



**VIABILITAS NEUTROFIL YANG DIPAPAR *Porphyromonas gingivalis*  
SETELAH DIINKUBASI EKSTRAK ETANOL DAUN SAMBILOTO  
(*Andrographis paniculata* Nees.)**

SKRIPSI

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

Oleh:

Dewi Martinda Hartono

NIM 111610101073

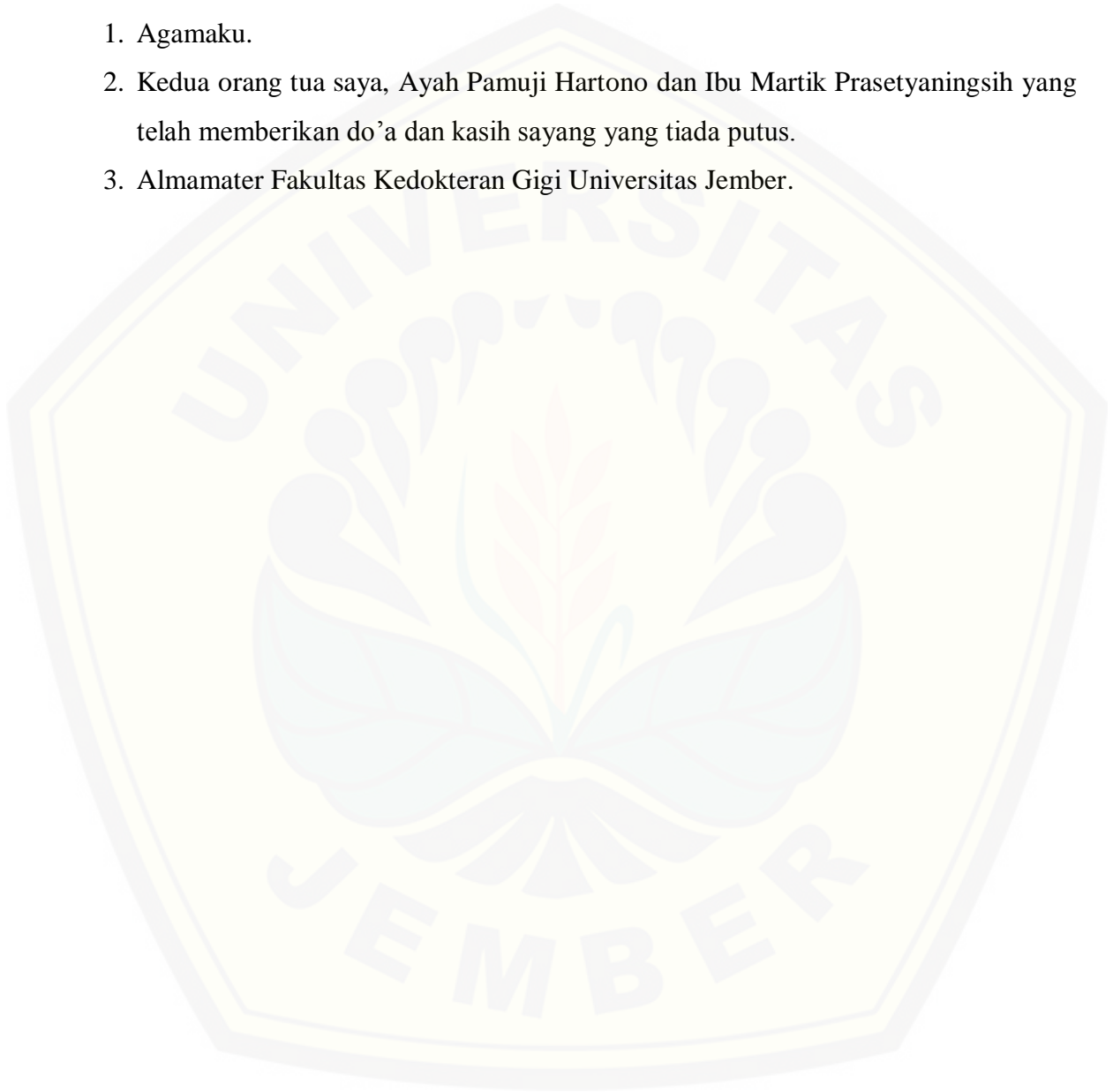
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER

2016

**PERSEMBAHAN**

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Agamaku.
2. Kedua orang tua saya, Ayah Pamuji Hartono dan Ibu Martik Prasetyaningsih yang telah memberikan do'a dan kasih sayang yang tiada putus.
3. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.



**MOTTO**

...Sesungguhnya Allah tidak mengubah keadaan suatu kaum sebelum mereka  
mengubah keadaan diri mereka sendiri...

(terjemah Surah *Ar-Ra'd* ayat 11)\*)

Maka sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan, sesungguhnya bersama  
kesulitan ada kemudahan.

(terjemah Surah *Al-Insyirah* ayat 5-6)\*)

---

\*) Departemen Agama Republik Indonesia. 2013. *Al-Qur'an dan Terjemahnya  
Disertai Tema Penjelasan Kandungan Ayat*. Edisi Tahun 2002. Jakarta Timur: CV  
Darus Sunah.

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dewi Martinda Hartono

NIM : 111610101073

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Viabilitas Neutrofil yang Dipapar *Porphyromonas gingivalis* setelah Diinkubasi Ekstrak Etanol Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees)” 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.

Dengan 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 2016

Yang menyatakan,

Dewi Martinda Hartono

NIM 111610101073

SKRIPSI

**VIABILITAS NEUTROFIL YANG DIPAPAR *Porphyromonas gingivalis*  
SETELAH DIINKUBASI EKSTRAK ETANOL DAUN SAMBILOTO  
(*Andrographis paniculata* Nees.)**

Oleh:

**Dewi Martinda Hartono**

**NIM 111610101073**

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : drg. Yenny Yustisia, M.Biotech.

Dosen Pembimbing Pendamping : Dr. drg. Didin Erma Indahyani, M.Kes

**PENGESAHAN**

Skripsi yang berjudul Viabilitas Neutrofil yang Dipapar *Porphyromonas gingivalis* setelah Diinkubasi Ekstrak Etanol Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Kamis, 17 November 2016

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Penguji Ketua,

Penguji Anggota,

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

drg. Rendra Chriestedy P., MD.Sc

NIP. 197104092005012002

NIP. 198305312008011003

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,

drg. Yenny Yustisia, M.Biotech

Dr. drg. Didin Erma Indahyani, M.Kes

NIP. 197903252005012001

NIP. 196903031997022001

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi

Universitas Jember

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

NIP. 196901121996011001

## RINGKASAN

**Viabilitas Neutrofil yang Dipapar *Porphyromonas gingivalis* setelah Diinkubasi Ekstrak Etanol Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees);** Dewi Martinda Hartono, 111610101073, 2016; 70 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Periodontitis merupakan inflamasi kronis yang disebabkan adanya infeksi bakteri pada jaringan periodontal yang terdapat dalam plak gigi. *Porphyromonas gingivalis* merupakan bakteri anaerob gram negatif pada rongga mulut yang terlibat dalam patogenesis periodontitis. Neutrofil merupakan jenis sel utama dalam poket gingiva dan membentuk garis pertahanan pertama terhadap bakteri patogen periodontal dengan meningkatkan reaksi oksidasi untuk membunuh bakteri. Namun, pembentukan reaksi oksidasi yang terlalu berlebihan dapat menyebabkan neutrofil mati. Maka dari itu, viabilitas neutrofil sangat penting untuk ditingkatkan agar tidak terjadi rusaknya membran sel atau lisis. Ekstrak etanol daun sambiloto diduga dapat meningkatkan viabilitas neutrofil karena mempunyai kandungan andrographolid dan flavonoid sebagai antioksidan. Tujuan penelitian ini adalah menganalisis ekstrak etanol daun sambiloto dalam meningkatkan viabilitas neutrofil yang dipapar bakteri *P. gingivalis* secara in vitro.

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental laboratoris in vitro dengan rancangan penelitian *post-test only control grup design*. Penelitian ini bertempat di Laboratorium *Bioscience* Rumah Sakit Gigi dan Mulut Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember dan dilaksanakan pada bulan Mei 2016. Sampel berjumlah 20 yang terbagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok kontrol, kelompok dengan ekstrak etanol daun sambiloto konsentrasi 100%, 75%, 50%, dan 25%. Kelompok kontrol berupa neutrofil yang dipapar bakteri *P. gingivalis*, kelompok perlakuan I, perlakuan II, perlakuan III dan perlakuan IV yaitu kelompok perlakuan dimana neutrofil diinkubasi ekstrak etanol daun sambiloto kemudian dipapar bakteri

*P. gingivalis*. Viabilitas neutrofil diamati dibawah mikroskop *inverted* dengan pewarnaan *trypan blue*.

Hasil rata-rata viabilitas neutrofil yang dipapar *P. gingivalis* pada kelompok kontrol memiliki rata-rata viabilitas sebesar 66,25, perlakuan I dengan ekstrak etanol daun sambiloto 25% sebesar 86, perlakuan II dengan ekstrak etanol daun sambiloto 50% sebesar 96,5, perlakuan III dengan ekstrak etanol daun sambiloto 75% dan perlakuan IV dengan ekstrak etanol daun sambiloto 100% tidak dapat dihitung karena ekstrak yang terlalu pekat. Hasil uji LSD menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ), yaitu antara kelompok kontrol (neutrofil + *P. gingivalis*), kelompok perlakuan I (neutrofil + ekstrak etanol daun sambiloto 25% + *P. gingivalis*), dan kelompok perlakuan II (neutrofil + ekstrak etanol daun sambiloto 50% + *P. gingivalis*). Hasil ini menunjukkan bahwa kelompok kontrol memiliki viabilitas neutrofil lebih rendah daripada kelompok ekstrak etanol daun sambiloto 25% (I) dan kelompok ekstrak etanol daun sambiloto 50% (II). Kelompok ekstrak etanol daun sambiloto 25% (I) memiliki viabilitas neutrofil yang lebih tinggi daripada dengan kelompok kontrol dan lebih rendah daripada kelompok ekstrak etanol daun sambiloto 50% (II). Kelompok ekstrak etanol daun sambiloto 50% (II) memiliki viabilitas neutrofil lebih tinggi daripada kelompok kontrol dan kelompok ekstrak etanol daun sambiloto 25% (I). Sehingga ekstrak etanol daun sambiloto konsentrasi 25% dan 50% efektif dalam meningkatkan viabilitas neutrofil yang dipapar *P. gingivalis*. Sedangkan pada kelompok perlakuan dengan ekstrak etanol daun sambiloto konsentrasi 75% dan 100% tidak dapat diamati karena ekstrak terlalu pekat.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat ditarik kesimpulan bahwa ekstrak etanol daun sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) konsentrasi 25% dan 50% dapat meningkatkan viabilitas neutrofil yang dipapar *P. gingivalis* secara *in vitro*.



## PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Viabilitas Neutrofil yang Dipapar *Porphyromonas gingivalis* setelah Diinkubasi Ekstrak Etanol Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees)”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

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

1. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M. Kes., Sp. Pros. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
2. DR. drg. I. D. A. Susilawati, M. Kes. selaku Pembantu Dekan I Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
3. DR. drg. Sri Hernawati, M. Kes., selaku Pembantu Dekan II Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
4. drg. Izzata Barid, M. Kes., selaku Pembantu Dekan III Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
5. drg. Yenny Yustisia, M. Biotech selaku Dosen Pembimbing Utama dan Dr. drg. Didin Erma Indahyani, M. Kes selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang telah meluangkan waktu, pikiran dan perhatian dalam penyusunan skripsi ini.
6. drg. Melok Aris Wahyukundari, M. Kes., Sp. Perio selaku Dosen Penguji Utama dan drg. Rendra Chriestedy Prasetya, MD.Sc selaku Dosen Penguji Anggota yang telah memberikan banyak masukan demi kesempurnaan skripsi ini.
7. drg. Desi Sandra Sari, MD.Sc dan drg. Kiswaluyo, M. Kes., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing penulis selama kuliah.
8. Kedua orangtuaku tercinta Ayah Pamuji Hartono dan Ibu Martik Prasetyaningih yang telah memberikan dorongan, semangat serta do'a yang tak henti-hentinya. Terimakasih tak terhingga atas semua yang telah diberikan hingga saat ini.

9. Adikku tersayang Mega Putri Samudra dan Mahendra Hayu Alfiyansah, S.Pd yang telah memberikan dukungan, semangat, do'a, dan kasih sayang
10. Teman seperjuangan penelitian, Sheila Dian Pradipta yang telah membantu saya selama penelitian dan saling memotivasi.
11. Sahabat-sahabatku tercinta, Tiara Fortuna, Adinda Martina, Asri Dinar, Berty Intan, Hayyu Rizky, Lulu Rosima yang selalu memotivasi dan memberi dukungan sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
12. Teman-teman *Kost* Anggrek, Chusna Sekar, Ni Putu Ina, Rifqi Afdila yang memberi dukungan sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
13. Mbak Zizah dan Mas Erwan selaku staff Laboratorium *Bioscience* yang telah membantu saya selama penelitian sehingga penelitian dapat berjalan dengan lancar.
14. Semua teman-teman angkatan 2011 Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Terimakasih atas kebersamaannya. Semoga kita semua bisa meraih cita-cita dan menjadi kebanggaan almamater.
15. Semua pihak yang terlibat baik secara langsung maupun tidak langsung yang telah membantu dalam penyelesaian skripsi ini.

Penulis menyadari masih ada ketidaksempurnaan dalam penyusunan skripsi ini sehingga penulis mengharapkan kritik dan saran demi kesempurnaan penulisan yang selanjutnya. Akhir kata, penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 17 November 2016

Penulis

**DAFTAR ISI**

|   | Halaman |
|---|---------|
| <b>HALAMAN JUDUL</b> .....                                  | i       |
| <b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....                            | ii      |
| <b>HALAMAN MOTTO</b> .....                                  | iii     |
| <b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....                             | iv      |
| <b>HALAMAN PEMBIMBINGAN</b> .....                           | v       |
| <b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....                             | vi      |
| <b>RINGKASAN</b> .....                                      | vii     |
| <b>PRAKATA</b> .....  | ix      |
| <b>DAFTAR ISI</b> .....                                     | xi      |
| <b>DAFTAR TABEL</b> .....                                   | xiv     |
| <b>DAFTAR GAMBAR</b> .....                                  | xv      |
| <b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....                                | xvi     |
| <b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....                             | 1       |
| <b>1.1 Latar Belakang</b> .....                             | 1       |
| <b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....                            | 4       |
| <b>1.3 Tujuan Penelitian</b> .....                          | 5       |
| <b>1.4 Manfaat Penelitian</b> .....                         | 5       |
| <b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....                        | 6       |
| <b>2.1 Sambiloto (<i>Andrographis paniculata</i>)</b> ..... | 6       |
| 2.1.1 Nama dan Klasifikasi .....                            | 6       |
| 2.1.2 Morfologi.....  | 7       |
| 2.1.3 Habitat .....   | 8       |
| 2.1.4 Kandungan.....  | 8       |
| 2.1.5 Manfaat Sambiloto.....                                | 10      |
| 2.1.6 Macam Sediaan Herbal.....                             | 11      |
| <b>2.2 <i>Porphyromonas gingivalis</i></b> .....            | 13      |
| 2.2.1 Klasifikasi.....                                      | 13      |

|               |  |           |
|---------------|--|-----------|
| 2.2.2         | Habitat .....                                    | 13        |
| 2.2.3         | Karakteristik.....                               | 14        |
| 2.2.4         | Kultur dan Identifikasi.....                     | 15        |
| 2.2.5         | Patogenitas.....                                 | 16        |
| <b>2.3</b>    | <b>Neutrofil.....</b>                            | <b>17</b> |
| 2.3.1         | Deskripsi Neutrofil .....                        | 17        |
| 2.3.2         | Fungsi Neutrofil.....                            | 19        |
| 2.3.3         | Neutrofil dan Penyakit Periodontal .....         | 22        |
| 2.3.4         | Membran dan Viabilitas Sel Neutrofil.....        | 23        |
| <b>2.4</b>    | <b>Antioksidan.....</b>                          | <b>23</b> |
| <b>2.5</b>    | <b>Antibakteri.....</b>                          | <b>23</b> |
| <b>2.6</b>    | <b>Kerangka Konsep.....</b>                      | <b>25</b> |
| <b>2.7</b>    | <b>Keterangan Kerangka Konsep.....</b>           | <b>26</b> |
| <b>2.8</b>    | <b>Hipotesis.....</b>                            | <b>26</b> |
| <b>BAB 3.</b> | <b>METODOLOGI PENELITIAN.....</b>                | <b>27</b> |
| <b>3.1</b>    | <b>Jenis Penelitian.....</b>                     | <b>27</b> |
| <b>3.2</b>    | <b>Rancangan Penelitian.....</b>                 | <b>27</b> |
| <b>3.3</b>    | <b>Tempat dan Waktu penelitian .....</b>         | <b>27</b> |
| 3.3.1         | Tempat Penelitian .....                          | 27        |
| 3.3.2         | Waktu penelitian.....                            | 27        |
| <b>3.4</b>    | <b>Variabel Penelitian .....</b>                 | <b>28</b> |
| <b>3.5</b>    | <b>Definisi Operasional .....</b>                | <b>28</b> |
| <b>3.6</b>    | <b>Alat dan Bahan.....</b>                       | <b>29</b> |
| <b>3.7</b>    | <b>Sampel Penelitian .....</b>                   | <b>30</b> |
| <b>3.8</b>    | <b>Prosedur Penelitian .....</b>                 | <b>31</b> |
| 3.8.1         | Mensterilkan Alat .....                          | 31        |
| 3.8.2         | Prosedur Pembuatan Ekstrak Etanol Sambiloto..... | 31        |
| 3.8.3         | Pengambilan Sampel Darah .....                   | 33        |
| 3.8.4         | Prosedur Isolasi Neutrofil .....                 | 33        |

|                             |   |           |
|-----------------------------|---|-----------|
| 3.8.5                       | Inkubasi Neutrofil dengan Ekstrak Etanol Sambiloto .... | 35        |
| 3.8.6                       | Pemaparan <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....         | 36        |
| 3.8.7                       | Uji Viabilitas Neutrofil .....                          | 36        |
| <b>3.9</b>                  | <b>Prosedur Penanganan Limbah Laboratorium .....</b>    | <b>36</b> |
| <b>3.10</b>                 | <b>Analisa Data.....</b>                                | <b>37</b> |
| <b>3.11</b>                 | <b>Alur Penelitian.....</b>                             | <b>38</b> |
| <b>BAB 4.</b>               | <b>HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>                       | <b>39</b> |
| <b>4.1</b>                  | <b>Hasil Penelitian.....</b>                            | <b>39</b> |
| <b>4.2</b>                  | <b>Analisa Data.....</b>                                | <b>42</b> |
| <b>4.3</b>                  | <b>Pembahasan .....</b>                                 | <b>44</b> |
| <b>BAB 5.</b>               | <b>KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>                       | <b>47</b> |
| <b>5.1</b>                  | <b>Kesimpulan.....</b>                                  | <b>47</b> |
| <b>5.2</b>                  | <b>Saran .....</b>                                      | <b>47</b> |
| <b>DAFTAR PUSTAKA .....</b> |   | <b>48</b> |
| <b>LAMPIRAN.....</b>        |   | <b>52</b> |

