel neutrofil seluruhnya}} \times 100 \text{ (Felicia, 2014).}$$

3.8 Analisis Data

Data yang didapatkan dianalisis dengan menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* untuk uji normalitas dan uji *Levene* untuk uji homogenitas. Data yang dihasilkan pada penelitian ini terdistribusi normal dan homogen, maka dilakukan uji statistik parametrik, yaitu uji *one-way ANOVA* kemudian dilanjutkan dengan uji LSD untuk mengetahui perbedaan tiap kelompok penelitian. Semua uji data menggunakan tingkat kemaknaan 95% ($\alpha=0,05$) (Notoatmodjo, 2005).



3.9 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur Penelitian