

**UJI SITOTOKSISITAS EKSTRAK DAUN MENKUDU
(*Morinda citrifolia* L.) TERHADAP SEL FIBROBLAS
DENGAN ESAI MTT**

SKRIPSI



Oleh:

MAR'ATUS SHOLIKHAH
NIM. 020710174



**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA BHMN
SURABAYA
2010**

**UJI SITOTOKSISITAS EKSTRAK DAUN MENKUDU
(*Morinda citrifolia L.*) TERHADAP SEL FIBROBLAS
DENGAN ESAI MTT**

SKRIPSI

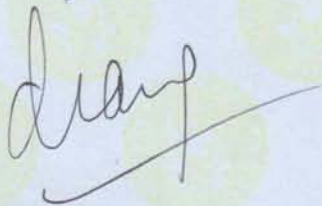
**Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Menyelesaikan
Pendidikan Dokter Gigi di Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Airlangga Surabaya**

Oleh:

**MAR'ATUS SHOLIKHAH
NIM. 020710174**

Menyetujui

Pembimbing Utama



**Diana Nurwati, drg., MS
NIP. 19480805 197603 2 002**

Pembimbing Serta



**Edhi Jularso, drg., MS
NIP. 19560729 198103 1 004**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA BHMN
SURABAYA
2010**

PENETAPAN PANITIA PENGUJI SKRIPSI

SKRIPSI ini telah diuji pada tanggal 30 Desember 2010

PANITIA PENGUJI SKRIPSI

- 1. Markus Budi Raharjo, drg., M.Kes (ketua penguji)**
- 2. Diana Nurwati, drg., MS (pembimbing utama/anggota)**
- 3. Edhi Jularso, drg., MS (pembimbing serta/anggota)**
- 4. Dr. Ira Arundina, drg., M.Si (anggota)**
- 5. Anis Irmawati, drg., M.Kes (anggota)**

Segala puji hanya bagi Allah SWT, Tuhan semesta alam, atas kehendak, karunia dan rahmat dari-Nya telah mengantarkan penulis menyelesaikan karya yang berjudul “Uji Sitotoksisitas Ekstrak Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) terhadap Sel Fibroblas dengan Esai MTT” yang disusun dalam rangka memenuhi persyaratan untuk kelulusan program studi kedokteran gigi Strata 1 Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.

Pada kesempatan ini, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada :

1. Prof. RM Coen Pramono D, drg., SU., SpBM (K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga
2. Prof. Dr. Jenny Sunariani, drg., MS. selaku Ketua Departemen Biologi Oral Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan untuk melakukan penelitian.
3. Diana Nurwati, drg., MS. selaku dosen pembimbing I yang telah banyak memberikan bimbingan, saran, pengetahuan baru dengan penuh kesabaran, dan dorongan semangat pada penulis.
4. Edhi Jularso, drg., MS. selaku dosen pembimbing II yang juga telah banyak memberikan bimbingan, saran, dan pengetahuan baru pada penulis.
5. Ibu Usreg dan Ibu Alfinda, yang telah memberikan bimbingan dan saran dalam pembuatan ekstrak di Laboratorium Fakultas Sains dan Teknologi, serta mbak Yuli atas bantuannya dalam pembuatan ekstrak.

6. Hary Besar Sosiawan, drh., SU., selaku Kepala PUSVETMA, Ibu Erna, drh.,
IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
Ibu Indah, yang telah mengizinkan dan membantu penulis dalam penelitian di
laboratorium PUSVETMA.
7. Adi Hapsoro, drg, MS dan mas Edwin yang telah membantu penulis dalam
menganalisis data penelitian.
8. Kedua orang tuaku tercinta Ibunda Sri Widayati dan Ayah Abu Chamid, Ir.,
MM. atas keikhlasan dan doa yang tulus, memberikan dorongan dan semangat
yang kuat, serta segenap doa, perhatian dan kasih sayangnya.
9. Saudara terkasih, Mbak Ida, Mas Adi, Mbak Cece, Mas Yus, Mbak Zuli dan
Dek Kiki, atas dukungan dan semangat, juga ponakanku Saiyaf Maul dan
Dzaky Iwul, kelucuan kalian menghiburku saat penat mengerjakan penelitian.
10. Hasrinuksmo Nukiandi, atas perhatian, keikhlasan dan ketulusan dalam
menemani penulis.
11. Teman-teman seperjuanganku dalam membuat skripsi, Nur Riflianty, Ririn
Aliftiani, Winda, Dewi, Berlian, Sarah, Rebitha, Putri dan Zulaikha yang saling
berbagi dalam berbagai masalah dalam pembuatan skripsi.
12. Semua pihak yang telah membantu penulis yang tidak dapat disebutkan satu
persatu.

Semoga karya ini memberikan kontribusi yang berarti bagi perkembangan
ilmu pengetahuan, masyarakat, bangsa, dan negara.

Surabaya, 29 Desember 2010

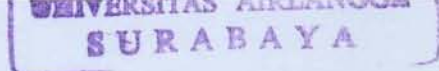
Penulis

CYTOTOXIC TEST NONI LEAVES (*Morinda citrifolia* L.)
FOR FIBROBLAST CELLS WITH MTT ASSAY

ABSTRACT

Background. Noni (*Morinda citrifolia* L) has been used in folk medicine for a long history and is reported to have a broad range of therapeutic effects, including antibacterial, antiviral, analgesic, antihyperglycemic, and anti-inflammatory, but there is no experiment before that shows the value of toxicity in its leaves, especially in fibroblast cell. **Purpose.** The aim of this study was to identify the effect of noni leaves extract (*Morinda citrifolia* L) and the effect of its toxicity in fibroblast cell with MTT assay. **Method.** The sample was fibroblast cells culture BHK-21 (Baby Hamster Kidney-21). The noni leaves extract divide into 5 concentration, 2mg/ml; 5 mg/ml; 7 mg/ml; 10 mg/ml; and 12 mg/ml. These extract applied into fibroblast cell culture and incubated in 24 hours. After incubated, ELISA reader used to read the result of this experiment. The data were compared and examined with one-way ANOVA with HSD Tukey. **Result.** The study showed that noni leaves extract is non toxic in fibroblast cell. From the study also showed that increasing of fibroblast proliferation happened when noni leaves extract applied to the culture therefore its safe to be use for medicine. **Conclusion.** Noni leaves extract is non toxic use in fibroblast cell

Keywords : noni leaves extract, fibroblast cell, toxicity



SAMPUL DEPAN	i
SAMPUL DALAM	ii
PERSETUJUAN	iii
PENETAPAN PANITIA PENGUJI	iv
UCAPAN TERIMA KASIH	v
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	1
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	4

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Mengkudu	5
2.1.1 Sejarah Singkat Mengkudu.....	5
2.1.2 Klasifikasi Tanaman.....	6
2.1.3 Deskripsi Daun Mengkudu.....	6

2.1.4 Kandungan Daun Mengkudu.....	7
2.1.5 Manfaat Daun Mengkudu.....	11
2.2 Fibroblas.....	13
2.2.1 Morfologi.....	13
2.2.2 Fungsi Sel Fibroblas dalam Penyembuhan Luka	14
2.2.3 Peran Sel Fibroblas dalam Matriks Ekstraseluler.....	15
2.3 Uji Sitotoksitas	15
2.4 Ekstrak Daun Mengkudu	18
2.5 Kultur Sel.....	18
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1 Kerangka Konseptual.....	21
3.2 Hipotesis Penelitian.....	22
BAB 4 METODE PENELITIAN	
4.1 Jenis Penelitian.....	23
4.2 Tempat Penelitian	23
4.3 Sampel Penelitian.....	23
4.4 Identifikasi Variabel Penelitian.....	24
4.5 Definisi Operasional Variabel Penelitian.....	24
4.6 Alat dan Bahan.....	25
4.6.1 Alat-alat yang digunakan	25
4.6.2 Bahan-bahan yang Digunakan	26
4.7 Prosedur Penelitian	27

4.7.1	Persiapan Ekstrak Daun Mengkudu.....	27
	IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA	
4.7.2	Cara Kerja Penelitian.....	27
4.8	Alur Penelitian.....	31
4.9	Analisis Data.....	31
BAB 5	HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	
5.1	Hasil Penelitian.....	32
5.2	Analisis Data.....	34
5.2.1	Uji Normalitas Kolmogorov Smirnov.....	35
5.2.2	Uji Homogenitas Varians Levene.....	35
5.2.3	Uji <i>Oneway Annova</i>	36
BAB 6	PEMBAHASAN	38
BAB 7	PENUTUP	
7.1	Simpulan.....	43
7.2	Saran.....	43
	DAFTAR PUSTAKA	44
	LAMPIRAN	47

Tabel 2.1 Komposisi Kandungan Daun Mengkudu Kering.....	10
Tabel 2.2 Kandungan Asam Amino dam Daun Mengkudu Kering.....	11
Tabel 5.1 Tingkat <i>Optical Density</i> Sel Fibroblas pada Kelompok Perlakuan dan Tingkat <i>Optical Density</i> pada Kelompok Kontrol.....	32
Tabel 5.2 Rata-rata dan Standar Deviasi Proliferasi Sel Fibroblas pada Setiap Kelompok Penelitian.....	34

Gambar 2.1 Daun Mengkudu.....	6
Gambar 2.2 Struktur Kimia <i>Scopoletin</i>	8
Gambar 2.3 Rumus Molekul Flavonoid <i>rutin</i>	9
Gambar 2.4 Rumus Molekul <i>Deacetylasperulosidic acid</i>	9
Gambar 2.5 Morfologi Fibroblas.....	13
Gambar 2.6 a Fibroblas dengan Arah Membujur.....	14
2.6 b Fibroblas dengan Arah Melintang.....	14
Gambar 4.1 <i>Microplate</i> yang Berisi Fibroblas.....	28
Gambar 4.2 Perlakuan Terhadap Sel Fibroblas dengan Menggunakan <i>Multichannel Pipet</i>	29
Gambar 4.3 Mikroplate Telah Ditetesi MTT Dimasukkan ke dalam Alat <i>ELISA Reader</i> Untuk Dilakukan Pembacaan <i>Multichannel Pipet</i>	30
Gambar 5.1 Rata-rata dan Uji Beda Proliferasi Sel Fibroblas Pada Masing-masing Kelompok Penelitian.....	34

Lampiran 1. Uji Statistik.....	47
Lampiran 2. Surat Identifikasi Tanaman Mengkudu	53
Lampiran 3. Surat Izin Pembuatan Ekstrak	54
Lampiran 4. <i>Print out</i> Hasil Penelitian dengan <i>Elisa Reader</i>	55
Lampiran 5. Alat dan Bahan Penelitian	56

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan salah satu negara *mega diversity* untuk tumbuhan obat di dunia dengan keanekaragaman hayati tertinggi kedua setelah Brazil. Dari 40.000 jenis flora yang ada di dunia sebanyak 30.000 jenis dijumpai di Indonesia dan 940 jenis diantaranya diketahui berkhasiat sebagai obat yang telah dipergunakan dalam pengobatan tradisional secara turun-temurun oleh berbagai etnis di Indonesia. Keanekaragaman hayati ini merupakan aset nasional yang bernilai tinggi untuk pengembangan industri agromedisin di dunia. Adanya kecenderungan pola hidup kembali ke alam (*back to nature*) dengan keyakinan bahwa mengkonsumsi obat alami relatif lebih aman dibanding dengan obat sintetik, maka berdampak tingginya permintaan dunia akan obat alami sehingga prospek pasar tumbuhan obat di Indonesia di dalam maupun di luar negeri semakin besar peluangnya (Dorly, 2005).

Banyak penelitian yang telah dilakukan dengan memanfaatkan bahan alam, salah satunya dalam membantu pada proses penyembuhan luka. Salah satu bahan alam yang dimanfaatkan adalah daun mengkudu (*Morinda citrifolia L.*). Ekstrak daun mengkudu memiliki kandungan bioflavonoid *rutin* dan *scopoletin* yang bermanfaat antiinflamasi dan mempunyai efek anti inflamasi dalam pengujian aktivitas reseptor antihistamin H-1 sehingga dapat dijadikan sebagai obat topikal untuk mengurangi inflamasi dan membantu proses penyembuhan

luka bakar. Ekstrak daun mengkudu berpotensi untuk mengurangi *erythema* yang disebabkan oleh paparan sinar *Ultraviolet B* (Brett, 2009).

