



**PENGARUH EKSTRAK FLAVONOID DAUN TEMBAKAU KASTURI
TERHADAP KADAR *INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE*
PADA *HUMAN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL*
YANG DIPAPAR LIPOPOLISAKARIDA *Porphyromonas gingivalis***

SKRIPSI

Oleh

**Hanifah Nailul Amania
NIM 141610101013**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2018**



**PENGARUH EKSTRAK FLAVONOID DAUN TEMBAKAU KASTURI
TERHADAP KADAR *INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE*
PADA *HUMAN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL*
YANG DIPAPAR LIPOPOLISAKARIDA *Porphyromonas gingivalis***

SKRIPSI

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

Oleh

Hanifah Nailul Amania
NIM 141610101013

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2018

PERSEMBAHAN

Dengan setulus hati skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Ibunda Harmiati, Ayahanda Dwi Rachmad Tjahjono, dan Adik tercinta Ahmad Fa'iz Mishbahuddin atas segala kasih sayang, motivasi, nasehat dan bimbingan, serta doa setulus hati yang tiada henti diberikan sampai saat ini;
2. Ibu Ummi Masnu'ah dan Abah Rofi' atas segala ilmunya, kasih sayang, nasehat dan bimbingan serta doa setulus hati;
3. Guruku yang telah menuangkan ilmunya dan membimbing sejak TK hingga Perguruan Tinggi;
4. Semua teman-teman 2014, Kakak tingkat, dan Adik tingkat yang telah berjuang bersama-sama di Almamater tercinta ini;
5. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

MOTO

Man Jadda Wa Jada, Siapa yang bersungguh-sungguh akan berhasil

Man Shobaro Dzafira, Siapa yang bersabar akan beruntung

Man Saara ‘Alaa Darbi Washala, Siapa yang berjalan di jalan-Nya akan sampai di tujuan

“Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Maka apabila engkau telah selesai (dari sesuatu urusan), tetaplah bekerja keras (untuk urusan yang lain). Dan hanya kepada Tuhanmulah engkau berharap”
(Q.S Al Insyirah ayat 6, 7 dan 8)*

*Hatta, Ahmad, Dr, MA. 2017. Tafsir Qur’an Perkata. *Cetakan ke-7 Tahun 2017.*

Jakarta: Maghfirah Pustaka

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Hanifah Nailul Amania

NIM : 141610101013

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Pengaruh Ekstrak Flavonoid Daun Tembakau Kasturi terhadap Kadar *Inducible Nitric Oxide Synthase* pada *Human Peripheral Blood Mononuclear Cell* yang Dipapar Lipopolisakarida *Porphyromonas gingivalis*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, Mei 2018

Yang menyatakan,

Hanifah Nailul Amania

NIM 141610101013

SKRIPSI

**PENGARUH EKSTRAK FLAVONOID DAUN TEMBAKAU KASTURI
TERHADAP KADAR *INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE*
PADA *HUMAN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL*
YANG DIPAPAR LIPOPOLISAKARIDA *Porphyromonas gingivalis***

Oleh

**Hanifah Nailul Amania
NIM 1416101013**

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : drg.Dwi Warna Aju Fatmawati, M.Kes

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

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Pengaruh Ekstrak Flavonoid Daun Tembakau Kasturi terhadap Kadar *Inducible Nitric Oxide Synthase* pada *Human Peripheral Blood Mononuclear Cell* yang Dipapar Lipopolisakarida *Porphyromonas gingivalis*” ini telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember pada :

hari :
tanggal : Mei 2018
tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Dosen Penguji Utama,

Dosen Penguji Anggota

Prof.Dr.drg. I Dewa Ayu Ratna Dewanti, M.Si
NIP 196705021997022001
Dosen Pembimbing Utama

drg.Agustin Wulan Suci D, MD.Sc
NIP. 197908142008122003
Dosen Pembimbing Pendamping

drg.Dwi Warna Aju Fatmawati, M.Kes
NIP. 197012191999032001

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

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember,

drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Prost
NIP. 196901121999601001

RINGKASAN

Pengaruh Ekstrak Flavonoid Daun Tembakau Kasturi terhadap Kadar *Inducible Nitric Oxide Synthase* pada *Human Peripheral Blood Mononuclear Cell* yang Dipapar Lipopolisakarida *Porphyromonas gingivalis*; Hanifah Nailul Amania, 1416101013, 58 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) merupakan komoditi unggulan Kabupaten Jember. Tembakau jenis Kasturi merupakan jenis tembakau yang banyak dibudidayakan di daerah Jember dan Bondowoso (Jawa Timur). Daun tembakau secara umum hanya dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan rokok yang dapat menyebabkan dampak negatif pada manusia. Daun tembakau mengandung bahan aktif yang bermanfaat berupa flavonoid. Flavonoid memiliki aktivitas antioksidan, antibakteri, anti thrombosis, antivirus, antialergi, anti kanker dan anti-inflamasi. Periodontitis adalah penyakit inflamasi yang disebabkan oleh patogen periodontal, salah satunya adalah bakteri *P. gingivalis*. Lipopolisakarida yang ditemukan di membran luar bakteri Gram-negatif dapat memicu respon imun yang kuat setelah mengikat *Toll-like receptor 4* (TLR4) pada permukaan *human peripheral blood mononuclear cell* (h-PBMC). Sel-sel tersebut terlibat dalam sistem imunitas seluler dan dapat mensekresikan sitokin pro inflamatori yang akan merangsang pembentukan mediator inflamasi nitrit oksida (NO) dari jalur iNOS. Selama ini, obat golongan AINS (Anti Inflamasi Non Steroid) adalah obat utama yang digunakan untuk menghambat aktivitas inflamasi. Namun, penggunaan obat ini juga memiliki efek samping pada saluran pencernaan dan sistem kardiovaskuler yang dapat menurunkan fungsi biologis tubuh. Oleh sebab itu, penggunaan bahan herbal merupakan pilihan alternatif sebagai obat anti-inflamasi untuk mencegah timbulnya efek samping tersebut. Penelitian mengenai pengaruh ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi terhadap kadar iNOS belum pernah dilakukan.

Ekstrak flavonoid rendah nikotin limbah daun tembakau kasturi dilakukan dengan menggunakan metode hidrolisis dan refluks. Hidrolisis dilakukan dengan menggunakan HCL untuk melarutkan nikotin dan refluks berulang yang sebelumnya ditambahkan HCL dan etanol 80%, serta ditambahkan pelarut protelem eter dan acetonitril untuk mengambil flavonoid. Hasil ekstrak diuji dengan menggunakan LC-MS/MS. Penelitian ini menggunakan konsentrasi ekstrak flavonoid 2,5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 80 µg/ml, 320 µg/ml, 640 µg/ml. Isolasi h-PBMC darah pendonor yang diambil dari pembuluh darah vena pada *fosaa cubiti*. Proses isolasi h-PBMC dilakukan dengan cara sentrifugasi gradien menggunakan *ficollpaque*. Jumlah sel yang digunakan adalah 1×10^5 cell/well didistribusikan ke dalam 96 well-plate (2 plate) dan diinkubasi ke dalam inkubator CO₂ 5%, 37°C selama 24 jam. Pemaparan dengan lipopolisakarida *P. gingivalis* *Ultrapure* (INVIVOGEN) dengan konsentrasi 10 µg/ml. Ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi sebanyak 100 µl ditambahkan pada kelompok kontrol dengan konsentrasi 2,5 µg/ml (PI), 10 µg/ml

(PII), 20 µg/ml (PIII), 40 µg/ml (PIV), 80 µg/ml (PV), 320 µg/ml (PVI) dan 640 µg/ml (PVII). Kelompok kontrol (K) hanya berisi lipopolisakarida dan tidak diberi ekstrak flavonoid. Uji kadar iNOS dengan metode ELISA dengan panjang gelombang 450 nm untuk mengukur kadar iNOS pada h- PBMC yang dipapar lipopolisakarida *P.gingivalis* dan diberikan ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi.

Hasil penelitian menunjukkan ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi cenderung menurunkan produksi iNOS pada h-PBMCs yang distimulasi lipopolisakarida *P. gingivalis* selama masa inkubasi 24 jam dan 48 jam. Konsentrasi ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi 80 µg/ml dipilih sebagai konsentrasi optimum dalam menghambat produksi iNOS pada h-PBMCs yang distimulasi lipopolisakarida. Pemilihan konsentrasi optimum 80 µg/ml didukung dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi dengan konsentrasi 80 µg/ml memiliki viabilitas yang baik dan daya anti-bakteri yang kuat terhadap bakteri *P. gingivalis*. Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa Ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi cenderung menghambat produksi iNOS pada h-PBMCs yang distimulasi lipopolisakarida selama 24 jam dan 48 jam serta konsentrasi optimum ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi dalam menghambat produksi iNOS pada h-PBMCs yang distimulasi lipopolisakarida dengan konsentrasi 80 µg/ml

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengaruh Ekstrak Flavonoid Daun Tembakau Kasturi terhadap Kadar *Inducible Nitric Oxide Synthase* pada *Human Peripheral Blood Mononuclear Cell* yang Dipapar Lipopolisakarida *Porphyromonas gingivalis*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

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

1. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Pros., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
2. drg. Dwi Warna Aju Fatmawati, M.Kes., dan Dr. drg. Banun Kusumawardani, M.Kes., selaku dosen pendamping penelitian dan dosen pembimbing skripsi.
3. Prof. Dr. drg. I Dewa Ayu Ratna Dewanti, M.Si., dan drg. Agustin Wulan Suci D, MDSc., selaku dosen pendamping penelitian dan dosen penguji skripsi.
4. drg. Niken Probrosari, M.Kes., selaku dosen pembimbing akademik.
5. Ibunda Harmiati dan Ayahanda Dwi Rachmad Tjahjono, orangtuaku tercinta yang selalu mendukung, mendampingi, memberikan nasihat dan motivasi, Adikku Ahmad Fa'iz Mishbahuddin yang selalu ada untuk memberikan semangat.
6. Ibunda Ummi Masnu'ah dan Abah Rofi', orangtuaku di pondok yang selalu mendampingi, memberikan ilmunya dan mengiringi setiap langkahku dengan doa setulus hati.
7. Tim Penelitian ini: Tazqia, Aisha, Iga, Agis, Ditto, Nancy, Sakti, Idris, Kartika, Fergy, Putu dan Karel yang telah mencurahkan segala tenaga, waktu dan pikirannya serta kebersamaannya dalam penelitian.

8. Sahabat satu atap Al-Ma'unah Mbak Nova, Ken Iqlima, Ashliech, Zura, Novi, Defi, Mbak Udhma, Mbak Shobi yang selalu menemani, mendoakan dan memberikan semangat dalam menyelesaikan skripsi.
9. Sahabatku sejak maba Erlita Prestiandari dan Tazqia Jamil Pratami yang selalu ada dan memberikan semangat.
10. Seluruh staf di fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang mendukung dalam penulisan ini.
11. Ibu Rumbiwati selaku Staf Laboran Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM yang telah membantu dalam penelitian.
12. Seluruh teman-teman LECI FKG angkatan 2014 yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu. Terima kasih atas dukungan dan doa kalian selama ini.
13. Seluruh teman KKN PPM 03 Arjasa atas dukungan dan doa kalian selama ini.
14. Seluruh teman seperjuangan BPM periode 2017 dan 2018 atas dukungan dan doa kalian selama ini.
15. Semua pihak yang telah membantu kegiatan penelitian; atas perhatian, perkenan dan bantuan yang telah diberikan hingga tersusunya skripsi ini.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pendidikan khususnya dibidang kesehatan serta menjadi upaya dalam meningkatkan mutu kesehatan masyarakat.

Jember, Mei 2018

Penulis

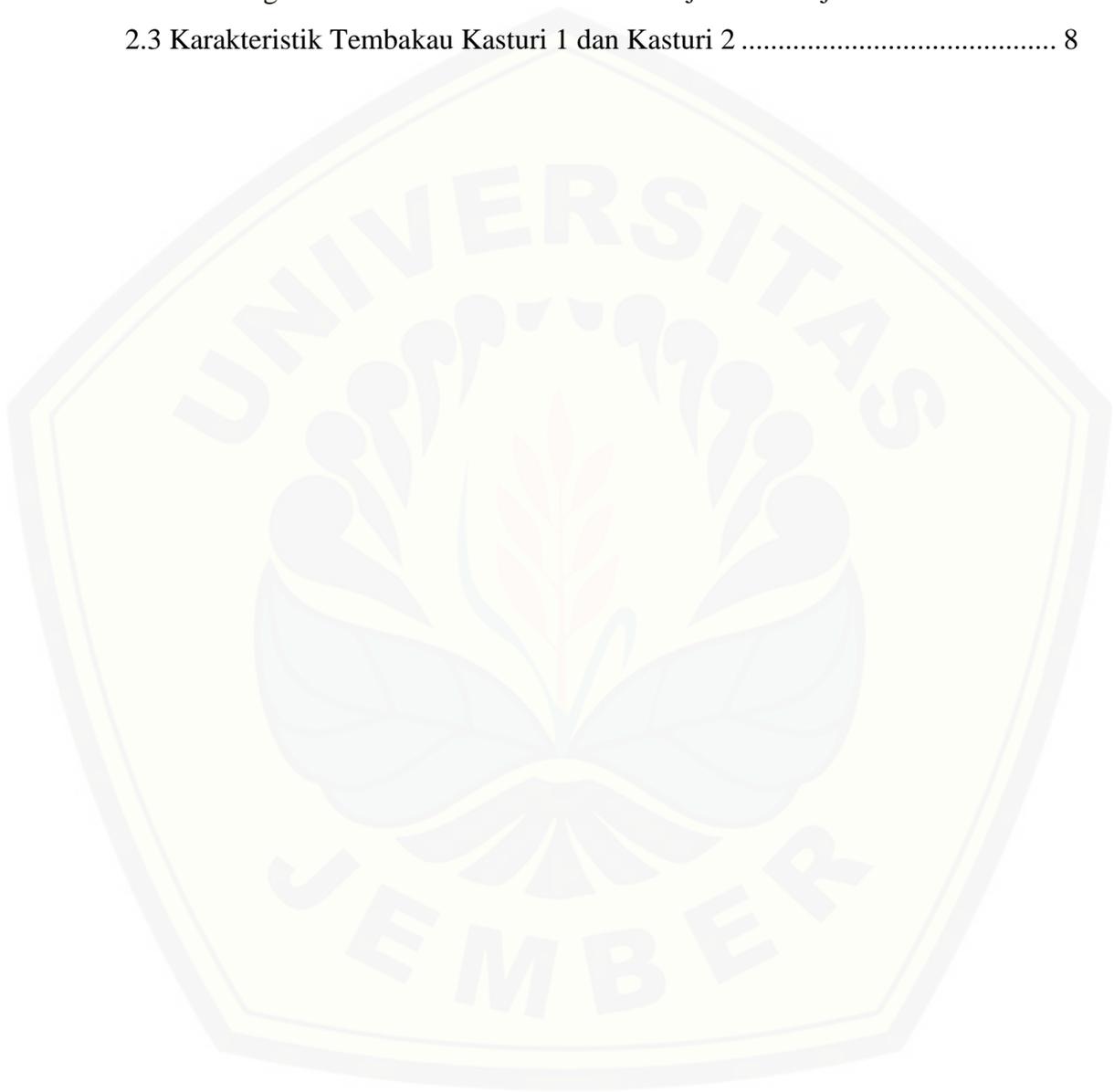
DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Tembakau	5
2.1.1 Morfologi Tembakau.....	5
2.1.2 Kandungan Daun Tembakau	6
2.2 Tembakau Kasturi	7
2.3 Flavonoid.....	9
2.4 Inflamasi.....	11
2.5 <i>inducible nitric oxide synthase (iNOS)</i>	11
2.6 <i>Human Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC)</i>	12
2.7 Lipopolisakarida <i>Porphyromonas gingivalis</i>	13
2.8 Kerangka Konseptual	14
2.9 Hipotesis.....	16

