

KESEHATAN

LAPORAN PENELITIAN HIBAH BERSAING

KFA  
KK  
LP.163/16  
Rah  
P



MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

**Peningkatan Ekspresi Sel *Immunesurveillance* oleh Senyawa Bioaktif Ekstrak *Gardenia jasmoides* : Suatu Inovasi dalam Penatalaksanaan Terapi Luka Akibat Trauma Pencabutan Gigi**

**Ketua Peneliti:**

**Dr. Retno Pudji Rahayu, drg., M.Kes**

**Anggota:**

**Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., M.Si.**

**Dr. Aulanni'am, drh. DES.**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
MARET 2009**

# LEMBAR PENGESAHAN LAPORAN AKHIR

1. Judul Penelitian : *Pemanfaatan Fungsi Immunomodulator dari Biokatalis Ekstrak Tanaman Jamur pada Kulit Pematang Terapi Luka pada Mucosa Rongga Mulut Akibat Trauma Persebaran Gigi*

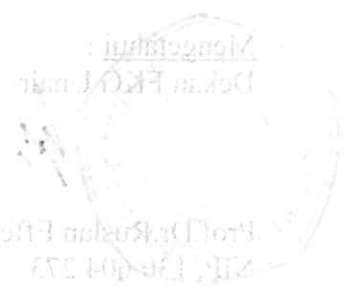
2. Ketua Panitia :  
 a. Nama :  
 b. Bidang Keahlian :  
 c. Pangkat/Gol/HP :  
 d. Jabatan Struktural :  
 e. Jabatan Fungsional :  
 f. Unit Kerja :  
 g. Perguruan Tinggi :  
 h. NIP :  
 i. No. :  
 Dr. Retno Puji Rahayu, drg., M.Kes  
 : Immunopatologi  
 : Pembia (Gol. IV/a) (131509391)  
 :  
 : Lektor Kepala  
 : Fakultas Kedokteran Gigi (F.K.G.)  
 : Universitas Airlangga Surabaya  
 : 031 - 5030233  
 : 031 - 5020250

3. Anggota Panitia :

| No. | Nama dan Gelar Akademik | Bidang Keahlian    | Jabatan      | Perguruan Tinggi |
|-----|-------------------------|--------------------|--------------|------------------|
| 1.  | Dr. Djoko Agus          | Analisis Farmasi   | Fak. Farmasi | UNAR             |
| 2.  | Dr. Anwar, dr. DS       | Biokimia Dasar     | Fak. MIPA    | UNIRRAW          |
|     |                         | Biokimia Molekuler |              |                  |

4. Pendanaan dan jangka waktu penelitian  
 a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 2 tahun  
 b. Biaya total yang diusulkan (Rp. & H) : Rp. 75.000.000,-  
 c. Biaya yang diusulkan tahun ke II : Rp. 75.000.000,-

Surabaya 18 Maret 2009  
 Ketua Panitia



Dr. Retno Puji Rahayu, drg., M.Kes  
 NIP. 131 509 391

Prof. Dr. Kristian Prichard, dr. MS., Sp.KG  
 NIP. 131 004 273

Mengucapkan  
 terima kasih atas penelitian dan pengabdian masyarakat  
 kepada Fakultas Kedokteran Gigi (F.K.G.)  
 Universitas Airlangga Surabaya  
 NIP. 131 837 004



## RINGKASAN

### Peningkatan Ekspresi Sel *Immunesurveillance* oleh Senyawa Bioaktif Ekstrak *Gardenia jasminoides* : Suatu Inovasi dalam Penatalaksanaan Terapi Luka Akibat Trauma Pencabutan Gigi

Retno Pudji Rahayu, Djoko Agus Purwanto, dan Aulanni'Am  
Tahun 2009

*Gardenia jasminoides* merupakan salah satu tanaman obat yang merupakan kekayaan alam di Indonesia. Kandungan kimia dari *Gardenia jasminoides* (daun kaca piring) terdiri dari minyak atsiri, gardenosid, krosin, dekstrosan dan manit. Minyak atsiri mempunyai sifat anti septik, anti oksidan dan mempunyai aktifitas anti bakteri dan jamur. Perkembangan terakhir dari penelitian tentang infusa *Gardenia jasminoides* ternyata dapat meningkatkan proses proliferasi sel fibroblas secara *in vitro*. Hal ini diduga *Gardenia jasminoides* juga mengandung komponen hormon pertumbuhan untuk fibroblas. Mengingat sifat *Gardenia jasminoides* sebagai anti bakteri dan jamur, maka kemungkinan pemberian bioaktif fraksi airnya dapat mempengaruhi komponen sel *immunesurveillance* inang, dalam hal ini adalah sel T sitotoksik dan sel NK yang berfungsi sebagai pertahanan lini terdepan terhadap virus dan bakteri. Bersama dengan makrofag ke 2 sel tersebut akan berkerja bersama dalam mengeliminasi sel target sehingga diperoleh kondisi homeostasis pada inang. Akan tetapi sejauh ini masih belum ada laporan yang pasti.

Oleh karena itu, penelitian ini dapat menjadi kajian ilmiah bagi pengembangan obat tradisional yang diharapkan dapat menemukan komponen bioaktif yang terkandung dalam tanaman tersebut sehingga dapat meningkatkan efektifitas pendayagunaan tanaman *Gardenia jasminoides* dan dengan melalui uji laboratoris diharapkan komponen bioaktif tersebut dapat bermanfaat dalam penatalaksanaan terapi luka yang sering terjadi di mukosa rongga mulut akibat trauma pencabutan atau alat kedokteran gigi. Dalam penelitian ini diharapkan pula dapat menentukan dosis minimal yang tepat dan aman dari *gardenia jasminoides* bagi penderita serta mampu meningkatkan ekspresi sel T sitotoksik dan sel NK sebagai komponen sel *immunesurveillance* inang dan dapat bersifat sebagai imunomodulator.

Dengan melakukan penelitian pada kandungan senyawa-senyawa aktif yang terkandung dalam daun *Gardenia jasminoides* tersebut, maka diharapkan dapat diperoleh obat alternatif yang sangat poten untuk penanganan luka akibat trauma pada waktu terjadi pencabutan gigi.

Permasalahan yang dihadapi saat ini adalah bagaimana cara mendapatkan senyawa aktif yang terkandung dalam daun *Gardenia jasminoides* sebab mungkin tidak semua komponen memiliki aktivitas yang dapat meningkatkan fungsi *immunosurveillance*. Oleh karena itu pada penelitian ini akan dicari suatu metode ekstraksi dan pemisahan komponen yang nantinya masing-masing fraksi atau komponen yang diperoleh dapat diuji aktivitasnya.

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun *Gardenia jasminoides* memiliki 4 komponen senyawa aktif yang dapat dipisahkan dengan kromatografi lapis tipis dengan fase gerak metanol:etil-asetat: n-heksana = 50:30:20. Spektra UV-Vis dan infra merah yang diperoleh menunjukkan bahwa keempat senyawa dalam ekstrak air bukan merupakan golongan alkaliioda.

Ke empat komponen senyawa bioaktif tersebut diaplikasikan pada luka bekas pencabutan gigi pada tikus putih strain wistar dengan konsentrasi berbeda yaitu 1,5% dan

3%. Dengan pengecatan imunohistokimia yang menggunakan antibodi monoklonal anti CD8 dan sel NK diperoleh bahwa komponen 3 dan 4 dengan konsentrasi 3% dapat meningkatkan ekspresi sel NK dan CD8. Berdasar hasil tersebut maka komponen senyawa bioaktif dari ekstrak *Gardenia jasminoides* dapat berfungsi sebagai imunomodulator karena mampu meningkatkan ekspresi sel NK dan sel T sitotoksik yang keduanya merupakan komponen pada sel *immunesurveillance*.

## PRAKATA

Dengan mengucapkan syukur Alhamdulillah, kami telah dapat menyelesaikan penelitian ini. Berbagai kendala telah dapat kami selesaikan dengan baik tanpa mengurangi validitas internal maupun eksternal dari penelitian ini. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun *Gardenia jasminoides* memiliki 4 komponen senyawa aktif yang dapat dipisahkan dengan kromatografi lapis tipis dengan fase gerak metanol:etil-asetat: n-heksana = 50:30:20. Spektra UV-Vis dan infra merah yang diperoleh menunjukkan bahwa keempat senyawa dalam ekstrak etanol bukan merupakan golongan alkalioda. Dengan pengecatan imunohistokimia ternyata dari 4 komponen yang diperoleh dalam penelitian ini hanya komponen 3 dan 4 yang dapat meningkatkan ekspresi sel NK dan sel T sitotoksik.

Akhirnya, pada kesempatan ini kami mengucapkan banyak terima kasih kepada :

1. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional yang telah memberi kesempatan kepada kami untuk ikut berkiprah memajukan penelitian di Indonesia serta memberdayakan kekayaan alam Indonesia.
2. Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Airlangga, yang telah memberi kesempatan dan fasilitas penelitian.
3. Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, yang telah memberi ijin dan fasilitas penelitian
4. Kepala Lab. Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah memberi fasilitas dalam penelitian ini.
5. Kepala Lab. Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, yang telah memberi kesempatan dan fasilitas penelitian.
6. Semua pihak yang telah membantu kelancaran penelitian

Semoga penelitian ini bermanfaat bagi kesehatan umat manusia

Surabaya, Maret 2009

Tim Peneliti,

## DAFTAR ISI

|  | HALAMAN |
|--|---------|
| HALAMAN PENGESAHAN                                   | i       |
| <b>A LAPORAN HASIL PENELITIAN</b>                    |         |
| RINGKASAN  | ii      |
| PRAKATA  | iv      |
| DAFTAR ISI   | v       |
| DAFTAR GAMBAR  | vii     |
| DAFTAR TABEL   | ix      |
| DAFTAR GRAFIK  | x       |
| <b>BAB 1   PENDAHULUAN</b>                           |         |
| 1.1. Latar Belakang Masalah                          | 1       |
| 1.2. Rumusan Masalah                                 | 3       |
| <b>BAB 2   TINJAUAN PUSTAKA</b>                      |         |
| 2.1. Tinjauan Tentang Tanaman Kaca Piring            | 4       |
| 2.1. 1 Klasifikasi Tanaman Kaca Piring               | 4       |
| 2.1. 2 Morfologi Tanaman Kaca Piring                 | 5       |
| 2.1.3 Kandungan Kimia dan Efek Farmakologis          | 6       |
| 2.1.3.1 Kandungan Ursolic Acid                       | 6       |
| 2.1.3.2 Kandungan Chlorogenic Acid                   | 7       |
| 2.1.3.3 Kandungan Geniposide                         | 9       |
| 2.2 Sel <i>Immunesurveillance</i>                    | 10      |
| 2.3 Proses penyembuhan luka                          | 11      |
| 2.4 Faktor Yang Mempengaruhi Proses Penyembuhan luka | 12      |
| <b>BAB 3   TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN</b>         |         |
| 3.1. Tujuan Khusus                                   | 14      |
| 3.2. Manfaat   | 14      |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| BAB 4 | METODOLOGI PENELITIAN                     |    |
|       | 4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian        | 15 |
|       | 4.2 Unit Analisis                         | 15 |
|       | 4.3 Banyaknya Replikasi                   | 15 |
|       | 4.4 Variabel Penelitian                   | 16 |
|       | 4.5 Lokasi Penelitian                     | 16 |
|       | 4.6 Tahapan Program Tahun I               | 17 |
|       | 4.7 Tahapan Program Tahun II              | 20 |
| <br>  |   |    |
| BAB 5 | HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN           |    |
|       | 5.1. Analisis Hasil Ekstraksi             | 23 |
|       | 5.2. Uji Aktivitas Sel T sitotoksik (CD8) | 31 |
|       | 5.3. Uji Aktivitas Sel NK                 | 34 |
| <br>  |   |    |
| BAB 6 | KESIMPULAN DAN SARAN                      | 38 |
| <br>  |   |    |
|       | DAFTAR PUSTAKA                            | 39 |

## DAFTAR GAMBAR

|             |  | Halaman |
|-------------|--|---------|
| Gambar 2.1  | Morfologi Tanaman <i>Gardenia jasminoides</i>  | 5       |
| Gambar 2.2. | Struktur Kimia Ursolic acid  | 7       |
| Gambar 2.3. | Struktur Kimia Chlorogenic Acid  | 8       |
| Gambar 2.4. | Struktur Kimia <i>Geniposide</i>   | 9       |
| Gambar 4.1  | Daun <i>Gardenia Jasminoides</i> kering  | 18      |
| Gambar 4.2  | Daun <i>Gardenia jasminoides</i> kering diserbuk dengan menggunakan blender  | 19      |
| Gambar 4.3  | Persiapan binatang coba  | 21      |
| Gambar 5.1  | Hasil Kromatografi Lapis Tipis (Silika gel GF 254) ekstrak air daun <i>Gardenia jasminoides</i> dengan pelarut ethanol dan eluen Metanol : Etil Asetat : n-Heksana = 50 : 30 : 20      | 24      |
| Gambar 5.2. | Hasil kromatogram ekstrak air daun <i>Gardenia jasminoides</i> dengan menggunakan Densito-meter Shimadzu CS/930. Terlihat ada 4 komponen senyawa aktif yang memberi puncak kromatogram | 25      |
| Gambar 5.3  | Spektra UV-Vis noda 1 hasil kromatografi lapis tipis ekstrak air daun <i>Gardenia jasminoides</i> dengan pelarut air dan eluen Metanol : Etil Asetat : n-Heksana = 50 : 30 : 20        | 26      |
| Gambar 5.4  | Spektra UV-Vis noda 2 hasil kromatografi lapis tipis ekstrak air daun <i>Gardenia jasminoides</i> dengan pelarut air dan eluen Metanol : Etil Asetat : n-Heksana = 50 : 30 : 20        | 26      |
| Gambar 5.5. | Spektra UV-Vis noda 3 hasil kromatografi lapis tipis ekstrak air daun <i>Gardenia jasminoides</i> dengan pelarut air dan eluen Metanol : Etil Asetat : n-Heksana = 50 : 30 : 20        | 27      |



|               |   |    |
|---------------|---|----|
| Gambar 5.6.   | Spektra UV-Vis noda 4 hasil kromatografi lapis tipis ekstrak air daun <i>Gardenia jasminoides</i> dengan pelarut air dan eluen Metanol : Etil Asetat : n-Heksana = 50 : 30 : 20 | 27 |
| Gambar 5.7.   | Spektra IR noda 1 hasil kromatografi lapis tipis ekstrak air daun <i>Gardenia jasminoides</i> dengan pelarut air dan eluen Metanol : Etil Asetat : n-Heksana = 50 : 30 : 20     | 28 |
| Gambar 5.8    | Spektra IR noda 2 hasil kromatografi lapis tipis ekstrak air daun <i>Gardenia jasminoides</i> dengan pelarut air dan eluen Metanol : Etil Asetat : n-Heksana = 50 : 30 : 20     | 29 |
| Gambar 5.9    | Spektra IR noda 3 hasil kromatografi lapis tipis ekstrak air daun <i>Gardenia jasminoides</i> dengan pelarut air dan eluen Metanol : Etil Asetat : n-Heksana = 50 : 30 : 20     | 30 |
| Gambar 5.10   | Spektra IR noda 4 hasil kromatografi lapis tipis ekstrak air daun <i>Gardenia jasminoides</i> dengan pelarut air dan eluen Metanol : Etil Asetat : n-Heksana = 50 : 30 : 20     | 30 |
| Gambar Lamp.1 | Hasil pemeriksaan imunohistokimia   | 42 |
| Gambar Lamp.2 | Sampel tanaman <i>Gardenia jasminoides</i> yang dipotret tanggal 24 Oktober 2007 dari habitatnya di Tulungagung dan digunakan dalam penelitian                                  | 46 |

## DAFTAR TABEL

|  | Halaman |
|--|---------|
| Tabel 5.1. Tabel 5.1. Beberapa eluen yang memberikan hasil kurang optimum  | 24      |
| Tabel 5.2. Hasil Kromatografi Lapis Tipis (Silika gel GF 254) ekstrak air daun <i>Gardenia jasminoides</i> dengan pelarut ethanol dan eluen Metanol : Etil Asetat : n-Heksana = 50 : 30 : 20   | 25      |
| Tabel 5.3. Puncak-puncak Spektra UV-Vis noda hasil kromatografi lapis tipis ekstrak etanol daun <i>Gardenia jasminoides</i> menggunakan spektrofotometer Perkin-Elmer  | 28      |
| Tabel 5.4. Jumlah sel CD8 pada tikus kontrol maupun yang mendapatkan perlakuan dengan beberapa isolat <i>Gardenia jasminoides</i> dengan konsentrasi 1,5% dalam campuran propilen glikol 500 dan propilenglikol 4000 sama banyak ditentukan dengan metode <i>Immunohistochemistry</i> (IHC). | 32      |
| Tabel 5.5. Jumlah sel CD8 pada tikus kontrol maupun yang mendapatkan perlakuan dengan beberapa isolat <i>Gardenia jasminoides</i> dengan konsentrasi 3% dalam campuran propilen glikol 500 dan propilenglikol 4000 sama banyak ditentukan dengan metode <i>Immunohistochemistry</i> (IHC).   | 32      |
| Tabel 5.6. Jumlah sel NK pada tikus kontrol maupun yang mendapatkan perlakuan dengan beberapa isolat <i>Gardenia jasminoides</i> dengan konsentrasi 1,5% dalam campuran propilen glikol 500 dan propilenglikol 4000 sama banyak ditentukan dengan metode <i>Immunohistochemistry</i> (IHC).  | 35      |
| Tabel 5.7. Jumlah sel NK pada tikus kontrol maupun yang mendapatkan perlakuan dengan beberapa isolat <i>Gardenia jasminoides</i> dengan konsentrasi 3% dalam campuran propilen glikol 500 dan propilenglikol 4000 sama banyak ditentukan dengan metode <i>Immunohistochemistry</i> (IHC).    | 35      |

## DAFTAR GRAFIK

|   | Halaman |
|---|---------|
| Grafik 5.1  | 33      |
| Profil peningkatan jumlah sel CD8 pada kontrol dan perlakuan menggunakan isolat 1,2,3,dan 4 kadar 1,50% dan 3,00% ekstrak <i>Gardenia jasminoides</i> menggunakan metode <i>Immunohistochemistry</i> (IHC). |         |
| Grafik 5.2  | 36      |
| Profil peningkatan jumlah sel NK pada kontrol dan perlakuan menggunakan isolat 1,2,3,dan 4 kadar 1,5% dan 3% ekstrak <i>Gardenia jasminoides</i> menggunakan metode <i>Immunohistochemistry</i> (IHC).      |         |

## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang Masalah

Di bidang kedokteran gigi, tindakan perawatan gigi dan mulut seringkali berkaitan dengan luka. Pencabutan gigi merupakan tindakan yang menimbulkan luka pada jaringan lunak dan jaringan keras. Luka adalah kerusakan pada jaringan tubuh oleh karena adanya jejas atau trauma yang menyebabkan gangguan kontinuitas yang normal dari struktur jaringan. Proses yang kemudian terjadi pada jaringan yang rusak adalah penyembuhan luka.

