



**PENGARUH GEL EKSTRAK ETANOL KULIT BUAH  
KAKAO (*Theobroma cacao L.*) TERHADAP JUMLAH  
FIBROBLAS GINGIVA DAN KEPADATAN SABUT  
KOLAGEN PADA TIKUS WISTAR YANG DI  
INDUKSI *Porphyromonas gingivalis***

**SKRIPSI**

Oleh:  
**Raikhan Mahadi**  
**NIM 191610101165**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
2023**



**PENGARUH GEL EKSTRAK ETANOL KULIT BUAH  
KAKAO (*Theobroma cacao L.*) TERHADAP JUMLAH  
FIBROBLAS GINGIVA DAN KEPADATAN SABUT  
KOLAGEN PADA TIKUS WISTAR YANG DI  
INDUKSI *Porphyromonas gingivalis***

**SKRIPSI**

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

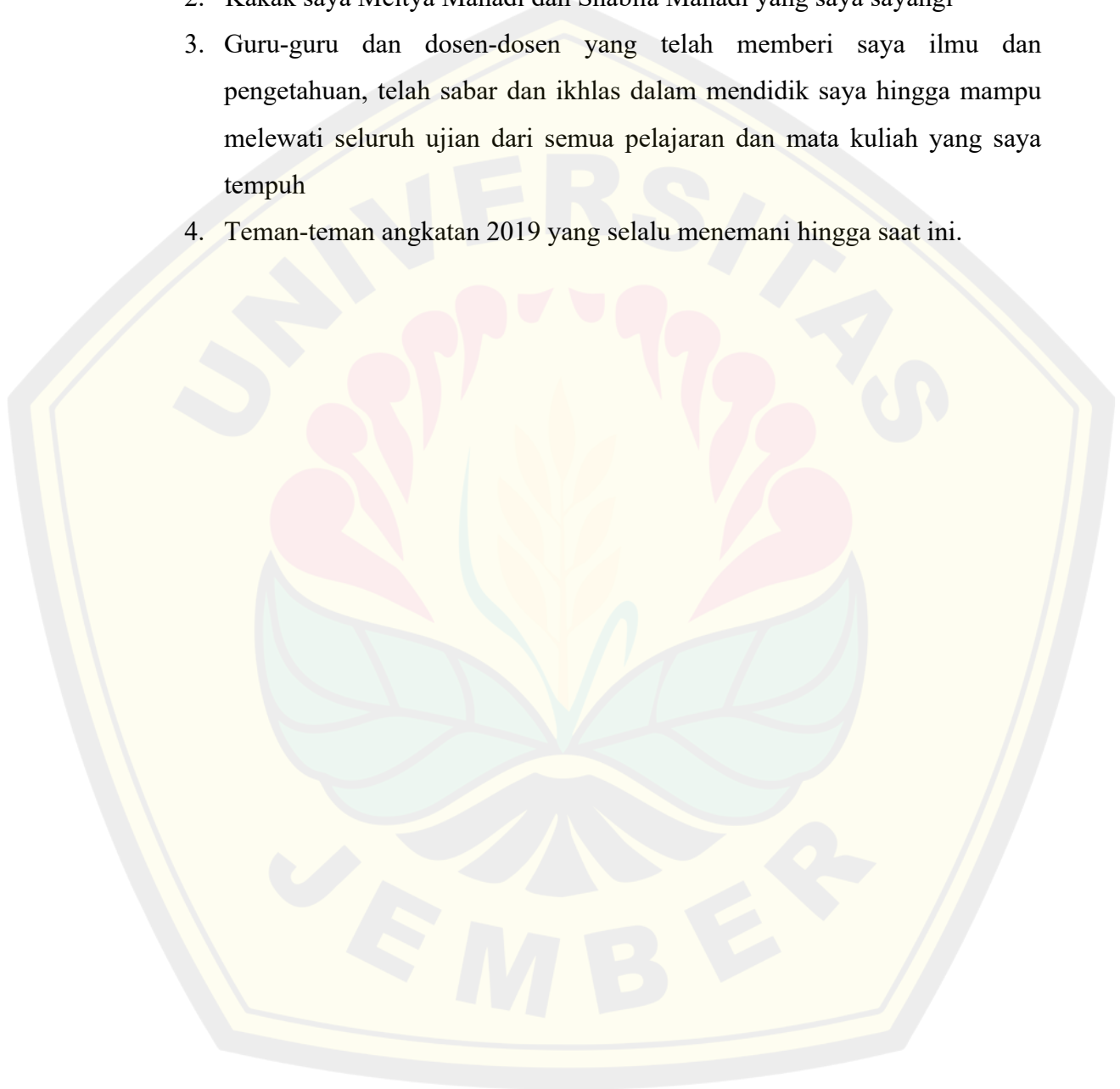
Oleh :  
**Raikhan Mahadi**  
NIM 191610101165

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
2023**

**PERSEMBAHAN**

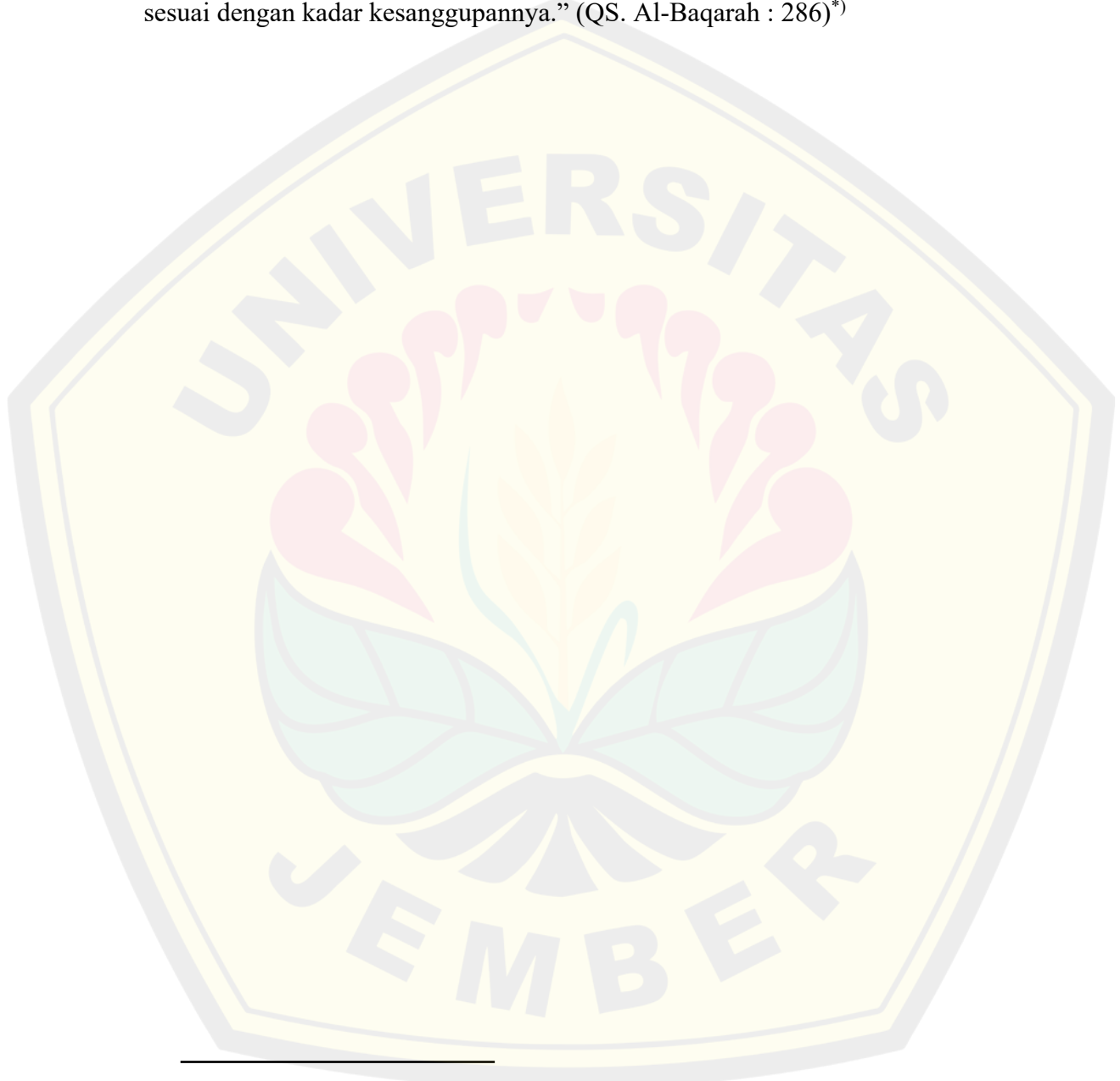
Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Orang tua yang saya cintai, Alm. Bapak Suprihadi dan Ibu Tanti Widyastuti yang selalu memberikan doa, dukungan dan nasihat.
2. Kakak saya Meitya Mahadi dan Shabila Mahadi yang saya sayangi
3. Guru-guru dan dosen-dosen yang telah memberi saya ilmu dan pengetahuan, telah sabar dan ikhlas dalam mendidik saya hingga mampu melewati seluruh ujian dari semua pelajaran dan mata kuliah yang saya tempuh
4. Teman-teman angkatan 2019 yang selalu menemani hingga saat ini.