BAB 3. METODE PENELITIAN	17
3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	17
3.2 Tempat Penelitian	17
3.3 Waktu Penelitian	17
3.4 Variabel Penelitian	17
3.5 Definisi Operasional	18
3.6 Pengelompokan Sampel Penelitian	18
3.7 Alat dan Bahan Penelitian	19
3.7.1 Alat yang dipakai pada penelitian ini adalah	19
3.7.2 Bahan yang digunakan dalam penelitian	20
3.8 Prosedur Penelitian	21
3.8.1 Tahap Persiapan	21
3.8.2 Prosedur Ekstraksi Flavonoid Daun Tembakau Kasturi	21
3.8.3 Pengenceran Flavonoid Daun Tembakau Kasturi	22
3.8.4 Prosedur Pengambilan Sampel	23
3.8.5 Isolasi h-PBMC	25
3.8.6 Prosedur Penghitungan Sel	28
3.8.8 Pemaparan Lipopolisakarida	29
3.8.7 Inkubasi Flavonoid pada h-PBMC	29
3.8.9 Uji Kadar iNOS dengan Metode ELISA	31
3.9 Analisis data	34
3.10 Alur Penelitian	36
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	38
4.1 Hasil Penelitian dan Analisis Data	38
4.2 Pembahasan	40
BAB 5. Kesimpulan dan Saran	45
5.1 Kesimpulan	45
5.2 Saran	45
DAFTAR PUSTAKA	46
LAMPIRAN	53

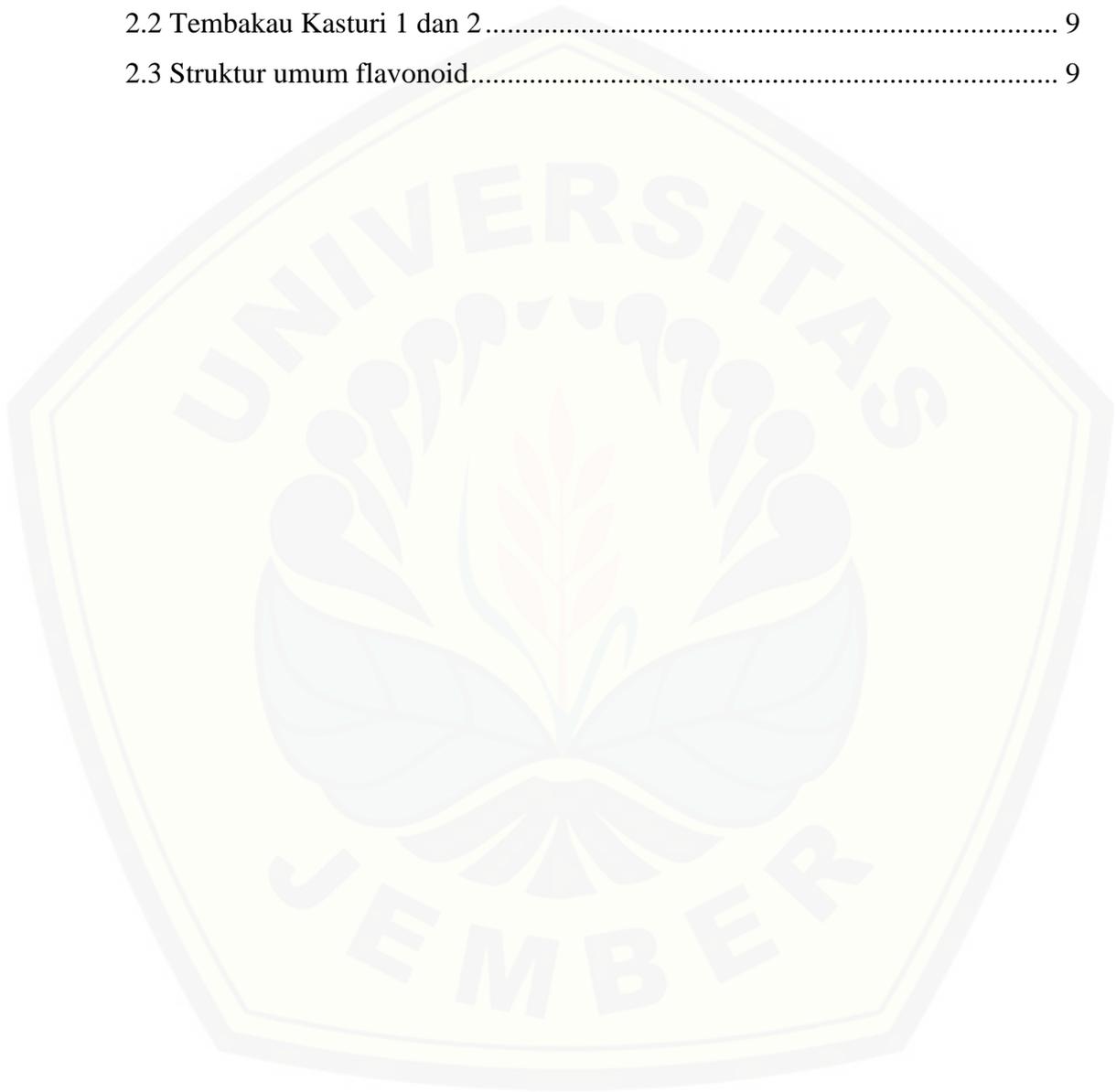
DAFTAR TABEL

2.1 Susunan Kimia Daun Tembakau menurut Cahyono	7
2.2 Kandungan Daun Tembakau menurut Podlejskidan Olejniczak.....	7
2.3 Karakteristik Tembakau Kasturi 1 dan Kasturi 2	8



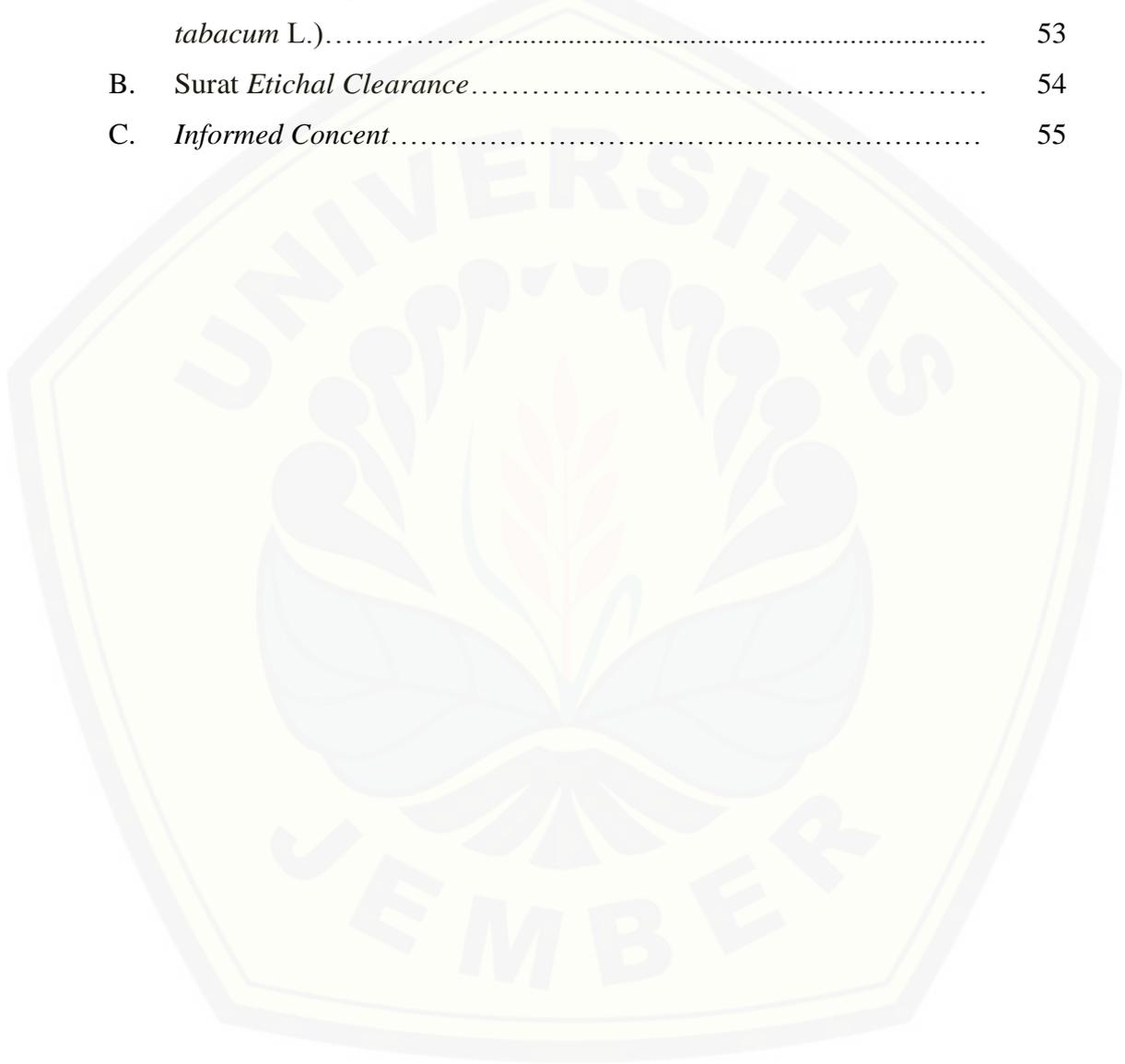
DAFTAR GAMBAR

2.1 Tanaman tembakau dan klasifikasi daun tembakau berdasarkan letak daun pada batang	6
2.2 Tembakau Kasturi 1 dan 2	9
2.3 Struktur umum flavonoid	9



DAFTAR LAMPIRAN

A.	Surat Keterangan Identifikasi Daun Tembakau (<i>Nicotiana tabacum</i> L.).....	53
B.	Surat <i>Etichal Clearance</i>	54
C.	<i>Informed Conccent</i>	55



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) merupakan komoditi unggulan Kabupaten Jember. Tembakau jenis Kasturi merupakan jenis tembakau yang banyak dibudidayakan di daerah Jember dan Bondowoso (Jawa Timur) (Susilowati, 2006). Daun tembakau secara umum hanya dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan rokok yang dapat menyebabkan dampak negatif seperti gangguan pada jantung, terjadinya penyakit kanker paru-paru, sesak nafas, perubahan warna gigi menjadi lebih kuning, kerusakan jaringan, penurunan kemampuan indra pengecap, leukoplakia dan resiko kanker mulut (Der Marderosian, 2001; Hadi dan Friyatno 2008). Daun tembakau diantaranya mengandung bahan aktif yang bermanfaat bagi manusia (Taiga dan Friday, 2009; Bakht dkk., 2012). Bahan aktif yang bermanfaat tersebut antara lain flavonoid. Komposisi flavonoid dalam daun tembakau antara lain apigenin, quercetin, dan rutin (Fathiazad dkk., 2006).

Flavonoid adalah senyawa fenol alam yang terdapat dalam hampir semua tumbuhan. Sejumlah tanaman obat yang mengandung flavonoid telah dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan, antibakteri, anti thrombosis, antivirus, antialergi, dan antikanker (Sari dan Shofi, 2011; Lipinski, 2011; Harborne dan Williams, 2000). Penelitian pendahuluan yang dilakukan oleh Fatimah (2016) menunjukkan kandungan ekstrak flavonoid rendah nikotin daun tembakau Kasturi memiliki daya antibakteri yang kuat terhadap bakteri *P. gingivalis* (bakteri Gram-negatif) dengan konsentrasi 320 µg/ml, 160 µg/ml, dan 80 µg/ml. Selain itu, hasil uji viabilitas menunjukkan ekstrak flavonoid rendah nikotin daun tembakau kasturi dengan konsentrasi 1,25 µg/ml, 2,5 µg/ml, 80 µg/ml, dan 320 µg/ml tidak bersifat toksik pada kultur sel fibroblas gingiva manusia (Rizki, 2016). Hal ini menunjukkan bahwa flavonoid memiliki biokompatibilitas yang sangat baik.