Ekstrak daun mengkudu juga memiliki aktivitas antibakteri. Kandungan dalam daun mengkudu dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escheria coli*, *Aspergillus niger* dan *Candida albican*. Konsentrasi ekstrak daun mengkudu 2 mg/100ml, 5mg/100ml, dan 10mg/100ml telah menunjukkan aktivitas antibakteri yang cukup baik, penelitian ini dilakukan dengan membandingkan terhadap antibiotik Gentamycin dan Nystatine (Usha, 2010). Daun mengkudu mengandung *iridoid glycoside* berupa *iacetylasperulosidic acid* yang mempunyai fungsi sebagai antioksidan. Antioksidan ini digunakan untuk melawan radikal bebas yang berbahaya bagi tubuh (Wasina, 2010).

Salah satu alkaloid penting yang terdapat dalam tanaman mengkudu adalah xeronine. Xeronine dalam tubuh manusia berfungsi untuk mengaktifkan enzim-enzim dan membantu metabolisme fungsi protein di dalam sel serta mengatur bentuk dan rigiditas protein-protein spesifik yang terdapat di dalam sel (Lenny, 2006).

Adanya kandungan dalam daun mengkudu yaitu, *scopoletin*, bioflavonoid, alkaloid dan *iridoid glycoside* yang mempunyai manfaat sebagai antiinflamasi, antibakteri serta antioksidan menjadikan daun mengkudu banyak dimanfaatkan oleh masyarakat untuk menyembuhkan luka. Bahan alam tersebut secara empiris di masyarakat tidak menimbulkan efek toksik, namun belum dilakukan penelitian secara ilmiah untuk membuktikan bahwa bahan alam tersebut tidak toksik.

Berdasarkan latar belakang di atas, maka perlu dilakukan uji toksisitas ekstrak daun mengkudu terhadap sel fibroblas secara *in vitro* yang berguna untuk

mengetahui konsentrasi ekstrak daun mengkudu yang aman bagi tubuh dan tidak menimbulkan kerusakan pada jaringan.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah ekstrak daun mengkudu 2 mg/100ml, 5 mg/100ml, 7 mg/100ml, 10 mg/100ml, dan 12 mg/100ml toksik terhadap sel fibroblas?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum :

Untuk mengetahui sitotoksisitas ekstrak daun mengkudu terhadap sel fibroblas.

1.3.2 Tujuan khusus :

1. Untuk mengetahui toksisitas ekstrak daun mengkudu 2mg/100ml terhadap sel fibroblas.
2. Untuk mengetahui toksisitas ekstrak daun mengkudu 5mg/100ml terhadap sel fibroblas.
3. Untuk mengetahui toksisitas ekstrak daun mengkudu 7mg/100ml terhadap sel fibroblas.
4. Untuk mengetahui toksisitas ekstrak daun mengkudu 10mg/100ml terhadap sel fibroblas.
5. Untuk mengetahui toksisitas ekstrak daun mengkudu 12mg/100ml terhadap sel fibroblas.

1.4 Manfaat Penelitian

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah tentang toksisitas ekstrak daun mengkudu terhadap sel fibroblas untuk mendukung daun mengkudu sebagai bahan kedokteran gigi yang tidak toksik atau dapat diterima oleh tubuh.

2.1 Tanaman Mengkudu

2.1.1 Sejarah Singkat

Tanaman mengkudu berasal dari Asia Tenggara. Pengetahuan tentang pengobatan menggunakan mengkudu diwariskan dari generasi ke generasi melalui nyanyian dan cerita rakyat. Pada tahun 100 SM, penduduk Asia Tenggara bermigrasi dan mendarat di kepulauan Polinesia. Tanaman-tanaman tersebut memiliki banyak kegunaan, antara lain untuk bahan pakaian, bangunan, makanan dan obat-obatan. Mengkudu yang biasa disebut noni adalah salah satu jenis tanaman obat penting yang sering digunakan sebagai obat tradisional. Bangsa Polinesia memanfaatkan mengkudu untuk mengobati berbagai jenis penyakit. Bangsa Polinesia menggunakan tanaman mengkudu untuk dimanfaatkan dalam penyembuhan tumor, luka, penyakit kulit, gangguan pernapasan, termasuk asma, demam, dan penyakit usia lanjut. Tabib di zaman Bangsa Polinesia, selalu menggunakan tanaman mengkudu dalam resep pengobatannya (Maria, 2004).

Pada tahun 1950 ditemukan zat antibakteri pada tanaman mengkudu. Kandungan dalam tanaman mengkudu, baik buah maupun daun dapat menghambat pertumbuhan beberapa bakteri. Riset-riset ilmiah pada tahun 1960-1980 dilakukan untuk membuktikan bahwa mengkudu dapat menurunkan tekanan darah tinggi. Pada 1972 ahli biokimia, Dr. Ralph Heinicke mulai melakukan penelitian tentang *xeronine* dari mengkudu. Pada 1993, penemuan zat anti kanker (*damnacanthal*) di dalam buah mengkudu. Penelitian juga dilakukan pada daun

mengkudu yang memiliki efek dalam antiinflamasi. Efek antiinflamasi ini yang menjadikan daun mengkudu banyak digunakan masyarakat untuk obat penyembuhan luka (Nayak, 2009).

2.1.2 Klasifikasi (WHO, 1999)

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Divisio	: <i>Lignosae</i>
Filum	: <i>Angiospermae</i>
Sub filum	: <i>Dycotyledones</i>
Ordo	: <i>Gentianales</i>
Famili	: <i>Rubiaceae</i>
Genus	: <i>Morinda</i>
Spesies	: <i>Morinda citrifolia</i>



Gambar 2.1 Daun mengkudu (*Morinda citrifolia*)
(Kebun Raya Puwodadi, 2010)

2.1.3 Deskripsi Daun mengkudu

Daun mengkudu terletak berhadapan-hadapan. Berdaun tebal mengkilap. Daun mengkudu memiliki ukuran yang besar, dengan penampang tebal, dan jumlah tunggal dalam satu tangkai kecil. Bentuk daun mengkudu seperti jorong

lanset, berukuran sekitar 15-50 x 5-17 cm dengan tepi daun rata dan ujung lancip pendek. Pangkal daun berbentuk pasak. Urat daun menyirip. Warna hijau mengkilap dan tidak berbulu. Pangkal daun pendek, berukuran 0,5-2,5 cm. Ukuran daun penumpu bervariasi dan berbentuk segi tiga lebar. Daun mengkudu dapat dimakan sebagai sayuran. Nilai gizi tinggi karena banyak mengandung vitamin (Maria, 2004).

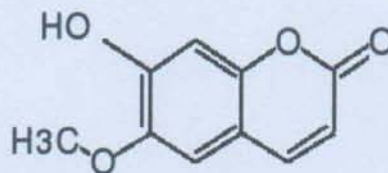
2.1.4 Kandungan Daun Mengkudu

Kandungan yang ada pada daun mengkudu antara lain, tanin, alkaloid, *scopoletin*, flavonoid dan tripenoid (Takashima, 2007).

1. Tanin adalah polifenol tanaman yang berfungsi mengikat dan mengendapkan protein. Tanin adalah senyawa fenolik kompleks yang memiliki berat molekul 500-3000. Tanin memiliki sifat antibakteri, antioksidan, dan dapat mengatur kadar gula dalam darah serta berperan dalam menghentikan perdarahan (Lenny, 2006).
2. Salah satu alkaloid penting yang terdapat dalam tanaman mengkudu adalah xeronine. Xeronine dihasilkan juga oleh tubuh manusia dalam jumlah terbatas yang berfungsi untuk mengaktifkan enzim-enzim dan mengatur fungsi protein di dalam sel. Xeronine mengandung bahan pembentuk (prekursor) xeronine, yaitu proxeronine yang merupakan sejenis asam koloid yang tidak mengandung gula, asam amino atau asam nukleat seperti koloid-koloid lainnya dengan berat molekul relatif besar, lebih dari 16.000. Di dalam tubuh manusia enzim proxeronase dan zat-zat lain akan mengubah proxeronine menjadi xeronine. Fungsi utama xeronine adalah mengatur bentuk dan

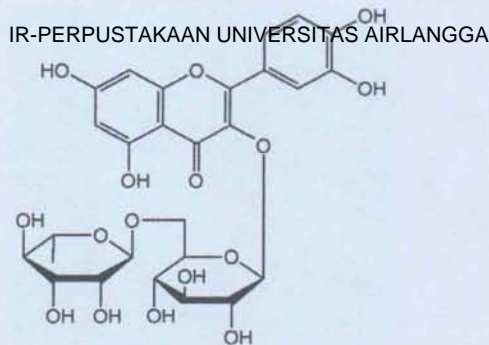
rigiditas (kekerasan) protein-protein spesifik yang terdapat di dalam sel
IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
(Lenny, 2006).

3. Aktifitas antibakteri tanaman mengkudu disebabkan kandungan *scopoletin* yang diduga dapat merusak dinding sel dan menghambat sintesis protein. Senyawa *scopoletin* (hidroksi-metoksi-kumarin) juga sangat efektif sebagai zat antiradang dan antialergi. Zat *scopoletin* dapat memperlebar pembuluh darah yang menyempit dan melancarkan peredaran darah serta bersifat antiradang dan alergi (Takashima, 2007).



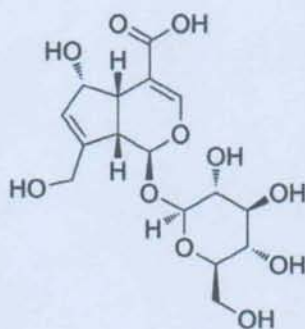
Gambar 2.2 *Scopoletin*
(Takashima, 2007)

4. Flavonoid yang terdapat pada daun mengkudu berupa bioflavonoid *rutin*. Bioflavonoid *rutin* mempunyai efek antiinflamasi dan antibakteri. *Rutin* diketahui dapat memberikan nutrisi dan support pada sistem sirkulasi termasuk dalam kapiler, membantu mencegah perdarahan dan memperkuat kapiler pada seseorang yang memiliki pembuluh darah lemah. *Rutin* juga berfungsi dalam menjaga stabilitas vitamin C sehingga penyerapan vitamin C oleh tubuh dapat lebih intensif. Penelitian mengatakan bahwa *rutin* dapat mengurangi edema pada vena, hal ini dikarenakan adanya aktivitas antiinflamasi (Wasina, 2010).



Gambar 2.3 Struktur *rutin*
(Wasina, 2010)

5. Kandungan lain yang terdapat pada daun mengkudu adalah terpenoids. Senyawa ini dapat terdistribusi luas termasuk pada manusia, amphibi, tanaman, fungi dan bakteri. Terpenoid juga memiliki aktivitas antibakteri tinggi. Tanaman yang mengandung terpenoid digunakan sebagai antiradang dan antiinflamasi serta diresepkan untuk pengobatan ulser pada lambung (Michael, 2009).
6. Senyawa *iridoid glycoside* berupa *deacetylasperulosidic acid* terdapat dalam daun mengkudu. Senyawa ini memiliki aktivitas antioksidan dalam melawan radikal bebas. Aktivitas antioksidan dalam tubuh dapat menangkal dan memutus rantai radikal bebas dan senyawa karsinogen penyebab kanker dan tumor (Shengmin, 2001).