**MOTTO**

“Tidak ada ujian yang tidak bisa diselesaikan. Tidak ada kesulitan yang melebihi batas kesanggupan. Karena Allah tidak akan membebani seseorang melainkan sesuai dengan kadar kesanggupannya.” (QS. Al-Baqarah : 286)\*)



---

\*) Departemen Agama Republik Indonesia. 2006. Al Qur'an dan Terjemahannya. Jakarta: Magfirah Pustaka

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Raikhan Mahadi

NIM : 191610101165

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa Skripsi yang berjudul “Pengaruh Gel Ekstrak Etanol Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*) terhadap Jumlah Fibroblas Gingiva dan Kepadatan Sabut Kolagen pada Tikus Wistar yang Diinduksi *Porphyromonas Gingivalis*” adalah benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember , 8 Juni 2023

Yang menyatakan,

Raikhan Mahadi

NIM 191610101165

**SKRIPSI**

**PENGARUH GEL EKSTRAK ETANOL KULIT BUAH  
KAKAO (*Theobroma cacao L.*) TERHADAP JUMLAH  
FIBROBLAS GINGIVA DAN KEPADATAN SABUT  
KOLAGEN PADA TIKUS WISTAR YANG DI  
INDUKSI *Porphyromonas gingivalis***

Oleh:

**Raikhan Mahadi**

**191610101165**

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama

: Dr. drg. Sukanto, M.Kes

Dosen Pembimbing Pendamping

: drg. Yani Corvianindya R., M.KG

**PENGESAHAN**

Skripsi yang berjudul “Pengaruh Gel Ekstrak Etanol Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*) terhadap Jumlah Fibroblas Gingiva dan Kepadatan Sabut Kolagen pada Tikus Wistar yang Diinduksi *Porphyromonas gingivalis*” telah di uji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi pada :

Hari, tanggal : Kamis, 8 Juni 2023

Tempat : Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember

Dosen Penguji Ketua

Dosen Penguji Anggota

drg. Happy Harmono, M. Kes  
NIP. 196709011997021001

Prof. Dr.drg. Hj. Herniyati, M. Kes  
NIP. 195909061985032001

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Pendamping

Dr. drg. Sukanto, M. Kes  
NIP. 196510271996011001

drg. Yani Corvianindya R., M.KG  
NIP. 197308251998022001

Mengesahkan,  
Dekan Fakultas Kedokteran Gigi  
Universitas Jember

drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Prof.

NIP. 196901121996011001

## RINGKASAN

**Pengaruh Gel Ekstrak Etanol Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*) terhadap Jumlah Fibroblas Gingiva dan Kepadatan Sabut Kolagen pada Tikus Wistar yang Diinduksi *porphyromonas gingivalis*; Raikhan Mahadi, 191610101165, 100 halaman: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember**

Penyakit periodontal merupakan salah satu penyakit inflamasi rongga mulut dengan prevalensi terbesar yang banyak dialami hampir seluruh manusia di dunia. Penyakit periodontal yang paling sering dijumpai yakni peradangan gingiva atau gingivitis. Penyebab utama gingivitis adalah bakteri plak pada subgingiva yang meliputi bakteri anaerob gram negatif seperti *Porphyromonas gingivalis*. *Porphyromonas gingivalis* selalu dikaitkan dengan kerusakan pada jaringan periodontal terutama gingivitis. Bakteri *P. gingivalis* ini menghasilkan gingipain, kolagenase, fibrinolysin, fosfolipase, fimbriae, kapsul polisakarida, dan liposakarida yang dapat menyebabkan peradangan kronis pada gingiva. Pada proses penyembuhan gingivitis dapat dibantu dengan menggunakan bahan kimia dan obat dengan bahan herbal, yang dapat mengurangi peradangan dan menyembuhkan gingivitis. Salah satu bahan herbal yang dapat dipakai yaitu tanaman kakao (*Theobroma cacao L.*) yang memiliki senyawa kandungan aktif berupa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, terpenoid dan lain sebagainya yang memiliki efek antibakteri, antioksidan, dan antiinflamasi yang dapat membantu proses penyembuhan luka.

Jenis penelitian adalah eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian *the post-test only control group design*. Penelitian ini menggunakan 24 ekor tikus yang dibagi menjadi 3 kelompok; kelompok kontrol negatif diberi gel placebo (K-), kelompok kontrol positif diberi gel metronidazole (K+), kelompok perlakuan diberi gel ekstrak kulit buah kakao (KP), kemudian semua kelompok dieutanasia setelah 7 dan 14 hari. Setiap kelompok terdiri dari 3 sampel. Setelah itu dilakukan pewarnaan HE dan penghitungan untuk fibroblas, sedangkan pewarnaan *Trichrome*



*Mallory* dan perhitungan pixel untuk kolagen yang dilakukan oleh 3 pengamat dan dihitung jumlah rata-rata.

Berdasarkan hasil perhitungan fibroblas dan kepadatan kolagen diperoleh kelompok perlakuan dengan pemberian gel ekstrak kulit buah kakao menunjukkan nilai rata-rata yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif dengan pemberian metronidazole dan kelompok kontrol negatif dengan gel plasebo CMC-Na. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) dapat meningkatkan fibroblas dan kepadatan kolagen.



## PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga saya dapat mengemban ilmu dengan baik di Fakultas kedokteran Gigi Universitas Jember dan dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengaruh Gel Ekstrak Etanol Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*) terhadap Jumlah Fibroblas Gingiva dan Kepadatan Sabut Kolagen pada Tikus Wistar yang Diinduksi *Porphyromonas gingivalis*” sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan program sarjana (S1) Pendidikan Dokter Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

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

1. Allah SWT atas segala limpahan nikmat, karunia, dan hidayah-Nya sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan lancar,
2. drg. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Pros, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
3. Dr. drg. Sukanto, M. Kes selaku Dosen Pembimbing Utama dan drg. Yani Corvianindya R., M.Kg selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang telah meluangkan waktunya untuk membimbing, memotivasi, memberi semangat, doa serta saran sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
4. drg. Happy Harmono, M. Kes selaku Dosen Penguji Ketua dan Prof. Dr.drg. Hj. Herniyati, M. Kes selaku Dosen Penguji Anggota yang telah berkenan memberikan kritik dan saran ilmu yang membangun dan memperbaiki untuk penulisan skripsi;
5. Dr.drg. Suhartini, M. Biotech selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing dan memberi nasihat dalam perjalanan studi saya di masa preklinik;
6. Seluruh dosen Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang telah mendidik dan memberikan ilmunya kepada penulis selama menempuh gelar S.KG;

7. Papa dan Mama tersayang yang selalu mendoakan, mendukung, memberikan semangat dan juga melimpahkan kasih sayang selama menempuh perjalanan hidup saya hingga saat ini;
8. Kakak Meitya Mahadi dan Shabila Mahadi tersayang yang selalu memberi dukungan, semangat dan membantu dalam penyusunan skripsi ini Canti dan Ronin yang telah bekerja sama dalam mengerjakan penelitian;
9. Siti hamidah, Dhana, Irfan dan Shila yang telah bekerja sama dalam mengerjakan penelitian;
10. Teman-teman Tiara, Zahra, Fay, Maura, Fadli, Yoga, dan teman satu kontrakan yang telah membantu, memotivasi dan berjuang bersama selama masa perkuliahan;
11. Teman-teman kelompok Tutorial N yang telah menemani perjalanan selama perkuliahan;
12. Teman-teman praktikum B4 yang telah membantu saya;
13. Teman-teman sejawat Orthodeum 2019;
14. Semua pihak yang telah membantu kegiatan penelitian ini yang tidak dapat saya ucapkan satu per satu, atas perhatian, perkenaan yang telah diberikan, ucapan terima kasih untuk kalian semua.

Penulis menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pendidikan dan kesehatan.

Jember,

2023

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>PERSEMBAHAN</b> .....	<b>iii</b>
<b>MOTTO</b> .....	<b>iv</b>
<b>PERNYATAAN</b> .....	<b>v</b>
<b>PENGESAHAN</b> .....	<b>vii</b>
<b>RINGKASAN</b> .....	<b>viii</b>
<b>PRAKATA</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>xii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xv</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xvi</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	5
1.3 Tujuan Penelitian .....	5
1.4 Manfaat Penelitian .....	5
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>6</b>
2.1 Gingivitis .....	6
2.1.1 Patogenesis gingivitis .....	6
2.2 Porphyromonas gingivalis .....	7
2.2.1 Taksonomi <i>P. gingivalis</i> .....	7
Taksonomi dari <i>P. gingivalis</i> adalah sebagai berikut: .....	7
2.2.2 Karakteristik Bakteri <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	7
2.2.3 Faktor Virulensi <i>P. gingivalis</i> .....	8
2.3 Fibroblas .....	9
2.4 Sabut Kolagen .....	11
2.5 Pembentukan Sabut Kolagen Oleh Fibroblas .....	11
2.6 Mekanisme Penyembuhan Luka Jaringan Lunak .....	12
2.7 Kakao ( <i>Theobroma cacao L.</i> ) .....	13
2.7.1 Taksonomi Tanaman Kakao .....	14
2.7.2 Kulit Buah Kakao .....	14
2.7.3 Kandungan Kulit Buah Kakao .....	15
2.8 Metode Ekstraksi Kulit Buah Kakao .....	17
2.9 Metronidazole .....	19