Flavonoid juga memiliki kemampuan sebagai agen anti-inflamasi (Harborne dan Williams, 2000). Bernardes dkk (2014) melalui penelitiannya

menyatakan bahwa flavonoid terbukti mampu menghambat aktivitas iNOS pada makrofag yang dipapar lipopolisakarida. Penelitian pendahuluan yang dilakukan Sonia (2017) menunjukkan bahwa ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi dengan konsentrasi 2,5 µg/ml, 40 µg/ml dan 640 µg/ml dapat menghambat ekspresi *Toll-like receptor 4* (TLR4) yang distimulasi oleh lipopolisakarida.

Periodontitis adalah penyakit inflamasi yang menyebabkan kerusakan progresif pada ligamen periodontal dan tulang alveolar sehingga dapat mengakibatkan kehilangan gigi. (Newman dkk., 2015; Andriani, 2012). Penyebab utama periodontitis adalah bakteri patogen periodontal, salah satunya adalah *P. gingivalis*. *P. gingivalis* adalah bakteri Gram-negatif yang berperan penting dalam virulensi biofilm dan inflamasi jaringan dengan menghasilkan endotoksin berupa lipopolisakarida. (Hajishengallis, 2011; 2012; Andriani, 2012). Lipopolisakarida yang ditemukan di membran luar bakteri Gram-negatif dapat memicu respon imun yang kuat setelah mengikat TLR4 pada permukaan h-PBMC (Chen dkk., 2006; Newman dkk., 2015).

h-PBMC merupakan sel-sel mononuklear yang terdiri dari limfosit dan monosit. Sel-sel tersebut terlibat dalam sistem imunitas seluler dan dapat mensekresikan sitokin pro inflamatori yang akan merangsang pembentukan mediator inflamasi nitrit oksida (NO) dari jalur iNOS (Han dkk., 2013; Liuzzo dkk., 2007; Prestes-Congro dkk., 2007; Shin dkk., 2004).

iNOS merupakan salah satu bentuk dari enzim *Nitric Oxide Synthase* (NOS) yang berfungsi sebagai biokatalisator dalam sintesis NO dalam jumlah yang besar dari asam amino L-arginine pada membran sel (Forsterman dan Sessa, 2012; Murokami dan Ohighasi, 2007; Aktan, 2004). Peningkatan kadar NO dapat menyebabkan penghambatan rantai oksidasi fosforilasi dan pengurangan konsumsi oksigen. NO akan berinteraksi dengan *reactive oxygen species* (ROS) membentuk peroksinitrit. Peroksinitrit selanjutnya akan menginduksi reaksi nitrasi, merusak protein dan lemak, depresi enzim mitokondria, dan merusak DNA sehingga terjadi peningkatan permeabilitas mitokondria. Peningkatan permeabilitas mitokondria berhubungan dengan penurunan *gradient*

elektrokimiawi dan sintesa ATP, serta mengaktivasi proses apoptosis (Reguiera dkk., 2011; Kang dkk., 2011; Escomes dkk., 2006).

iNOS akan terekspresikan dalam keadaan rendah atau bahkan tidak terekspresikan jika jaringan dalam keadaan normal. Namun ekspresi enzim ini akan meningkat apabila mendapatkan stimulus inflamasi, sehingga akan menyebabkan peningkatan NO sebagai mediator inflamasi. Selama ini, obat golongan AINS (Anti Inflamasi Non Steroid) adalah obat utama yang digunakan untuk menghambat aktivitas inflamasi. Namun, penggunaan obat ini juga memiliki efek samping pada saluran pencernaan dan sistem kardiovaskuler yang dapat menurunkan fungsi biologis tubuh (Rang dkk., 2007; Epinat., 1999). Oleh sebab itu, penggunaan bahan herbal merupakan pilihan alternatif sebagai obat anti-inflamasi untuk mencegah timbulnya efek samping tersebut.

Penelitian mengenai pengaruh ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi terhadap kadar iNOS belum pernah dilakukan. Berdasarkan latar belakang tersebut, penulis ingin meneliti pengaruh ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi terhadap kadar iNOS pada h-PBMC yang dipapar lipopolisakarida *P. gingivalis*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dimanfaatkan dan dikembangkan sebagai acuan bahan dasar pembuatan obat anti-inflamasi pada penyakit periodontitis.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, rumusan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Bagaimana pengaruh ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi terhadap kadar iNOS pada h-PBMC yang dipapar lipopolisakarida *P. gingivalis*?
- b. Berapa konsentrasi optimal ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi terhadap kadar iNOS pada h-PBMC yang dipapar lipopolisakarida *P. gingivalis*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Mengetahui dan mengkaji pengaruh ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi terhadap kadar iNOS pada h-PBMC yang dipapar lipopolisakarida *P. gingivalis*.
- b. Menetapkan konsentrasi optimal ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi terhadap kadar iNOS pada h-PBMC yang dipapar lipopolisakarida *P. gingivalis*

1.4 Manfaat Penelitian

Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat sebagai berikut:

1. Memberikan pengetahuan tentang pengaruh ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi terhadap kadar iNOS pada h-PBMC yang dipapar lipopolisakarida *P. gingivalis*.
2. Mengembangkan ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi sebagai bahan dasar pembuatan obat anti inflamasi pada penyakit periodontitis.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tembakau

Tembakau merupakan tanaman perkebunan yang tidak termasuk dalam kelompok tanaman pangan. Pemanfaatan tembakau di Indonesia masih terkonsentrasi pada industri rokok dan cerutu (Ardhilarisca dkk., 2015).

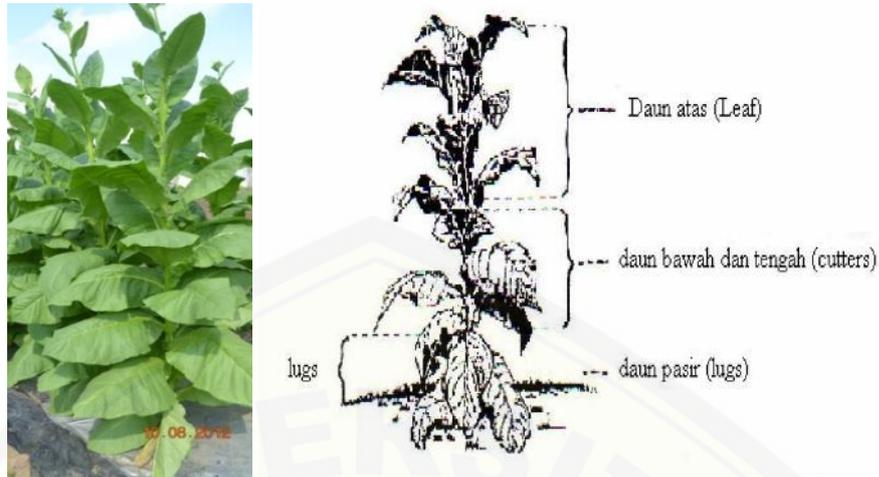
Berdasarkan Surat Keterangan Identifikasi UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi No. 1304/IPH.6/HM/IX/2015, menerangkan tanaman tembakau diklasifikasikan sebagai berikut:

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

2.1.1 Morfologi Tembakau

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

Daun tembakau dapat berperan sebagai tanaman obat yang dimanfaatkan sebagai antibakteri dan antijamur. Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa daun tembakau bagian atas dan tengah mengandung alkaloid, flavonoid, terpenoid dan steroid, sedangkan daun tembakau bagian bawah hanya mengandung alkaloid, flavonoid dan terpenoid seperti pada gambar 2.1 (Rusli dkk., 2011).



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

Daun tembakau secara umum diklasifikasikan berdasarkan letaknya pada batang, yang dimulai dari urutan bawah ke atas, yaitu: daun pasir (*zand blad/lugs*), kaki (*voet blad/cutters*), tengah (*midden blad/leaf*), dan atas (*top blad/tips*) (Susilowati, 2006).

2.1.2 Kandungan Daun Tembakau

Daun tembakau mengandung bahan aktif yang bermanfaat sebagai antibakteri dan antijamur (Taiga dan Friday, 2009; Bakht dkk., 2012). Daun tembakau mengandung berbagai senyawa bioaktif yang berlimpah seperti flavonoid, polifenol, dan alkaloid seperti pada tabel 2.1 dan 2.2 (Fathiazad dkk., 2005; Ru dkk., 2012). Kandungan flavonoid pada daun tembakau kering adalah sebesar 10.83 ± 0.91 mg RE/g (Ru dkk., 2012).

Tabel 2.1 Susunan Kimia Daun Tembakau menurut Cahyono (1998)

Uraian	Jumlah (%)
Abu	20
Gula	0,4-2,5
Fenol	0,0-0,5
Nitrat	1,0-2,0
Nikotin:	
a. Pada daun bawah	0,16-2,89
b. Pada daun tengah	0,3-3,75
c. Pada daun atas	0,5-4,0
Kandungan N total	2,18-3,58

Tabel 2.2 Kandungan Daun Tembakau menurut Podlejskidan Olejniczak (1983)

Komponen	Komposisi(%bk)
Total Nitrogen	2,20
Proteinnitrogen(nitrogen)	1,58
Nikotin	0,67
Nitrogendariasam α -amino	0,30
Airterlarutkarbohidrat	25,9
Selulosa	12,3
Pektin	13,4
Polypentose	4,90
Minyakatsiri	0,13
Resinyangdiekstrakmenggunakan benzena	7,42
Resin yangdiekstrakmenggunakanpetrolometer	6,20
Polyphenol	4,39
Asetaldehid	0,26
Asamorganik	9,12
a. Asam oksalat	2,18
b. Asm sitrat	1,27
c. Asam hidroksi	4,57
d. Asam volatil	1,12
pH dari air yang terekstrak	5,54
Abu	15,4

Sumber: Rusli, dkk: 2011.

2.2 Tembakau Kasturi

Kabupaten Jember merupakan salah satu sentra perkebunan tembakau di Jawa Timur. Berdasarkan data Badan Pusat Statistik (2014) tahun 2012 dan 2013 Jember merupakan penghasil tembakau terbesar di Jawa Timur sebesar 31.284 ton dan 18.297 ton. Pada tahun 2006 hingga 2013 areal panen tembakau, produksi, dan produktivitas tembakau di Kabupaten Jember cenderung meningkat.

Dinas Perkebunan Provinsi Jawa Timur (2013) menyatakan bahwa tembakau kasturi adalah salah satu diantara berbagai jenis tembakau dengan areal pada tahun 2012 seluas 13.150 hektar dengan produksi sebesar 15.161 ton serta produktivitas rata - rata 915,6 kg per hektar. Pengusahaan tembakau ini dilakukan petani di kabupaten Lumajang dengan luas areal 56 hektar dan produksi sebesar 43 ton; kabupaten Jember dengan luas areal 9.791 hektar dan produksi sebesar 12.487 ton; kabupaten Bondowoso dengan luas areal 1.867 hektar dan produksi sebesar 1.474 ton; kabupaten Situbondo, dengan luas areal 885 hektar dan produksi sebesar 619 ton dan kabupaten Banyuwangi dengan luas areal 552 hektar dan produksi sebesar 538 ton.

Tembakau Kasturi adalah salah satu tanaman tembakau yang dibudidayakan pada musim kemarau atau dikenal dengan istilah *Voor Oogst* (VO) dengan cara pengeringan menggunakan sinar matahari. Pengolahan tembakau kasturi dalam bentuk lembaran-lembaran daun. Jenis tembakau yang umumnya diusahakan di Kabupaten Jember adalah Tembakau Kasturi 1 dan Kasturi 2 (Herminingsih, 2014). Kasturi 1 dan Kasturi 2 merupakan hasil pemuliaan tanaman yang dilakukan pada tahun 2007 berdasarkan SK Mentan No: 132/Kpts/SR.120/2/ 2007 dan No: 133/Kpts/SR.120/2/2007. Karakteristik kedua varietas tersebut dijelaskan pada Tabel 2.3.

Tabel 2.3 Karakteristik Tembakau Kasturi 1 dan Kasturi 2

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

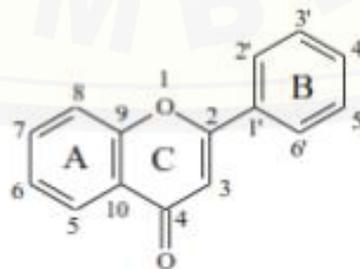
Sumber : <http://balittas.litbang.pertanian.go.id>



Gambar 2.2 Tembakau Kasturi 1 dan 2 (Sumber : Djajadi, 2015)

2.3 Flavonoid

Flavonoid berasal dari kata flavon atau fenil 2 kromon yang mempunyai kerangka dasar γ piron. Flavonoid digunakan untuk menamakan golongan senyawa yang memiliki struktur kerangka dasar $C_6-C_3-C_6$. Setiap bagian C_6 merupakan cincin benzona yang digunakan dengan atom (C_3) yang merupakan rantai alifatis yang dapat pula membentuk cincin ketiga seperti pada gambar 2.3 (Sabir, 2003). Flavonoid terdiri dari enam golongan yaitu flavonol, flavon, flavanon, flavanol, isoflavon, dan antosianidin (Gomez dkk., 2008). Flavonoid mempunyai manfaat untuk kesehatan yaitu berperan sebagai antibakteri, antioksidan dan antiinflamasi (Lopez dkk., 2016).