**DAFTAR TABEL**

|   | Halaman |
|---|---------|
| 2.1 Manfaat Kandungan Sambiloto.....  | 11      |
| 3.1 Pembagian Kelompok Percobaan.....   | 30      |
| 4.1 Rata-rata dan standar deviasi viabilitas neutrofil pada kelompok kontrol, perlakuan I, dan perlakuan II .....   | 41      |
| 4.2 Hasil uji LSD rata-rata viabilitas neutrofil yang dipapar <i>Porphyromonas gingivalis</i> setelah diinkubasi ekstrak etanol daun sambiloto ( <i>Andrographis paniculata</i> Nees.)..... | 43      |

**DAFTAR GAMBAR**

|   | Halaman |
|---|---------|
| 2.1 <i>Andrographis paniculata</i> .....  | 7       |
| 2.2 Andrografolid.....  | 10      |
| 2.3 Andrografisida.....   | 10      |
| 2.4 <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....   | 15      |
| 2.5 Neutrofil dan eritrosit .....   | 19      |
| 2.6 Kerangka konsep .....   | 25      |
| 4.1 Preparat hapusan bakteri <i>P. gingivalis</i> .....   | 39      |
| 4.2 Preparat hapus isolasi neutrofil .....  | 40      |
| 4.3 Diagram batang rata-rata viabilitas neutrofil yang dipapar<br><i>Porphyromonas gingivalis</i> pada kelompok kontrol, perlakuan I, dan<br>perlakuan II ..... | 42      |

**DAFTAR LAMPIRAN**

|                                    | Halaman |
|------------------------------------|---------|
| A. Data Hasil Penelitian .....     | 52      |
| B. Hasil Analisis Statistik .....  | 53      |
| C. Foto Hasil Penelitian .....     | 56      |
| D. Alat dan Bahan Penelitian ..... | 61      |
| E. Ijin Penelitian .....           | 65      |
| F. Identifikasi Tanaman .....      | 66      |
| G. Keterangan Ekstrak .....        | 67      |
| H. Identifikasi Bakteri .....      | 68      |
| I. <i>Informed Consent</i> .....   | 69      |
| J. <i>Ethical Clearance</i> .....  | 70      |



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Periodontitis merupakan inflamasi kronis yang disebabkan adanya infeksi bakteri pada jaringan periodontal yang terdapat dalam plak gigi, menyebabkan hancurnya jaringan tulang pendukung dan jaringan ikat (Rose *et al*, 2000). Penyakit ini diawali dengan serangan bakteri, selanjutnya sel inflamasi seperti sel polimorfonuklear (PMN) akan distimulasi untuk melepaskan radikal bebas dalam menghancurkan bakteri tersebut. Namun radikal bebas yang berlebihan dapat merusak sel-sel di dalam tubuh. Dengan adanya antioksidan sebagai salah satu sistem pertahanan tubuh, maka radikal bebas yang ada akan ternetralisir. Kondisi jaringan periodonsium dipengaruhi oleh antioksidan internal yang diproduksi tubuh untuk menghindari terjadinya stres oksidatif yaitu ketidakseimbangan oksigen radikal dan non-radikal yang dapat merusak sel-sel dengan berbagai mekanisme. Apabila kadar antioksidan tidak mencukupi, maka jaringan periodonsium tidak lagi mampu untuk mengatasi stres oksidatif, melindungi jaringan yang normal dan tidak mampu untuk mengontrol kerusakan yang dilakukan oleh bakteri sehingga hal ini menunjukkan pentingnya antioksidan bagi kesehatan tubuh (Shafie, 2011).

*Porphyromonas gingivalis* merupakan bakteri anaerob gram negatif pada rongga mulut yang terlibat dalam patogenesis periodontitis, penyakit inflamasi yang merusak jaringan pendukung gigi yang akhirnya dapat menyebabkan hilangnya gigi (Bodet *et al*, 2007). Bakteri ini merupakan salah satu bakteri yang paling sering ditemui pada kasus periodontitis kronis. *P. gingivalis*, bakteri paling agresif penyebab periodontitis selain menghasilkan toksin yang memicu produksi sitokin pro inflamasi, menghambat fagositosis, mendegradasi imunoglobulin, juga menginduksi produksi enzim *matrix metalloproteinase (MMP)* (Praptiwi, dkk., 2011). Bakteri *P. gingivalis* banyak ditemukan dalam plak gigi dan bakteri tersebut menyebabkan perubahan patologik jaringan periodontal dengan pengaktifan respons imun dan inflamatori

inang, dan secara langsung mempengaruhi sel-sel periodonsium. *P. gingivalis* memproduksi berbagai faktor virulensi patogenik, seperti lipopolisakarida dan hidrogen sulfida, yang dapat menginduksi inang untuk melepaskan interleukin-1 dan *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (Kusumawardani, 2010).

Leukosit polimorfonuklear (PMN) disebut juga neutrofil adalah sel fagositosis yang aktif menelan dan menghancurkan mikroorganisme. Neutrofil merupakan jenis sel utama dalam poket gingiva dan membentuk garis pertahanan pertama terhadap bakteri patogen periodontal (Martínez, 2009). Mekanisme kerja neutrofil adalah dengan memfagosit dan menghancurkan antigen. Proses fagositosis diawali dengan migrasi neutrofil menuju jaringan terinfeksi dengan cara digerakkan oleh kemoatraktan (Ferencik, 1997). Zat-zat *chemoattractant* ini adalah beberapa toksin bakteri atau virus, produk degeneratif dari jaringan yang meradang itu sendiri, beberapa produk reaksi “kompleks komplemen” yang diaktifkan di jaringan meradang, dan beberapa produk reaksi yang disebabkan oleh pembekuan plasma di area yang meradang, dan juga zat-zat lainnya (Guyton dan Hall, 2007).

Aktifitas perlawanan bakteri oleh PMN meliputi mekanisme bakterisida yang tergantung oksigen dan mekanisme bakterisida tidak tergantung oksigen. Pada jalur bergantung oksigen melibatkan produksi *reactive oxygen species* (ROS), yakni molekul yang mampu menginisiasi kerusakan jaringan periodontal. Produksi ROS oleh PMN terutama difokuskan untuk membunuh bakteri, tapi pelepasan ekstraseluler ROS menyebabkan kerusakan jaringan sekitarnya (Guentsch, 2009). Pada saat infeksi, neutrofil akan meningkatkan reaksi oksidasi untuk membunuh bakteri. Namun, pembentukan reaksi oksidasi yang terlalu berlebihan dapat menyebabkan neutrofil mati. Maka dari itu, viabilitas neutrofil sangat penting untuk ditingkatkan agar tidak terjadi rusaknya membran sel atau lisis (Underwood, 1999).

Menurut Harty dan Ogston (1995) viabel merupakan bisa hidup atau tumbuh. Viabilitas sel neutrofil merupakan kemampuan sel neutrofil untuk hidup. Penentuan paling umum terhadap viabilitas sel neutrofil didasarkan pada integritas membran sel. Hal ini didasarkan pada prinsip bahwa sel-sel hidup memiliki membran sel yang utuh,

sedangkan sel-sel mati tidak memiliki integritas sehingga mudah menyerap pewarnaan tertentu (Arzumanyan dan Ozhovan, 2002).

Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees, Acanthaceae) merupakan salah satu obat tradisional yang paling banyak dipakai di Indonesia. (Yulinah, 2001). Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) telah lama dikenal dan memiliki khasiat dalam pengobatan. Penggunaan sambiloto untuk kesehatan manusia maupun ternak sudah terbukti efektif dan berkhasiat baik untuk pencegahan maupun pengobatan (Sembiring, 2009). Tanaman sering ditemukan tumbuh liar di tempat terbuka, seperti tepi jalan, ladang, atau tanah kosong yang terbengkalai, juga di pekarangan (Mulisah, 2007). Sambiloto dapat dimanfaatkan dalam bentuk segar, simplisia, kapsul, serbuk, infus, kapsul ekstrak kental, maupun kapsul ekstrak kering (Sembiring, 2009). Semua bagian tanaman sambiloto, seperti daun, batang, bunga, dan akar, terasa sangat pahit jika dimakan atau direbus untuk diminum. Diduga ini berasal dari andrographolide yang dikandungnya. Sebenarnya, semua bagian tanaman sambiloto bisa dimanfaatkan sebagai obat, termasuk bunga dan buahnya. Namun bagian yang paling sering digunakan sebagai bahan ramuan obat tradisional adalah daun dan batangnya (Widyawati, 2007).

Secara kimia sambiloto mengandung flavonoid dan lakton. Andrographolide adalah lakton diterpenoid bisiklik diisolasi dari daun *Andrographis paniculata* (Lu et al., 1981). Senyawa flavonoid dilaporkan memiliki berbagai aktivitas biologis seperti antiulser, antibakteri, antidepresan, antioksidan dan antitumor (Warditiani, 2014). Pada lakton, komponen utamanya adalah *andrographolide* yang juga merupakan zat aktif utama dari tanaman ini. Kapil *et al* (1993) menambahkan bahwa *andrographoside* dan *neoandrographolide* bisa jadi kelompok glukosida yang dapat bertindak sebagai antioksidan kuat. Menurut Shen et al (2000), *andrographolide* dapat mencegah produksi ROS dan adhesi oleh neutrofil tikus terisolasi. Namun mekanismenya masih belum jelas (Shen et al., 2000). Senyawa andrografolid merupakan diterpen lakton (Sudarsono *et al.* 2006 dalam Rais, 2014) yang larut dalam pelarut semi polar seperti etanol, aseton dan kloroform dan sedikit larut dalam

air. Golongan flavonoid dapat tertarik dalam pelarut etanol yang bersifat universal (Warditiani, 2014). Konsentrasi ekstrak etanol untuk mendapatkan aktivitas antioksidan dari *A. paniculata* yakni diperkirakan 200 µg/ml sampai 1000 µg/ml (Sivananthan dan Elamaran, 2013).

Dari berbagai penelitian yang dilakukan secara umum sambiloto tidak menimbulkan efek samping yang serius sehingga aman dikonsumsi dan efektif. Dan sampai saat ini jarang ditemui efek samping yang tidak diinginkan saat sambiloto ini digunakan bersama-sama dengan tumbuhan atau obat lain. Uji toksisitas pada hewan coba menunjukkan bahwa andrographolide dan senyawa lain yang terdapat pada sambiloto memiliki toksisitas rendah (Dalimunthe, 2009)

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka penulis bermaksud untuk melakukan penelitian tentang potensi ekstrak etanol daun sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) dalam meningkatkan viabilitas neutrofil yang dipapar bakteri *Porphyromonas gingivalis* secara in vitro.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas maka timbul permasalahan, yaitu:

- 1.2.1 Apakah ekstrak etanol daun sambiloto dapat meningkatkan viabilitas neutrofil yang dipapar bakteri *P. gingivalis* secara in vitro?
- 1.2.2 Apakah terdapat perbedaan viabilitas neutrofil yang hanya dipapar bakteri *P. gingivalis*, dan viabilitas neutrofil yang diinkubasi ekstrak etanol daun sambiloto konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100% kemudian dipapar bakteri *P. gingivalis* secara in vitro.

### 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

- 1.3.1 Menganalisis ekstrak etanol daun sambiloto dalam meningkatkan viabilitas neutrofil yang dipapar bakteri *P. gingivalis* secara in vitro.
- 1.3.2 Mengetahui terdapat perbedaan viabilitas neutrofil yang hanya dipapar bakteri *P. gingivalis*, dan viabilitas neutrofil yang diinkubasi ekstrak etanol daun sambiloto konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100% kemudian dipapar bakteri *P. gingivalis* secara in vitro.

### 1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat diantaranya :

- a. Sebagai tambahan informasi kepada masyarakat dan tenaga kesehatan mengenai efektifitas pemberian ekstrak etanol sambiloto terhadap viabilitas neutrofil setelah dipapar bakteri *P. gingivalis*.
- b. Sebagai tambahan informasi pada bidang kesehatan mengenai manfaat tanaman sambiloto sebagai alternatif pengobatan untuk periodontitis.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Sambiloto (*Andrographis paniculata*)

#### 2.1.1 Nama dan Klasifikasi

*Andrographis paniculata* (Burm. F.) Wallich ex Nees (sinonim *Andrographis sub spathulata* C.B.Clarke), yang termasuk famili Acanthaceae, di Indonesia pada umumnya dikenal dengan nama sambiloto. Disamping itu, di beberapa daerah tumbuhan ini dikenal pula dengan nama shirotolmustaqim (Aceh), ampadu (Minangkabau), sandilata, ki-oray, ki-peurat, takilo (Sunda), bidara, sambilata, sadilata, takila (Jawa), samiroto (Bali), pepaitan (Maluku), sampiroto, daun ki-ular, dan takila (Acmad, 2008).

*Andrographis paniculata* diklasifikasikan sebagai berikut :

|               |                                  |
|---------------|----------------------------------|
| Kingdom       | : Plantae                        |
| Subkingdom    | : Tracheobionta, vascular plants |
| Superdivision | : Spermatophyta, seed plants     |
| Division      | : Angiospermae                   |
| Class         | : Dicotyledonae                  |
| Subclass      | : Gamopetalae                    |
| Series        | : Bicarpellatae                  |
| Order         | : Personales                     |
| Tribe         | : Justiceae                      |
| Family        | : Acanthaceae                    |
| Genus         | : <i>Andrographis</i>            |
| Species       | : <i>Andrographis paniculata</i> |

(Sivananthan dan Elamaran, 2013:2)

### 2.1.2 Morfologi

Diukur dari pangkal batang hingga ujung tajuk, tinggi sambiloto bervariasi, antara 30-100 cm. Tinggi dan rendahnya tanaman sangat tergantung dari cara penanaman, tempat penanaman, media tanam, dan cara perawatannya. Tanaman yang rasanya sangat pahit ini memiliki banyak cabang. Bunganya berwarna putih keunguan. Daunnya kecil-kecil, berbentuk lanset (pedang), ujung runcing, tepi rata, tangkai pendek, dan letaknya saling berhadapan. Panjang daun 2-8 cm dan lebar 1-3 cm. Permukaan atas daun berwarna hijau tua dan permukaan bawahnya berwarna hijau muda. Buah sambiloto berbentuk jorong (bulat panjang), pangkal dan ujungnya tajam. Panjang buah sekitar 2 cm. Setiap buah terdiri dari dua rongga. Setiap rongga berisi 3-7 biji kecil berwarna coklat muda yang berbentuk gepeng (Prapanza dan Marianto, 2003:6).



Gambar 2.1 *Andrographis paniculata* (Handayani, 2013:24)

### 2.1.3 Habitat

Famili Acantacheae terdiri dari 250 genus dan 2500 spesies, tersebar di daerah tropika. Lebih dari 50% jumlah spesies tersebut merupakan bagian dari 7 genus utama, yaitu *Justicia* (300 spesies), *Ruellia* (250), *Barleria* (250), *Strobilanthes* (200), *Thunbergia* (200), *Dicliptera* (180), dan *Ahelandra* (150), yang berarti bahwa *Andrographis* termasuk genus yang hanya terdiri dari jumlah spesies yang relatif kecil. Dicatat pula bahwa tumbuhan *Andrographis paniculata* ini berasal dari India, tetapi telah diperkenalkan dan ditanam sebagai tanaman obat di banyak negara di wilayah Asia Tenggara, mulai dari Indo Cina, Cina, Filipina, Thailand, Malaysia, dan Indonesia, terutama Jawa (Achmad, 2008).

Tanaman sambiloto merupakan salah satu tanaman obat yang banyak dipakai di Indonesia. Sambiloto merupakan tanaman yang dapat ditemui sepanjang tahun karena dapat tumbuh di semua jenis tanah, bahkan dapat tumbuh di kebun, tepi sungai, semak-semak, atau rumpun (Utami, 2013:157).