Gambar 2.4 Struktur *Deacetylasperulosidic acid*
(Shengmin Shang, 2001)

Komposisi kandungan daun mengkudu dalam keadaan yang telah dikeringkan dapat dilihat pada tabel sebagai berikut: (EFSA, 2008)

Tabel 2.1 Komposisi Kandungan Daun Mengkudu Kering

Parameter	Mean	Standard Deviation	Minimum	Maximum	Number of batches analysed
Protein (g/100g)	19.1	1.08	171	20.0	8
Moisture (g/100g)	3.2	1.35	0.8	5.2	8
Fat (g/100g)	4.9	1.48	3.9	8.3	8
Ash (g/100g)	11.8	0.93	10.8	13.0	8
Carbohydrat (g/100g)	60.7	2.2	55.5	63.7	8
Calories per 100g	363	7.64	353	376	8
Dietary Fiber (g/100g)	45	3.10	40.7	475	4
B-Carotene (mg/100g)	2.9	3.17	0.47	9.70	7
Vitamin C (mg/100g)	<1	-	<1	1.20	7
Riboflavin (mg/100g)	1.22	0.25	0.97	1.46	3
Niacin (mg/100g)	4.35	1.08	3.17	5.30	3
Fe (mg/100g)	14.2	3.47	9.1	16.5	4
Ca (mg/100g)	2065	113	1950	2220	4
K (mg/100g)	2275	364	1770	2620	4
Na (mg/100g)	537	161	1367	755	5
Mg (mg/100g)	672	78	565	742	4
Zn (mg/100g)	5.1	0.8	4.3	6.3	5
Cu (mg/100g)	0.6	0.05	0.5	0.7	4
Mn (mg/100g)	10.2	0.7	94	11	4
P (mg/100g)	348	21	327	374	4
Oxalic Acid (g/100g)	0.09	0.04	<0.05	0.14	7
Tannic Acid (g/100g)	2.6	0.1	24	2.7	4

Daun mengkudu juga memiliki kandungan lain seperti, protein, karbohidrat, betakaroten, vitamin C dan lain sebagainya. Protein dalam daun mengkudu bermanfaat sebagai pembangun sel-sel yang rusak dan memberi ketahanan tubuh. Kandungan protein dalam daun mengkudu memiliki asam amio

yang spesifik. Asam amino dalam daun mengkudu terdapat pada tabel sebagai berikut: (EFSA, 2008).

Tabel 2.2 Kandungan Asam amino dalam Daun Mengkudu Kering

Amino Acid	Range (mg/100g)
Aspartic Acid	1500-1750
Threonine	550-750
Serine	550-750
Glutamic Acid	1450-1675
Proline	600-850
Glycine	700-950
Alanine	750-950
Cysteine	100-250
Valine	700-950
Methionine	100-250
Isoleucine	550-750
Leucine	1150-1350
Tyrosine	400-600
Phenylalanine	700-900
Histidine	200-375
Lysine	200-350
Arginine	500-750
Tryptophane	150-350

2.1.5 Manfaat Daun Mengkudu

Daun mengkudu memiliki beberapa aktivitas biologis yang dapat mempengaruhi fungsi metabolisme dan sintesis dalam tubuh, antara lain:

a. Aktivitas sebagai antioksidan

Oksidasi DNA, protein, dan lemak oleh oksigen reaktif (*reactive oxygen species/ ROS*) merupakan faktor utama kasus penuaan dini, penyakit kardiovaskuler, kanker, neurodegenerasi dan inflamasi. Untuk mencegah proses oksidasi, maka digunakan senyawa anti-oksidan. Aktivitas senyawa tersebut, biasanya disebut antioksidatif. Dari berbagai penelitian *in vitro*, ekstrak daun mengkudu diketahui memiliki aktivitas anti-oksidatif (Wasina, 2010).

b. Aktivitas sebagai antibakteri

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Daun mengkudu berpotensi sebagai agen antibakteri. Kemampuannya menghambat pertumbuhan mikrobia sangat luas. Hal ini dibuktikan dengan penelitian daya hambat ekstrak daun mengkudu terhadap beberapa bakteri yang juga dibandingkan dengan obat antibiotik buatan dan hasilnya, daun mengkudu dapat menghambat pertumbuhan bakteri hampir sama dengan kerja antibiotik sintesis seperti Nystatin dan Gentamycin. Daya antibakteri daun mengkudu akan semakin kuat dengan bertambahnya konsentrasi karena semakin banyak kandungan senyawa aktif yang menyebabkan semakin banyak bakteri yang akan terhambat sintesis dinding selnya dan akhirnya akan mati (Usha, 2010).

c. Aktivitas sebagai antiinflamasi

Kemampuan daun mengkudu sebagai antiinflamasi diperoleh dari mekanisme kerja *scopoletin*. *Scopoletin* sangat efektif sebagai zat antiradang dan antialergi. Zat *scopoletin* dapat memperlebar saluran pembuluh darah yang menyempit dan melancarkan peredaran darah dan bersifat anti peradangan dan alergi (Pandurag, 2006).

d. Aktivitas sebagai analgetik

Dugaan efek analgetik daun mengkudu terletak pada kemampuannya dalam menghambat fungsi platelet dengan cara mengganggu sintesa tromboksan sehingga konversi asam arakhidonat menjadi endoperoksid terganggu dan sintesis prostaglandin menurun. Prostaglandin merupakan sensitisasi reseptor nyeri terhadap stimulus mekanik dan kimiawi yang akan dilepaskan bilamana sel mengalami kerusakan (Srivastava, 2007).

e. Aktivitas Antidiabetik

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

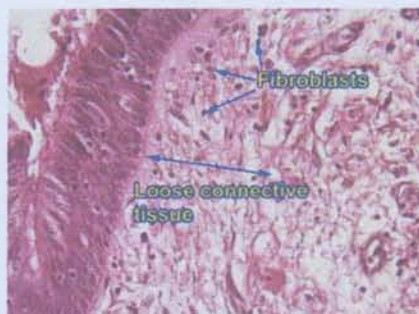
Ekstrak daun mengkudu memiliki efek hipoglikemik (Adnyana, 2004).

Dari penelitian yang telah dilakukan, disimpulkan bahwa uji aktivitas antidiabetes ekstrak mengkudu mampu menurunkan kadar glukosa darah pada tikus putih yang telah dibebani glukosa dan yang telah diberi aloksan (Fitri, 2009).

2.2 Fibroblas

2.2.1 Morfologi

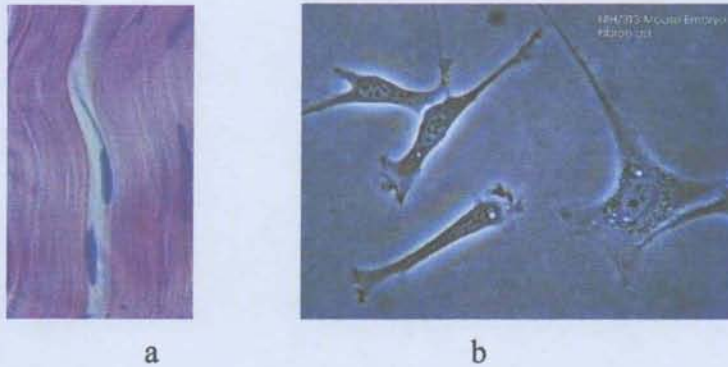
Fibroblas merupakan jaringan ikat yang terbentuk dari diferensiasi sel mesenkim. Fibroblas berbentuk sel besar gepeng dan bercabang-cabang, yang dari samping terlihat bentuk gelendong atau fusiform. Inti lonjong dan diliputi membran inti yang halus disertai sedikit granula kromatin halus.



Gambar 2.5 Morfologi fibroblas
(Regezi, 2003)

Fibroblas dewasa yang tidak aktif disebut juga dengan fibrosit. Sel ini berukuran lebih kecil daripada fibroblas, berbentuk gelendong, memiliki inti yang panjang, lebih gelap, lebih kecil dan sitoplasmanya bersifat asidofil serta mengandung sedikit retikulum endoplasma yang kasar. Fibrosit dapat dirangsang dan aktivitas sintetiknya dapat diaktifkan kembali menjadi fibroblas pada saat proses penyembuhan luka (Carlos, 1998).

Fibroblas merupakan sel utama yang terdapat pada jaringan ikat padat seperti tendon, tersusun di barisan paralel pada tendon, badan sel tersebut berbentuk kumparan dalam deretan bila dilihat menggunakan mikroskop dengan arah membujur, pada sayatan melintang, secara garis besar sel tampak sebagai bidang berbentuk bintang, gelap di antara gelondong kolagen (Fawcett, 2002).



Gambar 2.6 a. Fibroblas dibawah mikroskop dengan arah membujur b. Sayatan melintang fibroblas (Fawcett, 2002)

2.2.2 Fungsi Sel Fibroblas dalam Penyembuhan Luka

Komponen dalam proses penyembuhan luka, antara lain, koagulasi dan peradangan, fibroplasia, perbaikan matriks, angiogenesis, epitelisasi, dan faktor-faktor pertumbuhan. Beraneka ragam sel ditemukan dalam proses penyembuhan luka seperti trombosit, neutrofil, makrofag, fibroblast, sel endotel, keratinosit, dan sel epitel yang memegang peranan sangat penting (Farida, 2003).

Pada kondisi jaringan terluka, sel fibroblas muncul pada 2-3 hari paska terjadinya luka dan mencapai jumlah maksimal pada hari ke 7-14 paska luka. Sel fibroblas muncul sebagai tanda dimulainya tahap proliferasi pada proses penyembuhan luka. Sel fibroblas ikut menjadi bagian dari jaringan granulasi yang terdiri dari pembuluh-pembuluh darah kecil yang terbentuk dari jaringan ikat

kendor dan mengandung fibroblas serta sel-sel radang (Robbins dan Kumar, 2005).

2.2.3 Peran Sel Fibroblas terhadap Matriks Ekstraseluler

Dalam proses penyembuhan luka juga terjadi sintesis dan degradasi protein matriks ekstrasel. Matriks ekstrasel secara langsung mempengaruhi peristiwa selular dan memodulasi sel yang berespon terhadap faktor pertumbuhan. Komponen utama protein matriks ekstrasel adalah kolagen yang disintesis oleh fibroblas. Terbentuknya serat kolagen akan berpengaruh pada poses penyembuhan luka dan terbentuknya jaringan granulasi (Kusumo, 1991).

Komponen dasar matriks ekstraseluler ada 3, yaitu protein struktur fibrosa yang memberikan kekuatan regang dan rekoil, gel yang dihidrasi oleh air yang memungkinkan adanya daya pegas dan pelumasan, serta glikoprotein adhesif yang melekatkan unsur matriks satu sama lain serta melekatkan pada sel. Ekstraseluler matriks merupakan suatu kompleks makromolekul yang mengalami remodeling secara dinamis dan konstan yang disintesis secara lokal dan menyusun bagian penting pada setiap jaringan (Robbins, 2005).

2.3 Uji Sitotoksisitas

Uji sitotoksisitas adalah bagian dari evaluasi bahan kedokteran gigi yang diperlukan untuk prosedur skrining standar. Tujuan dari uji sitotoksisitas adalah untuk mengetahui efek toksik suatu bahan secara langsung terhadap kultur sel (Freshney, 2000).

berikut:

1. Uji primer (pendahuluan), yaitu uji toksisitas dari bahan secara *in vitro* yang dikontakkan secara langsung pada kultur sel atau jaringan.
2. Uji sekunder, yaitu evaluasi kemampuan bahan untuk menimbulkan toksisitas sistemik. Uji ini dilakukan pada hewan coba.
3. Uji aplikasi klinis, merupakan evaluasi bahan sesuai dengan pemakaian klinis atau identifikasi semua efek bahan yang akan digunakan pada jaringan, bahan tersebut ditempatkan sesuai fungsinya pada hewan seperti pada manusia.

Uji sitotoksisitas dapat dilakukan dengan menggunakan hewan coba secara *in vivo* atau menggunakan kultur sel secara *in vitro*. Tetapi, metode yang sering digunakan adalah *in vitro* dengan menggunakan kultur sel, sedangkan prinsip dasar menumbuhkan sel secara *in vitro* adalah merangcang sistem kultur agar menyerupai keadaan *in vivo*. Sel yang akan diteliti dipindah dari jaringan asalnya, kemudian ditempatkan dalam wadah kultur untuk mendapatkan tempat pertumbuhan dan nutrisi yang cukup pada temperatur 37°C dan pH lingkungan yang terjaga. Disamping itu ada beberapa alasan penggunaan penelitian lebih banyak secara *in vitro* dengan kultur sel, antara lain sebagai berikut:

1. Kultur sel dapat terpapar secara langsung oleh bahan yang diujikan, sehingga kultur sel sangat sensitif terhadap bahan yang bersifat toksik.
2. Lingkungan pada kultur (pH, suhu, dan tekanan osmotik) lebih terkontrol.
3. Respon terhadap sel hidup dapat langsung diamati.
4. Sampel lebih homogen.
5. Mengurangi penggunaan hewan coba.

6. Dapat diukur secara kuantitatif.

Adapun kekurangan metode *in vitro* dengan kultur sel harus dilakukan dalam kondisi aseptik, karena sel dapat mati jika terkontaminasi dengan mikro organisme (Freshney, 2000).