Luka pada pencabutan gigi seringkali ditemukan dalam keadaan kronis. Hal itu dikarenakan trauma mekanik yang sering terjadi, misalnya menyikat gigi yang terlalu keras sehingga melukai mukosa rongga mulut dan bekas luka pencabutan. Pada pencabutan dengan komplikasi dan odontektomi sering terjadi gangguan proses penyembuhan sebanyak 20% – 50 % (Peterson LJ et al, 2007). Kondisi kronis tersebut dapat terjadi karena infeksi, mengingat bahwa dalam rongga mulut terdapat berbagai macam mikroorganisme. Luka pencabutan gigi yang lama sembuh seringkali menimbulkan keluhan dari penderita antara lain rasa sakit, perdarahan, pembengkakan, gangguan fungsi pengunyahan, gangguan fungsi bicara dan bahkan bisa terjadi infeksi. Bila penatalaksanaan percepatan penyembuhan luka tidak diperhatikan dengan serius akan mengakibatkan gangguan penyembuhan luka yang lebih lama. Hal utama yang harus diperhatikan pada tindakan pencabutan gigi adalah percepatan proses penyembuhan luka pasca pencabutan.

Kenyataan yang ada di masyarakat, penderita cenderung menginginkan perawatan kesehatan gigi dengan cepat karena kesibukan sehingga sulit meluangkan waktu. Hal ini menjadikan pencabutan gigi adalah pilihan alternatif untuk waktu yang sempit tersebut, namun sering ditemukan penyembuhan luka yang lambat sehingga aktifitas penderita terganggu

Tanaman obat mempunyai peran kunci dalam perkembangan modern untuk studi aktifitas biologi dari substansi bioaktif yang dikandungnya. Pengobatan tradisional melalui penggunaan tanaman obat dapat diselaraskan dan digunakan untuk

pengembangan obat-obat baru. Penggunaan tanaman obat untuk pengobatan diyakini hanya mengandung sedikit sifat toksik dibanding komponen senyawa kimia sintetis. *Gardenia jasminoides* merupakan salah satu tanaman obat yang merupakan kekayaan alam di Indonesia (Depkes, 1987; Depkes 1997). Menurut Aliadi (1996); Chen Li *et al*, (2001) kandungan kimia dari *Gardenia jasminoides* (daun kaca piring) terdiri dari minyak atsiri, gardenosid, geniposid, krosin, dekstrosan dan manit. Minyak atsiri mempunyai sifat anti septik, anti oksidan dan mempunyai aktifitas anti bakteri dan jamur

Perkembangan terakhir dari penelitian tentang infusa *Gardenia jasminoides* dapat meningkatkan proses proliferasi sel fibroblas secara *in vitro* (Putri A dan Retno.P R, 2006), hal ini diduga *gardenia jasminoides* juga mengandung komponen hormon pertumbuhan untuk fibroblas. Mengingat sifat *Gardenia jasminoides* sebagai anti bakteri dan jamur (Yifang, 2002), maka kemungkinan pemberian bioaktif fraksi ethanolnya dapat mempengaruhi komponen sel *immunesurveillance* inang, dalam hal ini adalah sel T sitotoksik dan sel NK yang berfungsi sebagai pertahanan lini terdepan terhadap virus dan bakteri (Retno,1997). Bersama dengan makrofag ke 2 sel tersebut akan berkerja bersama dalam mengeliminasi sel target sehingga diperoleh kondisi homeostasis pada inang. Mengingat *Gardenia jasminoides* mempunyai sifat anti oksidan, anti bakteri dan anti virus maka diyakini dapat pula mengaktifasi respons imun tubuh. Namun demikian, belum ada laporan yang pasti tentang senyawa-senyawa kimia yang terkandung dalam daun kacapiring yang dapat mengaktifasi fungsi *immunesurveillance* pada proses penyembuhan luka pasca pencabutan gigi.

Hasil penelitian PHB tahun I didapatkan 4 komponen fraksi aktif *gardenia jasminoides* yang diduga dapat meningkatkan komponen sel *immunesurveillance* yaitu sel NK dan sel T sitotoksik (CD) pada tikus strain wistar. Dengan demikian melalui berbagai uji laboratories lebuh lanjut diharapkan dapat diaplikasikan pada pasca pencabutan.

Penggunaan obat alternatif dapat memenuhi harapan tersebut karena menguntungkan dari segi ekonomis. Oleh karena itu, penelitian ini dapat menjadi kajian ilmiah bagi pengembangan obat tradisional yang dapat menemukan komponen bioaktif yang terkandung dalam tanaman *Gardenia jasminoides* sehingga dapat meningkatkan efektifitas pendayagunaan tanaman tersebut sebagai obat alternatif yang dapat mempercepat proses penyembuhan luka.

Dalam penelitian ini diharapkan pula dapat menentukan dosis minimal yang tepat dan aman dari *gardenia jasminoides* serta mampu meningkatkan kualitas ekspresi sel T sitotoksik dan sel NK sebagai komponen sel *immunesurveillance* inang dan dapat bersifat sebagai imunomodulator. Dengan melakukan penelitian pada kandungan senyawa-senyawa aktif yang terkandung dalam daun kacapiring tersebut, maka diharapkan dapat diperoleh obat alternatif yang poten untuk penanganan luka akibat trauma pada pencabutan gigi.

Permasalahan yang dihadapi adalah bagaimana cara mendapatkan senyawa aktif yang terkandung dalam daun *Gardenia jasminoides* sebab mungkin tidak semua komponen memiliki aktivitas yang dapat meningkatkan fungsi *immunosurveillance*, dan apakah senyawa aktif yang ditemukan tersebut dapat meningkatkan ekspresi dari CD8 dan sel NK

#### **RUMUSAN MASALAH :**

1. Berapakah jenis senyawa aktif yang dapat diidentifikasi pada ekstrak etanol *Gardenia jasminoides* untuk uji aktivitas dalam meningkatkan fungsi *immunosurveillance* ?
2. Apakah senyawa aktif yang diidentifikasi dari ekstrak etanol *Gardenia jasminoides* dapat meningkatkan ekspresi CD8 ?
3. Apakah senyawa aktif yang diidentifikasi dari ekstrak etanol *Gardenia jasminoides* dapat meningkatkan ekspresi sel NK ?

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Kacapiring (*Gardenia jasminoides*)

Bunga Kacapiring (*Gardenia jasminoides*) mempunyai sinonim *Gardenia augusta* dan termasuk dalam familia *Rubiaceae*. Selain itu, kacapiring juga memiliki nama yang berbeda di berbagai daerah seperti Ceplong piring di Jawa, Jempiring di Bali, Meulu bruek, dan Raja putih di Aceh. Kacapiring banyak dipelihara orang sebagai tanaman hias atau pagar hijau dengan aroma yang harum. Kacapiring termasuk tumbuhan perdu yang berumur tahunan serta banyak memiliki cabang dan daun yang lebat. Kacapiring mudah tumbuh di sembarang tempat, baik di daerah dingin maupun panas. Namun, tumbuhan ini lebih cocok di daerah pegunungan atau lokasi yang tingginya lebih dari 400 meter di atas permukaan laut. Batangnya bulat, berkayu, bercabang, hijau kecoklatan dan pohonnya mencapai ketinggian 1-2 meter (Heyne, 1987).

#### 2.2.1 Klasifikasi Tanaman Kacapiring

Klasifikasi bunga Kacapiring

Kingdom : *Plantae*

Subkingdom : *Tracheobionta*

Super divisi : *Spermatophyta*

Divisi : *Magnoliophyta*

Class : *Magnoliopsida*

Subclass : *Asteridae*

Ordo : *Rubiales*

Famili : *Rubiaceae*

Genus : *Gardenia ellis*

Species : *Gardenia jasminoides*

Sinonim : *Gardenia augusta*, *Gardenia florida*, *Gardenia grandiflora*

### 2.2.2 Morfologi Kacapiring

Bunganya kacapiring berukuran besar seperti bunga mawar putih dengan tajuk-tajuk melingkar dan tersusun membentuk satu-kesatuan yang anggun. Daunnya berbentuk oval, tebal, licin, tebal, pangkal dan ujung runcing, tepi rata dengan panjang 5-8 cm, lebar 3-4 cm, dan mengkilat pada permukaan atas daun. Bunganya tunggal, tangkai pendek, berbentuk terompet dengan panjang 6-9 cm berwarna putih. Karena baunya yang harum, kacapiring memiliki nilai komersil sebagai minyak wangi (Heyne, 1987).



Gambar 2.1. Morfologi Tanaman *Gardenia jasminoides*  
([www.semencesdupuy.com](http://www.semencesdupuy.com))

*Gardenia jasminoides* (kaca piring) termasuk dalam famili Rubiaceae dan banyak dipelihara orang sebagai tanaman hias. Buah dari tanaman ini masuk kelompok " *Oriental medicine* " yang digunakan untuk terapi inflamasi, *jaundice*, *headache*, edema, fever, *hepatic disorder* dan hipertensi (Lee at al., 2006). Keharuman bunganya membuat kaca piring mempunyai nilai komersil dibuat minyak wangi. *Gardenia jasminoides* dengan kandungan *iridoid glycosides* (geniposide dan *gardenoside*), *chlorogenic acid*, and *ursolic acid* mampu mengurangi berbagai syptom seperti iritasi, insomnia, bleeding, jaundice, yang skin eruptions (Yifang, 2002). Menurut Aliadi (1996), kandungan kimia dari *Gardenia jasminoides* (daun kaca piring) terdiri dari minyak atsiri, gardenosid, krosin, dekstrosan dan manit. Minyak atsiri mempunyai sifat anti septik, anti oksidan dan mempunyai aktifitas anti



2.2.3. Morfologi kacangring

Bunganya kacangring berwujud besar seperti bunga mawar putih dengan tangkainya melengkang dan terasum membentuk satu kesatuan yang anggun. Bunganya berbentuk oval, tebal, licin, pangkal dan ujung runcing, tepi rata dengan panjang 7-8 cm, lebar 3-4 cm, dan mengkilat pada permukaan atas dan belakang tunggal. Tangkai pendek, berbentuk terpotong dengan panjang 6-9 cm berwarna putih. Kewanibungaan yang harum, kacangring memiliki nilai komersi sebagai minyak wangi (Hidayat, 1987).



Gambar 2.1. Morfologi Tanaman *Cassia javanica* (kacangring) (Hidayat, 1987)

Gairah *Javanica* (kaca piring) termasuk dalam famili Rubiaceae dan banyak dipelihara orang sebagai tanaman hias. Buah dari tanaman ini banyak digunakan sebagai "obat jerawat" yang digunakan untuk terapi infamasi, jerawat, jerawat, edema, jerawat, jerawat dan piodermitis (Lee et al., 2006). Kewanibungaan kacangring memiliki komersi dalam minyak wangi. Gairah *Javanica* dengan kandungan senyawa glikosida (glikosida dan glikosida), *chlorogenic acid* and *rosmarinic acid* mampu mengurangi berbagai symptom seperti iritasi, inflamasi, bledih, jaundice, yang skin eruptions (Yahya, 2002). Menurut Alabi (1992), kandungan kimia dari Gairah *Javanica* (dan kaca piring) terdiri dari minyak atsiri, gairah, kresol, dekarosan dan minyak atsiri merupakan film anti septik, anti oksidan dan merupakan efektifitas anti

bakteri dan jamur. Itulah sebabnya maka *gardenia jasminoides* dapat digunakan sebagai obat pada recurrent aphthous stomatitis (Depkes, 1987).

### 2.2.3 Kandungan Kimia dan Efek Farmakologis

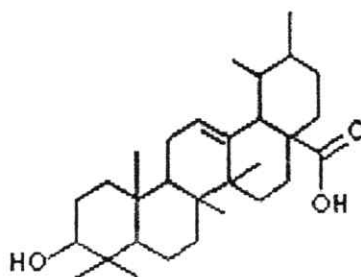
Komponen aktif daun kacapiring adalah *gallocatechin, gallic acid, and ursolic acid*. Kandungan *chlorogenic acid* 20 % mempunyai sifat anti oksidan, anti bakteri, dan anti virus. Selain itu, dengan rasa pahit dan sedikit asam, tanaman ini diindikasikan memiliki khasiat sebagai antibiotik, antiinflamasi, antipiretik, mampu membersihkan darah dan menghilangkan pembekuan darah (Heming, 2000).

Pada penelitian Djulaeha (1999), khasiat daun kacapiring dengan konsentrasi 10% dan 15% dapat menyebabkan penurunan koloni *candida albicans*, dapat dipakai sebagai obat kumur tradisional yang mempunyai efek fungisid.

Infusa daun *Gardenia jasminoides* pada konsentrasi 10 g/ml merupakan dosis minimal yang dapat meningkatkan proliferasi sel fibroblas secara *in vitro* (Putri dan Retno, 2006). Selain mempunyai efek anti inflamasi (Yao *et al*, 1991), pada kandungan *chlorogenic acid* 20% *Gardenia jasminoides* mempunyai sifat anti oksidan, anti bakteri dan anti virus (Yifang, 2002). Hal ini dibuktikan oleh (Li Chen *al*, 2001) dalam penelitiannya dimana ekstrak *Gardenia jasminoides* dapat menurunkan bakteri *actinomyces naeslundii* dan *actinomyces viscosus* penyebab karies gigi.

#### Kandungan *Ursolic acid*

*Ursolic acid* merupakan salah satu kandungan kimia dalam kacapiring yang termasuk dalam golongan *pentacyclic triterpenoid* yang memiliki sinonim *malol, micromerol, urson, prunol, (3β)-3-hydroxyurs-12-en-28-oic acid*. Zat ini memiliki daya larut yang buruk terhadap air, namun memiliki daya larut yang lebih baik pada alkohol, eter, asam asetat, dan daya larut paling baik terdapat pada aseton. Selain itu, *ursolic acid* terkandung pada beberapa macam tanaman seperti buah arbei, lembayung muda, dan beberapa macam rempah-rempah.



Gambar 2.2. Struktur Kimia *Ursolic acid*  
(Chemical land 21.com)

*Ursolic acid* berkhasiat untuk pengobatan, baik secara topikal atau pengobatan dari dalam sebagai anti inflamasi, anti tumor, anti mikroba, anti oksidan, anti virus, anti jamur dan anti bakteri . Pada beberapa penelitian menunjukkan bahwa *ursolic acid* ini cukup efektif dalam mencegah pertumbuhan *Candida albicans* dan *Microsporium lenosum*, sedangkan pada penggunaan secara topikal ternyata mampu menjadi penghambat pertumbuhan *TPA* sebagai awal pertumbuhan suatu tumor (Subbaramaiah K.et .al; 2000).

Penelitian eksperimental menemukan bahwa level dari protein antiapoptosis Bcl-2 menurun setelah diterapi dengan *ursolic acid*. Dari hasil tersebut mengindikasikan bahwa *ursolic acid* menginduksi terjadinya proses apoptotic pada sel kanker endometrial *poorly differentiated* yang terjadi melalui mekanisme yang disertai jalur mitokondia dan Bcl-2 *family protein* (Achiwa et. al; 2005).

Pengobatan dengan *ursolic acid* dapat menekan mediasi *phorbol 12-myristate 13-acetate* (PMA) untuk menginduksi protein COX-2 dan sintesis PGE<sub>2</sub>. Selain itu *ursolic acid* juga menekan induksi dari m-RNA COX-2 oleh PMA. Overekspresi dari COX-2 akan mempercepat angiogenesis dan menekan apoptosis, dan *ursolic acid* menghambat kedua efek tersebut. *Selective inhibitor* COX-2 dapat menurunkan formasi tumor pada binatang coba (Subbaramaiah K.et.al.; 2000).

### **Kandungan *Chlorogenic acid***

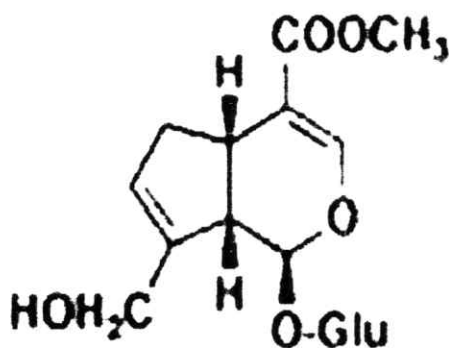
*Chlorogenic acid* merupakan salah satu fenol alam yang terdapat pada beberapa daun dari tumbuhan dikotil dan memiliki sinonim *3-O-Caffeoylquinic acid*; *Heriguard*; dan *NSC*. Zat ini tersedia sebagai *crystalline solid*. *Chlorogenic acid*



dari sel JB6P<sup>+</sup>. *Chlorogenic acid* juga dapat meningkatkan aktivitas enzimatis dari glutathion S-transferase (GTS) dan NAD(P)H. Hasil tersebut merupakan bukti utama bahwa *Chlorogenic acid* dapat melindungi tubuh melawan agen karsinogen dan diyakini bahwa *Chlorogenic acid* memiliki efek kemopreventif (Rentian Feng, et.al.; 2005)

### Kandungan *Geniposide*

*Geniposide* merupakan salah satu kandungan kimia daun kacapiring yang dapat mencegah *neuronal cell death* yang diakibatkan oleh berkurangnya faktor oksigen dan glukosa (*OGD damage*). Selain itu, *geniposide* yang telah diubah menjadi genipin mampu memberikan efek anti inflamasi, sehingga beberapa peneliti menduga *geniposide* merupakan komponen aktif yang penting dimiliki oleh kacapiring (Lee et al, 2006).



Gambar 2.4. Struktur Kimia *Geniposide*  
(www.axxora.com)

*Geniposide* menurunkan kerusakan DNA dan hepatogenesis yang diinduksi oleh aflatoksin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) dengan cara mengaktivasi enzim glutathion S-transferase (GST) dan GSH peroksidase (GSH-Px). Pengobatan dengan *geniposide* dapat menyebabkan fragmentasi DNA pada sel glioma. *Geniposide* menunjukkan aktivitas penghambatan sintesa DNA pada sel kanker. *Geniposide* menginduksi terjadinya apoptosis melalui aktivasi JNK/Jun/Fas L/Fas/caspase 8/caspase 3, jalur bebas mitokondria (Peng C.H.. et.al.; 2005). *Geniposide* juga telah terbukti potensial untuk detoksifikasi dengan cara

menginduksi aktivitas GST melalui peningkatan transkripsi dari GSTM1 dan GSTM2 (Wu-Hsien Kuo.et.al; 2005).

## 2.2 Sel *Immunesurveillance*

Pertahanan tubuh terhadap virus/bakteri dikenal sebagai *immunesurveillance* yang diperankan secara aktif oleh sel T sitotoksik, sel NK dan makrofag (Retno,1997; Nadine Y et al, 2002.), dan sel NK sebagai pertahanan lini terdepan terhadap virus dan bakteri. Ke tiga sel tersebut akan berkerja bersama dalam mengeliminasi sel target sehingga diperoleh kondisi homeostasis pada inang. Hilangnya kemampuan *Immunesurveillance* kemungkinan ada kerusakan sistem imun. Konsep *immunesurveillance* yaitu fungsi limfosit T senantiasa memantau pertumbuhan jaringan tubuh dalam mencari dan menemukan sel asing yang menunjukkan adanya antigen yang tidak lazim ditemukan pada sel normal.

