



**PENGARUH EKSTRAK FLAVONOID DAUN TEMBAKAU KASTURI
TERHADAP KADAR *CYCLOOXYGENASE-2* PADA *HUMAN
PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL* YANG
DIPAPAR LIPOPOLISAKARIDA
*Porphyromonas gingivalis***

SKRIPSI

Oleh

Tazqia Jamil Pratami

NIM 141610101020

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS JEMBER

2018



**PENGARUH EKSTRAK FLAVONOID DAUN TEMBAKAU KASTURI
TERHADAP KADAR *CYCLOOXYGENASE-2* PADA *HUMAN
PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL* YANG
DIPAPAR LIPOPOLISAKARIDA
*Porphyrromonas gingivalis***

SKRIPSI

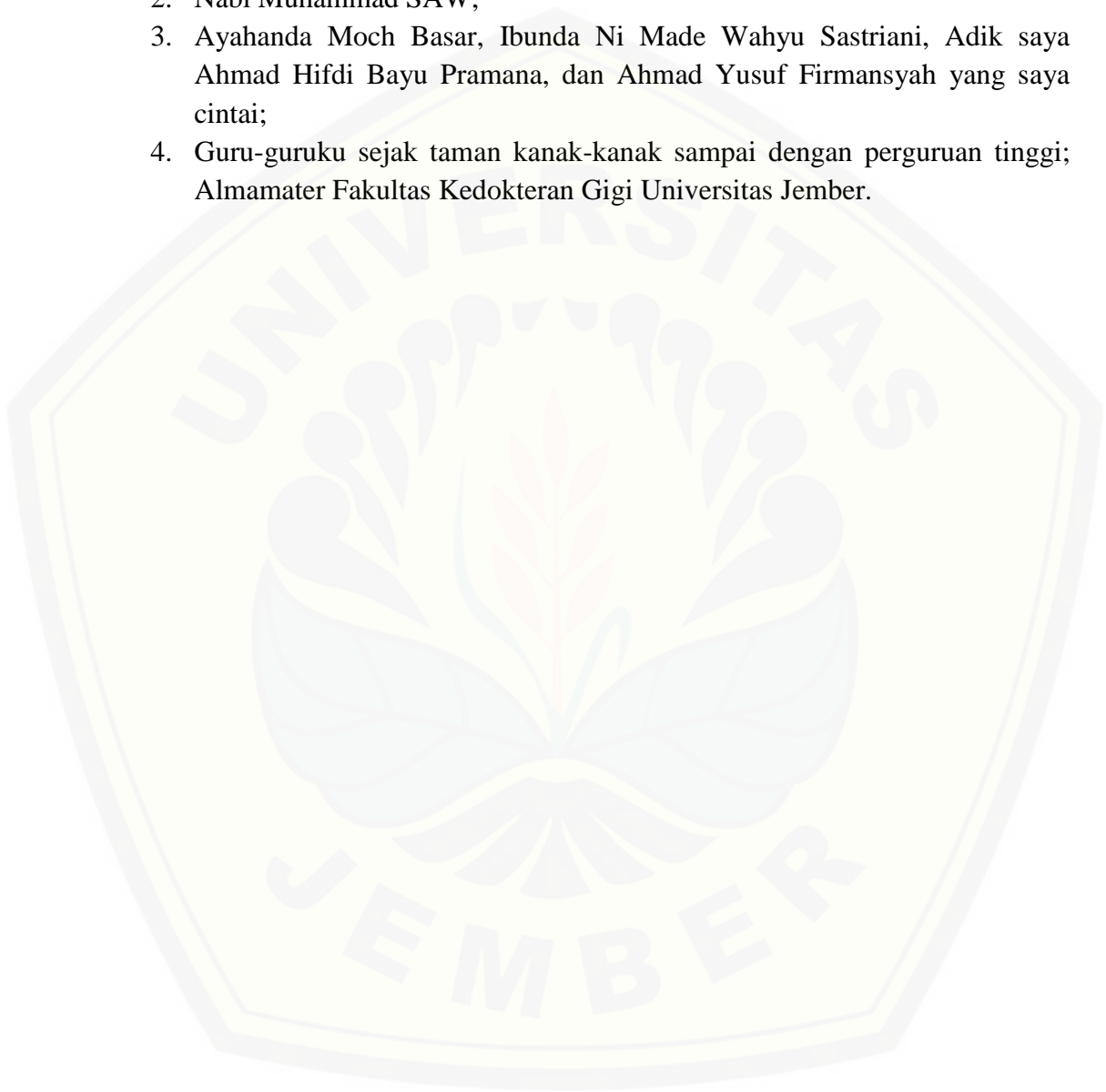
diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Kedokteran Gigi (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran Gigi

Oleh:
Tazqia Jamil Pratami
NIM 141610101020

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2018
PERSEMBAHAN**

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Allah SWT atas limpahan rahmat, hidayah, kemudahan dan berkah yang tiada habisnya;
2. Nabi Muhammad SAW;
3. Ayahanda Moch Basar, Ibunda Ni Made Wahyu Sastriani, Adik saya Ahmad Hifdi Bayu Pramana, dan Ahmad Yusuf Firmansyah yang saya cintai;
4. Guru-guruku sejak taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi; Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.



MOTO

“Allah swt tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya”
(QS. Al Baqarah: 286)

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

“Daun yang jatuh tak pernah membenci angin”
(Tere Liye)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Tazqia Jamil Pratami

NIM : 141610101020

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul "Pengaruh Ekstrak flavonoid Daun Tembakau Kasturi terhadap Kadar *Cyclooxygenase-2* pada *Human Peripheral Blood Mononuclear Cell* yang Dipapar Lipopolisakarida *Porphyromonas gingivalis*" adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi 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, Juli 2018

Yang menyatakan,

Tazqia Jamil Pratami

NIM 141610101020

SKRIPSI

**PENGARUH EKSTRAK FLAVONOID DAUN TEMBAKAU KASTURI
TERHADAP KADAR *CYCLOOXYGENASE-2* PADA *HUMAN*
PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL YANG
DIPAPAR LIPOPOLISAKARIDA
*Porphyromonas gingivalis***

Oleh:
Tazqia Jamil Pratami
NIM 141610101020

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Dr. drg. Banun Kusumawardani, M. Kes
Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Agustin Wulan Suci D., MDSc

PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul "Pengaruh Ekstrak Flavonoid Daun Tembakau Kasturi terhadap Kadar *Cyclooxygenase-2* pada *Human Peripheral Blood Mononuclear Cell* yang Dipapar Lipopolisakarida *Porphyromonas gingivalis*" telah diuji dan disahkan pada :

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Penguji Utama

Penguji Anggota

drg. Dwi Merry Christmarini Robin, M. Kes.
NIP. 197712232008122002

drg. Yenny Yustisia, M. Biotech.
NIP. 197903252005012000

Pembimbing Utama

Pembimbing Anggota

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

drg. Agustin Wulan Suci D., MDSc.
NIP.197908142008122000

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Jember,

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

RINGKASAN

Pengaruh Ekstrak Flavonoid Daun Tembakau Kasturi terhadap Kadar *Cyclooxygenase-2* pada *Human Peripheral Blood Mononuclear Cell* yang Dipapar Lipopolisakarida *Porphyromonas gingivalis*; Tazqia Jamil Pratami, 141610101020, 58 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Periodontitis merupakan penyakit inflamasi yang disebabkan oleh injuri biologis periopatojen, salah satunya bakteri *Porphyromonas gingivalis* melalui endotoksin berupa lipopolisakarida. Lipopolisakarida dapat memicu respon inflamasi intraseluler melalui ikatan dengan *Toll-like receptors 4* (TLR4) pada permukaan *human Peripheral Blood Mononuclear Cell* (hPBMC). hPBMC dapat menghasilkan enzim *Cyclooxygenase-2* (COX-2) yang berperan penting dalam metabolisme asam arakidonat menjadi mediator inflamasi seperti Prostaglandin E₂ (PGE₂) dan Tromboksan A₂ (TXA₂). Pemberian obat anti-inflamasi golongan Anti Inflamasi Non Steroid (AINS) seringkali digunakan untuk mengontrol aktivitas inflamasi dengan menghambat aktivitas enzim COX-2. Namun, penggunaan obat AINS dalam jangka waktu tertentu dapat menimbulkan efek samping. Penggunaan bahan herbal sebagai alternatif obat anti-inflamasi mulai dikembangkan, salah satunya adalah flavonoid daun tembakau kasturi.

Ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi diperoleh dengan menggunakan metode hidrolisis dan refluks. Proses isolasi hPBMC dilakukan dengan cara sentrifugasi gradien menggunakan *ficoll paque*. Jumlah sel yang digunakan adalah 1×10^5 cell/well yang didistribusikan ke dalam 96 well-plate (3 plate) dan diinkubasi ke dalam inkubator CO₂ 5%, 37°C selama 24 jam. hPBMC dipapar lipopolisakarida *Porphyromonas gingivalis* dengan konsentrasi 10 µg/ml. Ekstrak flavonoid sebanyak 100 µl ditambahkan pada kelompok penelitian dengan konsentrasi 640 µg/ml, 320 µg/ml, 80 µg/ml, 40 µg/ml, 20 µg/ml, 10 µg/ml, dan 2,5 µg/ml. Kelompok kontrol hanya berisi lipopolisakarida dan tidak diberi ekstrak flavonoid. Selanjutnya dilakukan inkubasi selama 24 jam, 48 jam, dan 72 jam. Uji kadar COX-2 dilakukan dengan metode ELISA dengan panjang gelombang 450 nm.

Hasil penelitian ini menunjukkan adanya perubahan kadar COX-2 pada hPBMC yang dipapar lipopolisakarida dan diberi ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi dengan berbagai konsentrasi (640 µg/ml, 320 µg/ml, 80 µg/ml, 40 µg/ml, 20 µg/ml, 10 µg/ml, dan 2,5 µg/ml) selama 24, 48, dan 72 jam. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak flavonoid kemungkinan mempunyai aktivitas anti-inflamasi kurang dari 24 jam yang ditunjukkan dengan penurunan ekspresi COX-2. Kemampuan flavonoid dalam menghambat ekspresi COX-2 pada hPBMC kemungkinan dapat terjadi melalui dua jalur, yaitu jalur *Nuclear Factor Kappa-B* (NF-κB) dan jalur *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs). Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi dengan berbagai konsentrasi dapat menghambat ekspresi COX-2 pada hPBMC yang dipapar lipopolisakarida *Porphyromonas gingivalis*, terutama selama masa inkubasi 24 jam dengan konsentrasi optimal adalah konsentrasi 640 µg/ml dan 320 µg/ml.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengaruh Ekstrak Flavonoid Daun Tembakau Kasturi terhadap Kadar *Cyclooxygenase-2* pada *Human Peripheral Blood Mononuclear Cell* yang Dipapar Lipopolisakarida *Porphyromonas gingivalis*”. 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 tua terkasih; Ayah Moch Basar dan Mama Ni Made Wahyu Sastriani, yang selalu mencurahkan kasih sayangnya kepada saya;
2. drg. Rahardyan Parnaadji, M. Kes., Sp. Pros sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
3. Dr. drg. Banun Kusumawardani, M. Kes dan drg. Agustin Wulan Suci D., MDSc selaku dosen pembimbing skripsi yang telah banyak meluangkan waktunya untuk memberikan bimbingan, saran, nasihat dan motivasi sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
4. drg. Dwi Merry Christmarini Robin, M. Kes dan drg. Yenny Yustisia, M. Biotech selaku dosen penguji skripsi yang telah memberikan kritik dan saran dalam penulisan skripsi ini;
5. drg. Nadie Fatimatuzzahro, MD.Sc sebagai dosen pembimbing akademik yang telah memberikan saran, motivasi dan bimbingan selama ini;
6. Ibu Rumbiwati, M.Sc selaku teknisi Laboratorium Parasitologi FK UGM yang telah membantu penelitian ini;
7. Tim Penelitian PKM-P 2016 Nancy, Dito, Agis, Iga, Putu, Kartika, Karel, Fergy, Idris, dan Sakti;
8. Jagoanku tercinta Ahmad Hifdi Bayu Pramana dan Ahmad Yusuf Firmasnyah yang selalu memberikan doa, semangat, dan senantiasa menghibur saya;

9. Saudara sepupu saya Agus Budiharto dan Almh. Lailatul Rif'ah Hidayati yang telah memberikan dukungan moral dan materiil kepada saya;
10. Keluarga besar Bani H. Ahmad Dimyati dan keluarga besar Drs. I Wayan Astudi Arya Kutawaringin atas doa dan dukungannya;
11. Sahabatku tercinta Hanifah Nailul Amania dan Erlita Prestiandari yang selalu ada disaat suka maupun duka;
12. Teman "Cost" Anindhita Virliana, Yunita Fatma, Arimbi Gupitasari, dan Aisha Rahma yang merupakan keluarga kedua saya di Jember;
13. Teman-teman terkasih Najla, Indra, Evi, Bangun, Paramita, dan Mbak Navira;
14. Teman-teman "LECI" FKG 2014;
15. Staff Laboratorium Farmasi, dan Laboratorium Parasitologi FK UGM;
16. Staff Akademik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
17. 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, Juli 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	vi
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
DAFTAR RINGKASAN.....	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Tembakau.....	5
2.1.1 Morfologi Tembakau	5
2.1.2 Kandungan Daun Tembakau.....	6
2.2 Tembakau Kasturi	7
2.3 Flavonoid	9
2.4 Flavonoid Tembakau	11
2.5 Inflamasi.....	13
2.6 Nuclear Factor Kappa-B (NF-κB).....	14
2.7 Cyclooxygenase-2	14