2.9.1	Farmakokinetik Metronidazole.....	19
2.9.2	Farmakodinamik Metronidazole.....	20
2.9.3	Efek Samping Metronidazole .....	20
2.9.4	Mekanisme Penyerapan Obat ke Sulkus.....	21
2.10	Kerangka Konsep .....	22
2.11	Keterangan Kerangka Konsep .....	23
	<b>2.12 Hipotesis.....</b>	<b>23</b>
	<b>BAB 3. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>24</b>
3.1	Jenis Penelitian .....	24
3.2	Tempat dan Waktu Penelitian.....	24
3.2.1	Tempat Penelitian.....	24
3.2.2	Waktu Penelitian.....	25
3.3	Variabel Penelitian .....	25
3.3.1.	Variabel Bebas.....	25
3.3.2	Variabel Terikat .....	25
3.3.3	Variabel Terkendali .....	25
3.4	Definisi Operasional .....	25
3.4.1	Kulit Buah Kakao ( <i>Theobroma cacao L.</i> ).....	25
3.4.2	Gel Ekstrak Etanol kulit Buah Kakao ( <i>Theobroma cacao L.</i> ).....	26
3.4.3	Model Tikus yang telah diinduksi <i>P. gingivalis</i> .....	26
3.4.4	Jumlah Fibroblas.....	26
3.4.5	Kepadatan Sabut Kolagen .....	26
3.5	Sampel Penelitian .....	27
3.5.1	Besar Sampel Penelitian .....	27
3.5.2	Kriteria Sampel Penelitian .....	28
3.6	Alat dan Bahan Penelitian.....	28
3.6.1	Alat Penelitian .....	28
3.6.2	Bahan Penelitian .....	28
3.7	Konsentrasi dan Dosis .....	29
3.7.1	Konsentrasi Gel Ekstrak Etanol Kulit Buah Kakao ( <i>Theobroma cacao L.</i> ) .....	29
3.7.2	Dosis ketamin .....	29
3.7.2	Dosis xylazine.....	29
3.8	Prosedur Penelitian .....	30

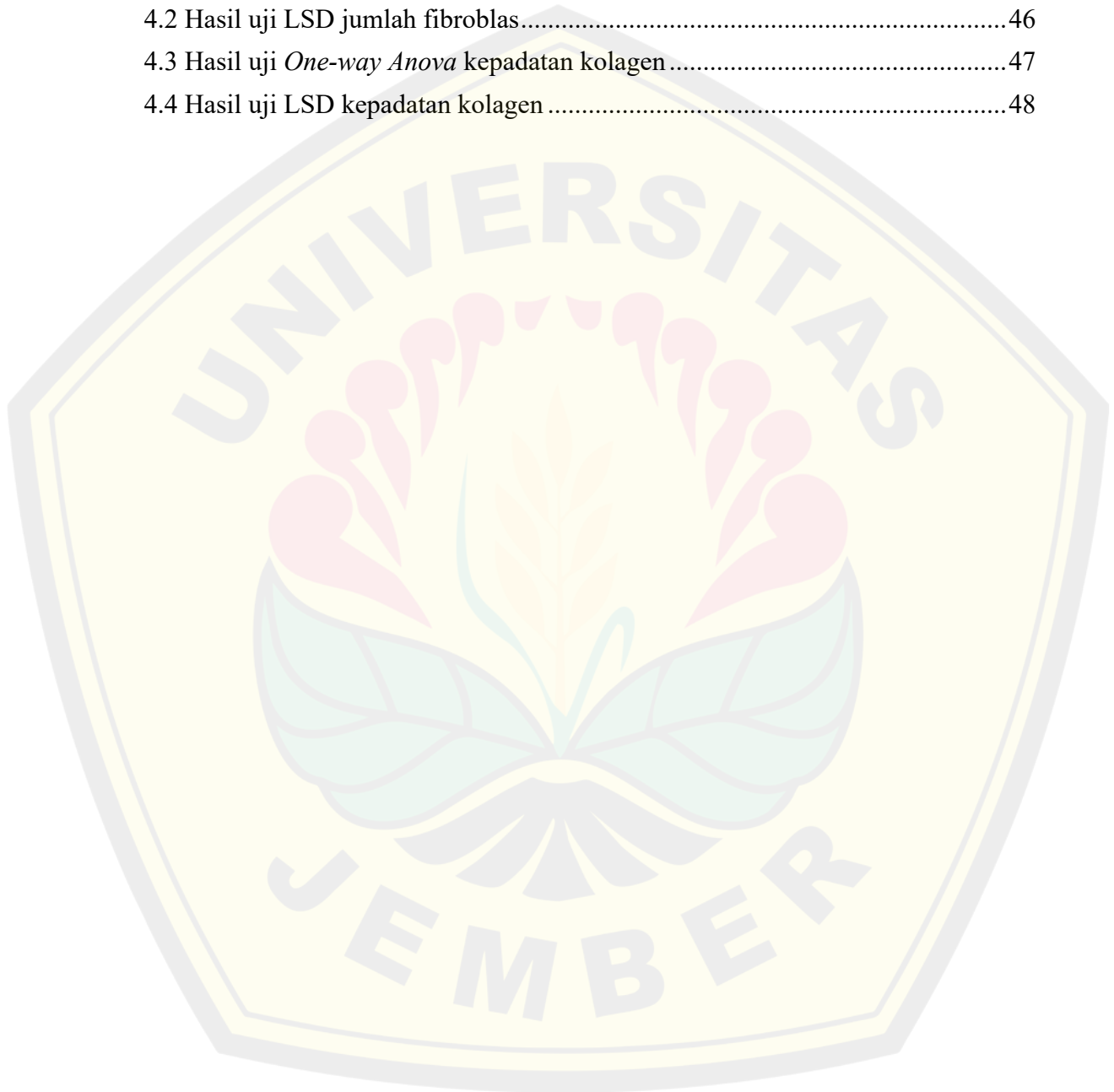
3.8.1	Persiapan Penelitian.....	30
3.8.2	Persiapan Hewan Coba.....	31
3.8.3	Identifikasi Tanaman Kulit Buah Kakao .....	31
3.8.4	Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Kakao ( <i>Theobroma cacao L.</i> ) ...	31
3.8.5	Pembuatan Gel Ekstrak Kulit Buah Kakao ( <i>Theobroma cacao L.</i> ) .....	32
3.8.6	Pembuatan Gel Metronidazole .....	32
3.8.7	Pengelompokan Hewan Coba.....	33
3.8.8	Identifikasi dan pembuatan sediaan <i>P. gingivalis</i> .....	34
3.8.9	Tahap Induksi <i>P. gingivalis</i> .....	34
3.8.10	Aplikasi Gel Plasebo, Gel Metronidazole, dan Gel Ekstrak Etanol Kulit Buah Kakao ( <i>Theobroma cacao L.</i> ) .....	35
3.8.11	Eutanasia Hewan Coba.....	35
3.8.12	Pembuatan Sediaan Histologi.....	35
3.8.13	Pengamatan dan Perhitungan Jumlah Fibroblas dan Sabut Kolagen.....	39
3.9	Analisis Data.....	39
3.10	Alur Penelitian .....	40
<b>BAB 4.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>41</b>
4.2	Analisis Data.....	45
4.2.1	Fibroblas .....	45
4.3	Pembahasan .....	49
4.3.1	Jumlah Fibroblas.....	49
4.3.2	Sabut Kolagen.....	51
<b>BAB 5.</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>55</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>		<b>56</b>

**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
2.1 Gambaran klinis gingivitis.....	6
2.2 Gambar <i>Prophyromonas Gingivalis</i> perbesaran 1000x.....	8
2.3 Gambaran struktur fibroblas.....	11
2.4 Gambaran sabut kolagen.....	12
2.5 Gambaran tanaman buah kakao.....	14
2.6 Gambaran komposisi buah kakao.....	15
4.1 Gambaran histologis preparat perbesaran 40x dan 100x.....	41
4.2 Gambaran histologi preparat perbesaran 400x.....	42
4.3 Grafik rata-rata fibroblas pada hari ke-7 dan hari ke-14.....	42
4.4 Gambaran histologis pewarnaan <i>Trichrome Mallory</i> 400x.....	44
4.5 Gambaran histologi preparat kolagen perbesaran 400x.....	44
4.5 Gambaran histologi preparat kolagen perbesaran 400x.....	45

