



**DAYA HAMBAT EKSTRAK DAUN WUNGU (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff) TERHADAP ADHESI BAKTERI *Porphyromonas gingivalis* PADA NEUTROFIL**

**SKRIPSI**

Oleh

**Grace Valencia Handoko**

**141610101066**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI**

**UNIVERSITAS JEMBER**

**2018**



**DAYA HAMBAT EKSTRAK DAUN WUNGU (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff) TERHADAP ADHESI BAKTERI *Porphyromonas gingivalis* PADA NEUTROFIL**

**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:

**Grace Valencia Handoko**

**NIM 141610101066**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI**

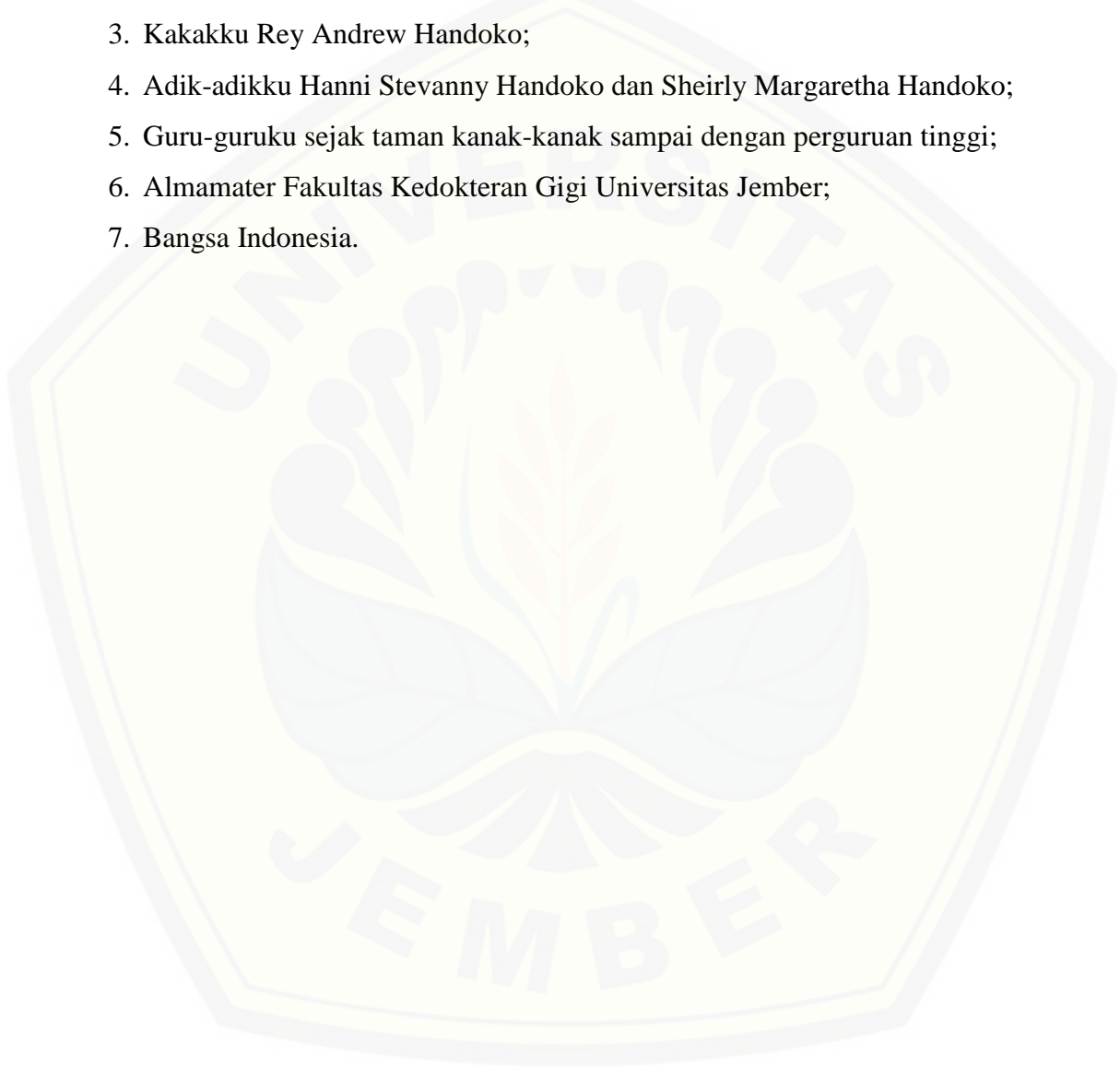
**UNIVERSITAS JEMBER**

**2018**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Tuhan Yang Maha Esa;
2. Ayahanda Suhandoko dan Ibunda Sih Mahanani;
3. Kakakku Rey Andrew Handoko;
4. Adik-adikku Hanni Stevanny Handoko dan Sheirly Margaretha Handoko;
5. Guru-guruku sejak taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi;
6. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
7. Bangsa Indonesia.



## MOTO

“Sebab itu janganlah kamu kuatir akan hari esok, karena hari esok mempunyai kesusahannya sendiri. Kesusahan sehari cukuplah untuk sehari.”

(Matius 6:34)<sup>\*)</sup>

“Janganlah takut, sebab Aku menyertai engkau, janganlah bimbang, sebab Aku ini Allahmu; Aku akan meneguhkan, bahkan akan menolong engkau; Aku akan memegang engkau dengan tangan kanan-Ku yang membawa kemenangan.”

(Yesaya 41:10)<sup>\*)</sup>

---

<sup>\*)</sup> Lembaga Alkitab Indonesia. 1998. Alkitab Versi Pemulihan Perjanjian Baru. Jakarta: Yayasan Perpustakaan Injil Indonesia.

## PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Grace Valencia Handoko

NIM : 141610101016

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul "Daya Hambat Ekstrak Daun Wungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff) terhadap Adhesi Bakteri *Porphyromonas gingivalis* pada Neutrofil" adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 2 Mei 2018

Yang menyatakan,

Grace Valencia Handoko

NIM 141610101066

**SKRIPSI**

**DAYA HAMBAT EKSTRAK DAUN WUNGU (*Graptophyllum Pictum (L.) Griff*) TERHADAP ADHESI BAKTERI *Porphyromonas Gingivalis* PADA NEUTROFIL**

**Oleh:**

**Grace Valencia Handoko**

**NIM 141610101066**

**Pembimbing:**

Dosen Pembimbing Utama : Dr. drg. Atik Kurniawati, M. Kes.

Dosen Pembimbing Anggota : drg. Depi Praharani, M.Kes.

## PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul "Daya Hambat Ekstrak Daun Wungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff) terhadap Adhesi Bakteri *Porphyromonas gingivalis* pada Neutrofil" telah diuji dan disahkan pada :

hari, tanggal : 2 Mei 2018

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Penguji Utama

Penguji Anggota

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

NIP. 197104092005012000

drg. Nuzulul Hikmah, M.Biomed

NIP. 198107172008012017

Pembimbing Utama

Pembimbing Anggota

Dr. drg. Atik Kurniawati, M.Kes.

NIP. 197102041998022002

drg. Depi Praharani, M.Kes

NIP. 196801221997022001

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi

Universitas Jember,

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

NIP. 196901121996011001

## RINGKASAN

**Daya Hambat Ekstrak Daun Wungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff) terhadap Adhesi Bakteri *Porphyromonas gingivalis* pada Neutrofil; Grace Valencia Handoko; 141610101066; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.**

Penyakit periodontal merupakan infeksi pada jaringan penyangga gigi yaitu gingiva, ligamen periodontal, sementum dan tulang alveolar. Penyebab utama penyakit periodontal adalah bakteri pada plak. *P. gingivalis* merupakan salah satu bakteri yang berperan dalam proses pembentukan plak dan menyebabkan perubahan patologik jaringan periodontal. Diantara patogen periodontal lain, *P. gingivalis* menjadi salah satu “key pathogen” pada penyakit periodontal. Bakteri *P. gingivalis* telah menginfeksi sekitar 40–100% pasien periodontitis kronis. Bakteri ini ditemukan di dalam 85,75% plak subgingiva pasien periodontitis kronis. Sebelum melakukan kolonisasi, invasi dan sampai timbulnya suatu infeksi, bakteri melakukan adhesi pada jaringan ataupun *host*. Adhesi adalah proses melekatnya permukaan bakteri dengan membran plasma *host*. Oleh karena itu, adhesi *P. gingivalis* pada neutrofil perlu dihambat, sehingga tahap awal proses infeksi dapat dicegah dan tidak mengganggu kerja sel *host* seperti neutrofil. Daun wungu mengandung beberapa zat aktif yang diduga dapat menghambat adhesi bakteri. Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui adanya daya hambat ekstrak daun wungu terhadap adhesi bakteri *P. gingivalis* pada neutrofil dan perbedaan daya hambat adhesi bakteri *P. gingivalis* antara ekstrak daun wungu konsentrasi 3,12%, 6,25%, 12,5% dan 25%.

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratories *in vitro* dengan *the post test only control group design*. Sampel penelitian berupa neutrofil yang diisolasi dari darah vena subyek yang memenuhi kriteria dan digolongkan menjadi 5 kelompok yaitu neutrofil yang tidak diinkubasi ekstrak daun wungu (kelompok kontrol), diinkubasi ekstrak daun wungu 3,12% (kelompok EDW3,12%), diinkubasi ekstrak daun wungu 6,25% (kelompok EDW6,25%), diinkubasi ekstrak daun wungu 12,5% (kelompok EDW12,5%), dan diinkubasi ekstrak daun



wungu 25% (kelompok EDW25%). Semua kelompok diinkubasi selama 3 jam, kemudian dipapar *P. gingivalis* selama 8 jam. Selanjutnya dilakukan pewarnaan Giemsa dan dilakukan penghitungan indeks adhesi yang dilakukan oleh tiga orang pengamat. Pengamatan pada 3-4 lapang pandang hingga didapatkan jumlah 100 neutrofil. Penghitungan dilakukan dengan cara menghitung jumlah *P. gingivalis* yang melekat per neutrofil kemudian dibagi dengan jumlah total neutrofil yang dihitung yaitu 100.

Data penelitian dilakukan analisis secara statistik. Berdasarkan hasil uji Shapiro-Wilk dan uji Levene maka didapatkan data berdistribusi normal dan homogen sehingga dilanjutkan dengan uji statistik parametrik *one way anova*. Hasil uji *one way anova* didapatkan nilai signifikansi (p) sebesar 0,000 ( $<0,05$ ) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada seluruh kelompok penelitian. Selanjutnya dilakukan uji LSD (*Least Significant Difference*) yang menunjukkan bahwa perbedaan signifikan yang ditandai dengan nilai signifikansi (p) lebih kecil dari 0,05 yaitu antara kelompok EDW25% dengan konsentrasi 3,12%, 6,25%, dan 12,5%.

Berdasarkan hasil penelitian ini, diketahui bahwa ekstrak daun wungu konsentrasi 25% yang mampu menghambat adhesi bakteri *P. gingivalis* pada neutrofil. Adhesi dari bakteri pada permukaan sel dapat dihambat oleh bahan kimia yang secara spesifik merusak atau mengisolasi adhesin bakteri maupun reseptor sel *host*. Bahan kimia tersebut juga terdapat dalam ekstrak daun wungu. Hasil uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) pada daun wungu menunjukkan hasil positif pada alkaloid dan flavonoid yang mana senyawa kimia tersebut memiliki kemampuan untuk menghambat adhesi *P. gingivalis* pada neutrofil. Adanya efek antibakteri juga diduga menyebabkan adhesi *P. gingivalis* pada neutrofil semakin rendah dikarenakan perkembangan *P. gingivalis* terhambat dan mati sebelum melakukan adhesi pada neutrofil.

Kesimpulan penelitian ini bahwa ekstrak daun wungu dapat menghambat adhesi *P. gingivalis* pada neutrofil dan ekstrak daun wungu yang mampu menghambat adhesi *P. gingivalis* pada neutrofil hanya konsentrasi 25%.

## PRAKATA

Puji syukur kepada Tuhan Yesus Kristus atas kasih dan kuasa serta rencananya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Daya Hambat Ekstrak Daun Wungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff) terhadap Adhesi Bakteri *Porphyromonas gingivalis* pada Neutrofil”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

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

1. Kedua orang tuaku tercinta: Papa Suhandoko dan Mama Sih Mahanani, yang tidak pernah lelah memberikan doa, nasehat, semangat, pengorbanan, dukungan serta perhatian yang penuh dengan kasih sayang kepada penulis;
2. Kakakku Rey Andrew Handoko, yang selalu memberikan doa dan dukungan;
3. Adik-adikku Hanni Stevanny Handoko dan Sheirly Margaretha Handoko, yang tiada hentinya selalu mendoakan, menyayangi, menjadi penyemangat dan penghibur selama ini;
4. drg. Rahardyan Parnaadji, M. Kes., Sp. Pros, sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas jember;
5. Dr. drg. Atik Kurniawati, M.Kes. sebagai Dosen Pembimbing Utama dan drg. Depi Praharani, M.Kes. sebagai Dosen Pembimbing Pendamping yang telah meluangkan waktu dalam memberikan bimbingan, berbagi ilmu dan motivasi dengan penuh kesabaran sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
6. drg. Melok Aris Wahyukundari, M.Kes., Sp.Perio, sebagai Dosen Penguji Ketua, dan drg. Nuzulul Hikmah, M.Biomed, sebagai Dosen Penguji Anggota yang telah meluangkan waktu untuk memberikan kritik dan saran dalam penulisan skripsi ini;
7. drg. Hafiedz Maulana, M.Biomed, sebagai Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberi motivasi, saran dan nasehat selama ini;
8. *Banyuwangi's Squad*, teman dari maba sampai sekarang, Heni Jayanti dan Zakiyya Ulpiyah yang selalu ada disaat suka maupun duka dan yang selalu

sabar mendengarkan keluh kesahku selama perkuliahan dan penyelesaian skripsi ini;

9. Geng Soleh Soleha, Maulana Akbari, Paramita Rachmawati Zulkarnain, Devica Dwi Ratna Putri dan Thariq Ibnu Tarmizi yang selalu menghibur dan bersedia menemani bermain dikala jenuh dan suntuk selama perkuliahan dan penyelesaian skripsi ini;
10. Teman seperjuangan dalam penelitian, Arina Nur Rahmah yang selalu ada 24/7 untuk mendukung dalam segala kondisi;
11. Teman-teman UKMF Persekutuan Mahasiswa Kristen Katolik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, yang selalu memberi dukungan doa dan motivasi secara rohani;
12. Saudara Aldiansyah Hakim, yang selalu memberi motivasi; saudari Prisca Vianda Sukma, yang menemani selama penelitian; saudari Narita Ajeng Loviana, yang tidak pernah bosan untuk bersedia diajak diskusi;
13. Staff Laboratorium Bioscience Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yaitu Mas Erwan, Mbak Nur dan Mbak Ning, staff Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yaitu Mbak Indri, staff laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Jember yaitu bu Widi dan staff WETO.
14. Seluruh teman-teman LECI FKG 2014, terima kasih atas motivasi, kerja sama, kekeluargaan, dan kekompakkannya selama ini;
15. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 2 Mei 2018

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	iii
<b>HALAMAN MOTO</b> .....	iv
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN</b> .....	vi
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vii
<b>RINGKASAN</b> .....	viii
<b>PRAKATA</b> .....	x
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xiv
<b>DAFTAR TABEL</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> .....	3
<b>1.3 Tujuan Penelitian</b> .....	3
<b>1.4 Manfaat Penelitian</b> .....	4
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	5
<b>2.1 Bakteri <i>Porphyromonas gingivalis</i></b> .....	5
2.1.1 Habitat dan Morfologi <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	5
2.1.2 Virulensi <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	6
<b>2.2 Mekanisme Adhesi Bakteri</b> .....	7
2.2.1 Adhesi <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	8
<b>2.3 Neutrofil</b> .....	9
<b>2.4 Tanaman Daun Wungu (<i>Graptophyllum pictum</i> (L) Griff)</b> .....	10
2.4.1 Habitat dan Morfologi Tanaman Daun Wungu .....	10
2.4.2 Kandungan Kimia dan Manfaat Tanaman Daun Wungu .....	11
<b>2.5 Ekstrak</b> .....	13

2.5.1 Ekstraksi.....	13
2.5.2 Metode Ekstraksi.....	13
<b>2.6 Pengaruh Daun Wungu terhadap Adhesi Bakteri pada Host .....</b>	<b>15</b>
<b>2.7 Kerangka Konsep.....</b>	<b>17</b>
<b>2.8 Hipotesis .....</b>	<b>18</b>
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 Jenis Penelitian .....</b>	<b>19</b>
<b>3.2 Rancangan Penelitian.....</b>	<b>19</b>
<b>3.3 Tempat dan Waktu Penelitian.....</b>	<b>19</b>
3.3.1 Tempat Penelitian.....	19
3.3.2 Waktu Penelitian.....	19
<b>3.4 Identifikasi Variabel Penelitian .....</b>	<b>19</b>
<b>3.5 Definisi Operasional.....</b>	<b>21</b>
<b>3.6 Sampel Penelitian .....</b>	<b>21</b>
3.6.1 Jumlah Sampel .....	21
3.6.2 Penggolongan Sampel Penelitian.....	22
<b>3.7 Alat dan Bahan Penelitian.....</b>	<b>23</b>
3.7.1 Alat Penelitian.....	23
3.7.2 Bahan Penelitian.....	23
<b>3.8 Prosedur Penelitian.....</b>	<b>23</b>
<b>3.9 Analisis Data .....</b>	<b>29</b>
<b>3.10 Alur Penelitian.....</b>	<b>30</b>
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>31</b>
<b>4.1 Hasil Penelitian .....</b>	<b>31</b>
<b>4.2 Pembahasan .....</b>	<b>37</b>
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>40</b>
<b>5.1 Kesimpulan.....</b>	<b>40</b>
<b>5.2 Saran .....</b>	<b>40</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>41</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>47</b>

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
<b>Gambar 2.1</b> Pemeriksaan <i>P. gingivalis</i> secara mikroskopis .....	6
<b>Gambar 2.2</b> Neutrofil (panah hitam) dilihat dengan mikroskop perbesaran 1000x .....	9
<b>Gambar 2.3</b> Tanaman daun wungu ( <i>Graptophyllum pictum</i> (L.) Griff) yang tumbuh baik pada tempat yang terbuka .....	11
<b>Gambar 2.4</b> Daun wungu .....	11
<b>Gambar 2.5</b> Adhesi <i>P. gingivalis</i> pada neutrofil.....	16
<b>Gambar 2.6</b> Kerangka konsep penelitian.....	17
<b>Gambar 3.1</b> Alur Penelitian .....	30
<b>Gambar 4.1</b> Isolat neutrofil .....	31
<b>Gambar 4.2</b> Neutrofil yang tidak diinkubasi ekstrak daun wungu (kelompok kontrol).....	32
<b>Gambar 4.3</b> Neutrofil yang diinkubasi ekstrak daun wungu 3,12% (kelompok EDW3,12%).....	32
<b>Gambar 4.4</b> Neutrofil yang diinkubasi ekstrak daun wungu 6,25% (kelompok EDW6,25%).....	33
<b>Gambar 4.5</b> Neutrofil yang diinkubasi ekstrak daun wungu 12,5% (kelompok EDW12,5%).....	33
<b>Gambar 4.6</b> Neutrofil yang diinkubasi ekstrak daun wungu 25% (kelompok EDW25%).....	34
<b>Gambar 4.7</b> Diagram batang indeks adhesi <i>Porphyromonas gingivalis</i> pada neutrofil.....	35

## DAFTAR TABEL

	Halaman
<b>Tabel 4.1</b> Rata-rata indeks adhesi <i>Porphyromonas gingivalis</i> pada neutrofil....	34
<b>Tabel 4.2</b> Hasil uji normalitas menggunakan uji <i>Shapiro-Wilk</i> .....	36
<b>Tabel 4.3</b> Hasil uji homogenitas menggunakan <i>Levene's test</i> .....	36
<b>Tabel 4.4</b> Hasil uji <i>one way anova</i> .....	36
<b>Tabel 4.5</b> Hasil uji LSD indeks adhesi <i>Porphyromonas gingivalis</i> pada neutrofil .....	37

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
<b>Lampiran A.</b> <i>Ethical clearance</i> .....	47
<b>Lampiran B.</b> Surat keterangan identifikasi daun wungu .....	48
<b>Lampiran C.</b> Surat keterangan hasil ekstraksi daun wungu.....	49
<b>Lampiran D.</b> Surat keterangan uji identifikasi dan gambaran mikroskopis <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	50
<b>Lampiran E.</b> <i>Informed consent</i> .....	52
<b>Lampiran F.</b> Foto alat dan bahan penelitian.....	53
<b>Lampiran G.</b> Foto prosedur Penelitian.....	56
<b>Lampiran H.</b> Hasil uji adhesi .....	57
<b>Lampiran I.</b> Hasil penghitungan adhesi <i>P. gingivalis</i> pada neutrofil .....	62
<b>Lampiran J.</b> Analisis data penelitian.....	68



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Penyakit periodontal merupakan penyakit multifaktorial yang lazim dijumpai pada negara maju dan berkembang (Muthukumar dan Suresh, 2009). Di Indonesia, penyakit periodontal mempunyai prevalensi cukup tinggi. Berdasarkan Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) tahun 2013 menunjukkan bahwa prevalensi penyakit periodontal penduduk Indonesia sebesar 23,4% pada tahun 2008 dan meningkat menjadi 25,9% pada tahun 2013 (Balitbang, 2013).