Pengujian efek biokompabilitas pada tingkat awal dari material yang digunakan pada kedokteran gigi untuk mengetahui toksisitas material yang dilakukan pengujian dengan menggunakan kultur sel. Toksisitas material yang diuji memberikan viabilitas atau sel yang hidup. Apabila material yang diuji memberikan viabilitas sel hidup yang tinggi, menunjukkan bahwa material yang diuji tidak memberikan efek toksik, begitu juga sebaliknya (Yuliati, 2004).

Salah satu syarat bahan yang digunakan dalam kedokteran gigi seharusnya tidak toksik, tidak mengiritasi, dan mempunyai sifat biokompabilitas atau bahan yang diproduksi tidak boleh mempunyai efek yang merugikan terhadap lingkungan biologis, baik lokal maupun sistemik. Salah satu metode untuk menilai sitotoksitas suatu bahan adalah dengan uji enzimatis dengan pereaksi MTT. Parameter toksisitas didasarkan pada CD_{50} , artinya suatu bahan dikatakan toksik apabila persentase sel hidup setelah terpapar bahan tersebut kurang dari 60% (Asti, 1994).

Uji sitotoksitas dengan MTT esai dapat digunakan untuk mengukur proliferasi dan sitotoksitas terhadap sel. Penggunaan MTT esai ini cukup positif, cepat, semiotomatis, dan tidak menggunakan radioisotop. Uji ini berdasar kemampuan sel hidup untuk mereduksi garam 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) yang berwarna kuning dan larut menjadi endapan formazan yang berwarna biru ungu dan tidak larut. Reduksi garam

tetrazolium terjadi intrasel dan melibatkan enzim dari retikulum endoplasma dan mitokondria. Dengan demikian jumlah sel yang hidup dapat diukur sebagai konsentrasi hasil produk MTT yang diukur dengan spektrofotometer (Siregar, 2000).

Keuntungan esai ini adalah pengukuran lebih akurat dan sensitif karena menggunakan alat spektrofotometer yang dapat mendeteksi perubahan metabolisme sel secara jelas, peralatan yang digunakan biasa tersedia di laboratorium, menghemat waktu, tenaga, dan tidak menggunakan isotop radioaktif.

2.4 Ekstrak Daun Mengkudu

Ekstrak adalah sediaan kering, kental atau cair yang dibuat dengan menyaring simplisia nabati atau hewani menurut cara yang sesuai di luar pengaruh cahaya matahari langsung. Dengan diketahuinya zat aktif yang terkandung dalam simplisia akan mempermudah pemilihan cairan pelarut dan cara ekstraksi yang tepat. Ekstraksi daun mengkudu dengan etanol pada suhu 25°C akan menghasilkan *rutin* dan *deacetylasperulosidic acid*. Berdasarkan hal di atas, ekstraksi dilakukan pada suhu kamar (West, 2010)

2.5 Kultur Sel

Kultur sel merupakan sebuah metode untuk mempelajari aktivitas sel hidup yang bebas dari variasi sistem yang mungkin timbul oleh karena ketidakseimbangan sistem tubuh atau karena adanya stres yang dialami oleh hewan coba selama perlakuan (Fresney, 2000). Mengkultur sel artinya

menempatkan sel hidup ke dalam suatu media yang dapat membuat sel berkembang biak atau tumbuh secara *in vitro*. Pertumbuhan sel dilakukan secara mitosis, untuk mendukung terjadinya proses mitosis diperlukan persyaratan dari media kultur yang disesuaikan dengan media kehidupan sel secara *in vivo* atau setidaknya mendekatinya (Ma'at, 1999).

Media *Eagle* adalah media yang juga dipakai untuk kultur sel fibroblas. Media ini berisi nutrisi bagi pertumbuhan sel seperti asam amino, vitamin dan garam mineral. Serum juga diberikan untuk memenuhi kebutuhan akan hormon dan faktor pertumbuhan (*Growth Factor/GF*). Pada pertumbuhan media ini ditambahkan pula antibiotik kanamisin-streptomisin-penisilin untuk menghindari kontaminasi dari organisme seperti bakteri, jamur, ragi dan spora jamur yang mungkin dapat tumbuh selama penyimpanan atau selama proses perlakuan. Kultur sel diperoleh dengan cara mengkultur sel jaringan hidup melalui proses enzimatik, kimiawi, ataupun mekanis untuk menghasilkan suspensi sel yang kemudian ditanam ke dalam media yang sesuai. Kultur sel semacam ini disebut sebagai kultur sel primer. Hasil pembiakan secara berulang-ulang ataupun hasil transformasi dari kultur sel primer disebut *cell lines* (Fresney, 2000).

Kultur sel mengalami tiga fase pertumbuhan yaitu, *lag phase*, *log phase* dan *plateau phase*. *Lag phase* yaitu fase *seeding* sel, fase sel-sel mulai menempel/tertanam pada media. *Log phase* yaitu fase sel-sel mulai mengadakan pertumbuhan sampai batas tertentu. *Plateau phase* yaitu fase stabilitas pertumbuhan sel, apabila telah tercapai kepadatan sel yang melebihi kapasitas media pertumbuhan maka pertumbuhan sel akan cenderung stabil. Pada penelitian

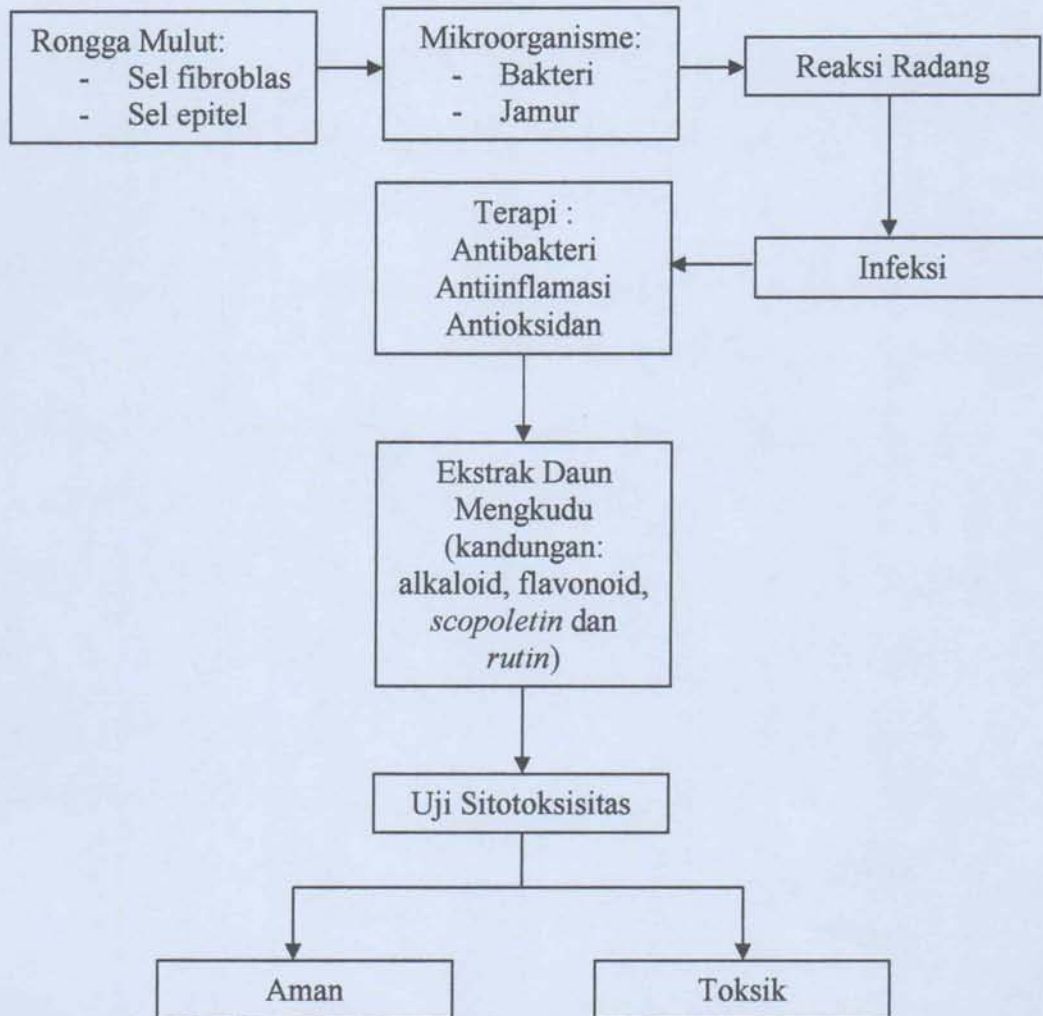
ini diterapkan pada *plateau phase* sehingga dapat mengontrol pertumbuhan sel fibroblas dalam keadaan stabil (Ma'at, 1999).

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Fibroblas sering digunakan dalam kultur *cell lines*, yaitu sel L-29 yang berasal dari fibroblas paru tikus dan sel BHK-21 yang berasal dari fibroblas ginjal hamster. Sel BHK-21 lebih banyak digunakan untuk menguji sitotoksisitas bahan dan obat-obatan di kedokteran gigi. Penggunaan kultur sel BHK-21 yang berasal dari fibroblas ginjal hamster dikarenakan sel fibroblas merupakan sel terpenting dan komponen terbesar dari pulpa, ligamen periodontal dan gingiva (Hadijono, 2000).

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Dalam rongga mulut terdapat berbagai macam mikroorganisme antara lain bakteri dan jamur. Bakteri dapat menyebabkan infeksi ketika terjadi ketidakseimbangan antara *host* yaitu manusia, *agent* dalam hal ini bakteri dan *environment* yaitu kondisi rongga mulut. Jamur akan tumbuh dalam rongga mulut

jika terdapat lingkungan yang baik untuk pertumbuhan jamur, yaitu pada individu yang memiliki *oral hygiene* yang tidak baik.

Infeksi yang diakibatkan oleh mikroorganisme akan direspon oleh tubuh dengan adanya proses peradangan. Untuk mengatasinya, diperlukan antibakteri dan antiinflamasi guna mengurangi radang dan menurunkan aktivitas mikroorganisme penyebab infeksi. Ekstrak daun mengkudu memiliki aktivitas antibakteri dan anti inflamasi. Kandungan flavonoid, alkaloid, dan *scopoletin* mempunyai pengaruh terhadap terhadap proses inflamasi, merangsang makrofag untuk menghasilkan *growth factor* yang diperlukan dalam meningkatkan proliferasi fibroblas yang terdapat di dalam berbagai organ tubuh termasuk di dalam rongga mulut.

Dalam perkembangannya, daun mengkudu telah diteliti memiliki manfaat sebagai antibakteri, antioksidan dan antiinflamasi, namun belum diketahui tingkat keamanan penggunaan terhadap sel, maka dilakukan uji toksisitas ekstrak daun mengkudu terhadap sel fibroblas yang terdapat pada berbagai organ termasuk pada mukosa rongga mulut.

3.2 Hipotesis Penelitian

Ekstrak daun mengkudu konsentrasi 2mg/100ml, 5mg/100ml, 7mg/100ml, 10mg/100ml dan 12mg/100ml tidak toksik terhadap sel fibroblas.

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dipergunakan adalah penelitian eksperimental laboratoris.

4.2 Tempat Penelitian

Pembuatan ekstrak daun mengkudu dilakukan di Laboratorium Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga Surabaya. Pembuatan kultur jaringan dan penelitian dilakukan di Pusat Veterinaria Farma Surabaya.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel penelitian yang digunakan berupa kultur sel fibroblas BHK-21. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini sebesar 8 dengan dasar, yang pertama sampel cukup homogen dan yang kedua berdasarkan estimasi karena penelitian ini merupakan penelitian pendahuluan (Budiharto, 2008).

Penentuan banyaknya sampel juga dapat diperoleh dengan menggunakan rumus (Lemeshow, 1990) :

$$\begin{aligned}
 n &= \frac{2\sigma^2 (Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta})^2}{(\mu_0 - \mu_1)^2} \\
 &= \frac{2(0,016)^2 (1,96 + 90)}{(0,13 - 0,16)^2} \\
 &= 5
 \end{aligned}$$

Keterangan :

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

n = besar sampel

σ = standar deviasi

$Z_{1-\alpha}$ = harga standar normal (tergantung harga α ; $\alpha = 0,05$)

$Z_{1-\beta}$ = besarnya kekuatan penelitian

$\mu_0 - \mu_1$ = beda rata-rata masing-masing kelompok

4.4 Identifikasi Variabel Penelitian

Variabel penelitian ini menurut Budiharto (2008) adalah:

1. Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah ekstrak daun mengkudu dengan konsentrasi 2mg/100ml, 5mg/100ml, 7mg/100ml, 10mg/100ml dan 12mg/100ml.