### 2.1.4 Kandungan

Komponen primer dari *A. Paniculata* adalah andrographolide (*diterpene lactone*) yang rasanya pahit dan berupa kristalin tak berwarna. Analisis dari keseluruhan tumbuhan (bentuk kering) terdiri andrographolides –  $C_{20}H_{30}O_5$ , mp 230 - 239°C, 0,6%; 14-deoxy-11-oxoandrographolide,  $C_{20}H_{28}O_5$ , mp 100°C, 0,12%; 14-deoxy-11, 12-didehydroandrographolide –andrographolide D,  $C_{20}H_{30}O_4$ , mp 203 - 204°C, 0,06%;14-deoxyandrographolide,  $C_{20}H_{30}O_4$ , mp 175°C, 0,02%, dan zat tidak pahit, neoandrographolide –  $C_{26}H_{40}O_8$ , mp 167 - 168°C, 0,005%. Daunnya mengandung jumlah andrographolide terbanyak (1,0% - 2,39 %), sedangkan bijinya mengandung andrographolide terendah. Daunnya juga memiliki diterpenoid (prinsip pahit), yaitu deoxyandrographolide 19 $\beta$ -D-glukosida dan neoandrographolide. Akar spesies mengandung apigenin - 7,4'-di-o-metil eter, andrografolida dan flavon alam baru, 7,8,2 5-hidroksi ', 3'-tetrametoksi flavon ( $C_{19}H_{18}O_7$ , mp 150-151°C, hasil -

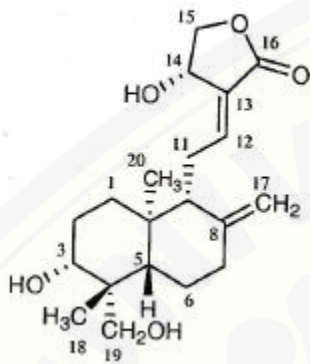


0,006%). Mereka juga mengandung flavon trimetil monohidroksi, andrographin ( $C_{18}H_{16}O_6$ , mp 190-191°C) dan dihidroksi-dimethoxyflavone, panicolin ( $C_{17}H_{14}O_6$ , mp 263-264°C) terlepas dari adanya  $\alpha$ -sitosterol. Rao et al mengidentifikasi dua flavonoid yaitu, 5, 7, 2', 3' tetramethoxyflavanone dan 5-hidroksi-7, 2', 3' trimethoxyflavone serta beberapa lainnya dikenal flavonoid, dan polifenol andrographolide diterpenoids dari seluruh tanaman *A. paniculata* (ekstrak MeOH dibagi menjadi fraksi larut  $CHCl_3$ ,  $Me_2CO$  dan MeOH) mengikuti metode spektroskopi, termasuk analisis oleh 2D Spektroskopi NMR. Kulyal et al melaporkan beberapa konstituen diterpenic seperti andrografolida, 14-deoxy-11, 12-didehydroandrographolide, 14-deoxyandrographolide, 3,14-dideoxyandrographolide, 14-deoksi-11 oxoandrographolide, 14-deoksi-12-hydroxyandrographolide, neoandrographolide, andrographiside dan 14-deoxyandrographiside dari ekstrak etanol bagian aerial *A. paniculata*. Struktur senyawa didirikan atas dasar analisis data spektral. Xu et al melaporkan novel 756 diterpen (13R, 14R) 3, 13, 14, 19-tetrahidroksi-entlabda- 8 (17), 11-dien-16, 15-olide 1 dari ekstrak etanol dari daun spesies. Struktur senyawa dikonfirmasi oleh X-ray analisis kristalografi.

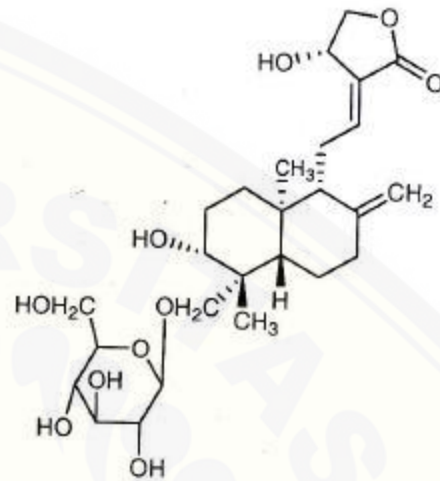
*A. paniculata*, mengandung sejumlah senyawa kimia yang merupakan ciri khas tumbuhan ini. Senyawa-senyawa tersebut terutama ialah diterpen lakton jenis *ent*-labdan, dan senyawa polimetoksiflavonoid turunan flavan dan flavon yang mempunyai substituen oksigen pada atom karbon C-5,7,8 pada cincin A yang dikombinasikan dengan adanya substituen oksigen pada C-2', C-2',3', atau C-2',3',4' pada cincin B (Achmad, 2008).

Dari berbagai jaringan tumbuhan *A. paniculata*, telah ditemukan suatu senyawa diterpen lakton jenis *ent*-labdan, yaitu andrografolid (**2.2**), yang merupakan kandungan kimia utama tumbuhan ini yang rasanya pahit, bersama-sama dengan glukosida andrografolid, yang disebut andrografisida (**2.3**) (Achmad, 2008).

Gambar berikut adalah andrografolid dan andrografisida tumbuhan *Andrographis paniculata*.



Gambar 2.2 Andrografolid  
(Achmad, 2008)



Gambar 2.3 Andrografisida  
(Achmad, 2008)

### 2.1.5 Manfaat Sambiloto

Semua bagian tanaman sambiloto seperti batang, daun, dan akar dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku pengobatan. Namun, bagian yang sering dimanfaatkan adalah daun dan batangnya. Niranjan dan Lehri dalam studinya yang diterbitkan pada *Indian Journal of Natural Products and Resources* tahun 2010 menyebutkan bahwa sambiloto dapat digunakan untuk aplikasi pengobatan dalam skala yang luas, mulai dari anti peradangan, anti human immunodeficiency virus (HIV-1), antimikroba, antifungal, antioksidan, antidiabetes, antikanker, penurunan panas, dan hepatoprotektif (pelindung kesehatan sel hati). Hal serupa juga disampaikan oleh Birdane dalam studi empirisnya tahun 2007 yang menyatakan bahwa sambiloto dimanfaatkan sebagai antioksidan, antidiabetes, anti HIV, antiflu, antimalaria, dan anti-diare. Jadi, kemampuan herba sambiloto sebagai salah satu obat tradisional sudah diuji, baik secara preklinis maupun klinis (Utami, 2013:158).

Tabel 2.1 Manfaat Kandungan Sambiloto

| Kandungan sambiloto  | Manfaat   |
|--|---|
| <b>Andrographolid</b><br>(C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub> ) | <p>Andrografolid diketahui dapat menghambat oksidasi sel-sel tubuh, efek antikanker, aktivitas antivirus, antibakteri, dan berfungsi sebagai antioksidan dalam sel hati (Utami, 2013).</p> <p>Andrografolid menghambat produksi radikal oksigen dalam neutrofil (Chao, 2010).</p>   |
| <b>Flavonoid</b>   | <p>Flavonoid berpotensi sebagai antioksidan dan mempunyai aktivitas sebagai anti bakteri, anti inflamasi, anti alergi dan anti thrombosis (Rais, 2015).</p> <p>Flavonoid berperan sebagai antioksidan yang akan berikatan dengan radikal bebas reaktif dan membentuk radikal bebas tak reaktif yang relatif lebih stabil sehingga dapat menghambat proses oksidasi (Dinna Sofia, 2008).</p> |

#### 2.1.6 Macam Sediaan Herbal

##### a. Infusa (Infus)

Infus adalah sediaan cair yang dibuat dengan cara mengekstraksi simplisia nabati dengan air pada suhu 90°C selama 15 menit. Pembuatan infusa merupakan cara yang paling sederhana untuk membuat sediaan herbal dari bahan lunak seperti daun dan bunga. Dapat diminum panas atau dingin. Sediaan herbal yang mengandung

minyak atsiri akan berkurang khasiatnya apabila tidak menggunakan penutup pada pembuatan infus.

b. Dekokta (Dekok)

Dekok adalah sediaan cair yang dibuat dengan mengekstraksi sediaan herbal dengan air pada suhu 90°C selama 30 menit.

c. Tea (Teh)

Pembuatan sediaan teh untuk tujuan pengobatan banyak dilakukan berdasarkan pengalaman seperti pada pembuatan infus yang dilakukan pada teh hitam sebagai minuman. Pembuatan: Air mendidih dituangkan ke simplisia, diamkan selama 5-10 menit dan saring. Pada pembuatan sediaan teh, beberapa hal perlu diperhatikan yaitu jumlah simplisia dan air, jumlah dinyatakan dalam takaran gram dan air dalam takaran mililiter. Derajat kehalusan untuk beberapa simplisia sesuai dengan yang tertera berikut ini: Daun, bunga dan herba: rajangan kasar dengan ukuran lebih kurang 4 mm. Kayu, kulit dan akar: rajangan agak kasar dengan ukuran lebih kurang 2,5 mm. Buah dan biji: digerus atau diserbuk kasar dengan ukuran lebih kurang 2 mm. Simplisia yang mengandung alkaloid dan saponin: serbuk agak halus dengan ukuran lebih kurang 0,5 mm.

d. Sirup

Sirup adalah sediaan berupa larutan dari atau yang mengandung sakarosa. Kecuali dinyatakan lain, kadar sakarosa tidak kurang dari 64,0% dan tidak lebih dari 66,0%.

e. Tinctura (Tingtur)

Tingtur adalah sediaan cair yang dibuat dengan cara maserasi atau perkolasi simplisia dalam pelarut yang tertera pada masing-masing monografi. Kecuali dinyatakan lain, tingtur dibuat menggunakan 20% zat khasiat dan 10% untuk zat khasiat keras.

f. Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan kering, kental atau cair dibuat dengan penyari simplisia menurut cara yang cocok, di luar pengaruh cahaya matahari langsung.

Ekstrak kering harus mudah dihaluskan menjadi serbuk. Sebagai cairan penyari digunakan air, eter, etanol, atau campuran etanol dan air. Penyarian simplisia dengan cara maserasi, perkolasi atau penyeduhan dengan air mendidih. Penyarian dengan campuran etanol dan air dilakukan dengan cara maserasi atau perkolasi. Penyarian dengan eter dilakukan dengan cara perkolasi (BPOM RI, 2011)

## 2.2 *Porphyromonas gingivalis*

### 2.2.1 Klasifikasi

*Porphyromonas gingivalis* adalah bakteri anaerobik gram negatif dan diklasifikasikan sebagai berikut:

|         |                                   |
|---------|-----------------------------------|
| Kingdom | : Bacteria                        |
| Phylum  | : Bacteroidetes                   |
| Class   | : Bacteroidetes                   |
| Orde    | : Bacteriosales                   |
| Family  | : Porphyromonadaceae              |
| Genus   | : <i>Porphyromonas</i>            |
| Species | : <i>Porphyromonas gingivalis</i> |

(Duncan et al.,2002:1)

### 2.2.2 Habitat

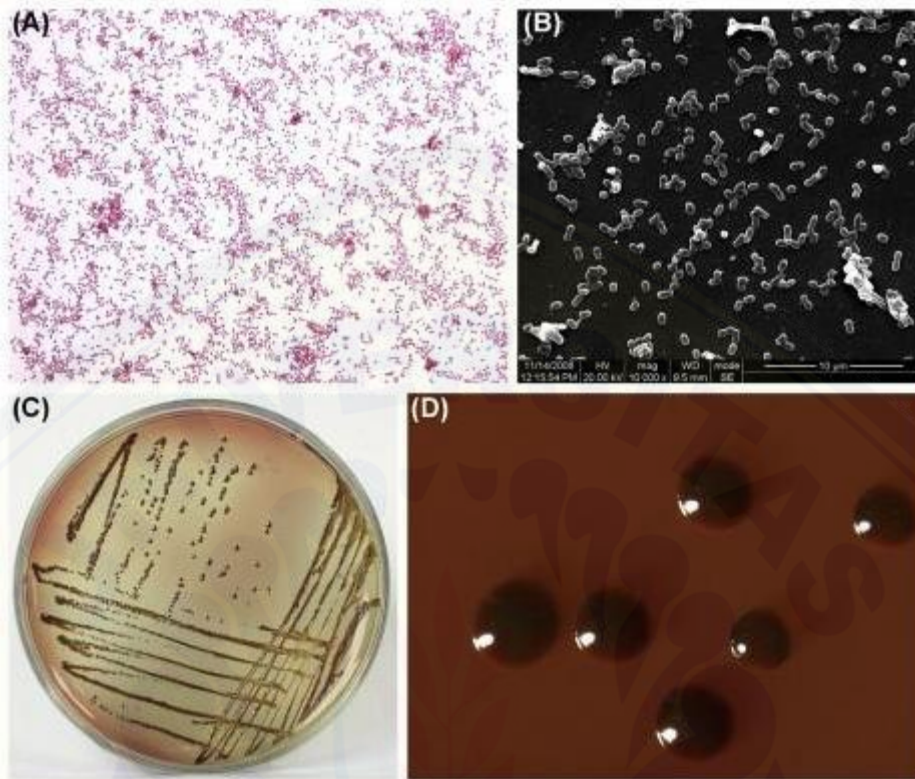
Habitat utama *P. gingivalis* adalah plak subgingival di krevikular gingiva. Namun, *P. gingivalis* dapat dideteksi dalam sampel lapisan lidah dari periodontal yang sehat dan subyek yang sakit (Dahlen et al, 1992;.. Kishi et al, 2002).

*Porphyromonas gingivalis* dapat ditemukan dalam jumlah rendah pada gingiva sehat atau gingivitis tetapi lebih sering ditemukan dalam agresif periodontitis. Spesies ini ditemukan meningkat pada subyek yang menunjukkan perkembangan

penyakit periodonal (memburuknya kerusakan periodonsium). *P. gingivalis* sering terlihat pada daerah yang menunjukkan rekurensi penyakit atau persistensi dari poket periodontal yang dalam setelah terapi periodontal. *P. gingivalis* dapat menghalangi migrasi leukosit melewati dinding epitel. Spesies ini telah terbukti menginduksi respon host tinggi pada subyek dengan berbagai bentuk periodontitis (Nield-Gehrig dan Willmann, 2011).

### 2.2.3 Karakteristik

*Porphyromonas gingivalis* adalah bakteri anaerobik non motil berbentuk batang yang telah dikaitkan dengan periodontitis kronis selama bertahun-tahun. Pada pewarnaan gram, bakteri ini tampak sebagai bakteri gram negatif berbentuk batang pendek atau kokus agak memanjang. Pada media agar darah, bakteri ini membentuk koloni berwarna hitam kecoklatan dan termasuk dalam kelompok spesies yang pernah disebut *Bacteroides* berpigmen hitam. Bakteri ini awalnya diklasifikasikan sebagai *Bacteroides melaninogenicus* dan setelah bertahun-tahun di klasifikasi kembali dan dibagi menjadi *Porphyromonas gingivalis* dan *Prevotella* genera (Wilson dan Kornman, 1996:53).



Gambar 2.4 (A) *Porphyromonas gingivalis* (Pewarnaan Gram); (B) *P. gingivalis* (SEM). *P. gingivalis* berbentuk batang atau kokobasilus, pada media solid berbentuk kokobasilus atau batang yang sangat pendek. Pewarnaan gram negatif; (C) Koloni *Porphyromonas gingivalis* (BHI blood agar); (D) Koloni *Porphyromonas gingivalis* (stereomikroskopis). *P. gingivalis* berbentuk koloni dengan diameter 1-2 mm pada blood agar. Koloninya berbentuk bulat, mengkilap, dengan permukaan halus (atau terkadang kasar). Setelah 4-8 hari kultur, melanin menyebar dari tepi ke pusat koloni untuk membentuk koloni hitam. Sejumlah kecil koloni tidak memproduksi melanin (Zhou, 2015).

#### 2.2.4 Kultur dan Identifikasi

*Porphyromonas gingivalis* tumbuh secara anaerob dan membentuk suatu karakteristik pigmentasi gelap pada media agar darah. Koloninya bila terdapat pada agar darah tampak lembut, berkilauan dan membentuk suatu karakteristik pigmen

berwarna coklat atau hitam. Bakteri ini dapat diidentifikasi dengan karakteristik biokimia sistem AnIdent, DNA, dan probe molekuler yang digunakan untuk identifikasi secara langsung dari sampel plak (Samaranayake, 2002:122).

#### 2.2.5 Patogenitas

*Porphyromonas gingivalis* merupakan bakteri melanogenik, nonsakarolitik, dan bagian dari koloni bakteri *Black-pigmented Gram-negative anaerobes*. Bakteri *P. gingivalis* banyak ditemukan dalam plak gigi dan bakteri tersebut menyebabkan perubahan patologik jaringan periodontal dengan pengaktifan respons imun dan inflamatori inang, dan secara langsung mempengaruhi sel-sel periodonsium. *P. gingivalis* memproduksi berbagai faktor virulensi patogenik, seperti lipopolisakarida dan hidrogen sulfida, yang dapat menginduksi inang untuk melepaskan IL-1 dan TNF- $\alpha$  (Kusumawardani, 2010).

*Porphyromonas gingivalis* telah terbukti banyak ditemukan pada lokasi dengan periodontitis dan rendah atau tidak terdeteksi di lokasi dengan kesehatan gingiva atau plak terkait gingivitis. Di samping itu, eliminasi *P. gingivalis* telah dikaitkan dengan hasil klinis yang baik sedangkan persistensi mikroorganisme telah dikaitkan dengan kekambuhan penyakit. Mikroorganisme ini telah terbukti memiliki faktor virulensi yang luas termasuk kolagenase, endotoksin, IgA (dan lai-lain) protease, dan low *molecular weight compounds* yaitu hidrogen sulfida dan ammonia. *P. gingivalis* mempunyai kemampuan untuk menginduksi resorpsi tulang, merusak jaringan ikat, menginduksi berbagai sitokin, dan menghambat mekanisme perlindungan host. *P. gingivalis* juga dapat masuk ke epitel junctional dan berkembang biak di tempat tersebut. Penambahan *P. gingivalis* ke ekosistem mikroba yang kompleks pada monyet telah terbukti untuk memulai kehilangan tulang progresif dan tanda-tanda klinis periodontitis (Wilson dan Kornman, 1996:54).