Penyakit periodontal merupakan infeksi pada jaringan penyangga gigi yaitu gingiva, ligamen periodontal, sementum dan tulang alveolar (Lamont dan Howard, 1998). Penyebab utama terjadinya penyakit periodontal disebabkan oleh bakteri pada plak (Newman dkk., 2015). Plak terbentuk dari deposit lunak yang membentuk lapisan *biofilm* dan melekat erat pada permukaan gigi, gusi serta permukaan keras lainnya di dalam rongga mulut (Toar dkk., 2013). Plak berisi kumpulan mikroorganisme patogen seperti *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia* (Newman dkk., 2015). *P. gingivalis* merupakan salah satu bakteri yang menyebabkan perubahan patologik jaringan periodontal (Page, 1991). Diantara patogen periodontal lain, *P. gingivalis* menjadi salah satu “*key pathogen*” pada penyakit periodontal (Newman dkk., 2015). Bakteri *P. gingivalis* telah menginfeksi sekitar 40–100% pasien periodontitis kronis. Bakteri *P. gingivalis* ini ditemukan di dalam 85,75% plak subgingiva pasien periodontitis kronis (How dkk., 2016)

Sebelum melakukan kolonisasi, invasi dan sampai timbulnya suatu infeksi, bakteri melakukan adhesi pada jaringan ataupun *host*. Adhesi adalah proses melekatnya permukaan bakteri dengan membran plasma *host*, yang dapat terjadi apabila terdapat dua komponen yaitu reseptor dan adhesin. Reseptor adalah komponen yang berupa residu peptida dan karbohidrat spesifik pada *host*, sedangkan adhesin adalah komponen makromolekul yang terdapat pada permukaan sel bakteri (Todar dalam Santosaningsih, 2003).

Saat bakteri masuk ke dalam tubuh *host*, terdapat persaingan antara terjadinya infeksi oleh bakteri atau eliminasi bakteri oleh *host* (Wilson dkk., 2002). Salah satu sel leukosit yang memiliki peran penting dalam sistem pertahanan tubuh *host* dan muncul pertama kali saat terjadi invasi bakteri adalah neutrofil (Robbins dan Kumar, 1995). Neutrofil merupakan jenis sel leukosit yang terbanyak dan di dalam darah jumlahnya mencapai 62% (Guyton dan Hall, 2007).

*P. gingivalis* dapat berinvasi secara viabel ke sirkulasi darah, sehingga dapat langsung berkontak dengan agen inflamatorik neutrofil dan dapat berikatan melalui reseptor tertentu. Peristiwa ini kemudian akan menginisiasi induksi *P. gingivalis* terhadap peningkatan enzim-enzim degradatif pada neutrofil serta mampu menginterupsi aktivitas neutrofil (Mubarokah dkk., 2009). Bakteri yang bertahan secara intraselular dalam neutrofil dapat menggunakan sel tersebut untuk menyebar melalui sistem sirkulasi darah (Wilson dkk., 2002). Oleh karena itu adhesi *P. gingivalis* pada neutrofil perlu dihambat, sehingga tahap awal proses infeksi dapat dicegah dan tidak mengganggu kerja neutrofil. Penelitian yang terkait dengan hambatan perlekatan bakteri *Escherichia coli* sudah dilakukan oleh Riza (2010). Dilaporkan bahwa daun wungu memiliki efek antiinflamasi dengan menghambat perlekatan bakteri *E. coli* pada reseptor membran sel neutrofil dengan menurunkan fungsi hidrofoblastis membran sel pada proses perlekatan melalui interaksi hidrofobik.

Daun wungu merupakan salah satu tanaman dari tiga belas komoditi yang dikembangkan oleh DITJEN POM sebagai tanaman obat unggulan (BBPP Lembang, 2012). Tanaman ini banyak dimanfaatkan masyarakat sebagai obat ambeien/wasir, sembelit, peluruh kencing, pelancar haid, obat bisul, dan beberapa kondisi seperti anti-jamur, anti-inflamasi dan anti-plak (Widyowati, 2011). Selain itu, daun wungu juga dapat digunakan untuk pengobatan terhadap luka, bengkak, borok, bisul, penyakit kulit, dan secara eksperimental ekstrak daun wungu berperan menghambat pembengkakan dan menurunkan permeabilitas membran (Sumarny dkk., 2013).

Komposisi kandungan daun wungu adalah alkaloid, peetin, asam formiat, glikosida, steroid, saponin, tanin, flavonoid dan alkohol (Wahyuningtyas dan Indrastuti, 2005). Hasil penelitian oleh Loresta dkk. (2012) melaporkan bahwa keberadaan senyawa-senyawa tersebut, khususnya senyawa flavonoid pada daun kelor telah diketahui dapat menghambat adhesi sel bakteri *Staphylococcus aureus*, baik perlekatan bakteri dengan permukaan substrat maupun perlekatan antar bakteri.

Penelitian tentang daya hambat ekstrak daun wungu terhadap adhesi bakteri *P. gingivalis* pada neutrofil belum pernah dilakukan. Menurut Indriana dkk. (2017) dalam penelitiannya melaporkan bahwa ekstrak daun wungu dapat menghambat pertumbuhan bakteri saluran akar gigi dengan konsentrasi minimal yaitu 12,5%. Berdasarkan penjelasan tersebut, maka penulis tertarik untuk meneliti pengaruh ekstrak daun wungu dalam berbagai konsentrasi yaitu 3,12%, 6,25%, 12,5% dan 25% terhadap adhesi *P. gingivalis* pada neutrofil karena sampai saat ini belum ada yang melakukan penelitian tersebut.

## 1.2 Rumusan Masalah

Masalah yang dapat dirumuskan berdasarkan latar belakang di atas:

1. Apakah pemberian ekstrak daun wungu dapat menghambat adhesi bakteri *P. gingivalis* pada neutrofil ?
2. Apakah terdapat perbedaan daya hambat adhesi bakteri *P. gingivalis* antara ekstrak daun wungu konsentrasi 3,12%, 6,25%, 12,5% dan 25% ?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini yaitu:

1. Mengetahui adanya daya hambat ekstrak daun wungu terhadap adhesi *P. gingivalis* pada neutrofil.
2. Mengetahui perbedaan daya hambat adhesi bakteri *P. gingivalis* antara ekstrak daun wungu konsentrasi 3,12%, 6,25%, 12,5% dan 25%.

## 1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat:

1. Memberi informasi mengenai pengaruh ekstrak daun wungu terhadap adhesi *P. gingivalis* pada neutrofil.
2. Sebagai dasar penelitian lebih lanjut yang terkait.



## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Bakteri *Porphyromonas gingivalis*

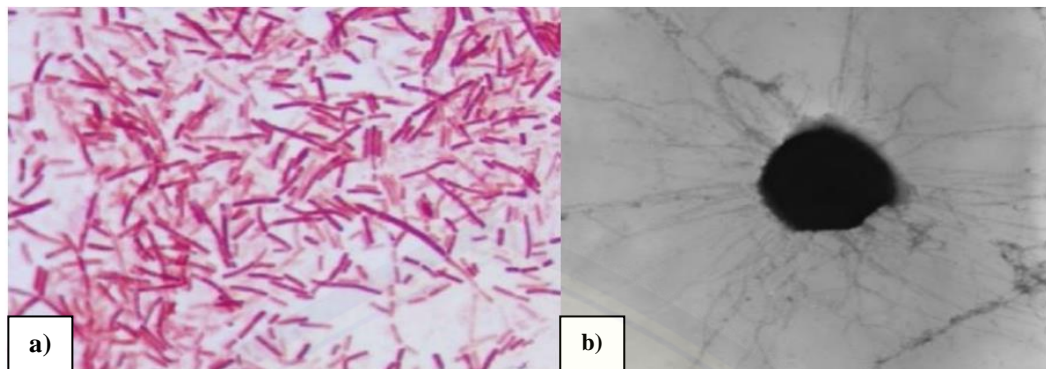
Menurut Pratiwi (2012), *P. gingivalis* diklasifikasikan sebagai berikut:

<i>Kingdom</i>	: <i>Eubacteria</i>
<i>Superphylum</i>	: <i>Bactroidetes / Chlorabi group</i>
<i>Phylum</i>	: <i>Bacteroidetes</i>
<i>Class</i>	: <i>Bacteroides</i>
<i>Ordo</i>	: <i>Bacteroidales</i>
<i>Family</i>	: <i>Porphyromonadaceae</i>
<i>Genus</i>	: <i>Porphyromonas</i>
<i>Species</i>	: <i>Porphyromonas gingivalis</i>

#### 2.1.1 Habitat dan Morfologi *Porphyromonas gingivalis*

Pada orang sehat bakteri ini merupakan flora subgingiva (Samaranayake, 2002). *P. gingivalis* juga dapat ditemui di berbagai tempat dalam tubuh seperti saluran pencernaan, saluran genital wanita dan dijumpai di berbagai infeksi di seluruh tubuh. Spesies ini banyak ditemukan pada poket periodontal pasien periodontitis dan infeksi (Amano, 2007).

*P. gingivalis* merupakan bakteri anaerob Gram negatif. Bakteri ini berbentuk kokobasil dengan panjang 0,5 – 2 µm, pleomorfik, tidak berspora (*non-sporeforming*), dan tak punya alat gerak (*non motile*) seperti tampak pada Gambar 2.1 (Samaranayake, 2002). Koloni bakteri ini bila terdapat pada agar darah tampak lembut, berkilauan, dan terlihat cembung serta 1-2 mm di dalam garis tengah dan menggelap dari tepi koloni ke pusat diantara 4-8 hari (Leslie dkk., 1998).



Gambar 2.1 Pemeriksaan *P. gingivalis* secara mikroskopis (a) *P. gingivalis* dilihat dengan mikroskop cahaya perbesaran 1000X (Sumber: Fitriyana dkk., 2013); (b) *P. gingivalis* dilihat dengan mikroskop elektron (Sumber: Hamada dkk., 1996).

#### 2.1.2 Virulensi *Porphyromonas gingivalis*

Virulensi merupakan kemampuan bakteri untuk menimbulkan infeksi dan penyakit. Faktor yang menentukan kemampuan tersebut disebut faktor virulensi (Brooks dkk., 2007). Secara garis besar faktor virulensi ini dapat diklasifikasikan menjadi dua kategori, pertama yang membantu kolonisasi dan invasi bakteri ke dalam tubuh *host* seperti adhesin, kapsul, lipopolisakarida dan sebagainya. Kedua adalah faktor virulensi yang sifatnya merusak *host* seperti protease, *fimbriae* dan sebagainya (Saylers dan Whitt dalam Santoso, 2002; Newman dkk., 2015).

Faktor virulensi pada bakteri *P. gingivalis* yaitu endotoksin, enzim kolagenase, enzim proteolitik yaitu gingipain, dan induksi mediator peradangan (Brooks dkk., 2007). Lipopolisakarida (LPS) adalah molekul besar yang tersusun dari komponen lipid (lipid A) dan komponen polisakarida. LPS ditemukan pada membran terluar bakteri Gram negatif, sebagai endotoksin dan memicu respons imun (Bostanci dan Belibasakis, 2012). LPS memiliki potensi yang kuat sebagai stimulator inflamasi apabila diinjeksikan secara *in vivo* karena LPS mampu menembus ke dalam jaringan dan bertindak sebagai endotoksin dalam organisme *host* sehingga menyebabkan peradangan pada jaringan dan berlanjut dengan terjadinya kerusakan tulang (Kumar dkk., 2007). Pada beberapa studi ditemukan bahwa LPS merupakan faktor virulensi terbesar dari *P. gingivalis* karena direspons oleh sel-sel inflamator sehingga mengakibatkan inflamasi dengan

melepaskan sitokin proinflamasi, mengganggu proses diferensiasi osteoblas dan mineralisasi sel ligamen periodontal (Nitawati dkk., 2014). Menurut Cutler (1995), enzim proteolitik pada *P. gingivalis* dapat memetabolisme asam amino serta menghasilkan sejumlah metabolit atau produk akhir bersifat toksik terhadap sel. *Gingipain* merupakan kelompok *cysteine proteinases*. Berdasarkan spesifisitas substratnya, *gingipain* dibagi menjadi *arginine-specific* (Arg-X) dan *lysine-specific* (Lys-X) *gingipain*. *Gingipain* memiliki efek multipel pada komponen molekular respons imun, dan dapat melakukan deregulasi pada respons ini. *Gingipain* juga dapat menstimulasi ekspresi reseptor yang diaktivasi protease pada neutrofil. Selain itu, *gingipain* menstimulasi produksi IL-6 oleh sel epitel mulut serta produksi IL-8 oleh fibroblas gingiva, yang akan meningkatkan respons inflamasi. Arg-X *gingipain* dapat membelah molekul C5, menimbulkan pelepasan komponen C5a, yang penting untuk meningkatkan perekrutan PMNs. Sebaliknya Lys-X *gingipain* akan mengganggu perekrutan PMNs dengan tidak mengaktifkan reseptor C5a. *Gingipain* juga meningkatkan permeabilitas vaskular dan masukan PMN (Bostanci dan Belibasakis, 2012).

## 2.2 Mekanisme Adhesi Bakteri

Adhesi bakteri itu adalah proses melekatnya permukaan bakteri dengan membran plasma *host*. Proses ini dibutuhkan bakteri supaya bakteri dapat memasuki *host*, berkembang biak di dalam jaringan, serta merusak jaringan ataupun *host*. Selain itu adhesi juga menandakan tahap awal proses infeksi pada sebagian besar bakteri (Wizemann dkk., 1999).

Adhesi bakteri pada permukaan jaringan atau *host* dapat terjadi apabila terdapat dua komponen, yaitu reseptor dan adhesin. Reseptor adalah komponen yang berupa residu peptida dan karbohidrat spesifik pada permukaan sel. Sedangkan adhesin adalah komponen makromolekul yang terdapat pada permukaan sel bakteri yang berinteraksi secara spesifik dengan reseptor *host*, seperti *fimbriae*, *outer membran protein* (OMP), serta kapsul polisakarida (Todar, 2012).

Mekanisme adhesi tersebut dari dua tahap yaitu:

1. Adhesi nonspesifik

Adhesi nonspesifik adalah adhesi bakteri pada permukaan sel yang bersifat labil (*reversibel*). Adhesi ini juga biasa disebut dengan *docking* (ikatan longgar). Adhesi nonspesifik dapat terjadi karena adanya berbagai gaya atau interaksi seperti interaksi hidrofobik, gaya elektrostatik, getaran atom atau molekul, gerak Brown, dan kapsul bakteri.

2. Adhesi spesifik

Adhesi spesifik adalah adhesi bakteri pada permukaan sel atau jaringan yang bersifat stabil (*irreversibel*). Adhesi ini juga biasa disebut dengan *anchoring*. Adhesi spesifik dapat terjadi karena adanya ikatan spesifik antara molekul reseptor dengan molekul adhesin (Todar, 2012).

2.2.1 Adhesi *Porphyromonas gingivalis*

Faktor-faktor *P. gingivalis* yang berperan dalam mekanisme adhesi pada substrat atau sel *host* diantaranya :

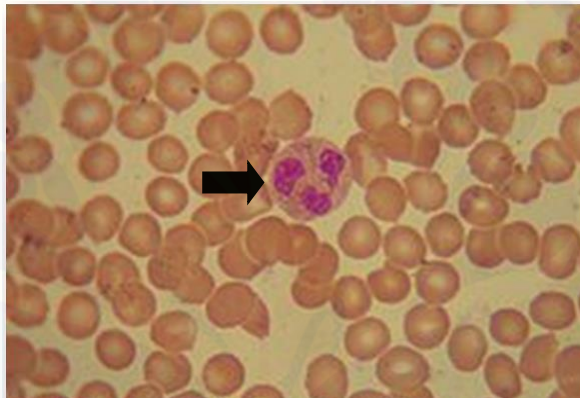
- a. Hemagglutinin berperan sebagai molekul adhesi dengan memperantarai pengikatan bakteri dengan reseptor pada permukaan sel *host*, misalnya protein adhesin. Adhesin 49.4 kDa dari OMP *P. gingivalis* merupakan molekul hemagglutinin yang terbukti sebagai komponen permukaan bakteri yang berikatan pada permukaan neutrofil (Mubarokah dkk., 2012).
- b. *Fimbriae* merupakan adhesin permukaan yang berbentuk batang. *Fimbriae* sering disebut sebagai hidrofobin karena *fimbriae* mengandung residu asam amino hidrofobik dalam jumlah besar, sehingga dianggap berperan dalam membentuk hidrofobitas permukaan sel yang penting untuk perlekatan bakteri (Santoso, 2002). *Fimbriae* juga memiliki perlekatan yang sangat kuat pada sel epitel (Wilson dkk., 2002).
- c. Kapsul polisakarida pada membran luar bakteri terdapat pada semua golongan *Bacteroides* termasuk *P. gingivalis*. Kapsulnya terlibat dalam adhesi, melindungi bakteri dari respons inflamasi *host* seperti aktivasi komplemen, dan mekanisme pembunuhan oleh sel fagosit (Wilson dkk., 2002).