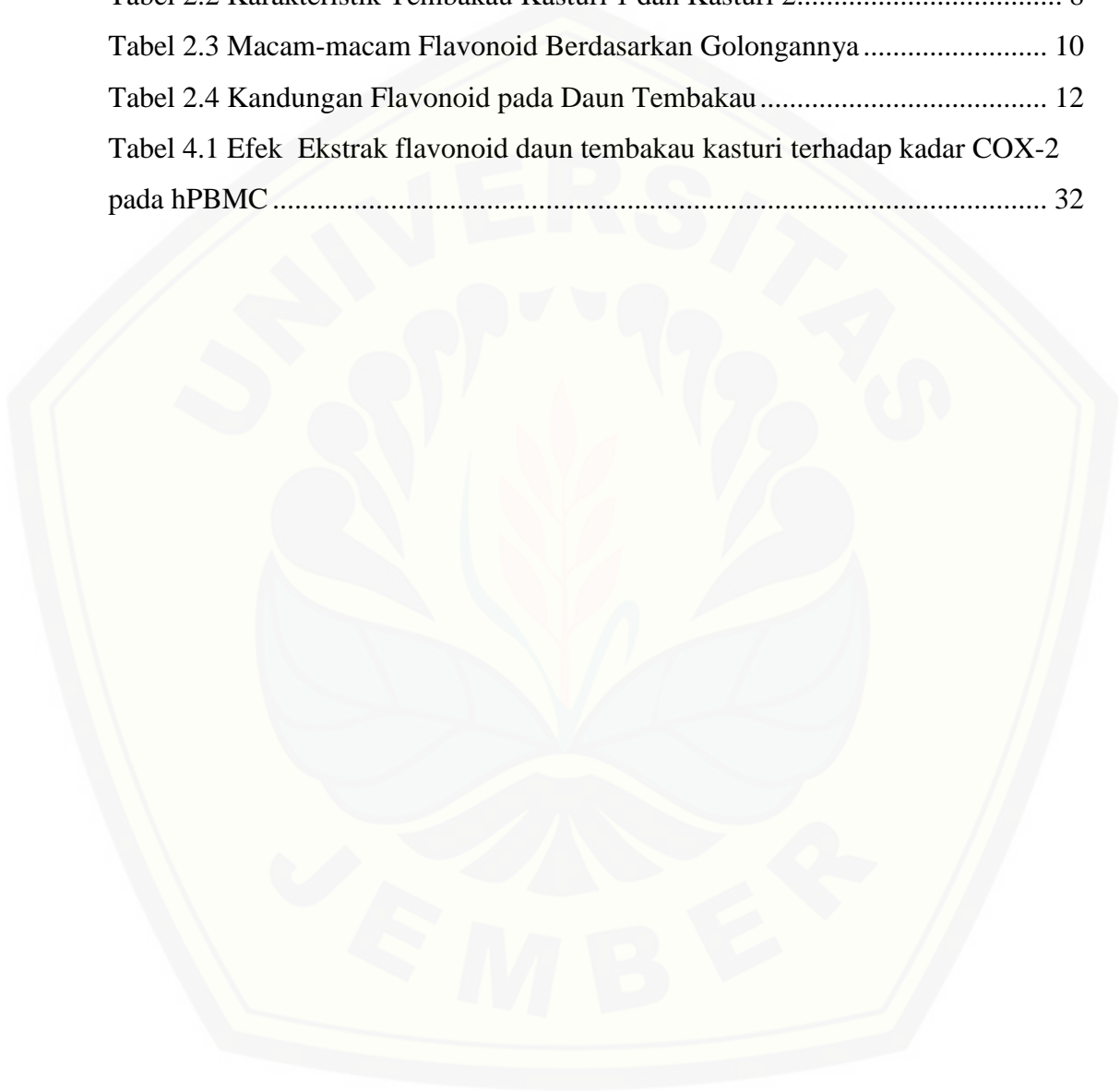
2.8	<i>Human Peripheral Blood Mononuclear Cell (hPBMC)</i>	15
2.9	Lipopolisakarida <i>Porphyromonas gingivalis</i>	16
2.10	Kerangka Konseptual	18
2.11	Hipotesis	20
BAB 3. METODE PENELITIAN		21
3.1	Jenis dan Rancangan Penelitian	21
3.2	Tempat Penelitian	21
3.3	Waktu Penelitian	21
3.4	Variabel Penelitian	21
3.5	Definisi Operasional	22
3.6	Pengelompokkan Sampel Penelitian	22
3.7	Alat dan Bahan Penelitian	23
3.7.1	Alat penelitian	23
3.7.2	Bahan penelitian	24
3.8	Prosedur Penelitian	25
3.8.1	Tahap Persiapan	25
3.8.2	Prosedur Ekstraksi Flavonoid Daun Tembakau Kasturi	25
3.8.3	Pengenceran Ekstrak kasturi Daun Tembakau Kasturi	26
3.8.4	Prosedur Pengambilan Sampel	27
3.8.5	Isolasi hPBMC	28
3.8.6	Prosedur Penghitungan Sel	28
3.8.7	Pemaparan Lipopolisakarida	29
3.8.8	Inkubasi Flavonoid pada hPBMC	29
3.8.9	Uji Kadar COX-2 dengan Metode ELISA	29
3.9	Analisis data	30
3.10	Alur Penelitian	31
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN		32
4.1	Hasil	32
4.2	Analisis Data	34
4.3	Pembahasan	34
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN		38

5.1 Kesimpulan	38
5.2 Saran.....	38
DAFTAR PUSTAKA.....	39
LAMPIRAN.....	47



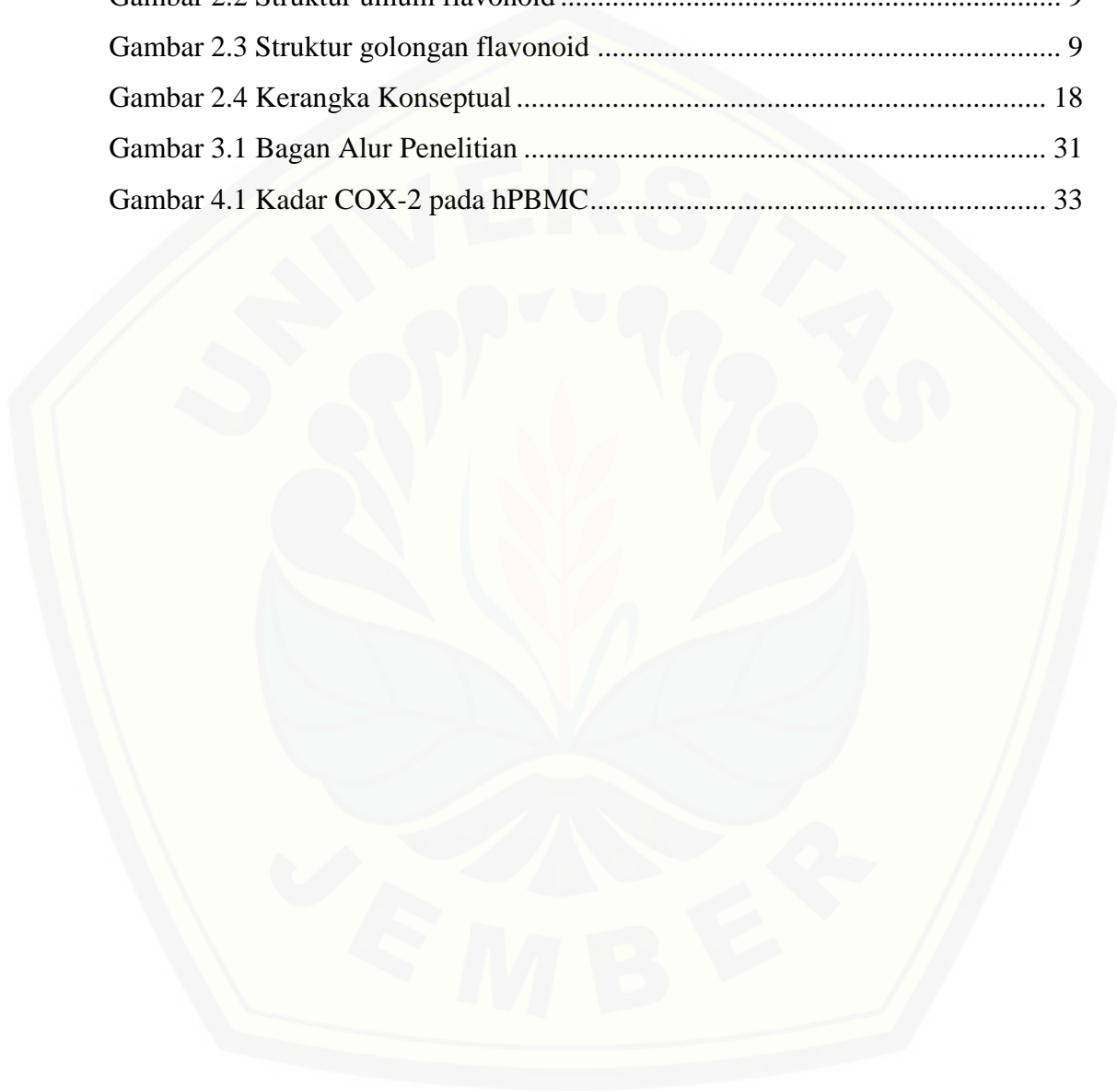
DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Kandungan Daun Tembakau menurut Podlejski dan Olejniczak	7
Tabel 2.2 Karakteristik Tembakau Kasturi 1 dan Kasturi 2.....	8
Tabel 2.3 Macam-macam Flavonoid Berdasarkan Golongannya	10
Tabel 2.4 Kandungan Flavonoid pada Daun Tembakau	12
Tabel 4.1 Efek Ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi terhadap kadar COX-2 pada hPBMK	32



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Tembakau Kasturi 1 dan 2	8
Gambar 2.2 Struktur umum flavonoid	9
Gambar 2.3 Struktur golongan flavonoid	9
Gambar 2.4 Kerangka Konseptual	18
Gambar 3.1 Bagan Alur Penelitian	31
Gambar 4.1 Kadar COX-2 pada hPBMC.....	33



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran A. Surat Keterangan Identifikasi Daun Tembakau.....	47
Lampiran B. Surat Keterangan <i>Ethical Clearance</i>	48
Lampiran C. Hasil Analisis Data	49
Lampiran C.1. Hasil Uji Regresi Linier Sederhana	49
Lampiran C.2. Hasil Uji Pearson	50
Lampiran D. <i>Informed Consent</i>	53
Lampiran E. Alat dan Bahan Penelitian	57
Lampiran F. Prosedur Penelitian.....	62

DAFTAR SINGKATAN

TLR4	: <i>Toll-like receptors 4</i>
hPBMC	: <i>human Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
COX-2	: <i>Cyclooxygenase-2</i>
PGE ₂	: <i>Prostaglandin E₂</i>
TXA ₂	: <i>Tromboksan A₂</i>
AINS	: <i>Anti Inflamasi Non Steroid</i>
LPS	: <i>Lipopolisakarida</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
IL-6	: <i>Interleukin-6</i>
IL-1	: <i>Interleukin-1</i>
COX-1	: <i>Cyclooxygenase-1</i>
NF- κ B	: <i>Nuclear Factor kappa-B</i>
I κ B	: <i>Inhibitor kappa-B</i>
IKK	: <i>Inhibitor kappa-B Kinase</i>
MAPKs	: <i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
JNK	: <i>c-Jun N-terminal Kinases</i>
ERK	: <i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Periodontitis merupakan penyakit inflamasi yang mengakibatkan kehilangan gigi. Penyebab utama penyakit ini yaitu adanya injuri biologis periopatogen, salah satunya bakteri *Porphyromonas gingivalis* (Bostanci dan Belibasakis, 2012). *Porphyromonas gingivalis* merupakan bakteri Gram-negatif yang menghasilkan endotoksin berupa lipopolisakarida. Lipopolisakarida merupakan komplek senyawa lipid dan polisakarida penyusun membran luar bakteri Gram-negatif (Wang dan Quinn, 2010). Lipopolisakarida akan memicu respon inflamasi intraseluler melalui ikatan antara lipopolisakarida dengan *Toll-like receptors 4* (TLR4) pada permukaan sel mononuklear (Nijland dkk., 2014).

Sel darah mononuklear merupakan sel-sel darah putih berinti bulat dan tunggal yang dapat diisolasi dari darah perifer manusia yang dikenal dengan *human peripheral blood mononuclear cells* (hPBMC). hPBMC terdiri atas sel monosit dan limfosit yang terlibat dalam sistem imunitas seluler (Kleiveland, 2015). Selain itu, sel-sel tersebut dapat menghasilkan enzim *Cyclooxygenase* (COX) yang berperan penting pada proses metabolisme asam arakidonat untuk menghasilkan mediator inflamasi, terutama COX-2 (Rouzer dan Marnett, 2009; Mohale dkk., 2014).

Cyclooxygenase-2 (COX-2) merupakan salah satu isoform yang bertanggung jawab dalam sintesis mediator inflamasi seperti Prostaglandin E₂ (PGE₂) dan Tromboksan A₂ (TXA₂) dari asam arakidonat membran sel pada kondisi patofisiologi seperti inflamasi. Ekspresi enzim ini akan meningkat apabila mendapatkan stimulus inflamasi seperti lipopolisakarida, sitokin pro-inflamatori, *growth factor*, dan trauma mekanis, sehingga akan menyebabkan peningkatan produksi mediator inflamasi. Jika produksi mediator inflamasi terjadi secara terus-menerus, dapat mengakibatkan kerusakan jaringan. Pemberian obat anti-inflamasi, salah satunya obat golongan Anti Inflamasi Non Steroid (AINS) seringkali digunakan untuk mengontrol aktivitas inflamasi (Ricciotti dan FitzGerald, 2011; Marks dkk., 2000; Mohale dkk., 2014).

Obat-obatan golongan AINS diketahui mampu menghambat aktivitas enzim COX-2 dalam mengkonversikan asam arakidonat menjadi prostaglandin (Corwin, 2009; Fajriani, 2008). Namun, penggunaan obat AINS dalam jangka waktu tertentu dapat menimbulkan efek samping, salah satunya berupa perdarahan pada saluran pencernaan (Goldstein dan Cryer, 2015). Oleh sebab itu, penggunaan bahan herbal sebagai alternatif obat anti-inflamasi mulai dikembangkan.

Salah satu hasil perkebunan utama di Kabupaten Jember adalah tembakau kasturi (*Nicotiana tabacum* L.). Saat ini pemanfaatan daun tembakau di Indonesia masih terpusat pada industri rokok dan cerutu (Ardhiarisca dkk., 2015). Produk tembakau terutama rokok menimbulkan dampak negatif bagi kesehatan, seperti kanker, penyakit paru-paru, perubahan warna pada gigi, resesi gingiva, kerusakan jaringan periodontal, dan hilangnya gigi (Fathiazad dkk., 2005). Namun, daun tembakau juga mengandung berbagai senyawa bioaktif yang berlimpah, salah satu senyawa tersebut adalah flavonoid. Jenis flavonoid yang terdapat pada daun tembakau adalah *rutin*, *apigenin*, *quercetin*, dan *kaempferol* (Fathiazad dkk., 2005; Fu dkk., 2016). Kandungan flavonoid pada daun tembakau lebih besar dibandingkan dengan sumber lain, dimana 100 mg daun tembakau kering mengandung $31,09 \pm 3,70$ mg RE/g flavonoid, sedangkan pada 2 g daun teh mengandung $5,40 \pm 0,72$ mg RE/g flavonoid dan 0,5 g bunga jeruk mengandung $3,83 \pm 0,05$ mg RE/g (Gonbad dkk., 2016; Karimi dkk., 2012; Wang dkk., 2016).