## 2.3 Neutrofil

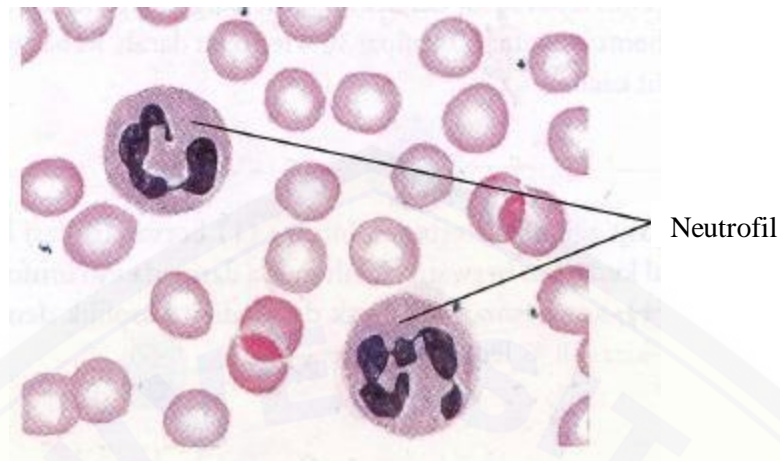
Polimorfonuklear leukosit (PMNs) adalah sel fagosit yang berperan penting dalam melawan bakteri patogen penyebab penyakit periodontal. PMNs juga dikenal dengan neutrofil, adalah sel fagosit yang aktif menelan dan menghancurkan mikroorganismenya. Sel ini merupakan responden cepat yang memberikan garis pertahanan pertama terhadap banyak mikroorganismenya yang umum dan sangat penting untuk menegontrol infeksi bakteri. Sekali dalam aliran darah, PMN dapat bergerak melalui dinding kapiler dan ke dalam jaringan. PMN tertarik pada bakteri dengan proses yang disebut kemotaksis. Sitoplasma dari PMN mengandung banyak granula yang berisi bakterisida yang kuat dan enzim untuk mencerna. Granula-granula ini (disebut lisosom) dapat membunuh dan mencerna sel bakteri setelah fagositosis. PMN adalah sel berumur pendek yang mati ketika mereka menjadi membesar dengan bakteri yang difagosit. Pus yang terbentuk pada lokasi inflamasi mengandung banyak PMN mati dan sekarat. PMN mempunyai masa hidup yang pendek, umumnya kurang dari 1 hari. Bakteri yang berhubungan dengan penyakit periodontal paling efektif difagosit oleh PMN. Biasanya, setiap mililiter darah mengandung antara 3000 sampai 6000 PMN (Nield-Gehrig dan Willmann, 2011).

### 2.3.1 Deskripsi Neutrofil

Sel-sel neutrofil polimorfonuklear/PMN (diameternya 10-14  $\mu\text{m}$ ) menempati sekitar 50-70% dari semua leukosit di dalam darah. Sel-sel ini masuk ke dalam ruang jaringan, mencari, memakan dan membunuh bakteri. Jadi, sel-sel neutrofil PMN merupakan lini pertahanan pertama tubuh terhadap infeksi oleh bakteri. Butir-butir granula dalam sitoplasma merupakan lisosom yang mengandung berbagai enzim proteolitik termasuk enzim elastase serta kolagenase, antibiotik antimikroba yang dinamakan defensin, dan enzim oksidase (yang bila diaktifkan akan menghasilkan preparat bakterisida seperti  $\text{H}_2\text{O}_2$  serta  $\text{O}_2^-$ ). Peningkatan jumlah neutrofil darah

(neutrofilia) merupakan ciri khas infeksi bakterial atau cedera jaringan seperti misalnya pada trauma, luka bakar atau infark jantung. (Kumar, 2013:25)

Neutrofil secara morfologik dibagi menjadi dua kelompok: Tidak bersegmen dan hipersegmentasi. Sel tidak bersegmen adalah neutrofil yang belum matang (imatur) (juga dikenal sebagai batang), yang tampak selama infeksi bakteri dan kondisi lainnya. Neutrofil hipersegmentasi (dengan lobus lebih dari lima) adalah sel-sel yang lebih tua tampak pada defisiensi vitamin B<sub>12</sub> atau defisiensi folat. Lobus yang banyak (3-5) sel-sel fagositik dengan granula dalam sitoplasma. Lobus yang banyak ini berperan untuk 60%-70% dari seluruh leukosit dan merupakan perantara utama pada inflamasi akut. Dua kelompok utama granula ada dalam sitoplasma, yaitu granula spesifik dan granula azurofil. Granula spesifik adalah peroksidase negatif, kecil dan pucat, sedangkan granula azurofil adalah lisosom yang peroksidase positif, besar dan padat serta mengandung enzim mieloperoksidase. Neutrofil menggunakan glukosa melalui jalur glikolisis dan mempunyai masa hidup 1-4 hari dalam darah. Neutrofil menggunakan O<sub>2</sub> setelah fagositosis, menghasilkan radikal bebas yang membantu membunuh bakteri. Neutrofil juga mengandung laktoferin, yang berikatan dengan besi, mengambil nutrisi penting untuk bakteri, sehingga menyebabkan bakteri mati (Tao dan Kendall, 2013).



Gambar 2.5 Neutrofil dan eritrosit. Pewarnaan: Wright. Imersi minyak. (Sumber: Eroschenko, 2010)

### 2.3.2 Fungsi Neutrofil

Neutrofil dan makrofag jaringan yang terutama menyerang dan menghancurkan bakteri, virus, dan agen-agen merugikan lain yang menyerbu masuk ke dalam tubuh. Neutrofil adalah sel matang yang dapat menyerang dan menghancurkan bakteri, bahkan di dalam darah sirkulasi (Guyton dan Hall, 2007).

Fungsi neutrofil dan makrofag yang terpenting adalah fagositosis, yang berarti pencernaan seluler terhadap agen yang mengganggu. Neutrofil sewaktu memasuki jaringan sudah merupakan sel-sel matur yang dapat segera memulai fagositosis. Sewaktu mendekati satu partikel untuk difagositosis, mula-mula neutrofil melekatkan diri pada partikel kemudian menonjolkan pseudopodia ke semua jurusan di sekeliling partikel. Pseudopodia bertemu satu sama lain pada sisi yang berlawanan dan bergabung. Hal ini menciptakan ruangan tertutup yang berisi partikel yang sudah difagositosis. Kemudian ruangan ini berinvaginasi ke dalam rongga sitoplasma dan melepaskan diri dari membran sel bagian luar untuk membentuk gelembung fagositik yang mengapung dengan bebas (juga disebut fagosom) di dalam sitoplasma. Sebuah

sel neutrofil biasanya dapat memfagositosis 3 sampai 20 bakteri sebelum sel neutrofil itu sendiri menjadi inaktif dan mati (Guyton dan Hall, 2007).

Selain mencerna bakteri yang dicerna dalam fagosom, neutrofil juga mengandung bahan bakterisidal yang membunuh sebagian besar bakteri, bahkan bila enzim lisosomal gagal mencerna bakteri tersebut. Hal ini menjadi demikian penting sebab beberapa bakteri mempunyai selubung pelindung atau faktor lain yang mencegah penghancurannya oleh enzim pencernaan. Banyak efek pembunuhan merupakan hasil dari beberapa bahan *pengoksidasi* kuat yang dibentuk oleh enzim dalam membran fagosom, atau oleh organel khusus yang disebut *peroksisom*. Bahan pengoksidasi ini ialah sejumlah besar *superoksida* ( $O_2^-$ ), *hidrogen peroksida* ( $H_2O_2$ ), dan *ion-ion hidrosil* ( $---OH$ ), semuanya bersifat mematikan bagi sebagian besar bakteri, bahkan bila bahan pengoksidasi itu jumlahnya sedikit. Selain itu, salah satu enzim lisosom, yaitu mieloperoksidase, mengatalisis reaksi antara  $H_2O_2$  dan ion klorida untuk membentuk hipoklorit, yang secara luas bersifat bakterisid (Guyton dan Hall, 2007).

Fagositosis dapat diuraikan dalam 3 tahap yang jelas berkaitan satu sama lain:

1. Perlekatan dan Pengenalan

Meskipun sel-sel fagosit dapat melekat pada partikel dan bakteri tanpa didahului oleh suatu proses pengenalan yang khas, telah lama diketahui bahwa fagositosis mikroorganisme sangat ditunjang, bila mikroorganisme diliputi oleh opsonin, yang terdapat dalam serum (misalnya IgG, C3). Permukaan neutrofil mempunyai reseptor untuk porsi Fc imunoglobulin IgG dan komponen ketiga komplemen (C3b). Bila mikroorganisme diliputi oleh antibodi IgG yang terdapat dalam serum, porsi Fc molekul imunoglobulin memberi tempat untuk perlekatan pada permukaan fagosit. Demikian pula adanya reseptor C3b pada fagosit memudahkan perlekatan dan fagositosis bila C3b tertambat pada permukaan mikroorganisme. Seperti akan dapat diketahui, C3b dapat dibentuk oleh aktivasi yang bergantung antibodi atau perubahan

jalur komponen. Perlekatan bakteri yang telah mengalami opsonisasi dengan bantuan reseptor disebut tahap pengenalan fagositosis.

## 2. Penelanan

Setelah bakteri yang mengalami opsonisasi melekat pada permukaan, selanjutnya sel fagosit sebagian besar akan meliputi partikel, berdampak pembentukan kantung yang dalam. Mulut invaginasi ini akan ditutup oleh filamen-filamen mikro sitoplasma disekitarnya yang bertindak seperti kantung uang. Partikel ini sekarang terletak dalam vesikel sitoplasma yang masih terikat pada selaput sel, disebut fagosom. Meskipun pada waktu pembentukan fagosom, sebelum menutup lengkap, granula-granula sitoplasma neutrofil menyatu dengan fagosom dan melepaskan isinya ke dalamnya, suatu proses yang disebut degranulasi. Dua macam granula sitoplasma neutrofil ialah: (1) granula azurofil (primer) yang merupakan lisosom yang mengandung hidrolase asam, protease netral, protein berkation, mieloperoksidase, dan lisozim, serta (2) granula khas (sekunder) yang mengandung lisozim dan laktoferin, tetapi tanpa hidrolase atau peroksidase. Pada proses degranulasi enzim-enzim dan juga oksigen metabolit reaktif bocor ke dalam lingkungan ekstrasel, sebab beberapa granula melepaskan isinya lebih dulu sebelum fagosom menutup lengkap (proses yang disebut “regurgitasi sewaktu makan”). Karena beberapa bahan kimia dalam granula dapat bekerja sebagai mediator, akan memperkuat respon radang. Sayangnya enzim-enzim lisosom dan radikal bebas berasal oksigen juga dapat menyerang sel-sel jaringan normal di sekitarnya. Ini ialah korban yang harus dibayar untuk pertahanan terhadap suatu invasi musuh. Penelanan ialah proses yang memerlukan energi, memerlukan kehadiran  $Ca^{++}$  dan  $Mg^{++}$ . Tidak ada sedikit keraguan pun bahwa mikrofilamen berperan menimbulkan kekuatan yang menghasilkan invaginasi, penutupan dan degranulasi. Proses ini dibantu oleh mikrotubuli yang terbuat dari protein tubulin yang tidak kontraktil. Perubahan-perubahan metabolisme yang penting terjadi dalam sel setelah fagositosis, yaitu peningkatan glikolisis

dan konsumsi oksigen (“ledakan oksigen”), dan peningkatan penggunaan glukosa melalui shunt heksosa monofosfat. Perlu diketahui bahwa peningkatan konsumsi oksigen tidak ada kaitannya dengan peningkatan produksi energi melalui respirasi mitokondria, tetapi tujuan lebih diutamakan untuk menghasilkan agen-agen antimikroba yang kuat. Kemampuan pernapasan anaerob melalui glikolisis penting bagi neutrofil karena harus berfungsi di tengah-tengah fokus radang dalam keadaan hipoksia.

### 3. Pembunuhan dan Degradasi

Bila mikroorganisme telah mengalami pelahapan, walaupun sebagian besar mudah dihancurkan oleh fagosit, beberapa organisme yang virulen dapat menghancurkan leukosit. Faktor-faktor yang menentukan apakah bakteri yang dilahap akan terbunuh dalam penjara berdinding selaput atau mampu hidup sukar dimengerti. Akan tetapi, mekanisme mikrobisidal dalam sel fagosit tergolong dalam bergantung oksigen atau tidak bergantung oksigen (Robbins dan Kumar, 1995).

#### 2.3.3 Neutrofil dan Penyakit Periodontal

Leukosit polimorfonuklear adalah sel darah putih yang paling umum. Terbentuk pada sumsum tulang dan merupakan sel darah yang paling penting untuk melindungi tubuh terhadap serangan bakteri akut. Karena sel ini mempunyai kemampuan seperti amuba untuk berubah bentuk dan bergerak cukup cepat, sel dapat melewati dinding kapiler dan bergerak melalui jaringan termasuk jaringan ikat gingiva dan epitelium jungsional. Arah pergerakannya ditentukan oleh substansi kimia yang terutama berasal dari bakteri atau turunan komplemen. Substansi ini akan menarik PMN ke daerah yang rusak di mana partikel asing akan dihancurkan. Walaupun peranannya adalah untuk pertahanan primer, PMN juga dapat memproduksi enzim proteolitik yang dapat merusak jaringan sekitarnya (Manson, 1993).

#### 2.3.4 Membran dan Viabilitas Sel Neutrofil

Viabel merupakan bisa hidup atau tumbuh (Harty dan Ogston, 1995). Viabilitas (kelangsungan hidup) sel adalah penentuan sel-sel hidup atau mati berdasarkan pada jumlah sel sampel. Uji terhadap viabilitas sel biasanya melibatkan sebuah populasi sel sampel dan pewarnaan tertentu untuk menunjukkan sel yang hidup dan yang mati (Christensen, 2003). Penentuan paling umum terhadap viabilitas sel neutrofil didasarkan pada integritas membran sel. Hal ini didasarkan pada prinsip bahwa sel-sel hidup memiliki membran sel yang utuh, sedangkan sel-sel mati tidak memiliki integritas sehingga mudah menyerap pewarnaan tertentu, seperti *trypan blue*. Sel yang hidup sitoplasmanya jernih sedangkan sel yang mati sitoplasmanya tampak berwarna biru (Strober, 2001).

#### 2.4 Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron (electron donor) atau reduktan. Senyawa ini memiliki berat molekul kecil, tetapi mampu menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi, dengan cara mencegah terbentuknya radikal. Antioksidan juga merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif. Akibatnya, kerusakan sel dihambat (Winarsi, 2007).

#### 2.5 Antibakteri

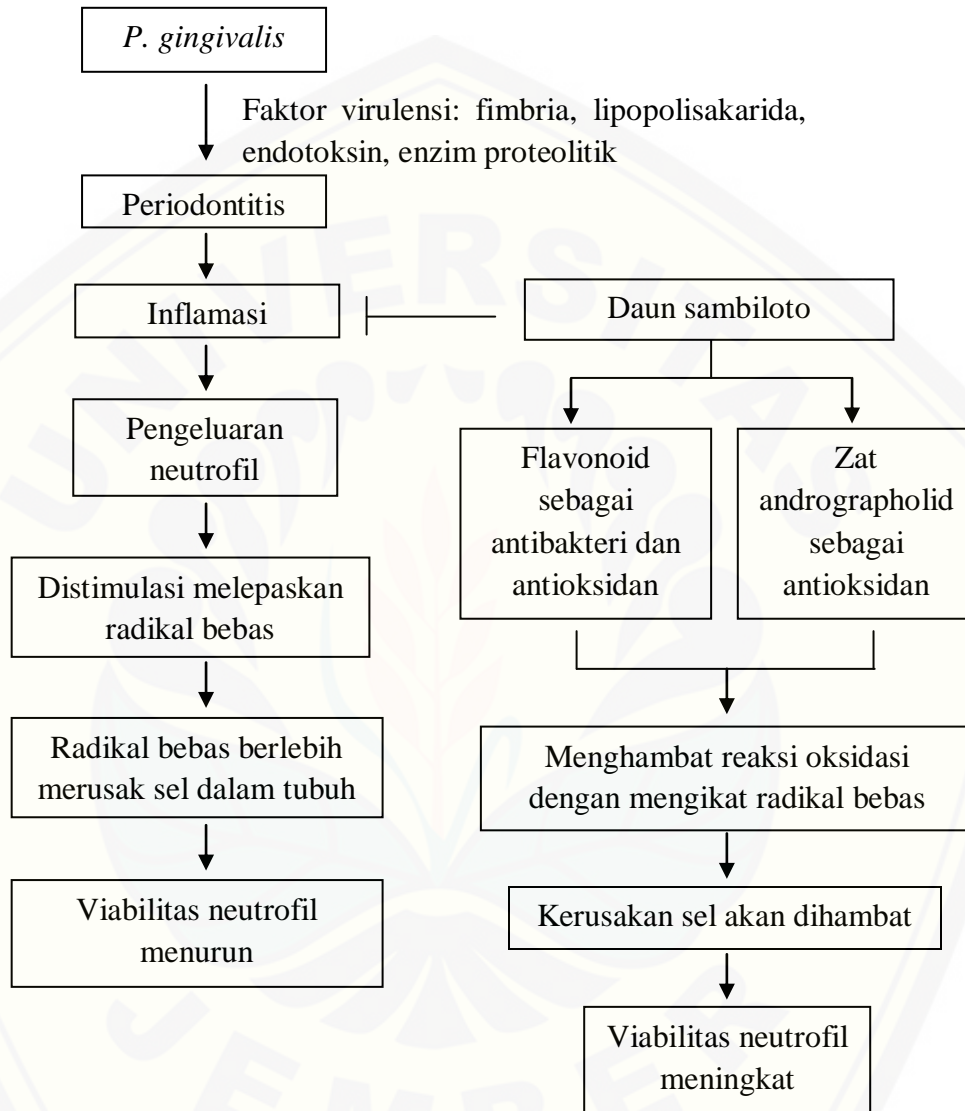
Antibakteri adalah senyawa yang digunakan untuk mengendalikan pertumbuhan bakteri yang bersifat merugikan. Pengendalian pertumbuhan mikroorganisme bertujuan untuk mencegah penyebaran penyakit dan infeksi, membasmi mikroorganisme pada inang yang terinfeksi, dan mencegah pembusukan serta perusakan bahan oleh mikroorganisme (Sulistyo, 1971). Antimikrobia meliputi golongan antibakteri, antimikotik, dan antiviral (Ganiswara, 1995).