**DAFTAR TABEL**

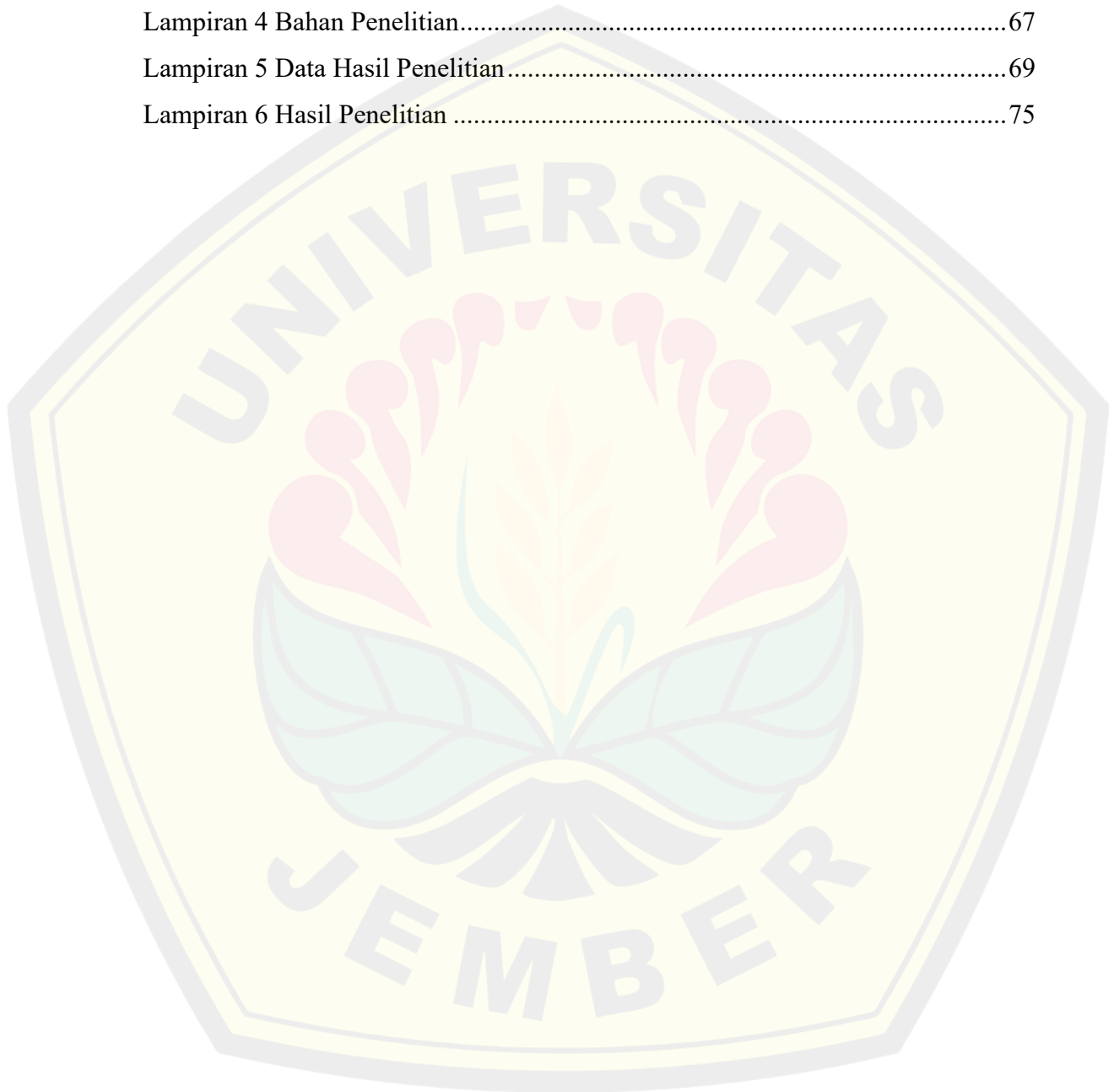
	Halaman
2.1 Kandungan senyawa aktif ekstrak kulit kakao .....	16
2.2 Persentase senyawa aktif ekstrak kulit kakao.....	16
4.1 Hasil uji <i>One-way Anova</i> jumlah fibroblas.....	46
4.2 Hasil uji LSD jumlah fibroblas.....	46
4.3 Hasil uji <i>One-way Anova</i> kepadatan kolagen.....	47
4.4 Hasil uji LSD kepadatan kolagen .....	48





**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
Lampiran 1 Surat Keterangan <i>Ethical Clearance</i> .....	60
Lampiran 2 Surat Keterangan Identifikasi Tanaman .....	63
Lampiran 3 Alat Penelitian .....	65
Lampiran 4 Bahan Penelitian.....	67
Lampiran 5 Data Hasil Penelitian.....	69
Lampiran 6 Hasil Penelitian .....	75



## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Penyakit periodontal merupakan salah satu penyakit inflamasi rongga mulut dengan prevalensi terbesar yang banyak dialami hampir seluruh manusia di dunia. Penyakit periodontal yang paling sering dijumpai yakni peradangan gingiva atau gingivitis. Hasil survei World Health Organization (WHO) menunjukkan bahwa hampir 90% penduduk di dunia menderita gingivitis dimana 80% diantaranya merupakan anak usia di bawah 12 tahun. Menurut Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) pada tahun 2013 prevalensi masalah kesehatan gigi dan mulut di Indonesia sebesar 25,9%, dan mengalami peningkatan pada tahun 2018 menjadi 57,6%. Hasil Riskesdas tahun 2013 juga menyebutkan bahwa Indonesia menduduki urutan kedua dengan prevalensi gingivitis terbanyak yakni sebesar 96,58%.

Gingivitis sering terjadi baik pada anak maupun dewasa. Gingivitis pada anak atau *puberty* gingivitis terjadi karena adanya peningkatan hormon endokrin yang biasa terjadi pada anak di bawah usia 17 tahun atau selama masa remaja (Diah *et al.*, 2018), sedangkan gingivitis pada dewasa biasanya disebabkan oleh akumulasi biofilm pada plak di sekitar margin gingiva dan respon peradangan terhadap bakteri. Plak yang tidak dibersihkan dari lapisan luar gigi akan menjadi tempat berkumpulnya bakteri. Bakteri tersebut akan mengeluarkan zat yang bersifat asam dan dapat merusak gingiva (Kasiha *et al.*, 2017)

Gingivitis merupakan bentuk penyakit periodontal dengan inflamasi pada jaringan gingiva yang ditandai dengan perubahan warna, perdarahan, adanya pembengkakan dan terdapat lesi pada gingiva (Korompot *et al.*, 2019). Penyebab utama gingivitis adalah bakteri plak pada subgingiva yang meliputi bakteri anaerob gram negatif seperti *Porphyromonas gingivalis* (Nitawati *et al.*, 2014). *Porphyromonas gingivalis* selalu dikaitkan dengan kerusakan pada jaringan periodontal terutama gingivitis (Samaranayake, 2012). Bakteri *P.*

*gingivalis* ini menghasilkan gingipain, kolagenase, fibrinolysin, fosfolipase, fimbrie, kapsul polisakarida, dan liposakarida yang dapat menyebabkan peradangan pada gingiva. (Samaranayake, 2012 & Nitawati *et al.*, 2014).

Diantara faktor virulensi *P. gingivalis*, gingipain yang terdiri dari Arg-gingipain (Rgp) dan Lys-gingipain (Kgp), dapat mendegradasi sejumlah protein host, termasuk sitokin/kemokin, imunoglobulin, protein komplemen, dan reseptor sel inang. Degradasi berbagai sitokin, termasuk *interleukin-beta* (IL-1 $\beta$ ), IL-4, IL-5, IL-6, *interferon-gamma* (IFN- $\gamma$ ), dan *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- $\alpha$ ), oleh gingipain murni atau *P. gingivalis* hidup menunjukkan kemungkinan bahwa *P. gingivalis* mungkin dapat memodulasi respon imun melalui inaktivasi preferensial dari sitokin tertentu (Baek *et al.*, 2015). Liposakarida (LPS) pada dinding sel dapat meningkatkan aksesnya ke jaringan gingiva, sehingga menimbulkan reaksi inflamasi yang menyebabkan peningkatan jumlah produksi sel inflamatori. Sitokin utama pada inflamasi adalah TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  yang diproduksi oleh makrofag yang teraktivasi, sel mast, sel endotel, dan beberapa jenis sel lain seperti odontoblas dan fibroblas. Peran utama TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  pada inflamasi dengan merangsang ekspresi molekul adhesi pada sel endotel, mengakibatkan peningkatan perlekatan dan migrasi leukosit, dan meningkatkan produksi sitokin lain. TNF- $\alpha$  juga menyebabkan agregasi dan aktivasi neutrofil, dan IL-1 $\beta$  mengaktifkan fibroblas jaringan, mengakibatkan peningkatan proliferasi (Kumar., 2006).

Peradangan adalah proses seluler bersifat kompleks yang berhubungan dengan keutuhan struktur. Peradangan gingiva memiliki 3 tahapan dalam proses penyembuhannya yaitu tahap *initial lesion*, *early lesion* dan *establish lesion*. Tahap *initial lesion* akan terjadi pada 2-4 hari dengan perubahan vaskuler yang terdiri dari pembuluh darah, peningkatan aliran darah, dan vaskulitis, akan terlihat perubahan bentuk pembuluh darah antara lain pelebaran kapiler dan venula, terjadi infiltrasi PMNs. Tahap *early lesion* ini pada 4-7 hari akan terjadi proliferasi vaskuler, terdapat infiltrasi leukosit jaringan ikat dibawah epitel yang terdiri dari limfosit primer (75% sel T) dan beberapa neutrophil yang migrasi menjadi makrofag, sel plasma dan sel mast ,

epitel mulai menunjukkan ridge, gingiva mengalami eritema dan pendarahan pada probing. Tahap *establish lesion* terjadi 14-21 hari ditandai penumpukan pembuluh darah sehingga gingiva mengalami anoxemia, aktivitas kolagenase meningkat pada jaringan yang terinflamasi. Peningkatan aktivitas disebabkan adanya produksi kolagenase dari bakteri dan polimorfonuklear (PMN), makrofag melepaskan mediator inflamasi berupa sitokin, PGE<sub>2</sub>, dan MMP, dimana sitokin merekrut makrofag dan limfosit menuju area lesi. Peningkatan aktivitas PGE<sub>2</sub> dan MMP kemudian menyebabkan destruksi serat kolagen pada jaringan konektif gingiva. (Sumerti, 2013)

Fibroblas sangat berperan penting ketika memasuki fase proliferasi pada proses penyembuhan. Pada keadaan normal aktivitas pembelahan fibroblas sangat jarang terlihat, namun ketika terjadi luka fibroblas akan segera bermigrasi menuju daerah tersebut dan merangsang sintesis kolagen secara bertahap untuk selanjutnya mampu menyembuhkan luka dengan baik. Fibroblas juga akan menstimuli makrofag untuk menghasilkan *growth factor* yang bertujuan untuk mensintesis vaskularisasi (Laut *et al.*, 2019). Peningkatan jumlah fibroblas menandakan adanya proses penyembuhan. Faktor cepat lambatnya proses penyembuhan yaitu lokasi, ukuran luka, vaskularisasi jaringan, dan peran fungsional jaringan itu sendiri (Smith *et al.*, 2019).