Flavonoid merupakan kelompok senyawa polifenol yang diketahui memiliki aktivitas biologis maupun farmakologis yang bermanfaat bagi kesehatan manusia, antara lain bersifat antibakteri, antikarsinogen, dan antioksidan (Zhu dkk., 2013; Ru dkk., 2012; Fatimah, 2016). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi daun tembakau konsentrasi 320 $\mu\text{g/ml}$, 160 $\mu\text{g/ml}$, dan 80 $\mu\text{g/ml}$ daun mempunyai daya antibakteri yang kuat terhadap bakteri *Porphyromonas gingivalis* (Fatimah, 2016), dan konsentrasi 640 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$, dan 2,5 $\mu\text{g/ml}$ dapat menghambat ekspresi TLR4 (Sonia, 2017). Selain itu, ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi konsentrasi 1,25 $\mu\text{g/ml}$, 2,5 $\mu\text{g/ml}$, 80 $\mu\text{g/ml}$, dan 320 $\mu\text{g/ml}$ mempunyai bioavailabilitas yang baik terhadap kultur sel fibroblas gingiva manusia (Rizky, 2016).

Berdasarkan latar belakang tersebut, penulis ingin meneliti pengaruh ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi (*Nicotiana tabacum* L.) terhadap kadar COX-2 pada *human peripheral blood mononuclear cell* (hPBMC) yang dipapar lipopolisakarida *Porphyromonas gingivalis*. Adapun konsentrasi flavonoid yang digunakan pada penelitian ini adalah 640 µg/ml, 320 µg/ml, 80 µg/ml, 40 µg/ml, 20 µg/ml, 10 µg/ml, dan 2,5 µg/ml dengan waktu inkubasi 24 jam, 48 jam dan 72 jam. Pemilihan konsentrasi tersebut didasarkan pada penelitian pendahuluan yang telah dilakukan oleh Rizky (2016), Fatimah (2016), dan Sonia (2017). Hasil penelitian ini diharapkan dapat dimanfaatkan dan dikembangkan sebagai acuan bahan dasar pembuatan obat anti-inflamasi pada penyakit periodontitis.

1.2 Rumusan Masalah

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

- a. Bagaimana pengaruh ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi (*Nicotiana tabacum* L.) terhadap kadar COX-2 pada hPBMC yang dipapar lipopolisakarida *Porphyromonas gingivalis*?
- b. Berapa konsentrasi optimal ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi (*Nicotiana tabacum* L.) terhadap kadar COX-2 pada hPBMC yang dipapar lipopolisakarida *Porphyromonas gingivalis*?

1.3 Tujuan Penelitian

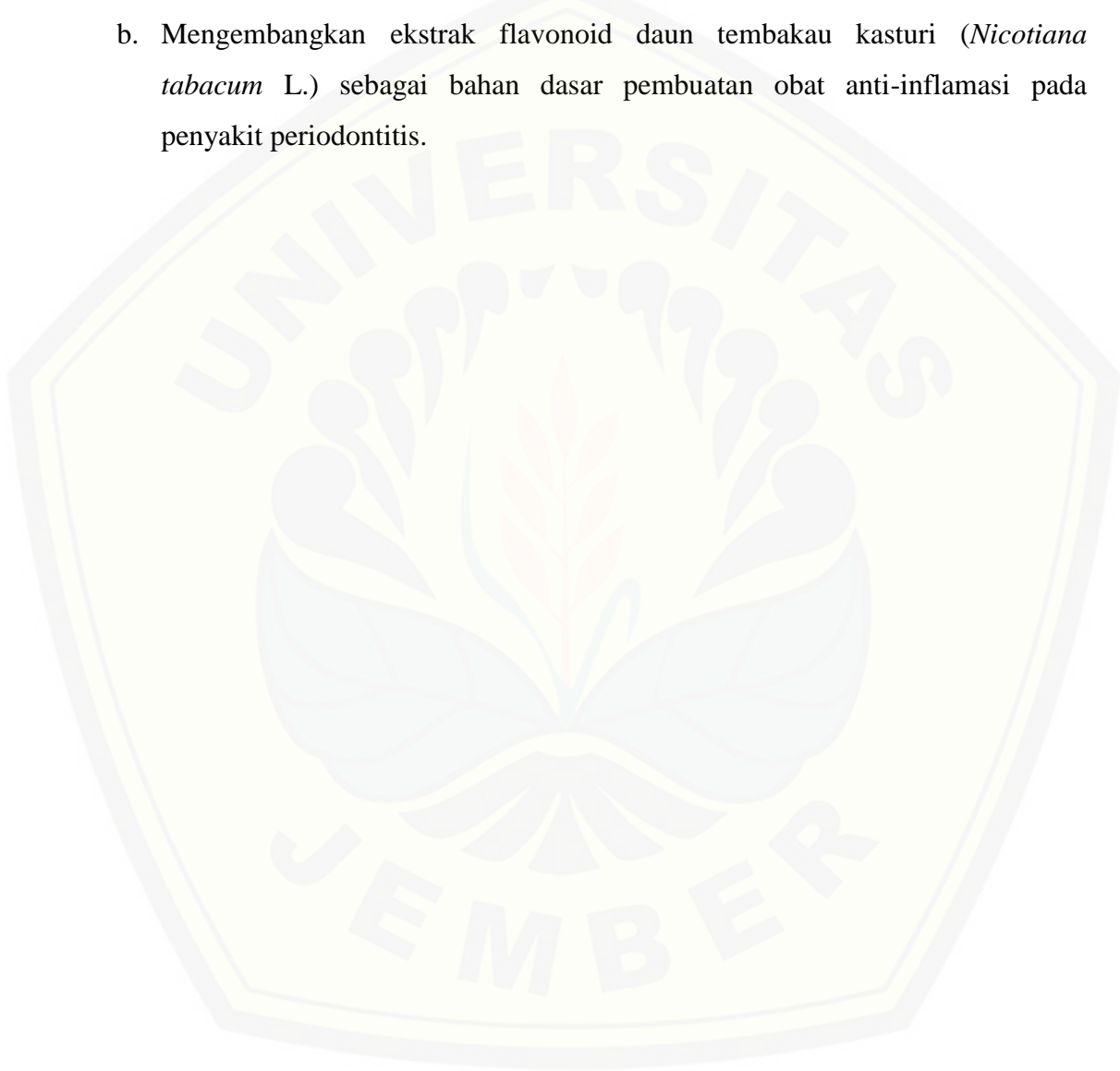
Penelitian ini bertujuan untuk:

- a. Mengkaji pengaruh ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi daun tembakau kasturi (*Nicotiana tabacum* L.) terhadap kadar COX-2 pada hPBMC yang dipapar lipopolisakarida *Porphyromonas gingivalis*.
- b. Menetapkan konsentrasi optimal ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi (*Nicotiana tabacum* L.) terhadap kadar COX-2 pada hPBMC yang dipapar lipopolisakarida *Porphyromonas gingivalis*.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah:

- a. Memberikan pengetahuan tentang pengaruh ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi (*Nicotiana tabacum L.*) terhadap kadar COX-2 pada hPBMC yang dipapar lipopolisakarida *Porphyromonas gingivalis*.
- b. Mengembangkan ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi (*Nicotiana tabacum L.*) sebagai bahan dasar pembuatan obat anti-inflamasi pada penyakit periodontitis.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tembakau

Tembakau adalah tanaman musiman yang tergolong dalam tanaman perkebunan yang diproses dari daun tanaman. Tembakau biasanya dikonsumsi sebagai rokok dan tembakau kunyah (Nitasari, 2010; Susilowati, 2006).

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

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

2.1.1 Morfologi Tembakau

a. Bagian Akar

Tanaman tembakau merupakan tanaman yang berakar tunggang. Akar tunggangnya dapat menembus ke dalam tanah sampai kedalaman 50 cm – 75 cm. Selain akar tunggang, tembakau juga memiliki akar serabut yang menyebar ke samping serta memiliki bulu-bulu akar. Fungsi akar adalah untuk memperkokoh tanaman, penyerapan zat-zat hara (makanan), dan air dari dalam tanah (Cahyono, 1998).

b. Bagian Batang

Batang tanaman tembakau berbentuk agak bulat dengan diameter batang sekitar 5 cm, semakin ke ujung semakin kecil. Batang tanaman tidak bercabang atau sedikit bercabang. Ruas-ruas batang yang ditumbuhi daun mengalami

penebalan. Pada setiap ruas batang selain ditumbuhi daun juga ditumbuhi tunas yang disebut tunas ketiak daun (Cahyono, 1998).

c. Bagian Daun

Daun tembakau berbentuk bulat lonjong (oval) atau bulat, tergantung pada varietasnya. Daun yang berbentuk bulat lonjong ujungnya meruncing, sedangkan yang berbentuk bulat ujungnya tumpul. Daun memiliki tulang daun yang menyirip; bagian tepi daun agak bergelombang dan licin. Ukuran daun (lebar dan panjangnya) bervariasi, tergantung pada varietas dan lingkungan tumbuhnya. Ketebalan daunnya juga berbeda-beda, tergantung pada varietas dan cara budi daya (Cahyono, 1998). Jumlah daun yang dapat dimanfaatkan (dipetik) dalam setiap batangnya mencapai 32 helai daun (Matnawi, 1997).

d. Bagian Bunga

Bunga tanaman tembakau merupakan bunga majemuk yang tersusun dalam beberapa tandan berisi sampai 15 bunga. Bunga berbentuk seperti terompet dan panjang. Warna bunga merah jambu sampai merah tua pada bagian atasnya, sedangkan bagian lain berwarna putih (Cahyono, 1998).

e. Bagian Buah

Bakal buah berada di atas dasar bunga, berbentuk lonjong dan bergerigi. Bakal buah akan tumbuh menjadi buah setelah terjadi penyerbukan. Buah tembakau berbentuk bulat lonjong dan berukuran kecil, di dalamnya banyak berisi biji yang bobotnya sangat ringan (Cahyono, 1998). Setiap pertumbuhan yang normal, dalam satu tanaman terdapat ± 300 buah dan setiap buahnya berisi biji-biji sebanyak ± 2.500 butir (Matnawi, 1997).

2.1.2 Kandungan Daun Tembakau

Daun tembakau mengandung berbagai senyawa bioaktif yang berlimpah seperti, flavonoid, polifenol, dan alkaloid (Fathiazad dkk., 2005 dan Ru dkk., 2012). Kandungan flavonoid pada 100 mg daun tembakau kering adalah sebesar $31,09 \pm 3,70$ mg RE/g flavonoid (Wang dkk., 2016). Selain itu daun tembakau juga mengandung nikotin dengan kadar rendah (min n 0,6%) (Santoso, 2013). Hasil penelitian pendahuluan Kusumawardani (2016) menunjukkan bahwa

limbah daun tembakau kasturi mengandung nikotin dengan kadar rendah yaitu kurang dari 0,1 µg/g. Kandungan lain yang terdapat dalam daun tembakau dijelaskan pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1. Kandungan Daun Tembakau menurut Podlejski dan Olejniczak

Komponen	Komposisi (%bk)
Total Nitrogen	2,20
Protein nitrogen (nitrogen)	1,58
Nikotin	0,67
Nitrogen dari asam α-amino	0,30
Air terlarut karbohidrat	25,9
Selulosa	12,3
Pektin	13,4
<i>Polypentose</i>	4,90
Minyak atsiri	0,13
Resin yang diekstrak menggunakan benzena	7,42
Resin yang diekstrak menggunakan petrolum eter	6,20
<i>Polyphenol</i>	4,39
Asetaldehid	0,26
Asam organik	9,12
a. Asam oksalat	2,18
b. Asam sitrat	1,27
c. Asam hidroksi	4,57
d. Asam volatil	1,12
pH dari air yang terekstrak	5,54
Abu	15,4

Sumber: Rusli dkk., 2011.

2.2 Tembakau Kasturi

Tembakau Kasturi adalah tanaman tembakau yang banyak diproduksi di Kabupaten Jember. Tembakau kasturi merupakan tanaman tembakau yang ditanam pada musim hujan dan dipanen pada musim kemarau, dikenal dengan tembakau *Voor-Oogst*. Tembakau kasturi termasuk tipe tembakau *sun cured* karena dikeringkan dengan sinar matahari dalam bentuk lembaran serta difermentasi. Tembakau tersebut digunakan sebagai bahan baku rokok kretek (Santoso, 2013).

Varietas tembakau kasturi yang ditanam oleh petani adalah Marakot, Jimahmud, dan Baleno. Pada tahun 2007, *Indonesia Sweetener and Fiber Crops*

Research Institute (ISFCRI) telah mengesahkan varietas baru dari tembakau kasturi (Djajadi, 2015). Berdasarkan SK Mentan No: 132/Kpts/SR.120/2/2007 dan No: 133/Kpts/SR.120/2/2007 varietas baru tembakau kasturi terdiri atas Kasturi 1 dan Kasturi 2 (Gambar 2.1) (Balittas, 2014). Karakteristik kedua varietas tersebut dijelaskan pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2. Karakteristik Tembakau Kasturi 1 dan Kasturi 2

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

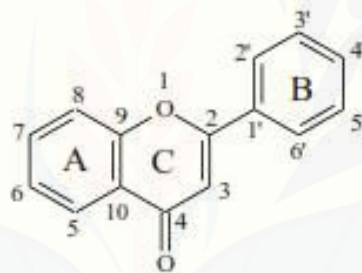
Sumber : <http://balittas.litbang.pertanian.go.id>



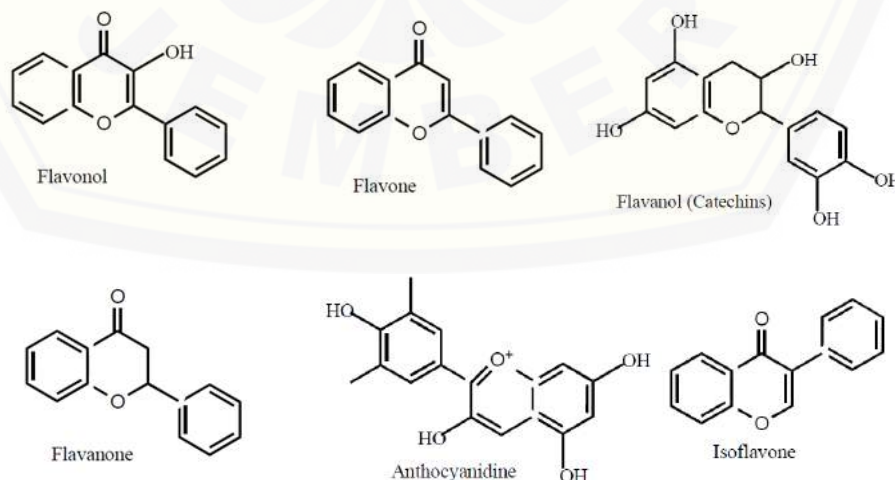
Gambar 2.1 Tembakau Kasturi 1 dan 2 (Sumber : Djajadi, 2015)

2.3 Flavonoid

Flavonoid merupakan golongan senyawa yang memiliki struktur kerangka dasar C₆–C₃–C₆. Setiap bagian C₆ merupakan cincin benzena yang dihubungkan dengan tiga atom karbon (C₃) yang merupakan rantai alifatik yang dapat pula membentuk cincin ketiga (Sabir, 2003). Struktur umum flavonoid dapat dilihat pada Gambar 2.2. Flavonoid dikelompokkan menjadi 6 golongan, yaitu: flavon, isoflavon, flavanon, flavonol, flavanol, dan antosianidin (Gambar 2.3) (Rathee dkk., 2009). Penggolongan flavonoid ini berdasarkan pada perbedaan struktur kimianya, yaitu perbedaan substituen cincin heterosiklik yang mengandung oksigen dan perbedaan distribusi gugus hidroksil. Sebaliknya, perbedaan oksigenasi pada atom C₃ menentukan sifat, khasiat, dan tipe/golongan flavonoid. Saat ini, lebih dari 4.000 flavonoid telah diidentifikasi pada tumbuhan tingkat tinggi dan rendah (Sabir, 2003).