### 2.3 Neutrofil

Leukosit terdiri dari beberapa jenis yaitu neutrofil polimorfonuklear, eosinofil polimorfonuklear, basofil polimorfonuklear, monosit, dan limfosit. Jenis leukosit yang terbanyak jumlahnya adalah neutrofil polimorfonuklear. Jumlah neutrofil polimorfonuklear dapat mencapai 62% (Guyton dan Hall, 2007).

Neutrofil memiliki beberapa karakteristik, yaitu memiliki nukleus dengan multi lobus (satu inti dan 2-5 lobus), granula azurofilik, dan granula spesifik yang berwarna ungu pucat pada pengecatan Wright's dan Giemsa, serta memiliki garis tengah berukuran sekitar 12  $\mu\text{m}$  (Effendi, 2003). Gambaran mikroskopik neutrofil dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Neutrofil (panah hitam) dilihat dengan mikroskop perbesaran 1000x (Sumber: Leonardi, 2005)

Neutrofil adalah garis pertahanan tubuh pertama terhadap invasi oleh mikroorganisme. Neutrofil akan melakukan pertahanan tubuh dengan memfagositosis mikroorganisme yang menyerang tubuh (Guyton dan Hall, 2007). Neutrofil memfagositosis dengan cara melekatkan diri pada mikroorganisme kemudian menonjolkan pseudopodia 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 (Bellanti, 1993). Kemudian ruangan ini berinvaginasi ke dalam rongga sitoplasma dan melepaskan diri dari membran sel bagian luar untuk membentuk gelembung fagositik yang mengapung dengan bebas di dalam sitoplasma. Sebuah sel neutrofil dapat

memfagositosis 3 hingga 20 mikroorganisme sebelum sel neutrofil itu sendiri menjadi inaktif dan mati (Guyton dan Hall, 2007).

#### 2.4 Tanaman Daun Wungu (*Graptophyllum pictum* (L) Griff)

Secara taksonomi, tanaman daun wungu dapat diklasifikasikan sebagai berikut (Indriana, 2012):

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Subkingdom	: <i>Tracheobionta</i>
Super divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Divisi	: <i>Magnoliophyta</i>
Kelas	: <i>Magnoliopsida-Dycotyledoneae</i>
Ordo	: <i>Lamiales</i>
Famili	: <i>Acanthaceae</i>
Genus	: <i>Gratophyllum</i>
Jenis	: <i>Gratophyllum pictum</i> (L.) Griff

##### 2.4.1 Habitat dan Morfologi Tanaman Daun Wungu

Tanaman daun wungu dapat ditemukan di dataran rendah sampai pegunungan dengan ketinggian 1.250 m dpl. Tumbuh baik pada tempat-tempat terbuka yang terkena sinar matahari, dengan iklim kering atau lembab (Gambar 2.3). Tanaman ini sering ditemukan tumbuh liar di pedesaan atau ditanam sebagai tanaman hias dan tanaman pagar. Asalnya dari Irian dan Polynesia (Dalimartha, 1999).

Tanaman daun wungu berbentuk perdu atau pohon kecil, dengan tinggi 1,5-3 meter, batang berkayu, kulit dan daun berlendir, serta baunya kurang enak. Ciri-ciri batang adalah sebagai berikut: *aerial*, berkayu, silindris, tegak, warna ungu kehijauan, bagian dalam *solid*, permukaan licin, percabangan *simpodial* (batang utama tidak tampak jelas), arah cabang miring ke atas. Daunnya tunggal, tersusun berhadapan (*folia oposita*), warna ungu tua, panjang 15-25 cm, lebar 5-11 cm, helaian daun tipis tegar, bentuk bulat telur, ujung runcing, pangkal meruncing (*acuminatus*), tepi rata, bentuk tulang daun menyirip (*pinnate*), permukaan

mengkilat (*nitidus*) seperti tampak pada Gambar 2.4. Bunganya majemuk, muncul dari ujung batang (*terminalis*) (Khumaida dkk., 2008).



Gambar 2.3 Tanaman daun wungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff) yang tumbuh baik pada tempat yang terbuka



Gambar 2.4 Daun wungu (Sumber: Dalimartha, 1999)

## 2.4.2 Kandungan Kimia dan Manfaat Tanaman Daun Wungu

Tanaman daun wungu memiliki bagian daun, batang, dan bunga dimana semua bagian tersebut dimanfaatkan sebagai obat alternatif. Tanaman ini biasanya digunakan dalam pengobatan diuretik (batang atau daunnya), melancarkan haid (bunganya) dan daunnya digunakan untuk pengobatan anti

inflamasi, melembutkan kulit, sembelit, ambeien, reumatik, bisul, dan pencahar ringan (Pidada, 2009).

Bagian dari tanaman daun wungu yang sering dimanfaatkan adalah daunnya (Dalimartha, 1999). Daun wungu memiliki beberapa kandungan kimia aktif yang dapat dimanfaatkan sebagai obat alternatif, seperti alkaloid, peetin, asam formiat, glikosida, steroid, saponin, tanin, flavonoid, dan alkohol (Indrastuti dan Wahyuningtyas, 2005).

Flavonoid merupakan golongan terbesar senyawa fenol, fenol monosiklik sederhana, fenil propanoid dan kuinon fenolik. Senyawa fenol dapat mengikat protein. Sifat umum senyawa fenol adalah mampu menambah permeabilitas sel dan mengendapkan protein. Senyawa flavonoid dapat menghambat mikroorganisme karena kemampuannya membentuk senyawa kompleks dengan protein (Wahyuningtyas, 2008).

Alkaloid mempunyai kemampuan dalam menghambat kerja enzim yang diperlukan untuk mensintesis protein bakteri. Penghambatan kerja enzim ini mengakibatkan metabolisme bakteri terganggu (Sunarintyas dkk., 2008). Alkaloid juga dapat merusak komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian pada sel tersebut (Juliantina dkk., 2009).

Tanin merupakan senyawa yang termasuk ke dalam golongan polifenol. Senyawa ini banyak dijumpai pada tumbuhan. Tanin mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara menginaktivasi protein transport pada membran sel (Cahyanto dkk., 2015).

Berdasarkan berbagai kandungan kimiawinya ini, daun wungu mempunyai sifat sebagai antiinflamasi, sembelit, ambeien, demam, batu empedu, haid tidak lancar, bengkak karena terpukul, rematik atau encok, memar, melancarkan buang air seni, sakit telinga, mempercepat pemasakan bisul, pelembut kulit kaki, melunakkan feses, dan mengempiskan wasir (Tukiran dkk., 2014). Ekstrak etanol pada daun wungu dalam serum darah dapat menurunkan kadar kolesterol LDL (*low density lipoprotein*) dan total lipid dalam serum darah, selain itu juga dapat

menurunkan berat badan mencit yang digunakan dalam percobaan (Suhargo, 2008).

## 2.5 Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani berupa sediaan kering, kental, dan cair yang dibuat dengan menyari simplisia nabati atau hewani menurut cara yang sesuai. Sebagai cairan penyari digunakan air, eter, etanol, atau campuran etanol dan air. Pembuatan sediaan ekstrak dimaksudkan agar zat berkhasiat yang terdapat pada simplisia terdapat dalam bentuk yang mempunyai kadar tinggi dan hal ini memudahkan zat berkhasiat dapat diatur dosisnya (Anief, 2000). Semakin tinggi konsentrasi ekstrak, maka kadar zat aktif yang terisolasi juga semakin tinggi (Lucia, 2011).

### 2.5.1 Ekstraksi

Menurut BPOM RI (2005), ekstraksi merupakan suatu teknik pemisahan senyawa berdasarkan perbedaan distribusi zat terlarut diantara dua pelarut yang saling bercampur. Pelarut yang digunakan harus dapat mengekstrak substansi yang diinginkan tanpa melarutkan material lainnya.

### 2.5.2 Metode Ekstraksi

Menurut Departemen Kesehatan RI (2000), metode ekstraksi dibagi menjadi tiga, yaitu:

#### a. Ekstraksi dengan menggunakan pelarut

##### 1) Cara dingin

##### a) Maserasi

Maserasi adalah proses perendaman sampel dengan pelarut yang digunakan dengan temperatur ruangan. Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi bahan alam karena dengan perendaman sampel akan terjadi pemecahan dinding dan membran yang disebabkan karena perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel sehingga metabolit

sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan. Pemilihan pelarut untuk proses ini akan memberikan efektifitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan dalam pelarut tersebut.

b) Perkolasi

Perkolasi adalah proses melewati pelarut organik pada sampel sehingga pelarut akan membawa senyawa organik bersama sama pelarut. Tetapi efektifitas dari proses ini hanya akan lebih besar untuk senyawa organik yang mudah larut dalam pelarut yang digunakan.

2) Cara panas

a) Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin baik.

b) Soxhlet

Soxhlet adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan tata khusus sehingga terjadi ekstraksi lanjutan dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin yang baik.

c) Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan.

d) Infus

Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (*water bath*) selama waktu tertentu.

e) Dekok

Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama dan temperatur sampai titik didih air.

b. Destilasi uap

Destilasi uap adalah ekstraksi senyawa kandungan menguap dari bahan dengan uap air. Proses destilasi ini lebih banyak digunakan untuk senyawa organik yang tahan pada suhu tinggi, yang lebih tinggi dari titik didih pelarut yang digunakan. Pada umumnya lebih banyak digunakan untuk minyak atsiri.

c. Cara ekstraksi lainnya

Cara ekstraksi lainnya dapat dilakukan dengan cara ekstraksi berkesinambungan, super kritis karbondioksida, ekstraksi ultrasonik, dan ekstraksi energi listrik.

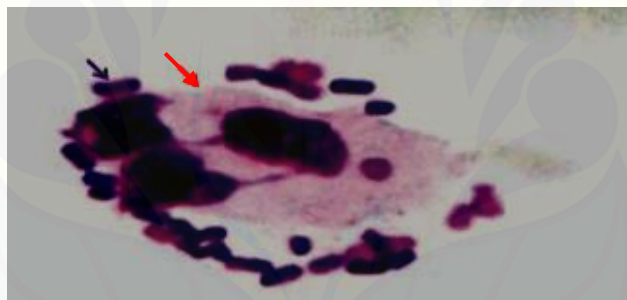
## 2.6 Peranan Daun Wungu terhadap Adhesi Bakteri pada *Host*

*P. gingivalis* mempunyai faktor virulensi yang menentukan kemampuan bakteri tersebut untuk menimbulkan infeksi pada *host*. Salah satu faktor virulensi ini yaitu adhesin. Adhesin bakteri adalah komponen makromolekul pada permukaan sel bakteri yang berinteraksi secara spesifik dengan reseptor sel *host* (Todar dalam Santosaningsih, 2003). Cara untuk menghambat adhesi bakteri pada sel *host* adalah dengan merusak adhesin bakteri oleh enzim dan bahan kimia spesifik (Todar, 2008). Daun wungu mengandung beberapa zat aktif seperti alkaloid, tanin, dan flavonoid yang memiliki beberapa efek farmakologis dan diduga dapat mempengaruhi adhesi bakteri (Indrastuti dan Wahyuningtyas, 2005)

Penurunan hidrofobisitas pada bakteri berperan dalam menghambat proses adhesi. Hidrofobisitas adalah sifat fisik yang tidak dapat larut dalam air. Hal tersebut kemungkinan disebabkan oleh senyawa komponen aktif pada ekstrak daun wungu seperti alkaloid dan flavonoid. Adanya komponen bioaktif ini mengakibatkan perubahan struktur tersier protein pada permukaan bakteri. Protein atau senyawa tersebut menyisip pada sisi hidrofobik protein, sehingga mengakibatkan penurunan hidrofobisitas sel bakteri yang berinteraksi dengan *fimbriae* dan mengakibatkan penggumpalan protein permukaan bakteri. Akibatnya protein ini kehilangan struktur hidrofobiknya dan mengakibatkan hidrofobisitas bakteri menurun. Penurunan hidrofobisitas ini akan mencegah

terjadinya interaksi hidrofobik dari komponen permukaan bakteri dengan sel *host* sehingga adhesi bakteri pada *host* (Gambar 2.5) dapat dihambat (Parhusip, 2004).

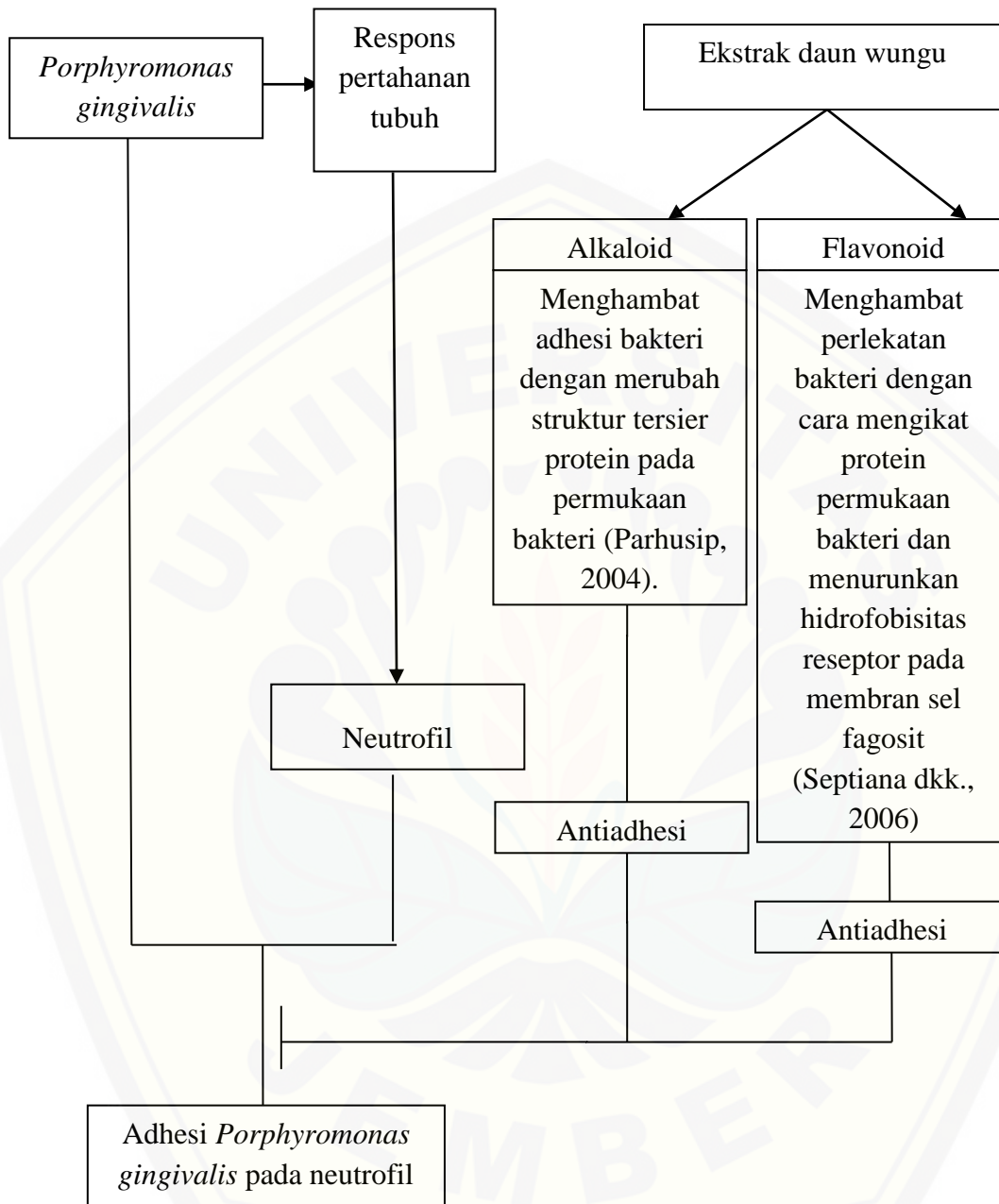
Alkaloid dapat mengganggu terbentuknya komponen penyusun peptidoglikan pada bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian pada bakteri (Juliantina dkk., 2008). Selain itu, flavonoid yang bersifat lipofilik akan merusak membran bakteri, sehingga permeabilitas akan meningkat dan mengganggu metabolisme bakteri (Harborne dan Williams, 2000; Rahman, 2008). Flavonoid mampu menghambat perlekatan bakteri dengan cara mengikat protein permukaan bakteri dan menurunkan hidrofobisitas reseptor pada membran sel fagosit (Septiana dkk., 2006). Sehingga diduga penggunaan ekstrak daun wungu dapat menghambat adhesi bakteri pada neutrofil dan mencegah terjadinya infeksi *P. gingivalis*.



Gambar 2.5 Adhesi *P. gingivalis* pada neutrofil. Tanda panah berwarna ungu menunjukkan *P. gingivalis* dan tanda panah berwarna merah menunjukkan sel neutrofil (pencetakan Giemsa, perbesaran 1000x) (Sumber: Mubarakah dkk., 2009).