2. Variabel Tak Bebas

Variabel tak bebas penelitian ini adalah jumlah sel fibroblas yang hidup setelah pengujian.

3. Variabel Terkendali

Variabel terkendali dari penelitian ini adalah media, alat, bahan dan cara kerja.

4.5 Definisi Operasional Variabel Penelitian

Definisi operasional variabel penelitian ini (Murti, 1997) meliputi :

1. Ekstrak daun mengkudu

Ekstrak daun mengkudu adalah hasil maserasi daun mengkudu untuk menarik semua komponen kimia yang terdapat dalam simplisia.

2. Uji Sitotoksitas

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Uji yang bertujuan untuk mengetahui efek toksik suatu bahan secara langsung terhadap kultur sel dengan menggunakan persentase sel yang hidup pada kultur sel dan dihitung berdasarkan rumus.

3. Tingkat Sitotoksitas

Kadar sitotoksitas dihitung melalui perbandingan jumlah sel yang hidup dengan total sel di dalam kultur baik yang hidup maupun yang mati.

4. Jumlah sel yang hidup

Apabila sel fibroblas *Baby Hamster Kidney* (BHK-21) yang dapat menghasilkan konsentrasi hasil produk MTT yang diukur dengan spektrofotometer.

5. Jumlah sel yang mati

Apabila sel fibroblas *Baby Hamster Kidney* (BHK-21) tidak menghasilkan konsentrasi hasil produk MTT

4.6 Alat dan Bahan

4.6.1 Alat-alat penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- Kertas saring
- Gelas ukur
- Alat timbangan
- Corong *Buchner*
- *Rotary Evaporator*
- *Autoclave*

- Tabung reaksi
- *Elisa Reader*
- Mikroskop cahaya
- *Multichannel* pipet 25 μ l
- Inkubator 37°C, 5 % CO₂
- Ujung pipet steril
- *Microplate*
- Botol ukur *Roux*
- Vial 2 ml
- *Shaker*

4.6.2 Bahan-bahan penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- a. Akuades steril
- b. Daun mengkudu
- c. Etanol 96 %
- d. Povidone Iodine 1 %
- e. Sel fibroblas dari BHK 21 (*Baby Hamster Kidney*)
- f. *Media Eagles*
- g. MTT
- h. DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*)
- i. PBS

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Ekstrak Daun Mengkudu

Mencuci daun mengkudu yang masih segar dan mengiris kecil-kecil daun mengkudu sebanyak 500 gram, kemudian dikeringkan (diangin-anginkan) di udara terbuka (tidak boleh terkena sinar matahari) sampai kering dan didapatkan simplisia kering daun mengkudu. Berat daun mengkudu setelah proses pengeringan sebesar 125 gram. Setelah kering, membuat ekstrak etanol 96 % dengan cara maserasi (perendaman). Proses perendaman dilakukan dengan cara maserasi diam, yaitu simplisia kering direndam dengan etanol 96 % dan dibiarkan selama 1x24 jam. Proses maserasi ini dilakukan selama 3 hari. Setiap 1x24 jam dilakukan penyaringan menggunakan corong "*Buchner*" dan pompa "*Vacuum*". Setiap proses perendaman kemudian disaring dan diambil filtratnya. Filtrat hasil ekstraksi dikumpulkan dan dipekatkan dengan menggunakan *Rotary Evaporator* hingga didapatkan ekstrak daun mengkudu kental. Hasil ekstraksi daun mengkudu yang diperoleh adalah 2,1538 gram ekstrak daun mengkudu. Konsentrasi ekstrak 2mg/100ml, 5mg/100ml, 7mg/100ml, 10mg/100ml dan 12mg/100ml dibuat dengan bantuan Fakultas Sains dan Teknologi di laboratorium kimia dengan formulasi yang telah ditentukan.

4.7.2 Cara kerja penelitian

- a. Tahapan split sel BHK
 1. Mencairkan kultur sel induk (*seed cells*) yang sebelumnya telah dibekukan di dalam akuades steril suhu 37°C. Setelah cair, kemudian memutar kultur sel induk dengan *centrifuge* 500 RPM selama 5 menit.

2. Di dalam *laminar flow*, membuang supernatan yang ada sehingga tersisa endapan sel di dasar. Endapan sel tersebut diambil dan disuspensikan dengan media *Eagles* dan *fetal bovine serum* 10%.
3. Menambahkan media *Eagles* sebanyak 36 ml ke dalam botol yang berisi serum 4 ml sehingga didapat hasil akhir 40 ml media *Eagles* + serum
4. Endapan sel yang telah disuspensikan ditanam di botol roux steril, lalu diinkubasi 37°C, 5% CO₂ sampai sel monolayer terbentuk (± 2 hari, dilihat dengan mikroskop)
5. Botol *Roux* besar yang berisi sel BHK tersebut, kemudian medianya dibuang dan dicuci dengan PBS 15 ml sebanyak 3-5 kali
6. Mengisi Botol *Roux* dengan *versene trypsine* 1 ml
7. Sel-sel dalam botol tersebut akan terlihat menggerombol kemudian dihomogenisasikan dengan media *Eagles* sebanyak 10 ml.
8. Sel yang telah homogen dimasukkan ke dalam *microplate* 96 well dengan kepadatan 2×10^5 sel/ml.
9. Menginkubasikan selama 24 jam dalam inkubator 37°C, 5% CO₂.



Gambar 4.1 : *microplate* yang berisi sel fibroblas dalam media *Eagles*

b. Tahapan Perlakuan

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

1. Mengamati *microplate* yang berisi sel fibroblas yang telah diinkubasi di bawah mikroskop cahaya, apakah sel fibroblas yang telah ditanam dalam setiap *well* telah cukup banyak untuk dilakukan perlakuan.
2. Setiap perlakuan mempunyai 8 replika/*well*. Melakukan perlakuan yaitu meneteskan setiap 8 replika/*well* dengan ekstrak daun mengkudu dengan konsentrasi 2 mg, 5 mg, 7mg, 10mg dan 12 mg dalam 100ml pelarut sebanyak 25 μ l. Sedangkan 8 *well* untuk kontrol sel, tidak dilakukan penetesan. Diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator 37°C, 5 % CO₂.



Gambar 4.2 : perlakuan terhadap sel fibroblas dengan menggunakan *Multichannel pipet*

c. Tahapan pengamatan dan pembacaan hasil perlakuan

1. Pembacaan dengan *Elisa Reader*, sebelum dilakukan pembacaan, media dibuang, lalu meneteskan setiap *well* dengan MTT sebanyak 10 μ l. Kemudian melakukan inkubasi lagi selama 4 jam.
2. Meneteskan setiap *well* dengan 50 μ l DMSO dan menggoyangkannya dengan alat *Shaker*.

3. Menyiapkan *microplate*, kemudian melakukan pembacaan dengan IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA memasukkan *microplate* tersebut ke dalam *Elisa Reader* dan mengukur absorbansinya.



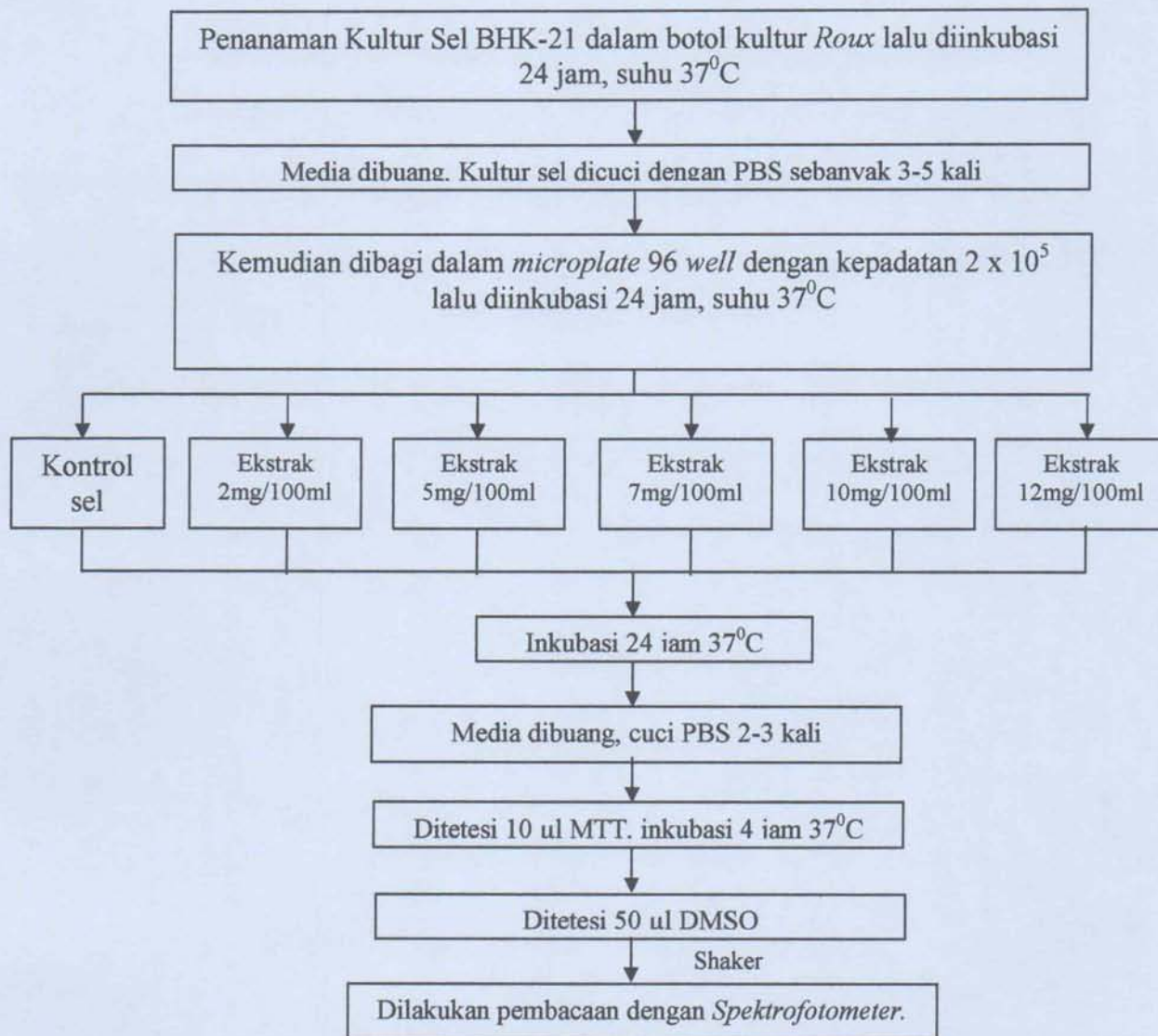
Gambar 4.3 : *Microplate* telah ditetsi MTT dimasukkan ke dalam alat *ELISA reader* untuk dilakukan pembacaan

4.8 Alur Penelitian

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Alur penelitian yang telah dijabarkan di atas dapat digambarkan pada bagan

berikut :



4.9 Analisis Data

Data penelitian ini dianalisis dengan uji statistik menggunakan *one way Anova* dilanjutkan uji *HSD Tukey* dengan taraf kemaknaan 5%.

BAB 5
 IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan terhadap sel fibroblas setelah peneteskan ekstrak etanol daun mengkudu dengan berbagai konsentrasi berbeda, sebelum dilakukan pembacaan masing-masing kelompok perlakuan dan kontrol sel. Hasil pembacaan dengan menggunakan *ELISA Reader* yang berupa tingkat absorbansi atau *optical density*, dengan angka-angka *optical density* dapat dilihat pada tabel 5.1. Semakin tinggi angka *optical density*, menunjukkan jumlah sel fibroblas yang hidup semakin banyak pula.