Sel utama yang berperan pada respons imun seluler adalah limfosit sel T sitotoksik, yang dapat mengaktifkan fungsi sitotoksitasnya apabila imunogen dipresentasikan oleh MHC yang sesuai. Proses pembunuhan sel sasaran oleh sel T sitotoksik berbeda dengan proses lisis oleh komplemen. Pada proses ini terjadi apoptosis yaitu fragmentasi DNA dan disintegrasi sel menjadi fragmen-fragmen (Darwin E, 2006). Sel T sitotoksik memiliki kemampuan untuk melisis sel target melalui ikatan dengan molekul MHC kelas I dengan cara melepaskan enzim perforin dan gransim (Lisa M et al, 2004). Kemampuan sel T sitotoksik untuk membunuh sel sasaranditentukan oleh beberapa hal antara lain : sel T sitotoksik hanya akan membunuh sel asaran yang mempresentasikan MHC kelas I yang relevan dengan antigen mikroorganisme yang telah mengaktifkannya dan MHC kelas I merupakan antigen utama yang dapat dikenal oleh sel T sitotoksik, karena MHC kelas I terdapat pada hampir seluruh sel dalam tubuh (Darwin E, 2006).

Populasi sel efektor yang berperan pada respons imun seluler adalah sel NK dan makrofag. Sel NK dapat mensekresi IL-1 melalui stimulasi oleh IL-2 sehingga dapat membunuh sel sasaran tanpa melalui pemaparan imunogen (Lamont RJ et al, 2006).

Sel NK (*Natural Killer Cell*) dapat menghancurkan sel target tanpa sensitisasi sedangkan makrofag dengan bantuan sitokin dapat menghancurkan sel target. Aktivitas sel NK diaktivasi oleh IFN yang diproduksi oleh sel Th1. Stimulasi

makrofag mengakibatkan makrofag melepaskan sitokin proinflamatori antara lain TNF- $\alpha$ , IL-1 dan IL-6 (Abbas, 2005; Masaki et al, 2006).

### 2.3 Proses penyembuhan luka

Penyembuhan luka merupakan respons terhadap proses radang pada organ dalam atau dapat terjadi sel nekrosis pada organ yang tidak mampu melakukan regenerasi (Kumar et al, 2005). Tujuan utama penyembuhan luka adalah mencapai integritas anatomi bagian yang luka, memperbaiki fungsi seutuhnya dan menghasilkan bekas luka dengan dengan kehilangan fungsi yang minimal dan sebisa mungkin tidak terlihat adanya bekas luka.

Penyembuhan luka pencabutan gigi tidak berbeda dengan penyembuhan luka di bagian tubuh lainnya. Perbaikan luka di mukosa rongga mulut sama dengan prinsip perbaikan luka di kulit. Perbedaannya terletak pada kemampuan jaringan dalam memperbaiki arsitektur jaringan untuk menjadi normal kembali.

Proses penyembuhan luka pencabutan gigi meliputi beberapa proses (Sjamsuhidayat, 2003; Kumar et al, 2005) :

1. Tahap radang : Berlangsung sejak terjadi luka hingga hari ke lima. Pembuluh darah yang terputus pada luka akan mengakibatkan perdarahan dan tubuh akan berusaha menghentikan dengan vasokonstriksi, retraksi bekuan darah dan reaksi hemostasis. Aktivitas seluler yang terjadi adalah pergerakan leukosit yang diaktifasi oleh TNF- $\alpha$ , IL-1, ICAM dan VCAM akan menembus dinding pembuluh darah menuju daerah luka karena adanya daya kemotaksis. Leukosit mengeluarkan enzim hidrolitik yang membantu mencerna bakteri dan benda asing lainnya serta berfungsi untuk menghancurkan jaringan nekrotik. Tahap selanjutnya muncul limfosit, monosit atau makrofag yang akan membantu fagositosis jaringan nekrotik dan benda asing lainnya. Pada tahap ini luka hanya terisi oleh fibrin yang memiliki sedikit kekuatan regangan.
2. Tahap proliferasi : yaitu proses proliferasi fibroblas. Tahap ini berlangsung dari akhir tahap radang sampai akhir minggu ke 3. Fibroblas menghasilkan mukopolisakarida, asam aminoglisin dan prolin yang merupakan bahan dasar serabut kolagen dan akan menstabilisasi fibrin serta akan menyatukan tepi luka. Pada tahap ini serabut kolagen dibentuk dan dihancurkan kembali untuk penyesuaian diri dengan tegangan pada luka yang cenderung retraksi. Pada tahap

akhir kekuatan kekuatan regangan luka mencapai 25 % pada jaringan normal. Selanjutnya tahap remodeling didapatkan kekuatan serabut kolagen akan bertambah karena ikatanintramolekul dan antarmolekul. Pada tahap proliferasi luka pencabutan akan dipenuhi sel radang, fibroblas dan kolagen membentuk jaringan berwarna kemerahan dengan permukaan yang menonjol halus yang dikenal dengan jaringan granulasi. Dengan tertutupnya permukaan luka maka proses fibroplasia dengan pembentukan jaringan granulasi juga akan terhenti dan mulai dengan proses pematangan tahap remodeling.

3. Tahap remodeling : merupakan tahap akhir perbaikan luka yaitu terjadi proses pematangan yang terdiri atas penyerapan kembali jaringan yang berlebihan. Terjadi retraksi sesuai dengan gaya gravitasi dan akhirnya terbentuk jaringan yang baru. Tahap ini dapat berlangsung ber bulan-bulan dan dinyatakan berakhir kalau semua tanda radang tidak ditemukan.

#### **2.4 Faktor Yang Mempengaruhi Proses Penyembuhan Luka**

Beberapa faktor yang berpengaruh pada proses penyembuhan luka (Sabiston, 1992) :

1. Suplai darah : merupakan faktor yang sangat penting dalam proses penyembuhan luka. Sirkulasi darah normal menuju ke soket gigi diperlukan untuk mempercepat proses penyembuhan luka. Iskemia dapat menimbulkan nekrotik jaringan dan mengurangi pengangkutan antibodi, leukosit dan antibiotik ke daerah luka, hal ini karena mengurangi pengantaran oksigen dan nutrisi yang diperlukan untuk proses penyembuhan.
2. Infeksi : merupakan salah satu faktor yang menyebabkan proses penyembuhan terhambat. Dalam rongga mulut ditemukan berbagai macam bakteri dan jamur yang tumbuh sehingga kontaminasi bakteri sangat tinggi. Bakteri yang masuk ke tubuh akan melepaskan eksotoksin yang dapat menimbulkan efek imunopatologi yang dapat mengakibatkan kerusakan jaringan mukosa rongga mulut, perdarahan dan nekrosis Infeksi yang timbul akan mengganggu pembentukan jaringan granulasi dan mencegah epitelisasi permukaan luka.
3. Benda asing : Benda asing merupakan hal yang paling sering menyebabkan komplikasi pada proses penyembuhan luka setelah pencabutan gigi. Benda asing terdiri dari bakteri dan non bakteri dapat menyebabkan masalah yang mendasar dalam proses penyembuhan yaitu bakteri dapat berproliferasi dan menyebabkan



infeksi dengan melepaskan protein bakteri yang dapat merusak jaringan inang. Benda asing seringkali bersifat antigenik dan dapat menstimulasi reaksi radang kronis yang dapat mengurangi terjadinya fibroplasi

4. Lokasi luka : Luka pada daerah dengan vaskularisasi yang baik proses penyembuhan akan lebih cepat dibanding dengan luka pada daerah dengan vaskularisasi darah yang kurang. Luka pencabutan yang luas dapat mempengaruhi penyembuhan karena membutuhkan waktu penyembuhan yang lama. Untuk mengurangi waktu penyembuhan dapat dilakukan penjahitan karena akan mengurangi besarnya daerah luka dan akan melindungi bekuan darah, jaringan granulasi terhadap faktor iritasi dan proliferasi epitel yang penting untuk penutupan luka.



## BAB 3

### TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

#### 3.1 TUJUAN PENELITIAN

##### Tujuan Umum :

Untuk mencari senyawa bioaktif dari ekstrak etanol *Gardenia jasminoides* yang dapat meningkatkan ekspresi sel *immunesurveillance* pada tikus putih wistar.

##### Tujuan Khusus :

1. Memperoleh senyawa bioaktif dari ekstrak etanol *Gardenia jasminoides* beserta karakterisasinya.
2. Membuktikan kemampuan ekstrak etanol *Gardenia jasminoides* dalam meningkatkan ekspresi sel *immunesurveillance* yaitu sel NK dan CD8.
3. Memberikan pertimbangan untuk pengembangan produksi komponen bioaktif ekstrak etanol *Gardenia jasminoides* untuk terapi proses penyembuhan luka pada rongga mulut pada industri farmasi dan obat-obatan.

#### 3.2 MANFAAT PENELITIAN

##### Manfaat Teoritis

1. Memberikan kontribusi keilmuan tentang komponen senyawa aktif yang dikandung oleh *Gardenia jasminoides*
2. Memberikan kontribusi keilmuan tentang dasar mekanisme kerja *Gardenia jasminoides* pada proses penyembuhan luka akibat pencabutan gigi.

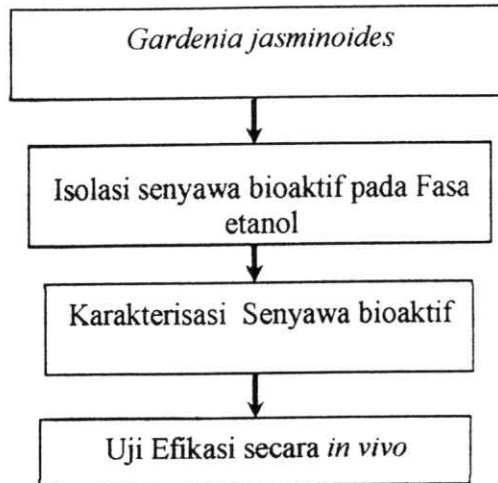
##### Manfaat Praktis

1. Dengan ditemukan komponen senyawa bioaktif pada *Gardenia jasminoides* maka diharapkan dapat digunakan sebagai model pengembangar. obat untuk terapi luka melalui jalur aktivasi fungsi *immunosurveillance*
2. Dapat menggali kekayaan alam tumbuhan Indonesia untuk digunakan sebesar-besarnya bagi kesejahteraan umat manusia.

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

Penelitian ini berlangsung melalui dua program penelitian selama dua tahun. Rangkaian program seperti pada *flowchart* dibawah ini :



#### 4.1 Jenis dan Rancangan penelitian

Jenis penelitian adalah eksperimental laboratorik dengan rancangan *post test only control group design*

#### 4.2 Unit Analisis

Unit analisis adalah hasil biopsi pada soket pasca pencabutan gigi insisif rahang bawah tikus putih jantan strain wistar yang diaplikasi dengan komponen bioaktif ekstrak *Gardenia jasminoides*

#### 4.3 Banyaknya Replikasi

Jumlah replikasi untuk penelitian eksperimental laboratories ditentukan menggunakan rumus (Gaspersz, 1991) adalah:

$$r = \frac{2t^2 \cdot (s)^2}{d^2}$$

$t^2_{0,05/2}$  pada derajat bebas 27 = 2,027; s = 0,28; d = 0,4

$$r = \frac{2 \cdot (2.027)^2 \cdot (0,28)^2}{(0,4)^2} = 4,03 \approx 4$$

Jadi banyaknya replikasi tiap-tiap perlakuan adalah 4 kali.

#### 4.4 Variabel Penelitian

Variabel Bebas : konsentrasi komponen bioaktif dari ekstrak etanol *Gardenia jasminoides*

Variabel Tergantung : Ekspresi sel NK dan sel T sitotoksik

Variabel Kendali : Tikus putih strain wistar

#### Difinisi Operasional

1. Konsentrasi komponen bioaktif Ekstrak etanol *Gardenia jasminoides* adalah komponen yang diperoleh dari ekstrak etanol *Gardenia jasminoides* dengan konsentrasi 1,5 % dan 3%. Daun diambil pada 1-3 daun dari pucuk.
2. Ekspresi sel NK dan sel T sitotoksik adalah jumlah sel yang terkspresi dari hasil pengecatan imunohistokimia dengan antibodi monoklonal anti CD8 dan sel NK. Sel dihitung dengan graticulae dan dilihat dibawah mikroskop dengan pembesaran 400 X
3. Tikus putih strain wistar adalah tikus wistar dengan kriteria tertentu untuk homogenisasi antara lain umur 3 bulan, BB 250-300 g, pakan, air minum aqua, cara pemeliharaan dan cara pencabutan gigi

#### 4.5 Lokasi Penelitian

1. Ekstraksi komponen senyawa bioaktif *Gardenia jasminoides* dilakukan di lab. Fitokimia Fakultas Farmasi Unair
2. Perlakuan pada binatang coba dan biopsi dilakukan di Lab. Biokimia FK Unair
3. Pembuatan preparat untuk pengecatan imunohistokimia dilakukan di Lab. PA RSUD. Dr. Soetomo Surabaya
4. Pengecatan imunohistokimia untuk CD 8 dan sel NK dilakukan di Gramik FK Unair

#### 4.6 Tahapan Program Tahun I yang telah dilakukan :

Untuk mencapai sasaran yang diinginkan pada penelitian tahun pertama ini maka dilakukan langkah-langkah penelitian sebagai berikut :

- Penyiapan sampel daun *Gardenia jasminoides*
- Melakukan optimasi metode isolasi
- Melakukan ekstraksi dan identifikasi fraksi-fraksi bioaktif
- Melakukan karakterisasi pada semua komponen fraksi air hasil pemisahan kromatografi lapis tipis dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan FT-IR.

##### a. Bahan dan Alat Penelitian :

Bahan yang dipakai untuk isolasi senyawa aktif *Gardenia jasminoides* adalah chloroform, etanol, etil asetat.

Alat yang dipergunakan dalam penelitian ini HPLC kolom preparatif, Spectrophotometer UV-Vis, Mass Spectrophotometer, NMR-H1, FT-IR, plat KLT (Silicagel 60 F<sub>254</sub> 0.2 mm), Densitometer, Sonikator dengan tempertur netral, volumetri flasks.

##### b. Metode Percobaan :

Metode penelitian yang dipakai dari tahapan penelitian ini berdasarkan modifikasi metode ekstraksi untuk mendapatkan berbagai fraksi dari berbagai pelarut yang telah dipisahkan menggunakan Kromatografi lapis tipis dari ekstrak tanaman obat. Masing-masing isolat yang didapat diuji aktivitasnya. Isolat yang memiliki aktivitas terbesar dimurnikan lagi dan dilakukan karakterisasi dari senyawanya dengan menggunakan Spectrophotometer UV-Vis, TLC-Densitometer dan FT-IR.

#### **Penyiapan Ekstrak Etanol**

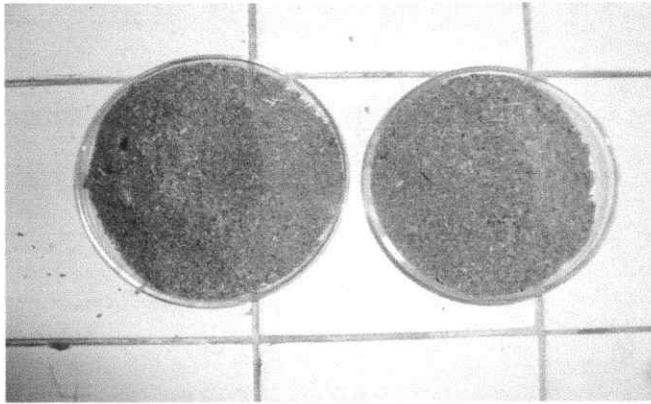
Sebelum dilakukan ekstraksi, daun *Gardenia jasminoides* dikeringkan terlebih dahulu untuk mendapatkan standar berat yang konstan. Daun *Gardenia jasminoides* dikeringkan dengan cara di angin-anginkan hingga kering. Pengeringan dengan sinar matahari langsung dihindari dalam penelitian ini untuk mencegah rusak atau

berubahnya kandungan senyawa aktif yang terdapat di dalamnya. Hasil yang diperoleh dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



Gambar 4.1 Daun *Gardenia jasminoides* yang sudah kering dengan diangin-anginkan.

Setelah didapatkan daun kering *Gardenia jasminoides*, kemudian dilakukan penghancuran dengan menggunakan blender. Penghancuran tidak dilakukan pada saat daun masih basah karena sangat berpengaruh pada hilang atau berkurangnya komponen yang terkandung dalam daun sehingga dapat menyulitkan atau bahkan menyebabkan kesalahan identifikasi yang dilakukan. Hasil berupa serbuk kering *Gardenia jasminoides* ini kemudian diayak dengan menggunakan ayakan *mesh* 40 dan dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama dalam wadah yang tertutup rapat kedap cahaya dengan pemberian kristal pengering untuk menjaga kelembabannya. Serbuk kering daun *Gardenia jasminoides* ini untuk selanjutnya digunakan dalam identifikasi kandungan senyawa aktif maupun uji aktivitasnya terhadap peningkatan fungsi *immunosurveilance* dalam terapi luka akibat pencabutan gigi.



Gambar 4.2 Serbuk *Gardenia jasminoides*

Untuk menyiapkan ekstrak etanol daun *Gardenia jasminoides* maka sebanyak 1 gram serbuk daun ditambah dengan etanol hingga volume 10,0 ml dibiarkan dalam suhu kamar selama 2 jam kemudian disaring dengan menggunakan corong *Buchner* dan *vaccum pump* serta kertas saring *Whatman 40* dengan cara dekantasi (fase air disaring terlebih dahulu). Penyaringan agak sulit dilakukan karena hasil perendaman berupa cairan yang agak berlendir sehingga dibutuhkan cara dekantasi dan *vaccum pump* menggunakan corong *Buchner*. Penyaringan biasa tidak dapat dilakukan. Hasil penyaringan merupakan ekstrak etanol dari daun *Gardenia jasminoides* yang siap dilakukan analisis kandungannya dengan menggunakan berbagai instrumen. Pada penelitian ini, identifikasi kandungan senyawa aktif dilakukan hanya sebatas karakterisasi sebab identifikasi hingga struktur kimia dibutuhkan waktu yang cukup lama dan biaya yang sangat besar. Di bawah ini adalah gambar 5.4 yang menunjukkan cara penyaringan ekstrak dengan menggunakan corong *Buchner*. Konsentrasi serbuk kering yang disiapkan sebesar 10% (b/v).