2.7 Kerangka Konsep



Gambar 2.6 Kerangka konsep penelitian

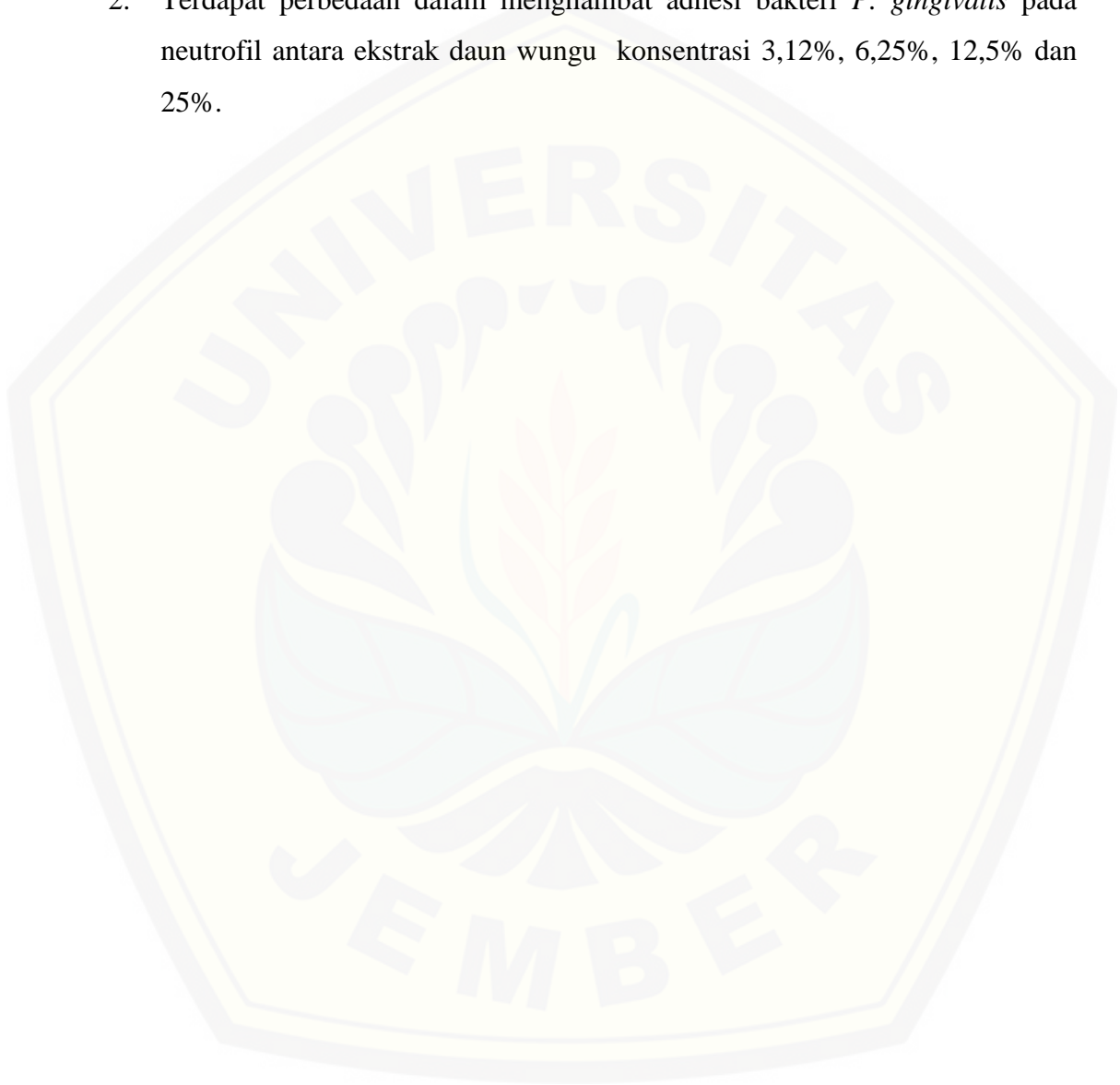
Keterangan :

- : menyebabkan/menghasilkan
- | : menghambat

### 3.7 Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini yaitu :

1. Pemberian ekstrak daun wungu dapat menghambat adhesi bakteri *P. gingivalis* pada neutrofil.
2. Terdapat perbedaan dalam menghambat adhesi bakteri *P. gingivalis* pada neutrofil antara ekstrak daun wungu konsentrasi 3,12%, 6,25%, 12,5% dan 25%.



## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris *in vitro*. Jenis ini dipilih karena pada tiap sampel diberi perlakuan terkendali, terukur, dan pengaruh perlakuan dipercaya (Notoatmodjo, 2010).

### 3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan pada penelitian ini adalah *the post test only control group design*, yaitu dilakukan pengukuran terhadap variabel yang diteliti setelah diberikan perlakuan, kemudian dibandingkan dengan kelompok kontrol (Notoatmodjo, 2010).

### 3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

#### 3.3.1 Tempat Penelitian

- a. Pembuatan ekstrak daun wungu di Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- b. Pembuatan suspensi *P. gingivalis*, isolasi neutrofil dan uji indeks adhesi di Laboratorium *Bioscience* Rumah Sakit Gigi dan Mulut Universitas Jember.

#### 3.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari 2018–Februari 2018.

### 3.4 Identifikasi Variabel Penelitian

#### 1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak daun wungu dengan konsentrasi 3,12%, 6,25%, 12,5% dan 25%.

#### 2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah adhesi *P. gingivalis* pada neutrofil.

### 3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah :

#### a. Kriteria subyek yang diambil darahnya

Penelitian ini menggunakan sampel berupa isolat neutrofil yang diambil dari darah subyek yaitu orang sehat dengan kriteria laki-laki dewasa, tidak memiliki riwayat penyakit sistemik, kelainan darah, dan kebiasaan merokok, serta bersedia mengisi *informed consent* sebagai tanda persetujuan bahwa darah yang diambil akan dijadikan sampel penelitian (Rakhmawati, 2012)

#### b. Teknik isolasi neutrofil menggunakan *gradient density* dengan *ficoll hypaque centrifugation*,

#### c. Suspensi *P. gingivalis* yang digunakan adalah strain ATCC 33277 dengan konsentrasi 0,5 Mc. Farland.

#### d. Kriteria daun wungu

Kriteria daun wungu yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah:

- 1) Daun wungu yang digunakan merupakan spesies *Gratophyllum pictum* (L.) Griff yang telah dilakukan identifikasi.
- 2) Daun wungu dengan kondisi segardan bebas kontaminasi hama (daun tidak berlubang).
- 3) Daun ungu yang digunakan tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda, yaitu daun pada urutan ke-4 sampai dengan urutan ke-6 dari pucuk.
- 4) Daun dipetik pada waktu yang sama, yaitu pada waktu sore hari antara pukul 15.00 sampai 16.00, merupakan waktu yang tepat karena proses fotosintesis sudah selesai.
- 5) Daun wungu diambil dari lahan yang sama yaitu lahan Wahana Edukasi Tanaman Obat Universitas Jember.

### 3.5 Definisi Operasional

#### 1. Ekstrak daun wungu

Ekstrak daun wungu merupakan daun wungu yang diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan etanol 96% sebagai pelarut. Ekstrak daun wungu

yang digunakan adalah konsentrasi 3,12%, 6,25%, 12,5% dan 25%.

## 2. Neutrofil

Neutrofil merupakan leukosit granular matur polimorfonuklear yang memiliki inti hingga lima lobus, sitoplasma berwarna merah muda pucat yang mengandung banyak granula berwarna ungu, berukuran sekitar 14  $\mu\text{m}$  dan berbentuk bulat. Neutrofil diambil dari darah vena perifer orang sehat (tidak memiliki kelainan sistemik). Isolasi neutrofil dilakukan dengan teknik *gradient density* menggunakan *Histopaque-1119* dan *Lymphoprep 1077*. Hasil isolasi neutrofil dapat dilihat menggunakan mikroskop *inverted* dengan perbesaran 400x.

## 3. *Porphyromonas gingivalis*

*P. gingivalis* merupakan bakteri anaerob Gram negatif. Bakteri ini berbentuk *coccobacili* dengan panjang 0,5-2  $\mu\text{m}$ . *P. gingivalis* yang digunakan pada penelitian ini adalah *strain* ATCC 33277 yang diperoleh dari Laboratorium *Bioscience* Rumah Sakit Gigi dan Mulut Universitas Jember dengan densitas 0,5 Mc. Farland.

## 4. Adhesi *Porphyromonas gingivalis* pada neutrofil

Adhesi *P. gingivalis* pada neutrofil yaitu perlekatan *P. gingivalis* pada neutrofil yang diukur menggunakan indeks adhesi. Indeks adhesi yaitu banyaknya jumlah bakteri yang melekat per neutrofil. Perhitungan indeks adhesi dilakukan di bawah mikroskop *inverted* dengan perbesaran 1000x.

## 3.6 Sampel Penelitian

### 3.6.1 Jumlah Sampel

Jumlah 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 ditolelir, diasumsikan  $\sigma = d$

$z$  = nilai pada tingkat kesalahan tertentu, jika  $\alpha = 0,05$  maka  $z = 1,96$   
Perhitungannya adalah sebagai berikut:

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

Berdasarkan hasil perhitungan di atas, diperoleh jumlah sampel minimal yang digunakan dalam penelitian ini adalah 4 sampel untuk setiap kelompok.

### 3.6.2 Penggolongan Sampel Penelitian

Sampel digolongkan dalam 5 kelompok yaitu :

- Kelompok kontrol yaitu isolat neutrofil yang dipapar bakteri *P. gingivalis* dan tidak diinkubasi ekstrak daun wungu.
- Kelompok EDW3,12% yaitu isolat neutrofil yang dipapar bakteri *P. gingivalis* dan diinkubasi ekstrak daun wungu dengan konsentrasi 3,12%.
- Kelompok EDW6,25% yaitu isolat neutrofil yang dipapar bakteri *P. gingivalis* dan diinkubasi ekstrak daun wungu dengan konsentrasi 6,25%.
- Kelompok EDW12,5% yaitu isolat neutrofil yang dipapar bakteri *P. gingivalis* dan diinkubasi ekstrak daun wungu dengan konsentrasi 12,5%.
- Kelompok EDW25% yaitu isolat neutrofil yang dipapar bakteri *P. gingivalis* dan diinkubasi ekstrak daun wungu dengan konsentrasi 25%.

## 3.7 Alat dan Bahan Penelitian

### 3.7.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah : tabung reaksi, *becker glass*, tabung elenmeyer, *centrifuge*, *torniquet*, *syringe 10 ml*, kaca obyek, *cover*

*glass*, mikroskop *inverted*, rak objek *glass*, *haemocytometer*, *oven*, *autoclave*, pipet mikro, tabung *falcon*, *disposable syringe*, *laminar flow cabinet*, neraca analitik, *petridish*, *rotary evaporator*, blender, *densicheck*, masker, *handscoon*, tabung heparin, *microplate 12 well*, tabung *falcon*, *shaker inkubator* (LabTech, Korea), *yellow tip*, *blue tip*.

### 3.7.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : daun wungu (Wahana Edukasi Tanaman Obat Universitas Jember) , *histopaque 1119*, *limphoprep 1077*, pewarna giemsa, aquades steril, darah vena perifer, *P. gingivalis* strain ATCC 33277 (Laboratorium *Bioscience* Rumah Sakit Gigi dan Mulut Universitas Jember), alkohol 70%, *penicillin-streptomycin solution stabilized*, *hank's balance salt solution* (HBSS), etanol 96%, metanol absolut, *brain heart infusion agar* (BHI-A), *brain heart infusion broth* (BHI-B), minyak emersi, *roswell park memorial institute* (RPMI), *medium complete* (m199), *fungizone*, *hemin*, vitamin K, kertas saring, *disposable syringe*, 5% CO<sub>2</sub> (Gas Generating Kit; Oxoid, UK).

## 3.8 Prosedur Penelitian

### 3.8.1 Persiapan

#### a. Perizinan *Ethical Clearance* (EC)

Sebelum dilaksanakan penelitian diajukan perizinan *Ethical Clearance* (EC) ke Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember dan telah memenuhi syarat kelayakan oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember berdasarkan surat No. 035/UN25.8/KEPK /DL/2018 (Lampiran A).

#### b. Identifikasi daun wungu

Daun wungu yang akan digunakan terlebih dahulu dilakukan identifikasi. Uji identifikasi dilakukan di UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi-Pasuruan (Lampiran B).

c. Pembuatan subkultur dan uji identifikasi *Porphyromonas gingivalis*

*P. gingivalis* yang digunakan pada penelitian ini adalah *strain* ATCC 33277. Pertama-tama dilakukan pembuatan media padat BHI-A dengan cara 0,37 gram BHI-A dan 10 cc aquadest dicampur dalam tabung erlemeyer kemudian diaduk hingga homogen. Setelah homogen, tabung ditutup kapas lalu disterilkan pada *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Selanjutnya ditambahkan dengan 1 µl vitamin K, 5 µl hemin, dan 50 µl ekstrak *yeast* lalu dihomogenkan. Dilakukan uji sterilisasi media BHI-A dengan cara dimasukkan ke dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam. Media BHI-A dianggap telah steril jika tidak terkontaminasi jamur dan bakteri serta berwarna jernih, dituangkan pada *petridish* tidak bersekat lalu ditunggu sampai padat. Selanjutnya, *P. gingivalis* ditanam pada media tersebut, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 2x24 jam, kemudian koloni *P. gingivalis* dipanen (Pratiwi dkk., 2015). Setelah itu dilanjutkan untuk membuat sediaan hapusan bakteri dan dilakukan pewarnaan Gram. Kemudian dikirim ke Laboratorium Mikrobiologi Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk dilakukan identifikasi *P. gingivalis* (Lampiran D).

### 3.8.2 Pembuatan Ekstrak Daun Wungu

Pembuatan ekstrak daun wungu dengan metode maserasi dilaksanakan di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember. Daun wungu segar sebanyak 700 gr dicuci hingga bersih dan ditiriskan. Lalu daun diiris kecil-kecil dan ditimbang dengan timbangan. Setelah itu dilakukan pengeringan daun wungu untuk menghilangkan kadar air dengan cara diangin-anginkan dalam ruangan yang tidak terpapar matahari secara langsung. Daun wungu tersebut kemudian dioven dengan suhu 50°C selama 12 jam untuk menghilangkan kadar air yang masih ada. Suhu pengeringan harus memenuhi standar yaitu tidak boleh lebih dari 50°C selama 3 jam sehingga didapatkan berat kering. Jika daun sudah kering, daun dihaluskan hingga menjadi simplisia dan didapatkan berat 200 gr. Simplisia tersebut direndam dalam toples kaca dengan pelarut etanol 96% selama



± 3 hari. Pengadukan rendaman tersebut dilakukan sebanyak dua kali, yaitu pada pagi hari dan sore hari. Setelah tiga hari, disaring dengan menggunakan kertas saring. Hasil saringan merupakan ekstrak cair. Ekstrak cair tersebut diuapkan sampai bebas dari pelarut etanol dengan menggunakan vakum evaporator (*rotary evaporator*) pada suhu 45-50°C selama 45 menit hingga ekstrak menjadi kental dengan konsentrasi 100%. Kemudian dilakukan penghitungan rendemen ekstrak daun wungu dengan rumus sebagai berikut:

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak (g)}}{\text{Berat simplisia (g)}} \times 100\% \\ \text{Rendemen} &= \frac{362,8 \text{ g}}{200 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 18,14\% \end{aligned}$$

Jadi, konsentrasi 100% didapat dari hasil rendemen ekstrak daun wungu sebesar 18,14% (Lampiran C).

### 3.8.3 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Daun Wungu

Rumus pengenceran yang digunakan untuk mendapatkan berbagai konsentrasi adalah (Permadani dkk., 2015):

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

Keterangan:

N1 = Nilai konsentrasi awal

V1 = Volume awal

N2 = Nilai konsentrasi akhir

V2 = Volume akhir

Adapun cara pengencerannya yaitu:

- a. Ekstrak daun wungu 3,12% sebanyak 4 ml diperoleh dari perhitungan dengan rumus sebagai berikut:

$$\begin{aligned} 100\% \times V1 &= 3,12\% \times 4 \\ V1 &= \frac{3,12 \times 4}{100} \end{aligned}$$

$$V1 = 0,12 \text{ ml}$$

Jadi ekstrak daun wungu 100% harus diencerkan dengan menambahkan 3,8 ml akuades steril ke dalam 0,12 ml ekstrak daun wungu 100%.

- b. Ekstrak daun wungu 6,25% sebanyak 4 ml diperoleh dari perhitungan dengan rumus sebagai berikut:

$$100\% \times V1 = 6,25\% \times 4$$

$$V1 = \frac{6,25 \times 4}{100}$$

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

Jadi ekstrak daun wungu 100% harus diencerkan dengan menambahkan 3,75 ml akuades steril ke dalam 0,25 ml ekstrak daun wungu 100%.

- c. Ekstrak daun wungu 12,5% sebanyak 4 ml diperoleh dari perhitungan dengan rumus sebagai berikut:

$$100\% \times V1 = 12,5\% \times 4$$

$$V1 = \frac{12,5 \times 4}{100}$$

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

Jadi ekstrak daun wungu 100% harus diencerkan dengan menambahkan 3,5 ml akuades steril ke dalam 0,5 ml ekstrak daun wungu 100%.

- d. Ekstrak daun wungu 25% sebanyak 4 ml diperoleh dari perhitungan dengan rumus sebagai berikut:

$$100\% \times V1 = 25\% \times 4$$

$$V1 = \frac{25 \times 4}{100}$$

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

Jadi ekstrak daun wungu 100% harus diencerkan dengan menambahkan 3 ml akuades steril ke dalam 1 ml ekstrak daun wungu 100%.

#### 3.8.4 Pembuatan Suspensi *Porphyromonas gingivalis*

Sebelum dilakukan pembuatan suspensi, disiapkan media cair BHI-B dengan cara 0,37 gram BHI-B dan 10 cc aquades dihomogenkan pada tabung

erlenmeyer, lalu ditutup dengan kapas dan disterilkan pada *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. BHI-B yang sudah steril ditambah 1 µl vitamin K, 5 µl hemin dan 50 µl ekstrak *yeast*, kemudian dihomogenkan. Dilakukan uji sterilisasi media BHI-B dengan cara dimasukkan ke dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam. Setelah steril, dibuat suspensi *P. gingivalis* dengan cara memasukkan 2 ml suspensi BHI-B ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 ose *P. gingivalis* lalu dicampur. Perlakuan ini dilakukan dengan melewatkannya di atas bunsen yang sedang menyala. Suspensi lalu diukur dengan *densi-check* hingga didapatkan densitas 0,5 Mc. Farland atau sebanding dengan jumlah bakteri  $3 \times 10^6$  (CLSI, 2015). Setelah itu, suspensi diinkubasi dalam inkubator selama 2x24 jam pada suhu 37°C (Pratiwi dkk., 2015).

### 3.8.5 Isolasi Neutrofil

Subyek diambil darahnya sebanyak 6 cc dari vena perifer menggunakan *disposable syringe*, dan dicampur dengan antikoagulan (heparin) dalam tabung EDTA. Darah tersebut dibagi menjadi dua tabung dengan jumlah masing-masing 3 cc. Menyiapkan 3 ml larutan *histopaque 1119* dalam tabung falcon, lalu ditambahkan 3 ml larutan *limphoprep 1077* dengan cara dialirkan melalui dinding falcon dengan sudut miring 45°. Darah dimasukkan ke dalam tabung falcon secara hati-hati agar larutan *ficoll* tidak pecah. Sentrifugasi dengan kecepatan 900g selama 30 menit pada suhu 18°-26°C, sehingga akan terbentuk 6 lapisan dalam tabung falcon yang tersusun dari bagian atas ke bawah adalah plasma, mononuklear, larutan *limphoprep*, PMN, larutan *histopaque*, dan eritrosit. Lapisan granulosit diambil untuk mendapatkan sel neutrofil, lalu dimasukkan ke dalam tabung falcon lain. Lapisan PMN tersebut ditambahkan HBSS dengan perbandingan 1:2, dan dilakukan *pipetting* secara hati-hati sampai homogen. Sentrifugasi dengan kecepatan 600g selama 10 menit pada suhu 18°-26°C. Setelah disentrifugasi, akan terbentuk endapan pada dasar tabung falcon. Lapisan yang ada di bagian atas dibuang, sementara endapan yang tersisa ditambahkan HBSS dengan perbandingan 1:1, kemudian dilakukan *pipetting* sampai homogen secara hati-hati. Ditambahkan antijamur yaitu *fungizone* sebanyak 5 µl dan

antibakteri yaitu *penicillin-streptomycinsolution stabilised* sebanyak 20 µl untuk 1000 µl larutan media sel agar terhindar dari kontaminasi mikroorganisme, lalu dilakukan *pipetting*. Mengambil 50 µl larutan tersebut, kemudian diamati menggunakan mikroskop *inverted* perbesaran 400 kali. Dilakukan pengamatan untuk melihat populasi sel setiap lapang pandang. Apabila populasi sel masih terlalu padat, maka ditambahkan lagi HBSS sampai didapatkan populasi sel yang diinginkan (Pratiwi dkk., 2015).