Gambar 2.2 Struktur umum flavonoid dengan dua cincin benzena (A dan B), dihubungkan melalui cincin pirin heterosiklik (C) (Sumber : Sabir, 2003)



Gambar 2.3 Struktur golongan flavonoid (Sumber : Rathee dkk., 2009)

Tabel 2.3. Macam-macam Flavonoid Berdasarkan Golongannya

Golongan Flavonoid	Macam-macam Flavonoid
Flavon	<i>Flavone, Acacetin, Luteolin, dan Chrysin</i>
Flavonol	<i>Kaempferol, Rhamnetin, Isorhamnetin, Morin, Myricetin, Quercetin, Quercitrin, dan Rutin</i>
Flavanon	<i>Naringenin, Naringin, dan Taxifolin</i>
Antosianidin	<i>Pelargonidin, Cyanidin, Malvidin, Delphinidin, dan Pelargonidin</i>
Isoflavon	<i>Daidzein, Genistein, dan Genistin</i>
Flavan-3-ol	<i>Catechin, Epicatechin, Epicatechin gallate (ECG), Epigallocatechin gallate (EGCG), Procyanidin B1, dan Procyanidin B2</i>

Sumber: Bellik dkk., 2013; Hämäläinen dkk., 2011

Flavonoid merupakan kelompok senyawa polifenol yang diketahui memiliki aktivitas biologis maupun farmakologis yang bermanfaat bagi kesehatan manusia, antara lain bersifat antimikroba, antikarsinogen, anti-inflamasi, dan antioksidan. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi konsentrasi 320 µg/ml, 160 µg/ml, dan 80 µg/ml mempunyai daya antimikroba terhadap bakteri *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, dan jamur *Candida albicans* (Fatimah, 2016). Flavonoid *casticin* dan *chrysoptanol* efektif menghambat mediator angiogenesis yang berperan penting dalam pertumbuhan tumor (Zhu dkk., 2013). Flavonoid sebagai anti-inflamasi diketahui mampu menghambat beberapa enzim yang diaktifkan selama proses inflamasi seperti COX-2. Hal ini dibuktikan oleh Hämäläinen dkk., (2011) melalui penelitiannya yang menyatakan bahwa flavonoid yaitu *flavone*, *isorhamnetin*, *daidzein*, dan *genistein* secara signifikan mampu menghambat ekspresi COX-2 pada makrofag teraktivasi yang dipicu lipopolisakarida. Sementara itu, Ru dkk., (2012) menyatakan bahwa flavonoid pada daun tembakau

efektif pada *scavenging* radikal bebas dan memiliki potensi menjadi antioksidan kuat.

Pemanfaatan flavonoid di beberapa disiplin ilmu kedokteran gigi masih terus diteliti. Flavonoid diketahui berperan dalam mempercepat proses penyembuhan luka pasca pencabutan gigi dengan cara meningkatkan atau mempercepat proliferasi sel fibroblas dan produksi serabut kolagen. Selain itu, aplikasi flavonoid juga dapat mengurangi rasa sakit yang timbul pasca ekstraksi gigi dengan cara menghambat jalur *cyclooxygenase* dan fosfolipase A₂ sehingga sintesis prostaglandin akan berkurang (Sabir, 2003). Flavonoid juga berpotensi sebagai terapi pada penyakit periodontal. Terapi pada pasien penyakit periodontal dengan kapsul yang mengandung flavonoid terkonsentrasi menunjukkan adanya penurunan *papillary bleeding index* (Nanescu dkk., 2011). Penelitian yang dilakukan oleh Tominari dkk., (2012) juga menunjukkan bahwa flavonoid dapat mengembalikan masa tulang alveolar dengan menghambat resorpsi tulang yang diinduksi oleh lipopolisakarida.

2.4 Flavonoid Tembakau

Fathiazad dkk., (2006) menyebutkan bahwa dalam daun tembakau terdapat tiga jenis utama flavonoid yaitu: *apigenin*, *quercetin*, dan *rutin*. Chen dkk., (2013) menemukan tiga flavonoid baru yaitu: 6,7-dimetoksi-4'-hidroksi-8-formilflavon (1), 8-formil-4',6,7-trimetoksiflavon (2), dan 4',7-dihidroksi-8-formil-6-methoxyflavon (3), yang diisolasi dari daun tembakau oriental (varietas *Nicotiana tabacum* L). Penelitian pendahuluan yang dilakukan oleh Kusumawardani (2016) menunjukkan bahwa pada limbah daun tembakau jenis kasturi mengandung flavonoid yaitu: *quercetin*, *kaempferol*, dan *rutin*. Kandungan flavonoid lain pada daun tembakau terdapat pada Tabel 2.4.

Tabel 2.4. Kandungan Flavonoid pada Daun Tembakau

Flavonoid	Rumus Molekul
<i>Kaemferol</i>	$C_{15}H_{10}O_6$
<i>Isokaemferide</i>	$C_{16}H_{12}O_6$
<i>Quercetin 3-methyl ether</i>	$C_{16}H_{12}O_7$
<i>5,7-Di-O-methylquercetin</i>	$C_{17}H_{14}O_7$
<i>Astragalin</i>	$C_{21}H_{20}O_{11}$
<i>Isoquercetin</i>	$C_{21}H_{20}O_{12}$
<i>Nicotiflorin</i>	$C_{27}H_{30}O_{15}$
<i>Rutin</i>	$C_{27}H_{30}O_{16}$
<i>6-Hydroxy-rutin</i>	$C_{27}H_{30}O_{17}$
<i>Cyanidin 3-O-rutinoside chloride</i>	$C_{27}H_{31}O_{15}Cl$
<i>Kaemferol 3-O-rhamnopyranosyl(1-2)-β-galactopyranoside-7-O-β-glucopyranoside</i>	$C_{33}H_{40}O_{20}$
<i>Quercetin-3,7-rutinosogalactoside</i>	$C_{33}H_{40}O_{21}$

Sumber: Fu dkk, 2016

Flavonoid tembakau juga diketahui memiliki aktivitas biologis seperti antibakteri, antioksidan, dan anti jamur. Wang dkk., (2008) dalam penelitiannya melaporkan bahwa kandungan polifenol yang banyak terdapat pada daun tembakau adalah asam klorogenik dan *rutin*. Kedua polifenol tersebut memiliki aktivitas antioksidan dan aktivitas antimikroba yang baik terhadap bakteri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Bacillus subtilis*. Penelitian yang dilakukan oleh Dubey dkk., (2013) juga menunjukkan bahwa flavonoid *rutin* dari daun tembakau memiliki aktivitas anti jamur terhadap *Pseudomonas aurigenosa* dan *Candida albicans*, serta memiliki aktivitas antibakteri yang baik terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella oxytoca*, *Bacillus subtilis*, dan *Escherichia coli*. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi konsentrasi 320 $\mu\text{g/ml}$, 160 $\mu\text{g/ml}$, dan 80 $\mu\text{g/ml}$ mempunyai daya antimikroba terhadap bakteri *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, dan jamur *Candida albicans* (Fatimah, 2016). Ekstrak etanol daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) efektif sebagai antibakteri terhadap bakteri *Porphyromonas gingivalis* (Putri, 2015). Penelitian pendahuluan yang telah dilakukan oleh Sonia (2017), menunjukkan bahwa ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi pada konsentrasi 640 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$, dan 2,5 $\mu\text{g/ml}$ dapat

menghambat ekspresi TLR4. Flavonoid juga diketahui memiliki sifat bioavailabilitas yang baik, dimana ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi dengan konsentrasi 1,25 µg/ml, 2,5 µg/ml, 80 µg/ml, dan 320 µg/ml tidak bersifat toksik terhadap kultur sel fibroblas gingiva manusia (Rizky, 2016).

2.5 Inflamasi

Inflamasi merupakan suatu respon imun dan fisiologis tubuh akibat adanya invasi patogen ataupun cedera sel (Kang dkk., 2011). Respon inflamasi tersebut dapat disebabkan oleh kehadiran beragam zat, seperti bakteri, jamur dan virus, trauma, dan senyawa toksik (polutan) (Lopez dkk., 2016). Terdapat dua stadium yang terjadi selama proses inflamasi, yaitu stadium inflamasi vaskular dan stadium inflamasi seluler (Corwin, 2009).

Perubahan pada stadium vaskular meliputi vasokonstriksi sementara sebagai respon terhadap cedera, diikuti dengan vasodilatasi dan peningkatan aliran darah ke daerah yang mengalami cedera sehingga mengakibatkan panas dan kemerahan. Bersamaan dengan itu, pelepasan histamin oleh sel-sel mast menyebabkan peningkatan permeabilitas kapiler yang selanjutnya meningkatkan perpindahan filtrat plasma ke dalam ruang interstisium. Hal ini menyebabkan terjadinya edema (Price, 2005; Corwin, 2009).

Respon inflamasi juga melibatkan pengaktifan beberapa komponen seluler seperti neutrofil, makrofag, monosit, dan limfosit. Makrofag dan monosit dapat diaktifkan melalui pengenalan endotoksin bakteri patogen, yaitu lipopolisakarida (LPS) bakteri, oleh *Toll-like receptors 4* (TLR4) (Nijland dkk., 2014). Sel-sel tersebut akan mengeluarkan sejumlah besar mediator vasoaktif seperti tromboksan dan prostaglandin, serta sitokin pro-inflamatori yaitu, *tumor necrosis factor-α* (TNF-α), *interleukin-6* (IL-6), dan *interleukin-1* (IL-1). Adanya endotoksin berupa lipopolisakarida dan sitokin pro-inflamatori akan merangsang pembentukan mediator inflamasi melalui jalur *Cyclooxygenase* (COX) (Baratawidjaja, 2013; Corwin, 2009).

Membran sel tersusun atas membran fosfolipid bilayer yang mengandung asam lemak berupa asam arakidonat. Adanya stimulus inflamasi akan

menyebabkan pengaktifkan enzim fosfolipase A₂ yang menyebabkan pelepasan asam arakidonat dari membran sel ke dalam sitosol. Asam arakidonat akan diubah menjadi prostaglandin E₂ (PGE₂) dan tromboksan A₂ (TXA₂) dengan bantuan enzim *Cyclooxygenase* (COX) (Marks dkk., 2000; Corwin, 2009).

Terdapat dua jenis COX yaitu, COX-1 dan COX-2. COX-1 secara terus-menerus diekspresikan pada kebanyakan sel yang berfungsi untuk menghasilkan PGE₂ dan TXA₂ untuk mempertahankan fungsi fisiologis seperti melindungi lapisan mukosa gastrointestinal, mengatur keseimbangan air atau elektrolit, dan integritas fungsi trombosit. COX-2 tidak terekspresikan pada kebanyakan jaringan, namun ekspresinya diinduksi oleh stimulus inflamasi (Mohale dkk., 2014; Murphy, 2006; Ricciotti dan FitzGerald, 2011).

2.6 Nuclear Factor Kappa-B (NF-κB)

NF-κB merupakan faktor transkripsi penting dalam mengekspresikan gen yang terlibat pada proses inflamasi. NF-κB biasanya terdiri atas dua sub unit yang dinamai p50 dan p65. Secara normal, NF-κB berada di dalam sitoplasma berupa suatu kompleks inaktif berikatan dengan protein inhibitor yang disebut IκB. Berbagai rangsangan Produk bakteri Gram-negatif berupa lipopolisakarida akan menyebabkan pengaktifan IκB kinase (IKK) sitoplasma yang akan memfosforilasi dan mendegradasi kompleks ikatan NF-κB dengan IκB. Akibatnya, heterodimer NF-κB (p50/p65) akan bertranslokasi dari sitoplasma ke dalam inti sel. Selanjutnya di dalam inti sel, sub unit p50/p65 akan berikatan dengan sejumlah promotor gen dan mengaktifkan transkripsi gen target yang terlibat dalam respon inflamasi, seperti iNOS, COX-2, dan berbagai sitokin proinflamasi, seperti IL-6, IL-1, dan TNF-α (Kang dkk, 2011; Murray dkk, 2009).

2.7 Cyclooxygenase-2

COX-2 merupakan enzim yang berperan dalam metabolisme asam arakidonat membran sel. Apabila dalam keadaan normal, enzim ini tidak akan terekspresikan atau terekspresikan dalam keadaan rendah. Ekspresi COX-2 akan meningkat

apabila mendapat stimulus inflamasi seperti lipopolisakarida, sitokin pro-inflamatori, *growth factor*, dan trauma mekanis. Enzim ini berperan dalam proses sintesis PGE₂ dan TXA₂ sebagai mediator inflamasi (Mohale dkk., 2014). PGE₂ berperan dalam meningkatkan aliran darah ke lokasi inflamasi, meningkatkan permeabilitas kapiler, dilatasi vaskuler, dan induksi kemotaksis neutrofil. PGE₂ juga meningkatkan efek histamin yang menyebabkan demam ketika terjadi infeksi dan merangsang reseptor nyeri (Baratawidjaja, 2013; Corwin, 2009). Sementara itu TXA₂ dapat merangsang agregasi trombosit yang dapat memicu terbentuknya trombus (Marks dkk., 2000).