#### 4.7 Tahapan Program Tahun II

Untuk mencapai sasaran yang diinginkan pada penelitian tahun ke-2 ini maka dilakukan langkah-langkah penelitian sebagai berikut :

- Menyiapkan tikus (*Rattus norvegicus*, galur wistar) yang diadaptasikan pada Laboratorium Hewan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
- Preparasi komponen bioaktif untuk pemberian perlakuan pada tikus
- Pemberian senyawa bioaktif pada tikus

- Mengamati pengaruh pemberian senyawa bioaktif terhadap peningkatan komponen sel *immunesurveillance*, dalam hal ini adalah ekspresi CD8 dan sel NK yang berfungsi sebagai pertahanan lini terdepan terhadap virus dan bakteri.

a. Bahan dan Alat Penelitian :

Bahan yang dipakai adalah tikus (*Rattus norvegicus*, galur wistar), ransum tikus, isolat bioaktif yang diperoleh tahun pertama, seperangkat bahan untuk imunohistokimia untuk pemeriksaan ekspresi sel NK dan sel T sitotoksik.

Alat yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah mikropipet, tip (yellow, white, blue), mikroskop dilengkapi kamera, kit pemeriksaan imunohistokimia untuk melihat ekspresi CD8 dan sel NK.

b. Metode Percobaan :

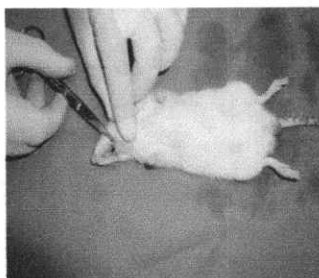
Untuk uji efikasi senyawa bioaktif yang terkandung dalam *Gardenia jasminoides* pada tikus (*Rattus norvegicus*, galur Wistar) dalam meningkatkan komponen *immunesurveillance* yaitu sel NK dan Sel T sitotoksik pada penelitian tahun ke-2 ini maka dilakukan langkah-langkah penelitian sebagai berikut :

- Menyiapkan tikus (*Rattus norvegicus*, galur wistar) yang dilakukan pencabutan gigi Insisivus bawah dan dipapari bioaktif yang merupakan produk tahun pertam penelitian ini.
- Mengamati pemberian bioaktif fraksi etanol dalam mempengaruhi komponen sel *immunesurveillance* inang, dalam hal ini adalah ekspresi CD8, sel NK yang berfungsi sebagai pertahanan lini terdepan terhadap virus dan bakteri.

Gambar 4.3 Persiapan binatang coba



pembrenerian anestesi



pembukaan jar.Periodontal



Hasil potongan mandibula



b. Bahan dan Alat Penelitian :

Bahan yang dipakai adalah tikus (*Rattus norvegicus*, galur wistar), ransum tikus, isolat bioaktif yang diperoleh tahun pertama, seperangkat bahan untuk teknik pemeriksaan HPA dan imunohistokimia untuk pemeriksaan sel NK dan sel T sitotoksik.

Alat yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah mikropipet, tip (yellow, white, blue), mikroskop dilengkapi kamera, kit pemeriksaan imunohistokimia untuk melihat ekspresi CD8 dan sel NK.

c. Metode Percobaan :

Metode imunohistokimia dan HPA yang dipakai adalah mengacu metode menurut Aulanni'am (2005).

**Pengecatan imunohistokimia**

**Persiapan reagen**

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% (digunakan untuk menghilangkan aktivitas endogenus peroksidase )

Trypsi 0,025 % dalam PBS ( digunakan membersihkan debris protein yang kemungkinan menutup epitop dari bahan yang akan dideteksi)

Larutan kerja DAB ( digunakan sebagai indicator warna/ kromogen pada reaksi enzimatik) :

|   |            |
|---|------------|
| R/. aquadestilata                             | : 1 ml     |
| Buffer substrat H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | : 50 tetes |
| Larutan DAB stok                              | : 1 tetes  |

**Cara kerja**

Lakukan deparafinisasi, caranya adalah dengan memasukkan sayatan jaringan berturut-turut ke dalam :

1. xylol : 2 menit
2. xylol : 2 menit
3. etanol absolute : 1 menit
4. etanol absolute : 1 menit
5. etanol 95 % : 1 menit
6. etanol 95 % : 1 menit

7. etanol 80 % : 1 menit
8. etanol 70 % : 1 menit
9. air mengalir : 10-15 menit
10. masukkan kedalam larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% : 30 menit
11. cuci dengan PBS 3 kali ( @ 2 menit )
12. trypsin 0,025 % selama 6 menit pada 37°C
13. cuci dengan PBS 3 kali ( @ 2 menit )
14. masukkan ke dalam antibodi monoclonal : 30 menit
15. cuci dengan PBS 3 kali ( @ 2 menit )
16. masukkan ke dalam antibody sekunder : 30 menit
17. cuci dengan PBS 3 kali ( @ 2 menit )
18. masukkan ke dalam septavidin/avidin HRP label : 30 menit
19. cuci dengan PBS 3 kali ( @ 2 menit )
20. masukkan ke dalam substrat kromogen : 5 menit
21. cuci dengan PBS 3 kali ( @ 2 menit ), kemudian dibilas dengan aquadestilata
22. masukkan ke dalam Mayer's Hematoxylin : 6 menit
23. cuci dengan air mengalir
24. dehydrasi-clearing-mounting

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Di Indonesia, beberapa tumbuhan berkhasiat telah lama dipakai sebagai bahan obat untuk pencegahan, perawatan kesehatan maupun pengobatan. Pemakaian obat tradisional di masyarakat memiliki beberapa keuntungan yaitu bahan mudah didapat, efek samping yang kecil dan harganya murah. Bahan baku obat tradisional di Indonesia sangat mudah diperoleh karena telah ditanam sejak ribuan tahun yang lalu di samping Indonesia memiliki keaneka ragaman hayati.

Saat ini, pengobatan dengan menggunakan bahan obat tradisional merupakan pengobatan yang lazim digunakan dalam masyarakat. Pengobatan dengan bahan sintetis lebih mahal dan kadang memberikan efek samping yang merugikan bagi tubuh. Untuk itu, maka diupayakan pengobatan dengan menggunakan bahan-bahan alami sebagai upaya pengobatan alternatif. Pengobatan tradisional merupakan salah satu cara pengobatan sederhana yang membudaya di dalam masyarakat Indonesia. Penggunaan obat tradisional terutama didasarkan pada hasil pengalaman atau pengetahuan yang diteruskan turun-temurun, dan masih memerlukan rangkaian penelitian untuk mengkaji kebenaran secara ilmiah dengan menggunakan data-data farmakologi. Hal itu merupakan upaya yang bertujuan untuk meningkatkan taraf kesehatan masyarakat. Melalui uji laboratoris diharapkan komponen bioaktif tersebut dapat bermanfaat dalam penatalaksanaan terapi luka yang sering terjadi di mukosa rongga mulut akibat trauma pencabutan atau alat kedokteran gigi.

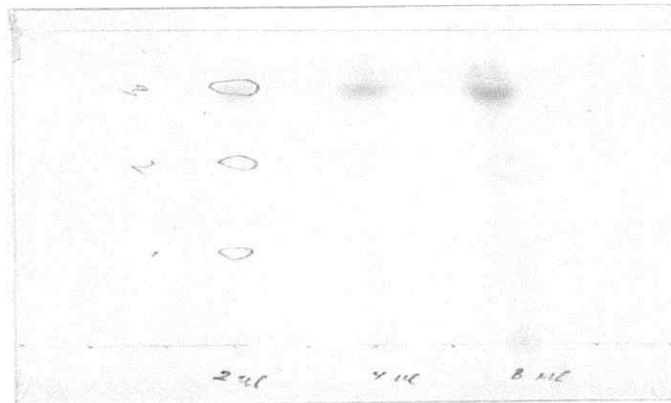
### 5.1 Analisis Hasil Ekstraksi

Ekstrak air daun *Gardenia jasminoides* dianalisis dengan cara ditotolkan sebanyak 2  $\mu$ l, 4  $\mu$ l, dan 8  $\mu$ l pada *plate* Kromatografi Lapis Tipis (KLT) silika Gel 60 GF 254 dan dieluasi menggunakan berbagai campuran fasa gerak. Berbagai fasa gerak dengan tingkat polaritas yang berbeda-beda telah dicoba untuk mendapatkan hasil yang optimal. Beberapa eluen yang telah dicoba dapat dilihat pada tabel 5.1

Tabel 5.1. Beberapa eluen yang memberikan hasil kurang optimum

| Eluen  | Jumlah noda     | Keterangan                        |
|--|-----------------|-----------------------------------|
| Metanol 40<br>etil asetat 30                 | 1 noda          | Noda tidak terelusi               |
| Metanol 40<br>etil asetat 30<br>n-heksana 30 | 3 noda terpisah | Pemisahan baik                    |
| Metanol 30<br>etil asetat 30<br>n-heksana 40 | 2 noda terpisah | 1 noda tailing dan pemisahan baik |
| Metanol 50<br>etil asetat 30<br>n-heksana 20 | 4 noda terpisah | Pemisahan baik                    |

Akhirnya, hasil pemisahan yang optimal diperoleh dari campuran metanol : etil asetat : n-heksana = 50 : 30 : 20, karena memiliki jumlah komponen terbanyak dan dapat terlihat terpisah satu sama lainnya. Pada totolan 2  $\mu$ l, terlihat ada 3 noda yaitu Rf 0,29, 0,59 dan Rf 0,80. Pada totolan 4  $\mu$ l, terdapat 3 noda pada Rf 0,22, 0,54 dan Rf 0,80, sedangkan pada totolan 8  $\mu$ l, terdapat 4 noda pada Rf 0,31, 0,52, 0,57 dan Rf 0,79 seperti terlihat pada gambar 5.1 dan tabel 5.2. di bawah ini. Dari tabel dan gambar tersebut maka disimpulkan bahwa ekstrak air daun *Gardenia jasminoides* dapat diuraikan menjadi 4 komponen dengan menggunakan campuran metanol : etil asetat : n-heksana = 50 : 30 : 2.

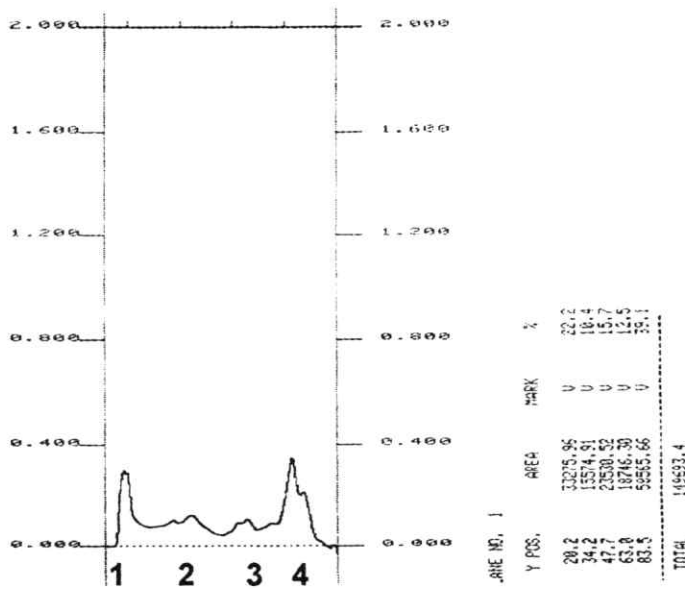


Gambar 5.1. Hasil Kromatografi Lapis Tipis (Silika gel GF 254) ekstrak air daun *Gardenia jasminoides* dengan pelarut ethanol dan eluen Metanol : Etil Asetat : n-Heksana = 50 : 30 : 20

Tabel 5.2 Hasil Kromatografi Lapis Tipis pemberian berbagai volume ekstrak air daun *Gardenia jasminoides* dengan pelarut ethanol dan eluen Metanol : Etil Asetat : n-Heksana = 50 : 30 : 20

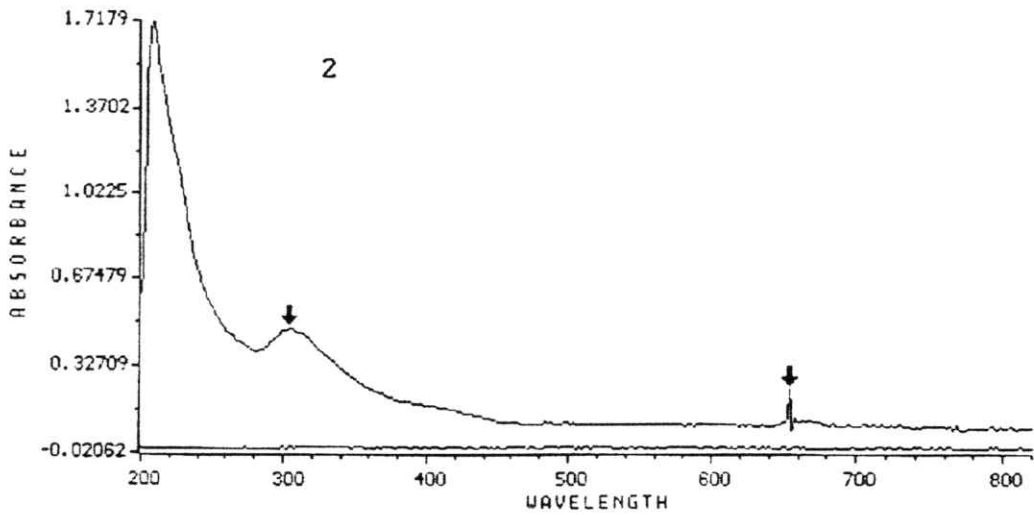
| Volume totalan (µl) | Rf noda 1 | Rf noda 2 | Rf noda 3 | Rf noda 4 |
|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 2 µl                | 0,29      | 0,59      | 0,80      | -         |
| 4 µl                | 0,22      | 0,54      | 0,80      | -         |
| 8 µl                | 0,31      | 0,52      | 0,57      | 0,79      |

Hasil pengamatan noda kromatografi lapis tipis ekstrak etanol daun *Gardenia jasminoides* dengan menggunakan TLC-Densitometer nampak pada gambar 5.2 di bawah ini.

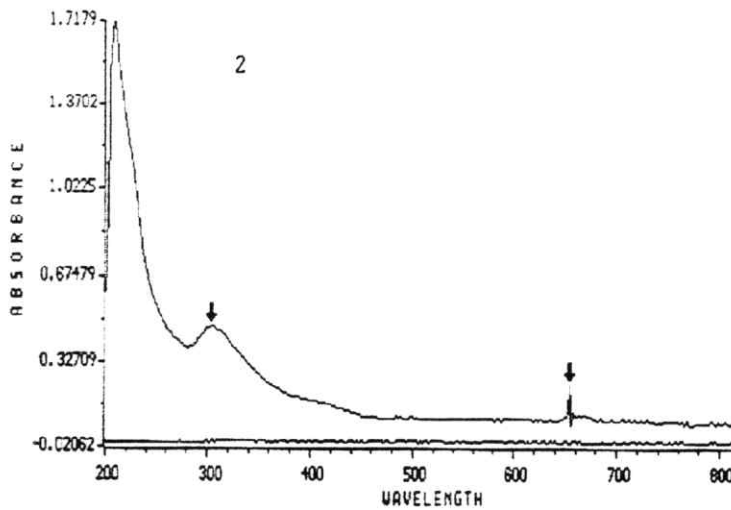


Gambar 5.2. Hasil kromatogram ekstrak etanol daun *Gardenia jasminoides* dengan menggunakan Densitometer Shimadzu CS/930. Terlihat ada 4 komponen senyawa aktif yang memberi puncak kromatogram.

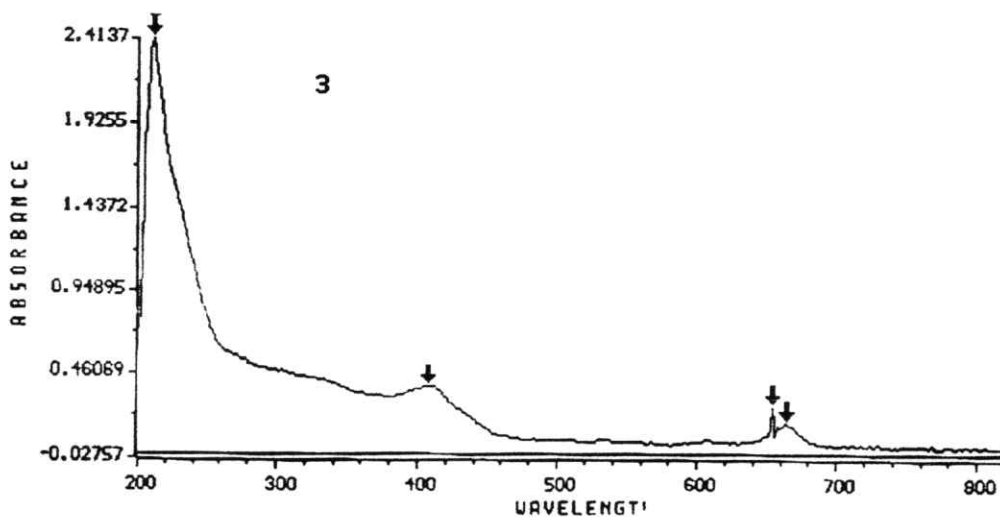
Masing-masing noda pada hasil *plate* kromatografi dikerok dan dilarutkan dengan air dalam tabung reaksi. Tabung disentrifuse dan diambil filtratnya untuk dibaca spektra UV-Vis pada spektrofotometer Perkin-Elmer. Noda no.1 menghasilkan spektra UV-Vis seperti terlihat pada gambar 5.3 -5.6.