Mekanisme penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri oleh senyawa antibakteri dapat berupa merusak dinding sel dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubahnya setelah selesai terbentuk, perubahan permeabilitas membran sitoplasma sehingga menyebabkan keluarnya bahan makanan dari dalam sel, perubahan molekul protein dan asam nukleat, penghambatan kerja enzim, dan penghambatan sintesis asam nukleat dan protein. Di bidang farmasi, bahan antibakteri dikenal dengan nama antibiotik, yaitu suatu substansi kimia yang dihasilkan oleh mikroba dan dapat menghambat pertumbuhan mikroba lain. Senyawa antibakteri dapat bekerja secara bakteristatik, bakteriosidal, dan bakteriolitik (Pelczar dan Chan, 1988).

Mekanisme penghambatan antibakteri dapat dikelompokkan menjadi lima, yaitu menghambat sintesis dinding sel mikrobia, merusak keutuhan dinding sel mikrobia, menghambat sintesis protein sel mikrobia, menghambat sintesis asam nukleat, dan merusak asam nukleat sel mikrobia (Sulistyo, 1971).



2.6 Kerangka Konsep



Gambar 2.6 Kerangka Konsep

Keterangan:

→ : memengaruhi/ menyebabkan

⊥ : menghambat

## 2.7 Keterangan Kerangka Konsep

*Porphyromonas gingivalis* merupakan bakteri anaerob gram negatif pada rongga mulut yang terlibat dalam patogenesis periodontitis. *P. gingivalis* memproduksi berbagai faktor virulensi patogenik, seperti fimbria, lipopolisakarida, endotoksin, dan enzim proteolitik. Periodontitis merupakan inflamasi kronis yang disebabkan adanya infeksi bakteri pada jaringan periodontal yang terdapat dalam plak gigi. Neutrofil merupakan jenis sel utama dalam poket gingiva dan membentuk garis pertahanan pertama terhadap bakteri patogen periodontal dengan meningkatkan reaksi oksidasi untuk membunuh bakteri. Namun, pembentukan reaksi oksidasi yang terlalu berlebihan dapat menyebabkan neutrofil mati. Maka dari itu, viabilitas neutrofil sangat penting untuk ditingkatkan agar tidak terjadi rusaknya membran sel atau lisis. Ekstrak etanol daun sambiloto diduga dapat meningkatkan viabilitas neutrofil karena mempunyai kandungan andrographolid dan flavonoid sebagai antioksidan. Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron (*electron donor*) atau reduktan. Senyawa ini memiliki berat molekul kecil, tetapi mampu menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi, dengan cara mencegah terbentuknya radikal. Antioksidan juga merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif. Akibatnya, kerusakan sel dihambat, sehingga viabilitas neutrofil meningkat.

## 2.8 Hipotesis

Ekstrak etanol daun sambiloto dapat meningkatkan viabilitas neutrofil yang dipapar bakteri *P. gingivalis* secara in vitro.

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian eksperimental *in vitro*.

### 3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini adalah *the posttest only control group design* yang merupakan pengukuran terhadap variabel yang diteliti setelah diberikan perlakuan kemudian dibandingkan dengan kelompok kontrol (Notoadmodjo, 2010).

### 3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

#### 3.3.1 Tempat Penelitian

- a. Laboratorium Mikrobiologi Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk identifikasi dan pembuatan suspensi *Porphyromonas gingivalis*.
- b. Laboratorium *Bioscience* Rumah Sakit Gigi dan Mulut Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk isolasi neutrofil, dan uji viabilitas neutrofil.

#### 3.3.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan Mei 2016.

### 3.4 Variabel Penelitian

#### 3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol daun sambiloto.

### 3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah viabilitas neutrofil.

### 3.4.3 Variabel Kendali

Variabel kendali pada penelitian ini adalah:

#### a. Kriteria subyek penelitian

Kriteria subyek penelitian adalah laki-laki dewasa, sehat, tidak memiliki riwayat penyakit sistemik, kelainan darah, dan kebiasaan merokok, serta bersedia mengisi *informed consent*.

#### b. Jenis dan konsentrasi *P. gingivalis*

*P. gingivalis* yang digunakan adalah strain ATCC 33277 dengan konsentrasi  $3 \times 10^6$ .

#### c. Teknik isolasi neutrofil

Isolasi neutrofil dengan menggunakan metode *double ficoll hypaque centrifugation*.

#### d. Kriteria daun sambiloto

Daun sambiloto adalah daun dari tanaman sambiloto yang berwarna hijau, sudah tua, dan tidak berlubang yang diperoleh dari UPT Materia Medica Batu di Kabupaten Malang.

## 3.5 Definisi Operasional

### 3.5.1 Daun sambiloto

Daun sambiloto adalah daun dari tanaman sambiloto yang berwarna hijau, sudah tua, dan tidak berlubang yang diperoleh dari UPT Materia Medica Batu di Kabupaten Malang.

### 3.5.2 Ekstrak etanol daun sambiloto

Ekstrak etanol daun sambiloto adalah cairan yang diperoleh dari daun sambiloto yang diekstraksi dengan menggunakan metode maserasi yang

menggunakan pelarut etanol 96%. Parameter yang digunakan dalam variabel ini yaitu konsentrasi ekstrak yang digunakan yaitu konsentrasi 100%, 75%, 50%, dan 25%. Pengenceran ekstrak sambiloto menggunakan aquades.

### 3.5.3 Viabilitas neutrofil

Viabilitas neutrofil adalah kemampuan neutrofil untuk bertahan hidup yang diuji dengan metode pewarnaan *trypan blue* dan diamati dibawah mikroskop *inverted* dan dihitung menggunakan hemositometer. Neutrofil yang hidup terlihat bening dan jernih, sedangkan yang tidak hidup akan terlihat berwarna biru karena membran selnya permeabel terhadap *trypan blue*.

### 3.5.4 *Porphyromonas gingivalis*

*P. gingivalis* yang digunakan adalah strain ATCC 33277 dengan konsentrasi  $3 \times 10^6$ .

## 3.6 Alat dan Bahan Penelitian

### 3.6.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: tabung falcon 15 ml, *dysposable syringe* 5 ml, rak tabung, *tissue*, masker, *handscoon*, inkubator shaker, *coverslip*, *object glass*, *micro plate*, timbangan, lampu spirtus, mikroskop *inverted*, pipet mikro, *yellowtip*, *bluetip*, *syringe filter*, *laminar flow cabinet*, *vortex mixer*, toples.

### 3.6.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut: ekstrak etanol daun sambiloto, *ficoll hypaque gradient*, LSM (*Lymphocyte Separation Medium*), HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*), medium complete RPMI, M199, *Penicillin Streptomycin*, *Fungizone Amphotencin B*, darah vena perifer, *trypan blue*, *Giemsa stain*, minyak emersi, alkohol, akuades steril, suspensi *P. Gingivalis*.

### 3.7 Sampel Penelitian

#### 3.7.1 Kriteria Sampel

##### a. Sampel penelitian ini adalah isolat neutrofil

Isolat neutrofil diambil dari darah vena perifer orang dewasa sehat dengan kriteria tidak mempunyai riwayat kelainan darah dan tidak memiliki kebiasaan merokok serta bersedia mengisi *informed consent*.

##### b. Daun sambiloto

Daun sambiloto yang digunakan adalah daun yang sudah dalam bentuk kering.

##### c. *Porphyrromonas gingivalis*

*P. gingivalis* yang digunakan adalah strain ATCC 33277

#### 3.7.2 Kelompok Percobaan

Penelitian ini terdapat 5 kelompok percobaan yang terdiri dari kelompok kontrol, perlakuan I, perlakuan II, perlakuan III, perlakuan IV lebih jelasnya dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 3.1 Pembagian Kelompok Percobaan

| Kelompok      | Percobaan                                       |
|---------------|---|
| Kontrol       | Neutrofil + <i>P. gingivalis</i>                |
| Perlakuan I   | Neutrofil + ekstrak 25% + <i>P. gingivalis</i>  |
| Perlakuan II  | Neutrofil + ekstrak 50% + <i>P. gingivalis</i>  |
| Perlakuan III | Neutrofil + ekstrak 75% + <i>P. gingivalis</i>  |
| Perlakuan IV  | Neutrofil + ekstrak 100% + <i>P. gingivalis</i> |

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

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

Keterangan:

n = besar sampel tiap kelompok

$\sigma$  = standart deviasi sampel

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

z = nilai pada tingkat kesalahan tertentu, jika  $\alpha = 0,05$  maka  $z = 1.96$

Penghitungannya adalah sebagai berikut:

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

Dari hasil penghitungan diatas, diperoleh besar sampel minimal yang digunakan dalam penelitian ini adalah 4 sampel untuk setiap kelompok.

### 3.8 Prosedur Penelitian

#### 3.8.1 Mensterilkan Alat

Semua peralatan dicuci bersih kemudian disterilkan di dalam alat sterilisasi (oven) khusus untuk peralatan yang terbuat dari bahan kaca dan logam seperti tabung falcon, gelas ukur, dan lain-lain selama 15 menit dan alat yang terbuat dari bahan yang tidak tahan panas disterilisasi menggunakan alkohol agar terbebas dari invasi bakteri.

#### 3.8.2 Prosedur Pembuatan Ekstrak Etanol Sambiloto

Proses pembuatan ekstraksi dilakukan di Laboratorium Fitokimia UPT Materica Medica Batu dengan perincian sebagai berikut:

1. Timbang serbuk daun sambiloto sebanyak 400 g
2. Lakukan pembasahan serbuk dengan pelarut etanol 96% secukupnya
3. Masukkan serbuk daun sambiloto yang telah dibasahi dengan pelarut ke dalam toples, diratakan dan sambil ditambahkan pelarut etanol 96% sampai serbuk terendam, total yang digunakan sebanyak 2000 ml. Tutup toples dengan rapat selama 48 jam. Dan dishaker di atas shaker digital rpm 50.
4. Saring ekstrak cair dengan penyaring kain. Tampung ekstrak dalam Erlenmeyer
5. Lakukan remaserasi pada ampas sebanyak dua kali dengan cara dimasukkan kembali ke dalam toples dan ditambahkan dengan pelarut sampai terendam (minimal 5 cm di atas permukaan serbuk). Kemudian dibiarkan semalam atau 48 jam di atas shaker. Masing-masing remaserasi menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 1.000 ml.
6. Hasil ekstrak cair pertama sampai dengan terakhir dijadikan satu dan diuapkan dengan menggunakan rotary evaporator besar. Diperlukan waktu 2,5 jam untuk evaporasi.
7. Ekstrak cair yang dihasilkan kemudian dievaporasi/ diupkan kembali di atas water bath selama 1 jam.
8. Ekstrak sambiloto diencerkan dengan aquades sesuai konsentrasi yaitu 75%, 50%, dan 25% diperoleh dengan menggunakan rumus dibawah ini:

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

Keterangan: M1 = kadar konsentrasi awal

M2 = kadar konsentrasi akhir

V1 = volume awal

V2 = volume akhir

Cara pengencerannya:

- a. Untuk memperoleh ekstrak sambiloto 75% sebanyak 2 ml:

$$100\% \times V1 = 75\% \times 2$$

$$4 \times V1 = 3 \times 2$$



$$V1 = 1,5 \text{ ml}$$

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

- b. Untuk memperoleh ekstrak sambiloto 50% sebanyak 2 ml:

$$100\% \times V1 = 50\% \times 2$$

$$4 \times V1 = 2 \times 2$$

$$V1 = 1 \text{ ml}$$

Jadi, ekstrak sambiloto 100% harus diencerkan dengan menambahkan akuades sebanyak 1 ml ke dalam 1 ml ekstrak sambiloto 100%.

- c. Untuk memperoleh ekstrak sambiloto 25% sebanyak 2 ml:

$$100\% \times V1 = 25\% \times 2$$

$$4 \times V1 = 1 \times 2$$

$$V1 = 0,5 \text{ ml}$$

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

### 3.8.3 Pengambilan Sampel Darah

Pengambilan darah (whole blood) sebanyak 9 cc dari darah vena perifer orang sehat (yang telah menandatangani *informed consent*) dengan menggunakan *dysposable syringe* secara intravena pada fossa cubiti pada tangan kanan, kemudian darah tersebut dibagi dalam tiga tabung heparin (antikoagulan).

### 3.8.4 Prosedur Isolasi Neutrofil

1. Pengambilan darah vena pada subjek sebesar 9 cc lalu dibagi menjadi tiga tabung dengan jumlah masing-masing 3 cc.
2. Masukkan ke dalam tabung heparin dan digoyang-goyang agar darah bercampur dengan antikoagulan (*heparinized whole blood*) sehingga tidak menggumpal.

3. Sentrifugasi dengan kecepatan 600 rpm selama 10 menit pada suhu ruang 21° C untuk memisahkan plasma dari sel darah dan mengurangi kontaminasi platelet.
4. Plasma darah dibuang, sedangkan *buffy coat* yang mengandung sel darah diaspirasi.
5. Selanjutnya dilapiskan pada *ficoll hypaque* 1119 sebanyak 3 ml secara hati-hati didalam tabung falcon dengan teknik ujung mikro pipet ditempelkan pada dinding tabung dan disemprotkan secara perlahan-lahan, hal ini untuk mencegah pecahnya *ficoll*.
6. Lapiskan 3 ml *Lymphocyte Separation Medium* (LSM) diatas *ficoll hypaque* 1119.
7. Setelah itu 6 ml darah dimasukkan perlahan kedalam tabung berisi *ficoll hypaque* 1119 dan LSM tadi.
8. Sentrifugasi dengan kecepatan 1900 rpm selama 30 menit pada suhu ruang 21° C. Setelah disentrifugasi maka akan terbentuk enam lapisan, yaitu dari teratas:
  - a. plasma,
  - b. monosit,
  - c. larutan LSM,
  - d. neutrofil,
  - e. larutan *ficoll hypaque*,
  - f. eritrosit.
9. Plasma yang terbentuk diatas mononuklear diaspirasi dan dibuang, lalu *buffy coat* monosit diaspirasi dan dimasukkan ke dalam tabung falcon lain untuk penelitian lainnya. LSM yang berada diatas *buffy coat* neutrofil diaspirasi dan dibuang.
10. *Buffy coat* yang mengandung neutrofil diaspirasi menggunakan pipet mikro dan dimasukkan ke dalam tabung falcon.

11. *Buffy coat* neutrofil kemudian dicuci 2x menggunakan HBSS 1000 µl dan disentrifugasi 1700 rpm selama 10 menit pada suhu ruang 21° C.
12. Supernatan hasil sentrifugasi dibuang. Pelet neutrofil diresuspensi menggunakan HBSS sebanyak 2 ml.
13. 100 µl neutrofil ditempelkan pada *cover glass* lalu diamati dibawah mikroskop untuk melihat populasi sel neutrofil, lalu difiksasi methanol dan di cat giemsa.
14. Suspensi neutrofil dilapiskan ke dalam sumur *microplate* yang didasarnya telah diberi *cover slip*, 100 µl tiap sumur dan diinkubasi dalam inkubator shaker selama 15 menit pada suhu ruang 21° C. Hal ini bertujuan untuk melekatkan neutrofil pada *coverslip*.
15. Kemudian ditambahkan *penicillin-streptomycin* sebanyak 20 µl dan *fungizone* sebanyak 5 µl, kemudian dilakukan *pipetting*. Selanjutnya neutrofil diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang 21° C, hingga neutrofil makin melekat pada *coverslip*.
16. Isolat neutrofil siap untuk uji lebih lanjut.

#### 3.8.5 Inkubasi Neutrofil dengan Ekstrak Etanol Sambiloto

Isolat neutrofil dalam *microplate* diinkubasi dengan ekstrak etanol sambiloto. Pada kelompok kontrol negatif tidak diberi ekstrak tapi diberi HBSS untuk mempertahankan kehidupan sel, pada kelompok perlakuan I ditambahkan 200 µl ekstrak etanol sambiloto dengan konsentrasi 25%, pada kelompok perlakuan II ditambahkan 200 µl ekstrak etanol sambiloto dengan konsentrasi 50%, pada kelompok perlakuan III ditambahkan 200 µl ekstrak etanol sambiloto dengan konsentrasi 75%, dan pada kelompok perlakuan IV ditambahkan 200 µl ekstrak etanol sambiloto dengan konsentrasi 100% dan diletakkan pada *incubator shaker* selama 15 jam. Setelah diinkubasi, suspensi media dibuang, digantikan dengan M199 sebanyak 1000 µl. Pada masing-masing sampel ditambahkan 100 µl suspensi *Porphyromonas gingivalis*.

### 3.8.6 Pemaparan *Porphyromonas gingivalis*

Pada masing-masing tabung sumur *microplate* dipapar 100 µl suspensi *Porphyromonas gingivalis* konsentrasi  $3 \times 10^6$  lalu diinkubasi pada *inkubator shaker* diamati tiap 1 jam pada suhu 37° C selama 4 jam.