Ketika mendapat stimulus inflamasi, COX-2 akan terekspresikan oleh suatu sel dengan kecepatan tertentu. Ekspresi COX-2 juga dapat dipengaruhi oleh kultur sel yang digunakan. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa ekspresi COX-2 pada hPBMC yang di stimulasi lipopolisakarida sudah dapat terdeteksi pada waktu inkubasi kurang dari 24 jam (Lu dan Wahl, 2005; Charoenkij dkk., 2016). Namun, peningkatan ekspresi COX-2 pada hPBMC diduga dapat dipengaruhi oleh respon hPBMC terhadap adanya inflamasi. Hal tersebut diduga dipengaruhi oleh beberapa faktor, baik dari segi pendonor seperti status gizi, hormonal, adanya atau tidaknya infeksi, riwayat penyakit menahun, maupun dari segi sel tersebut seperti: viabilitas sel, komposisi sel, serta kemampuan adhesi dan *spreading* hPBMC. Kemampuan adhesi dan *spreading* hPBMC dipengaruhi oleh beberapa hal yaitu: luas permukaan sel, jumlah dan kepadatan adhesi *site*, dan reseptor pada permukaan sel (Miagkov, 2016; Kleiveland, 2015; Rajaraman dkk., 1977).

2.8 Human Peripheral Blood Mononuclear Cell (hPBMC)

Human Peripheral Blood Mononuclear Cell (hPBMC) merupakan sel-sel darah yang berperan penting dalam sistem kekebalan tubuh untuk melawan infeksi dan beradaptasi dengan benda asing yang masuk ke dalam tubuh. Sel-sel darah ini terdiri atas setiap sel darah yang memiliki inti bulat seperti limfosit dan monosit. Sel-sel darah ini dapat diekstraksi dari darah perifer manusia. HPBMC banyak digunakan dalam penelitian dan aplikasi toksikologi. HPBMC diperoleh

dengan memisahkan sel-sel tersebut dari komponen darah lainnya seperti granulosit, sel darah merah, dan plasma darah dengan metode *density gradient centrifugation* (Pourahmad dan Salimi, 2015; Kleiveland, 2015).

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

Limfosit T menyusun sistem imun seluler. Pematangan sel T berlangsung selama pergerakan melalui kelenjar timus. Seperti sel B, sel T tetap inaktif sampai sel tersebut berhadapan dengan molekul spesifik. Ketika molekul asing muncul, sel T akan aktif dan secara langsung menyerang dan menghancurkan molekul tersebut. Sel T dapat pula melepaskan zat-zat kimia yang mewaspadakan sel B untuk membangkitkan respon humoral. Sel T juga dapat merangsang pelepasan sitokin pro-inflamasi atau anti-inflamasi (Corwin, 2009).

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

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

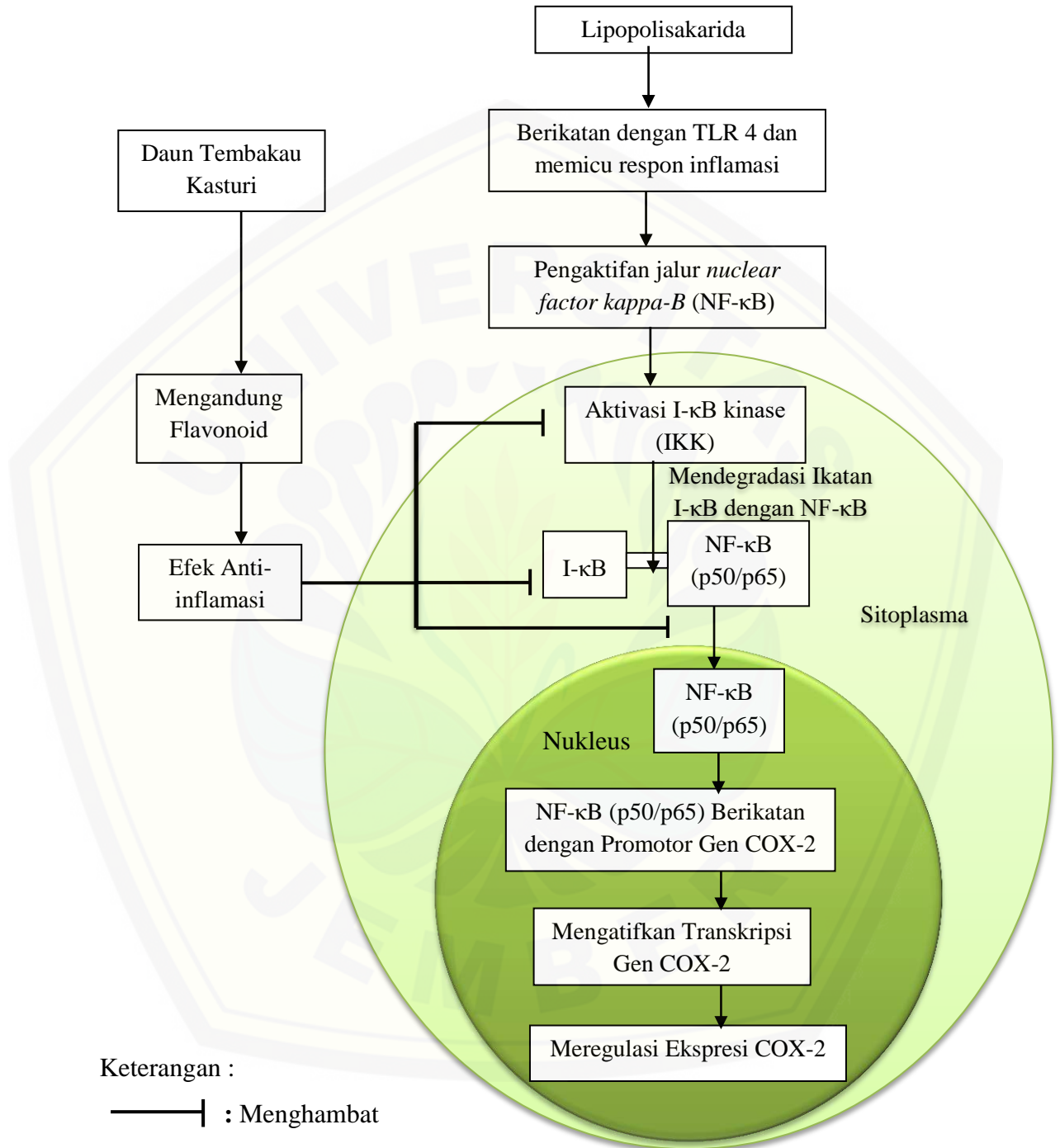
2.9 Lipopolisakarida *Porphyromonas gingivalis*

Porphyromonas gingivalis adalah bakteri Gram-negatif, berpigmen hitam, yang membutuhkan kondisi anaerob untuk tumbuh dan adanya *heme* serta vitamin K sebagai nutrisinya. Bakteri periodontopatik ini ditemukan pada 85,75% sampel plak subgingiva dari pasien dengan periodontitis kronis. Spesies

ini memiliki beberapa faktor virulensi salah satunya adalah endotoksin berupa lipopolisakarida (Bostanci dan Belibasakis, 2012; How, 2016).

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

2.10 Kerangka Konseptual



Gambar 2.4 Kerangka Konseptual

Penjelasan Kerangka Konseptual

Lipopolisakarida (LPS) merupakan endotoksin bakteri Gram-negatif, dapat berikatan dengan *Toll-like receptors 4* (TLR4) pada permukaan sel hPBMC dan memicu respon inflamasi melalui pengaktifan jalur *nuclear factor kappa-B* (NF- κ B). NF- κ B merupakan faktor transkripsi penting dalam mengekspresikan gen yang terlibat dalam proses inflamasi. NF- κ B biasanya terdiri atas dua sub unit yang dinamai p50 dan p65. Secara normal, NF- κ B berada di dalam sitoplasma berupa suatu kompleks inaktif berikatan dengan protein inhibitor yang disebut inhibitor NF- κ B (I κ B). Stimulus inflamasi seperti lipopolisakarida akan berikatan dengan TLR4 pada permukaan sel, sehingga menyebabkan pengaktifan I κ B kinase (IKK) sitoplasma yang akan memfosforilasi dan mendegradasi kompleks ikatan NF- κ B dengan I κ B. Akibatnya, NF- κ B (p50/p65) akan bertranslokasi dari sitoplasma ke dalam nukleus. Selanjutnya di dalam nukleus, sub unit p50/p65 akan berikatan dengan sejumlah promotor gen dan mengaktifkan transkripsi gen target yang terlibat dalam respon inflamasi, salah satunya COX-2.

Daun Tembakau jenis Kasturi diketahui mengandung senyawa bioaktif yang berlimpah salah satunya adalah flavonoid. Flavonoid berpotensi sebagai agen anti-inflamasi yaitu menghambat aktivitas COX-2 dengan menghambat aktivasi IKK, menghambat fosforilasi dan degradasi I κ B, serta mencegah translokasi NF- κ B (p50/p65) ke nukleus.

2.11 Hipotesis

Ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi daun tembakau kasturi (*Nicotiana tabacum* L.) mampu menghambat kadar COX-2 pada *human peripheral blood mononuclear cell* (hPBMC) yang dipapar lipopolisakarida *Porphyromonas gingivalis*.



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

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

3.2 Tempat Penelitian

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

3.3 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2017- Maret 2018.

3.4 Variabel Penelitian

- a. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi daun tembakau kasturi (*Nicotiana tabacum* L) pada konsentrasi 640 µg/ml, 320 µg/ml, 80 µg/ml, 40 µg/ml, 20 µg/ml, 10 µg/ml, dan 2,5 µg/ml.

- b. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar COX-2 pada hPBMC yang telah dipapar lipopolisakarida.

c. Variabel Terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah daun tembakau kasturi yang sesuai kriteria sampel, hPBMC, waktu pengamatan (24 jam, 48 jam, dan 72 jam), suhu inkubasi 37°C, dan paparan lipopolisakarida.

3.5 Definisi Operasional

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

3.6 Pengelompokan Sampel Penelitian

Penelitian ini terdiri atas 8 kelompok penelitian dengan 1 kelompok kontrol dan 7 kelompok perlakuan. Inkubasi dilakukan dalam waktu 24 jam, 48 jam, dan 72 jam pada masing-masing kelompok. Pengelompokan tersebut yaitu:

- a. Kontrol : kelompok kontrol yang berisi media kultur, hPBMC, dan lipopolisakarida,
- b. Konsentrasi 640 µg/ml : kelompok dengan hPBMC kemudian dipapar lipopolisakarida, dan diberi ekstrak flavonoid daun

- tembakau kasturi daun tembakau kasturi dengan konsentrasi 640 $\mu\text{g/ml}$,
- c. Konsentrasi 320 $\mu\text{g/ml}$: kelompok dengan hPBMC kemudian dipapar lipopolisakarida, dan diberi ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi daun tembakau kasturi dengan konsentrasi 320 $\mu\text{g/ml}$,
- d. Konsentrasi 80 $\mu\text{g/ml}$: kelompok dengan hPBMC kemudian dipapar lipopolisakarida, dan diberi ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi daun tembakau kasturi dengan konsentrasi 80 $\mu\text{g/ml}$,
- e. Konsentrasi 40 $\mu\text{g/ml}$: kelompok dengan hPBMC kemudian dipapar lipopolisakarida, dan diberi ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi daun tembakau kasturi dengan konsentrasi 40 $\mu\text{g/ml}$,
- f. Konsentrasi 20 $\mu\text{g/ml}$: kelompok dengan hPBMC kemudian dipapar lipopolisakarida, dan diberi ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi daun tembakau kasturi dengan konsentrasi 20 $\mu\text{g/ml}$,
- g. Konsentrasi 10 $\mu\text{g/ml}$: kelompok dengan hPBMC kemudian dipapar lipopolisakarida, dan diberi ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi daun tembakau kasturi dengan konsentrasi 10 $\mu\text{g/ml}$,
- h. Konsentrasi 2,5 $\mu\text{g/ml}$: kelompok dengan hPBMC kemudian dipapar lipopolisakarida, dan diberi ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi daun tembakau kasturi dengan konsentrasi 2,5 $\mu\text{g/ml}$.

3.7 Alat dan Bahan Penelitian

3.7.1 Alat yang dipakai pada penelitian ini adalah :

1. Timbangan
2. Oven

3. Blender
4. Labu alas bulat
5. *Vacuum filter*
6. Tabung reaksi
7. *Laminar air flow*
8. *Centrifuge*
9. *Handscoon*
10. Masker
11. *Syringe* 10 ml
12. *Vacuette tube* mengandung EDTA 5,4 mg
13. *Torniquet*
14. *Hemacytometer*
15. Mikroskop inverted
16. Inkubator CO₂ 5%
17. Tabung *eppendorf*
18. *Conical tube*
19. *Micropipette*
20. *Multi-channel pipette*
21. *Yellow tip*
22. *Blue tip*
23. Rak *eppendorf*
24. *Shaker*
25. *Counter*
26. *96-well plate*
27. *96- microwell plate* ELISA
28. ELISA kit COX-2
29. ELISA reader

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

1. Daun Tembakau
2. *Ficoll paque*

3. RPMI 1640
4. HCL 1 M (500 ml, 250 ml),
5. Etanol 80%
6. Petroleum eter 50 ml,
7. Acetonitrile 20 ml
8. DMSO (*Dimetil Sulfoxide*) 0,25%
9. Alkohol 70%.