Gambar 2.3 Struktur umum flavonoid (Sumber : Sabir A, 2003)

Sejumlah tanaman obat yang mengandung flavonoid telah dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan, antibakteri, anti thrombosis, antivirus, antialergi, dan antikanker (Sari dan Shofi, 2011; Lipinski, 2011; Harborne, 2000). Flavonoid juga dapat menghambat terjadinya inflamasi. Mekanismenya yaitu menghambat aktivitas enzim dari metabolisme asam arakidonat seperti fosfolipase A₂, siklooksigenase, lipoksigenase dan *inducible nitric oxide synthase* (iNOS). Penghambatan aktivitas enzim tersebut oleh flavonoid mengakibatkan penurunan produksi dari asam arakidonat, prostaglandin, leukotrin, dan nitrit oksida yang merupakan mediator inflamasi (Kim dkk., 2004). Bernardes (2014) melalui penelitiannya menyatakan bahwa flavonoid terbukti mampu menghambat aktivitas iNOS pada makrofag yang dipapar lipopolisakarida sehingga mampu menurunkan sintesis nitrit oksida.

Penelitian pendahuluan yang dilakukan Fatimah (2016) ekstrak flavonoid rendah nikotin limbah daun tembakau kasturi dengan konsentrasi 80 µg/mL memiliki efek antimikroba terhadap bakteri *Streptococcus mutans*, *P. gingivalis*, dan jamur *Candida albicans*. Selain itu Rizky (2016) juga menyatakan bahwa ekstrak flavonoid rendah nikotin daun tembakau kasturi dengan konsentrasi 1,25 µg/ml; 2,5 µg/ml; 80 µg/ml; dan 320 µg/ml tidak memberikan efek penghambatan pada pertumbuhan sel fibroblas gingiva manusia. Hal ini diduga karena flavonoid tidak bersifat toksik pada sel normal. Flavonoid bersifat toksik pada sel kanker, dan tidak toksik atau sedikit toksik pada sel normal (Middleton dkk., 2000; Nijveldt dkk., 2001).

Flavonoid juga ditemukan dalam tanaman tembakau. Masih sangat sedikit penelitian yang mengungkapkan komposisi flavonoid yang terkandung di dalam daun tembakau. Menurut Fathiazad, dkk (2006), flavonoid dalam 14 daun tembakau mengandung komposisi antara lain adalah apigenin, querectin, rutin. Komposisi dari masing-masing flavonoid ini diperkirakan sekitar 1,5%, 0,5%, dan 0,6%. Penelitian Ru, dkk (2012) dan Docheva, dkk (2014) flavonoid pada *scavenging* radikal bebas dan memiliki potensi sebagai antioksidan kuat. Yu dkk (2011), ekstrak tembakau bebas nikotin yang diduga mengandung senyawa flavonoid terbukti sebagai agen kemopreventif pada tahap prakanker.

2.4 Inflamasi

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

Respon inflamasi juga melibatkan pengaktifan beberapa komponen seluler seperti makrofag, neutrofil, dan limfosit. Makrofag dapat diaktifkan melalui pengenalan endotoksin bakteri patogen, yaitu lipopolisakarida (LPS) bakteri, oleh *Toll-like receptors 4* (TLR4) (Uematsu dan Akira, 2008). Makrofag yang telah aktif akan mengeluarkan sejumlah besar mediator vasoaktif seperti leukotrien dan prostaglandin, serta sitokin pro inflamatori yaitu, *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), *interleukin-6* (IL-6), dan *interleukin-1* (IL-1) (Corwin, 2009). Adanya sitokin pro inflamatori yaitu TNF- α dan IL-1 akan merangsangkan pembentukan mediator inflamasi melalui jalur *nitric oxide synthase* (NOS) (Baratawidjaja, 2013).

Terdapat tiga jenis NOS yaitu, *endotelial NOS* (eNOS), *inducible NOS* (iNOS) dan *neuronal NOS* (nNOS) secara konstitutif diekspresikan pada kebanyakan sel untuk mempertahankan fungsi fisiologis seperti melindungi lapisan mukosa gastrointestinal, mengatur keseimbangan air atau elektrolit, dan merangsang agregasi trombosit untuk mempertahankan hemostasis normal. (Kang dkk., 2011)

2.5 Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS)

iNOS merupakan salah satu bentuk dari enzim NOS. Ekspresi iNOS dapat diinduksi oleh *cytokine immunostimulatory* dan produk bakteri berupa Lipopolisakarida. iNOS berfungsi sebagai biokatalisator dalam sintesis NO

dari asam amino L-arginine pada membran sel (Forsterman, 2012; Murokami dkk., 2007; Aktan dkk, 2004).

Nitric Oxide merupakan komponen penting molekul signal intraseluler yang terlibat dalam regulasi beragam mekanisme fisiologis dan patologis pada sistem kardiovaskuler, saraf dan sistem imun. Tetapi, peningkatan kadar NO yang sangat tinggi dapat menyebabkan penghambatan rantai oksidasi fosforilasi dan pengurangan konsumsi oksigen. NO akan berinteraksi dengan ROS membentuk peroksinitrit. Peroksinitrit selanjutnya akan menginduksi reaksi nitrasi, merusak protein dan lemak, depresi enzim mitokondria, dan merusak DNA sehingga terjadi peningkatan permeabilitas mitokondria. Peningkatan permeabilitas mitokondria berhubungan dengan penurunan *gradient* elektrokimiawi dan sintesa ATP, serta mengaktivasi proses apoptosis (Reguiera dkk., 2011; Kang, 2011; Escomes dkk., 2006).

2.6 Human Peripheral Blood Mononuclear Cell (h-PBMC)

h-PBMC merupakan sel-sel darah yang berperan penting dalam sistem kekebalan tubuh untuk melawan infeksi dan beradaptasi dengan benda asing yang masuk ke dalam tubuh. Sel-sel darah ini terdiri atas setiap sel darah yang memiliki inti bulat seperti limfosit, monosit atau makrofag. Sel-sel darah ini dapat diekstraksi dari keseluruhan darah manusia. h-PBMC banyak digunakan dalam penelitian dan aplikasi toksikologi (Paurahmad dan Salimi, 2015).

Limfosit B (sel B) matang di sum-sum tulang. Setelah matang, sel B beredar dalam darah berbentuk inaktif dan menjadi aktif hanya setelah terpajan pada molekul spesifik, biasanya protein atau karbohidrat besar dari molekul asing. Sel B menyusun sistem imun humoral, yang berarti bahwa sel – sel tersebut bersirkulasi dalam darah (Corwin, 2009).

Limfosit T menyusun sistem imun seluler. Pematangan sel T berlangsung selama pergerakan melalui kelenjar timus. Seperti sel B, sel T tetap inaktif sampai sel tersebut berhadapan dengan molekul spesifik. Ketika molekul asing muncul, sel T akan aktif dan secara langsung menyerang dan menghancurkan

molekul tersebut. Sel T dapat pula melepaskan zat-zat kimia yang mewaspadakan sel B untuk membangkitkan respon humoral. Sel T juga dapat merangsang pelepasan sitokin proinflamasi atau antiinflamasi (Corwin, 2009).

Monosit merupakan salah satu leukosit dengan tipe agranular yang berasal dari sum – sum tulang belakang. Pada perjalanan respon inflamasi akut, monosit mulai bermigrasi dalam waktu yang kira-kira sama dengan neutrofil, tetapi jumlahnya jauh lebih sedikit dan kecepatannya jauh lebih lambat. Oleh karena itu pada awal respon inflamasi, jumlah sel darah putih relatif sedikit (Corwin, 2009).

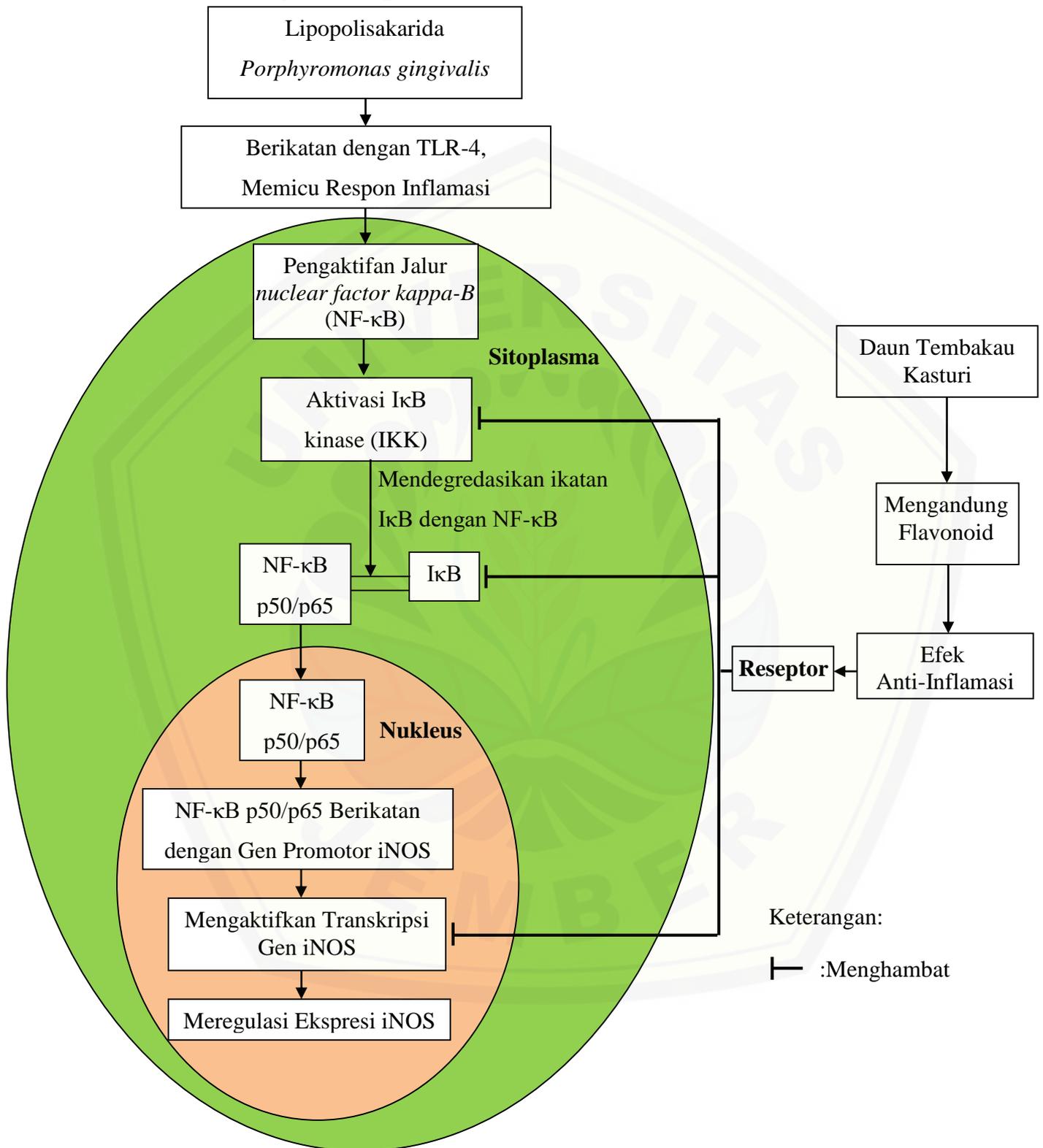
Monosit mampu mensintesis berbagai enzim interseluler tetapi tidak bersifat fagositik. Setelah beberapa jam berada di jaringan, sel ini berkembang matang menjadi makrofag. Makrofag adalah sel besar yang bergerak aktif dan berespon terhadap rangsangan kemotaktik. Makrofag bersifat fagositik aktif dan mampu membunuh serta mencerna berbagai agen inflamasi (Price, 2005 dan Corwin, 2009).

2.7 Lipopolisakarida *Porphyromonas gingivalis*

P. gingivalis adalah bakteri Gram-negatif yang berperan penting dalam virulensi biofilm dan inflamasi jaringan dengan menghasilkan endotoksin berupa lipopolisakarida. (Hajishengallis, 2011; 2012; Andriani, 2012).

Lipopolisakarida merupakan komponen penyusun terbesar pada membran luar bakteri Gram-negatif. Secara molekuler, lipopolisakarida terdiri atas tiga bagian, yaitu lipid A, inti polisakarida, dan antigen O. Lipid A merupakan komponen hidofilik yang terdapat dalam membran luar bakteri, sedangkan inti polisakarida dan antigen O terdapat pada permukaan sel bakteri. Lipid A diketahui bertanggung jawab atas efek toksik dari infeksi bakteri gram negatif. Lipid A ini juga merupakan komponen bakteri gram negatif yang dapat dikenali oleh TLR4. Struktur lipopolisakarida secara rinci bervariasi dari satu bakteri ke bakteri lainnya, dan variasi ini dapat mempengaruhi virulensi bakteri (Wang dan Quinn, 2010 dan Uematsu dan Akira, 2008).

2.8 Kerangka Konseptual



Gambar 2.4 Kerangka konseptual

Penjelasan Kerangka Konsep

Tembakau jenis Kasturi merupakan jenis tembakau yang banyak dibudidayakan di daerah Jember dan Bondowoso. Daun tembakau diantaranya mengandung bahan aktif yang bermanfaat bagi manusia, salah satunya adalah flavonoid. Flavonoid memiliki kemampuan sebagai agen anti-inflamasi dengan menghambat aktivitas iNOS pada makrofag yang dipapar lipopolisakarida.

Lipopolisakarida yang ditemukan di membran luar bakteri Gram-negatif dapat memicu respon imun yang kuat setelah mengikat TLR4 pada permukaan sel mononuklear. Hal ini akan menyebabkan pengaktifan dari *nuclear factor kappa-B* (NF- κ B). Secara normal, NF- κ B ditemukan pada sitoplasma sebagai ikatan kompleks yang bersifat inaktif dengan protein inhibitor NF- κ B (I κ B). Berbagai stimulus dari dalam dan luar sel dapat menyebabkan aktivasi dari I κ B kinase (IKK) pada sitoplasma yang akan menyebabkan fosforilasi dan degradasi dari ikatan kompleks NF- κ B dan I κ B. Akibatnya heterodimer dari NF- κ B (p50/p65) akan mengalami translokasi dari sitoplasma ke dalam nukleus. Selanjutnya, di dalam inti sel, subunit p50/p65 akan mengikat sejumlah promotor gen dan mengaktifkan transkripsi gen target yang terlibat dalam respons inflamasi, seperti iNOS. Akibatnya ekspresi enzim ini akan meningkat apabila mendapatkan stimulus inflamasi, sehingga akan menyebabkan peningkatan NO sebagai mediator inflamasi. Jika hal ini terjadi secara terus menerus dapat menyebabkan kerusakan jaringan.