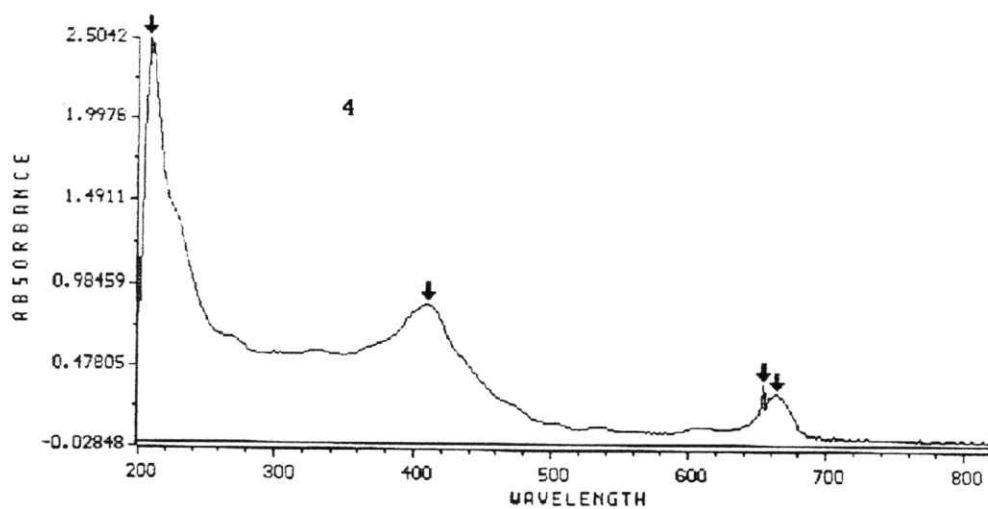
Gambar 5.3 Spektra UV-Vis noda 1 hasil kromatografi lapis tipis ekstrak etanol daun *Gardenia jasminoides* dengan pelarut air dan eluen Metanol : Etil Asetat : n-Heksana = 50 : 30 : 20



Gambar 5.4 Spektra UV-Vis noda 2 hasil kromatografi lapis tipis ekstrak etanol daun *Gardenia jasminoides* dengan pelarut air dan eluen Metanol : Etil Asetat : n-Heksana = 50 : 30 : 20



Gambar 5.5 Spektra UV-Vis noda 3 hasil kromatografi lapis tipis ekstrak etanol daun *Gardenia jasminoides* dengan pelarut air dan eluen Metanol : Etil Asetat : n-Heksana = 50 : 30 : 20

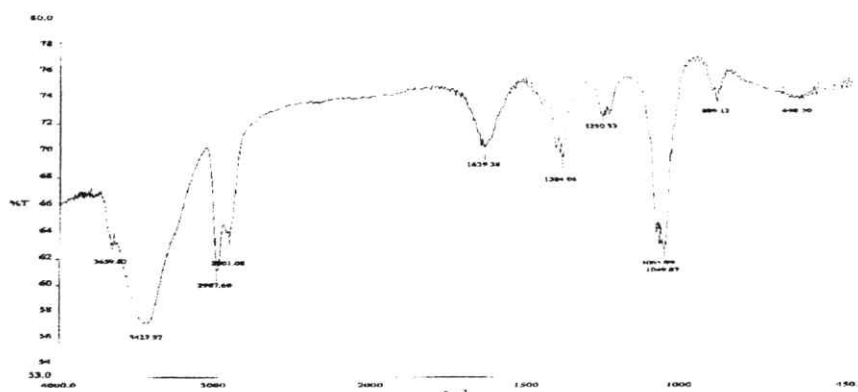


Gambar 5.6 Spektra UV-Vis noda 4 hasil kromatografi lapis tipis ekstrak etanol daun *Gardenia jasminoides* dengan pelarut air dan eluen Metanol : Etil Asetat : n-Heksana = 50 : 30 : 20

Tabel 5.3 Puncak-puncak Spektra UV-Vis noda hasil kromatografi lapis tipis ekstrak etanol daun *Gardenia jasminoides* menggunakan spektrofotometer Perkin-Elmer

| Noda ke- | Puncak 1 | Puncak 2 | Puncak 3 | Puncak 4 |
|----------|----------|----------|----------|----------|
| 1        | 206 nm   | 300 nm   | -        | -        |
| 2        | 304 nm   | 654 nm   | -        | -        |
| 3        | 210 nm   | 408 nm   | 654 nm   | 664 nm   |
| 4        | 208 nm   | 410 nm   | 654 nm   | 664 nm   |

Terdapat 4 noda hasil kromatografi lapis tipis yang diekstrak dengan etanol dan diamati puncak spektra yang dihasilkan pada tiap-tiap noda. Noda pertama dengan Rf 0,31 menghasilkan spektra serapan pada daerah UV-Vis (200-800 nm) dengan 2 puncak pada 206 nm dan 300 nm. Noda kedua dengan Rf 0,52 menghasilkan spektra dengan 2 puncak yaitu 304 nm dan 654 nm. Noda ketiga terjadi 4 puncak pada 210 nm, 408 nm, 654 nm dan 664 nm. Sedangkan noda ke 4 mirip dengan noda ketiga yaitu terjadi 4 puncak pada 208 nm, 410 nm, 654 nm dan 664 nm. Noda ketiga dan noda keempat memiliki spektra yang mirip walaupun keduanya berbeda Rf yang sangat signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa noda ketiga dan noda keempat memiliki struktur kimia yang mirip namun berbeda polaritasnya.

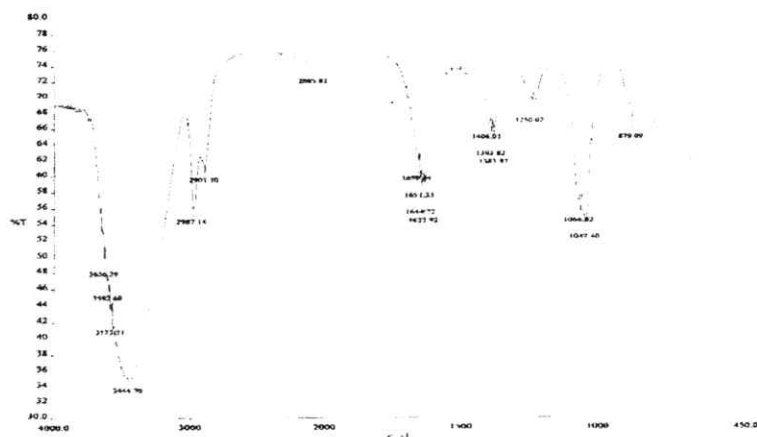


Gambar 5.7 Spektra IR noda 1 hasil kromatografi lapis tipis ekstrak etanol daun *Gardenia jasminoides* dengan pelarut air dan eluen Metanol : Etil Asetat : n-Heksana = 50 : 30 : 20

Daerah antara 1400 – 4000 cm<sup>-1</sup> adalah daerah khusus yang berguna untuk identifikasi gugus-gugus fungsional. Biasanya daerah ini digunakan untuk identifikasi senyawa berdasarkan gugus fungsional yang dimiliki. Daerah antara 800-1400 cm<sup>-1</sup>



merupakan bagian yang unik untuk setiap senyawa walaupun tidak dapat digunakan untuk mendeteksi gugus fungsional tertentu dengan cermat. Oleh karena itu, bagian spektrum ini disebut daerah sidik jari (*finger print*) yang sangat spesifik untuk setiap senyawa. Hasil spektra IR (*infra red*) noda kesatu pada gambar 5.8 menunjukkan adanya serapan gugus OH pada daerah 3000-3700  $\text{cm}^{-1}$ . Uluran CH terlihat antara 2800-3300  $\text{cm}^{-1}$ . Tidak terlihat adanya gugus amina pada daerah 3000-3700  $\text{cm}^{-1}$ , demikian juga gugus karbonil ( $\text{C}=\text{O}$ ) pada daerah 1700-1750  $\text{cm}^{-1}$  tidak muncul pada spektra IR yang diperoleh.



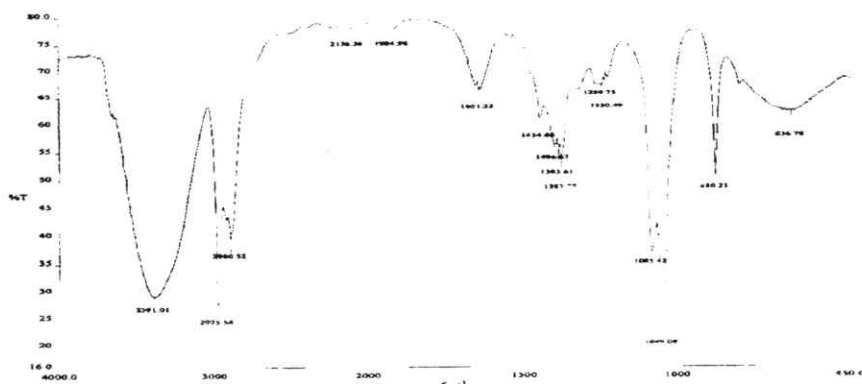
Gambar 5.8 Spektra IR noda 2 hasil kromatografi lapis tipis ekstrak etanol daun *Gardenia jasminoides* dengan pelarut air dan eluen Metanol : Etil Asetat : n-Heksana = 50 : 30 : 20

Hasil spektra IR pada noda 2 menunjukkan gugus OH yang sangat kuat 3444,70  $\text{cm}^{-1}$ . Uluran CH terjadi pada 2901,10  $\text{cm}^{-1}$ . Pada senyawa ini terdapat ikatan  $\text{C}=\text{C}$  pada serapan 2085,82 $\text{cm}^{-1}$  yang tidak terdapat pada spektra noda 1. Tidak terdapat gugus karbonil maupun amina yang muncul.



Gambar 5.9 Spektra IR noda 3 hasil kromatografi lapis tipis ekstrak etanol daun *Gardenia jasminoides* dengan pelarut air dan eluen Metanol : Etil Asetat : n-Heksana = 50 : 30 : 20

Gambaran spektra IR pada noda 3 menunjukkan struktur yang mirip dengan noda 2. Uluran gugus OH tidak sekuat noda 2, namun muncul juga serapan  $C=C$  pada daerah  $2100,82\text{ cm}^{-1}$ . Hal ini menunjukkan bahwa senyawa pada noda 2 memiliki gugus OH yang lebih banyak dari noda 1 maupun noda 3. Tidak terdapat gugus karbonil maupun amina pada struktur senyawa pada noda 3.



Gambar 5.10 Spektra IR noda 4 hasil kromatografi lapis tipis ekstrak etanol daun *Gardenia jasminoides* dengan pelarut air dan eluen Metanol : Etil Asetat : n-Heksana = 50 : 30 : 20

Noda 4 memiliki struktur mirip dengan noda 3 baik pada spektra UV-Vis maupun spektra IR nya. Uluran kecil pada  $2136,36\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan kesamaan struktur noda no 3 tentang adanya gugus  $C=C$  pada daerah  $2136,36\text{ cm}^{-1}$ . Pada struktur senyawa pada noda nomer 4 tidak dijumpai gugus karbonil pada daerah  $1700-1750\text{ cm}^{-1}$  dan gugus amina antara  $3000-3500\text{ cm}^{-1}$ . Hal ini menunjukkan bahwa senyawa-senyawa ini bukanlah golongan alkaloid.

Hasil penelitian tanun I diperoleh 4 komponen senyawa aktif yang ada dalam kandungan ekstrak ethanol gardenia jasminoides. Selanjutnya ke empat senyawa bioaktif tersebut dibuat dalam bentuk salep dengan 2 konsentrasi berbeda yaitu 1,5 % dan 3 %.

## 5.2 Uji Aktivitas Sel T sitotoksik (CD8)

Empat isolat dari *Gardenia jasminoides* yang diperoleh melalui kromatografi lapis tipis dikerok dan dilarutkan masing-masing ke dalam etanol 98% dalam tabung reaksi. Hasil kerokan di ekstraksi 3 kali 10 ml etanol 98% kemudian hasil ekstraksi

disaring dengan kertas Whatman dan dikumpulkan dalam cawan porselin. Etanol dalam cawan porselin diuapkan hingga kering pada lemari asam.

Sisa pengeringan berupa serbuk putih dikerok dan ditimbang. Sementara itu dibuat basis gel yang terbuat dari Polietilen Glikol (PEG) 4000 dan PEG 500 sama banyak. Setiap isolat dibuat 2 kadar sediaan yaitu 1,5% dan 3%. Setelah diaplikasikan pada tikus Wistar selama 4 hari dan dilakukan pengamatan terhadap peningkatan komponen *immunosurveillance* yaitu pada sel T sitotoksik (CD8) dengan metode imunohistokimia (tabel 5.4 dan 5.5) dan pada sel NK (tabel 5.6 dan 5.7).

Tabel 5.4. Jumlah sel CD8 pada tikus kontrol maupun yang mendapatkan perlakuan dengan beberapa isolat *Gardenia jasminoides* dengan konsentrasi 1,5% dalam campuran propilen glikol 500 dan propilenglikol 4000 sama banyak ditentukan dengan metode *Immunohistochemistry* (IHC).

| No                 | Kontrol     | Isolat 1    | Isolat 2    | Isolat 3    | Isolat 4    |
|--------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 1                  | 35          | 49          | 83          | 84          | 68          |
| 2                  | 42          | 24          | 36          | 53          | 77          |
| 3                  | 37          | 24          | 53          | 29          | 39          |
| 4                  | 38          | 63          | 66          | 11*         | 27          |
| 5                  | 39          | 82          | 35          | 46          | 32          |
| <b>X rata-rata</b> | <b>38.2</b> | <b>48.4</b> | <b>54.6</b> | <b>53</b>   | <b>48.6</b> |
| <b>SD</b>          | <b>2.6</b>  | <b>25.2</b> | <b>20.4</b> | <b>23.0</b> | <b>22.5</b> |

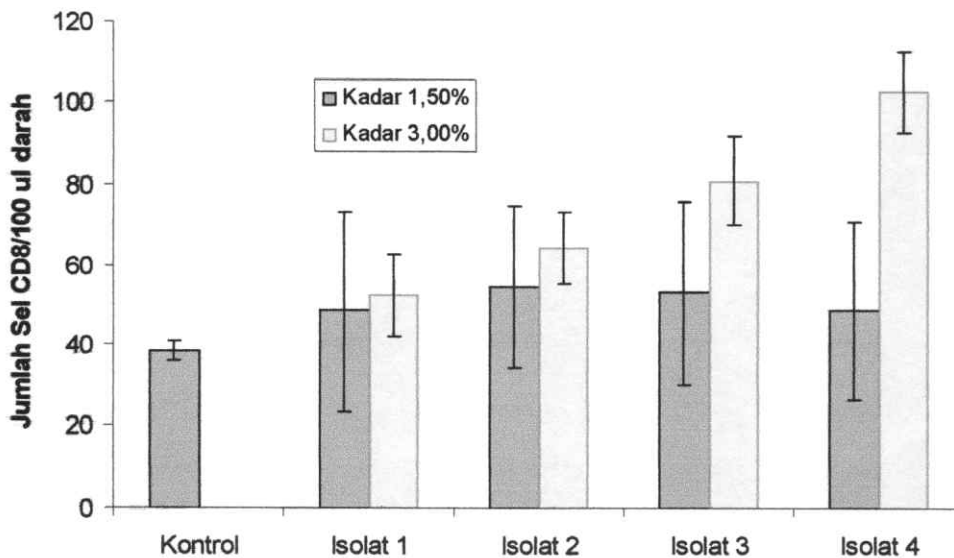
\* data direjek dengan aturan 2,5 d

Hasil analisis ANOVA (Lampiran 1) menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan antara kontrol dengan semua perlakuan isolat dengan kadar 1,5%. Hal ini menunjukkan bahwa pada kadar isolat 1,50% tidak ada aktivitas yang berbeda secara signifikan dibandingkan dengan kontrol. Antar perlakuan juga tidak didapatkan perbedaan yang signifikan.

Tabel 5.5. Jumlah sel CD8 pada tikus kontrol maupun yang mendapatkan perlakuan dengan beberapa isolat *Gardenia jasminoides* dengan konsentrasi 3% dalam campuran propilen glikol 500 dan propilenglikol 4000 sama banyak ditentukan dengan metode *Immunohistochemistry* (IHC).

| No                 | Kontrol     | Isolat 1    | Isolat 2    | Isolat 3    | Isolat 4     |
|--------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| 1                  | 35          | 49          | 51          | 84          | 91           |
| 2                  | 42          | 47          | 65          | 97          | 102          |
| 3                  | 37          | 68          | 60          | 72          | 117          |
| 4                  | 38          | 56          | 74          | 70          | 97           |
| 5                  | 39          | 41          | 71          | 81          | 106          |
| <b>X rata-rata</b> | <b>38.2</b> | <b>52.2</b> | <b>64.2</b> | <b>80.8</b> | <b>102.6</b> |
| <b>SD</b>          | <b>2.6</b>  | <b>10.3</b> | <b>9.1</b>  | <b>10.8</b> | <b>9.8</b>   |

Pada pemberian isolat dengan kadar 3%, hasil analisis ANOVA menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna pada pemberian isolat 3 ( $p=0,035$ ) dan isolat 4 ( $p=0,000$ ) dibandingkan dengan kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa isolat 3 dan isolat 4 *Gardenia jasminoides* memiliki efek dapat meningkatkan jumlah sel CD8 pada tikus Wistar. Profil peningkatan sel CD8 karena pengaruh pemberian 4 isolat *Gardenia jasminoides* dapat dilihat pada grafik 5. 1.



Grafik 5.1 Profil peningkatan jumlah sel CD8 pada kontrol dan perlakuan menggunakan isolat 1,2,3,dan 4 kadar 1,50% dan 3,00% ekstrak *Gardenia jasminoides* menggunakan metode *Immunohistochemistry* (IHC).

Pada penelitian ini ternyata komponen 3 dan 4 pada konsentrasi 3% dapat meningkatkan ekspresi CD8 (sel T sitotoksik), hal ini berarti hanya ada 2 komponen bioaktif dari 4 komponen yang diperoleh dari penelitian ini yang dapat digunakan untuk meningkatkan fungsi sel T sitotoksik dalam mekanisme pertahanan terhadap jejas pencabutan gigi. Mekanisme sel T sitotoksik dalam membunuh bakteri dengan cara merusak sel membran yang terinfeksi bakteri intraseluler sehingga bakteri keluar dan dihancurkan dengan apoptosis. Pada proses apoptosis ini sitokin yang berperan adalah IFN yang akan berikatan dengan fas ligand dari sel T sitotoksik untuk menginduksi apoptosis.

Sel T sitotoksik merupakan salah satu *major cell type* pada respon imun adaptif. Sel ini secara langsung melawan *pathogen intracellular* melalui ikatan dengan molekul MHC kelas I. Setelah berikatan dengan MHC kelas I sel T sitotoksik melepaskan enzim perforin dan granzim untuk melisiskan sel sasaran (Lamont RJ et al, 2006). Sel T sitotoksik memproduksi perforin yang dapat merusak membran sel bakteri dengan membentuk pori, dan setelah terbentuk pori maka dilepaskan enzim *granzyme* yang berfungsi membunuh sel sasaran. Cara ini merupakan cara lain dari sel T sitotoksik dalam membunuh sel sasaran disamping dengan cara mengaktifasi program apoptosis. Apoptosis terjadi melalui mekanisme kerusakan yang terorganisir. Dalam proses ini sel sasaran mengalami degradasi kromatin menjadi fragmen-fragmen kecil yang terdiri atas beberapa pasang DNA. Fragmentasi DNA terjadi karena aktivitas endonuklease yang terdapat didalam inti sel sasaran sendiri.

Jejas akibat trauma pencabutan gigi akan mengaktifasi makrofag sebagai sel fagosit pada *natural immune respons*. Makrofag yang teraktifasi akan melepaskan IL-12 yang akan mengaktifasi diferensiasi sel T helper. Selanjutnya sel T helper akan melepaskan sitokin yang mengaktifkan fungsi sel T sitotoksik untuk membunuh sel target. IL-17 yang dilepaskan oleh sel T helper akan mengaktifasi proliferasi fibroblas yang berperan penting pada mekanisme perbaikan luka, sehingga dapat mempercepat proses penyembuhan luka.

Sel. Pada mekanisme *immunesurveillance* sel T helper akan melakukan perondaan untuk mengenali konfigurasi sel asing yang akan dikenalkan pada sel T sitotoksik melalui sensitisasi, sehingga sel T sitotoksik akan mengenali sel asing tersebut sebagai imunogen.

### 5.3 Uji Aktivitas Sel NK

Peningkatan jumlah sel NK setelah pemberian 4 isolat *Gardenia jasminoides* dengan kadar 1,5 % pada tikus Wistar dapat dilihat pada tabel 5.5 dan kadar 3% pada tabel 5.6. Hasil analisis One-way ANOVA pada lampiran 2 menunjukkan bahwa pada kadar 1,5% tidak diperoleh perbedaan yang bermakna antara perlakuan dengan kontrol (lampiran 2). Akan tetapi pada kadar 3%, diperoleh isolat 4 memiliki efek yang berbeda makna dengan kontrol ( $p=0,000$ ). Dengan demikian isolat 4 pada kadar 3% memiliki kemampuan meningkatkan ekspresi sel NK pada tikus Wistar.