#### 3.8.6 Uji Indeks Adhesi

Pertama-tama disiapkan 2 buah *microplate* 12 well, dan *coverslip* sebanyak 20 sampel yang telah steril. Masing-masing *coverslip* tersebut diletakkan dalam *microplate* dan diberi tanda sesuai kelompok. Suspensi neutrofil ditapiskan diatas setiap *coverslip*, masing-masing sebanyak 100 µl dan diinkubasi dalam *shaker incubator* selama 20 menit pada suhu 37°C dengan tujuan untuk melekatkan neutrofil pada *coverslip*. Setelah itu, neutrofil diresuspensi dengan 1000 µl RPMI dengan cara dialirkan melalui dinding *microplate* dan ditambahkan *penicillin-streptomycin* sebanyak 20 µl dan *fungizone* sebanyak 5 µl, kemudian dilakukan *pipetting*. Neutrofil diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C, hingga neutrofil semakin melekat pada *coverslip*. Selanjutnya larutan RPMI diambil, lalu digantikan dengan *media complete* (M199) sebanyak 1000 µl, kemudin diamati menggunakan mikroskop *inverted* perbesaran 400 kali untuk mengetahui adanya kontaminasi oleh mikroorganisme. Apabila terdapat kontaminasi, maka ditambahkan lagi *penicillin-streptomycin* sebanyak 20 µl dan *fungizone* sebanyak 5 µl pada sampel tersebut dan dilakukan *pipetting*. Namun apabila sudah tidak ada kontaminasi, ditambahkan ekstrak daun wungu dengan konsentrasi 3,12%, 6,25%, 12,5% dan 25% yang sudah difiltrasi ke dalam masing-masing pada 4 sampel sebanyak 200 µl, sementara pada kelompok kontrol tidak diberi ekstrak. Kemudian diinkubasi selama 3 jam pada suhu 37°C dan 5% CO<sub>2</sub>, dengan pengamatan setiap jamnya untuk melihat penyerapan ekstrak pada neutrofil. Setelah diinkubasi, media dibuang, digantikan M199 sebanyak 1000 µl. Pada masing-masing sampel ditambahkan 200 µl *P.*

*gingivalis*. Inkubasi selama 8 jam pada suhu 37°C dan 5% CO<sub>2</sub>, dengan diamati perubahan setiap jamnya. Setelah diinkubasi selama 8 jam, suspensi media dibuang dengan diambil menggunakan mikropipet. Setelah dicuci dengan HBSS sebanyak 1 kali, suspensi difiksasi dengan methanol absolut selama 3 menit. Setelah 3 menit, metanol dibuang menggunakan mikropipet. Terakhir, dikeringkan dengan posisi miring. Selanjutnya dilakukan pengecatan dengan Giemsa. Giemsa dimasukkan ke dalam masing-masing sampel, dan dibiarkan selama 7 menit. Selanjutnya, cat Giemsa dibuang, dan dibilas dengan air mengalir. Setelah kering, dilakukan pengamatan dengan mikroskop *inverted* perbesaran 1000x untuk dilakukan penghitungan indeks adhesi (Pratiwi dkk., 2015).

### 3.8.7 Penghitungan Indeks Adhesi

Penghitungan indeks adhesi dilakukan dengan cara menghitung jumlah *P. gingivalis* yang melekat per neutrofil kemudian dibagi dengan jumlah total neutrofil yang dihitung yaitu 100. Penghitungan dilakukan oleh tiga orang pengamat. Hal ini dilakukan pada semua sampel dan dilakukan pada 3-4 lapang pandang hingga didapatkan jumlah 100 neutrofil. Penghitungan indeks adhesi dilakukan dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Indeks adhesi} = \frac{\text{jumlah } P. \text{ gingivalis} \text{ yang melekat per neutrofil}}{100 \text{ neutrofil}}$$

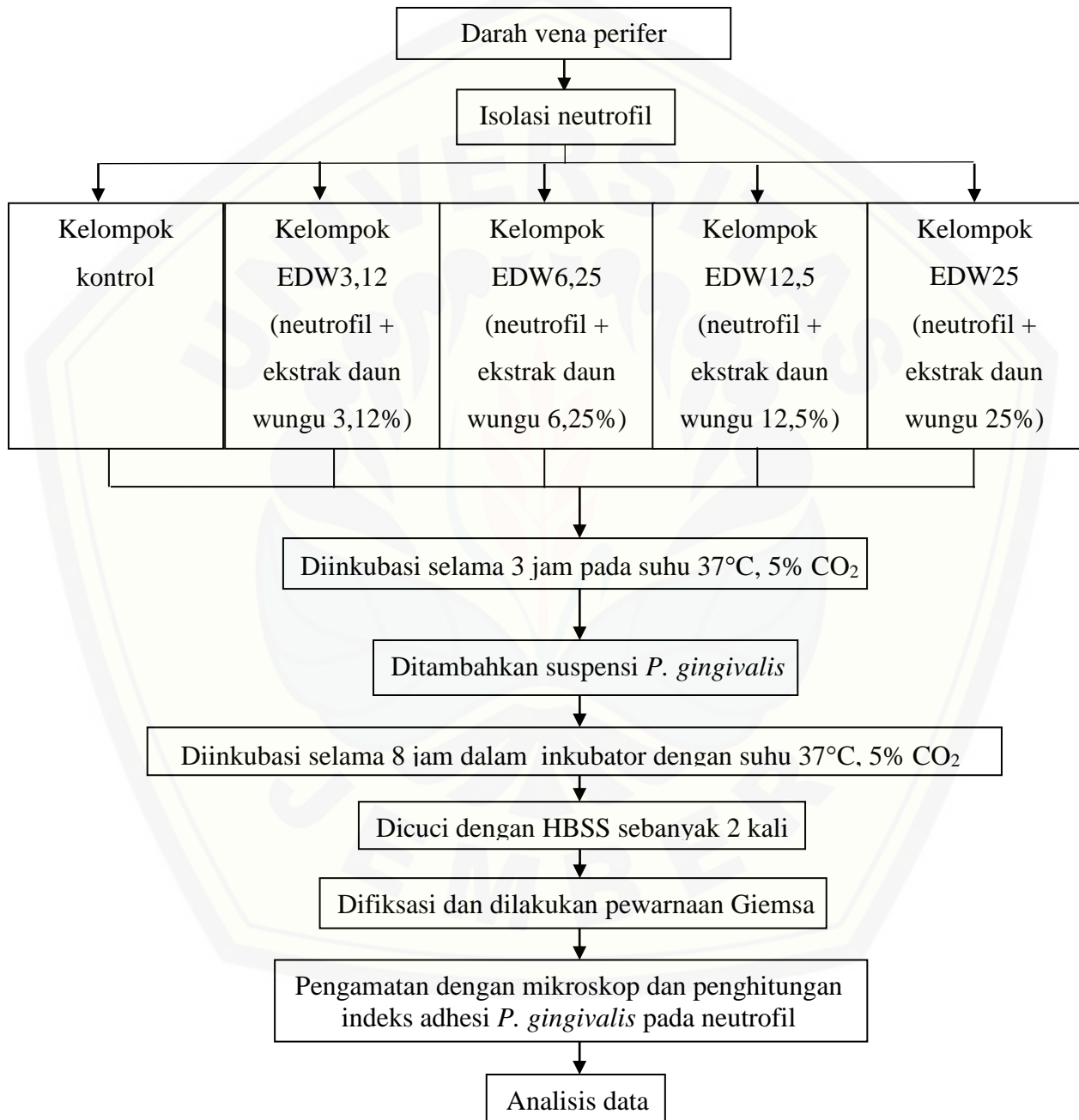
(Mubarokah dkk., 2009)

## 3.9 Analisis Data

Analisis data yang pertama kali dilakukan yaitu uji normalitas data menggunakan uji Shapiro-Wilk serta uji homogenitas data menggunakan uji Levene dengan nilai signifikansi (p) lebih dari 0,05 yang menunjukkan data berdistribusi normal dan homogen. Selanjutnya dilakukan uji statistik parametrik, yaitu *one way anova* yang bertujuan untuk mengetahui adanya perbedaan antar kelompok dan uji *least significance different* (LSD) untuk mengetahui kelompok

mana yang memiliki perbedaan dengan menggunakan tingkat kemaknaan atau signifikansi 95% ( $\alpha=0,05$ ).

### 3.10 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur penelitian

## DAFTAR PUSTAKA

- Amano, A. 2007. Disruption of Epithelial Barrier and Impairment of Cellular Function by *Porphyromonas gingivalis*. *Front Biosci.* 12: 396-574.
- Anief, M. 2000. *Ilmu Meracik Obat: Teori dan Praktek*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.
- BPOM RI. 2005. *Standardisasi Ekstrak Tumbuhan Obat Indonesia, Salah Satu Tahapan Penting dalam Pengembangan Obat Asli Indonesia*. Jakarta: Info POM. 6(4).
- BBPP-Lembang. Potensi Tanaman Obat Indonesia. Lembang. 2012. Kementerian Pertanian Badan Penyuluhan dan Pengembangan Sumber Daya Manusia Pertanian Balai Besar Pelatihan Pertanian (BBPP) Lembang. <http://bbpp-lembang.info/index.php/arsip/artikel/artikel-pertanian/585-potensi-tanaman-obat-indonesia> [Diakses pada 4 Juni 2017].
- Balitbang. 2013. *Riset Kesehatan Dasar; RISKESDAS*. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.
- Bellanti, A., dan Joseph. 1993. *Immunology III*. Terjemahan oleh A. Samik Wahab. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Beumer, C., W. Marty, R. Willem, R. Danielle, B. Ruud, dan S. Willem. 2003. Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, A Novel Therapeutic Drug for Lipopolysaccharide (LPS) - Mediated Diseases, Attenuates LPS Toxicity in Mice and Piglets. *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics.* 307(2): 737-744.
- Bostanci, N., dan G. N. Belibasakis. 2012. *Porphyromonas gingivalis*: An Invasive and Evasive Opportunistic Oral Pathogen. *FEMS Microbiol Lett.* 333: 1-9.
- Brooks, G. F., S. B. Janet, dan A. M. Stephen. 2007. *Mikrobiologi Kedokteran Jawetz, Melnick, dan Adelberg*. Terjemahan oleh E. Mudihardi, Kuntaman, dan Wasito. Jakarta: EGC.
- Cahyanto, T., T. Sujarwo, dan R. I. Lestari. 2015. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Beluntas (*Pluchea indica (L.) Less.*) terhadap *Propionibacterium acnes* Penyebab Jerawat. *Jurnal Istek.* 9(1).
- CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute). 2015. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. *CLSI document M100-S25*, Pennsylvania: Wayne.

- Cutler, C. W., J. R. Kalmar, dan C. A. Genco. 1995. Pathogenic Strategies of Oral Anaerob *Porphyromonas gingivalis*. *Trends Microbiol.* 45(3).
- Dalimartha, S. 1999. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia Jilid 1*. Jakarta: Trubus Agriwidya.
- Daniel, W. W. 2005. *Biostatic: A Foundation for Analysis in the Health Sciences*. 8<sup>th</sup> ed. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Effendi, Z. 2003. Peranan Leukosit sebagai Anti Inflamasi Alergik dalam Tubuh. Karya Tulis Ilmiah online. <http://library.usu.ac.id/download/fk/histologi-zukesti2.pdf> [Diakses pada 05 juli 2017].
- Ermawati, T. 2012. Periodontitis dan Diabetes Melitus. *Stomatognatic.* 9(3): 152-154.
- Fitriyana, N., Y. M. D. Arina, H. Harmono, dan I. Susilawati . 2013. Pemaparan Bakteri *Porphyromonas gingivalis* Mempengaruhi Produksi Superoksida Nitrofil. *Dentofasilal*, 12(3):152-157.
- Guyton, A. C., dan J. E. Hall. 2007. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Edisi Kesebelas. Terjemahan oleh Irawati dkk. Jakarta: EGC.
- Harborne, J. dan C. Williams. 2000. Advances in Flavonoid Research Since 1992. *Phytochemistry.* 55: 481-504.
- Hamada, N., H.T. Sojar, M. Cho dan R.J. Genco. 1996. Isolation and Characterization of A Minor Fimbria from *Porphyromonas gingivalis*. *Jurnal Infection and Immunity*, 4788-4794.
- How, K. Y., P. S. Keang dan K. G. Chan. 2016. *Porphyromonas gingivalis*: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. *Frontiers in Microbiology.* 7(53): 1-14.
- Indriana, A. R. 2012. Uji Daya Hambat Ekstrak Metanol Daun Ungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff) terhadap Pertumbuhan Bakteri Saluran Akar Gigi. *Skripsi*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Indriana, A. R., P. Astuti, A. Kurniawati. 2017. Uji Daya Hambat Ekstrak Metanol Daun Ungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff) terhadap Pertumbuhan Bakteri Saluran Akar Gigi. *e-Jurnal Pustaka Kesehatan.* 5 (1).
- Irianto, B. W. 2016. Efek Berkumur Seduhan Daun Wungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff) terhadap Jumlah Koloni Bakteri Saliva pada Subyek dengan Skor DMF-T 4-5. *Skripsi*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.



- Juliantina, F. R., D. A. Cita, B. Nirwani, T. Nurmasitoh, dan E. T. Bowo. 2009. Manfaat Sirih Merah (*Piper crocatum*) sebagai Agen Antibakterial terhadap Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*. 1(1): 12-20.
- Khumaida, N., N. Kristina, D. Sartiami, dan T. L. Mardiningsih. 2008. Peningkatan Keragaman Genetik Tanaman Obat Handeuleum (*Graptophyllum pictum* L. Griff) Melalui Induksi Mutasi untuk Perakitan Varietas Baru Produksi Tinggi dan Tahan Hama Utama. *Laporan Hasil Penelitian Kerjasama Penelitian KKP3T. IPB- Litbang Reptan*.
- Kumar V, R. Cotran, Robbins, dan Stanley. 2007. *Buku Ajar Patologi Robbins*. 7<sup>th</sup> ed. Terjemahan oleh Pendit Brahm U. Jakarta: EGC.
- Kurniawati, A., dan A. D. I. R. Dewanti. 2011. Isolasi Zat Aktif Daun Wungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff) sebagai Imunomodulator serta Uji Aktivitasnya terhadap Infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. *Penelitian Fundamental DP2M. Universitas Jember*.
- Lamont, R. J., dan F. J. Howard. 1998. Life Below the Gum Line: Pathogenic Mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62(4): 1244-1263.
- Leonardi, T. 2005. Neutrophil Granulocyte Smear. <http://id.wikipedia.org/wiki/Berkas:Neutrophil.jpg>. [Diakses pada 6 juli 2017].
- Loresta S., S. Murwani S, dan P. Trisunuwati. 2012. *Efek Ekstrak Etanol Daun Kelor (Moringa oleifera) terhadap Pembentukan Biofilm Staphylococcus aureus secara In Vitro*. Malang: FKH Universitas Brawijaya.
- Leslie, C., A. Ballows, dan M. Sussman. 1998. *Topley and Wilson Microbiology and Microbial Infection: Systematic Bacteriology*. 9<sup>th</sup> ed. New York: Oxford Universty Press, Inc.
- Lucia, E. W. 2011. *Aksi Obat: Basis Farmakologi Klinis*. Surabaya: Sandika Surabaya.
- Mubarokah, S. N., I. Ketut, G. M., dan Sumarno. 2009. 49.4 Kda Outer Membrane Protein of *Porphyromonas gingivalis* is A Hemagglutinin and Adhesin Protein to Neutrophil. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 25(2): 48-59.
- Mubarokah, S. N., I. Ketut, G. M., W. Edi, S. Sanarto, dan R. P. Sumarno. 2012. Adhesin 49.4 Kda of *Porphyromonas gingivalis* Outer Membrane Protein on Neutrophil. *Journal of Dental and Medical Sciences*. 2(1): 7-13.