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Tahap Persiapan

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

3.8.2 Prosedur Ekstraksi Flavonoid Daun Tembakau Kasturi

Metode ekstraksi daun tembakau kasturi yang digunakan pada penelitian ini adalah metode modifikasi dari metode hidrolisis dan refluks. Proses mengekstrak diawali dengan menyediakan daun tembakau kasturi segar. Daun tembakau kasturi selanjutnya dicuci bersih dan dikeringkan dengan cara kering angin selama tiga hari pada suhu kamar dan di oven pada suhu 40°-50° C selama 2 hari. Daun tembakau kasturi yang sudah kering dihaluskan menggunakan blender, kemudian ditimbang sebanyak 100 gram dan dimasukkan ke dalam labu alas bulat. Tembakau kasturi tersebut kemudian dilarutkan dalam 500 ml HCL 1 M untuk proses hidrolisis dan di refluks selama 2 jam pada suhu 80° C. Hasil dari refluks disaring menggunakan *vacuum filter*. Bagian yang lolos penyaringan, atau bagian yang lebih kecil molekulnya dibuang. Bahan yang berbentuk padat atau komponen yang lebih besar molekulnya disebut *Slurry*. *Slurry* ditambahkan lagi ke dalam labu alas bulat dan ditambahkan lagi dengan HCL 500 ml serta dilakukan pengadukan. Lakukan penyaringan kembali menggunakan *vacuum filter* dan mengambil *slurry*. *Slurry* selanjutnya dicuci dengan menggunakan HCL 250 ml, dan dimasukkan lagi ke dalam labu alas bulat. Selanjutnya dilakukan pengambilan

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

3.8.3 Pengenceran Ekstrak flavonoid Daun Tembakau Kasturi

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

$$V1.M1=V2.M2$$

Keterangan:

V1 : Volume awal ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi

M1 : Konsentrasi awal ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi

V2 : Volume akhir ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi

M2 : Konsentrasi akhir ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi

3.8.4 Prosedur Pengambilan Sampel

a. Kriteria Subyek Penelitian

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

b. Pengisian *Informed Consent*

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

c. Pengambilan Sampel Darah

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

3.8.5 Isolasi hPBMC

Proses isolasi hPBMC diawali dengan melakukan sentrifugasi sampel darah sebanyak 20 ml dengan kecepatan 3000 rpm selama 12 menit. Supernatan dibuang, darah diencerkan atau dicampur dengan media kultur RPMI 1640 dengan perbandingan 1:1, lalu dihomogenkan dengan menggunakan *micropipette*. Campuran tersebut ditambahkan ke dalam *conical tube* yang telah berisi *ficoll paque* dengan perbandingan 1:1. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 20 menit. Setelah disentrifus, akan terbentuk 4 lapisan. Plasma darah akan berada pada bagian atas, lapisan kedua terdapat *buffy coat*, lapisan ketiga terdapat *ficoll paque*, dan pada lapisan keempat terdapat sel darah merah. Lapisan *buffy coat* diambil dengan menggunakan *micropipette*, masukkan ke dalam *conical tube* 15 ml. Encerkan kembali dengan media kultur hingga 10 ml. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi kembali selama 15 menit hingga didapatkan lapisan sel yang mengendap di bagian bawah tabung. Supernatan dibuang, lapisan sel diresuspensi dengan medium kultur RPMI 1640.

3.8.6 Prosedur Penghitungan Sel

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

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

b. Menghitung jumlah total sel yang diperlukan

Setiap satu *well* diperlukan 1 x 10⁵ sel, maka jumlah sel yang diperlukan dalam 96-*well* adalah 96x10⁵ sel (Gupta, 2016).

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

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

hPBMC masing-masing sebanyak 100 μ l dimasukkan ke dalam *96-well* sebanyak 3 *plate*. Selanjutnya dilakukan inkubasi selama 24 jam pada inkubator dengan suhu 37°C mengandung 5% CO₂.

3.8.7 Pemaparan Lipopolisakarida

Sebanyak 50 μ l lipopolisakarida dengan konsentrasi 10 μ g/ml dimasukkan ke dalam setiap *well* yang telah berisi hPMBC dengan menggunakan *micropipette*.

3.8.8 Inkubasi Flavonoid pada hPBMC yang Telah Dipapar Lipopolisakarida

Pada hPBMC yang telah dipapar lipopolisakarida, selanjutnya diberi ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi dengan konsentrasi 640 μ g/ml, 320 μ g/ml, 80 μ g/ml, 40 μ g/ml, 20 μ g/ml, 10 μ g/ml, dan 2,5 μ g/ml masing–masing sebanyak 100 μ l. Kelompok kontrol tidak diberi ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi. Selanjutnya dilakukan inkubasi selama 24 jam, 48 jam, dan 72 jam pada inkubator dengan suhu 37°C mengandung 5% CO₂. Setelah dilakukan inkubasi, dilakukan *pipetting* supernatan pada semua kelompok penelitian dalam *eppendorf tube*.

3.8.9 Uji Kadar COX-2 dengan Metode ELISA

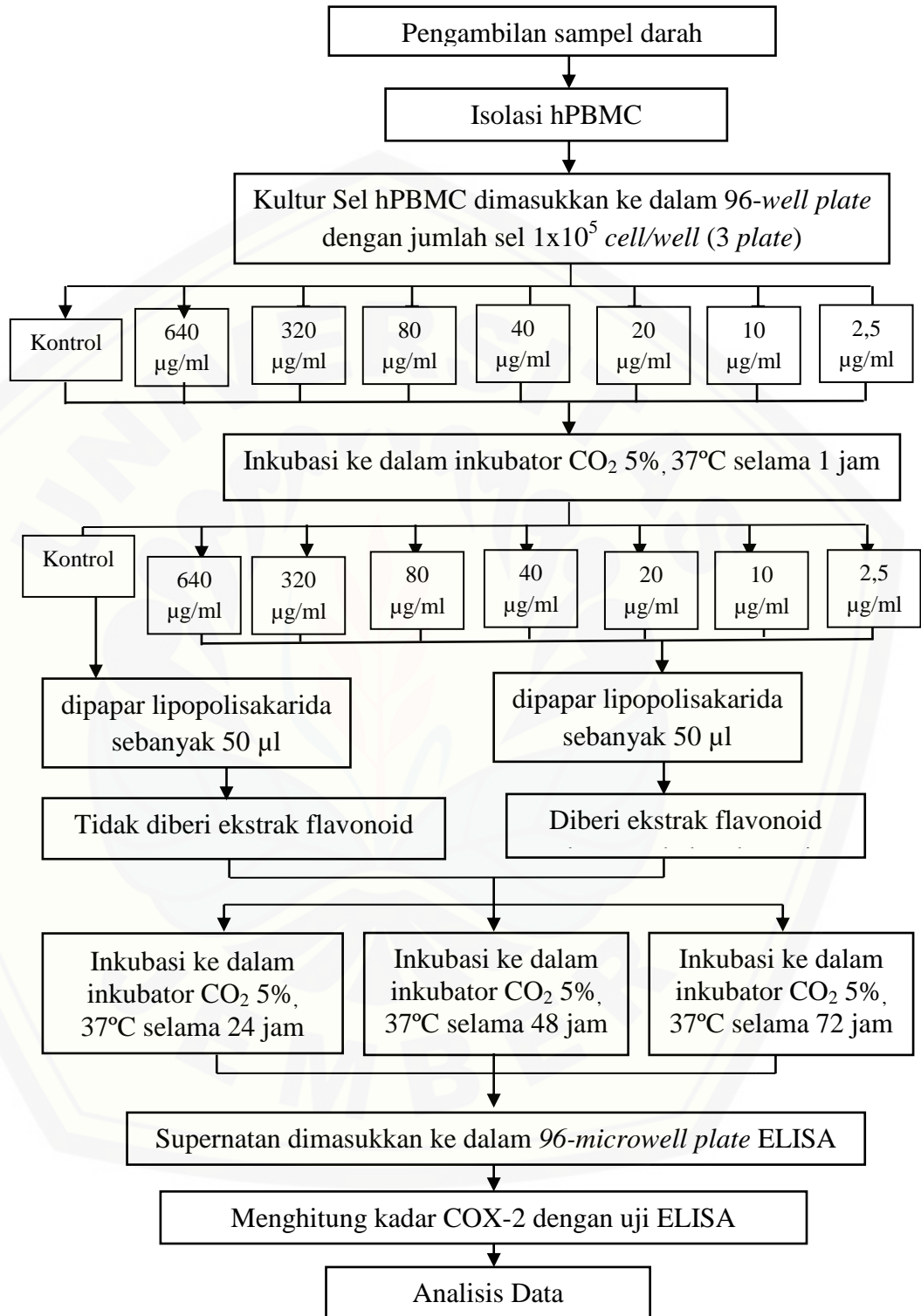
Siapkan sampel yang akan dilakukan uji ELISA dengan marker COX-2. Masukkan masing–masing standart ELISA yaitu 3,75 U/L; 7,5 U/L; 15 U/L; 30 U/L; 60 U/L; 120 U/L; dan 240 U/L sebanyak 50 μ l ke dalam *96-microwell plate* ELISA dengan pengulangan sebanyak satu kali (duplo). Tambahkan 40 μ l sampel uji ke dalam *well*. Selanjutnya di tambahkan 10 μ l antibodi COX-2 ke dalam *well* yang telah berisi sampel uji. Tambahkan 50 μ l *streptavidin-HRP* ke dalam *well* yang telah berisi sampel uji dan standart ELISA. Tutup *96-microwell plate* dengan menggunakan *sealer* dan *mix* dengan menggunakan *shaker* untuk mencampurkan semua bahan yang ada di dalam *well*. Kemudian *well* dinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit. Setelah masa inkubasi selesai, cairan yang ada

dalam *well* dibuang dan *well* tersebut dicuci. Pencucian dilakukan sebanyak 5 kali dengan memasukan larutan *buffer* pencuci (*washing buffer*) sebanyak minimal 0,35 ml pada setiap *well* menggunakan *multi-channel pipette*, selama 1 sampai 2 menit. Setelah dicuci, keringkan *well* dengan menggunakan kertas serap atau bahan lain yang mudah menyerap cairan. Kemudian tambahkan 50 μ l *substrate solution A* dan 50 μ l *substrate solution B* ke dalam setiap *well* sehingga akan terjadi perubahan warna menjadi warna biru. Tutup kembali *well* dengan *sealer* dan dilakukan inkubasi dalam ruang gelap pada suhu 37°C selama 10 menit. Setelah diinkubasi, tambahkan 50 μ l larutan penghenti reaksi (*stop solution*) ke dalam setiap *well*, sehingga akan terjadi perubahan warna dari biru menjadi kuning. Kemudian hasil uji dibaca dengan menggunakan ELISA reader dengan panjang gelombang 450 nm maksimal 30 menit setelah diberikan *stop solution* (Bioassay, China).

3.9 Analisis data

Analisis data yang digunakan yaitu menggunakan Uji Regresi Linier Sederhana dan Uji Korelasi *Pearson* ($p \leq 0,05$), untuk mengetahui hubungan dan pengaruh ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi terhadap kadar COX-2 pada hPBMC yang dipapar lipopolisakarida *Porphyromonas gingivalis*.

3.10 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Bagan alur penelitian

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

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

1. Ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi daun tembakau kasturi (*Nicotiana tabacum L.*) dengan berbagai konsentrasi dapat menghambat ekspresi COX-2 pada hPBMC yang dipapar lipopolisakarida *Porphyromonas gingivalis*, terutama pada masa inkubasi 24 jam.
2. Konsentrasi optimal ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi daun tembakau kasturi dalam menghambat ekspresi COX-2 pada hPBMC yang dipapar lipopolisakarida adalah konsentrasi 640 µg/ml dan 320 µg/ml.

5.2 Saran

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

1. Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi (*Nicotiana tabacum L.*) terhadap kadar COX-2 dengan waktu inkubasi kurang dari 24 jam.
2. Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi (*Nicotiana tabacum L.*) terhadap kadar COX-2 pada kultur sel hPBMC yang lebih homogen (mengandung limfosit atau monosit saja).
3. Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai stabilitas sifat fisik dan kimiawi ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi sebagai agen anti-inflamasi.
4. Perlu adanya penelitian lebih lanjut untuk mengetahui mekanisme ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi (*Nicotiana tabacum L.*) dalam menghambat COX-2 melalui jalur NF-κB dan MAPKs.

DAFTAR PUSTAKA

- Ardhiarisca, O., M. M. Du, dan T. Kustiari. 2015. Analisis Faktor Internal dan Eksternal yang Mempengaruhi Pengembangan Agribisnis Tembakau di Kabupaten Jember. *Jurnal Ilmiah Inovasi*. 15(3): 62-65.
- Balittas. 2014. <http://balittas.litbang.pertanian.go.id/index.php/produk/varietas-unggul/tembakau>. Diakses pada : 11 September 2017.
- Baratawidjaja, K. G dan I. Rengganis. 2013. *Imunologi Dasar*. Edisi 10. Jakarta: Balai Penerbit FK UI.
- Bellik, Y., L. Boukraâ, H. A. Alzahrani, B. A. Bakhotmah, F. Abdellah, S. M. Hammoudi, dan M. Iguer-Ouada. 2013. Molecular Mechanism Underlying Anti-Inflammatory and Anti-Allergic Activities of Phytochemicals: An Update. *Molecules*. 18: 322-353.
- Bostanci N., dan G.N. Belibasakis. 2012. Porphyromonas gingivalis an Invasive and Evansive Opportunistic Oral Pathogen. *FEMS Microbiology Letters*. 333 (1) : 1-9.
- Cahyono, B. 1998. *Tembakau, Budidaya dan Analisis Tani*. Yogyakarta: Kaninus.
- Charoenkij, P., T. Palo, S. Chotewuttakorn, S. Limsuwan, T. Laohapand, dan P. Akarasereenont. 2016. The Effect of Ayurved Siriraj Wattana Recipe (AVS073) on LPS Induced COX-2 Expression in Human PBMC. *Siriraj Med J*. 68: 90-96.
- Chen, J., H. Leng, Y. Duan, W. Zhao, G. Yang, Y. Guo, Y. Chen, Q. Hu. 2013. Three new flavonoids from the leaves of oriental tobacco and their cytotoxicity. *Phytochemistry Letters*. 6: 144–147.
- CCRC. 2009. Standard Operating Procedure, Cancer Chemoprevention Research Cancer Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Corwin, E. J. 2009. *Buku Saku Patofisiologi*. Ed. 3. Jakarta : EGC.
- Djajadi, 2015. Tobacco Diversity In Indonesia. *Journal of Biological Research*, 20: 27-32.