Tabel 5.1 Tingkat *Optical Density* Sel Fibroblas pada Kelompok Perlakuan dan Tingkat *Optical Density* pada Kelompok Kontrol

No	Konsentrasi Ekstrak Daun Mengkudu (<i>Morinda citrifolia L</i>) (mg/100ml)					Kontrol Sel	Kontrol Media
	2	5	7	10	12		
1	0,204	0,294	0,251	0,232	0,218	0,223	0,082
2	0,263	0,216	0,226	0,296	0,201	0,271	0,051
3	0,236	0,256	0,218	0,204	0,269	0,208	0,069
4	0,239	0,251	0,287	0,272	0,232	0,223	0,069
5	0,241	0,274	0,32	0,283	0,267	0,379	0,083
6	0,287	0,276	0,297	0,244	0,277	0,405	0,062
7	0,266	0,189	0,251	0,286	0,376	0,358	0,056
8	0,263	0,213	0,218	0,272	0,332	0,248	0,081
Jumlah	1,999	1,969	2,068	2,089	2,172	2,175	0,553
Rata-rata	0,249	0,246	0,259	0,261	0,272	0,271	0,069

Berdasarkan tabel di atas, dapat diketahui jumlah sel yang hidup. Perhitungan persentase jumlah sel yang hidup adalah sebagai berikut :

$$\% \text{ sel hidup} = \frac{\text{OD perlakuan} + \text{OD media}}{\text{OD kontrol sel} + \text{OD media}} \times 100 \%$$

Keterangan :

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

% sel hidup : persentase jumlah sel hidup setelah pengujian

OD Perlakuan : nilai *optical density* fibroblas pada setiap sampel setelah pengujian hasil pembacaan dengan Elisa Reader

OD media : nilai *optical density* fibroblas pada kontrol media

OD kontrol sel: nilai *optical density* fibroblas pada kontrol sel

Hasil penghitungan dikatakan tidak toksik bila ≥ 60 % hidup

Dari penelitian didapatkan bahwa :

Ekstrak daun mengkudu dengan 2mg/100 ml

$$\% \text{ hidup} = \frac{1,999 + 0,069}{0,271 + 0,069} \times 100 \% = 93,54\%$$

Ekstrak daun mengkudu dengan 5mg/100 ml

$$\% \text{ hidup} = \frac{1,969 + 0,069}{0,271 + 0,069} \times 100 \% = 92,44\%$$

Ekstrak daun mengkudu dengan 7mg/100 ml

$$\% \text{ hidup} = \frac{2,068 + 0,069}{0,271 + 0,069} \times 100 \% = 96,07\%$$

Ekstrak daun mengkudu dengan 10mg/100 ml

$$\% \text{ hidup} = \frac{2,089 + 0,069}{0,271 + 0,069} \times 100 \% = 96,84\%$$

Ekstrak daun mengkudu dengan dosis 12mg/100 ml

$$\% \text{ hidup} = \frac{2,172 + 0,069}{0,271 + 0,069} \times 100 \% = 98,99\%$$

Dari perhitungan di atas, dapat diketahui bahwa ekstrak daun mengkudu tidak menimbulkan efek toksik pada sel, dimana persentase sel hidup di atas 60%.

5.2 Analisis Data

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Berdasarkan hasil pengamatan dan penghitungan proliferasi sel fibroblas terhadap penggunaan ekstrak etanol daun mengkudu, yang terbagi atas 5 kelompok penelitian dengan masing-masing 8 sampel, yaitu kelompok ekstrak 12mg/100ml, 10mg/100ml, 7mg/100ml, 5mg/100ml, 2mg/100ml dan kontrol sel, didapatkan hasil sebagai berikut :

Tabel 5.2. Rata-rata dan standar deviasi proliferasi sel fibroblas pada setiap kelompok penelitian.

Kelompok	N	Rata-rata	Standar deviasi
2 mg/100ml	8	0,2498	0,0253
5 mg/100ml	8	0,2461	0,0366
7 mg/100ml	8	0,2585	0,0388
10 mg/100ml	8	0,2611	0,0315
12 mg/100ml	8	0,2715	0,0586

Dari tabel 5.2. dapat dilihat adanya kecenderungan peningkatan rata-rata proliferasi sel fibroblas pada konsentrasi ekstrak yang lebih tinggi yaitu pada konsentrasi 12 mg/100ml, namun sel hidup terendah terdapat pada konsentrasi 5 mg/100ml.



Gambar 5.1. Jumlah sel fibroblas pada masing-masing kelompok penelitian.

Pada gambar 5.1. dapat dilihat rata-rata proliferasi sel fibroblas tertinggi terdapat pada kelompok ekstrak 12mg/100ml, dan proliferasi sel fibroblas paling rendah pada kelompok kontrol sel.

Perolehan data jumlah sel fibroblas yang diberi perlakuan dengan ekstrak daun mengkudu dilakukan uji *Oneway Anova*. Uji *oneway Anova* dimaksudkan untuk mengetahui signifikansi hasil perhitungan jumlah sel terhadap konsentrasi. Untuk melakukan uji tersebut, sebelumnya terdapat persyaratan terhadap data yang akan diuji yaitu data harus berdistribusi normal dengan menggunakan statistik uji Kolmogorov-Smirnov dan varians antar variabel percobaan harus konstan atau homogen dengan menggunakan statistik uji Levene tes (Imam, 2005).

5.2.1 Uji Normalitas Kolmogorov Smirnov

Statistik uji Kolmogorov-Smirnov digunakan untuk menguji kenormalan data guna memenuhi syarat untuk dilakukannya uji *Oneway Anova*. Data dari tabel 5.1, pada uji *Kolmogorov Smirnov* didapatkan hasil seluruh kelompok penelitian mempunyai nilai lebih besar dari 0,05 ($\text{Sig} > 0,05$) yang berarti data pada seluruh kelompok penelitian berdistribusi normal.

5.2.2 Uji Homogenitas Varians Levene

Uji Homogenitas Varians Levene perlu dilakukan untuk mengetahui varians data yang digunakan sama atau tidak. Uji Homogenitas Varians Levene ini adalah salah satu syarat lain yang perlu dipastikan sebelum uji *Anova*

dijalankan. Hasilnya seperti yang terlihat pada Tabel tes homogenitas dalam lampiran menunjukkan nilai Sig. didapatkan sebesar 0,064 (nilai diatas 0,05). Maka dapat disimpulkan bahwa varians pada data penelitian tersebut adalah homogen.

5.2.3 Uji *Oneway Annova*

Setelah data telah dinyatakan normal dan homogen maka uji statistik untuk analisa selanjutnya adalah *Oneway Annova*, hasilnya seperti yang terlihat pada Tabel analisis *Annova* dalam lampiran. Dari tabel 5.6 didapatkan nilai Sig. sebesar 0,000 yang berada di bawah nilai 0,05. Jadi dapat disimpulkan bahwa rata-rata peningkatan sel fibroblas dalam masing-masing pelakuan berbeda secara signifikan.

Untuk mengetahui kelompok konsentrasi mana yang rata-ratanya berbeda dilakukan uji lanjut *Post Hoc Test* cara *Tukey* yang dapat dilihat pada Tabel *Multiple comparison* dalam lampiran. Perbedaan yang signifikan pada tabel ini dinyatakan dengan tanda *asterik* ‘*’ pada *mean difference* atau nilai Sig. yang lebih kecil dari 0,05. Dari tabel *Post Hoc Test* cara *Tukey* terlihat bahwa perbedaan yang signifikan terdapat pada kelompok konsentrasi 0% (Kontrol sel), 2 mg/100ml, 5 mg/100ml, 7 mg/100ml, 10 mg/100ml, dan 12 mg/100ml.

Untuk mengetahui kelompok konsentrasi yang mempunyai rata-ratanya tidak berbeda dilakukan uji lanjut *Homogeneous Subsets* yang dapat dilihat pada lampiran. Dari tabel tersebut terlihat bahwa kelompok konsentrasi 2 mg/100ml, 5 mg/100ml, 7 mg/100ml, 10 mg/100ml, dan 12 mg/100ml berada pada satu kolom yang sama yaitu *subset 2*. Dalam tabel tersebut menunjukkan rata-rata

peningkatan sel fibroblas pada kelompok dengan konsentrasi 2 mg/100ml, 5 mg/100ml, 7 mg/100ml, 10 mg/100ml, dan 12 mg/100ml tidak berbeda secara signifikan. Kelompok sel pada penelitian ini terletak pada *subset 1* sehingga jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan maka terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan yang diberikan ekstrak mengkudu.

Daun mengkudu mengandung senyawa aktif yang berfungsi sebagai antibakteri, antiinflamasi dan antioksidan. Aktifitas antibakteri tanaman mengkudu disebabkan kandungan *scopoletin* (*hidroksi-metoksi-kumarin*), yang diduga dapat merusak dinding sel dan menghambat sintesa protein. Senyawa *scopoletin* (*hidroksi-metoksi-kumarin*) sangat efektif sebagai zat antiradang dan antialergi. Zat *scopoletin* dapat memperlebar saluran pembuluh darah yang menyempit dan melancarkan peredaran darah dan bersifat anti peradangan dan alergi (Takashima, 2007).

Senyawa *iridoid glycoside* berupa *deacetylasperulosidic acid* dalam daun mengkudu mempunyai manfaat sebagai antioksidan dalam melawan radikal bebas. Radikal bebas adalah molekul yang kehilangan elektron sehingga molekul tersebut menjadi tidak stabil dan selalu berusaha mengambil elektron dari molekul atau sel lain. Dengan adanya *iridoid glycoside* berupa *deacetylasperulosidic acid* dalam daun mengkudu ini, adanya radikal bebas dalam tubuh dapat diminimalisir. Radikal bebas dapat dihasilkan dari metabolisme tubuh dan faktor eksternal seperti asap rokok, sinar ultraviolet, zat kimia dan polutan lain. Gangguan dalam tubuh yang disebabkan oleh radikal bebas bersifat kronis. Radikal bebas mengambil elektron dari sel tubuh dan menyebabkan adanya perubahan pada struktur DNA sehingga dapat menghasilkan sel mutan. Kandungan aktif *deacetylasperulosidic acid* dalam daun mengkudu menghambat pelepasan elektron yang akan diambil oleh radikal bebas.

Kandungan lain dari daun mengkudu dapat bermanfaat sebagai antiinflamasi adalah flavonoid. Flavonoid dari daun mengkudu disebut dengan bioflavonoid *rutin*. Bioflavonoid *rutin* diketahui dapat memberikan nutrisi dan support pada sistem sirkulasi termasuk dalam kapiler, membantu mencegah perdarahan dan memperkuat kapiler pada seseorang yang memiliki pembuluh darah lemah. *Rutin* juga berfungsi dalam menjaga stabilitas vitamin C sehingga penyerapan vitamin C oleh tubuh dapat lebih intensif. Vitamin C dalam daun mengkudu membantu *deacetylasperulosidic acid* dalam melawan radikal bebas. Shengmin Shan (2001) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa adanya kandungan bioflavonoid *rutin* dapat merangsang *growth factor* dalam tubuh. Hal ini dibantu juga oleh aktivitas senyawa aktif lain yaitu *scopoletin* dan *iridoid glycoside* berupa *deacetylasperulosidic acid*. Kandungan protein yang tinggi dalam daun mengkudu juga berperan dalam memperbaiki sel-sel yang telah rusak yang secara tidak langsung dapat mempengaruhi aktivitas sel sehingga dapat berjalan dengan baik sesuai dengan fungsinya.

Pada perhitungan persentase jumlah sel yang hidup, diketahui semua persentasi bernilai di atas 60%. Hal ini memiliki arti pemberian ekstrak daun mengkudu pada masing-masing perlakuan, dalam hal ini dalam sel fibroblas BHK-21 tidak toksik. Dalam penelitian suatu bahan kedokteran gigi dikatakan bahwa, salah satu syarat bahan yang digunakan dalam kedokteran gigi seharusnya tidak toksik, tidak mengiritasi, dan mempunyai sifat biokompabilitas atau bahan yang diproduksi tidak boleh mempunyai efek yang merugikan terhadap lingkungan biologis, baik lokal maupun sistemik. Salah satu metode untuk menilai sitotoksitas suatu bahan adalah dengan uji enzimatik dengan pereaksi 3-(4,5-

dimethylthiazol-2-yl)-2,5-di-phenyl-tetrazolium bromide (MTT). Parameter toksisitas didasarkan pada CD_{50} , artinya suatu bahan dikatakan toksik apabila persentase sel hidup setelah terpapar bahan tersebut kurang dari 60% (Asti, 2004).