- Muthukumar, S., dan R. Suresh. 2009. Community Periodontal Index of Treatment Needs Index: An indicator of Anaerobic Periodontal Infection. *Original research*, 20(4): 423-425.
- Notoatmodjo, S. 2010. *Metodologi Penelitian Kesehatan. Cetakan III*. Jakarta: PT. Rineka Cipta.
- Newman, M. G., H. H. Takei, dan F. A. Carranza. 2011. *Carranza's Clinical Periodontology*. 11<sup>th</sup> Ed. China: Elsevier.
- Newman, M. G., H. H. Takei, P. R. Klokkevold dan F.A. Carranza. 2015. *Carranza's Clinical Periodontology*. 12<sup>th</sup> Ed. Canada: Elsevier.
- Nitawati, M. P. N., C. M. Robin, dan M. Syafriadi. 2014. Respon Limfosit T Sitotoksik pada Gingivitis setelah Pemberian Kurkumin. *e-Jurnal Pustaka Kes*. 2(1): 42-48.
- Page, R. 1991. The Role of Inflammatory Mediators in the Pathogenesis of Periodontal Disease. *J Periodent Res*, 230-42.
- Parhusip, A. 2004. Pengaruh Ekstrak Andaliman terhadap Hidrofobisitas Bakteri *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhimurium*. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan*. 2(2).
- Permadani, I. A., P. Surjowardojo dan Sarwiyono. 2015. Daya Hambat Ekstrak Daun Beluntas (*Pluchea indica L.*) menggunakan Pelarut Etanol terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* Penyebab Mastitis pada Sapi Perah. Malang: Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya.
- Pidada, I. B. R., dan L. Suhargo. 2009. Peranan Ekstrak Daun Wungu (*Graptophyllum pictum (L.) Griff*) untuk Menghambat Atrofi Kelenjar Mammae Mencit Betina Ovariektomi. *Jurnal Penelitian Media Eksakta*. 8 (2): 120-124.
- Pratiwi, E. W., D. Praharani, D. M. Y. Arina. 2015. Daya Hambat Ekstrak Daun Pepaya (*Carica papaya L.*) terhadap Adhesi Bakteri *Porphyromonas gingivalis* pada Neutrofil. *e-Jurnal Pustaka Kesehatan*. 3(2).
- Pratiwi, L. 2012. Adhesi *Porphyromonas gingivalis* pada Netrofil yang Diinkubasi Ekstrak Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*). *Skripsi*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Rahman, M. F. 2008. Potensi Antibakteri Ekstrak Daun Wungu pada Ikan Gurami yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Skripsi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

- Riza, N. F. 2010. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Wungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli*. Skripsi. Jember: Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
- Robbins, S. L., dan V. Kumar. 1995. *Buku Ajar Patofisiologi I*. Terjemahan oleh Staf Pengajar Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Jakarta: EGC.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Bandung: ITB.
- Samaranayake, L.P. 2002. *Essential Microbiology for Dentistry*. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Elsevier Ltd.
- Santosaningsih, D. 2003. Peranan Protein Fimbriae dan Lipopolisakarida terhadap Perlekatan Bakteri Enterohemorragic *Escherichia coli* (EHEC) 0157 pada Enterosit Kelinci secara *In Vitro*: Penelitian Eksperimental Laboratoris. Tesis. Surabaya: Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Santoso, Sanarto. 2002. Protein Adhesin *Salmonella typhi* sebagai Faktor Virulensi Berpotensi Imunogenik pada Produk S-Ig Protektif. Tidak diterbitkan. Disertasi. Surabaya: Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Septiana, Dwiyantri, Muchtadi, dan Zakaria. 2006. Penghambatan Oksidasi LDL dan Akumulasi Kolesterol pada Makrofag oleh Ekstrak Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza roxb*). *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. 17(3).
- Suhargo, L. 2008. Pemanfaatan Ekstrak Daun Wungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff) untuk Penurunan Kadar Kolesterol Serum Darah Mencit Betina yang Diovariectomi. *Penelitian Hayati*. 13: 97-100.
- Sumarny, R., Yuliandini, dan M. Rohani. 2013. Efek Antiinflamasi dan Anti-Diare Ekstrak Etanol Herba Meniran (*Phyllanthus Niruri L.*) dan Daun Ungu (*Graptophyllum pictum L.*). Skripsi. Fakultas Farmasi Universitas Pancasila. Jakarta.
- Sung, S. H., H. K. Kyoung, T. J. Byong, H. C. Sun, H. P. Jae, H. K. Dong, J. K. Hyuk, dan H. M. Sang. 2012. Antibacterial and Antioxidant Activities of Tannins Extracted from Agricultural by-Products. *Journal of Medicinal Plants Research*. 6(15): 3072-3079.
- Toar, A.I., J. Posangi, dan V. Wowor. 2013. Daya Hambat Obat Kumur *Cetylpyridinium Chloride* dan Obat Kumur Daun Sirih terhadap

Pertumbuhan *Streptococcus mutans*. *Jurnal Biomedik (JBM) Universitas Sam Ratulangi*. 5: 163-168.

Todar, K. 2012. Bacteriology. Departement of Bacteriology. University of Wiconsin-Madison. <http://textbookofbacteriology.net>. [Diakses pada 20 September 2017].

Tukiran, Suyatno, dan N. Hidayati. 2014. Skrining Fitokimia pada Beberapa Ekstrak dari Tumbuhan Bugenvil (*Bougainvillea glabra*), Bunga Sepatu (*Hibiscus rosa-Sinensis L.*), dan Daun Ungu (*Graptophyllum pictum Griff.*). *Prosiding Seminar Nasional Kimia FMIPA Universitas Negeri Surabaya*. Surabaya: 238-239.

Wahyuningtyas, E., dan M. Indrastuti. 2005. Pengaruh Ekstrak *Graptophyllum pictum* terhadap Pertumbuhan Bakteri *Streptococcus mutans* pada Resin Akrilik. *Majalah Kedokteran Gigi Edisi Khusus Temu Ilmiah Nasional IV*.

Widyowati, R. 2011. Alkaline Phosphatase Activity of *Graptophyllum pictum* and *Sphilanthes acmella* Fractions Against MC3T3-E1 Cells as Marker of Osteoblast Differentiation Cells. *International Conference and Exhibition on Pharmaceutical, Nutraceutical and Cosmeceutical Technology*. 3(1): 34-37.

Wilson, J. W., M. J. Schurr, C. L. LeBlanc, R. Ramamurthy, K. L. Buchanan, dan C. A. Nickerson. 2002. Mechanisms of Bacterial Pathogenicity. *Postgraduate Medical Journal*. 78: 216-224.

Wizemann, T. M., J. E. Adamoum, dan S. Langermann. 1999. *Adhesins as Targets for Vaccine Development*. Maryland: MedImmune, Inc.

## LAMPIRAN

### Lampiran A. *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><b>ETHIC COMMITTEE APPROVAL</b> <u>No. 035/UN25.8/KEPK/DL/2018</u></p>	
Title of research protocol	: "Daya Hambat Ekstrak Daun Wungu ( <i>Graptophyllum Pictum</i> (L) Griff) Terhadap Adhesi Bakteri <i>Porphyromonas gingivalis</i> Pada Neutrofil"
Document approved	: Research Protocol
Principal investigator	: Grace Valencia Handoko
Member of research	: -
Responsible Physician	: Grace Valencia Handoko
Date of approval	: February 5 <sup>th</sup> , 2018
Place of research	: 1. Microbiology Laboratory Biomedical Sect. Faculty of Dentistry Universitas Jember 2. Biology Laboratory Pharmacy Faculty Universitas Jember 3. Bioscience Laboratory RSGM Universitas Jember 4. UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi (LIPI)
<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 10<sup>th</sup>, 2018</p>	
Dean of Faculty of Dentistry Universitas Jember	Chairperson of Research Ethics Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember
 (Desi) Eka Pratiyana P. M. Kes, Sp. Pros	 (Grace) Valencia Handoko, D. Grg., I. Dewa Ayu Ratna Dewanti, M. Si.)

Lampiran B. Surat keterangan identifikasi daun wungu



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



**SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TUMBUHAN**

**No: 05 /IPH.06/HM/I/2018**

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

Nama : Grace Valencia Handoko  
NIM : 141610101066  
Instansi : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.  
Tanggal material diterima : 9 Januari 2018

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

Kingdom : Plantae  
Division : Magnoliophyta  
Class : Magnoliopsida  
Subclass : Asteridae  
Ordo : Scrophulariales  
Family : Acanthaceae  
Genus : Graptophyllum  
Species : *Graptophyllum pictum* (L.) Griff.

Referensi:

1. Backer CA & Bakhuizen van den Brink RC. 1965. Flora of Java Vol.II. NVP Noordhoff, Groningen, The Netherlands. Hal. 579
  2. Cronquist A. 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press, New York, USA. Hal. XVII
  3. Heyne K. 1987, Tumbuhan Berguna Indonesia Hal. 1756
- Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Purwodadi, 16 Januari 2018

An. Kepala

Kepala Seksi Eksplorasi dan Koleksi Tumbuhan



Sugeng Budiharta, MSc., PhD.

Lampiran C. Surat keterangan hasil ekstraksi daun wungu



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
FAKULTAS FARMASI  
Jl. Kalimantan I/2 Kampus Tegal Boto. Telp./ Fax. (0331) 324736 Jember 68121

SURAT KETERANGAN PEMBUATAN EKSTRAK

Data pemohon :  
Nama : Grace Valencia Handoko  
NIM : 141610101066  
Fakultas : Kedokteran Gigi Universitas Jember  
Bahan : Daun Wungu (*Graptophyllum Pictum* L. Griff)  
Pelarut Pengekstraksi : Etanol 96%  
Metode ekstraksi : Maserasi  
Prosedur : Serbuk daun wungu (*Graptophyllum Pictum* L. Griff) 200 gram dimaserasi dengan etanol 96% sebanyak 7,5 kali berat serbuk selama 3 hari. Maserat dipekatkan dengan rotary evaporator.  
Hasil : Ekstrak etanol daun wungu dengan rendemen 18,14% (b/b)  
Tanggal pembuatan : 6 November 2017

Jember, 23 November 2017  
Ketua Bagian Biologi Farmasi,



Indah Yulia Ningsih, S.Farm., M.Sc., Apt.  
NIP. 198407122008122002

Lampiran D. Surat keterangan uji identifikasi dan gambaran mikroskopis  
*Porphyromonas gingivalis*



LABORATORIUM MIKROBIOLOGI  
BAGIAN BIOMEDIK KEDOKTERAN GIGI  
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER

**SURAT KETERANGAN**

No. 0135 / MIKRO / S.KET / 2018

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


Nama : Grace Valencia Handoko  
NIM : 141610101066  
Fakultas : Kedokteran Gigi  
Keperluan : Penelitian Skripsi

Telah melakukan uji identifikasi terhadap isolat bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 murni dengan menggunakan pengecatan Gram dan diamati secara mikroskopis menunjukkan hasil *cocco-bacillus*, Gram negatif dan tidak terkontaminasi.

Jember, 2018

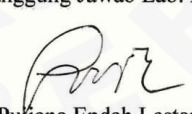
Mengetahui,

Kepala Bagian Biomedik Kedokteran Gigi

  
(drg. Amandia Dewi Shita, M.Biomed)

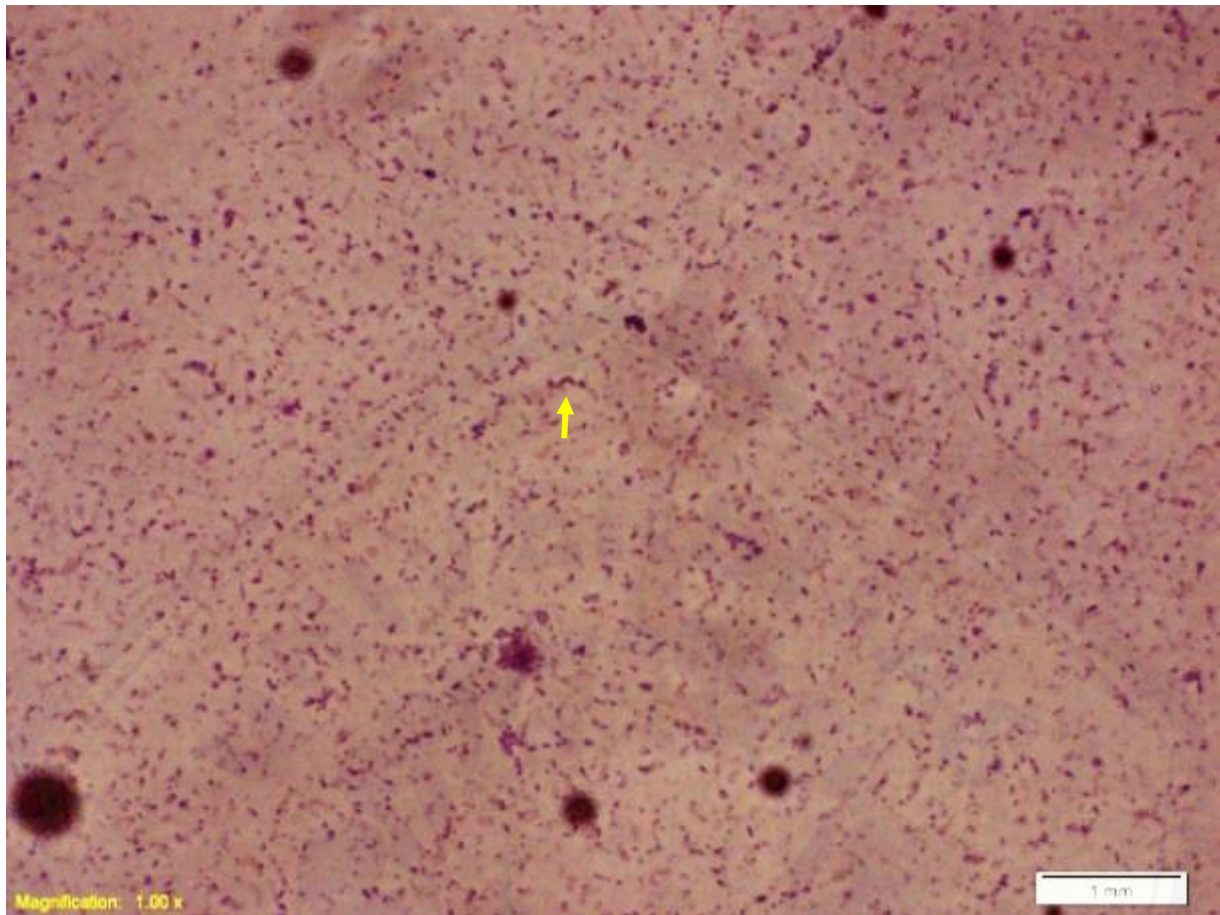
NIP. 198006032006042002

Penanggung Jawab Lab. Mikrobiologi

  
(drg. Pujiانا Endah Lestari, M.Kes)

NIP. 197608092005012002





Gambar D.1 Hasil identifikasi bakteri *Porphyromonas gingivalis* dengan mikroskop *inverted*. Tanda panah menunjukkan sel berwarna merah dan berbentuk batang (pewarnaan gram, perbesaran 400x).

Lampiran E. *Informed consent*

Surat Persetujuan (*Informed Consent*)

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Nur Qum Irfan

Umur : 21 tahun

Jenis kelamin : Laki - laki

Alamat : Mastrip II No.10

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

Nama : Grace Valencia Handoko

Nim : 141610101066

Fakultas : Kedokteran Gigi Universitas Jember

Alamat : Jl. Jawa IID No. 14, Sumbersari - Jember

Dengan judul "Daya Hambat Ekstrak Daun Wungu (*Graptophyllum Pictum (L.) Griff*) Terhadap Adhesi Bakteri *Porphyromonas gingivalis* pada Neutrofil" 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, 8 Februari 2018

Saksi

Yang Membuat Pernyataan,

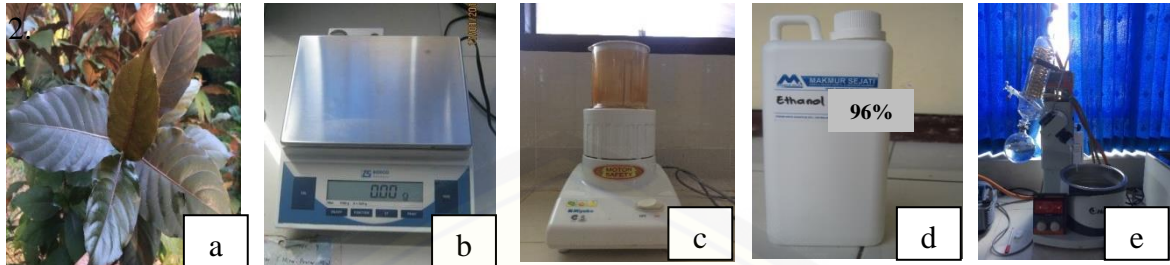


( Arina Nur Rahmah )

( Nur Qum Irfan )

**Lampiran F. Foto alat dan bahan penelitian**

1. Pembuatan ekstrak daun wungu



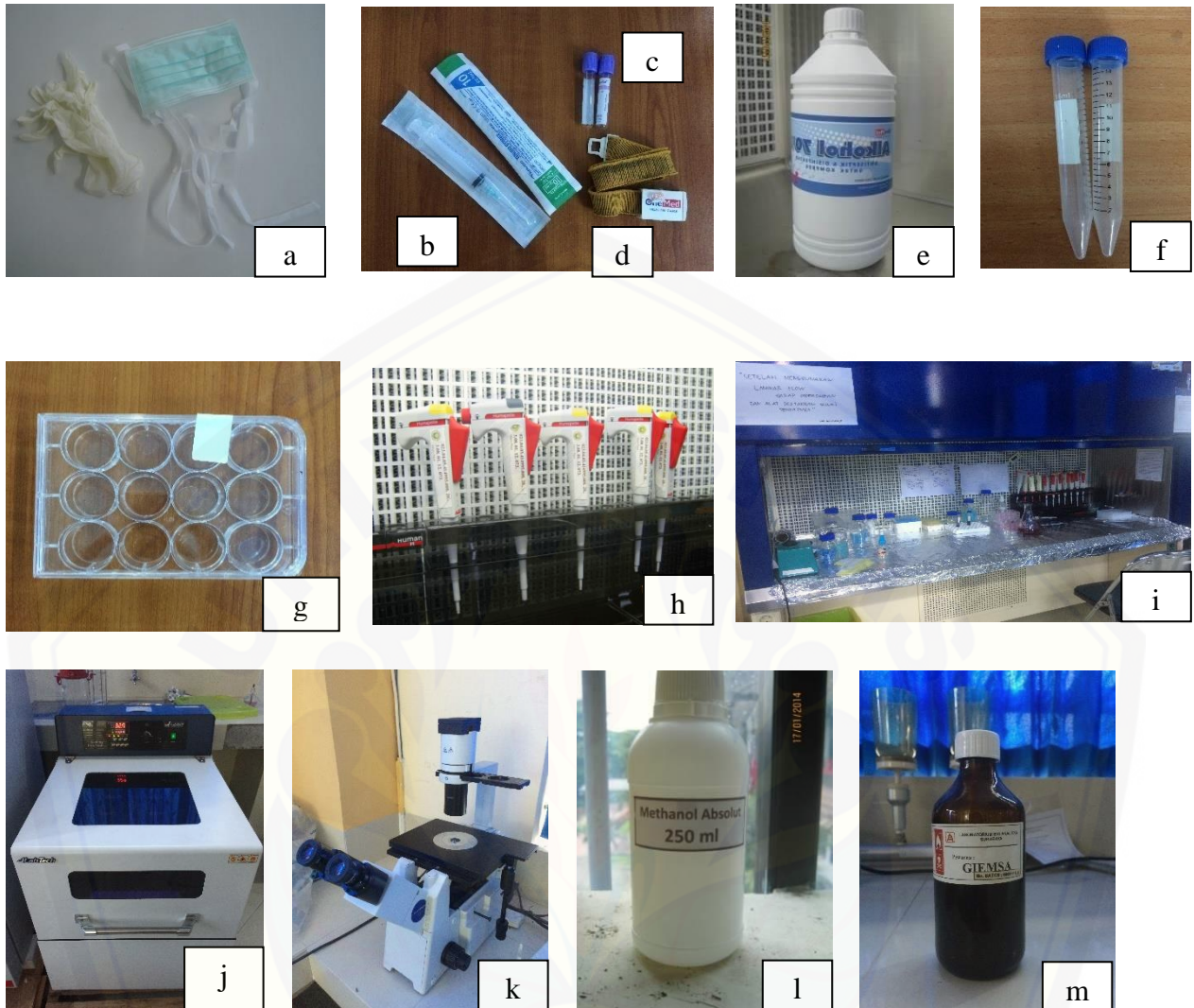
Keterangan: a) daun wungu; b) neraca digital; c) blender; d) etanol 96%; e) rotary evaporator.