- Dubey, S., A. Ganeshpurkar, D. Bansal, dan N. Dubey. 2013. Experimental studies on bioactive potential of rutin. *Chronicles of Young Scientists*. 4(2): 153-157.
- Fajriani. 2008. Pemberian Obat-Obatan Anti Inflamasi Non Steroid (AINS) pada Anak. *Indonesian Journal of Dentistry*. 15(3): 200-204.
- Fathiazad, F., A. Delazar, R. Amiri, dan S. D. Sarker. 2005. Extraction of Flavonoids and Quantification of Rutin from waste Tobacco Leaves. *Iranian Journal of Pharmaceutical*. 3: 222-227.
- Fatimah, I. 2016. Pengaruh Ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi Rendah Nikotin Limbah Daun Tembakau Kasturi (*Nicotina Tabacum L.*) terhadap Pertumbuhan Mikroba Rongga Mulut. *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.
- Fu, B., X. Ji, M. Zhao, F. He, X. Wang, Y. Wang, P. Liu, dan L. Niu. 2016. The influence of light quality on the accumulation of flavonoids in tobacco (*Nicotiana tabacum L.*) leaves. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*. 162 : 544–549.
- Goldstein, J. L., dan B. Cryer. 2015. Gastrointestinal injury associated with NSAID use: a case study and review of risk factors and preventative strategies. *Drug, Healthcare and Patient Safety*. 7: 31-41.
- Gonbad, R. A., A. Afzanb, E. Karimi, U. R. Sinniah, dan M. K. Swamy. 2015. Phytoconstituents and antioxidant properties among commercial tea (*Camellia sinensis L.*) clones of Iran. *Electronic Journal of Biotechnology*. 18: 433–438.
- Gupta, A., dan S. R. Chaphalkar. 2016. Anti-inflammatory and immunosuppressive activities of flavonoids from medicinal plants. *J Herb Med Pharmacol*. 5(3): 121-124.
- Hämäläinen, M., R. Nieminen, M. Z. Asmawi², P. Vuorela, H. Vapaatalo, dan E. Moilanen. 2011. Effects of Flavonoids on Prostaglandin E₂ Production and on COX-2 and mPGES-1 Expressions in Activated Macrophages. *Planta Med*. 77: 1504–1511.
- Hong, G. E., J.A. Kim, A. Nagappan, S. Yumnam, Ho. J. Lee, E. H. Kim, W. S. Lee, S. C. Shin, H. S. Park, dan G. S. Kim. 2013. Flavonoids Identified from Korean *Scutellaria baicalensis* Georgi Inhibit Inflammatory Signaling by Suppressing Activation of NF- κ B and MAPK in RAW 264.7 Cells. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 1-11.

- Hougee, S., A. Sanders, J. Faber, Y. M.F. Graus, W. B. V. D. Berg, J. Garssen, H. F. Smit, dan M. A. Hoijer. 2005. Decreased pro-inflammatory cytokine production by LPS-stimulated PBMC upon in vitro incubation with the flavonoids apigenin, luteolin or chrysin, due to selective elimination of monocytes/macrophages. *Biochemical Pharmacology*. 69: 241–248.
- How, K.Y., K. P. Song dan K. G. Chan. 2016. Porphyromonas gingivalis: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. *Frontiers in Microbiology*. 7 (53) : 1-14.
- Integrated Taxonomic Information System (ITIS), 2017. Porphyromonas gingivalis (Coykendall et al., 1980) Shah and Collins, 1988. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=964978#null. Diakses pada : 5 Oktober 2017.
- Ikawati, Z., A. E. Nugroho, dan W. Werdhinindah. 2006. Efek ekstrak etanol daun *Erythrina fusca Lour* (cangkring) terhadap penekanan ekspresi enzim siklooksigenase-2 pada kultur sel raji. *Majalah Farmasi Indonesia*.17(2), 85 – 90.
- Kang, S. R., D. Y. Han, K. I. Park, H. S. Park, Y. B. Cho, H. J. Lee, W. S. Lee, C. H. Ryu, Y. L. Ha, D. H. Lee, J. A. Kim, dan G. S. Kim. 2011. Suppressive Effect on Lipopolysaccharide-Induced Proinflammatory Mediators by Citrus aurantium L. In Macrophage RAW264.7 Cells via NF- κ B Signal Pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 1-12.
- Karimi, E., E. Oskoueian, R. Hendra, A. Oskoueian, dan H. Z. E. Jaafar. 2012. Phenolic Compounds Characterization and Biological Activities of Citrus aurantium Bloom. *Molecules*. 17: 1203-1218.
- Kim, Y. J., S. J. Park, K. J. Yun, Y. W. Cho, H. J. Park, dan K. T. Lee. 2008. Isoliquiritigenin isolated from the roots of Glycyrrhiza uralensis inhibits LPS-induced iNOS and COX-2 expression via the attenuation of NF- κ B in RAW 264.7 macrophages. *European Journal of Pharmacology*. 584: 175–184.
- Kleiveland, C. R. 2015. *The impact of Food Bio-Active on Gut Health*. Chapter 15. London, New York: Spriger Open.
- Lazăr, L., A. Loghin, E. S. Bud, D. Cerghizan, E. Horváth, dan E. E. Nag. 2015. Cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 expressions correlate with tissue inflammation degree in periodontal disease. *Rom J Morphol Embryol*. 56(4): 1441–1446.

- Liptrott, N. 2016. Preparation of blood and PBMC for cytokine secretion. <http://www.euncl.eu/about-us/assaycascade/PDFs/Immunology/EUNCL-ITA-010.pdf?m=1468937873>. Diakses pada : 18 Oktober 2017.
- López, N. L., E. P. G. Grijalva, D. L. A. Perez dan J. B. Heredia. 2016. Flavonoids as Cytokine Modulators: A Possible Therapy for Inflammation-Related Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 17 (921) : 1-15.
- Lu, Y., dan L. M. Wahl. 2005. Oxidative Stress Augments the Production of Matrix Metalloproteinase-1 Primary Cyclooxygenase-2, and Prostaglandin E2 through Enhancement of NF-kB Activity in Lipopolysaccharide-Activated Human Monocytes. *J Immunol.* 175: 5423-5429.
- Ma, Y., Y. He, T. Yin, H. Chen, S. Gao, dan M. Hu. 2018. Metabolism of Phenolic Compounds in LPS-stimulated Raw264.7 Cells Can Impact Their Anti-inflammatory efficacy: Indication of Hesperetin. *Journal Agriculture and Food Chemistry.* 1-39.
- Marks, D. B., A. D. Marks, dan C. M. Marks. 2000. *Biokimia Kedokteran Dasar*. Jakarta: EGC.
- Matnawi, H. 1997. *Budi Daya Tembakau Bawah Naungan*. Klaten: Kanisius.
- Miagkov, A. 2016. Functionally characterized human PBMCs: An improved in vitro model of human immune response. https://www.atcc.org/en/About/News_and_Events/Events/Webinars/2016/Functionally_Characterized_Human_PBMCs.aspx. [Diakses pada 8 Agustus 2018]
- Mohale, D. S., A. S. Tripathi, J. B. Wahane, dan A.V. Chandewar. 2014. A Pharmacological Review on Cyclooxygenase Enzyme. *Indian Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 1(1): 46-58.
- Moutia, M., K. E. Azhary, A. Elouaddari, A. A. Jahid, J. J. Eddine, F. Seghrouchni, N. Habti, dan A. Badou. 2016. Capparis Spinosa L. Promotes Antiinflammatory Response In Vitro through the Control Of Cytokine Gene Expression in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *BMC Immunology.* 17(26): 1-12.
- Murphy, H. S. 2006. Inflammation. http://downloads.lww.com/wolterskluwer_vitalstream_com/samplecontent/9780781795166_Rubin/samples/91731_ch02.pdf. Diakses pada : 7 Oktober 2017.

- Nam, T. G., T. G. Lim, B. H. Lee, S. Lim, H. Kang, S. H. Eom, M. Yoo, H. W. Jang, dan D. O. Kim. 2017. Comparison of Anti-Inflammatory Effects of Flavonoid-Rich Common and Tartary Buckwheat Sprout Extracts in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 and Peritoneal Macrophages. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 1-17.
- Nanescu, S., S. Martu, G. Ciomaga, V. Toma, D. Fornu, dan L. Foia. 2011. Dual Effects of Flavonoids on Dyslipidemia and Periodontal Disease. *Romanian Journal of Oral Rehabilitation*. 3(4): 38-45.
- Nijland, R., T. Hofland, dan J. A. G. V. Strijp. 2014. Recognition of LPS by TLR4: Potential for Anti-Inflammatory Therapies. *Mar. Drugs* 12 : 4260-4273.
- Nitasari, D. 2010. Analisis Pendapatan Usahatani dan Tataniaga Tembakau Voor Oogst Kasturi pada Gabungan Kelompok Tani Permata VII Desa Pakusari, Kecamatan Pakusari, Kabupaten Jember, Provinsi Jawa Timur. *Skripsi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Pourahmad, J., dan A. Salimi. 2015. Isolated Human Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC), a Cost Effective Tool for Predicting Immunosuppressive Effects of Drugs and Xenobiotics. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 14 (4): 679-98.
- Prasetya, C. R. 2015. Ekspresi dan Peran Siklooksigenase-2 dalam Berbagai Penyakit di Rongga Mulut. *Stomatognathic (J. K. G Unej)*. 12 (1): 16-19.
- Price, S. A., dan L. M. Wilson. 2005. Patofisiologi: *Konsep Klinis Proses – Proses Penyakit*. Ed. 6. Vol.1. Jakarta : EGC.
- Putri, R. H. 2015. Daya Hambat Ekstrak etanol daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) terhadap pertumbuhan mikroba rongga mulut. *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.
- Rajaraman, R., R. A. Fox, V. G. Vethamany, L. A. Fernandez, Dan J. M. Mac. 1977. Adhesion and Spreading Behaviour of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) In Vitro. *Experimental Cell Research*. 107: 179-190.
- Rathee, P., H. Chaudhary, S. Rathee, D. Rathee, V. Kumar dan K. Kohli. 2009. Mechanism of Action of Flavonoids as Anti-inflammatory Agents: A Review. *Inflammation & Allergy - Drug Targets*. 8: 229-235.
- Ricciotti, E., dan G. A. FitzGerald. 2011. Prostaglandins and Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 31(5): 986–1000.

- Rizky, F. 2016. Uji Sitotoksitas Ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi Rendah Nikotin Limbah Daun Tembakau Kasturi (*Nicotiana Tabacum L.*) pada Kultur Sel Fibroblas Gingiva Manusia. *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.
- Rohaya,S., Hariwati, L. R. W, dan H. Sujuti. 2014. Efek Pemberian Ekstrak Kulit Jeruk Keprok (*Citrus reticulata*) terhadap Cell-Cycle G1 Arrest dan Apoptosis pada Sel Kultur Retinoblastoma. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 28(2): 68-73.
- Rouzer, C. A., dan L. J. Marnett. 2009. Cyclooxygenases: structural and functional insights. *Journal of Lipid Research*. S29-S34.
- Ru, Q. M., L. J. Wang, W. M Li, J. L Wang, dan Y. T. Ding. 2012. In Vitro Antioxidant Properties of Flavonoid and Polysaccharides Extract from Tobacco (*Nicotiana tabacum L.*) Leaves. *Journal Molecules*. 17: 1281-1291.
- Rusli, M. S., Suryani., dan Puspita, P. E. 2011. Antibacterial Activity of Temanggung Tobacco Extract Variety Genjah Kemloko. *Skripsi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Sabir, A. 2003. Pemanfaatan flavonoid di bidang kedokteran gigi. *Maj Ked Gigi (Dental Journal)*; Edisi Khusus Temu Ilmiah Nasional III: 81–87.
- Santoso, K. 2013. *Tembakau Dibutuhkan dan Dimusuhi*. Jember: UPT Penerbitan UNEJ.
- Sazali, S. N. M., J. Jalil, N. M. Arriffin, S. A. Abdullah, dan S. Jamil. 2017. In vitro inhibitory effects of flavonoids from the extracts of *Artocarpus* species on prostaglandin E₂ (PGE₂) production in human plasma. *Journal of Innovations in Pharmaceutical and Biological Sciences*. 4 (4): 106-111.
- Shalini, V., S. Bhaskar , K. S. Kumar, S. Mohanlal, A. Jayalekshmy , dan A. Helen. 2012. Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of the flavonoid, tricetin from Njavara rice (*Oryza sativa L.*) in human peripheral blood mononuclear cells: Possible role in the inflammatory signaling. *International Immunopharmacology*. 14: 32–38.
- Sonia, S. 2017. Pengaruh Ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi Daun Tembakau Kasturi terhadap Ekspresi *Toll Like Receptor 4* pada Kultur Sel Osteoblast yang Dipapar Lipopolisakarida. *Skripsi*. Universitas Jember.

- Susilowati, E. Y. 2006. Identifikasi Nikotin dari Daun Tembakau (*Nicotiana tabacum*) Kering dan Uji Efektifitas Ekstrak Daun Tembakau sebagai Insektisida Penggerak Batang Padi (*Scirpophaga inonata*). *Skripsi*. Semarang: Universitas Negeri Semarang.
- Tian, C., P. Zhang, C. Yang, X. Gao, H. Wang, Y. Guo, dan M. Liu. 2018. Extraction Process, Component Analysis, and In Vitro Antioxidant, Antibacterial, and Anti-Inflammatory Activities of Total Flavonoid Extracts from *Abutilon theophrasti* Medic. Leaves. *Mediators of Inflammation*. 1-17.
- Tominari, T., M. Hirata, C. Matsumoto, M. Inada, dan C. Miyaura. 2012. Polymethoxy Flavonoids, Nobiletin and Tangeretin, Prevent Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Bone Loss in an Experimental Model for Periodontitis. *J Pharmacol Sci*. 119: 390 – 394.
- Uematsu, S., dan S. Akira. 2008. Toll-Like Receptors (TLRs) and Their Ligands. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 183. 1-21.
- Wang, H., M. Zhao, B. Yang, Y. Jiang, G. Rao. 2008. Identification of polyphenols in tobacco leaf and their antioxidant and antimicrobial activities. *Food Chemistry*. 107: 1399–1406.
- Wang, X., dan P. J. Quinn. 2010. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Progress in Lipid Research*. 49 (2010): 97–107.
- Wang, X., P. Liu, F. Wang, B. Fu, F. He, dan M. Zhao. 2016. Influence of altitudinal and latitudinal variation on the composition and antioxidant activity of polyphenols in *Nicotiana tabacum* L. Leaf. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 29(5): 359-366.
- World Health Organization. 2011. *Pedoman teknik dasar untuk laboratorium*. Ed. 2. Jakarta : EGC.
- Xu, L., L. Zhanga, A. M. Bertuccia, R. M. Popea, dan S. K. Datta. 2008. Apigenin, A Dietary Flavonoid, Sensitizes Human T Cells For Activation-Induced Cell Death By Inhibiting Pkb/Akt and Nf-Kb Activation Pathway. *Immunol Lett*. 121(1): 74–83.
- Zaganjor, E., dan M. H. Cobb. 2011. Functions and Modulation of MAP Kinase Pathways. *Tocris Bioscience*. 1-11.
- Zhang, F., S. P. Engebretson, R. S. Morton, P. F. Cavanaugh, K. Subbaramaiah, dan A. J. Dannenberg. 2003. The Overexpression of Cyclo-oxygenase-2

in Chronic Periodontitis. *Journal American Dental Association*. 131: 861-867.

Zhu, X. X., L. Yang, Y. J. Li, D. Zhang, Y. Chen, P. Kostecká, E. Kmoněková, dan Z. Zidek. 2013. Effects of Sesquiterpene, Flavonoid and Coumarin Types of Compounds from *Artemisia annua* L. on Production of Mediators of Angiogenesis. *Pharmacological Reports*. 65 : 410-420.