Tabel 5.6. Jumlah sel NK pada tikus kontrol maupun yang mendapatkan perlakuan dengan beberapa isolat *Gardenia jasminoides* dengan konsentrasi 1,5% dalam campuran propilen glikol 500 dan propilenglikol 4000 sama banyak ditentukan dengan metode *Immunohistochemistry* (IHC).

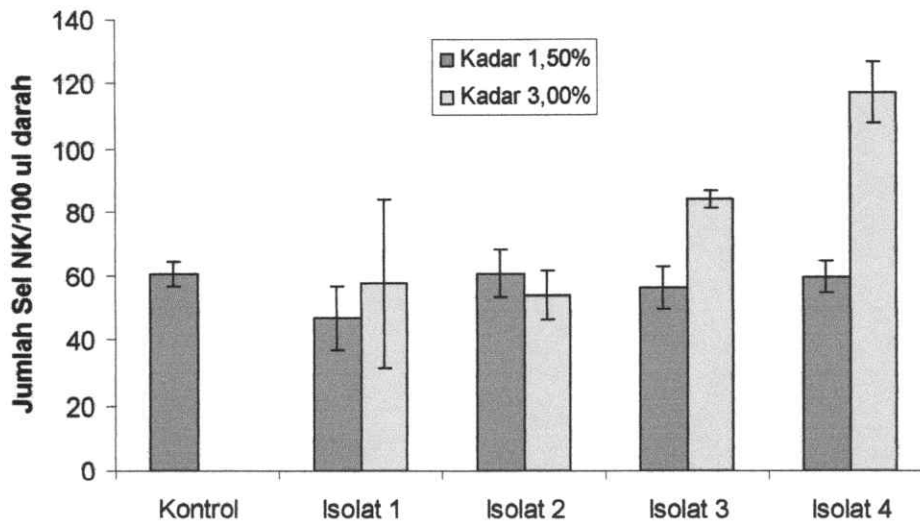
| No                 | Kontrol     | Isolat 1    | Isolat 2    | Isolat 3   | Isolat 4    |
|--------------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|
| 1                  | 54          | 24*         | 63          | 64         | 65          |
| 2                  | 65          | 31*         | 50          | 50         | 56          |
| 3                  | 61          | 58          | 67          | 51         | 53          |
| 4                  | 60          | 40          | 98*         | 20*        | 60          |
| 5                  | 62          | 42          | 62          | 59         | 62          |
| <b>X rata-rata</b> | <b>60.4</b> | <b>46.7</b> | <b>60.5</b> | <b>56</b>  | <b>59.2</b> |
| <b>SD</b>          | <b>4.0</b>  | <b>9.9</b>  | <b>7.3</b>  | <b>6.7</b> | <b>4.8</b>  |

\* data direjek dengan aturan 2,5 d

Tabel 5.7. Jumlah sel NK pada tikus kontrol maupun yang mendapatkan perlakuan dengan beberapa isolat *Gardenia jasminoides* dengan konsentrasi 3% dalam campuran propilen glikol 500 dan propilenglikol 4000 sama banyak ditentukan dengan metode *Immunohistochemistry* (IHC).

| No                 | Kontrol     | Isolat 1    | Isolat 2    | Isolat 3    | Isolat 4     |
|--------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| 1                  | 54          | 77          | 59          | 16*         | 107          |
| 2                  | 65          | 63          | 16*         | 81          | 108          |
| 3                  | 61          | 39          | 45          | 87          | 121          |
| 4                  | 60          | 23          | 57          | 82          | 129          |
| 5                  | 62          | 86          | 30*         | 85          | 119          |
| <b>X rata-rata</b> | <b>60.4</b> | <b>57.6</b> | <b>53.7</b> | <b>83.8</b> | <b>116.8</b> |
| <b>SD</b>          | <b>4.0</b>  | <b>26.2</b> | <b>7.6</b>  | <b>2.8</b>  | <b>9.3</b>   |

\* data direjek dengan aturan 2,5 d



Grafik 5.2. Profil peningkatan jumlah sel NK pada kontrol dan perlakuan menggunakan isolat 1,2,3,dan 4 kadar 1,5% dan 3% ekstrak *Gardenia jasminoides* menggunakan metode *Immunohistochemistry* (IHC).

Peningkatan ekspresi sel NK pada penelitian ini diperankan oleh komponen 4 pada konsentrasi 3%. Hal ini berarti hanya ada 1 komponen bioaktif yang ada dalam kandungan ekstrak etanol *Gardenia jasminoides* yang dapat mengaktivasi peningkatan ekspresi sel NK yang berperan sebagai salah satu komponen sel *immunesurveillance*.

Sel NK merupakan pertahanan lini terdepan terhadap agen infeksi dan merupakan imunitas alami terhadap respon ekstraseluler. Respons sel NK terhadap infeksi diperantarai oleh pelepasan sitokin dan substansi sitotoksik. Sel ini dapat mengenali sel target tanpa sensitisasi (Darwin E, 2006). Menurut Lamount R et al, (2006), sel NK berperan mengaktivasi MHC kelas I yang dihambat oleh agen infeksi, sehingga MHC kelas I dapat berikatan dengan sel T sitotoksik untuk melisiskan sel sasaran.

Dalam rongga mulut terdapat banyak mikroorganisme yang bersifat patogen oportunistik, sehingga sering kali mengganggu proses penyembuhan. Kerjasama yang sinergi dari kedua sel tersebut yaitu sel NK dan sel T sitotoksik yang bersama dengan makrofag akan membantu dalam mempercepat proses penyembuhan. Hal ini karena

menurut Crowe et al, (2002), sel NK dapat melindungi dari kerusakan jaringan pasca pencabutan gigi melalui pelepasan sitokin antiinflamasi.

Bakteri gram negatif pada umumnya dapat dibunuh langsung oleh sel NK dengan cara melisis membran sel bakteri dan mekanisme proses pembunuhan tersebut dengan cara pelepasan faktor sitotoksik yaitu sitolisin atau perforin dan serin protease yang berasal dari granula sel NK (Lamont RJ et al, 2006).

Pada kasus terjadinya infeksi pasca pencabutan akan menyebabkan proses penyembuhan terhambat. Dengan demikian maka dibutuhkan terapi yang dapat mengatasi kondisi tersebut. Dari hasil penelitian ini diketahui bahwa komponen bioaktif dari ekstrak *Gardenia jasminoides* ternyata dapat meningkatkan ekspresi sel NK maka hal ini menunjukkan aktivitas fungsi sel tersebut juga meningkat. Aktivitas sel NK dapat diaktivasi oleh IFN- $\gamma$  yang diproduksi oleh sel T sitotoksik sehingga meningkatnya ekspresi sel NK maka dapat diartikan ekspresi sel T sitotoksik juga meningkat seperti pada hasil penelitian ini juga. IFN- $\gamma$  yang diproduksi oleh sel T sitotoksik mampu mencegah penyebaran mikroorganisme termasuk bakteri ke sel lain. Dengan demikian maka kejadian infeksi dapat dihambat sehingga proses penyembuhan pasca pencabutan dapat dipercepat.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa komponen 3 dan 4 dapat bersifat sebagai imunomodulator karena dapat meningkatkan ekspresi sel NK dan sel T sitotoksik yang keduanya merupakan komponen dari sel *immunesurveillance*. Dengan demikian maka ke 2 komponen bioaktif yang terdapat dalam ekstrak *Gardenia jasminoides* diharapkan dapat digunakan sebagai terapi alternatif dalam mempercepat proses penyembuhan luka pasca pencabutan gigi karena dapat menghambat proses inflamasi yang terjadi. Namun demikian masih dibutuhkan berbagai tahapan uji laboratoris, uji klinis dan penelitian lebih lanjut dari ke dua komponen senyawa bioaktif tersebut untuk mengetahui karakteristik dari komponen 3 dan 4 pada hasil penelitian ini.



## BAB 6

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1 Kesimpulan

1. Ekstraksi kandungan dari *Gardenia jasminoides* di peroleh 4 komponen senyawa aktif yang terdapat pada ekstrak etanol daun *Gardenia jasminoides* dan melalui Spektra UV-Vis dan infra merah menunjukkan bahwa keempat senyawa bukan merupakan golongan alkaloida.
2. Komponen 3 dan 4 pada konsentrasi 3% dapat meningkatkan ekspresi CD8.
3. Komponen 4 pada konsentrasi 3% dapat meningkatkan ekspresi sel NK.
4. Ke dua komponen senyawa bioaktif yaitu komponen 3 dan 4 dapat bersifat sebagai imunomodulator karena meningkatkan ekspresi CD8 dan sel NK

#### 6.2 Saran

1. Fraksi *Gardenia jasminoides* yang memiliki aktivitas terbesar dapat dikembangkan lebih lanjut menjadi senyawa tunggal yang poten untuk penanganan terapi luka pada trauma pencabutan gigi.
2. Perlu dilakukan karakterisasi untuk mengetahui senyawa bioaktif yang terkandung dalam komponen 3 dan 4 dari ekstrak etanol *Gardenia jasminoides*.
3. Perlu dilakukan uji laboratoris lebih lanjut dan uji klinis sehingga dapat diaplikasikan pada manusia.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK and Lichtman AH, 2005. Cellular and Molecular Immunology. Fifth Ed. Philadelphia Elsevier Saunders Inc, p. 391-400
- Achiwa Y, Hasegawa K, Udagawa Y. 2005. *Molecular mechanism of ursolic acid induced apoptosis in poorly differentiated endometrial cancer HEC108 cell.* Onco Rep; 14(2): p.507-512

- Aliadi A, Sudibyو dan Haryono D, 1996. Tanaman Obat Pilihan. Yayasan Sidowayah, Jakarta :p.93-94.
- Aulanni'am. 2005. Protein & Analisisnya. Citra Mentari Group, Malang. ISBN 978508423-X.
- Chien LI, 2001. Cariogenic Actomyces Identified with a B-Glucosidase-Dependent Green Chlor Reaction to gardenia jasminoides Extract. *Journal of Clinical Microbiology*, vol 39(8),p:3009-12.
- Clifford, M. N. 1999. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79: p.362–372
- Crowe Nadine Y., Mark J. Smyth and Dale I. Godfrey 2002 : A Critical Role for Natural Killer T Cells in Immunosurveillance of Methylcholanthrene-induced Sarcomas. *The Journal of Experimental Medicine*, Vol 196 (1) p. 119-127
- Darwin Eryati, 2006. *Imunologi Dan Infeksi*. Andalas University Press. p.101-107
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1987. *Pemanfaatan Tanaman Obat*, ed.III, Indonesia, p:83.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1997. *Farmakope Indonesia*. Ed.III, Indonesia, p:12-13.
- Djulæha, 1999 . Khasiat infusa daun kaca piring sebagai obat kumur Terhadap Keberadaan *C.albicans*. *Majalah Kedokteran Gigi* vol32(4),:p.156-159,
- Gaspersz, V., 1991. *Metode Perancangan Percobaan: Untuk Ilmu-ilmu Pertanian, Ilmu-ilmu Teknik, Biologi*, CV. Armico, Bandung, pp.26.
- Heyne, 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia II* Jakarta. Badan Litbang Kehutanan, 622-627, 1070
- Hembing Wijayakusuma, 2000. *Ensiklopedia Milenium Tumbuhan Berkhasiat Obat Indonesia*. Jilid 1. PT. Prestasi Insani Indonesia Jakarta. p.71-4
- Higgins YE and Kleinbaum AP, 1985. *Introduction to Randomized Clinical Trials*. North California USA. Family Health International. Research Triangle Park.p. 31
- Jassim, S A.A ;Naji. M.A 2003. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective (HTML). *Journal of Applied Microbiology* 95 (3): 412-427. Blackwell Publishing. Retrieved on 2007-05-26

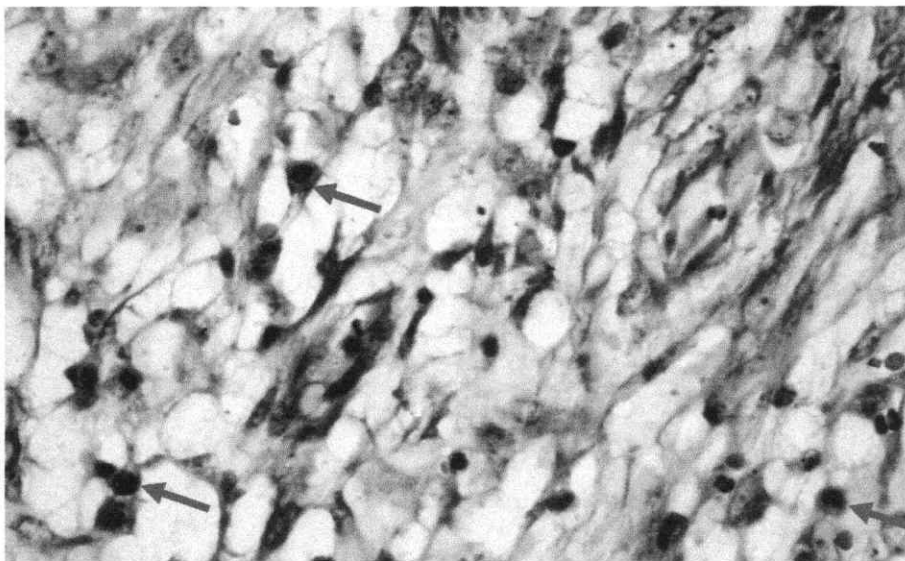
- Kumar V, Abbas AK and Fausto N. 2005 : Tissue Renewal and Repair : Regeneration, Healing and Fibrosis (Robbins and Cotran, Pathologic Basis of Disease), Chapter 3, 7<sup>th</sup> ed Quintessence Publiher, p.87-116.
- Lamont RJ, Robert AB, Marilyn SL, Donald JL. 2006. Oral microbiology and immunology. ASM Press : Washington DC p 322-324
- Lee P; Lee J; Choi SY; Lee SE; Lee S and Son D. 2006. Geniposide from *Gardenia jasminoides* Attenuates Neuronal Cell Death in Oxygen and Glucose Deprivation-Exposed Rat Hippocampal Slice Culture. *Biol Pharma, Bill* 19(1)p.174-176.
- Li Chen, Lili Ma, No-Hee Park, and Wenyuan Shi, 2001. Cariogenic Actinomyces Identified with a  $\beta$ -Glucosidase-Dependent Green Color Reaction to *Gardenia jasminoides* Extract . *Journal of Clinical Microbiology*, August 2001 Vol. 39(8), p. 3009-3012,
- Lisa M. Rimsza, Robin A. Roberts, Thomas P. Miller, Joseph M. Unger, Michael LeBlanc, et al, 2004. Loss of MHC class II gene and protein expression in diffuse large B-cell lymphoma is related to decreased tumor immunosurveillance and poor patient survival regardless of other prognostic factors: a follow-up study from the Leukemia and Lymphoma Molecular Profiling Project. *Blood*, 1 June 2004, Vol. 103, No. 11, p. 4251-4258.
- Masaki Terabe, Chand Khanna, Seuli Bose, Fraia Melchionda, Arnulfo Mendoza et al , 2006. CD1d-Restricted Natural Killer T Cells Can Down-regulate Tumor Immunosurveillance Independent of Interleukin-4 Receptor-Signal Transducer and Activator of Transcription 6 or Transforming Growth Factor- $\beta$ . *Cancer Research* April 1, 2006.66. p.3869-3875.
- Nadine Y. Crowe, Mark J. Smyth and Dale I. Godfrey, 2002. A Critical Role for Natural Killer T Cells in Immunosurveillance of Methylcholanthrene-induced Sarcomas. *The Journal of Experimental Medicine*, Volume 196 (1), July 1, 2002, p.119-127
- Olthof Margreet, Peter C.H, Hollman and Martian B.Katan. 2001. Chlorogenic acid are antioxidant in vitro, and they might inhibit the formation of mutagenic and carcinogenic N-nitroso compound because they are inhibitors of the N-nitrosation reaction in vitro. *Journal of Nutrition*, p.131:66-71
- Peng C.H, T.H. Tseng, C.N. Huang, Shu-Ping Hsu, and Chau-Jong Wang. 2005. Apoptosis induced by penta-acetyl geniposide in C6 glioma cells is associated with JNK activation and Fas ligand induction. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 202(2): p.172-179
- Peterson Larry J 2007. Contemporary Oral and Maxillofacial Surgery. Mosby : Missouri. p.236-237

- Putri M A dan Retno.P R, 2006. Efektifitas pemberian gardenia jasminoides terhadap proliferasi sel fibroblas. Penelitian mandiri.
- Rentian Feng, Yongju Lu, Linda L.Bowman, Yong Qian, Vincent Castranova, Ming Ding. 2005. Inhibition of activator protein-1, NF-kB, and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzyme activity by chlogenic acid. *J.Biol. Chem.*,280(30):p.27888-27895
- Retno P.R. Pola Respons Imun Seluler pada Karsinoma Sel Skuamosa Rongga Mulut. *Jurnal Penelitian Universitas Airlangga*, vol.5 no.2. Sept.1997 :p.11-17.
- Sabiston DC, 1992. *Buku Ajar Bedah I (Essensial of Surgery)*; Alih Bahasa Adrianto P, Timan IS. Jakarta, EGC, p. 145-150
- Sjamsuhidajat R, De Yong W, 2003. *Buku Ajar Bedah*, Edisi ke dua. Jakarta ,EGC, p.67-70
- Subbaramaiah K., Michaluart P, et.al. 2000. Ursolic acid inhibit COX-2 transcription in human mammary epithelial cells. *Cancer Research.*, 60: p.2399-2404
- Yao Q, Zhou G and Zhu Y, 1991. Screening studies on anti-inflammatory function of traditional Chinese herb Gardenia jasminoides Ellis and its possibility in treating soft tissue injuries in animals. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 16(8): p.489-93, 513.
- Yifang Y 2002. *Chinese Herbal Comparisos and Characteristic*. Churchill Livingstone London, p:1-4Albert, B. Bray, D. Lewis, J. Raff, M. Robert, K. & Watson. J. D. 1983. *Molecular Biology of The Cell*. New York & London: Garland Publishing Inc. p. 1140.
- Wu-Hsien Kuo, Fen Pi Chou, Shun-Chieh Yung, Yun- Ching Chang, and Chao-Jong Wang. 2005. Geniposide activity GSH S-transferase by induction of GST M1 and GST M2 subunit involving the transcription and phosphorylationof MEK-1 signaling in Rat hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 208(2): p.155-162,

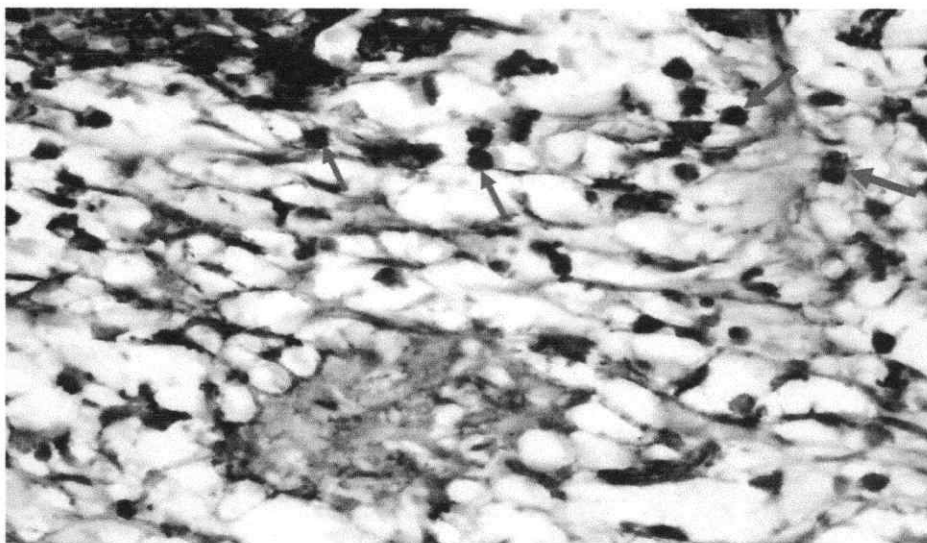
## Lampiran 1

### Hasil Pengecatan imuhistokimia

Pengecatan imunohistokimia ini menggunakan antibodi monoklonal anti CD 8 dan anti NK sel. Kromogen yang digunakan adalah DAB sehingga hasil positif menunjukkan warna kecoklatan dengan counterstain hematoksilin.