### 3.8.7 Uji Viabilitas Neutrofil

1. Setelah pemaparan dengan P. Gingivalis, kemudian isolat neutrofil dicuci dua kali dengan HBSS lalu resuspensi dengan 50 µl HBSS.
2. Satu-persatu sumuran kemudian diberi *trypan blue* 50 µl diratakan memenuhi cover slip dan inkubasi selama 3 menit. 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.
3. Sel neutrofil yang berwarna putih bening atau tidak menyerap pewarnaan *trypan blue* dihitung sebagai sel neutrofil yang hidup.
4. Hasil pemotretan dihitung dengan cara menghitung sel yang hidup saja pada setiap lapang pandang dengan perbesaran 400 kali pada setiap sampel. Persentase viabilitas neutrofil diperoleh dengan menggunakan rumus:

$$\text{Viabilitas sel (\%)} = \frac{\text{Jumlah sel neutrofil yang hidup}}{\text{Jumlah sel neutrofil seluruhnya}} \times 100\%$$

### 3.9 Prosedur Penanganan Limbah Laboratorium

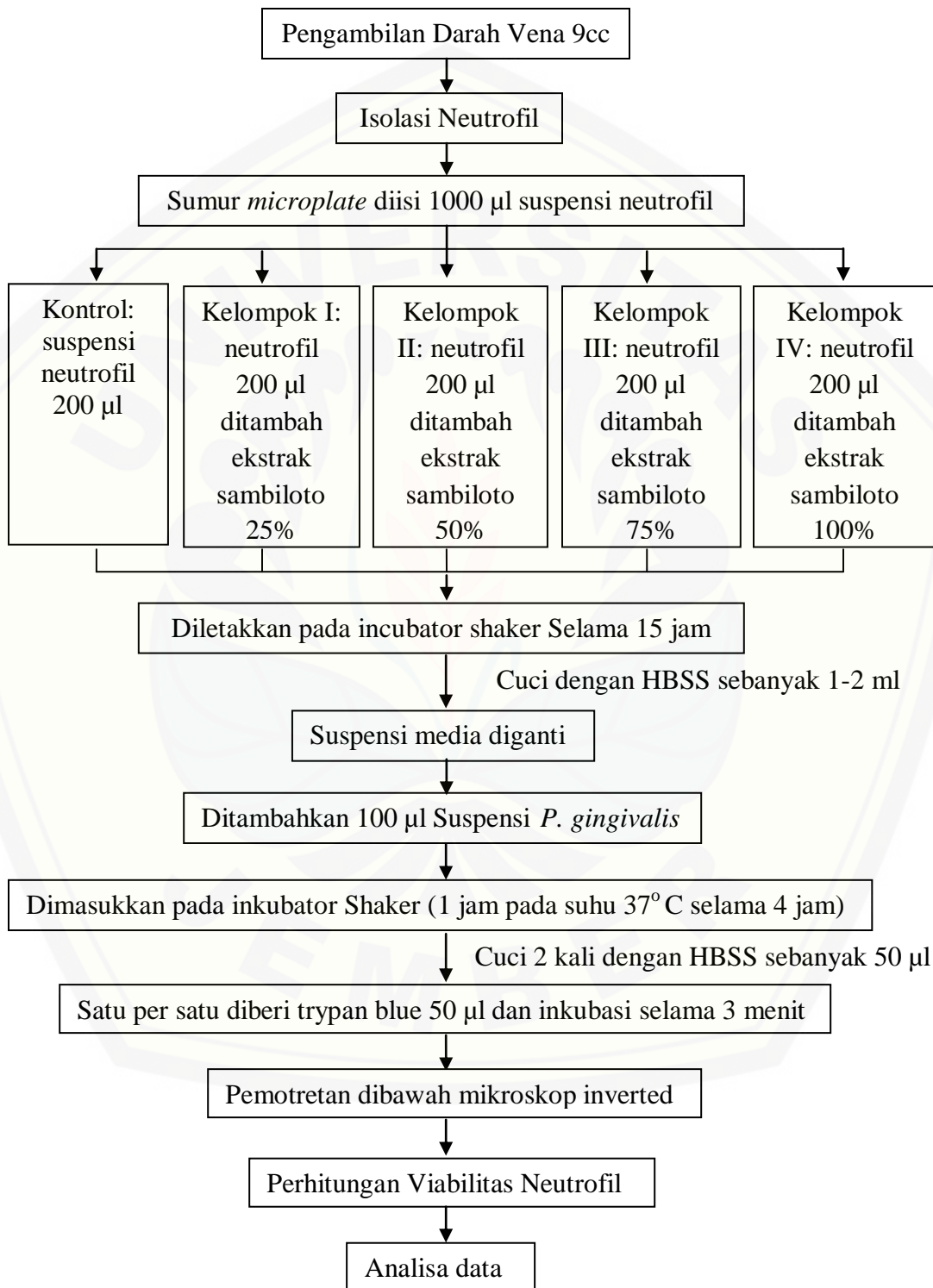
1. Petugas atau peneliti menggunakan sarung tangan dan masker bila perlu sebelum penanganan limbah.
2. Membersihkan dengan air, dicampur sabun pembersih untuk limbah berupa tumpahan bahan kimia di area kerja kemudian di pel atau di lap sampai bersih dan kering.

3. Membuang langsung ke wastafel untuk cairan yang mudah larut dalam air dengan dibilas menggunakan kran mengalir sedangkan untuk cairan yang bersifat asam atau basa perlu dinetralkan terlebih dahulu sebelum dibuang.
4. Media agar yang sebelumnya ditumbuhi bakteri, plastik, botol, peralatan yang terkontaminasi, dan vaksin disterilisasi terlebih dahulu dengan Autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit kemudian dimasukkan dalam kantong plastik untuk selanjutnya dibuang ke tempat pembuangan.
5. Membuang langsung ke tempat sampah untuk tisu, kertas, botol dan limbah tidak berbahaya atau tidak terkontaminasi mikroorganisme.

### 3.10 Analisis Data

Penelitian ini, data yang didapatkan dianalisis menggunakan uji Kolmogorov Smirnov untuk uji normalitas dan uji Levene untuk uji homogenitas. Jika data yang dihasilkan terdistribusi normal dan homogen, maka dilakukan uji statistik parametrik, yaitu One Way ANOVA dan dilanjutkan uji LSD. Semua uji menggunakan tingkat kemaknaan 95% ( $\alpha=0,05$ ) (Notoatmodjo, 2005)

### 3.11 Alur Penelitian



## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) konsentrasi 25% dan 50% dapat meningkatkan viabilitas neutrofil yang dipapar *Porphyromonas gingivalis* secara in vitro, sedangkan pada ekstrak etanol daun sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) konsentrasi 75% dan 100% tidak dapat dihitung karena ekstrak yang terlalu pekat.

### 5.2 Saran

- 5.2.1 Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui konsentrasi ekstrak etanol daun sambiloto yang paling efektif untuk meningkatkan viabilitas neutrofil yang dipapar *P. gingivalis*.
- 5.2.2 Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai kandungan zat aktif pada ekstrak etanol daun sambiloto konsentrasi 25% dan 50% dan mekanismenya yang dapat meningkatkan viabilitas neutrofil.
- 5.2.3 Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai viabilitas sel leukosit lainnya yang dipapar *Porphyromonas gingivalis* setelah diinkubasi ekstrak etanol daun sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.).
- 5.2.4 Perlu dilakukan pengujian lebih lanjut mengenai aplikasi daun sambiloto sebagai pengembangan terapi dalam bidang kedokteran gigi salah satunya sebagai pengobatan setelah perawatan periodontal.
- 5.2.5 Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai penggunaan pelarut dan cara ekstraksi daun sambiloto yang paling efektif untuk meningkatkan viabilitas neutrofil yang dipapar *P. gingivalis*.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Achmad, S. A., E. H. Hakim, L. Makmur, Y. M. Syah, L. D. Juliawaty, dan D. Mujahidin. 2008. *Ilmu Kimia dan Kegunaan: Tumbuh-tumbuhan Obat Indonesia*. Bandung: Penerbit ITB.
- Arzumanyan, V. G. and I. M. Ozhovan. 2002. Modified Method for Evaluation of Plasma Membrane Integrity in Eukaryotic Cell. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 134(1): 103-105.
- Bodet, C., F. Chandad, and D. Grenier. 2007. Pathogenic potential of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*, the Red Bacterial Complex Associated with Periodontitis. *Pathologie Biologie*. 55(3-4): 154-162.
- Chao, W. W. and B. F. Lin. 2010. Isolation and Identification of Bioactive Compounds in *Andrographis paniculata* (Chuanxinlian). *Chinese Medicine*. 5(17): 1-15.
- Dalimunthe, A. 2009. Interaksi Sambiloto (*Andrographis paniculata*). <http://repository.usu.ac.id/bitstream/123456789/3618/1/10E00504.pdf>. [Diakses pada 15 Oktober 2015].
- Daniel, W. W. 2005. *Biostatistics: A Foundation for Analysis in the Health Sciences*. Eight Edition. Hoboken NJ: Georgia Wiley.
- Dalimartha, S. dan M. Soediby. 1999. *Awet Muda dengan Tumbuhan Obat no Diet Suplemen*. Jakarta: Trubus Agriwidya.
- Duncan, M., F. Dewhirst, and T. Chen. 2002. *Porphyromonas gingivalis* Genome Project. <http://www.pgingivalis.org/aims.htm>. [Diakses pada 25 Oktober 2015].



- Dyatmiko, W., M. H. Santosa dan A. F. Hafid. 2000. *Aktifitas Penangkapan Radikal Bebas Dalam Sistem Molekuler dan Seluler Sari Air Rimpang Tanaman Obat Zingiberaceae*. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, Surabaya, Pusat Penelitian Obat Tradisional Universitas Airlangga.
- Eroschenko, V. P. 2010. *Atlas Histologi diFiore: dengan Korelasi Fungsional*. Jakarta: EGC.
- Ferencik, L. J. 1997. *Immunology for Life Scientific a Basic Introduction*. New York: John Wiley and Sons.
- Guentsch, A., M. Puklo, P. M. Preshaw, E. Glockman, W. Pfister, J. Potempa, and S. Eick. 2009. Neutrophils in Chronic and Aggressive Periodontitis in Interaction with *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res.* 44(3): 368–377.
- Guyton, A. C. dan J. E. Hall. 2007. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Jakarta: EGC.
- Handayani, T. 2013. *Apotek Hidup*. Jakarta: Padi.
- Harty, F. J. 1995. *Kamus Kedokteran Gigi*. Jakarta: EGC.
- Kumar, Dr.R. 2013. *Dasar-dasar Patofisiologi Penyakit*. Tangerang Selatan/Jakarta: BINARUPA AKSARA Publisher.
- Kusumawardani, B., P. Pujiastuti, dan D. Sandrasari. 2010. Uji Biokimiawi Sistem API 20 A Mendeteksi *Porphyromonas gingivalis* Isolat Klinik dari Plak Subgingiva Pasien Periodontitis Kronis. *Jurnal PDGI.* 59(3): 110-114.
- Martínez A. B., M. M. Corcuera, S. Noronha, P. Mota, C. B. Ilundain, and J. C. Trapero. 2009. Host Defence Mechanisms Against Bacterial Aggression in Periodontal Disease: Basic Mechanisms. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 14(12): e680-e685.

- Muhlisah, F. 2007. *Tanaman Obat Keluarga (TOGA)*. Jakarta: PT. Seri Agri Sehat
- Newman, M. G., H. H. Takei, P. R. Klokkevold, and F. A. Carranza. 2006. *Carranza's Clinical Periodontology*. 10<sup>th</sup> Edition. Philadelphia: Saunders.
- Nield-Gehrig, J. S. and D. E. Willmann. 2011. *Foundations of Periodontics for the Dental Hygienist Third Edition*. Amerika Serikat: Wolters Kluwer Health.
- Prapanza, I. dan L. A. Marianto. 2003. *Khasiat dan Manfaat Sambiloto Raja Pahit Penakluk Aneka Penyakit*. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Praptiwi, S. F., S. H. Muis, dan Suryono. 2011. Sumbangan All-Trans Asam Retinoat (ATRA) Bagi Penyembuhan Periodontitis. *Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dan Ikatan Dokter Indonesia Wilayah Jawa Tengah*. 45(3): 1-5.
- Pelczar, M. J. dan E.C.S. Chan. 1988. *Dasar – Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: UI Press.
- Rais, I. R. 2015. Isolasi dan Penentuan Kadar Flavonoid Ekstrak Etanolik Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.F.) Ness). *Jurnal Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan*. 5(1): 101-106.
- Rose, L. F., B. J. Steinberg, and L. Minsk. 2000. The Relationship between Periodontal Disease and Systemic Conditions. *Compend Contin Educ Dent*. 21(10A): 870-878.
- Sembiring, B. B. 2009. Pengaruh Konsentrasi Bahan Pengisi dan Cara Pengeringan terhadap Mutu Ekstrak Kering Sambiloto. *Bul. Litro*. 20(2): 173-181.
- Shafie, F. M. 2011. Hubungan Radikal Bebas Dan Antioksidan Terhadap Penyakit Periodontal. Skripsi. Medan: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Sumatra Utara.
- Shen, Y. C., C. F. Chen, and W. F. Chiou. 2002. Andrographolide Prevents Oxygen Radical Production by Human Neutrophils: Possible Mechanism(s) Involved in

its Anti-inflammatory Effect. *British Journal of Pharmacology*. 135(2): 399-406.

Sivananthan, M. and M. Elamaran. 2013. Medicinal and Pharmacological Properties of *Andrographis paniculata*. *International Journal of Biomolecules and Biomedicine*. 3(2): 1-12.

Srijanto, B., O. Bunga, L. Khojayanti, E. Rismana, dan Sriningsih. 2012. Pemurnian Ekstrak Etanol Sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness.) dengan Teknik Ekstraksi Cair-Cair. *Pusat Teknologi Farmasi dan Medika-BPPT KO-26-KO-29*.

Underwood, J. C. E. 1999. *Patologi Umum dan Sistemik*. Jakarta: EGC.

Utami, P. dan D. E. Puspaningtyas. 2013. *The Miracle of Herbs*. Jakarta: AgroMedia Pustaka.

Widyawati, T. 2007. Aspek Farmakologi Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees). *Majalah Kedokteran Nusantara*. 40(3): 216-222.

Wilson, T. G. and K. S. Kornman. 1996. *Fundamentals of Periodontics*. China: Quintessence Publishing Co, Inc.

Warditiani, N. K., L. P. F. Larasanty, I. N. K. Widjaja, N. P. M. Juniari, A. E. Nugroho, dan S. Pramono. 2014. Identifikasi Kandungan Kimia Ekstrak Terpurifikasi Herba Sambiloto. *Volume Article ID 476068*: 22-25.

Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.

Yulinah, E., Sukrasno, dan M. A. Fitri. 2001. Aktivitas Antidiabetika Ekstrak Etanol Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees (Acanthaceae)). *Jurnal Matematika dan Sains Jurusan Farmasi FMIPA ITB*. 6(1): 13-20.

**LAMPIRAN A. Data Hasil Penelitian**

| Kelompok Perlakuan | Viabel | Rata-rata Viabilitas | Standar Deviasi |
|--------------------|--------|----------------------|-----------------|
| Kelompok Kontrol   | 66     | 66,25                | 9,3             |
|                    | 55     |                      |                 |
|                    | 78     |                      |                 |
|                    | 66     |                      |                 |
| Kelompok I         | 88     | 86                   | 3,16            |
|                    | 82     |                      |                 |
|                    | 89     |                      |                 |
|                    | 85     |                      |                 |
| Kelompok II        | 98     | 96,5                 | 1,2             |
|                    | 97     |                      |                 |
|                    | 96     |                      |                 |
|                    | 95     |                      |                 |

**LAMPIRAN B. Hasil Analisis Statistik**

**B.1 Uji Normalitas Data**

**Descriptive Statistics**

|            | N  | Mean  | Std. Deviation | Minimum | Maximum |
|------------|----|-------|----------------|---------|---------|
| Viabilitas | 12 | 82.92 | 14.100         | 55      | 98      |

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

|                                 |                | Viabilitas |
|---------------------------------|----------------|------------|
| N                               |                | 12         |
| Normal Parameters <sup>a</sup>  | Mean           | 82.92      |
|                                 | Std. Deviation | 14.100     |
| Most Extreme Differences        | Absolute       | .142       |
|                                 | Positive       | .142       |
|                                 | Negative       | -.142      |
| Kolmogorov-Smirnov Z            |                | .493       |
| Asymp. Sig. (2-tailed)          |                | .968       |
| a. Test distribution is Normal. |                |            |
|                                 |                |            |

**B.2 Uji Homogenitas Data****Test of Homogeneity of Variances**

Viabilitas

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 1.691            | 2   | 9   | .238 |

**B.3 Uji One Way ANOVA****ANOVA**

Viabilitas

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F      | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 1887.167       | 2  | 943.583     | 28.331 | .000 |
| Within Groups  | 299.750        | 9  | 33.306      |        |      |
| Total          | 2186.917       | 11 |             |        |      |