Mekanisme flavonoid dalam menghambat iNOS diduga dengan cara berikatan dengan reseptor pada sel sehingga dapat menghambat aktivasi IKK, menghambat fosforilasi dan degradasi I κ B dan mencegah translokasi NF- κ B (p50/p65) ke nukleus, serta menghambat transkripsi gen iNOS.

2.9 Hipotesis

Ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi memiliki pengaruh terhadap kadar iNOS pada h-PBMC yang dipapar lipopolisakarida *P. gingivalis*.



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *the post test only control group design*.

3.2 Tempat Penelitian

- a. Pengeringan daun tembakau dilakukan di Laboratorium Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Jember.
- b. Pembuatan ekstrak flavonoid daun tembakau dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia, Politeknik Negeri Malang.
- c. Pengambilan sampel darah pendonor dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Gajah Mada Yogyakarta.
- d. Isolasi human-PBMC dilakukan di Laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Gajah Mada Yogyakarta.
- e. Uji ELISA dilakukan di Laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Gajah Mada Yogyakarta.

3.3 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober- Desember 2017

3.4 Variabel Penelitian

- a. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi pada konsentrasi 640 $\mu\text{g/ml}$, 320 $\mu\text{g/ml}$, 80 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ dan 2,5 $\mu\text{g/ml}$.

- b. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar iNOS pada h-PBMC yang telah dipapar lipopolisakarida.

c. Variabel Terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah daun tembakau kasturi yang sesuai kriteria sampel, human-PBMC, suhu inkubasi 37°C, dan paparan lipopolisakarida.

3.5 Definisi Operasional

- a. Ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi (*Nicotiana tabacum* L.) merupakan stok ekstrak dari daun tembakau jenis kasturi berkualitas rendah yang diambil pada daun bagian bawah, berasal dari Kecamatan Pakusari, Kabupaten Jember, Jawa Timur. Konsentrasi ekstrak flavonoid yang digunakan adalah 640 µg/ml, 320 µg/ml, 80 µg/ml, 40 µg/ml, 20 µg/ml, 10 µg/ml, dan 2,5 µg/ml.
- b. Kadar iNOS merupakan konsentrasi iNOS pada h-PBMC yang dipapar lipopolisakarida dengan konsentrasi U/L yang dihitung menggunakan uji ELISA dengan panjang gelombang 450 nm.
- c. h-PBMC adalah sel darah mononuklear yang diisolasi dari 20 ml sampel darah pendonor yang diambil dari pembuluh darah vena pada *fosaa cubiti*. Proses isolasi h-PBMC dilakukan dengan cara sentrifugasi gradien menggunakan *ficollpaque*. Jumlah sel yang digunakan adalah 1×10^5 cell/well.
- d. Lipopolisakarida merupakan stok lipopolisakarida *Porphyromonas gingivalis* *Ultrapure* (INVIVOGEN) dengan konsentrasi 10 µg/ml.

3.6 Pengelompokan Sampel Penelitian

Penelitian ini terdiri atas 8 kelompok penelitian dengan 1 kelompok kontrol dan 7 kelompok perlakuan. Inkubasi dilakukan dalam waktu 24 jam dan 48 jam pada masing-masing kelompok. Pengelompokan tersebut yaitu:

- a. Kelompok K : kelompok kontrol media yang berisi media kultur, h-PBMC, dan lipopolisakarida,

- b. Kelompok P I : kelompok dengan h-PBMC dipapar lipopolisakarida, kemudian diberi ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi dengan konsentrasi 2,5 µg/ml,
- c. Kelompok P II : kelompok dengan h-PBMC dipapar lipopolisakarida, kemudian diberi ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi dengan konsentrasi 10 µg/ml,
- d. Kelompok P III : kelompok dengan h-PBMC dipapar lipopolisakarida, kemudian diberi ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi dengan konsentrasi 20 µg/ml,
- e. Kelompok P IV : kelompok dengan h-PBMC dipapar lipopolisakarida, kemudian diberi ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi dengan konsentrasi 40 µg/ml,
- f. Kelompok P V : kelompok dengan h-PBMC dipapar lipopolisakarida, kemudian diberi ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi dengan konsentrasi 80 µg/ml.
- g. Kelompok P VI : kelompok dengan h-PBMC dipapar lipopolisakarida, kemudian diberi ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi dengan konsentrasi 320µg/ml.
- h. Kelompok P VII : kelompok dengan h-PBMC dipapar lipopolisakarida, kemudian diberi ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi dengan konsentrasi 640 µg/ml.

3.7 Alat dan Bahan Penelitian

3.7.1 Alat yang dipakai pada penelitian ini adalah :

1. Timbangan
2. Oven
3. Blender
4. Labu alas bulat
5. *Vacuumfilter*
6. Tabung reaksi
7. *Laminar air flow*

8. *Centrifuge*
9. *Handsocon*
10. Masker
11. *Syringe* 10 ml
12. *Vacutec tube* mengandung EDTA 5,4 mg
13. *Torniquet*
14. *Hemacytometer*
15. Mikroskop inverted
16. Inkubator CO₂ 5%
17. Tabung *ependorf*
18. *Conical tube*
19. *Micropipette*
20. *Multi-channel pipette*
21. *Yellow tip*
22. *Blue tip*
23. Rak *ependorf*
24. Label
25. *Counter*
26. *96-well*
27. ELISA kit iNOS *Bioassay China*
28. ELISA reader

3.7.2 Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut ini:

1. Daun Tembakau
2. *Ficoll paque*
3. RPMI 1640
4. HCL 1 M (500 ml, 250 ml),
5. Etanol 80%
6. Petroleum eter 50 ml,
7. Acetonitrile 20 ml
8. DMSO (*DimetilSulfoxide*) 0,25%

9. Alkohol 70%.
10. *Hank's balanced salt solution* (HBSS)

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Tahap Persiapan

Persiapan penelitian dimulai dengan pengajuan *ethical clearance* kepada bagian etika dan advokasi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk mendapatkan perizinan pelaksanaan penelitian.

3.8.2 Prosedur Ekstraksi Flavonoid Daun Tembakau Kasturi

a. Kriteria Daun Tembakau

Daun Tembakau yang dipakai adalah jenis daun tembakau kasturi berkualitas rendah yang diambil pada daun bagian bawah.

b. Prosedur Ekstraksi

Metode ekstraksi daun tembakau kasturi yang digunakan pada penelitian ini adalah metode modifikasi dari metode hidrolisis dan refluks.

- 1) Daun tembakau kasturi dicuci bersih dan dikeringkan dengan cara kering angin selama tiga hari pada suhu kamar dan di oven pada suhu 40°-50° C selama 2 hari. Daun tembakau kasturi yang sudah kering dihaluskan menggunakan blender.
- 2) Daun tembakau kasturi yang sudah halus kemudian ditimbang sebanyak 100 gram dan dimasukkan ke dalam labu alas bulat.
- 3) Sebanyak 100 gr daun tembakau kasturi dilarutkan dalam 500 ml HCL 1 M untuk proses hidrolisis dan di refluks selama 2 jam pada suhu 80° C. Hasil dari refluks disaring menggunakan vacuum filter. Bagian yang lolos penyaringan, atau bagian yang lebih kecil molekulnya dibuang.
- 4) Bahan yang berbentuk padat atau komponen yang lebih besar molekulnya disebut Slurry. Slurry ditambahkan lagi ke dalam labu alas bulat dan ditambahkan lagi dengan HCL 500 ml serta dilakukan pengadukan.

- 5) Lakukan penyaringan kembali menggunakan vacuum filter dan mengambil slurry. Slurry selanjutnya dicuci dengan menggunakan HCl 250 ml, dan dimasukkan lagi ke dalam labu alas bulat.
- 6) Selanjutnya dilakukan pengambilan ekstrak flavonoid, yaitu dengan cara slurry ditambahkan etanol 80% sebanyak 500 ml, dan dilakukan metode refluk pada suhu 80°C selama 1 jam. Hasil dari prosedur tersebut berupa cairan yang kemudian disaring dengan vacuum filter dan dicuci dengan etanol 80% sebanyak 200 ml.
- 7) Cairan tersebut lalu disimpan selama 8 jam. Cairan yang telah didiamkan selama 8 jam akan memisah menjadi endapan dan bagian cair.
- 8) Bagian cair dilakukan lagi pengestrakan untuk memisahkan lateks dan gum dengan menggunakan pelarut petroleum eter sebanyak 50 ml. Lapisan paling atas dibuang, dan ekstraksi diulang sebanyak 3 kali.
- 9) Hasil ekstraksi kemudian dikeringkan sampai volume ± 10 ml, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi dengan ditambahkan acetonitril sebanyak 20 ml. Metode ini digunakan untuk membersihkan komponen gula dan komponen pengotor yang masih tertinggal.
- 10) Melakukan sentrifugasi selama 10 menit pada 400 rpm. Lapisan atas diambil dan dikeringkan pada suhu 40° C selama 4-5 hari.
- 11) Lapisan paling atas hasil dari sentrifugasi diambil dan dikeringkan, untuk kemudian dilakukan pengujian menggunakan metode LC-MS/MS.
- 12) Prosedur ekstraksi selesai dan didapatkan hasil berupa ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi
(Fatimah, 2016; Rizky, 2016).

3.8.3 Pengenceran Flavonoid Daun Tembakau Kasturi

Penelitian ini menggunakan ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi yang diencerkan menggunakan DMSO 0,25% (Rizky, 2016). Ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi diencerkan di dalam *laminar air flow* dan dalam keadaan steril. Pengenceran dilakukan dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Rohaya, 2014):

$$V1.M1=V2.M2$$

Ket:

V1 : Volume awal ekstrak flavonoid daun tembakau

M2 : Konsentrasi awal ekstrak flavonoid daun tembakau

V2 : Volume akhir ekstrak flavonoid daun tembakau

M2 : Konsentrasi akhir ekstrak flavonoid daun tembakau

3.8.4 Prosedur Pengambilan Sampel

a. Kriteria Subyek Penelitian

- 1) Sampel darah sebanyak 20 ml pada penelitian ini diambil dari pembuluh darah vena pada *fossa cubiti* (Hougee dkk., 2005; WHO, 2011).
- 2) Subyek penelitian berusia 20-30 tahun, dalam keadaan sehat, bersih dari infeksi minimal 2 minggu sebelum pengambilan darah, dan tidak sedang mengonsumsi obat-obatan (Moutia dkk., 2016; Liptrott, 2016).

b. Pengisian *Informed Consent*

Sebelum pendonor diambil darahnya untuk dijadikan sebagai sampel penelitian, pendonor yang telah memenuhi kriteria sebagai subyek penelitian diminta mengisi *informed consent*. Pada prosedur ini pendonor dijelaskan secara lisan dan tertulis mengenai keterangan ringkas penelitian, keterangan spesimen yang akan diambil, prosedur yang akan dilakukan, perlakuan yang diterapkan, serta hak dan keterangan kerahasiaan.

c. Pengambilan Sampel Darah



Gambar 3.1 Pengambilan sampel darah (sumber: dokumen pribadi)

- 1) Pendoror diposisikan dalam posisi duduk, lengan pendonor diletakkan di atas meja, dengan telapak tangan menghadap ke atas.
- 2) Menentukan lokasi atau tempat pembuluh darah vena yang akan dilakukan pengambilan darah.
- 3) Posisikan lengan yang akan diambil darahnya dalam keadaan lurus. Pasangkan *tourniquet* di atas lipatan siku pendonor. Minta pendonor untuk membuka-tutup telapak tangannya.
- 4) Lakukan desinfeksi pada daerah pembuluh darah vena yang akan diambil darahnya dengan menggunakan alkohol 70%.
- 5) Tusuk bagian vena menggunakan *syringe* 10 ml dan ambil darah secara perlahan.
- 6) Lepas *tourniquet* setelah darah mengalir. Setelah volume darah dianggap cukup, minta pasien membuka kepalan tangannya.
- 7) Letakan kapas pada lokasi suntikan lalu segera lepaskan jarum *syringe*. Tekan kapas selama 3 menit dengan lengan diluruskan.
- 8) Darah pendonor disimpan dalam *vacutee tube* yang sudah terdapat EDTA (*Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid*) 5,4 mg (WHO, 2011).

3.8.5 Isolasi h-PBMC

- 1) Sampel darah sebanyak 20 ml disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 12 menit (Gambar 3.2).