Kolagen adalah komponen kunci pada fase dari penyembuhan luka. Paparan kolagen *fibriler* ke darah akan menyebabkan agregasi dan aktivasi trombosit sehingga melepaskan faktor- faktor kemotaksis yang memulai proses penyembuhan luka. Fragmen-fragmen kolagen melepaskan kolagenase leukositik untuk menarik fibroblas ke daerah injuri. Selanjutnya kolagen menjadi pondasi untuk matrik ekstraseluler yang baru. Akumulasi kolagen pada daerah luka tergantung pada rasio antara sintesis kolagen dan degradasi kolagen oleh enzim. Pada fase awal proses penyembuhan luka, jumlah degradasi kolagen rendah, tetapi akan meningkat seiring dengan maturasi dari luka (Mercandetti, 2002)

Sel utama yang terlibat adalah fibroblas dan kolagen. Fibroblas merupakan elemen selular yang banyak ditemukan pada jaringan ikat gingiva yang

berproliferasi dan aktif mensintesis komponen matriks pada proses penyembuhan luka dan perbaikan jaringan yang rusak. Fibroblas merupakan bahan dasar pembentukan jaringan parut dan kolagen yang memberikan kekuatan daya rentang pada penyembuhan luka jaringan lunak. Pada saat jaringan mengalami peradangan, maka fibroblas akan segera bermigrasi ke arah luka, berproliferasi dan memproduksi matriks kolagen untuk memperbaiki jaringan yang rusak (Ali, 2011).

Pada proses penyembuhan gingivitis dapat dibantu dengan menggunakan bahan kimia dan obat dengan bahan herbal, yang dapat mengurangi peradangan dan menyembuhkan gingivitis. Salah satu bahan herbal yang mulai banyak diteliti adalah tanaman kakao (*Theobroma cacao L.*). Di Indonesia, tanaman ini banyak dibudidayakan, kakao memiliki nilai ekonomi yang tinggi sebagai sumber pendapatan masyarakat. Kabupaten Jember merupakan salah satu daerah penghasil kakao yang cukup besar (Badan Pusat Statistik, 2018). Pada saat panen, petani hanya mengambil bijinya saja sedangkan kulitnya hanya menjadi limbah yang kurang dimanfaatkan.

Berdasarkan hasil uji fitokimia, ekstrak kulit buah kakao mengandung beberapa senyawa aktif yaitu saponin, alkaloid, tannin, flavonoid dan triterpenoid (Nugroho *et al.*, 2019). Pada kulit buah kakao mengandung senyawa antioksidan, antibakteri dan anti inflamasi yaitu polifenol. Senyawa polifenol yang dikandung dalam kulit buah kakao diantaranya katekin, epitakin, proantosianidin, asam fenolat, flavonoid (Daniswara & Mujiburohman, 2020). Flavonoid bermanfaat sebagai antibakteri, antilergik, antiplatelet, antiinflamasi, antitumor dan antioksidan sebagai sistem pertahanan tubuh (Harismah & Chusniatun, 2016)

Berdasarkan uraian diatas penulis melakukan penelitian menggunakan hewan coba untuk mengetahui efek pemberian gel ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao Linn*) terhadap jumlah peningkatan fibroblas dan kepadatan kolagen pada model tikus yang diinduksi *P. gingivalis*.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, dapat dirumuskan masalah yaitu:

1. Apakah gel ekstrak etanol kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) berpengaruh terhadap jumlah fibroblas pada tikus yang di induksi *P. gingivalis* gingivitis?
2. Apakah gel ekstrak etanol kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) berpengaruh terhadap kepadatan sabut kolagen pada jaringan gingiva tikus yang di induksi *P. gingivalis* setelah pemberian gel ekstrak etanol kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.)?

## 1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui jumlah fibroblas pada jaringan gingiva pada tikus yang diinduksi *P. gingivalis* hari ke-7 dan ke-14 setelah pemberian gel ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.)
2. Mengetahui kepadatan sabut kolagen gingiva pada tikus yang diinduksi *P. gingivalis* hari ke-7 dan ke-14 setelah pemberian gel ekstrak etanol kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.).

## 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Memberikan wawasan dan ilmu pengetahuan mengenai efek pemberian gel ekstrak etanol kulit kakao terhadap penyembuhan gingivitis melalui pengamatan mikroskopis pada model tikus gingivitis.
2. Memberikan informasi kepada masyarakat dan tenaga kesehatan dalam mendukung upaya kesehatan gigi dan mulut dengan cara memanfaatkan bahan herbal kulit buah kakao, sebagai hasil pertanian unggulan di Jember.

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Gingivitis

Gingivitis merupakan tahap awal penyakit periodontal berupa reaksi peradangan gingiva yang ditandai kemerahan, pembengkakan, dan perdarahan gingiva. Hal ini disebabkan oleh kebersihan gigi dan mulut buruk yang menyebabkan akumulasi biofilm pada plak di sepanjang margin gingiva (Zefanya *et al.*, 2021). Gambaran klinis gingivitis adalah munculnya warna kemerahan pada margin gingiva, pembesaran pembuluh darah di jaringan ikat subepitel, hilangnya keratinisasi pada permukaan gingiva dan pendarahan yang terjadi pada saat dilakukan probing. Penyebab gingivitis dibagi menjadi dua, yaitu penyebab utama dan penyebab predisposisi. Penyebab utama gingivitis adalah penumpukan mikroorganisme yang membentuk suatu koloni kemudian membentuk plak gigi yang melekat pada tepi gingiva. Penyebab sekunder gingivitis berupa faktor lokal dan faktor sistemik (Diah *et al.*, 2018)



**Gambar 2.1** Gambaran klinis gingivitis (Carranza's Clinical Periodontology)

#### 2.1.1 Patogenesis gingivitis

Penyebab utama terjadinya inflamasi gingiva dikarenakan adanya akumulasi bakteri plak yang bersifat patogen. Plak merupakan lapisan tipis biofilm yang mengandung bakteri, produk metabolisme bakteri, dan sisa makanan. Akumulasi plak ini akan merangsang respon inflamasi pada gingiva yang dapat menyebabkan kerusakan jaringan pada daerah akumulasi sejumlah organisme patogen (Newman *et al.*, 2012). Proses infeksi ini dimulai dari adanya

invasi oral patogen yang berkolonisasi pada biofilm plak gigi. Bakteri yang menginvasi didominasi oleh spesies bakteri obligat anaerob gram negatif seperti *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacterrectus*, serta fakultatif anaerob gram negatif seperti *Actinobacillus actinomycetemcomitans* dan *Eikenella corrodens* (Samaranayake, 2012).

## 2.2 Porphyromonas gingivalis

*Porphyromonas gingivalis* merupakan bakteri yang selalu dikaitkan dengan kerusakan jaringan periodontal terutama gingivitis (Samaranayake, 2012). *P. gingivalis* menghasilkan *collagenase*, *endotoxin*, *fibrinolysin*, *phospholipase* yang akan mengakibatkan gangguan pada imunoglobulin dan gingipain yang kemudian dapat menimbulkan gangguan sistem imun pada gingiva (Samaranayake, 2012).

### 2.2.1 Taksonomi *P. gingivalis*

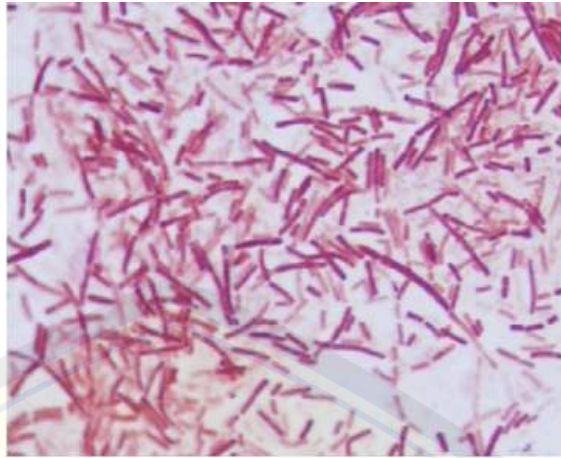
Taksonomi dari *P. gingivalis* adalah sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Eubacteria</i>
Filum	: <i>Bacteriodes</i>
Kelas	: <i>Bacterioedes</i>
Ordo	: <i>Bacteriodales</i>
Familia	: <i>Phorphyromonadaceae</i>
Genus	: <i>Porhyromonas</i>
Spesies	: <i>Porphyromonas gingivalis</i>

### 2.2.2 Karakteristik Bakteri *Porphyromonas gingivalis*

*P. gingivalis* merupakan bakteri anaerob gram negatif yang mempunyai struktur dinding sel yang berbeda dengan struktur dinding sel bakteri gram positif. Pada bakteri ini mempunyai dinding sel yang terdapat adanya membran luar, dinding peptidoglikan dan ruang periplasmik diantara dinding sel dan membran (Nitawati, *et al.*,2014). Bakteri ini memiliki bercak yang berwarna kehitaman, tidak mempunyai alat gerak (*nonmotile*), tumbuh optimum di suhu sekitar 36,8 - 39° C dengan pH antara 7,5 – 8,0, tidak membentuk spora (Naito, *et al.*,2008).





**Gambar 2.2** Gambar *Porphyromonas Gingivalis* perbesaran 1000x (Fitriyana *et al.*, 2013)

### 2.2.3 Faktor Virulensi *P. gingivalis*

*P. gingivalis* merupakan salah satu bakteri gram-negatif berbentuk batang, berpigmen hitam yang terdapat pada plak subgingiva. Bakteri patogen memiliki faktor virulensi atau potensi toksin yang dapat menginfeksi inang dan merusak jaringan normal. *P. gingivalis* secara lokal dapat menyerang jaringan periodontal dan menghindari mekanisme pertahanan host. *P. gingivalis* menghasilkan beberapa faktor virulensi diantaranya yaitu fimbria, kapsul, polisakarida, lipopolisakarida dan hemolysis yang bersifat patogen di rongga mulut (Pratiwi *et al.*, 2020).