Uji biokompatibilitas pada tingkat awal adalah uji toksisitas yang digunakan untuk mengevaluasi secara biologi efek suatu material kedokteran gigi yang diperlukan secara langsung terhadap jaringan dalam kultur sel untuk prosedur *screening* standar yang direkomendasikan dan perhatian utamanya pada sifat iritasi lokal. Penelitian ini menguji biokompatibilitas tingkat awal suatu material pada kultur sel menggunakan uji enzimatik dengan MTT esai. Uji dengan esai MTT ini dilakukan berdasar kemampuan sel hidup untuk mereduksi garam MTT yang berwarna kuning dan larut menjadi endapan formazan yang berwarna biru ungu dan tidak larut. Reduksi garam tetrazolium terjadi intrasel dan melibatkan enzim dari retikulum endoplasma dan mitokondria. Mitokondria dari sel hidup berperan dalam menghasilkan dehidrogenase. Apabila dehidrogenase tidak aktif karena adanya efek sitotoksik, maka formazan yang berwarna biru ungu tidak akan terbentuk yang dapat dibandingkan dengan proporsional aktivitas sel yang hidup (Siregar, 2000).

Perhitungan jumlah sel hidup pada perlakuan pemberian ekstrak mengkudu memiliki nilai di atas 100% pada masing-masing kelompok, yaitu pada konsentrasi 2mg/100ml, 5mg/100ml, 7mg/100ml, 10mg/100ml dan 12mg/100ml. Hal ini dapat diartikan, ekstrak daun mengkudu tidak hanya aman tetapi juga memiliki potensi dalam meningkatkan proliferasi sel fibroblas.

Sel fibroblas merupakan jaringan ikat yang terbentuk dari diferensiasi sel mesenkim. Fibroblas dewasa yang tidak aktif disebut juga dengan fibrosit. Sel ini

berukuran lebih kecil daripada fibroblas, berbentuk gelendong, memiliki inti yang panjang, lebih gelap, lebih kecil dan sitoplasmanya bersifat asidofil serta mengandung sedikit retikulum endoplasma yang kasar. Fibrosit dapat dirangsang dan aktivitas sintetiknya dapat diaktifkan kembali menjadi fibroblas pada saat proses penyembuhan luka (Carlos, 1998). Pada kondisi jaringan terluka, sel fibroblas muncul pada 2-3 hari paska terjadinya luka dan mencapai jumlah maksimal pada hari ke 7-14 paska luka. Sel fibroblas muncul sebagai tanda dimulainya tahap proliferasi pada proses penyembuhan luka. Sel fibroblas ikut menjadi bagian dari jaringan granulasi terdiri dari pembuluh-pembuluh darah kecil yang baru dibentuk dengan latar belakang jaringan kendor atau edema dan mengandung fibroblas serta sel-sel radang (Robbins dan Kumar, 2005).

Adanya nilai persentasi sel hidup pada sel fibroblas BHK-21 yang tinggi dapat diartikan daun mengkudu memiliki efek dalam meningkatkan proliferasi fibroblas sehingga dapat membantu proses penyembuhan luka. Hal ini dapat dijadikan pertimbangan untuk mengembangkan potensi daun mengkudu sebagai obat penyembuh luka dalam perawatan di bidang kedokteran gigi.

Dari hasil penelitian yang dilakukan dengan menggunakan *One-way Anova* dilanjutkan dengan *HSD Tukey* untuk masing-masing kelompok. Hasilnya, tidak didapatkan perbedaan yang bermakna antara proliferasi sel fibroblas pada perbandingan kelompok ekstrak 2mg/100ml, 5mg/100ml, 7mg/100ml, 10mg/100ml dan 12mg/100ml ($p > 0,05$). Namun, pada perbandingan kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol sel didapatkan perbedaan yang bermakna terhadap proliferasi sel fibroblas ($p < 0,05$).

Hasil tersebut menunjukkan bahwa terjadi peningkatan proliferasi fibroblas pada kelompok yang diberi perlakuan dengan ekstrak daun mengkudu. Hal ini dapat dilihat pada perbedaan jumlah fibroblas antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol sel. Jumlah fibroblas pada kelompok perlakuan lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol sel.

Pada pemberian dosis berbeda di perlakuan dari setiap kelompok, tidak didapatkan perbedaan yang bermakna. Secara keseluruhan, jumlah sel hidup di atas 60%, bahkan setiap konsentrasi terjadi proliferasi fibroblas. Peningkatan proliferasi sel fibroblas dapat digunakan sebagai marker biologis terhadap kecepatan proses penyembuhan, yaitu dengan adanya nilai presentase peningkatan proliferasi fibroblas yang tinggi, selain itu penggunaan ekstrak daun mengkudu juga tidak toksik dan aman karena nilai presentase sel hidup sel fibroblas tidak menunjukkan angka di bawah 60%.

7.1 Simpulan

Penelitian uji sitotoksitas terhadap ekstrak daun mengkudu dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun mengkudu dengan konsentrasi 2mg/100ml, 5mg/100ml, 7mg/100ml, 10mg/100ml, dan 12mg/100ml tidak toksik terhadap sel fibroblas.

7.2 Saran

Uji sitotoksitas merupakan uji pendahuluan untuk biokompatibilitas suatu bahan. Untuk memastikan toksisitas ekstrak daun mengkudu sebagai salah satu bahan kedokteran gigi disarankan:

1. Melakukan penelitian lebih lanjut pada sel fibroblas secara *in vivo* pada hewan coba, sehingga dapat dijadikan alternatif sebagai bahan penyembuhan luka.
2. Melakukan penelitian efek ekstrak daun mengkudu terhadap sel epitel, mengingat salah satu lapisan mukosa rongga mulut adalah sel epitel.

DAFTAR PUSTAKA

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

- Asti Meizarini. 1994. Sitotoksitas *Bahan estorasi Cyanoacrylate pada Variasi Perbandingan Powder dan Liquid Menggunakan MTT Assay*. Majalah Kedokteran Gigi Universitas Airlangga. P:20-21
- Budiharto. 2008. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta. Hal: 46-60.
- Brett J. West; Shixin Deng; Afa K. Palu; C. Jarakae Jensen. 2009. *Morinda citrifolia Linn (Rubiaceae) Leaf Extract Mitigate UVB-induced erythema*. J Nat Med 63:351-354. Japanese Society of Pharmacognosy. Available from www.springerlink.com Accessed on May, 3th 2010
- Brett J. West; and Shixin Deng. 2010. *Thin Layer Methods for Rapid Identity Testing of Morinda citrifolia L (Noni) Fruit and Leaf*. Advance Journal of Food and Technology 2 (5): 298-302. USA; Maxwell Scientific Organization
- Carlos Junqueira. 1998. *Histologi Dasar*. Jakarta; Penerbit buku kedokteran EGC h: 92-109
- Decherd Michael E. 2002. *Scar Revision and Camouflage*. Grand Rounds Presentation, UTMB, Dept. of Otolaryngology. 1-8
- Dorly. 2005. *Potensi Tumbuhan Obat Indonesia dalam Pengembangan Industri Argomedisin*. Bogor; Institut Pertanian Bogor
- EFSA (European Food Safety Authority). 2008. *Scientific Opinion of Panel on Dietetic Products, Nutrition and allergies of Leaves Morinda citrifolia L*. The EFSA Journal (2008) 769, 1-17
- Farida R. 2003. *Reaksi Radang*. Majalah Kedokteran Gigi. Edisi khusus II Oktober 2003. Universitas Indonesia. H469-72
- Fawcett and Bloom. 2002. *Buku Ajar Histologi*. Jakarta; EGC
- Fitri Sahyuni. 2009. *Uji Efek Antidiabetes Infusa Buah Mengkudu (Morinda citrifolia Linn) Terhadap Penurunan Kadar Glukosa Darah Pada Tikus Putih (Rattus norvegicus)*. Skripsi thesis, Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Freshney, RI. 2000. *Culture of Animal Cell; a manual of Basic Technique 4th Edition*. New York: Wiley Liss Inc. P 329-43

Hadijono BS dan Fazwishni S. 2000. *Uji sitotoksisitas dengan esei MTT*. Jurnal Kedokteran Gigi UIR-IR PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA p. 28-32

Heinrich, Michael dkk. 2009. *Farmakognosi dan Fitoterapi*. Jakarta: EGC

Imam Ghozali. 2009. *Aplikasi Analisis Multivariate dengan program SPSS (Cetakan keempat)*. Semarang; Badan Penebit Universitas Diponegoro

Johanes Supranto. 2007. *Teknik Sampling untuk Survey dan Eksperimen*. Jakarta; Penebit Rineka Cipta

Kusumo, J.S. 1991. *Keempat Jaringan Pokok Tubuh*. Surabaya : Laboratorium Anatomi dan Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya. Hal: 41-45.

Lemeshow S; Hosmer D; Klar J. 1990. *Adequacy of sample size in health studies*. New York: John Wiley and Sons Ltd.

Lenny, sovia. 2006. *Senyawa flavonoida, Fenil Propanoida, Tanin, dan Alkaloida*. USU: Repository

Ma'at, S. 1999. *Kultur Jaringan (Hewan)*. Surabaya : Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. h. 2-41.

Maria Goreti Waha. 2004. *Buku Sehat Dengan Mengkudu*. Jakarta: STP

Murti B. 1997. *Prinsip dan Metode Riset Epidemiologi*. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. Hal: 84-85.

Nayak, B. Shivananda; Steve Sandiford and Anderson Maxwell. 2009. *Evaluation of the Wound Healing Activity of Ethanolic Extract of Morinda Citrifolia L. Leaf*. eCAM ;6 (3) 351-356. Departement of Pre Clinical Sciences, Biochemistry unit, Trinidad.

Pandurag Rasal, Vijaykumar; Arulmozhi S; Purnima A and Sridar Y. 2006. *Wound Healing and Antioxidant Activities of Morinda Citrifolia Extract in Rats*. Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics 1735-2657/08/71-49-52 J.N Medical College Campus, Belgaum.

Regezi A. Joseph, James J., Richard C.K. Jordan. 2003. *Oral Pathology Clinical Pathology Correlation 4th Edition*. San Fransisco; Sauders p: 106

Robbins, Kumar Vinay and Cotran. 2005. *Pathologic Basis of Disease 7th edition*. Philadelphia, Pemsylvania : Elsevier Saunders. P : 103-115

Ronald E. Walpole. 1986. *Ilmu Peluang dan Statistika untuk Insiyur dan Ilmuwan*. Bandung; Penebit Institut Teknologi Bandung

- Shengmin Sang et al. 2001. *Flavonol and Iridoid glycoside from The Leaves of Morinda citrifolia*. *IR- PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA* *Journal of Food Chemistry* 2001, 49, 4478-4481. New Jersey; New York.
- Siregar F, Hadijono BS. 2000. *Uji Sitotoksitas dengan esei MTT*. *Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Vol 7 Edisi Khusus*. P28-32
- Srivastava. 2007. *Anti-inflammatory and Analgesic Activity of Morinda citrifolia (Noni) in Experimental Animals*. *Noni Eksperimental Eksperimen program* available at: www.worldnoni.net/srivastava
- Suharsimi Arikunto. 2009. *Manajemen Metode Penelitian*. Jakarta; Penerbit Rineka Cipta
- Takashima Junko; Yoshitaka I; K. Komiyama; Masahiko H; Akio K and Ayumi Oshaki. 2007. *New Constituents from the Leaves of Morinda Citrifolia*. *Chem Pharm Bull* 55(2)343-345. Pharmaceutical Research Division, Mitsubishi Pharma Corporation, Tokyo Medical and Dental University: Japan
- Titien HA. 2002. *Pengaruh Tegangan Listrik dan Lama Penyinaran Pada Semen Ionomer Gelas Modifikasi Resin Terhadap Kekerasan Permukaan dan Sitotoksitas*. Tesis Pasca Sarjana. Universitas Airlangga Surabaya. Hal: 26
- Usha, R; Sangeetha S; M. Palaniswamy. 2010. *Antimicrobial Activity of a Rarely Known Species Moinda citrifolia L*. *Ethnobotanical Leaflets* 14: 306-11 Karpagam University, India.
- Wasina Thani; Omboon Vallisuta; Pongpan Siripong and Nongluck Ruangwises. 2010. *Antiproliferative and Antioxidative Activities of Thai Noni / Yor (Morinda citrifolia Linn) Leaf Extract*. *Journal of Departement of Pharmacognosy* Vol 41 No.2 March; Mahidol University, Bagkok, Thailand p: 482-489
- WHO. 1999. *WHO monographs on selected medicinal plants*. WHO Library Cataloguing in Publication Data. Geneva : 16-32
- Yuliati A. 2005. *Uji Biokompatibilitas Resin Akrilik Jenis Otopolimerisasi pada Sel Fibroblas*. *Majalah Kedokteran Gigi Universitas Airlangga* No.63 p:128

Test Distribusi Normal Konsentrasi 2mg/100ml

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		Kons_2
N		8
Normal Parameters(a,b)	Mean	,2499
	Std. Deviation	,02529
Most Extreme Differences	Absolute	,198
	Positive	,137
	Negative	-,198
Kolmogorov-Smirnov Z		,560
Asymp. Sig. (2-tailed)		,912
a Test distribution is Normal.		
b Calculated from data.		