Gambar 3.2 Sampel darah disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 12 menit

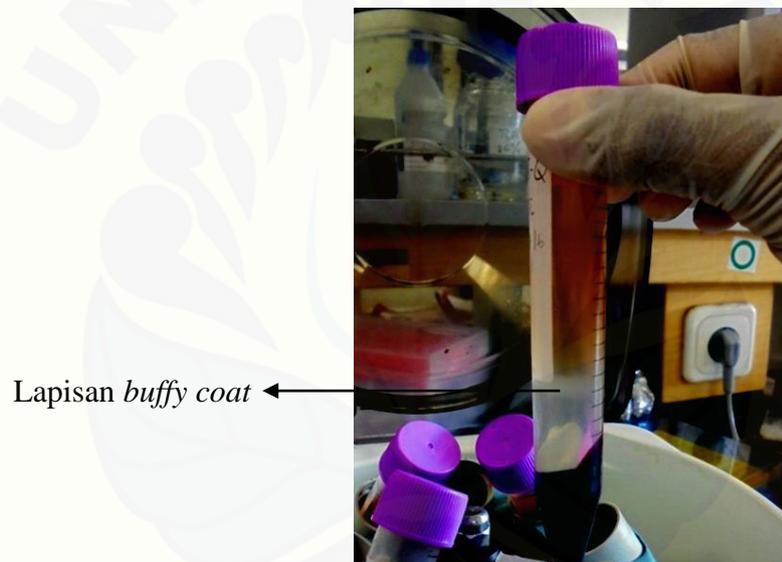
- 2) Supernatant dibuang, kemudian darah diencerkan (dicampur) dengan larutan HBSS dengan perbandingan 1:1 (Gambar 3.3).
- 3) Menyiapkan 5 mL *ficoll* ke dalam tabung conical 15 mL. Kemudian secara hati-hati masukkan darah di atas lapisan *ficoll* (Gambar 3.4).
- 4) Campuran tersebut kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm, 20 menit. Ambil lapisan *buffy coat*, kemudian masukkan ke dalam tabung conical 15 mL, setelah itu encerkan kembali dengan HBSS hingga 10 mL dan disentrifugasi lagi 15 menit (Gambar 3.5 dan Gambar 3.6).



Gambar 3.3 (a) lapisan supernatant dibuang; (b) pengenceran dengan menggunakan larutan HBSS (sumber: dokumen pribadi)



Gambar 3.4 (a)Memasukkan 5 mL *ficoll* kedalam tabung conical 15 mL ;
(b)Memasukkan darah pada tabung conical yang berisi *ficoll* (sumber: dokumen pribadi)



Gambar 3.5 Hasil sentrifuge untuk pemisahan *buffy coat* (sumber: dokumen pribadi)



Gambar 3.6 Lapisan *buffy coat* diambil dan dimasukkan ke dalam tabung conical 15 mL
(sumber: dokumen pribadi)

- 5) Supernatant dibuang, kemudian pellet diresuspensi dengan medium kultur (RPMI 1640 dengan 10% FBS, 0.1% Penstrep dan 0.05% Fungizone) (Gambar 3.7)



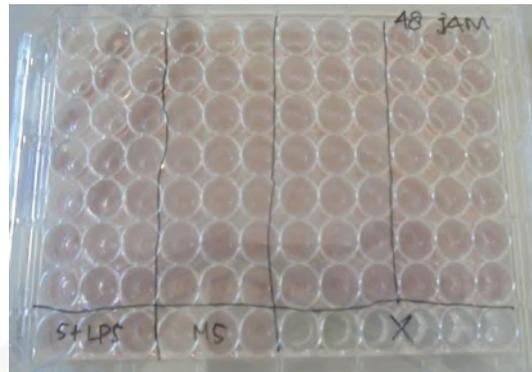
Gambar 3.7 Penambahan media RPMI pada *buffy coat* setelah lapisan supernatant dibuang (sumber: dokumen pribadi)

- 6) Menghitung jumlah sel dengan menggunakan hemositometer dan *tryphan blue*. Dari 5 mL darah biasanya didapatkan sekitar $3-5 \times 10^6$ sel PBMC (Gambar 3.8)



Gambar 3.8 Perhitungan jumlah sel dibawah mikroskop (sumber: dokumen pribadi)

- 7) Membuat kepadatan sel 5×10^4 dan dibagi dalam 3 mikroplate 96 sumur (24 jam dan 48 jam) yang telah dilapisi cover slip sesuai dengan jumlah kelompok percobaan, masing-masing berisi 20 μ l (Gambar 3.9).



Gambar 3.9 Memasukkan sel ke dalam 2 buah 96-well mikroplate (sumber: dokumen pribadi)

- 8) Inkubasi pada 37°C dengan CO₂ overnight, kemudian tambahkan medium kultur sebanyak 300 µl (Gambar 3.10).



Gambar 3.10 Menyimpan 96-well mikroplate yang berisi sel ke dalam incubator CO₂ dengan suhu 37°C (sumber: dokumen pribadi)

3.8.6 Prosedur Penghitungan Sel

Sel yang telah diresuspensi pada medium kultur selanjutnya diambil sebanyak 10µl dan dipipetkan ke *hemacytometer*. Hitung jumlah sel dengan menggunakan *counter* di bawah mikroskop inverted. Jumlah sel yang dihitung/ml didapatkan melalui rumus (CCRC, 2009):

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

- b. Menghitung jumlah total sel yang diperlukan

Setiap satu well diperlukan 1×10^5 sel, maka jumlah sel yang diperlukan dalam 96 well adalah 96×10^5 sel (Gupta, 2016).

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

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

h-PBMC masing masing sebanyak 100 μ l dimasukkan ke dalam 96-well plate (2 plate). Selanjutnya dilakukan inkubasi selama 24 jam pada inkubator dengan suhu 37°C mengandung 5% CO₂.

3.8.7 Pemaparan Lipopolisakarida

Sebanyak 50 μ l lipopolisakarida dengan konsentrasi 10 μ g/ml dimasukkan ke dalam setiap well dengan menggunakan *micropipette* pada masing–masing kelompok yaitu Kelompok K1, P I, P II, P III, P IV, P V, PVI dan PVII.



Gambar 3.11 Pemberian 50 μ l lipopolisakarida pada setiap well (sumber: dokumen pribadi)

3.8.8 Inkubasi Flavonoid pada h-PBMC yang Telah Dipapar Lipopolisakarida

- 1) Ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi dengan konsentrasi 2,5 μ g/ml, 10 μ g/ml, 20 μ g/ml, 40 μ g/ml, 80 μ g/ml, 320 μ g/ml dan 640 μ g/ml masing–masing diambil sebanyak 100 μ l dan ditambahkan ke dalam

kelompok P I, P II, P III, P IV, P V, P VI dan P VII. Kelompok K tidak diberi ekstrak flavonoid karena digunakan sebagai kontrol.



Gambar 3.12 Pemberian ekstrak flavonoid pada kelompok perlakuan dengan konsentrasi yang telah ditentukan (sumber: dokumen pribadi)

- 2) Inkubasi selama 24 jam dan 48 jam pada inkubator dengan suhu 37°C mengandung 5% CO_2 . Setelah dilakukan inkubasi, dilakukan pippeting supernatan pada semua kelompok penelitian dan disimpan ke dalam *eppendorf tube* dengan suhu -80°C sampai dilakukan uji ELISA dengan marker iNOS (Hougee dkk., 2005).



(a)



(b)

Gambar 3.13 (a)Pemindahan supernatan ke dalam *eppendorf tube*; (b)Box penyimpanan yang berisi *eppendorf tube* disimpan ke dalam lemari pendingin sampai dilakukan uji ELISA (sumber: dokumen pribadi)

3.8.9 Uji Kadar iNOS dengan Metode ELISA

- 1) Siapkan sampel yang akan dilakukan uji ELISA dengan marker iNOS.
- 2) Masukkan masing-masing standart ELISA yaitu 7,5 U/L; 15 U/L; 30 U/L ; 60 U/L; 120 U/L; dan U/L sebanyak 50 μ l ke dalam *96-microwell plate* ELISA dengan pengulangan sebanyak satu kali (duplo).



Gambar 3.14 Memasukkan standart ELISA sesuai protokol (sumber: dokumen pribadi)

- 3) Tambahkan 40 μ l sampel uji ke dalam *well*. Selanjutnya di tambahkan 10 μ l antibodi iNOS ke dalam *well* yang telah berisi sampel uji.



Gambar 3.15 Memasukkan 40 μ l sampel uji pada *well* (sumber: dokumen pribadi)

- 4) Tambahkan 50 μ l *streptavidin-HRP* ke dalam *well* yang telah berisi sampel uji dan standart ELISA.



Gambar 3.16 Menambahkan 50 μl *streptavidin-HRP* pada *well* yang telah berisi sampel uji dan standart ELISA(sumber: dokumen pribadi)

- 5) Tutup *96-microwell plate* dengan menggunakan *sealer* dan kocok dengan hati – hati untuk mencampurkan semua bahan yang ada di dalam *well*.



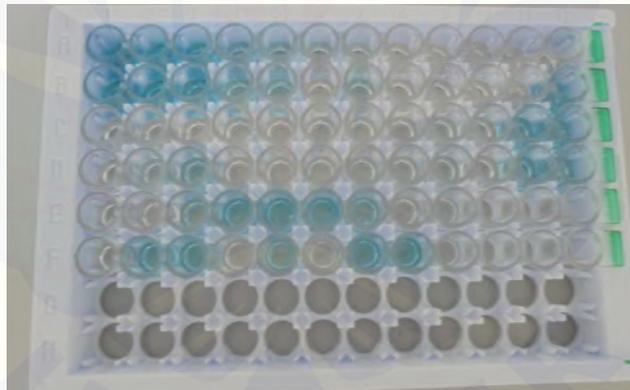
Gambar 3.17 Menutup dengan *sealer* (sumber: dokumen pribadi)

- 6) *well* dinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit. Setelah masa inkubasi selesai, cairan yang ada dalam *well* dibuang dan *well* tersebut dicuci. Pencucian dilakukan sebanyak 5 kali dengan memasukan larutan buffer pencuci (*washing buffer*) sebanyak minimal 0,35 ml pada setiap *well* menggunakan *multi-channel pipette*, selama 1 sampai 2 menit.



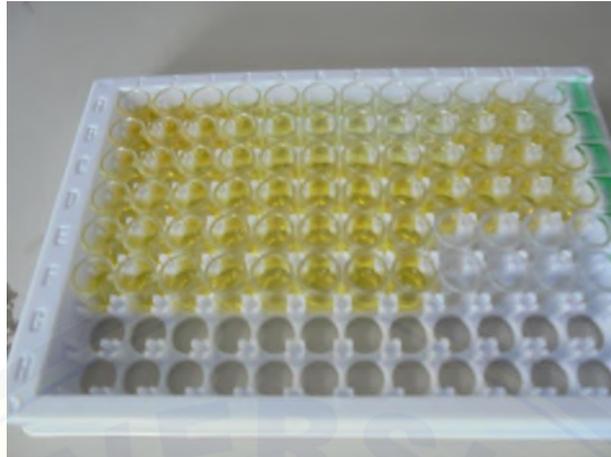
Gambar 3.18 (a) Menginkubasi *well* pada suhu 37°C selama 60 menit; (b) Pencucian *well* dengan memasukan larutan buffer pencuci (*washing buffer*) (sumber: dokumen pribadi)

- 7) Setelah dicuci, keringkan *well* dengan menggunakan kertas serap atau bahan lain yang mudah menyerap cairan. Kemudian tambahkan 50 μ l *substrate solution A* dan 50 μ l *substrate solution B* ke dalam setiap *well* sehingga akan terjadi perubahan warna menjadi warna biru.



Gambar 3.19 Perubahan warna menjadi biru setelah ditambahkan *substrate solution A* dan *B* (sumber: dokumen pribadi)

- 8) Tutup kembali *well* dengan *sealer* dan dilakukan inkubasi dalam ruang gelap pada suhu 37°C selama 10 menit.
- 9) Setelah diinkubasi, tambahkan 50 μ l larutan penghenti reaksi (*stop solution*) ke dalam setiap *well*, sehingga akan terjadi perubahan warna dari biru menjadi kuning.



Gambar 3.20 Perubahan warna menjadi kuning setelah ditambahkan larutan penghenti reaksi (*stop solution*) ke dalam setiap *well* (sumber: dokumen pribadi)

- 10) Kemudian hasil uji dibaca dengan menggunakan *ELISA reader* dengan panjang gelombang 450 nm maksimal 30 menit setelah diberikan *stop solution*



Gambar 3.21 Pembacaan Hasil Uji dengan menggunakan *ELISA reader* (sumber: dokumen pribadi)

(*Bioassay*, China).