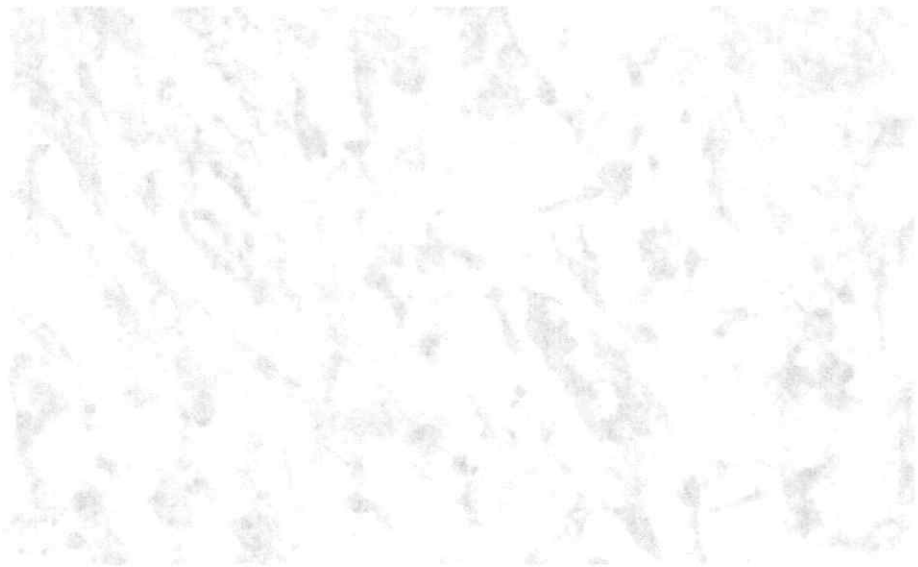
Hasil pengecatan imunohistokimia untuk CD 8 pada preparat biopsi mukosa rongga mulut rahang bawah tikus wistar (kelompok kontrol). Pembesaran 400 X  
Ket : panah biru menunjukkan reaksi positif



Hasil pengecatan imunohistokimia untuk CD 8 pada preparat biopsi mukosa rongga mulut rahang bawah tikus wistar (kelp. Perlakuan konsentrasi 1,5%). Pembesaran 400 X  
Ket : panah biru menunjukkan reaksi positif

Hasil pengamatan immunohistokimia

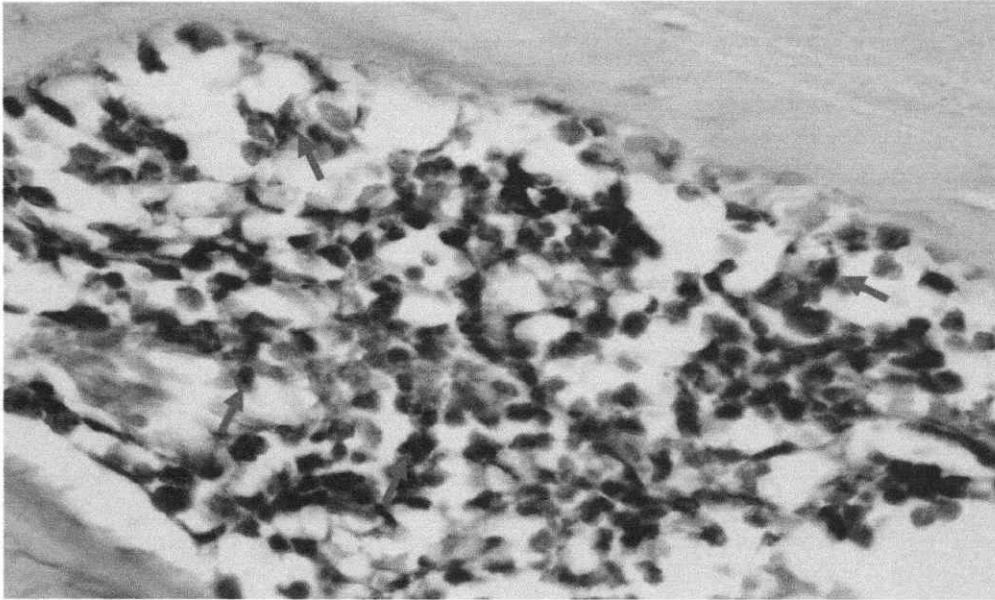
Pengamatan immunohistokimia ini menggunakan antibodi monoklonal anti CD 2 dan anti NK sel. Kromogen yang digunakan adalah DAB sehingga hasil positif menunjukkan warna kecoklatan dengan konsentrasi immunohistokimia



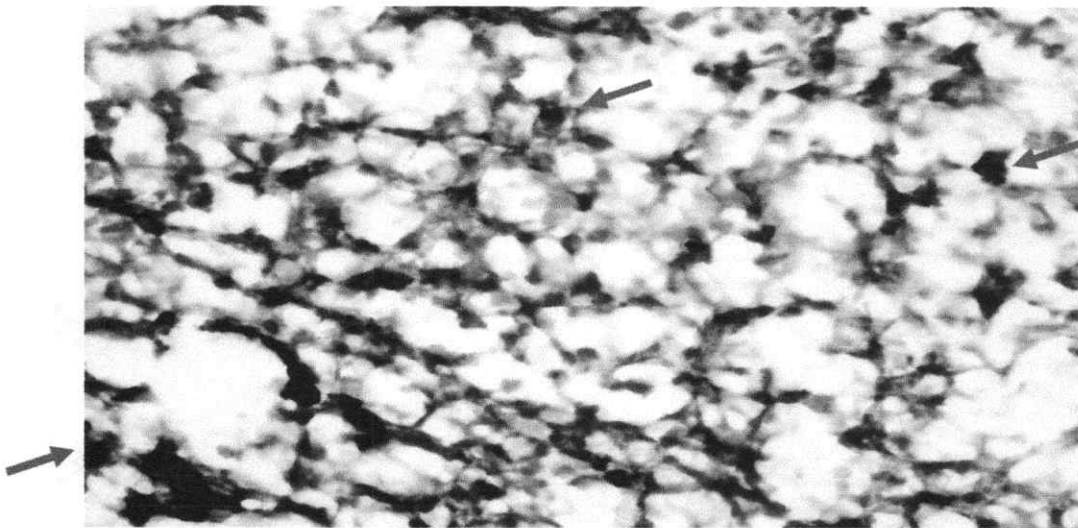
Hasil pengamatan immunohistokimia untuk CD 2 pada preparat biopsi mukosa rongga mulut rahang bawah tipe karsinoma sel skuam. Preparasi 100 X. Hasilnya menunjukkan reaksi positif.



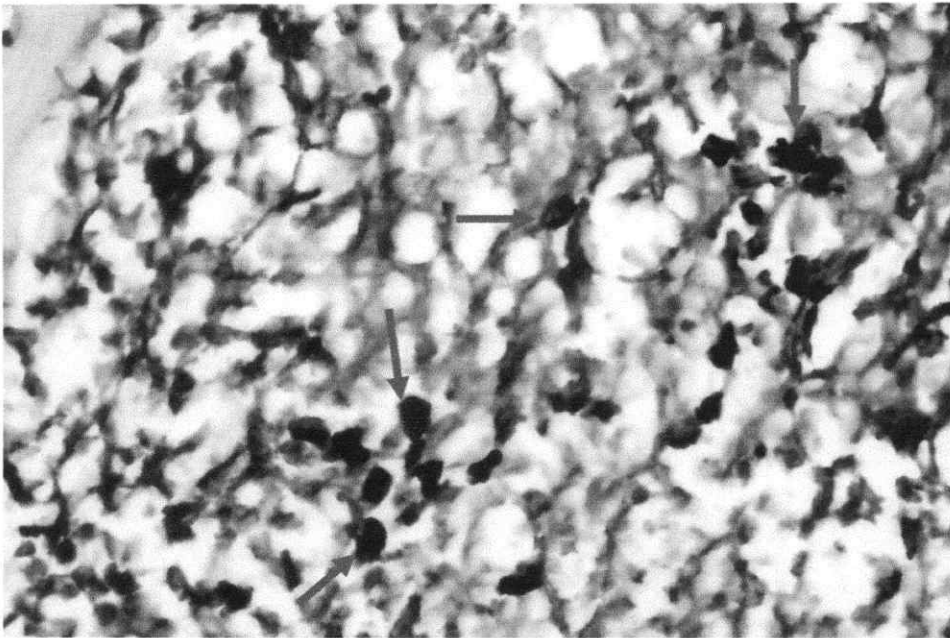
Hasil pengamatan immunohistokimia untuk CD 2 pada preparat biopsi mukosa rongga mulut rahang bawah tipe karsinoma sel skuam. Preparasi konsentrasi 120 X. Hasilnya menunjukkan reaksi positif.



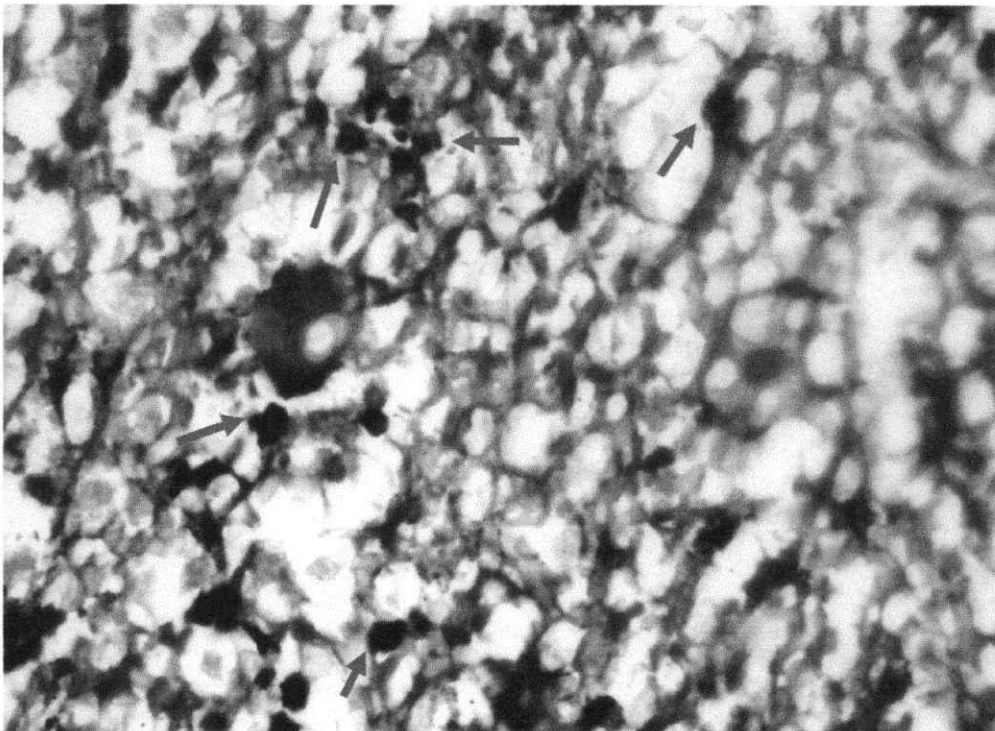
Hasil pengecatan imunohistokimia untuk CD 8 pada preparat biopsi mukosa rongga mulut rahang bawah tikus wistar (kelp. Perlakuan konsentrasi 3%).  
Pembesaran 400 X  
Ket : panah biru menunjukkan reaksi positif



Hasil pengecatan imunohistokimia untuk sel NK pada preparat biopsi mukosa rongga mulut rahang bawah tikus wistar (kelompok kontrol). Pembesaran 400 X  
Ket : panah biru menunjukkan reaksi positif.



Hasil pengecatan imunohistokimia untuk sel NK pada preparat biopsi mukosa rongga mulut rahang bawah tikus wistar (kelp. Perlakuan konsentrasi 1,5%).  
Pembesaran 400 X  
Ket : panah biru menunjukkan reaksi positif

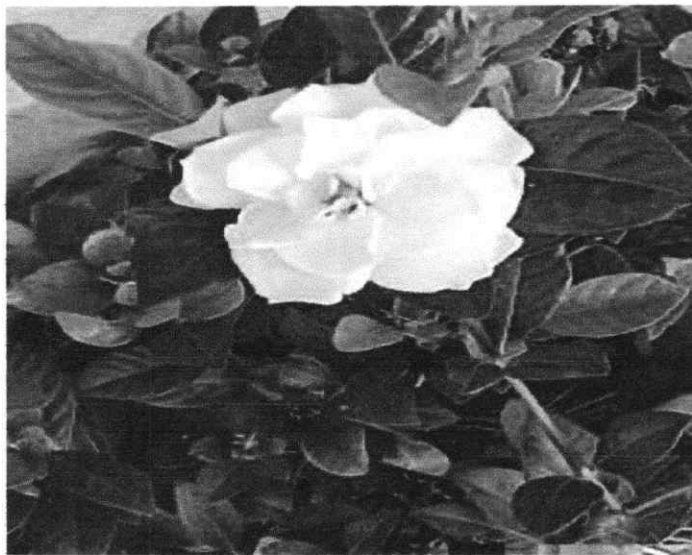


Hasil pengecatan imunohistokimia untuk sel NK pada preparat biopsi mukosa rongga mulut rahang bawah tikus wistar (kelp. Perlakuan konsentrasi 3%).  
Pembesaran 400 X  
Ket : panah biru menunjukkan reaksi



## Lampiran 2

Sebelum digunakan dalam penelitian maka *Gardenia jasminoides* diidentifikasi terlebih dahulu untuk memperoleh kepastian bahwa telah mengambil sample yang benar. Daun *Gardenia jasminoides* diambil dari daerah Tulungagung, pemilik tanaman menyebutnya sebagai bunga kaca piring. Hasil identifikasi menyatakan bahwa sample yang dikirim merupakan tanaman *Gardenia jasminoides*.



Sampel tanaman *Gardenia jasminoides* yang dipotret tanggal 24 Oktober 2007 dari habitatnya di Tulungagung dan digunakan dalam penelitian ini.

### Lampiran 3

## One Way ANOVA Pemberian 4 Isolat *Gardenia jasminoides* Terhadap Peningkatan Sel CD8

### Oneway

#### Descriptives

CD8

|       | N  | Mean     | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean |             | Minimum | Maximum |
|-------|----|----------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
|       |    |          |                |            | Lower Bound                      | Upper Bound |         |         |
| 1.00  | 5  | 38.2000  | 2.58844        | 1.15758    | 34.9860                          | 41.4140     | 35.00   | 42.00   |
| 2.00  | 5  | 48.4000  | 25.16545       | 11.25433   | 17.1530                          | 79.6470     | 24.00   | 82.00   |
| 3.00  | 5  | 52.2000  | 10.32957       | 4.61952    | 39.3741                          | 65.0259     | 41.00   | 68.00   |
| 4.00  | 5  | 54.6000  | 20.42792       | 9.13564    | 29.2354                          | 79.9646     | 35.00   | 83.00   |
| 5.00  | 5  | 64.2000  | 9.14877        | 4.09145    | 52.8403                          | 75.5597     | 51.00   | 74.00   |
| 6.00  | 4  | 53.0000  | 22.99275       | 11.49638   | 16.4134                          | 89.5866     | 29.00   | 84.00   |
| 7.00  | 5  | 80.8000  | 10.80278       | 4.83115    | 67.3866                          | 94.2134     | 70.00   | 97.00   |
| 8.00  | 5  | 48.6000  | 22.45662       | 10.04291   | 20.7164                          | 76.4836     | 27.00   | 77.00   |
| 9.00  | 5  | 102.6000 | 9.81326        | 4.38862    | 90.4152                          | 114.7848    | 91.00   | 117.00  |
| Total | 44 | 60.4545  | 24.16364       | 3.64281    | 53.1081                          | 67.8010     | 24.00   | 117.00  |

### Test of Homogeneity of Variances

CD8

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 2.912            | 8   | 35  | .013 |

### ANOVA

CD8

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F     | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|------|
| Between Groups | 15660.909      | 8  | 1957.614    | 7.253 | .000 |
| Within Groups  | 9446.000       | 35 | 269.886     |       |      |
| Total          | 25106.909      | 43 |             |       |      |