#### a. Lipopolisakarida

Lipopolisakarida (LPS) adalah molekul besar yang terdiri dari komponen lipid (lipid A) dan komponen polisakarida. LPS biasa ditemukan di membran luar bakteri gram negatif, mereka bertindak sebagai endotoksin. TLR-4 (*toll like receptor-4*) yang terletak pada permukaan sel host, CD14 (*cluster of differentiation 14*) dan MD-2 (*myeloid differentiation-2*) yang dikenal sebagai antigen limfosit 96 yang dapat mengenali LPS dari bakteri gram negatif sebagai bagian dari kompleks molekul permukaan sel. Interaksi kompleks CD14 / TLR-4 / MD-2 dengan LPS memicu serangkaian peristiwa intraseluler, yang hasilnya yaitu peningkatan produksi mediator inflamasi (terutama sitokin) seperti IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  dan diferensiasi sel imun untuk pengembangan respons imun efektif terhadap patogen (Newman *et al.*, 2019)

#### b. Fimbriae

Fimbriae *P. gingivalis* adalah penonjolan pada permukaan sel yang tipis dan berserabut yang memfasilitasi terjadinya adhesi ke sel inang dan bakteri lain. Fimbria, *P. gingivalis* dapat melekat pada awal koloni bakteri dan berperan dalam perkembangan biofilm. Jenis fimbriae ini ialah fimbriae tipe I (mayor) yang disebut fimbrillin atau FimA yang dikode oleh gen fimA dan memiliki peran penting dalam kolonisasi dan invasi. Fimbriae tipe II (minor) atau yang disebut dengan protein subunit Mfa yang dikode oleh gen mfa1 memiliki peran khusus yaitu untuk menginduksi kerusakan tulang pada model periodontitis eksperimental (Morten Enerson *et al.*, 2013).

#### c. Gingipain

Gingipain merupakan proteinase sistein yang disekresikan oleh *P. gingivalis* dan juga menyumbang 85% dari total aktivitas proteolitik *P. gingivalis*. Berdasarkan spesifisitas substratnya, gingipain dibagi menjadi arginin gingipain (Arg-X) dan lisin (Lys-X) yang spesifik. Gingipain arginin dapat menurunkan komponen matriks ekstraseluler, termasuk faktor komplemen, sitokin, imunoglobulin, dan pengikatan integrin-fibronektin. Terdapat dua jenis arginin gingipain yaitu RgpA yang mengandung domain adhesi dan proteolitik dan juga RgpB yang hanya berisi domain proteolitik. Selain itu juga terdapat satu jenis lysine gingipain yaitu Kgp yang mengandung adhesi dan proteolitik. (Collyer *et al.*, 2011)

#### d. Kapsul

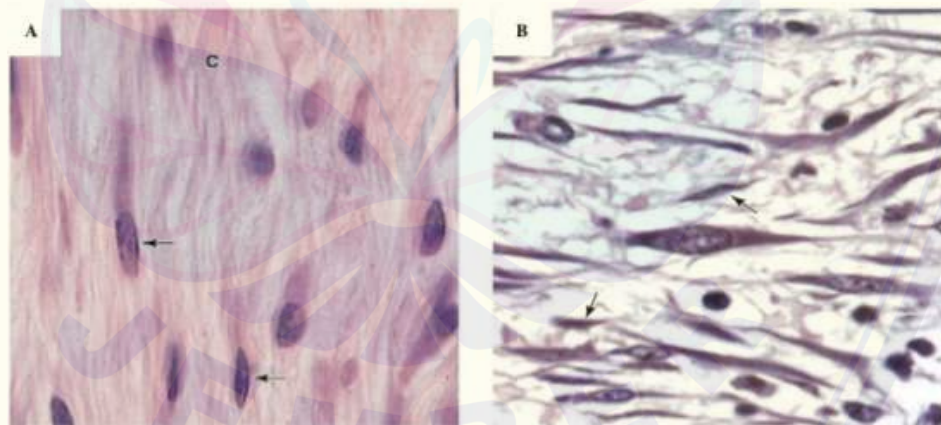
*P. gingivalis* ada yang berkapsul dan ada yang tidak berkapsul. *P. gingivalis* yang berkapsul lebih virulen dikarenakan *P. gingivalis* yang tidak berkapsul akan lebih mudah dibunuh oleh makrofag dan sel dendritik. *P. gingivalis* yang berkapsul juga memiliki kemampuan untuk memodulasi respon host dengan cara menstimulasi sintesis sitokin interleukin-1 (IL-1), IL-6 dan IL-8 dari fibroblas (How *et al.*, 2016).

### 2.3 Fibroblas

Fibroblas memegang peran yang penting dalam proses penyembuhan luka seperti penghentian dalam membentuk bekuan fibrin, menciptakan matriks ekstra

seluler (ECM) dan pembentukan struktur kolagen maupun proses kontraksi pada luka (Bainbridge, 2013). Fibroblas mempunyai banyak pecabangan sitoplasma yang tidak terbentuk. Intinya lonjong, besar, kromatin halus dan anak inti yang nyata. Fibroblas biasanya berbentuk gelondong, inti lebih kecil, gelap dan Panjang.

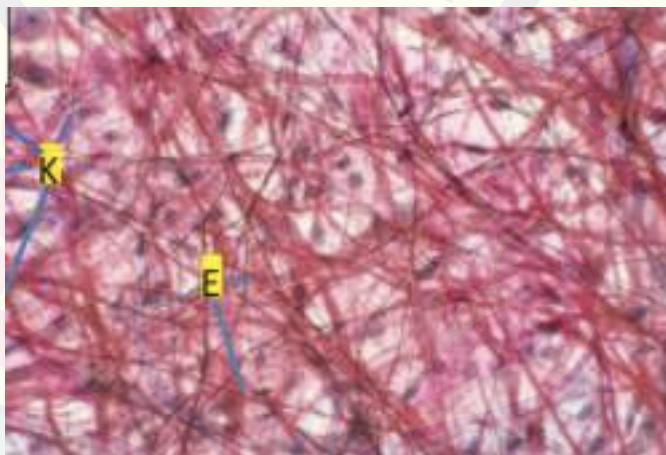
Fibroblas berperan besar dan menghasilkan produk struktur protein yang digunakan untuk proses rekonstruksi jaringan. Pada saat normal aktivitas pembelahan dari fibroblas sangat jarang, namun ketika terjadi luka sel fibroblas sangat aktif dan memproduksi matriks ekstraseluler. Proliferasi fibroblas di stimulasi oleh beberapa faktor diantaranya, interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), *platelet Derivate Growth factor* (PDGF) dan *Fibroblast Growth Factor* (FGF), migrasi fibroblas pada area luka di stimulasi oleh *Transforming Growth Factor* (TGF –  $\beta$ ). TGF –  $\beta$  merupakan faktor pertumbuhan yang diproduksi oleh jaringan granulasi. Proses penyembuhan luka dipengaruhi oleh peranan migrasi dan proliferasi fibroblas pada area luka (Sumbayak, 2016). Kolagen berfungsi pada sel fibroblas yaitu membentuk jaringan baru (*connective tissue matrix*) dan dengan diproduksinya substrat oleh fibroblas akan memberi tanda bahwa makrofag pembuluh darah baru dan fibroblas menjadi satu kesatuan area luka (Sumbayak, 2016).



**Gambar 2.3** Struktur Fibroblas (400X; H&E). (A) Fibroblas biasanya memiliki inti aktif yang besar dan sitoplasma eosinofilik yang meruncing di kedua arah di sepanjang sumbu nukleus,. (B). Fibroblas aktif memiliki inti eukromatik yang besar dan sitoplasma basofilik, sedangkan fibroblas tidak aktif (fibrosit) berukuran lebih kecil dengan inti yang lebih heterokromatik (panah). Sel bulat yang sangat basofilik berada dalam leukosit (Junqueira dan Mescher, 2016)

## 2.4 Sabut Kolagen

Kolagen merupakan protein yang terdapat di kulit, tendon, tulang rawan, dan organ dengan kandungan sekitar 30% atau lebih dari protein total. Kolagen terdapat pada manusia dan hewan (Sinthusamran *et al.*, 2012). Kolagen mengandung asam amino tertentu seperti (33,5%), Prolin (12%), hydroxyproline dan Arginine (10%) (Tadelilin *et al.*, 2006). Kolagen mempunyai peran penting dalam tubuh yaitu sebagai pembangun tulang, gigi, sendi, otot, dan kulit sehingga diperlukan oleh tubuh (Sinthusamran *et al.*, 2012). Tiga kelas kolagen utama yang normal terdapat dalam jaringan ikat, yaitu : Kolagen fibriliar (Kolagen tipe I, III dan V), Kolagen membrane basalis (Kolagen tipe IV), Kolagen Interstisial (Kolagen VI, VII, VIII) (Primadina *et al.*, 2019).