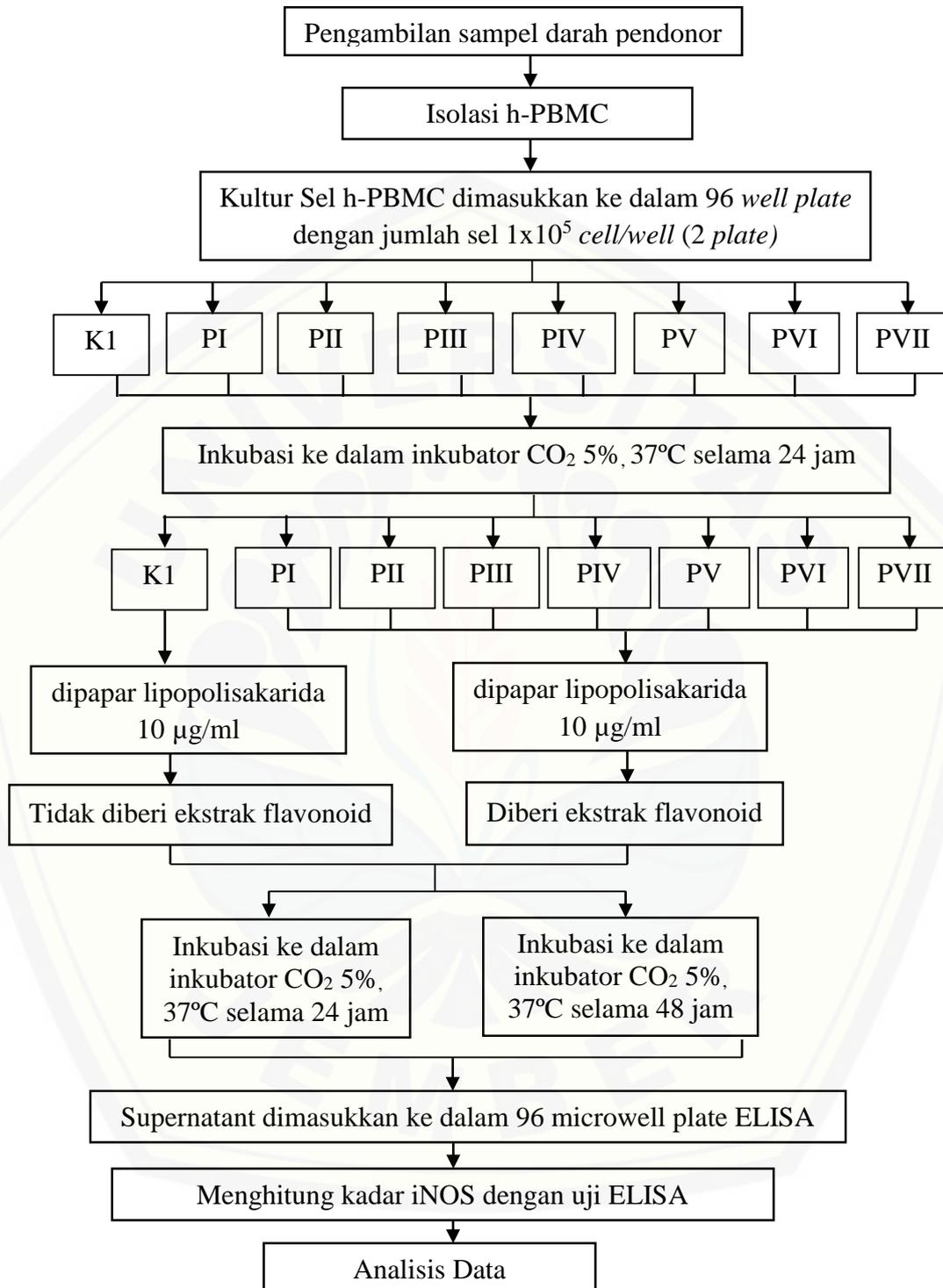
3.9 Analisis data

Analisis data yang digunakan yaitu menggunakan analisa kuantitatif deskriptif, di mana mendeskripsikan hasil uji ELISA kadar iNOS kelompok kontrol dan kelompok perlakuan selama 24 jam dan 48 jam, sehingga dapat diketahui

pengaruh ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi terhadap kadar iNOS pada h-PBMC yang dipapar Lipopolisakarida.



3.10 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Bagan Alur Penelitian

Ket:

- K : kelompok kontrol media yang berisi media kultur, h-PBMC, dan lipopolisakarida.
- PI : kelompok dengan h-PBMC dipapar lipopolisakarida, kemudian diberi ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi dengan konsentrasi 2,5 µg/ml,
- PII : kelompok dengan h-PBMC dipapar lipopolisakarida, kemudian diberi ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi dengan konsentrasi 10 µg/ml,
- PIII : kelompok dengan h-PBMC dipapar lipopolisakarida, kemudian diberi ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi dengan konsentrasi 20 µg/ml,
- PIV : kelompok dengan h-PBMC dipapar lipopolisakarida, kemudian diberi ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi dengan konsentrasi 40 µg/ml,
- PV : kelompok dengan h-PBMC dipapar lipopolisakarida, kemudian diberi ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi dengan konsentrasi 80 µg/ml.
- PVI : kelompok dengan h-PBMC dipapar lipopolisakarida, kemudian diberi ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi dengan konsentrasi 320 µg/ml,
- PVII : kelompok dengan h-PBMC dipapar lipopolisakarida, kemudian diberi ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi dengan konsentrasi 640 µg/ml,

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi cenderung menghambat produksi iNOS pada h-PBMCs yang distimulasi lipopolisakarida selama 24 jam dan 48 jam.
2. Konsentrasi optimum ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi dalam menghambat produksi iNOS pada h-PBMCs yang distimulasi lipopolisakarida dengan konsentrasi 80 µg/ml.

5.2 Saran

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

1. Perlu adanya penelitian lebih lanjut untuk mengetahui mekanisme ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi dalam menghambat iNOS melalui jalur aktivasi NF-κB.
2. Perlu adanya penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi terhadap kadar iNOS pada h-PBMC dengan waktu inkubasi kurang dari 24 jam.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahn, K.S., Noh, E.J., Cha, K.H., Kim, Y.S., Lim, S.S., Shin, K.H., and Jung, S.H. 2006. Inhibitory effects of Iridogenin from the rhizomes of *Belamcanda chinensis* on nitric oxide and prostaglandin E(2) production in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Life Sci.* 78: 2336–2342.
- Aktan, F. 2004. iNOS-mediated nitric oxide and its regulation. *Life Science.* 75: 639-653.
- Andriani, I. 2012. Efektivitas antara *scaling root planing* (srp) dengan dan tanpa pemberian ciprofloxacin per oral pada penderita periodontitis. *IDJ.* 1(2): 70-81.
- Ardhiarisca, O., M. M. D. Utami., T. Kustiari. 2015. Perumusan strategi pengembangan agribisnis tembakau di kabupaten jember menggunakan analisa swot. *Jurnal Teknologi Pertanian.* 16(1): 65-74
- Asmino., dan R. Soedoko. 1987. *Dampak Merokok terhadap Kesehatan dan Kehidupan.*
- Asmis, R., Stevens, J., Begley, J.G., Grimes, B., Van Zant, G., and Fanti, P. 2006. The isoflavone genistein inhibits LPS-stimulated TNF alpha, but not IL-6 expression in monocytes from hemodialysis patients and healthy subjects. *Clin Nephrol.* 65: 267–275.
- Badan Pusat Statistik. 2014. Laporan Produksi Perkebunan Tembakau Tahun 2006-2013. Januari. Surabaya: BPS Jawa Timur
- Bakht, J., Azra., dan M. Shafi. 2012. Antimicrobial activity of nicotiana tabacum using different solvents extracts. *Pakistan: Khyber Pukhtum Khwa Agricultural University.* 44(1): 459-463.
- Balittas. 2014. <http://balittas.litbang.pertanian.go.id/index.php/produk/varietas-unggul/tembakau>. Diakses pada : 9 September 2017.
- Benito S, Lopez D, Saiz MP, Buxaderas S, Sanchez J, Puigparellada P. 2002. A flavonoid-rich diet increases nitric oxide production in rat aorta. *Br J Pharmacol.* 2002;135:910–916.
- Bernardes, N. R., M. Heggdorne-Araújo, I. F. J. C. Borges., F. M. Almeida, E. P. Amaral., E. B. Lasunskaa., M. F. Muzitano., D. B. Oliveira. 2014. Nitric oxide production, inhibitory, antioxidant and antimycobacterial activities of the fruits extract and flavonoid content of schinus terebinthifolius. *Rev Bras Farmacogn.* 24: 644-650.

- Billack, B., Radkar, V., and Adiabouah, C. 2008. In vitro evaluation of the cytotoxic and anti-proliferative properties of resveratrol and several of its analogs. *Cell Mol Biol Lett.* 13: 553–569.
- Cahyono, B. 1998. *Tembakau, Budidaya dan Analisis Tani*. Yogyakarta: Kaninus.
- Cano, J., M. M. Cladera, J. Lagunas, dan M. Castell. 2014. Flavonoids Affect Host-Microbiota Crosstalk through TLR Modulation. *Antioxidants.* 3(4): 649-670.
- CCRC, 2009. *Standard Operating Procedure*, Cancer Chemoprevention Research Cancer Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Chen, C. H., M. T. Sheu., T. F. Che., Y. C. Wang., W. C. Hou., D. Z. Liu., T. C. Chung., dan Y. C. Liang. 2006. Suppression of endotoxin-induced proinflammatory responses by citrus pectin through blocking LPS signaling pathways. *Biochem Pharmacol.* 72(8):1001-9.
- Cheon BS, Kim YH, Son KH, Chang HW, Kang SS, Kim HP. 2000. Effects of prenylated flavonoids and biflavonoids on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production from the mouse macrophage cell line, RAW 264.7. *Planta Med.* 66:596–600.
- Corwin, E. J. 2009. *Buku Saku Patofisiologi*. Ed. 3. Jakarta : EGC.
- DerMarderosian A. 2001. *The Review Of Natural Products 2nd Ed. Facts And Comparison*. Missouri, 554-555.
- Dinas Perkebunan Provinsi Jawa Timur. 2013. *Mekanisme Pengolahan Tanah dan Pasca Panen Tembakau Kasturi*. Januari. Surabaya: Dinas Perkebunan Provinsi Jawa Timur.
- Djajadi, 2015. Tobacco Diversity In Indonesia. *Journal of Biological Research*, 20: 27-32
- Docheva, M., Soleya Dagnon, dan Stela S. Abhege, 2014. Flavonoid Content and Radical Scavenging Potential of Extract Prepared From Tobacco Cultivars and Waste. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, 28(17): 1328-1334.
- Durgo K., I. V. Halec., I. Šola., J. Franeki. 2011. Quercetin/Lanthanum Complex Effects on Human Cervical Carcinoma Cells. *Arh Hig Rada Toksikol.* 62:221-227
- Epinat, J. C., dan T. D. Gilmore. 1999. Diverse agents act at multiple levels to inhibit the Rel/NF-Kb signal transduction pathway. *Oncogene.* 18: 6896-6909.

- Escames, G., L. C. Lopez., dan F. Ortiz. 2006. Age dependent lipopolysaccharide-induce INOS expression and multiorgan failure in rats: effects of melatonin treatment. *Experimental Gerontology*. 41(11): 65-73.
- Fathiazad, F., A. Delazar., R. Amiri., dan S. D. Sarker. 2005. Extraction of Flavonoids and Quantification of Rutin from waste Tobacco Leaves. *Iranian Journal of Pharmaceutical*. 3: 222-227.
- Fatimah, I. 2016. Pengaruh Ekstrak Flavonoid Rendah Nikotin Limbah Daun Tembakau Kasturi (*Nicotiana Tabacum L.*) Terhadap Pertumbuhan Mikroba Rongga Mulut. *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.
- Forstermann, U., dan W. C. Sessa. 2012. Nitric oxide synthase: regulation and function. *European Heart Journal*. 33: 829-837.
- Gomes, A., F. Eduarda, L. F. C. Jose, M. Lurdes, dan M. luisa. 2008. Molecular Mechanisms of Anti-Inflammatory Activity Mediated by Flavonoids. *Curr Med Chem*, 15(16): 1586-1605.
- Gupta, A., dan S. R. Chaphalkar. 2016. Anti-inflammatory and immunosuppressive activities of flavonoids from medicinal plants. *J Herb Med Pharmacol*. 5(3): 121-124.
- Hadi, P. U., dan S. Friyatno. 2008. Peranan sector tembakau dan industri rokok dalam perekonomian Indonesia: Analisis table I-O tahun 2000. *Jurnal Agro Ekonomi*. 26(1): 90-121.
- Hajishengallis G., R. P. Darveau., dan M. A. Curtis. 2012. The Keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol*. 10(10):717-725.I
- Hajishengallis, G. 2011. Immune evasion strategies of *Porphyromonas gingivalis*. *J Oral Biosci*, 53(3):233-240.
- Hamalainen, M., Nieminen, R., Vuorela, P., Heinonen, M., and Moilanen, E. 2007. Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kappaB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kappaB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators Inflamm*. 2007: 45673.
- Han, S., J. H. Lee., C. Kim., D. Nam., W. S. Chung., S. G. Lee., K. S. Ahn., S. K. Cho., M. Cho, K. S. Ahn. 2013. Capillarisin inhibits iNOS, COX-2 expression, and proinflammatory cytokines in LPS-induced RAW 264.7 macrophages via the suppression of ERK, JNK, and NF-kappaB activation. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 35: 34-42
- Harborne, J.B., dan C.A. Williams. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 55: 481-504.

- Herawati, I., U. A. Husin, dan S. Sudigdoadi. 2015. Pengaruh Ekstrak Etanol Propolis Terhadap Aktivitas dan Kapasitas Fagositosis pada Kultur Makrofag yang Diinfeksi Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC). *MKB*. 47 (2): 102-108.
- Herminingsih, H. 2014. Hubungan adaptasi petani terhadap perubahan iklim dengan produktivitas tembakau pada lahan sawah dan tegalan di kabupaten jember. *JSEP*. 7(2): 31-44.
- Hougee, S., A. Sanders, J. Faber, Y. M.F. Graus, W. B. V. D. Berg, J. Garssen, H. F. Smit, dan M. A. Hoijer. 2005. Decreased pro-inflammatory cytokine production by LPS-stimulated PBMC upon in vitro incubation with the flavonoids apigenin, luteolin or chrysin, due to selective elimination of monocytes/macrophages. *Biochemical Pharmacology*. 69: 241–248
- Kang, C., Y. H. Choi., I. Choi., J. Lee., dan G. Kim. 2011. Inhibition of Lipopolysaccharide-induced INOS, COX-2, and TNF Ekspresi by Aqueous Extract of Orxa Japonica in RAW 264.7 Cells via Suppression of NF-Kb activity. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 10(2): 161-168.
- Kim, H.P., K. H. Son, H. W. Chang, dan S. K. Sam. 2004. Anti-inflammatory Plants flavonoid and Cellular Action Mechanisms. *J Pharmacol Sci*, 96: 229-245
- Kumar, S., dan A. K. Pandey. 2013. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids. *The scientific world journal*, 2013.
- Lin, C.M., Huang, S.T., Liang, Y.C., Lin, M.S., Shih, C.M., Chang, Y.C., Chen, T.Y., and Chen, C.T. (2005). Isoviteksin suppresses lipopolysaccharide mediated inducible nitric oxide synthase through inhibition of NF-kappa B in mouse macrophages. *Planta Med*. 71: 748–753.
- Lipinski, B. 2011. Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease. *Review Article: Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 11: 1-9.
- Liptrott, N. 2016. Preparation of blood and PBMC for cytokine secretion. <http://www.euncl.eu/aboutus/assaycascade/PDFs/Immunology/EUNCL-ITA-010.pdf?m=1468937873>. Diakses pada : 18 Oktober 2017.
- Liuzzo G., M. Santamaria., L. M. Biasucci, Narducci M, Colafrancesco V, Porto A, Brugaletta S. 2007. Persistent activation of nuclear factor kappa-B signaling pathway in patients with unstable angina and elevated levels of C-reactive protein evidence for a direct proinflammatory effect of azide and lipopolysaccharide-free C-reactive protein on human monocytes via nuclear factor kappa-B activation. *J Am Coll Cardiol*. 49:185–194.