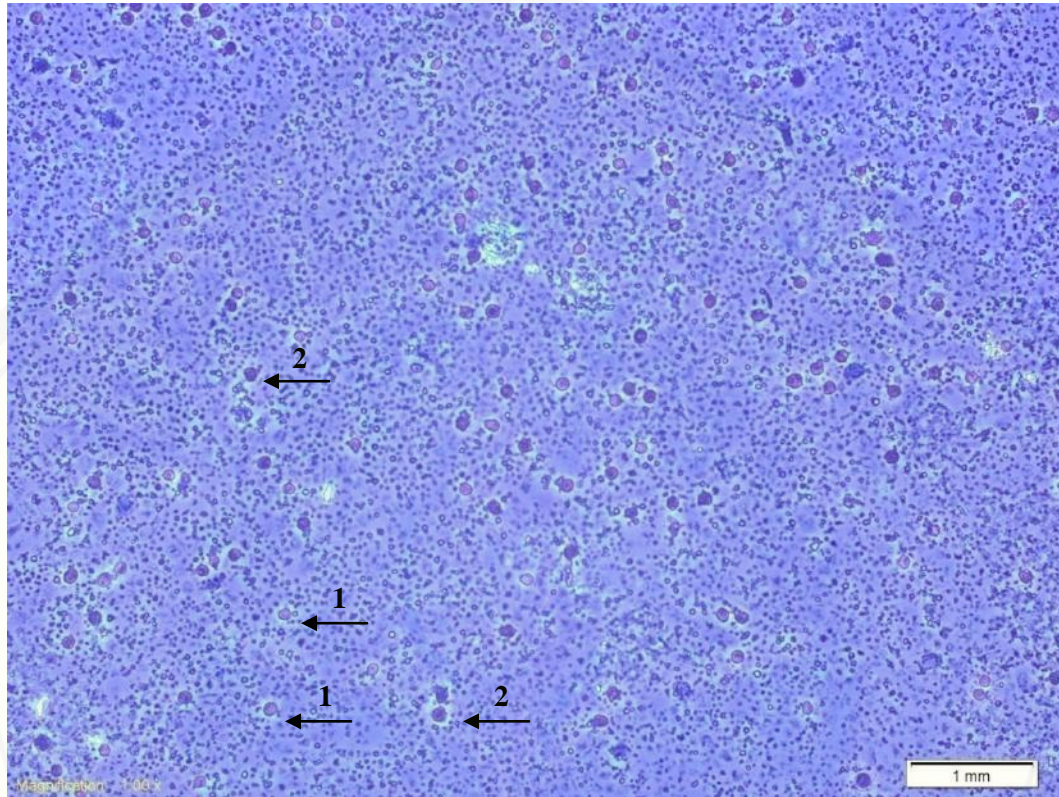
**B.4 Uji LSD****Multiple Comparisons**

Viabilitas

LSD

| (I)<br>Variabel | (J)<br>Variabel | Mean Difference<br>(I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval |             |
|-----------------|-----------------|--------------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
|                 |                 |                          |            |      | Lower Bound             | Upper Bound |
| 1               | 2               | -19.750*                 | 4.081      | .001 | -28.98                  | -10.52      |
|                 | 3               | -30.250*                 | 4.081      | .000 | -39.48                  | -21.02      |
| 2               | 1               | 19.750*                  | 4.081      | .001 | 10.52                   | 28.98       |
|                 | 3               | -10.500*                 | 4.081      | .030 | -19.73                  | -1.27       |
| 3               | 1               | 30.250*                  | 4.081      | .000 | 21.02                   | 39.48       |
|                 | 2               | 10.500*                  | 4.081      | .030 | 1.27                    | 19.73       |

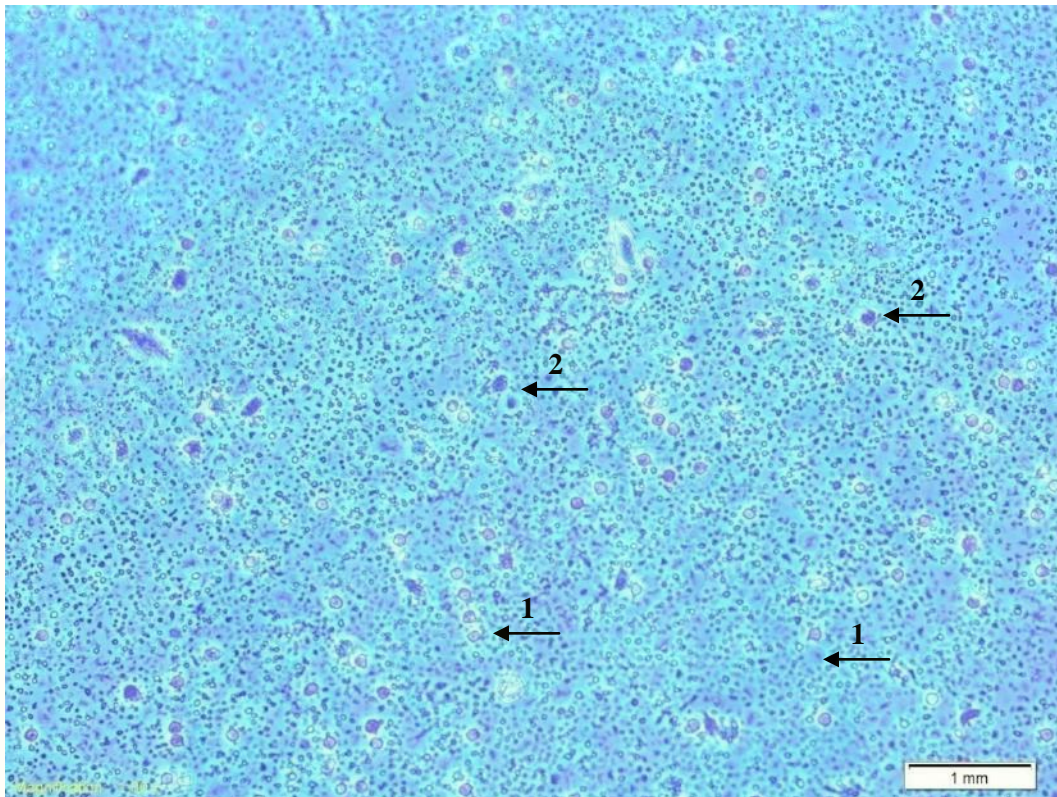
\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

**LAMPIRAN C. Foto Hasil Penelitian****C.1 Kelompok kontrol**

Neutrofil yang dipapar *P. gingivalis*: (1) sel hidup (bening) (2) sel mati (gelap) dengan perbesaran 400x

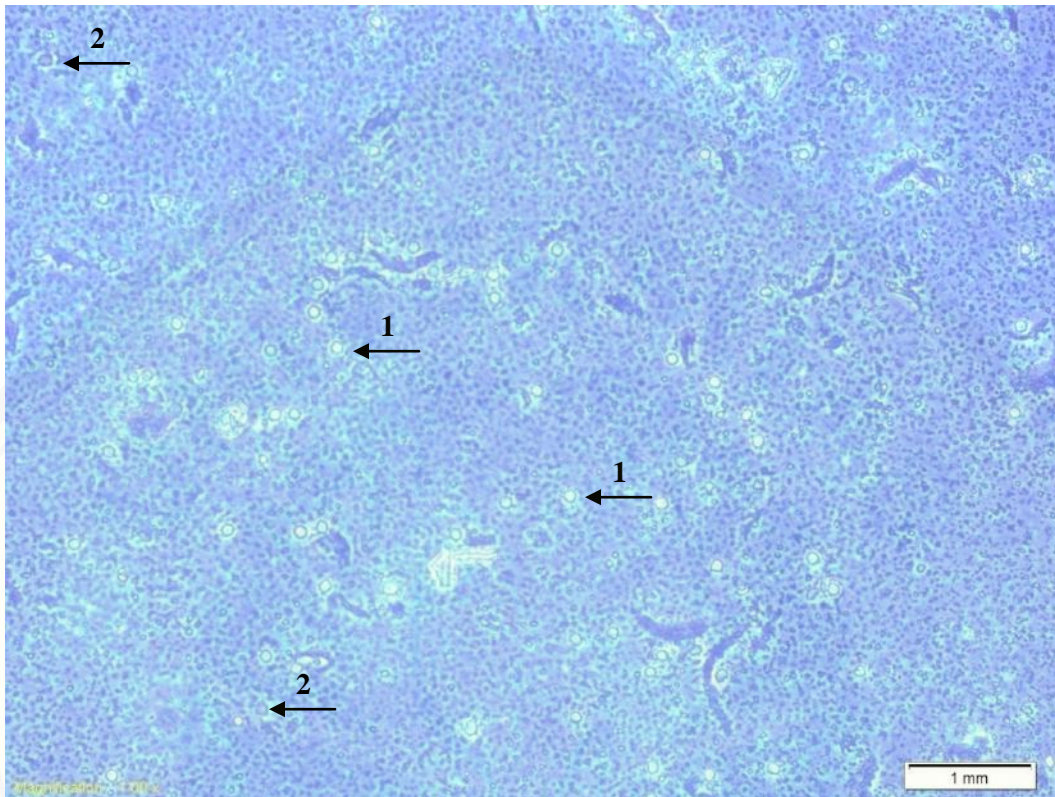


### C.2 Kelompok Perlakuan I



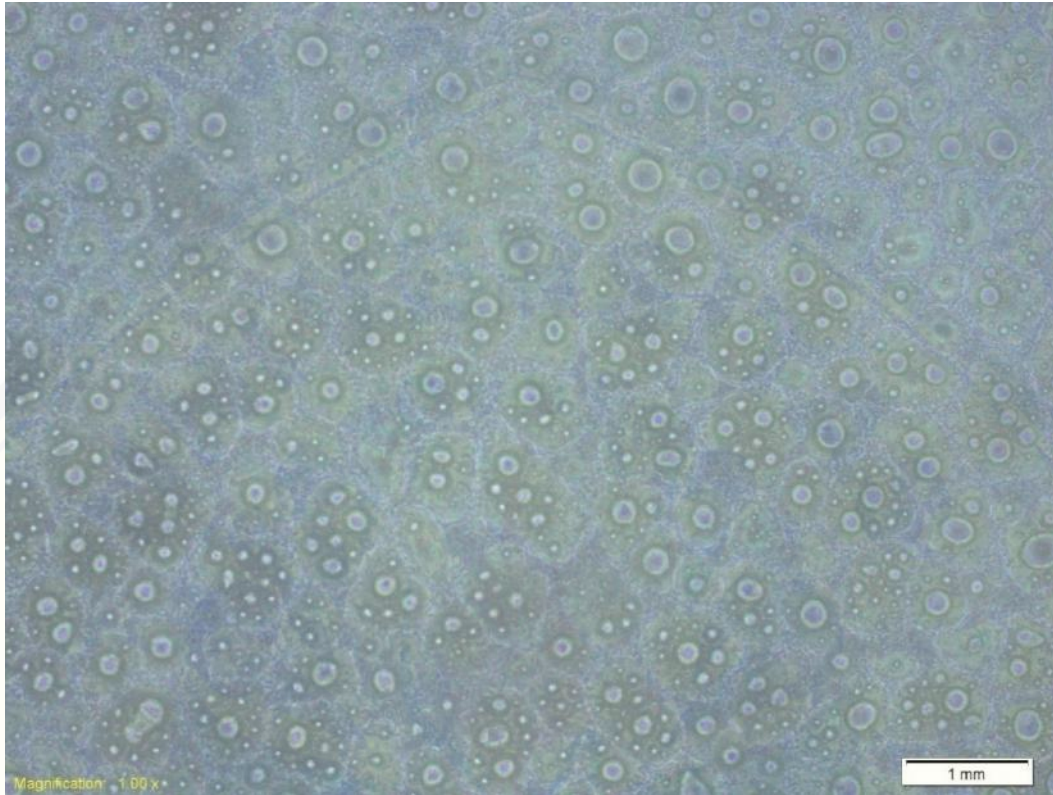
Neutrofil yang diinkubasi dengan ekstrak etanol daun sambiloto 25% setelah itu dipapar *P. gingivalis*: (1) sel hidup (bening) (2) sel mati (gelap) dengan perbesaran 400x

### C.3 Kelompok Perlakuan II



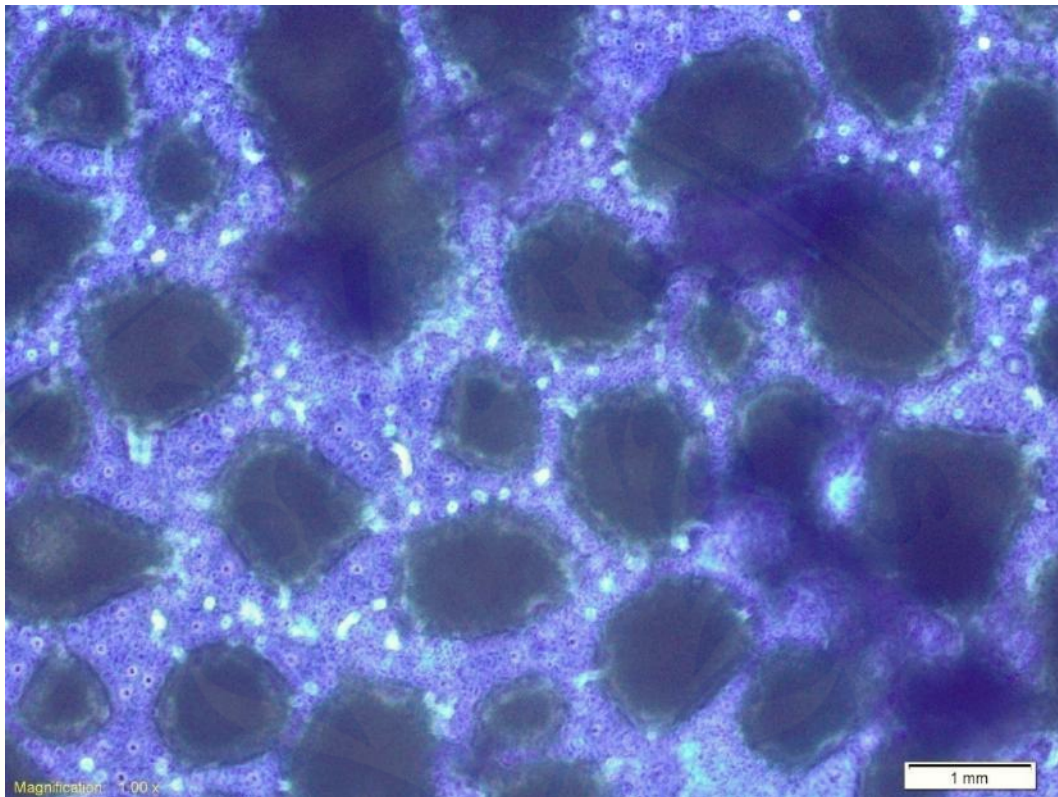
Neutrofil yang diinkubasi dengan ekstrak etanol daun sambaloto 50% setelah itu dipapar *P. gingivalis*: (1) sel hidup (bening) (2) sel mati (gelap) dengan perbesaran 400x

#### C.4 Kelompok Perlakuan III

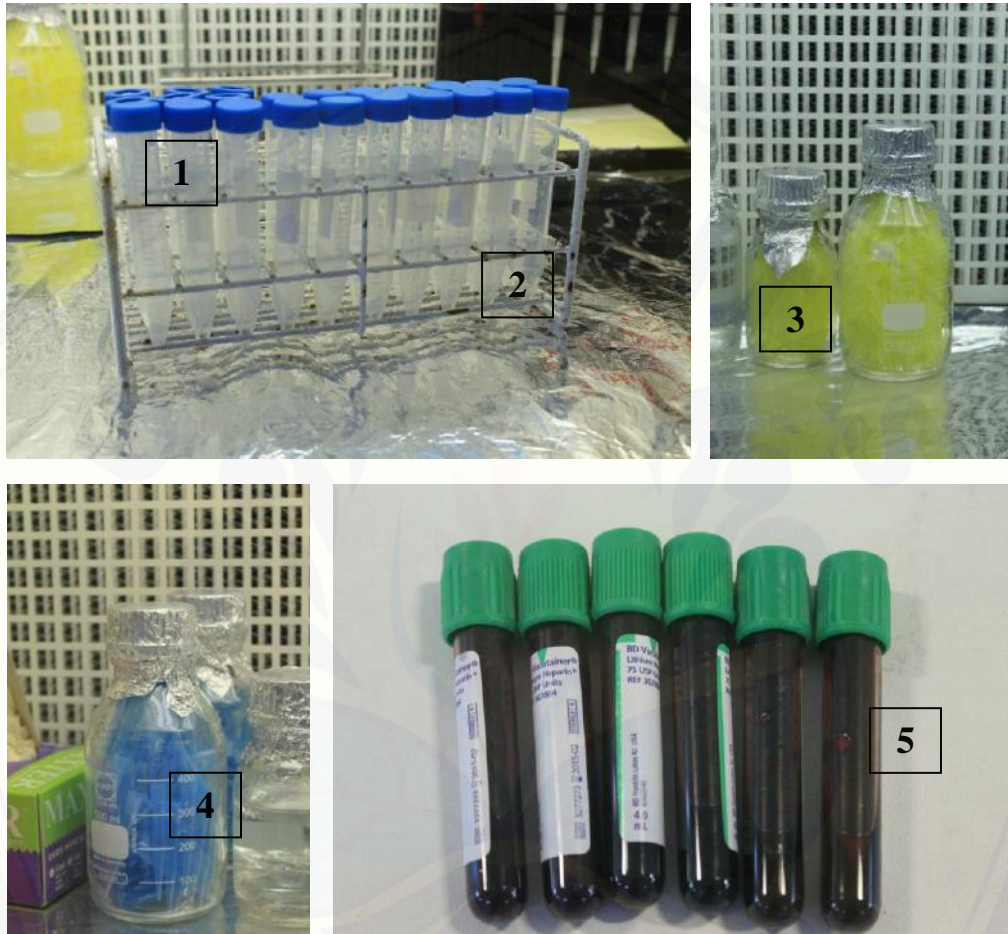


Neutrofil yang diinkubasi dengan ekstrak etanol daun sambilito 75% setelah itu dipapar *P. gingivalis*: sel neutrofil tidak dapat dihitug karena ekstrak etanol daun sambilito terlalu pekat.