**Gambar 2.4** Struktur Gingiva secara histologis serat kolagen (**K**) dengan warna ungu dan ukuran yang lebih tebal dibandingkan elastin dan serat elastin (**E**) berwarna hitam dan ukurannya lebih tipis dibandingkan serat kolagen dengan perbesaran 200x (Mescher, 2018)

## 2.5 Pembentukan Sabut Kolagen Oleh Fibroblas

Dalam proses penyembuhan sel utama yang terlibat adalah fibroblas dan kolagen. Fibroblas merupakan sel induk yang berperan dalam pembentukan substansi dasar dan sabut kolagen yang memberikan kekuatan daya rentang pada penyembuhan jaringan lunak. Pada saat jaringan mengalami peradangan, maka fibroblas akan segera bermigrasi ke arah luka, berproliferasi dan memproduksi matriks kolagen untuk memperbaiki jaringan yang rusak, dengan meningkatnya jumlah sel fibroblas akan meningkatkan jumlah serat kolagen yang akan mempercepat proses penyembuhan (Taqwim, 2011)

## 2.6 Mekanisme Penyembuhan Luka Jaringan Lunak

Penyembuhan luka merupakan suatu prosedur penting dalam mempertahankan homeostatis dan pengembalian integritas jaringan yang terluka. Penyembuhan luka berdasarkan klasifikasinya dibagi menjadi penyembuhan primer dan penyembuhan sekunder. Pada penyembuhan luka primer, tidak terjadi kehilangan sel dan jaringan serta semua jaringan akan diganti dalam posisi anatomi yang sama dan dengan struktur yang sama sebelum cedera. Sedangkan penyembuhan luka sekunder ditandai dengan luka yang terbuka, kehilangan sel dan jaringan yang besar serta kadang terinfeksi. Proses penyembuhan luka pada jaringan lunak dibagi menjadi tiga fase, yaitu:

### 1. Fase inflamasi

Fase inflamasi berlangsung sejak awal terjadinya luka hingga hari ke-lima dan terdiri dari fase vaskuler dan seluler. Respon vaskuler mengakibatkan sel-sel radang terakumulasi pada daerah luka. Perdarahan terjadi akibat pembuluh darah yang ruptur pada luka dan tubuh akan melakukan vasokonstriksi sehingga terjadi penghambatan, pengerutan ujung pembuluh darah yang putus dan terjadi reaksi homeostatis. Pada fase seluler, terjadi pergerakan leukosit menembus dinding pembuluh darah (diapedesis) menuju luka karena daya kemotaksis. Leukosit menggunakan enzim hidrolitik untuk mencerna bakteri dan debris pada luka (Kumar, 2006).

Beberapa jam setelah luka, terjadi invasi sel inflamasi yang mengakibatkan sel polimorfonuklear (PMN) bermigrasi menuju daerah luka dan setelah 24-48 jam terjadi perubahan sel polimorfonuklear (PMN) menjadi sel mononuklear atau makrofag. Pada fase ini biasanya akan berakhir selama lima hari dan akan dilanjutkan dengan fase proliferasi (Sugiaman, 2011)

### 2. Fase proliferasi

Fase proliferasi disebut juga fase fibroplasia, karena merupakan proses proliferasi fibroblas dan berlangsung dari akhir fase inflamasi hingga minggu ke-3 akhir. Pada fase ini terdapat pembentukan jaringan granulasi, proliferasi dan migrasi sel-sel jaringan ikat serta repitelisasi permukaan luka. Fibroblas memproduksi matriks ekstraseluler, fibronektin dan kolagen primer untuk

melakukan migrasi dan proliferasi sel. Fibroblas berasal dari sel mesenkim yang belum berdiferensiasi, menghasilkan polisakarida, asam amino-glisin, dan prolin yang merupakan bahan dasar serat kolagen yang akan melekat pada tepi luka.

Proses angiogenesis ditandai dengan terbentuknya susunan pembuluh darah baru dan terjadinya proses pertumbuhan saraf pada ujung luka. Keratinosit bermigrasi dan berproliferasi pada proses epitelisasi hingga mengakibatkan terjadinya proses penutupan luka. Proses epitelisasi ini menyediakan barrier pertahanan alami terhadap infeksi dan kontaminasi dari luar. Epitel luka yang berisi sel basal akan terlepas dan berpindah mengisi permukaan luka. Kemudian akan terjadi mitosis untuk membentuk sel baru yang akan mengisi luka. Proses epitelisasi akan berhenti pada saat sel epitel saling menyentuh dan menutupi seluruh permukaan luka, maka proses fibroplasia telah selesai dan dilanjutkan dengan proses pematangan atau remodeling (Sugiaman, 2011)

### 3. Fase *remodeling*/fase pematangan

Fase pematangan luka merupakan fase terakhir dari proses penyembuhan luka. Fase ini terjadi pada minggu ke-2 dan ke-3 setelah terjadi perlukaan. Pada fase remodeling terjadi perubahan bentuk, kepadatan dan kekuatan luka. Selain itu, pada fase ini juga menghasilkan jaringan parut yang pucat, tipis, lemas dan mudah digerakkan dari dasar lukanya. Hal ini disebabkan oleh pergantian kolagen tipe III menjadi tipe I dan pengurangan asam hyaluronic dan fibronectin. Secara mikroskopis, susunan serat mengalami perubahan dan menjadi lebih terorganisasi. Fase ini dapat berlangsung beberapa bulan dan dikatakan berakhir apabila sudah ditemui tanda peradangan (Sugiaman, 2011).

## 2.7 Kakao (*Theobroma cacao L.*)

Kakao (*Theobroma cacao L.*) merupakan suatu tanaman perkebunan yang umumnya tumbuh di daerah yang tropis dan tersebar luas di wilayah Indonesia. Kakao (*Theobroma cacao L.*) memiliki peran yang cukup penting dalam program pembangunan pertanian, terutama dalam penyediaan lapangan kerja, pendorong pengembangan wilayah, peningkatan kesejahteraan petani, dan peningkatan pendapatan atau devisa negara. Kakao banyak digunakan sebagai bahan baku seperti permen, bubuk coklat dan lemak coklat yang biasanya digunakan untuk

industri farmasi, kosmetik, makanan dan minuman (Siregar & Nurbaiti, 2018., Direktorat Jenderal Perkebunan Indonesia, 2019).



Gambar 2.5 Tanaman Kakao (Fitri, 2021)

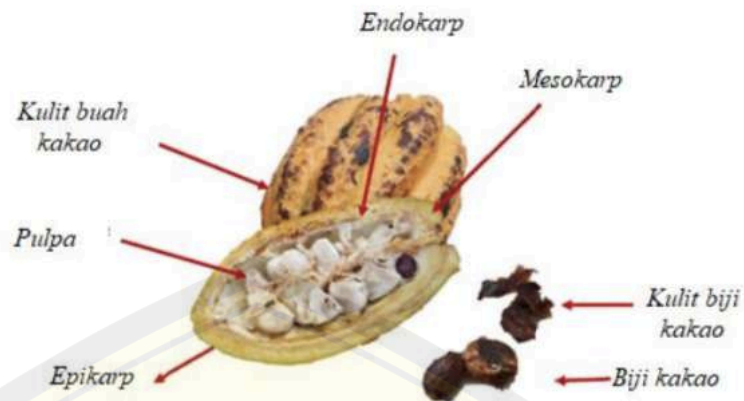
#### 2.7.1 Taksonomi Tanaman Kakao

Taksonomi Tanaman Kakao adalah sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Subdivisi	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Dicotyledenaeae</i>
Subkelas	: <i>Dialypetalae</i>
Ordo	: <i>Malvales</i>
Famili	: <i>Sterculiaceae</i>
Genus	: <i>Theobroma</i>
Spesies	: <i>Theobroma cacao L.</i>

#### 2.7.2 Kulit Buah Kakao

Kulit buah kakao mempunyai persentase sekitar 67%-76% dari bobot buah kakao segar dan biasanya menjadi produk olahan sampingan utama (Campos-Vega *et al.*, 2018). Kulit buah kakao pada umumnya akan menjadi limbah perkebunan yang dapat menyebabkan pencemaran lingkungan. Banyak orang yang telah membudidayakan tanaman kakao terutama pada buah dan bijinya (Pakaya *et al.*, 2019).



Gambar 2.6 Komposisi Buah Kakao (Yuliani,2020)

### 2.7.3 Kandungan Kulit Buah Kakao

Kulit buah kakao merupakan bagian terluar dari buah kakao yang memiliki tekstur yang kasar serta berbentuk bulat dan relatif tebal. Menurut penelitian yang dilakukan (Rachmawaty *et al.*,2017) melaporkan bahwa ekstrak kulit buah kakao mempunyai beberapa senyawa aktif seperti pada (Tabel 2.1).

Tabel 2.1 Kandungan senyawa aktif ekstrak kulit buah kakao Rachmawaty *et al.*,2017)

Senyawa Kimia	Hasil Ekstrak	
	Etanol 70%	Aseton : air
Alkaloid	+	+
Saponin	+	+
Tanin	+	+
Triterpenoid	+	-
Steroid	-	-
Flavonoid	+	+
Fenol	+	+

Berdasarkan tabel tersebut, analisis kualitatif dari komponen fitokimia ekstrak kulit buah kakao melaporkan bahwa hasil ekstrak kulit buah kakao pada setiap perlakuan mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, tanin dan saponin, sedangkan terpenoid hanya bisa teridentifikasi pada ekstrak dengan pelarut etanol 70% (Rachmawaty *et al.*, 2017). Kemudian uji fitokimia kandungan ekstrak kulit



buah kakao yang dilakukan oleh (Nugroho *et al.*, 2019) menunjukkan bahwa kulit buah kakao terdiri atas beberapa senyawa aktif dengan persentase yaitu saponin (4,05%), alkaloid (5,06%), tanin (6,11%), flavonoid (3,91%), dan terpenoid (2,94%).

Tabel 2.2 Persentase senyawa aktif dalam ekstrak kulit buah kakao (Nugroho *et al.*, 2019)

Kandungan	Persentase
Saponin	4.05%
Alkaloid	5,06%
Tanin	6,11%
Flavonoid	3,91%
Terpenoid	2,94%

Adanya senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin dan triterpenoid ini menunjukkan bahwa ekstrak kulit buah kakao mempunyai potensi sebagai antimikroba. Senyawa aktif fenol dilaporkan mempunyai aktivitas antifungi dan dapat merusak membran sel sehingga terjadi perubahan permeabilitas pada sel yang dapat mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan sel atau matinya sel jamur. Selain itu senyawa fenol juga memiliki aktivitas sebagai antibakteri yang cara kerjanya yaitu berinteraksi dengan sel bakteri melalui proses absorpsi yang melibatkan ikatan hydrogen. Senyawa fenol pada kulit buah kakao juga dapat mendenaturasi protein sel serta mengerutkan dinding sel sehingga dapat melisiskan dinding sel jamur. Selain itu, senyawa fenol juga dapat berdifusi ke membran sel jamur dan mengganggu jalur metabolik seperti sintesis ergosterol, glukukan, kitin, protein, dan glukosamin pada jamur (Rachmawaty *et al.*, 2017).