- Lopez, N. L., P. Erick, L. Dulce, dan J. Basilio. 2016. Flavonoid As Cytokine Modulators: A Possible Therapy For Inflammation-Related Disease. *Molecular Sciences*, 921.
- Moutia, M., K. E. Azhary, A. Elouaddari, A. A. Jahid, J. J. Eddine, F. Seghrouchni, N. Habti, dan A. Badou. 2016. Capparis Spinosa L. Promotes Antiinflammatory Response In Vitro through the Control Of Cytokine Gene Expression in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *BMC Immunology*. 17(26): 1-12.
- Murakami, A., dan H. Ohigashi. 2007. Targeting NOX, INOS, and COX-2 in inflammatory cells: Chemoprevention using food phytochemicals. *Int. J. Cancer*. 121: 2357-2363.
- Newman, M.G., H. H. Takei., P. R. Klokkevold., dan F. A. Carranza. 2015. *Carranza's Clinical Periodontology*, 12th. W.B. Saunders Company: Philadelphia.
- Purahmad, J., dan A. Salimi. 2015. Isolated Human Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC), a Cost Effective Tool for Predicting Immunosuppressive Effects of Drugs and Xenobiotics. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 14 (4): 679-98.
- Podlejski, J., dan Olejniczak, W. 1983. *Methods and Techniques in Research of Tobacco Flavour*. *Nahrung*, 27(5): 429-436.
- Prestes-Carneiro L. E., M. T. Shio., P. D. Fernandes., dan S. Jancar. 2007. Cross-regulation of iNOS and COX-2 by its products in murine macrophages under stress conditions. *Cell Physiol Biochem*. 20: 283–292.
- Radkar, V., Hardej, D., Lau-Cam, C., and Billack, B. (2007). Evaluation of resveratrol and piceatannol cytotoxicity in macrophages, T cells, and skin cells. *Arh Hig Rada Toksikol*. 58: 293–304.
- Rang, H. P., M. M. Dale., J. M. Ritter., dan R. J. Flower. 2007. *Farmacologia Rio de Janeiro, RJ (6th Ed)*. Elsevier.
- Regueira, T., M. Andersen., dan M. Mercado. 2011. Physiopathology of acute renal failure during sepsis. *Med Intensiva*. 35(4): 24-32.
- Rizky, F. 2016. Uji Sitotoksitas Ekstrak Flavonoid Rendah Nikotin Limbah Daun Tembakau Kasturi (*Nicotiana tabacum* L) pada kultur sel fibroblast gingiva manusia. *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.
- Ru, Q. M., L. J. Wang, W. M Li, J. L Wang, dan Y. T. Ding. 2012. In Vitro Antioxidant Properties of Flavonoid and Polysaccharides Extract from Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Leaves. *Journal Molecules*, 17: 1281-1291.

- Rusli, M. S., Suryani., dan Puspita, P. E. 2011. Antibacterial Activity of Temanggung Tobacco Extract Variety Genjah Kemloko. *Skripsi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Sabir A, 2003. Pemanfaatan flavonoid di bidang kedokteran gigi. *Maj Ked Gigi (Dental Journal)*; Edisi Khusus Temu Ilmiah Nasional III: 81–7.
- Salim T, Sershen CL, May EE. 2016. Investigating the Role of TNF- α and IFN- γ Activation on the Dynamics of iNOS Gene Expression in LPS Stimulated Macrophages. *PLoS ONE* . 11(6):1-35
- Sari, F.P., dan M. S. Shofi. 2011. Ekstraksi zat aktif antimikroba dari tanaman yodium (*jatropha multifida linn*) sebagai bahan baku alternatif antibiotik alami. *Technical Report*. Universitas Diponegoro, Semarang.
- Serafini M., I. Peluso., A. Raguzzini. 2010. Antioxidants and the immune system Flavonoids as anti-inflammatory agents Proceedings of the Nutrition Society: 3rd International Immunonutrition Workshop. 69 (273–278). 21–24 October 2009
- Shin, K. M., Y. H. Kim., W. S. Park., I. Kang., J. Ha., J. W. Choi., Park, H.J. dan Lee, K.T. 2004. Inhibition of meth- anol extract from the fruits of *Kochiascoparia* on lipo- polysaccharide-induced nitric oxide, prostaglandin E2, and tumor necrosis factor-alpha production from murine macrophage RAW 264.7 cells. *Biological & Pharmaceu- tical Bulletin*. 27: 538-543.
- Sonia, S. 2017. Pengaruh Ekstrak Flavonoid Daun Tembakau Kasturi terhadap Ekspresi Toll Like Receptor 4 pada Kultur Sel Osteoblast yang Dipapar Lipopolisakarida. *Skripsi*. Universitas Jember.
- Sukumaran S., E. Lepist., D. C. DuBois, R.R. Almon., W. J. Jusko. 2012. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling of Methylprednisolone Effects on iNOS mRNA Expression and Nitric Oxide During LPS-Induced Inflammation in Rats *Pharm Res*. 29(8): 2060–2069
- Susilowati, E. Y. 2006. “Identifikasi Nikotin dari Daun Tembakau (*Nicotiana tabacum*) Kering dan Uji Efektifitas Ekstrak Daun Tembakau sebagai Insektisida Penggerak Batang Padi (*Scirpophaga innonata*)”. *Skripsi*. Semarang: Universitas Negeri Semarang.
- Taiga, A., dan E. Friday. 2009. Variations in phytochemical properties of selected fungicidal aqueous extracts of some plant leaves in kogi state, nigeria. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*. 3(3): 407-409.
- Uematsu, S., dan S. Akira. 2008. Toll-Like Receptors (TLRs) and Their Ligands. *Handbook of Experimental Pharmacology* 183. 1-21.

World Health Organization. 2011. *Pedoman teknik dasar untuk laboratorium*. Ed. 2. Jakarta : EGC.

Yu, Y., Pavan K Soma, Y Martin Lo, Cheng-I Whei, dan When-Hsing Cheng, 2012. Effect of Nicotine-free Tobacco Extract on DNA Damage Responses in Cancerous and Non-Cancerous Cells. *J. Carcinogene Mutagene.*, 1-5



LAMPIRAN

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



LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
(INDONESIAN INSTITUTE OF SCIENCES)
UPT BALAI KONSERVASI TUMBUHAN
KEBUN RAYA PURWODADI

Jl. Raya Surabaya - Malang Km. 65 Purwodadi - Pasuruan 67163
Telp. (+62 343) 615033, (+62 341) 426046, Faks. (+62 343) 615033, (+62 341) 426046
website: <http://www.krpurwodadi.lipi.go.id>



SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI

No.1209 /IPH.6/HM/IX/2015

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

drg. Agustin Wulan Suci D, MDSC NIP : 197908142008122003

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

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

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

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

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

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



Deden Mudiana, S.Hut, M.Si

B. Surat Keterangan *Ethical Clearance*

	<p>KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK) FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS JEMBER <i>(THE ETHICAL COMMITTEE OF MEDICAL RESEARCH FACULTY OF DENTISTRY UNIVERSITAS JEMBER)</i></p>
<p>ETHIC COMMITTEE APPROVAL <u>No. 016/UN25.8/KEPK/DL/2018</u></p>	
Title of research protocol	: "Pengaruh Ekstrak Flavonoid Daun Tembakau Kasturi Terhadap Kadar Inducible Nitric Oxide <i>Synthase</i> Pada Human Peripheral Blood Mononuclear <i>Cell</i> Yang Dipapar <i>Lipopolisakarida Porphyromonas Gingivalis</i> "
Document approved	: Research Protocol
Principal investigator	: Hanifah Nailul Amania
Member of research	: -
Responsible Physician	: Hanifah Nailul Amania
Date of approval	: February 5th, 2018
Place of research	: 1. Pharmacy Laboratory at Faculty of Pharmacy in Universitas Jember 2. Chemical Engineering Laboratory in Politeknik Negeri Malang 3. Pharmacology Laboratory at Faculty of Medicine in University of Gajah Mada 4. Parasitology Laboratory at Faculty of Medicine in University of Gajah Mada
<p>The Research Ethic Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember states that the above protocol meets the ethical principle outlined and therefore can be carried out.</p>	
<p>Jember, February 10th, 2018</p>	
<p>Dean of Faculty of Dentistry Universitas Jember</p> 	<p>Chairperson of Research Ethics Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember</p> 
<p>(drg. R. Rahardyan P. M. Kes, Sp. Pros)</p>	<p>(Prof. Dr. drg. I Dewa Ayu Ratna Dewanti, M, Si.)</p>

C. Informed Consent

LEMBAR INFORMASI UNTUK RESPONDEN

Saya peneliti skripsi, Hanifah Nailul Amania dari Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember akan melakukan penelitian yang berjudul “Pengaruh Ekstrak Flavonoid Daun Tembakau Kasturi Terhadap Kadar *Inducible Nitric Oxide Synthase* Pada *Human Peripheral Blood Mononuclear Cell* Yang Dipapar Lipopolisakarida *Porphyromonas gingivalis*”

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi (*Nicotiana tabacum L.*) terhadap kadar iNOS pada h-PBMC yang dipapar lipopolisakarida *Porphyromonas gingivalis*.

Peneliti mengajak saudara untuk ikut serta dalam penelitian ini. Penelitian ini membutuhkan 1 subyek penelitian, dengan jangka waktu keikutsertaan 4 bulan.

A. Kesukarelaan untuk ikut penelitian

Anda bebas memilih keikutsertaan dalam penelitian ini tanpa ada paksaan. Bila Anda sudah memutuskan untuk ikut, Anda juga bebas untuk mengundurkan diri/berubah pikiran setiap saat tanpa dikenai denda atau pun sanksi apapun.

B. Prosedur penelitian

Apabila Anda bersedia berpartisipasi dalam penelitian ini, Anda diminta menandatangani lembar persetujuan ini rangkap dua, satu untuk Anda simpan. dan satu untuk peneliti. Prosedur selanjutnya adalah:

1. Anda akan diwawancarai oleh dokter untuk menanyakan: nama, usia, riwayat penyakit, riwayat penggunaan obat, riwayat alergi, kebiasaan merokok,

kebiasaan minum-minuman keras atau minum-minuman yang mengandung alkohol.

2. Menjalani pemeriksaan fisik oleh dokter untuk memeriksa status kesehatan
3. Kira kira semalam sebelum penelitian, anda diminta berpuasa, namun diperbolehkan minum air putih seperlunya.
4. Pada hari dimulainya penelitian, anda diminta datang pada pukul 6.45 untuk selanjutnya dilakukan pengambilan darah
5. Pengambilan darah dilakukan sebanyak 2 kali dengan cara menggunakan *syringe* 10 ml tusuk bagian vena dan diambil darah secara perlahan.
6. Pengambilan darah dilakukan oleh perawat yang sudah terbiasa mengambil darah.
7. Darah pendonor disimpan dalam *vacutee tube* yang sudah terdapat EDTA (*Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid*) 5,4 mg.

C. Kewajiban subyek penelitian

Sebagai subyek penelitian, saudara berkewajiban mengikuti aturan atau petunjuk penelitian seperti yang tertulis di atas. Bila ada yang belum jelas, saudara bisa bertanya lebih lanjut kepada peneliti. Selama penelitian, tidak diperbolehkan minum obat lain ataupun jamu selain yang diberikan oleh peneliti.

D. Resiko, efek samping dan penanganannya

Pengambilan darah ini akan menimbulkan sedikit rasa nyeri ketika jarum ditusukkan, oleh karena itu pasien tidak boleh cemas dan harus rileks agar pengambilan darah efektif dan efisien.

E. Manfaat

Anda akan membantu penelitian ini untuk:

1. Memberikan pengetahuan tentang pengaruh ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi (*Nicotiana tabacum L.*) terhadap kadar iNOS pada h-PBMC yang dipapar lipopolisakarida *Porphyromas gingivalis*.
2. Mengembangkan ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi (*Nicotiana tabacum L.*) sebagai bahan dasar pembuatan obat anti inflamasi pada penyakit periodontitis.

F. Kerahasiaan

Semua informasi yang berkaitan dengan identitas subyek penelitian akan dirahasiakan dan hanya akan diketahui oleh peneliti dan staf penelitian. Hasil penelitian akan dipublikasikan tanpa identitas subyek penelitian.

G. Kompensasi

Saudara akan mendapatkan 1 botol air mineral, 1 botol susu dan roti.

H. Pembiayaan

Semua biaya yang terkait penelitian akan ditanggung oleh peneliti dan sponsor.

I. Informasi Tambahan

Saudara diberi kesempatan untuk menanyakan semua hal yang belum jelas sehubungan dengan penelitian ini. Bila sewaktu-waktu terjadi efek samping atau membutuhkan penjelasan lebih lanjut, saudara dapat menghubungi Hanifah Nailul Amania pada no. HP 081231934902.

PERSETUJUAN KEIKUTSERTAAN DALAM PENELITIAN

Semua penjelasan tersebut telah disampaikan kepada saya dan semua pertanyaan saya telah dijawab oleh peneliti. Saya mengerti bahwa bila memerlukan penjelasan, saya dapat menanyakan kepada peneliti.

Dengan menandatangani formulir ini, saya setuju untuk ikut serta dalam penelitian ini.

Yogyakarta, 24 November 2017

Saksi

Pasien/Subyek



(Dr.drg.Banun Kusumawardani, M.Kes)



(Tazqia Jamil Pratami)