Test Distribusi Normal Konsentrasi 5mg/100ml

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		Konsen_5
N		8
Normal Parameters(a,b)	Mean	,2461
	Std. Deviation	,03655
Most Extreme Differences	Absolute	,178
	Positive	,170
	Negative	-,178
Kolmogorov-Smirnov Z		,504
Asymp. Sig. (2-tailed)		,962
a Test distribution is Normal.		
b Calculated from data.		

Test Distribusi Normal Konsentrasi 7mg/100ml

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		Kons 7
N		8
Normal Parameters(a,b)	Mean	,2585
	Std. Deviation	,03878
Most Extreme Differences	Absolute	,202
	Positive	,202
	Negative	-,148
Kolmogorov-Smirnov Z		,570
Asymp. Sig. (2-tailed)		,901
a Test distribution is Normal.		
b Calculated from data.		

Test Distribusi Normal Konsentrasi 10mg/100ml

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		Kons 10
N		8
Normal Parameters(a,b)	Mean	,2611
	Std. Deviation	,03152
Most Extreme Differences	Absolute	,260
	Positive	,134
	Negative	-,260
Kolmogorov-Smirnov Z		,735
Asymp. Sig. (2-tailed)		,652
a Test distribution is Normal.		
b Calculated from data.		

Test Distribusi Normal Konsentrasi 12mg/100ml

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		Kons 12
N		8
Normal Parameters(a,b)	Mean	,2715
	Std. Deviation	,05859
Most Extreme Differences	Absolute	,213
	Positive	,213
	Negative	-,114
Kolmogorov-Smirnov Z		,601
Asymp. Sig. (2-tailed)		,863
a Test distribution is Normal.		
b Calculated from data.		

Test Distribusi Normal Kontrol Media

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		Kontrol Media
N		8
Normal Parameters(a,b)	Mean	,0691
	Std. Deviation	,01225
Most Extreme Differences	Absolute	,209
	Positive	,129
	Negative	-,209
Kolmogorov-Smirnov Z		,591
Asymp. Sig. (2-tailed)		,877
a Test distribution is Normal.		
b Calculated from data.		

Test Distribusi Normal Konsentrasi Kontrol Sel

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		Kontrol sel
N		8
Normal Parameters(a,b)	Mean	,289
	Std. Deviation	,0789
Most Extreme Differences	Absolute	,217
	Positive	,217
	Negative	-,183
Kolmogorov-Smirnov Z		,614
Asymp. Sig. (2-tailed)		,845
a Test distribution is Normal.		
b Calculated from data.		

Oneway ANOVA

Test of Homogeneity of Variances			
Konsent			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5,993	6	49	,064

ANOVA					
Konsent					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,267	6	,045	21,814	,000
Within Groups	,100	49	,002		
Total	,367	55			

Post Hoc Test
 IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
Dependent Variable Konsent

Tukey HSD

(I) Group	(J) Konsentrasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol Media	Kontrol Sel	-,22025(*)	,02259	,000	-,2897	-,1508
	Konsent 2mg	-,18075(*)	,02259	,000	-,2502	-,1113
	Konsent 5mg	-,17700(*)	,02259	,000	-,2464	-,1076
	Konsent 7mg	-,18938(*)	,02259	,000	-,2588	-,1199
	Konsent 10mg	-,19200(*)	,02259	,000	-,2614	-,1226
	Konsent 12mg	-,20237(*)	,02259	,000	-,2718	-,1329
Kontrol Sel	Kontrol Media	,22025(*)	,02259	,000	,1508	,2897
	Konsent 2mg	,03950	,02259	,588	-,0299	,1089
	Konsent 5mg	,04325	,02259	,481	-,0262	,1127
	Konsent 7mg	,03087	,02259	,816	-,0386	,1003
	Konsent 10mg	,02825	,02259	,870	-,0412	,0977
	Konsent 12mg	,01787	,02259	,985	-,0516	,0873
Konsent 2mg	Kontrol Media	,18075(*)	,02259	,000	,1113	,2502
	Kontrol Sel	-,03950	,02259	,588	-,1089	,0299
	Konsent 5mg	,00375	,02259	1,000	-,0657	,0732
	Konsent 7mg	-,00863	,02259	1,000	-,0781	,0608
	Konsent 10mg	-,01125	,02259	,999	-,0807	,0582
	Konsent 12mg	-,02163	,02259	,961	-,0911	,0478
Konsent 5mg	Kontrol Media	,17700(*)	,02259	,000	,1076	,2464
	Kontrol Sel	-,04325	,02259	,481	-,1127	,0262
	Konsent 2mg	-,00375	,02259	1,000	-,0732	,0657
	Konsent 7mg	-,01237	,02259	,998	-,0818	,0571
	Konsent 10mg	-,01500	,02259	,994	-,0844	,0544
	Konsent 12mg	-,02537	,02259	,918	-,0948	,0441
Konsent 7mg	Kontrol Media	,18938(*)	,02259	,000	,1199	,2588
	Kontrol Sel	-,03087	,02259	,816	-,1003	,0386
	Konsent 2mg	,00863	,02259	1,000	-,0608	,0781
	Konsent 5mg	,01237	,02259	,998	-,0571	,0818
	Konsent 10mg	-,00262	,02259	1,000	-,0721	,0668
	Konsent 12mg	-,01300	,02259	,997	-,0824	,0564
Konsent 10mg	Kontrol Media	,19200(*)	,02259	,000	,1226	,2614
	Kontrol Sel	-,02825	,02259	,870	-,0977	,0412
	Konsent 2mg	,01125	,02259	,999	-,0582	,0807
	Konsent 5mg	,01500	,02259	,994	-,0544	,0844
	Konsent 7mg	,00262	,02259	1,000	-,0668	,0721
	Konsent 12mg	-,01037	,02259	,999	-,0798	,0591

Konsent 12mg	Kontrol Media	,20237(*)	,02259	,000	,1329	,2718
	Kontrol Sel	,02163	,02259	,961	-,0873	,0516
	Konsent 2mg	,02537	,02259	,918	-,0478	,0911
	Konsent 5mg	,01300	,02259	,997	-,0564	,0824
	Konsent 7mg	,01037	,02259	,999	-,0591	,0798
	Konsent 10mg					

* The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

Konsent			
Tukey HSD			
Konsentrasi	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
,00	8	,0691	
5,00	8		,2461
2,00	8		,2499
7,00	8		,2585
10,00	8		,2611
12,00	8		,2715
1,00	8		,2894
Sig.		1,000	,481
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 8,000.			

Perhitungan Besar Sampel Penelitian

Hypothesis tests for two population means (one-sided test)

Level of significance (%)	5
Power of the test (%)	90
Population standard deviation	0.016
Population variance	0.000256
Test value of the population mean	0.16
Anticipated population mean	0.13
Sample size	5



IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
 (Indonesia Institute of Sciences)
UPT BALAI KONSERVASI TUMBUHAN KEBUN RAYA PURWODADI
 (Purwodadi Botanic Garden)
 Jl. Raya Surabaya - Malang Km. 65 Purwodadi - Pasuruan 67163
 Telepon : 0341 - 426046, 424076, 0343 - 615033
 Fax. : 0341 - 426046, 0343 - 615033
 e-mail : krpurwodadi@mail.lipi.go.id, - Website : www.krpurwodadi.lipi.go.id

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI

No. 1061 /IPH.UPT.03.4/HM/VIII /2010

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

Mar'atus Sholikhah, NIM : 020710174

Mahasiswa Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, datang di UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi pada tanggal 20 Agustus 2010 berdasarkan buku Flora of Java, karangan C. A. Backer and R. C. Bakhuizen Van Den Brink, Vol. II, tahun 1965, halaman 351, nama ilmiahnya adalah:

Marga : *Morinda*
 Jenis : *Morinda citrifolia* L.

Adapun menurut buku The Standard Cyclopedia of Horticulture, karangan L.H. Bailey, jilid I, tahun 1953, halaman 4, klasifikasinya adalah sebagai berikut:

Divisio : *Spermatophyta*
 Sub Divisio : *Angiospermae*
 Kelas : *Dicotyledoneae*
 Ordo / Bangsa : *Rubiales*
 Family / Suku : *Rubiaceae*

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Purwodadi, 24 Agustus 2010

An. Kepala

UPT Balai Konservasi Tumbuhan
 Kebun Raya Purwodadi
 Koordinator Unit Jasa dan Informasi,



WARDAYA
 NIP. 195502271981031003



UNIVERSITAS AIRLANGGA FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

Jl. Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya 60132 Telp. 031-5030255 Faks. 031-5020256
Website: <http://www.fkg.unair.ac.id> -- E-mail: fkg@unair.ac.id

Nomor : 6254/H3.1.2/PPd/2010
Lampiran : -
Hal : Permohonan untuk menggunakan
Lab. Kimia

9 Agustus 2010

Yth. Dekan
u.p. Wakil Dekan I
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Airlangga
Surabaya

Bersama ini kami hadapkan mahasiswa Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga :

Nama : Mar'atus Sholikhah
N.I.M. : 020710174

Sedang melaksanakan pembuatan skripsinya dalam bidang Ilmu Biologi Oral , dengan judul :

“ Uji Sitotoksisitas Ekstrak Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) terhadap Sel Fibroblas Dengan MTT Esai.”

Untuk melaksanakan penelitian tersebut yang bersangkutan memerlukan data dan informasi penelitian.
Sehubungan dengan itu kami mohon kesediaan Saudara untuk memberikan ijin kepada mahasiswa tersebut untuk melakukan penelitian di Laboratorium kimia Fakultas Sains dan Teknologi Unair, Surabaya.

Demikian atas perhatian dan bantuan Saudara kami sampaikan terima kasih.

Wakil Dekan I,

Prof. Dr. Latief Mooduto, drg., SpKG., MS.
NIP. 1952090719780310017



Tembusan Yth. :
1. Ketua Departemen Kimia
2. Penanggungjawab Laboratorium Kimia
Fakultas Sains dan Teknologi Unair
Surabaya

Member of :



all
P. Daman / mbk yph
mohon dibantu oleh tsb Arates
Mds
18/8 10



Gambar 1. Centrifuge



Gambar 2. Shaker



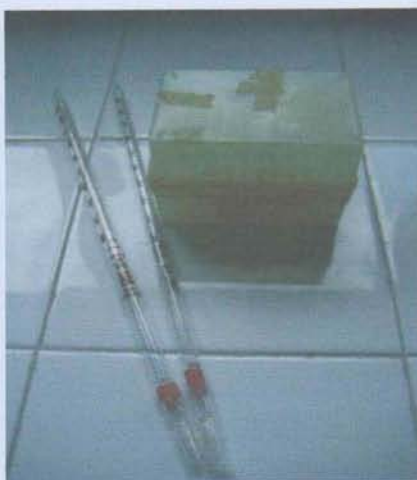
Gambar 3. Inkubator



Gambar 4. Laminar Flow



Gambar 5. Elisa Reader



Gambar 6. Pipet Steril dan Ujung Pipet Steril



Gambar 7. Multichannel Pipet



Gambar 8. Botol Ukur Roux



Gambar 9. Mikroskop



Gambar 10. Alat penimbang hasil Ekstrak



Gambar 11. Rotary Evaporator



Gambar12. Media Eagles dan Fetal Bovine Serum



Gambar 13. DMSO dan PBSO



Gambar 14. Mikroplate