### Post Hoc Tests

**Multiple Comparisons**

CD8

Tukey HSD

| (I)<br>Perlakuan<br>n | (J)<br>Perlakuan<br>n | Mean Difference<br>(I-J) | Std. Error | Sig.  | 95% Confidence Interval |             |
|-----------------------|-----------------------|--------------------------|------------|-------|-------------------------|-------------|
|                       |                       |                          |            |       | Lower Bound             | Upper Bound |
| 1.00                  | 2.00                  | -10.20000                | 10.39011   | .985  | -44.5168                | 24.1168     |
|                       | 3.00                  | -14.00000                | 10.39011   | .909  | -48.3168                | 20.3168     |
|                       | 4.00                  | -16.40000                | 10.39011   | .810  | -50.7168                | 17.9168     |
|                       | 5.00                  | -26.00000                | 10.39011   | .265  | -60.3168                | 8.3168      |
|                       | 6.00                  | -14.80000                | 11.02037   | .911  | -51.1985                | 21.5985     |
|                       | 7.00                  | -42.60000*               | 10.39011   | .006  | -76.9168                | -8.2832     |
|                       | 8.00                  | -10.40000                | 10.39011   | .983  | -44.7168                | 23.9168     |
|                       | 9.00                  | -64.40000*               | 10.39011   | .000  | -98.7168                | -30.0832    |
| 2.00                  | 1.00                  | 10.20000                 | 10.39011   | .985  | -24.1168                | 44.5168     |
|                       | 3.00                  | -3.80000                 | 10.39011   | 1.000 | -38.1168                | 30.5168     |
|                       | 4.00                  | -6.20000                 | 10.39011   | 1.000 | -40.5168                | 28.1168     |
|                       | 5.00                  | -15.80000                | 10.39011   | .838  | -50.1168                | 18.5168     |
|                       | 6.00                  | -4.60000                 | 11.02037   | 1.000 | -40.9985                | 31.7985     |
|                       | 7.00                  | -32.40000                | 10.39011   | .077  | -66.7168                | 1.9168      |
|                       | 8.00                  | -2.20000                 | 10.39011   | 1.000 | -34.5168                | 34.1168     |
|                       | 9.00                  | -54.20000*               | 10.39011   | .000  | -88.5168                | -19.8832    |
| 3.00                  | 1.00                  | 14.00000                 | 10.39011   | .909  | -20.3168                | 48.3168     |
|                       | 2.00                  | 3.80000                  | 10.39011   | 1.000 | -30.5168                | 38.1168     |
|                       | 4.00                  | -2.40000                 | 10.39011   | 1.000 | -36.7168                | 31.9168     |
|                       | 5.00                  | -12.00000                | 10.39011   | .961  | -46.3168                | 22.3168     |
|                       | 6.00                  | -8.00000                 | 11.02037   | 1.000 | -37.1985                | 35.5985     |
|                       | 7.00                  | -28.60000                | 10.39011   | .167  | -62.9168                | 5.7168      |
|                       | 8.00                  | 3.60000                  | 10.39011   | 1.000 | -30.7168                | 37.9168     |
|                       | 9.00                  | -50.40000*               | 10.39011   | .001  | -84.7168                | -16.0832    |
| 4.00                  | 1.00                  | 16.40000                 | 10.39011   | .810  | -17.9168                | 50.7168     |
|                       | 2.00                  | 6.20000                  | 10.39011   | 1.000 | -28.1168                | 40.5168     |
|                       | 3.00                  | 2.40000                  | 10.39011   | 1.000 | -31.9168                | 36.7168     |
|                       | 5.00                  | -9.60000                 | 10.39011   | .990  | -43.9168                | 24.7168     |

|      |      |            |          |       |          |          |
|------|------|------------|----------|-------|----------|----------|
|      | 6.00 | 1.60000    | 11.02037 | 1.000 | -34.7985 | 37.9985  |
|      | 7.00 | -26.20000  | 10.39011 | .257  | -60.5168 | 8.1168   |
|      | 8.00 | 6.00000    | 10.39011 | 1.000 | -28.3168 | 40.3168  |
|      | 9.00 | -48.00000* | 10.39011 | .001  | -82.3168 | -13.6832 |
| 5.00 | 1.00 | 26.00000   | 10.39011 | .265  | -8.3168  | 60.3168  |
|      | 2.00 | 15.80000   | 10.39011 | .838  | -18.5168 | 50.1168  |
|      | 3.00 | 12.00000   | 10.39011 | .961  | -22.3168 | 46.3168  |
|      | 4.00 | 9.60000    | 10.39011 | .990  | -24.7168 | 43.9168  |
|      | 6.00 | 11.20000   | 11.02037 | .982  | -25.1985 | 47.5985  |
|      | 7.00 | -16.60000  | 10.39011 | .800  | -50.9168 | 17.7168  |
|      | 8.00 | 15.60000   | 10.39011 | .847  | -18.7168 | 49.9168  |
|      | 9.00 | -38.40000* | 10.39011 | .019  | -72.7168 | -4.0832  |
| 6.00 | 1.00 | 14.80000   | 11.02037 | .911  | -21.5985 | 51.1985  |
|      | 2.00 | 4.60000    | 11.02037 | 1.000 | -31.7985 | 40.9985  |
|      | 3.00 | .80000     | 11.02037 | 1.000 | -35.5985 | 37.1985  |
|      | 4.00 | -1.60000   | 11.02037 | 1.000 | -37.9985 | 34.7985  |
|      | 5.00 | -11.20000  | 11.02037 | .982  | -47.5985 | 25.1985  |
|      | 7.00 | -27.80000  | 11.02037 | .256  | -64.1985 | 8.5985   |
|      | 8.00 | 4.40000    | 11.02037 | 1.000 | -31.9985 | 40.7985  |
|      | 9.00 | -49.60000* | 11.02037 | .002  | -85.9985 | -13.2015 |
| 7.00 | 1.00 | 42.60000*  | 10.39011 | .006  | 8.2832   | 76.9168  |
|      | 2.00 | 32.40000   | 10.39011 | .077  | -1.9168  | 66.7168  |
|      | 3.00 | 28.60000   | 10.39011 | .167  | -5.7168  | 62.9168  |
|      | 4.00 | 26.20000   | 10.39011 | .257  | -8.1168  | 60.5168  |
|      | 5.00 | 16.60000   | 10.39011 | .800  | -17.7168 | 50.9168  |
|      | 6.00 | 27.80000   | 11.02037 | .256  | -8.5985  | 64.1985  |
|      | 8.00 | 32.20000   | 10.39011 | .080  | -2.1168  | 66.5168  |
|      | 9.00 | -21.80000  | 10.39011 | .491  | -56.1168 | 12.5168  |
| 8.00 | 1.00 | 10.40000   | 10.39011 | .983  | -23.9168 | 44.7168  |
|      | 2.00 | .20000     | 10.39011 | 1.000 | -34.1168 | 34.5168  |
|      | 3.00 | -3.60000   | 10.39011 | 1.000 | -37.9168 | 30.7168  |
|      | 4.00 | -6.00000   | 10.39011 | 1.000 | -40.3168 | 28.3168  |
|      | 5.00 | -15.60000  | 10.39011 | .847  | -49.9168 | 18.7168  |
|      | 6.00 | -4.40000   | 11.02037 | 1.000 | -40.7985 | 31.9985  |

|      |      |            |          |      |          |          |
|------|------|------------|----------|------|----------|----------|
|      | 7.00 | -32.20000  | 10.39011 | .080 | -66.5168 | 2.1168   |
|      | 9.00 | -54.00000* | 10.39011 | .000 | -88.3168 | -19.6832 |
| 9.00 | 1.00 | 64.40000*  | 10.39011 | .000 | 30.0832  | 98.7168  |
|      | 2.00 | 54.20000*  | 10.39011 | .000 | 19.8832  | 88.5168  |
|      | 3.00 | 50.40000*  | 10.39011 | .001 | 16.0832  | 84.7168  |
|      | 4.00 | 48.00000*  | 10.39011 | .001 | 13.6832  | 82.3168  |
|      | 5.00 | 38.40000*  | 10.39011 | .019 | 4.0832   | 72.7168  |
|      | 6.00 | 49.60000*  | 11.02037 | .002 | 13.2015  | 85.9985  |
|      | 7.00 | 21.80000   | 10.39011 | .491 | -12.5168 | 56.1168  |
|      | 8.00 | 54.00000*  | 10.39011 | .000 | 19.6832  | 88.3168  |

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

## Homogeneous Subsets

CD8

Tukey HSD<sup>a,b</sup>

| Perlakuan<br>n | N | Subset for alpha = 0.05 |         |          |
|----------------|---|-------------------------|---------|----------|
|                |   | 1                       | 2       | 3        |
| 1.00           | 5 | 38.2000                 |         |          |
| 2.00           | 5 | 48.4000                 | 48.4000 |          |
| 8.00           | 5 | 48.6000                 | 48.6000 |          |
| 3.00           | 5 | 52.2000                 | 52.2000 |          |
| 6.00           | 4 | 53.0000                 | 53.0000 |          |
| 4.00           | 5 | 54.6000                 | 54.6000 |          |
| 5.00           | 5 | 64.2000                 | 64.2000 |          |
| 7.00           | 5 |                         | 80.8000 | 80.8000  |
| 9.00           | 5 |                         |         | 102.6000 |
| Sig.           |   | .281                    | .084    | .509     |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.865.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

## Lampiran 4

### One Way ANOVA Pemberian 4 Isolat *Gardenia jasminoides* Terhadap Peningkatan Sel NK

#### Oneway

#### Descriptives

SELNK

|       | N  | Mean     | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean |             | Minimum | Maximum |
|-------|----|----------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
|       |    |          |                |            | Lower Bound                      | Upper Bound |         |         |
|       |    |          |                |            | 1.00                             | 5           |         |         |
| 2.00  | 3  | 46.6667  | 9.86577        | 5.69600    | 22.1587                          | 71.1746     | 40.00   | 58.00   |
| 3.00  | 5  | 57.6000  | 26.24500       | 11.73712   | 25.0125                          | 90.1875     | 23.00   | 86.00   |
| 4.00  | 4  | 60.5000  | 7.32575        | 3.66288    | 48.8431                          | 72.1569     | 50.00   | 67.00   |
| 5.00  | 3  | 53.6667  | 7.57188        | 4.37163    | 34.8571                          | 72.4763     | 45.00   | 59.00   |
| 6.00  | 4  | 56.0000  | 6.68331        | 3.34166    | 45.3654                          | 66.6346     | 50.00   | 64.00   |
| 7.00  | 4  | 83.7500  | 2.75379        | 1.37689    | 79.3681                          | 88.1319     | 81.00   | 87.00   |
| 8.00  | 5  | 59.2000  | 4.76445        | 2.13073    | 53.2842                          | 65.1158     | 53.00   | 65.00   |
| 9.00  | 6  | 110.8333 | 16.80972       | 6.86254    | 93.1926                          | 128.4741    | 81.00   | 129.00  |
| Total | 39 | 68.0256  | 23.48066       | 3.75991    | 60.4141                          | 75.6372     | 23.00   | 129.00  |

#### Test of Homogeneity of Variances

SELNK

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 4.547            | 8   | 30  | .001 |

#### ANOVA

SELNK

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F      | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 15999.858      | 8  | 1999.982    | 12.118 | .000 |
| Within Groups  | 4951.117       | 30 | 165.037     |        |      |
| Total          | 20950.974      | 38 |             |        |      |

#### Post Hoc Tests

**Multiple Comparisons**

SELNK

Tukey HSD

| (I)<br>Perlakuan<br>n | (J)<br>Perlakuan<br>n | Mean Difference<br>(I-J) | Std. Error | Sig.    | 95% Confidence Interval |             |
|-----------------------|-----------------------|--------------------------|------------|---------|-------------------------|-------------|
|                       |                       |                          |            |         | Lower Bound             | Upper Bound |
| 1.00                  | 2.00                  | 13.73333                 | 9.38189    | .863    | -17.5787                | 45.0454     |
|                       | 3.00                  | 2.80000                  | 8.12495    | 1.000   | -24.3170                | 29.9170     |
|                       | 4.00                  | -.10000                  | 8.61782    | 1.000   | -28.8620                | 28.6620     |
|                       | 5.00                  | 6.73333                  | 9.38189    | .998    | -24.5787                | 38.0454     |
|                       | 6.00                  | 4.40000                  | 8.61782    | 1.000   | -24.3620                | 33.1620     |
|                       | 7.00                  | -23.35000                | 8.61782    | .187    | -52.1120                | 5.4120      |
|                       | 8.00                  | 1.20000                  | 8.12495    | 1.000   | -25.9170                | 28.3170     |
|                       | 9.00                  | -50.43333*               | 7.77905    | .000    | -76.3959                | -24.4707    |
|                       | 2.00                  | 1.00                     | -13.73333  | 9.38189 | .863                    | -45.0454    |
| 3.00                  |                       | -10.93333                | 9.38189    | .958    | -42.2454                | 20.3787     |
| 4.00                  |                       | -13.83333                | 9.81181    | .885    | -46.5803                | 18.9136     |
| 5.00                  |                       | -7.00000                 | 10.48927   | .999    | -42.0079                | 28.0079     |
| 6.00                  |                       | -9.33333                 | 9.81181    | .988    | -42.0803                | 23.4136     |
| 7.00                  |                       | -37.08333*               | 9.81181    | .017    | -69.8303                | -4.3364     |
| 8.00                  |                       | -12.53333                | 9.38189    | .912    | -43.8454                | 18.7787     |
| 9.00                  |                       | -64.16667*               | 9.08398    | .000    | -94.4844                | -33.8489    |
| 3.00                  |                       | 1.00                     | -2.80000   | 8.12495 | 1.000                   | -29.9170    |
|                       | 2.00                  | 10.93333                 | 9.38189    | .958    | -20.3787                | 42.2454     |
|                       | 4.00                  | -2.90000                 | 8.61782    | 1.000   | -31.6620                | 25.8620     |
|                       | 5.00                  | 3.93333                  | 9.38189    | 1.000   | -27.3787                | 35.2454     |
|                       | 6.00                  | 1.60000                  | 8.61782    | 1.000   | -27.1620                | 30.3620     |
|                       | 7.00                  | -26.15000                | 8.61782    | .098    | -54.9120                | 2.6120      |
|                       | 8.00                  | -1.60000                 | 8.12495    | 1.000   | -28.7170                | 25.5170     |
|                       | 9.00                  | -53.23333*               | 7.77905    | .000    | -79.1959                | -27.2707    |
|                       | 4.00                  | 1.00                     | .10000     | 8.61782 | 1.000                   | -28.6620    |
| 2.00                  |                       | 13.83333                 | 9.81181    | .885    | -18.9136                | 46.5803     |
| 3.00                  |                       | 2.90000                  | 8.61782    | 1.000   | -25.8620                | 31.6620     |
| 5.00                  |                       | 6.83333                  | 9.81181    | .998    | -25.9136                | 39.5803     |

|      |      |            |          |       |          |          |
|------|------|------------|----------|-------|----------|----------|
|      | 6.00 | 4.50000    | 9.08398  | 1.000 | -25.8178 | 34.8178  |
|      | 7.00 | -23.25000  | 9.08398  | .245  | -53.5678 | 7.0678   |
|      | 8.00 | 1.30000    | 8.61782  | 1.000 | -27.4620 | 30.0620  |
|      | 9.00 | -50.33333* | 8.29250  | .000  | -78.0095 | -22.6571 |
| 5.00 | 1.00 | -6.73333   | 9.38189  | .998  | -38.0454 | 24.5787  |
|      | 2.00 | 7.00000    | 10.48927 | .999  | -28.0079 | 42.0079  |
|      | 3.00 | -3.93333   | 9.38189  | 1.000 | -35.2454 | 27.3787  |
|      | 4.00 | -6.83333   | 9.81181  | .998  | -39.5803 | 25.9136  |
|      | 6.00 | -2.33333   | 9.81181  | 1.000 | -35.0803 | 30.4136  |
|      | 7.00 | -30.08333  | 9.81181  | .091  | -62.8303 | 2.6636   |
|      | 8.00 | -5.53333   | 9.38189  | 1.000 | -36.8454 | 25.7787  |
|      | 9.00 | -57.16667* | 9.08398  | .000  | -87.4844 | -26.8489 |
| 6.00 | 1.00 | -4.40000   | 8.61782  | 1.000 | -33.1620 | 24.3620  |
|      | 2.00 | 9.33333    | 9.81181  | .988  | -23.4136 | 42.0803  |
|      | 3.00 | -1.60000   | 8.61782  | 1.000 | -30.3620 | 27.1620  |
|      | 4.00 | -4.50000   | 9.08398  | 1.000 | -34.8178 | 25.8178  |
|      | 5.00 | 2.33333    | 9.81181  | 1.000 | -30.4136 | 35.0803  |
|      | 7.00 | -27.75000  | 9.08398  | .094  | -58.0678 | 2.5678   |
|      | 8.00 | -3.20000   | 8.61782  | 1.000 | -31.9620 | 25.5620  |
|      | 9.00 | -54.83333* | 8.29250  | .000  | -82.5095 | -27.1571 |
| 7.00 | 1.00 | 23.35000   | 8.61782  | .187  | -5.4120  | 52.1120  |
|      | 2.00 | 37.08333*  | 9.81181  | .017  | 4.3364   | 69.8303  |
|      | 3.00 | 26.15000   | 8.61782  | .098  | -2.6120  | 54.9120  |
|      | 4.00 | 23.25000   | 9.08398  | .245  | -7.0678  | 53.5678  |
|      | 5.00 | 30.08333   | 9.81181  | .091  | -2.6636  | 62.8303  |
|      | 6.00 | 27.75000   | 9.08398  | .094  | -2.5678  | 58.0678  |
|      | 8.00 | 24.55000   | 8.61782  | .143  | -4.2120  | 53.3120  |
|      | 9.00 | -27.08333  | 8.29250  | .059  | -54.7595 | .5929    |
| 8.00 | 1.00 | -1.20000   | 8.12495  | 1.000 | -28.3170 | 25.9170  |
|      | 2.00 | 12.53333   | 9.38189  | .912  | -18.7787 | 43.8454  |
|      | 3.00 | 1.60000    | 8.12495  | 1.000 | -25.5170 | 28.7170  |
|      | 4.00 | -1.30000   | 8.61782  | 1.000 | -30.0620 | 27.4620  |
|      | 5.00 | 5.53333    | 9.38189  | 1.000 | -25.7787 | 36.8454  |
|      | 6.00 | 3.20000    | 8.61782  | 1.000 | -25.5620 | 31.9620  |



|      |      |            |         |      |          |          |
|------|------|------------|---------|------|----------|----------|
|      | 7.00 | -24.55000  | 8.61782 | .143 | -53.3120 | 4.2120   |
|      | 9.00 | -51.63333* | 7.77905 | .000 | -77.5959 | -25.6707 |
| 9.00 | 1.00 | 50.43333*  | 7.77905 | .000 | 24.4707  | 76.3959  |
|      | 2.00 | 64.16667*  | 9.08398 | .000 | 33.8489  | 94.4844  |
|      | 3.00 | 53.23333*  | 7.77905 | .000 | 27.2707  | 79.1959  |
|      | 4.00 | 50.33333*  | 8.29250 | .000 | 22.6571  | 78.0095  |
|      | 5.00 | 57.16667*  | 9.08398 | .000 | 26.8489  | 87.4844  |
|      | 6.00 | 54.83333*  | 8.29250 | .000 | 27.1571  | 82.5095  |
|      | 7.00 | 27.08333   | 8.29250 | .059 | -.5929   | 54.7595  |
|      | 8.00 | 51.63333*  | 7.77905 | .000 | 25.6707  | 77.5959  |

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

## Homogeneous Subsets

SELNK

Tukey HSD<sup>a,b</sup>

| Perlakuan<br>n | N | Subset for alpha = 0.05 |         |          |
|----------------|---|-------------------------|---------|----------|
|                |   | 1                       | 2       | 3        |
| 2.00           | 3 | 46.6667                 |         |          |
| 5.00           | 3 | 53.6667                 |         |          |
| 6.00           | 4 | 56.0000                 | 56.0000 |          |
| 3.00           | 5 | 57.6000                 | 57.6000 |          |
| 8.00           | 5 | 59.2000                 | 59.2000 |          |
| 1.00           | 5 | 60.4000                 | 60.4000 |          |
| 4.00           | 4 | 60.5000                 | 60.5000 |          |
| 7.00           | 4 |                         | 83.7500 | 83.7500  |
| 9.00           | 6 |                         |         | 110.8333 |
| Sig.           |   | .825                    | .085    | .099     |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.122.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