2. Pembuatan suspensi *Porphyromonas gingivalis*

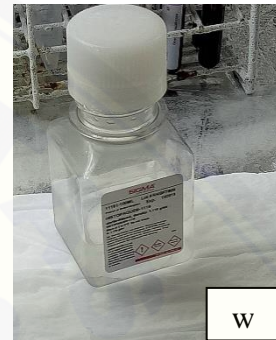
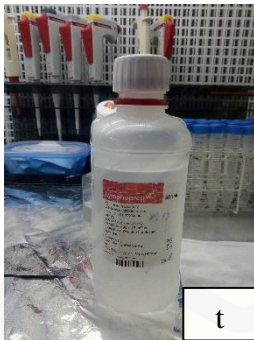
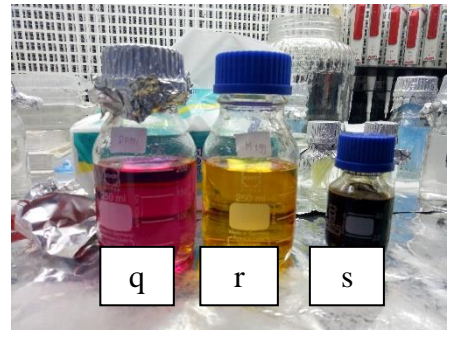
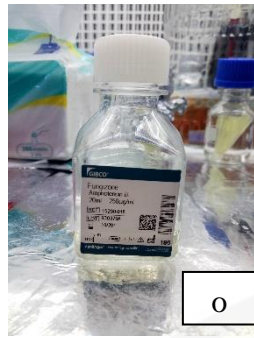


Keterangan: a) inkubator; b) autoclave; c) densitometer; d) BHI-A; e) BHI-B; f) aquadest steril; g) hemin; h) vitamin K.

3. Uji adhesi

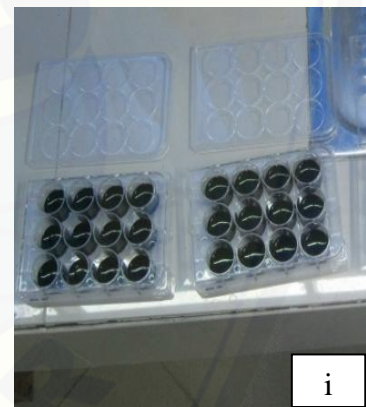
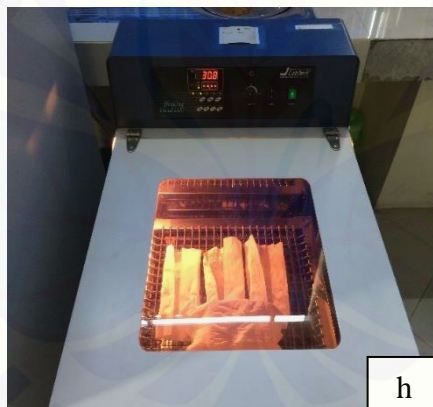
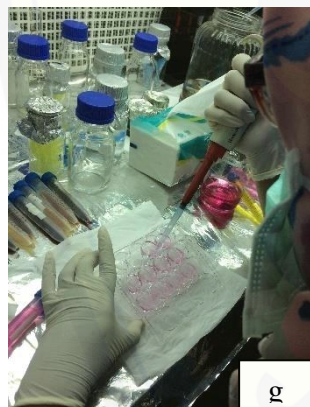
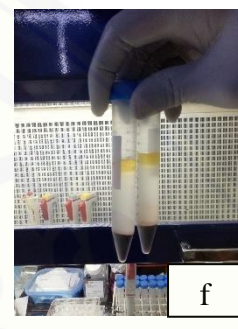
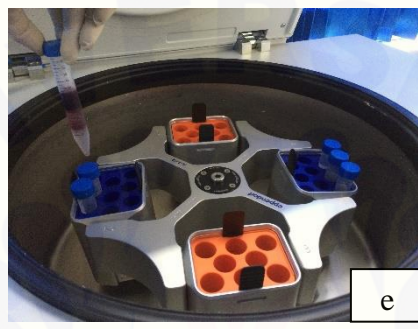
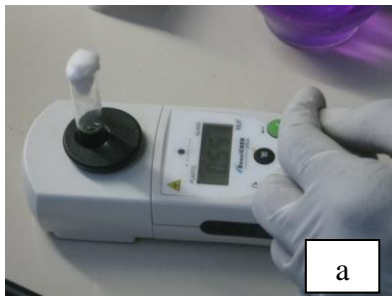


Keterangan: a) masker dan *handscoon*; b) *disposable syringe*; c) tabung heparin; d) *tourniquet*; e) alkohol 70%; f) tabung falcon; g) *microplate 12 well*; h) *micropippet*; i) *laminar flow*; j) *shaker incubator*; k) mikroskop *inverted*; l) metanol absolut; m) pewarna Giemsa



Keterangan: n) HBSS; o) *fungizone*; p) *entellon*; q) RPMI; r) M199; s) ekstrak daun wungu; t) *limphoprep*; u) *blue tip*; v) *yellow tip*; w) *histopaque*.

Lampiran G. Foto prosedur penelitian



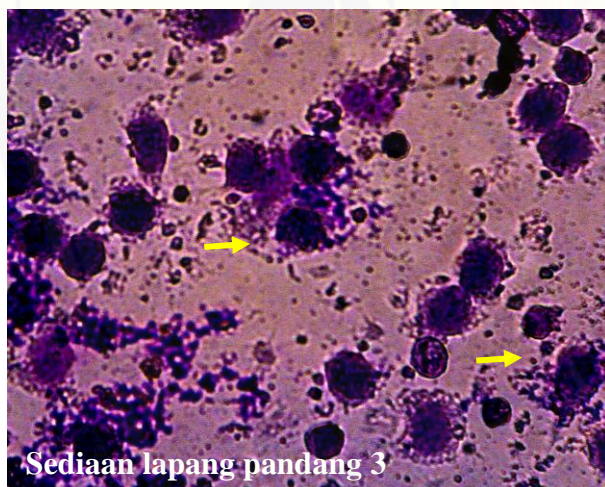
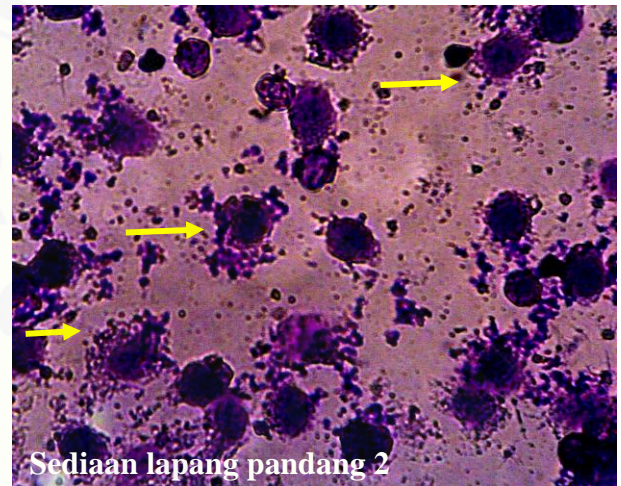
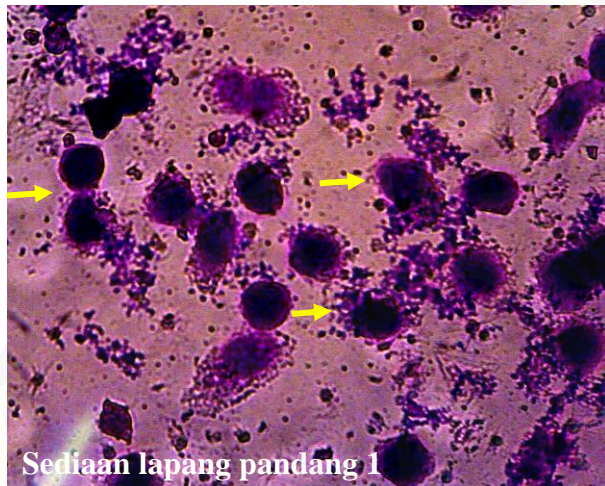
Keterangan:

- a) Pengukuran densitas *P. gingivalis* dengan *densicheck*
- b) Proses maserasi ekstrak daun wungu
- c) Proses evaporasi ekstrak daun wungu
- d) Pengambilan darah subyek
- e) Proses sentrifugasi darah subyek
- f) Isolasi neutrofil
- g) Proses penambahan media
- h) Proses inkubasi
- i) Proses pewarnaan Giemsa

**Lampiran H. Hasil uji adhesi**

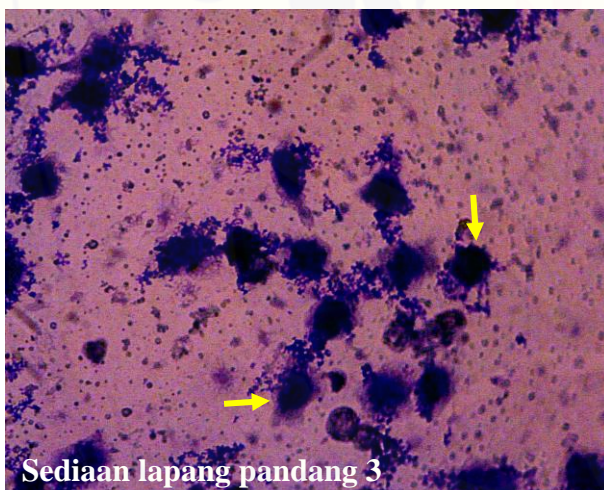
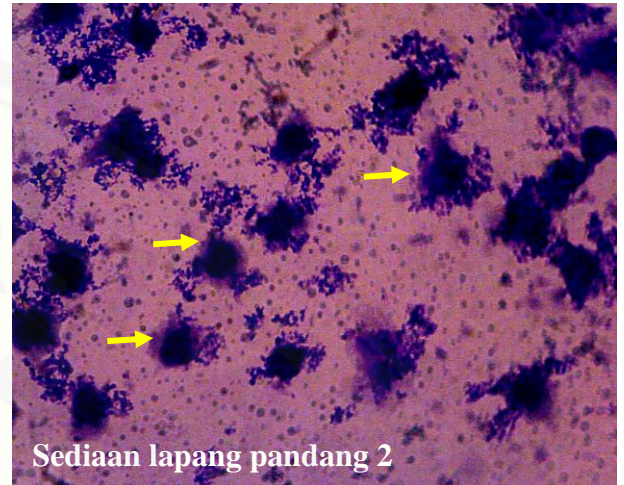
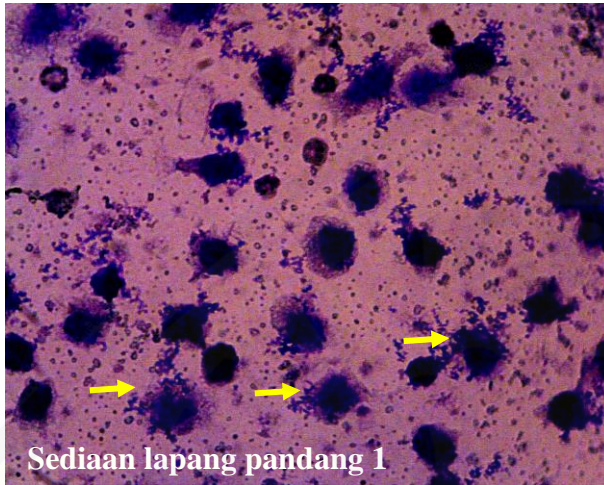
**1. Kelompok kontrol**

Adhesi *Porphyromonas gingivalis* pada neutrofil (panah kuning) pada kelompok kontrol dengan pengecatan Giemsa dan perbesaran 1000x menggunakan mikroskop *inverted*.



**2. Kelompok EDW 3,12%**

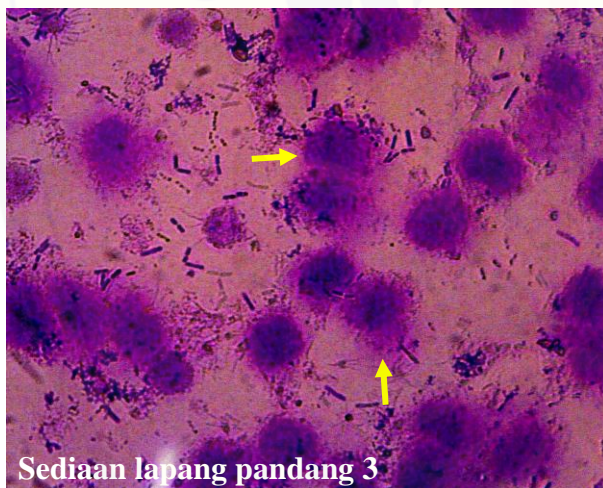
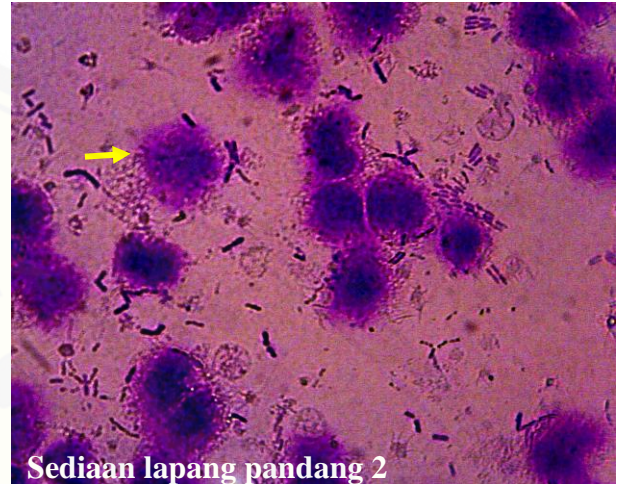
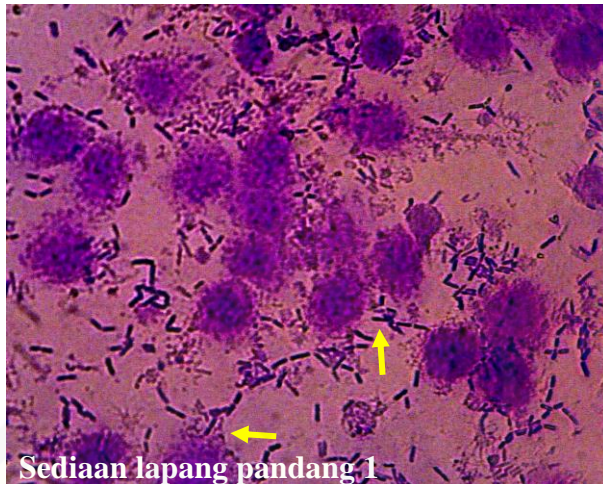
Adhesi *Porphyromonas gingivalis* pada neutrofil (panah kuning) pada kelompok EDW 3,12% dengan pengecatan Giemsa dan perbesaran 1000x menggunakan mikroskop *inverted*.





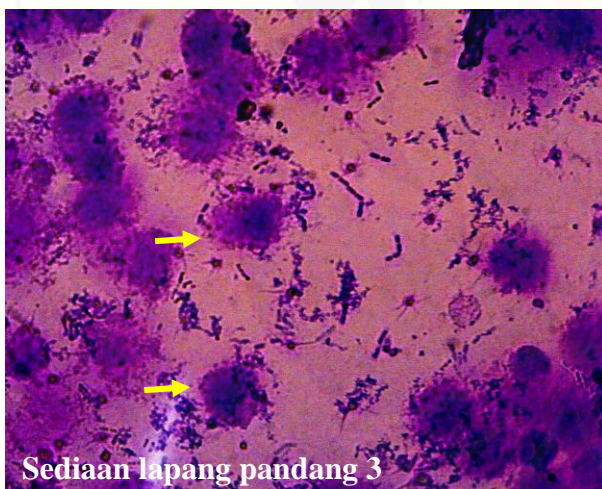
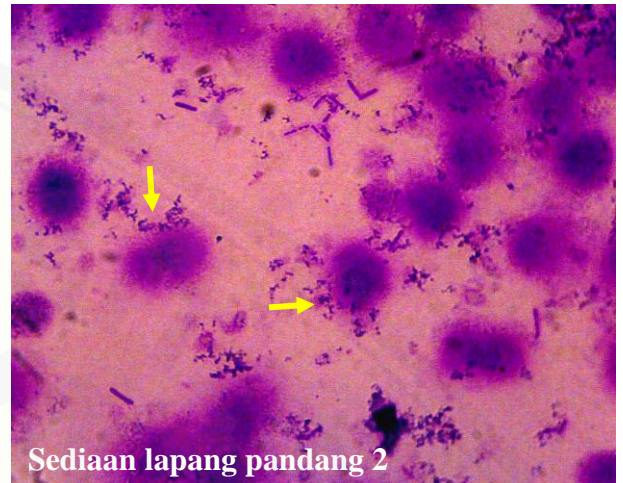
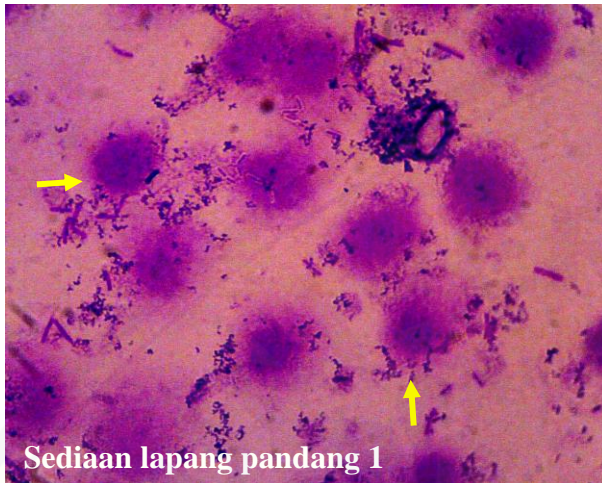
### 3. Kelompok EDW 6,25%

Adhesi *Porphyromonas gingivalis* pada neutrofil (panah kuning) pada kelompok EDW 6,25% dengan pengecatan Giemsa dan perbesaran 1000x menggunakan mikroskop *inverted*.