LAMPIRAN

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

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

Jl. Raya Surabaya - Malang Km. 65 Purwodadi - Pasuruan 67163

Telp. (+62 343) 615033, (+62 341) 426046, Faks. (+62 343) 615033, (+62 341) 426046
website: <http://www.krpurwodadi.lipi.go.id>

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI

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

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

drg. Agustia Wulan Suci D, MDSC NIP : 197908142008122003

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

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

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

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

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

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



Deden Mudiana, S.Hut, M.Si

Lampiran B. Surat Keterangan *Ethical Clearance*

 <p>KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK) FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS JEMBER (THE ETHICAL COMMITTEE OF MEDICAL RESEARCH FACULTY OF DENTISTRY UNIVERSITAS JEMBER)</p>	
<p>ETHIC COMMITTEE APPROVAL <u>No. 017/UN25.8/KEPK/DL/2018</u></p>	
Title of research protocol	: "Pengaruh Ekstrak Flavonoid Daun Tembakau Kasturi Terhadap Kadar <i>Cyclooxygenase-2</i> Pada <i>Human Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> yang Dipapar <i>Lipopolisakarida Porphyromonas gingivalis</i> "
Document approved	: Research Protocol
Principal investigator	: Tazqia Jamil Pratami
Member of research	: -
Responsible Physician	: Tazqia Jamil Pratami
Date of approval	: February 5 th , 2018
Place of research	: 1. Pharmacy Laboratory at Faculty of Pharmacy in Universitas Jember 2. Chemical Engineering Laboratory in Politeknik Negeri Malang 3. Pharmacology Laboratory at Faculty of Medicine in University of Gajah Mada 4. Parasitology Laboratory at Faculty of Medicine in University of Gajah Mada
<p>The Research Ethic Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember states that the above protocol meets the ethical principle outlined and therefore can be carried out.</p>	
<p>Jember, February 10th, 2018</p>	
<p>Dean of Faculty of Dentistry Universitas Jember</p>   <p>Handyan P. M. Kes, Sp. Pros)</p>	<p>Chairperson of Research Ethics Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember</p>   <p>Deva Ayu Ratna Dewanti, M. Si.)</p>

Lampiran C. Hasil Analisis Data**Lampiran D.1. Hasil Uji Regresi Linier Sederhana**Variables Entered/Removed^b

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	konsentrasia	.	Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: kadarCOX2_24

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.583a	.340	.230	27.99746

a. Predictors: (Constant), konsentrasi

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	2421.332	1	2421.332	3.089	.129a
	Residual	4703.148	6	783.858		
	Total	7124.480	7			

a. Predictors: (Constant), konsentrasi

b. Dependent Variable: kadarCOX2_24

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	58.098	11.808		4.920	.003
	konsentrasi	-.081	.046	-.583	-1.758	.129

a. Dependent Variable: kadarCOX2_24

Lampiran E.2. Hasil Uji Pearson

Correlations

		waktu	konsentrasi	cox2
waktu	Pearson Correlation	1	.000	.605**
	Sig. (2-tailed)		1.000	.002
	N	24	24	24
konsentrasi	Pearson Correlation	.000	1	-.250
	Sig. (2-tailed)	1.000		.238
	N	24	24	24
cox2	Pearson Correlation	.605**	-.250	1
	Sig. (2-tailed)	.002	.238	
	N	24	24	24

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Correlations

		waktu24	cox
waktu24	Pearson Correlation	1	-.583
	Sig. (2-tailed)		.129
	N	8	8
cox	Pearson Correlation	-.583	1
	Sig. (2-tailed)	.129	
	N	8	8

Correlations

		waktu48	cox1
waktu48	Pearson Correlation	1	-.056
	Sig. (2-tailed)		.895
	N	8	8
cox1	Pearson Correlation	-.056	1
	Sig. (2-tailed)	.895	
	N	8	8

Correlations

	waktu72	cox3
Pearson Correlation	1	.055
waktu72 Sig. (2-tailed)		.897
N	8	8
Pearson Correlation	.055	1
cox3 Sig. (2-tailed)	.897	
N	8	8

Correlations

	waktu1	k320	k80	k40	k20	k10
Pearson Correlation	1	.926	.866	.969	.885	.968
waktu1 Sig. (2-tailed)		.247	.333	.160	.309	.161
N	3	3	3	3	3	3
Pearson Correlation	.926	1	.991	.991	.995	.991
k320 Sig. (2-tailed)	.247		.087	.087	.062	.085
N	3	3	3	3	3	3
Pearson Correlation	.866	.991	1	.963	.999*	.964
k80 Sig. (2-tailed)	.333	.087		.173	.025	.172
N	3	3	3	3	3	3
Pearson Correlation	.969	.991	.963	1	.973	1.000**
k40 Sig. (2-tailed)	.160	.087	.173		.149	.001
N	3	3	3	3	3	3
Pearson Correlation	.885	.995	.999*	.973	1	.973
k20 Sig. (2-tailed)	.309	.062	.025	.149		.147
N	3	3	3	3	3	3
Pearson Correlation	.968	.991	.964	1.000**	.973	1
k10 Sig. (2-tailed)	.161	.085	.172	.001	.147	
N	3	3	3	3	3	3
Pearson Correlation	.254	-.130	-.264	.005	-.226	.003
K2.5 Sig. (2-tailed)	.837	.917	.830	.997	.855	.998
N	3	3	3	3	3	3
Pearson Correlation	.908	.999*	.996	.984	.999*	.984
k640 Sig. (2-tailed)	.275	.029	.058	.115	.033	.114
N	3	3	3	3	3	3

Correlations

		k0	k640
waktu1	Pearson Correlation	.254	.908
	Sig. (2-tailed)	.837	.275
	N	3	3
k320	Pearson Correlation	-.130	.999
	Sig. (2-tailed)	.917	.029
	N	3	3
k80	Pearson Correlation	-.264	.996
	Sig. (2-tailed)	.830	.058
	N	3	3
k40	Pearson Correlation	.005	.984
	Sig. (2-tailed)	.997	.115
	N	3	3
k20	Pearson Correlation	-.226	.999
	Sig. (2-tailed)	.855	.033
	N	3	3
k10	Pearson Correlation	.003	.984
	Sig. (2-tailed)	.998	.114
	N	3	3
K2.5	Pearson Correlation	1	-.175
	Sig. (2-tailed)		.888
	N	3	3
k640	Pearson Correlation	-.175	1*
	Sig. (2-tailed)	.888	
	N	3	3

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Lampiran F. Informed Consent**LEMBAR INFORMASI UNTUK RESPONDEN**

Kami, tim peneliti, yang terdiri dari Hanifah Nailul Amania dan Tazqia Jamil Pratami dari Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember akan melakukan penelitian yang berjudul “Pengaruh Ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi Daun Tembakau Kasturi Terhadap Kadar *Inducible Nitric Oxide Synthase* dan *Cyclooxygenase-2* Pada *Human Peripheral Blood Mononuclear Cell* Yang Dipapar Lipopolisakarida *Porphyromonas gingivalis*”

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi daun tembakau kasturi (*Nicotiana tabacum L.*) terhadap kadar iNOS dan COX-2 pada h-PBMC yang dipapar lipopolisakarida *Porphyromonas gingivalis*.

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

A. Kesukarelaan untuk ikut penelitian

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

B. Prosedur penelitian

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

1. Anda akan diwawancarai oleh dokter untuk menanyakan: nama, usia, riwayat penyakit, riwayat penggunaan obat, riwayat alergi, kebiasaan merokok, kebiasaan minum-minuman keras atau minum-minuman yang mengandung alkohol.
2. Menjalani pemeriksaan fisik oleh dokter untuk memeriksa status kesehatan
3. Kira kira semalam sebelum penelitian, anda diminta berpuasa, namun diperbolehkan minum air putih seperlunya.
4. Pada hari dimulainya penelitian, anda diminta datang pada pukul 6.45 untuk selanjutnya dilakukan pengambilan darah
5. Pengambilan darah dilakukan sebanyak 2 kali dengan cara menggunakan *syringe* 10 ml tusuk bagian vena dan diambil darah secara perlahan.
6. Pengambilan darah dilakukan oleh perawat yang sudah terbiasa mengambil darah.
7. Darah pendonor disimpan dalam *vacutee tube* yang sudah terdapat EDTA (*Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid*) 5,4 mg.

C. Kewajiban subyek penelitian

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

D. Resiko, efek samping dan penanganannya

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

E. Manfaat

Anda akan membantu penelitian ini untuk:

1. Memberikan pengetahuan tentang pengaruh ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi daun tembakau kasturi (*Nicotiana tabacum L.*) terhadap kadar iNOS

dan COX-2 pada h-PBMC yang dipapar lipopolisakarida *Porphyromas gingivalis*.

2. Mengembangkan ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi daun tembakau kasturi (*Nicotiana tabacum* L.) sebagai bahan dasar pembuatan obat anti inflamasi pada penyakit periodontitis.

F. Kerahasiaan

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

G. Kompensasi

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

H. Pembiayaan

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

I. Informasi Tambahan

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

PERSETUJUAN KEIKUTSERTAAN DALAM PENELITIAN

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

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

Yogyakarta, 24 November 2017

Saksi



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

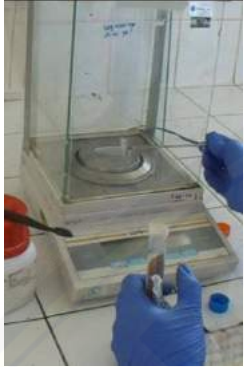



Pasien/Subyek












(Tazqia Jamil Pratami)

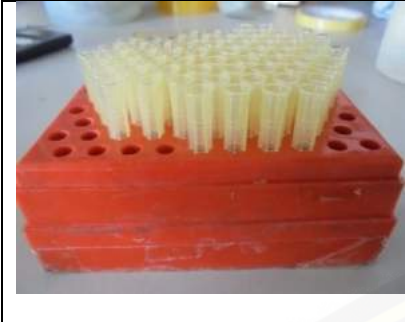





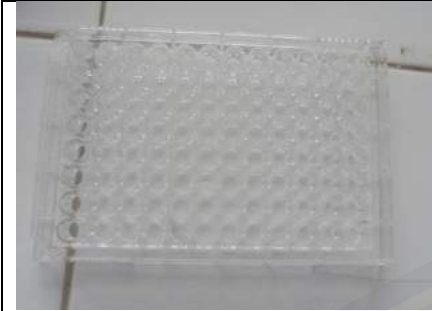



Lampiran G. Alat dan Bahan Penelitian

Alat dan Bahan	Keterangan
	Timbangan
	<i>Laminar air flow</i>
	<i>Sentrifuge</i>
	<i>Handscoon</i>

		Masker
		Syringe 10 ml
		Vacutae tube mengandung EDTA 5,4 mg
		Torniquet
		Hemacytometer

	Mikroskop Inverted
	Inkubator CO ₂ 5%
	Tabung <i>eppendorf</i>
	<i>Conical Tube</i>
	<i>Micropipette</i>

 A photograph showing a red rack filled with numerous yellow pipette tips.	<p><i>Yellow tip</i></p>
 A photograph showing three blue pipette tips standing upright.	<p><i>Blue tip</i></p>
 A photograph showing a hand using a pipette tip to transfer liquid into a white rack.	<p><i>Rak eppendorf</i></p>
 A photograph of a digital counter displaying the number 0.107.	<p><i>Counter</i></p>

	<p>96-well plate</p>
	<p>Shaker</p>
	<p>Media Kultur RPMI</p>
	<p>Alkohol 70%</p>

Lampiran H. Prosedur Penelitian



Pengambilan sampel darah
sebanyak 20 ml



Hasil sentrifuse dengan *ficoll paque*
akan membentuk 4 lapisan yaitu :

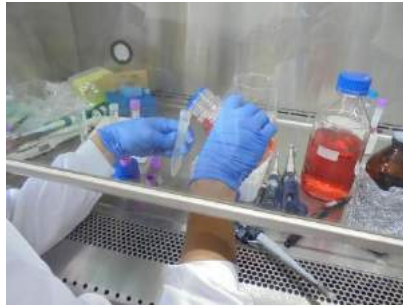
1. Plasma darah
2. *Buffy coat*
3. *Ficoll paque*
4. Sel darah merah



Pengambilan *Buffy coat*



Buffy coat diencerkan kembali
dengan media kultur dan
disentrifuse



hPBMC yang diperoleh
diresuspensi dengan media kultur
RPMI



Perhitungan sel di bawah mikroskop
inverted



hPBMC yang diperoleh
diresuspensi dengan media kultur
RPMI dan diletakkan ke dalam
96-well



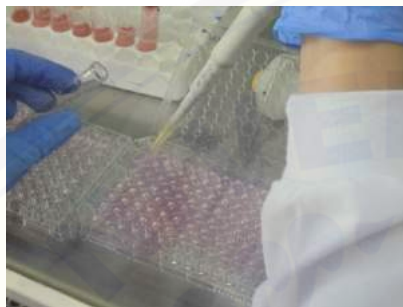
hPBMC diinkubasi selama 24 jam
dalam inkubator CO₂ 5% dengan
suhu 37°C



Pengenceran LPS dan flavonoid



Pemaparan LPS



Pemberian flavonoid



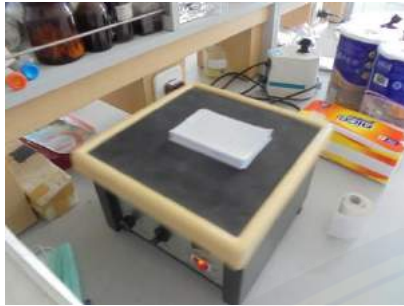
Pemberian sampel uji ke dalam 96-*microwell plate* ELISA



Pemberian *streptavidin*-HRP



96-*Microwell plate* ditutup dengan *sealer*



Mix well dengan menggunakan *shaker*



Inkubasi selama 60 menit



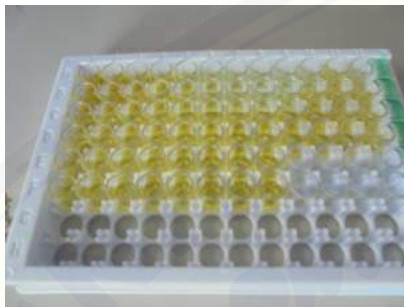
Pencucian dengan larutan *buffer* pencuci



Pemberian *substrate solution A* dan *B*



Pemberian *stop solution*



Perubahan warna setelah pemberian *stop solution*



Perhitungan kadar COX-2 dengan ELISA *reader*