### C.5 Kelompok Perlakuan IV

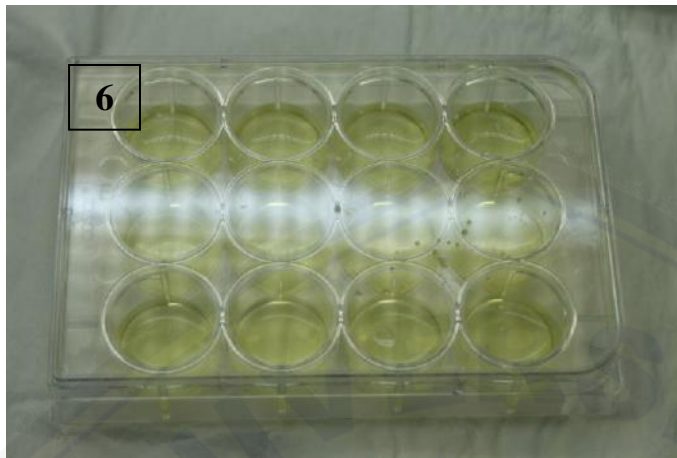


Neutrofil yang diinkubasi dengan ekstrak etanol daun sambiloto 100% setelah itu dipapar *P. gingivalis*: sel neutrofil tidak dapat dihitung karena ekstrak etanol daun sambiloto terlalu pekat.

**LAMPIRAN D. Alat dan Bahan Penelitian****D.1 Alat Penelitian**

Keterangan:

1. Tabung falcon
2. Rak tabung
3. *Yellowtip*
4. *Bluetip*
5. Tabung heparin



Keterangan:

6. *Microplate*
7. *Vortex*
8. *Incubator shaker*
9. *Neraca digital*



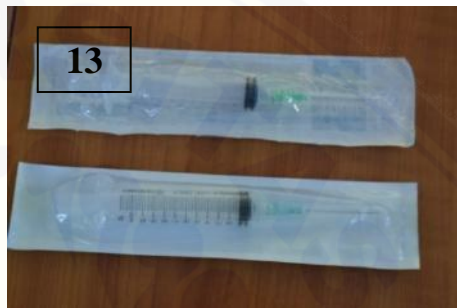
10



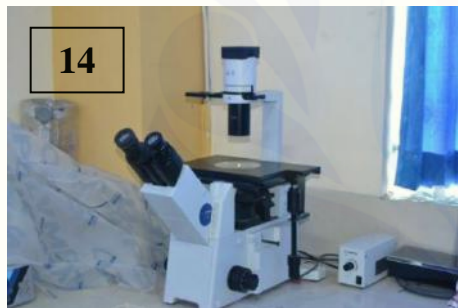
11



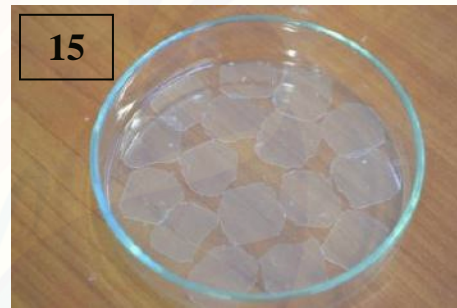
12



13



14

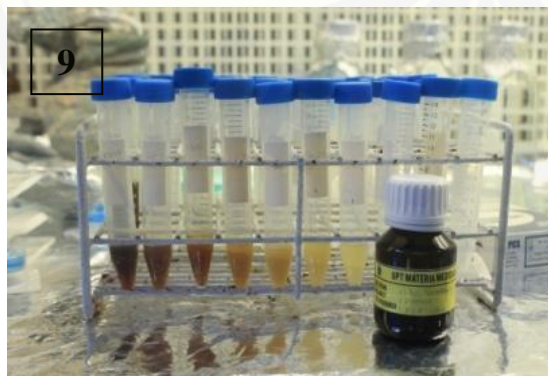
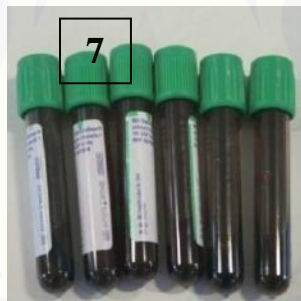
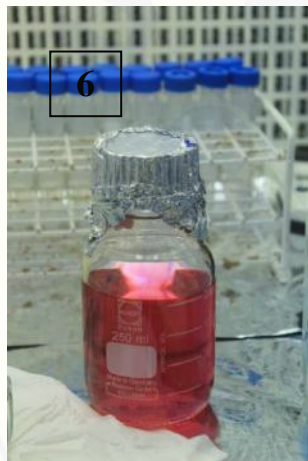
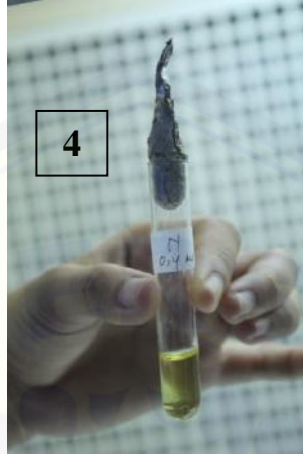
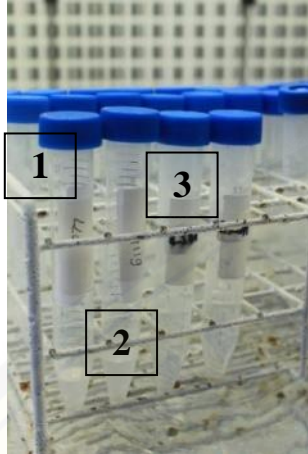


15

Keterangan:

- 10. *Centrifuge*
- 11. *Laminar Flow Cabinet*
- 12. *Micro pipette*
- 13. *Dysposable syringe*
- 14. *Mikroskop inverted*
- 15. *Cover slip*

**D.2 Bahan Penelitian**




**Keterangan:**

1. *Fycoll Hypaque 1077*
2. *Fycoll Hypaque 1119*
3. *Lymphocyte Separation Medium*
4. Suspensi bakteri *P. Gingivalis*
5. M199
6. *Medium Complete RPMI*
7. *Hank Balanced Salt Solution (HBSS)*
8. Darah vena perifer
9. Ekstrak etanol daun sambiloto



## LAMPIRAN E. Surat Ijin Penelitian

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

---

Nomor : 1165 /UN25.8.TL/2016  
Perihal : Ijin Penelitian


Kepada Yth.  
Direktur RSGM Universitas Jember  
di  
Jember

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

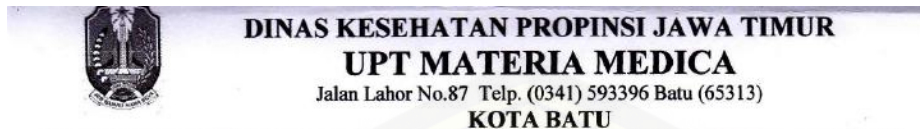
1. Nama : Dewi Martinda Hartono  
2. NIM : 111610101073  
3. Tahun Akademik : 2015/2016  
4. Fakultas : Kedokteran Gigi Universitas Jember  
5. Alamat : Jl. Mastrip IX No. 45 B Jember  
6. Judul Penelitian : Viabilitas Neutrofil Yang Dipapar Porphyromonas Gingivalis Setelah Pemberian Ekstrak Etanol Sambiloto (Andrographis Paniculata Nees)  
7. Lokasi Penelitian : Lab. Bioscience RSGM Universitas Jember  
8. Data/alat yang dipinjam : Inkubator shaker  
9. Waktu : April 2016 s/d Selesai  
10. Tujuan Penelitian : Untuk Mengetahui Viabilitas Neutrofil Yang Dipapar Porphyromonas Gingivalis Setelah Pemberian Ekstrak Etanol Sambiloto (Andrographis Paniculata Nees)  
11. Dosen Pembimbing : 1. drg. Yenny Yustisia, M.Biotech  
2. Dr. drg. Didin Erma I, M.Kes

Demikian atas perkenan dan kerjasama yang baik disampaikan terima kasih.

Jember,  
an. Dekan  
Pembantu Dekan I

  
Drg. IDA Susilawati, M.Kes  
NIP. 196109031986022001

## LAMPIRAN F. Surat Keterangan Identifikasi Tanaman Sambiloto



Nomor : 074/600/101.8/2015  
Sifat : Biasa  
Perihal : **Determinasi Tanaman Sambiloto**

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : DEWI MARTINDA HARTONO  
NIM/ NIP : 111610101073  
FAKULTAS : FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER

1. Perihal determinasi tanaman sambiloto

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)  
Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)  
Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)  
Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)  
Kelas : Dicotyledonae  
Bangsa : Solanales  
Suku : Acanthaceae  
Marga : *Andrographis*  
Jenis : *Andrographis paniculata* Nees  
Sinonim : *Justicia stricta* Lamk. = *J. paniculata* Burm. = *J. latebrosa* Russ.  
Nama Daerah : Ki oray, ki peurat, takilo (Sunda); bidara, sadilata, sambilata, takila (Jawa); pepaitan (Sumatra).  
Kunci Determinasi : 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14b-16 a-239b-243b-244b-248b-249b-250a-251b-253b-254b-255a-256a-257b-259a-2b.

2. Morfologi : Habitus: Herba, semusim, tinggi ±50 cm. Batang: Berkayu, pangkal bulat, masih muda bentuk segi empat setelah tua bulat, percabangan monopodial, hijau. Daun: Tunggal, bulat telur, bersilang berhadapan, pangkal dan ujung runcing, tepi rata, panjang ±5 cm, lebar ±1.5 cm, pertulangan menyirip panjang tangkai ±30 mm, hijau keputih-putihan, hijau. Bunga: Majemuk, bentuk tandan, di ketiak daun dan di ujung batang, kelopak lanset, berbagi lima, pangkal berlekatan, hijau, benang sari dua, bulat panjang, kepala sari bulat, ungu, putik pendek, kepala putik ungu kecoklatan, mahkota lonjong, pangkal berlekatan, ujung pecah menjadi empat, bagian dalam putih bernoda ungu, bagian luar berambut, merah. Buah: Kotak, bulat panjang, ujung runcing, tengah beralur, masih muda hijau setelah tua hitam. Biji: Kecil, bulat, masih muda putih kotor setelah tua coklat. Akar: Tunggang, putih kecoklatan.

3. Nama Simplisia : *Andrographis Foliolum*/ Daun Sambiloto

4. Kandungan : Daun dan percabangannya mengandung laktone yang terdiri dari deoksiandrografolid, andrografolid (zat pahit), neoandrografolid, 14-deoksi-11-12-didehidroandrografolid, dan homoandrografolid. Juga terdapat flavonoid, alkane, keton, aldehid, mineral (kalium, kalsium, natrium), asam kersik, dan damar. Flavonoid diisolasi terbanyak dari akar, yaitu polimetoksisflavon, andrografin, pan.ikulin, mono-O-metilwithin, dan apigenin-7,4- dimetileter.

5. Penggunaan : Penelitian

6. Daftar Pustaka

- Anonim. 2006. *Serial Tanaman Obat "SAMBILOTO"*. Badan POM Republik Indonesia.
- Anonim. <http://www.iptek.net.id/sambiloto>, diakses tanggal 15 Desember 2010.
- Anonim. <http://www.plantamor.com/sambiloto>, diakses tanggal 11 Desember 2010.
- Anonim. <http://www.warintek.ristek.go.id/sambiloto>, diakses tanggal 11 Mei 2007.
- Syamsuhidayat, Sri Sugati dan Hutapea, Johny Ria. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia I*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan.
- Van Steenis, CGGJ. 2008. *FLORA*. Pradnya Paramita, Jakarta.

Demikian surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 2 November 2015  
Kepala UPT Materia Medica Batu  
  
Dr. Husin R.M., Drs., Apt., MKes.

## LAMPIRAN G. Surat Keterangan Ekstrak Tanaman Sambiloto



## DINAS KESEHATAN PROVINSI JAWA TIMUR

## UPT MATERIA MEDICA

Jalan Lahor No.87 Telp. (0341) 593396 Batu (65313)

KOTA BATU

Nomor : 074/599/101.8/2015  
 Sifat : Biasa  
 Perihal : **Surat Keterangan Ekstrak tanaman Sambiloto**

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : DEWI MARTINDA HARTONO  
 NIM/NIP : 111610101073  
 FAKULTAS : FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
 UNIVERSITAS JEMBER

Kami menerangkan bahwa yang bersangkutan telah melakukan ekstraksi untuk bahan penelitian dari tanaman Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.). Adapun proses pembuatan di lakukan di Laboratorium Fitokimia UPT Materia Medica Batu dengan perincian sebagai berikut :

|       |  |   |
|-------|--|---|
| BAHAN | : Serbuk daun sambiloto<br>Etanol 96 %<br>Kertas saring                        |   |
| ALAT  | : Toples bertutup<br>Corong gelas<br>Timbangan analitik<br>Gelas ukur<br>Botol | Erlenmeyer<br>Rotary evaporator besar<br>Beaker glass<br>Shaker digital |

**Cara Kerja :**

1. Timbang serbuk daun sambiloto sebanyak 400 g.
2. Lakukan pembasahan serbuk dengan pelarut etanol 96% secukupnya.
3. Masukkan serbuk daun sambiloto yang telah dibasahi dengan pelarut ke dalam toples, diratakan dan sambil ditambahkan pelarut etanol 96% sampai serbuk terendam, total yang digunakan sebanyak 2.000 mL. Tutup toples dengan rapat selama 48 jam. Dan dishaker di atas shaker digital rpm 50.
4. Saring ekstrak cair dengan penyaring kain. Tampung ekstrak dalam Erlenmeyer.
5. Lakukan remaserasi pada ampas sebanyak dua kali dengan cara dimasukkan kembali ke dalam toples dan ditambahkan dengan pelarut sampai terendam (minimal 5 cm di atas permukaan serbuk). Kemudian dibiarkan semalam atau 48 jam di atas shaker. Masing-masing remaserasi menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 1.000 mL.
6. Hasil ekstrak cair pertama sampai dengan terakhir dijadikan satu dan diuapkan dengan menggunakan rotary evaporator besar. Diperlukan waktu 2,5 jam untuk evaporasi.
7. Ekstrak cair yang dihasilkan kemudian dievaporasi/ diuapkan kembali di atas water bath selama 1 jam.

**Hasil :**

1. Dari serbuk daun sambiloto 400 g dan diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 4.000 mL dihasilkan ekstrak cair sebanyak 100 mL.

Demikian keterangan ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 2 November 2015

Kepala UPT Materia Medica Batu

*Mallalena*  
 Dr. Husin RM, Drs., Apt., MKes.  
 NIP.19611102 199103 1 003

LAMPIRAN H. Surat Keterangan Identifikasi Bakteri *Porphyromonas gingivalis*

**LABORATORIUM MIKROBIOLOGI  
BAGIAN BIOMEDIK KEDOKTERAN GIGI  
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER**

**SURAT KETERANGAN**  
**No. 098/ MIKRO/ S.KET/ 2016**

Sehubungan dengan keperluan identifikasi mikroorganisme, maka kami menerangkan bahwa mahasiswa berikut:

Nama : Dewi Martinda Hartono  
NIM : 111610101073  
Fakultas : Kedokteran Gigi  
Keperluan : Penelitian Skripsi

Telah melakukan uji identifikasi terhadap isolat bakteri *Porphyromonas gingivalis* dengan menggunakan pengecatan Gram dan diamati secara mikroskopis menunjukkan hasil coccobacillus Gram-negatif dan tidak terkontaminasi.

Jember, 17 April 2016

Mengetahui,

Kepala Bagian Biomedik Kedokteran Gigi

Penanggung Jawab Lab.Mikrobiologi

(Prof. Dr. drg. I Dewa Ayu Ratna D., M.Si)  
NIP. 197605021997022001

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

LAMPIRAN I. *Informed Consent*Surat Persetujuan (*Informed Consent*)

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Dhani Yanuar P.  
Umur : 23 tahun.  
Jenis kelamin : Laki-laki  
Alamat : Perum Mastrip A-11.

Menyatakan dengan sesungguhnya, tanpa ada paksaan dari pihak lain, bersedia menjadi subyek penelitian dari:

Nama : Dewi Martinda Hartono  
NIM : 111610101073  
Fakultas : Kedokteran Gigi Universitas Jember  
Alamat : Jalan Mastrip IX no. 45B Jember

Dengan judul "Viabilitas Neutrofil yang Dipapar *Porphyromonas gingivalis* setelah Diinkubasi Ekstrak Etanol Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.)" dan saya juga bersedia menanggung segala resiko yang mungkin terjadi dengan catatan apabila tindakan tersebut terbukti tidak menyalahi prosedur yang telah ditetapkan.

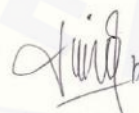
Adapun keterangan mengenai prosedur pelaksanaan, persiapan tindakan, dan lain-lain telah diberikan oleh peneliti.

Demikian surat pernyataan ini saya buat,

Jember, 9 Mei 2016

Peneliti,

Yang Membuat Pernyataan,



(Dewi Martinda Hartono)



(DHANI YANUAR P.)

LAMPIRAN J. Surat Keterangan *Ethical Clearance*

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK PENELITIAN**  
**("ETHICAL CLEARANCE")**

No.00652/KKEP/FKG-UGM/EC/2016

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

Judul : **VIABILITAS NEUTROFIL YANG DIPAPAR *Porphyromonas gingivalis* SETELAH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL DAUN SAMBILOTO (*Andrographis Paniculata* Nees.)**

Peneliti Utama : Dewi Martinda Hartono

Penanggung Jawab Medis : drg. Yenny Yustisia, M.Biotech

Unit/Lembaga : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Lokasi Penelitian : Laboratorium Bioscience Rumah Sakit Gigi dan Mulut  
 Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Waktu Penelitian : Mei – Juni 2016

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

Yogyakarta, 18 Mei 2016

Wakil Dekan Bidang Akademik dan Kemahasiswaan

drg. Diatri Nani Ratih, M.Kes., Sp. KG, Ph.D.

Ketua Komisi Etik Penelitian FKG UGM

drg. Suryono, S.H, Ph.D