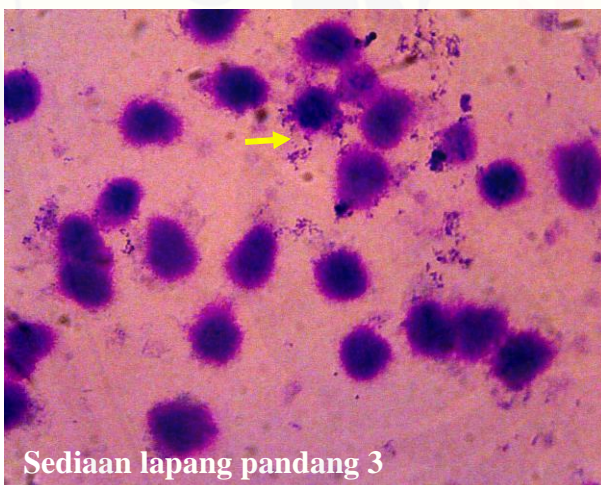
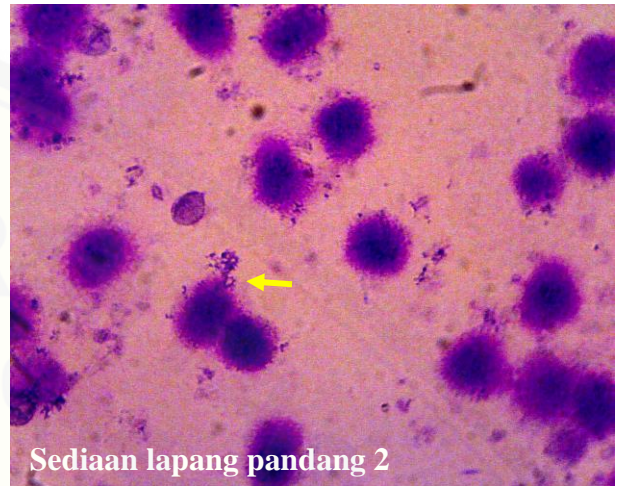
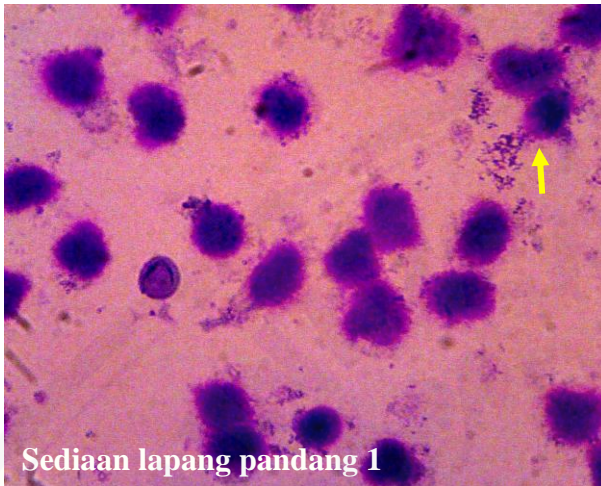
**4. Kelompok EDW 12,5%**

Adhesi *Porphyromonas gingivalis* pada neutrofil (panah kuning) pada kelompok EDW 12,5% dengan pengecatan Giemsa dan perbesaran 1000x menggunakan mikroskop *inverted*.



**5. Kelompok EDW25%**

Adhesi *Porphyromonas gingivalis* pada neutrofil (panah kuning) pada kelompok EDW 25% dengan pengecatan Giemsa dan perbesaran 1000x menggunakan mikroskop *inverted*.



**Lampiran I. Hasil penghitungan adhesi *P. gingivalis* pada neutrofil**

**1. Kelompok kontrol = isolat neutrofil + *P. gingivalis***

SAMPEL A										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	7	7	4	4	6	6	5	6	8	6
2	6	6	6	5	4	4	5	6	8	7
3	6	6	5	5	4	4	4	6	5	6
4	6	6	8	7	4	5	5	6	7	8
5	4	4	6	6	5	6	4	6	8	7
6	6	6	6	7	8	4	8	6	7	4
7	4	4	4	5	6	8	7	4	5	6
8	6	6	5	5	8	7	6	7	6	5
9	5	5	6	8	4	6	6	5	6	4
10	4	4	6	5	8	7	6	5	4	6
<b>Total</b>	<b>: 552</b>									
<b>Indeks adhesi</b>	<b>: 5,52</b>									

SAMPEL B										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	5	4	6	4	5	6	4	5	6	4
2	5	6	6	4	6	4	5	5	6	4
3	4	6	6	5	4	4	6	6	5	6
4	4	6	5	4	4	6	5	5	6	5
5	4	5	5	5	4	6	4	6	5	6
6	6	6	5	6	4	4	5	6	5	5
7	5	5	4	6	5	4	5	6	6	5
8	5	4	4	6	5	6	4	6	5	6
9	4	5	5	5	6	4	4	4	5	6
10	6	6	5	4	5	6	4	5	6	6
<b>Total</b>	<b>: 497</b>									
<b>Indeks adhesi</b>	<b>: 4,97</b>									

SAMPEL C										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	6	5	6	8	7	4	6	5	4	6
2	5	4	5	4	6	8	7	4	6	5
3	5	4	4	6	5	4	6	5	5	6
4	6	6	5	5	4	4	8	6	7	8
5	7	6	6	7	4	5	6	8	7	6
6	4	4	5	6	8	7	6	4	5	6
7	6	6	5	5	6	8	7	4	6	7
8	5	5	6	8	7	7	6	6	5	4
9	4	4	5	6	4	6	7	8	4	4
10	4	4	6	5	6	8	4	4	4	5
<b>Total</b>	<b>: 548</b>									
<b>Indeks adhesi</b>	<b>: 5,48</b>									

SAMPEL D										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	8	4	6	5	4	4	5	6	5	4
2	4	4	5	5	6	7	4	6	8	7
3	4	5	6	6	4	8	7	4	5	6
4	6	6	5	5	6	7	4	8	5	6
5	4	4	6	6	5	7	8	4	5	6
6	6	6	5	5	4	4	8	7	6	7
7	8	7	8	4	6	4	6	6	8	5
8	5	5	6	7	5	5	6	8	4	5
9	5	5	6	8	4	7	6	4	8	6
10	5	6	4	6	5	4	6	8	7	4
<b>Total</b>	<b>: 558</b>									
<b>Indeks adhesi</b>	<b>: 5,58</b>									

2. Kelompok EDW3,12% = isolat neutrofil + ekstrak daun wungu 3,12% + *P. gingivalis*

SAMPEL A										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	4	4	4	3	4	5	6	4	3	1
2	2	2	4	5	6	4	4	5	4	3
3	0	0	1	2	4	5	6	4	3	1
4	1	1	2	2	3	3	4	5	6	1
5	2	1	4	3	3	5	6	1	2	4
6	5	5	6	1	3	2	1	6	5	0
7	0	6	5	4	0	2	1	3	4	6
8	5	5	4	3	0	2	0	2	3	4
9	5	0	0	4	6	4	6	0	5	4
10	3	2	0	1	4	0	6	5	4	6
Total : 318										
Indeks adhesi : 3,18										

SAMPEL B										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	6	6	6	5	5	4	6	8	7	5
2	5	5	6	7	6	6	7	8	6	4
3	4	4	6	7	8	6	7	4	4	3
4	3	3	4	4	5	6	5	8	7	8
5	4	7	6	5	4	7	6	4	4	5
6	5	5	6	7	8	6	6	5	4	3
7	4	4	3	5	6	6	7	8	4	6
8	5	5	4	3	6	6	4	8	7	6
9	6	6	5	5	8	7	4	8	7	6
10	4	4	5	5	3	4	7	6	8	4
Total : 544										
Indeks adhesi : 5,44										

SAMPEL C										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	6	6	5	5	4	3	4	6	5	5
2	4	4	6	6	5	4	3	4	5	6
3	5	5	6	7	6	7	8	6	8	7
4	4	4	5	6	7	8	4	3	4	5
5	6	6	4	4	5	5	6	8	7	6
6	6	5	4	4	5	5	6	7	6	4
7	4	4	4	6	5	6	8	6	4	7
8	7	7	6	5	4	5	5	4	4	3
9	4	3	4	5	5	6	7	7	6	8
10	7	7	4	8	6	4	3	4	6	5
Total : 524										
Indeks adhesi : 5,24										

SAMPEL D										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	7	7	7	6	6	8	6	7	4	5
2	6	6	4	4	5	5	6	6	7	8
3	8	7	8	6	7	4	5	5	6	6
4	5	5	4	6	7	8	4	3	6	5
5	5	5	6	6	7	8	4	6	7	8
6	8	8	6	5	6	7	8	4	5	6
7	6	6	5	5	6	7	4	4	5	6
8	6	6	7	8	7	8	8	4	6	6
9	4	6	5	5	6	3	4	5	6	7
10	8	7	8	4	6	8	7	6	5	4
Total : 582										
Indeks adhesi : 5,82										

3. Kelompok EDW6,25% = isolat neutrofil + ekstrak daun wungu 6,25% + *P. gingivalis*

SAMPEL A										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	6	6	6	5	5	4	6	4	7	8
2	8	4	5	6	7	8	4	5	6	7
3	4	5	6	7	8	4	5	6	4	3
4	3	4	4	5	6	8	7	3	4	4
5	5	5	5	6	6	6	4	4	3	3
6	4	3	4	5	8	7	4	5	6	3
7	5	5	5	6	4	7	8	3	4	5
8	5	6	8	4	4	5	5	6	7	4
9	5	5	6	4	3	4	4	5	8	7
10	6	6	6	5	5	5	4	3	6	4
Total : 505										
Indeks adhesi : 5,05										

SAMPEL B										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	6	6	6	5	5	5	4	6	4	5
2	5	4	3	3	4	4	2	2	4	6
3	6	6	5	5	4	6	6	5	5	4
4	4	4	6	6	5	5	6	4	4	6
5	6	6	5	4	6	6	5	5	4	3
6	3	3	4	4	2	2	6	6	5	5
7	6	6	6	5	5	5	4	5	4	3
8	3	3	4	4	4	5	4	6	6	4
9	4	4	5	4	4	6	5	6	6	5
10	5	4	6	4	3	5	5	4	6	5
Total : 456										
Indeks adhesi : 4,56										

SAMPEL C										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	4	4	3	3	5	5	6	6	3	2
2	3	4	4	5	6	5	6	4	4	2
3	2	2	2	3	4	5	6	6	5	4
4	4	4	4	5	6	3	4	5	6	5
5	5	5	4	4	4	3	6	6	4	5
6	4	5	5	5	6	6	3	3	4	2
7	2	2	3	4	3	4	4	5	6	5
8	5	5	6	5	3	4	4	6	5	4
9	4	4	4	4	5	5	6	6	4	3
10	2	2	3	4	3	2	4	5	6	5
Total : 424										
Indeks adhesi : 4,24										

SAMPEL D										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	6	6	6	5	5	5	4	6	6	4
2	4	4	5	5	6	6	3	6	5	6
3	5	6	4	4	3	3	3	2	2	4
4	4	4	5	5	6	6	5	5	4	3
5	3	3	4	4	2	4	6	6	5	4
6	4	5	5	5	6	6	4	3	4	2
7	6	6	5	6	6	5	5	4	4	4
8	4	5	5	6	6	3	6	6	5	6
9	5	6	5	6	4	3	6	6	4	5
10	6	6	6	5	5	5	4	6	6	5
Total : 477										
Indeks adhesi : 4,77										

4. Kelompok EDW12,5% = isolat neutrofil + ekstrak daun wungu 12,5% + *P. gingivalis*

SAMPEL A										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	6	6	6	5	7	8	6	4	5	6
2	4	4	4	3	3	4	3	6	7	8
3	5	5	4	5	6	7	8	6	7	8
4	8	7	4	6	8	7	4	5	6	7
5	6	6	6	5	7	7	4	8	3	4
6	4	4	3	6	4	7	8	3	4	4
7	5	5	6	6	8	7	3	4	7	6
8	6	6	4	4	5	7	4	3	2	6
9	8	4	5	6	3	4	4	5	6	6
10	6	6	5	6	4	5	7	6	8	4
Total : 524										
Indeks adhesi : 5,24										

SAMPEL B										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	5	5	4	6	6	4	5	4	3	3
2	4	4	5	6	4	6	5	4	3	1
3	2	2	4	4	5	3	4	5	6	3
4	3	3	4	4	5	6	4	5	6	3
5	4	4	5	6	3	4	5	6	4	5
6	5	5	6	3	3	4	4	6	5	3
7	4	4	3	6	4	5	5	5	6	4
8	3	3	4	5	5	6	4	3	2	4
9	6	6	5	5	4	4	3	4	6	2
10	5	5	4	4	3	2	6	5	4	6
Total : 427										
Indeks adhesi : 4,27										

SAMPEL C										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	4	5	7	4	6	5	8	4	3	4
2	5	5	4	4	4	6	7	6	3	4
3	4	4	5	5	6	8	7	6	5	4
4	5	5	6	6	6	3	4	4	5	7
5	4	8	5	7	8	6	6	5	4	4
6	3	4	3	5	4	7	4	5	6	6
7	4	2	4	3	8	6	4	5	6	7
8	4	5	8	3	2	4	5	3	3	2
9	5	6	7	6	4	6	5	3	2	4
10	5	5	4	4	6	7	3	2	8	4
Total : 491										
Indeks adhesi : 4,91										

SAMPEL D										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	4	4	5	5	6	4	3	3	2	1
2	1	2	4	5	6	3	4	0	2	1
3	4	4	5	5	6	6	0	4	5	3
4	3	3	6	4	5	4	3	1	6	5
5	0	0	5	6	4	5	3	4	6	5
6	6	5	4	3	1	2	4	5	6	3
7	0	0	3	4	6	5	4	4	5	6
8	6	5	6	4	4	5	3	4	2	1
9	0	6	5	0	6	5	4	3	4	1
10	2	4	0	6	5	0	5	6	4	3
Total :377										
Indeks adhesi : 3,77										

5. Kelompok EDW25% = isolat neutrofil + ekstrak daun wungu 25% + *P. gingivalis*

SAMPEL A										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	2	2	1	3	4	4	3	0	2	4
2	1	2	3	3	4	3	4	0	2	3
3	2	3	4	3	2	1	0	4	4	2
4	4	4	3	3	3	4	2	1	0	1
5	1	1	2	3	2	2	2	3	4	1
6	4	4	0	3	3	2	2	1	4	3
7	0	0	3	4	2	4	3	2	1	2
8	1	1	3	3	3	4	2	2	4	2
9	3	2	1	4	3	3	2	1	4	3
10	0	0	3	3	4	2	2	1	3	4
<b>Total</b>	<b>:240</b>									
<b>Indeks adhesi : 2,40</b>										

SAMPEL B										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	4	3	3	4	4	5	3	2	0	2
2	2	3	3	4	1	2	3	0	4	5
3	4	4	3	3	3	4	4	0	3	2
4	2	2	3	4	4	5	2	1	0	3
5	4	4	3	5	5	2	3	1	4	0
6	3	2	2	1	1	4	5	4	3	2
7	0	0	2	1	2	1	4	3	5	4
8	4	3	4	5	5	3	2	1	0	1
9	2	1	3	1	2	3	4	0	5	4
10	3	3	2	4	1	0	4	5	3	3
<b>Total</b>	<b>:270</b>									
<b>Indeks adhesi : 2,70</b>										

SAMPEL C										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	4	4	3	3	5	5	4	4	3	1
2	4	5	4	4	3	0	6	2	3	4
3	3	3	6	4	5	2	3	4	0	2
4	3	3	4	4	5	5	5	4	3	0
5	2	6	4	3	4	4	4	3	4	0
6	3	2	3	3	4	4	5	5	0	3
7	5	4	3	6	2	4	6	4	0	2
8	3	2	2	3	4	4	5	3	3	0
9	1	1	2	4	5	4	3	3	2	1
10	0	0	4	5	5	6	6	1	4	5
<b>Total</b>	<b>: 330</b>									
<b>Indeks adhesi : 3,30</b>										

SAMPEL D										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	2	2	3	1	0	0	2	3	1	1
2	2	3	1	1	2	2	0	2	3	1
3	1	1	3	3	2	2	1	0	3	2
4	3	3	3	2	1	1	2	2	0	1
5	1	1	2	1	2	3	2	2	2	0
6	3	2	2	1	3	2	1	1	0	2
7	2	2	3	3	1	2	1	3	1	0
8	0	0	2	1	2	1	1	2	3	3
9	2	1	2	2	3	3	0	1	2	3
10	1	1	3	2	2	1	2	3	0	2
<b>Total</b>	<b>: 178</b>									
<b>Indeks adhesi : 1,78</b>										



## Nilai indeks adhesi per sampel dan kelompok

Kelompok	Indeks adhesi per sampel				Jumlah	Rata-rata indeks adhesi per kelompok
	1	2	3	4		
Kelompok kontrol	5,52	4,97	5,48	5,58	21,55	5,38
Kelompok EDW3,12%	3,18	5,44	5,24	5,82	19,68	4,92
Kelompok EDW6,25%	5,05	4,56	4,24	4,77	9,08	4,65
Kelompok EDW12,5%	5,24	4,27	4,91	3,77	18,19	4,54
Kelompok EDW25%	2,40	2,70	3,30	1,78	10,18	2,54

**Lampiran J. Analisis data penelitian**

**1. Deskriptif data penelitian**

**Descriptive Statistics**

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	Variance
Kontrol	4	4.97	5.58	5.3875	.28135	.079
3,125%	4	3.18	5.82	4.9200	1.18468	1.403
6,25%	4	4.24	5.05	4.6550	.34181	.117
12,5%	4	3.77	5.24	4.5475	.65637	.431
25%	4	1.78	3.30	2.5450	.63253	.400
Valid N (listwise)	4					

**2. Hasil Uji normalitas dengan Shapiro-Wilk**

**Tests of Normality**

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	Df	Sig.	Statistic	Df	Sig.
Kontrol	.379	4	.	.764	4	.052
3,125%	.356	4	.	.811	4	.123
6,25%	.141	4	.	.999	4	.996
12,5%	.210	4	.	.965	4	.810
25%	.159	4	.	.998	4	.994

a. Lilliefors Significance Correction

**3. Hasil uji homogenitas dengan Levene**

**Test of Homogeneity of Variances**

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.207	4	15	.117

**4. Hasil uji parametrik dengan *one way anova***

**ANOVA**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	19.091	4	4.773	9.819	.000
Within Groups	7.291	15	.486		
Total	26.382	19			

5. Hasil uji LSD (*Least Significant Differences*)

Multiple Comparisons

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	3.12%	.46750	.49299	.358	-.5833	1.5183
	6.25%	.73250	.49299	.158	-.3183	1.7833
	12.5%	.84000	.49299	.109	-.2108	1.8908
	25%	2.84250*	.49299	.000	1.7917	3.8933
3.12%	Kontrol	-.46750	.49299	.358	-1.5183	.5833
	6.25%	.26500	.49299	.599	-.7858	1.3158
	12.5%	.37250	.49299	.462	-.6783	1.4233
	25%	2.37500*	.49299	.000	1.3242	3.4258
6.25%	Kontrol	-.73250	.49299	.158	-1.7833	.3183
	3.12%	-.26500	.49299	.599	-1.3158	.7858
	12.5%	.10750	.49299	.830	-.9433	1.1583
	25%	2.11000*	.49299	.001	1.0592	3.1608
12.5%	Kontrol	-.84000	.49299	.109	-1.8908	.2108
	3.12%	-.37250	.49299	.462	-1.4233	.6783
	6.25%	-.10750	.49299	.830	-1.1583	.9433
	25%	2.00250*	.49299	.001	.9517	3.0533
25%	Kontrol	-2.84250*	.49299	.000	-3.8933	-1.7917
	3.12%	-2.37500*	.49299	.000	-3.4258	-1.3242
	6.25%	-2.11000*	.49299	.001	-3.1608	-1.0592
	12.5%	-2.00250*	.49299	.001	-3.0533	-.9517

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