#### 1. Flavonoid

Flavonoid yang terdapat pada kulit buah kakao dapat berperan sebagai antiinflamasi dan antibakteri. Flavonoid berpotensi merusak membran sitoplasma dan dapat menyebabkan kerusakan dinding sel pada bakteri (Handika, 2018). Selain itu, flavonoid bermanfaat sebagai antiviral, antialergik, antiplatelet, antiinflamasi,

antitumor dan antioksidan pada sistem pertahanan tubuh (Harismah & Chusniatun, 2016). Membran sel bakteri yang tersusun atas protein dan lipid dapat terganggu karena adanya kehadiran flavonoid yang bersifat toksik terhadap membran sel bakteri tersebut sehingga protein pada bakteri terdenaturasi dan tidak dapat melakukan fungsinya

## 2. Saponin

Saponin merupakan kelompok glikosida triterpenoid atau steroid aglikon, terdiri dari satu atau lebih gugus gula yang berikatan dengan aglikon atau sapogenin, dapat membentuk kristal berwarna kuning dan amorf, serta berbau menyengat (Giri *et al.*, 2021). Saponin memiliki aktivitas sebagai antibakteri, antidiabetik, sitotoksik, antispasmodik, antioksidan, antiinflamasi, antihelmintik (Azah *et al.*, 2020).

## 3. Tanin

Tanin merupakan komponen zat organik yang sangat kompleks, terdiri dari senyawa fenolik yang sukar dipisahkan dan sukar mengkristal, mengendapkan protein dari larutannya dan bersenyawa dengan protein tersebut. Tanin dibagi menjadi dua kelompok yaitu tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi. Tanin merupakan senyawa aktif metabolit sekunder yang diketahui mempunyai beberapa khasiat yaitu sebagai astringen, antidiare, antibakteri, dan antioksidan (Malangngi *et al.*, 2012).

## 4. Alkaloid

Alkaloid bersifat antibakteri dan berperan dalam proses perangsangan fibroblas dan penguatan fibril kolagen dengan mencegah kerusakan sel melalui sintesis DNA sehingga jaringan baru yang terbentuk pada area luka menjadi lebih cepat, padat, dan kuat (Giri *et al.*, 2021; Rohani, 2021)

### **2.8 Metode Ekstraksi Kulit Buah Kakao**

Ekstraksi secara umum merupakan suatu proses pemisahan zat aktif dari suatu padatan maupun cairan dengan menggunakan bantuan pelarut. Dalam proses ekstraksi diperlukan pemilihan pelarut dikarenakan pelarut tersebut harus dapat memisahkan atau mengekstrak substansi yang diinginkan tanpa melarutkan zat-zat lainnya yang tidak diinginkan (Prayudo *et al.*, 2015). Tujuan dilakukannya

ekstraksi yaitu memisahkan kandungan metabolit sekunder dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Pemilihan metode ekstraksi didasarkan pada sifat bahan dan senyawa yang akan dipisahkan. Terdapat beberapa macam metode ekstraksi yakni maserasi, refluks, soxhletasi, dan sonikasi (*Ultrasound Assisted Extraction*).

#### 1. Maserasi

Metode ini dilakukan dengan memasukkan serbuk tanaman dan pelarut yang sesuai ke dalam wadah inert yang tertutup rapat pada suhu kamar. Proses ekstraksi dihentikan ketika tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman. Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan. Kerugian utama dari metode maserasi ini adalah memakan banyak waktu, pelarut yang digunakan cukup banyak, dan besar kemungkinan beberapa senyawa hilang. Selain itu, beberapa senyawa mungkin saja sulit diekstraksi pada suhu kamar. Namun di sisi lain, metode maserasi dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang bersifat termolabil (Tetti, 2014).

#### 2. Refluks

Refluks merupakan ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dengan jumlah pelarut terbatas dan relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Ekstraksi dapat berlangsung secara efisien dan senyawa yang terdapat dalam sampel dapat ditarik secara efektif oleh pelarut (Susanty *et al.*, 2016).

#### 3. Soxhletasi

*Soxhletasi* merupakan penyaringan yang dilakukan secara berulang-ulang sehingga didapatkan hasil yang sempurna dan pelarut yang digunakan relatif sedikit. Ekstraksi dengan alat soxhlet merupakan cara ekstraksi yang efisien dan efektif untuk menentukan kadar minyak atau lemak suatu bahan. Hal ini dikarenakan pelarut yang digunakan dapat diperoleh kembali dan waktu yang digunakan untuk ekstraksi relatif singkat. Proses ekstraksi dipengaruhi oleh metode, pelarut, suhu, serta waktu ekstraksi sehingga dapat mempengaruhi konsentrasi serta kualitas ekstrak minyak yang dihasilkan (Sahriwati, 2016).

Kelebihan dari metode soxhletasi ialah dapat mengekstrak minyak lebih banyak, membutuhkan pelarut yang lebih sedikit dan waktu ekstraksi yang dibutuhkan juga lebih singkat (Pratama *et al.*, 2017).

#### 4) Ultrasonic bath

Metode ekstraksi ultrasonik merupakan metode ekstraksi dengan perambatan energi melalui gelombang ultrasonik pada media perambatan berupa cairan sehingga dapat menimbulkan efek kavitasi yang dapat menyebabkan dinding sel pecah dan senyawa dapat terekstrak dalam pelarut. Efek kavitasi adalah proses pembentukan dari gelembung mikro yang diakibatkan peningkatan tekanan gelombang ultrasonik. Keuntungan dari metode ekstraksi ultrasonik adalah waktu ekstraksi lebih cepat, rendemen yang dihasilkan dapat maksimal, dan lebih hemat pelarut (Winata & Yuniarta, 2015).

## 2.9 Metronidazole

*Metronidazole* mempunyai sifat bakteriosid terhadap bakteri anaerob. *Metronidazole* sering digunakan untuk terapi penunjang perawatan penyakit periodontal sebab efektif untuk bakteri anaerob seperti *P. gingivalis* dan *Prevotella intermedia* (Setiawan *et al.*, 2013). Penggunaan *metronidazole* dalam perawatan periodontal sering digunakan dalam bentuk topikal gel (Wijayanto *et al.*, 2014).

Mekanisme kerja metronidazole sebagai antibakteri dengan cara masuk ke dalam sel bakteri dan bereduksi menjadi produk polar yang menghasilkan 2-hydroxymethyl metronidazole yang akan berikatan dengan DNA bakteri dan mengganggu struktur heliksnya, lalu menghambat sintesis asam nukleat dan mengakibatkan kematian sel bakteri (Tani *et al.*, 2017). Penggunaan gel metronidazole yang kurang tepat dan berlebihan dapat menimbulkan resistensi (Ardila *et al.*, 2010). Metronidazole dapat menyebabkan beberapa efek samping diantaranya seperti: sakit kepala, mual, mulut kering, dan lidah merasakan senyawa logam (Tedjasulaksana, 2016).

### 2.9.1 Farmakokinetik Metronidazole

Obat ini biasanya diabsorpsi sebanyak 90% setelah pemberian oral, mencapai konsentrasi dalam plasma 8-13 µg/ml dalam 0,25 sampai 4 jam setelah dosis tunggal

500mg. Waktu paruh metronidazole dalam plasma sekitar 8 jam dan volume distribusinya hampir sama dengan volume distribusi air total di dalam tubuh. Metronidazole berpenetrasi dengan baik ke dalam berbagai jaringan dan cairan tubuh seperti sekresi vagina, cairan semen, air liur, dan air susu ibu. Konsentrasi terapeutik juga tercapai di dalam cairan serebrospinal. Metronidazole di distribusikan secara luas di seluruh tubuh setelah itu di deteksi dalam saliva dan cairan sulkus gingiva. Setelah lima hari dengan dosis 250mg tiga kali sehari, tingkat metronidazole dalam cairan sulkus gingiva menunjukkan rentang yang jauh lebih besar dan dapat hampir 50% lebih tinggi dari konsentrasi serum. Lebih dari 75 % metronidazole dieliminasi dalam urin yang sebagian besar berupa metabolit dan hanya sekitar 10% ditemukan dalam bentuk tak berubah. Urin dapat berwarna coklat kemerahan karena pigmen dari obat (Tedjasulaksana, 2016).

#### 2.9.2 Farmakodinamik Metronidazole

Metronidazole adalah senyawa dengan berat molekul rendah yang berdifusi melintasi membran sel mikroorganisme anaerobi sebagai prodrug dan diaktifkan dalam sitoplasma bakteri atau organel-organel tertentu dalam protozoa. Molekul metronidazole dikonversi menjadi nitroso radikal bebas dengan reduksi intraseluler yang meliputi transfer elektron untuk kelompok obat nitro. Bentuk obat menjadi sitotoksik dan dapat berinteraksi dengan molekul DNA yang menyebabkan hilangnya struktur helix DNA dan putusya untai DNA, sehingga terjadi penghambatan sintesa DNA dan matinya sel. Obat ini hanya aktif terhadap bakteri anaerob (Tedjasulaksana, 2016).

#### 2.9.3 Efek Samping Metronidazole

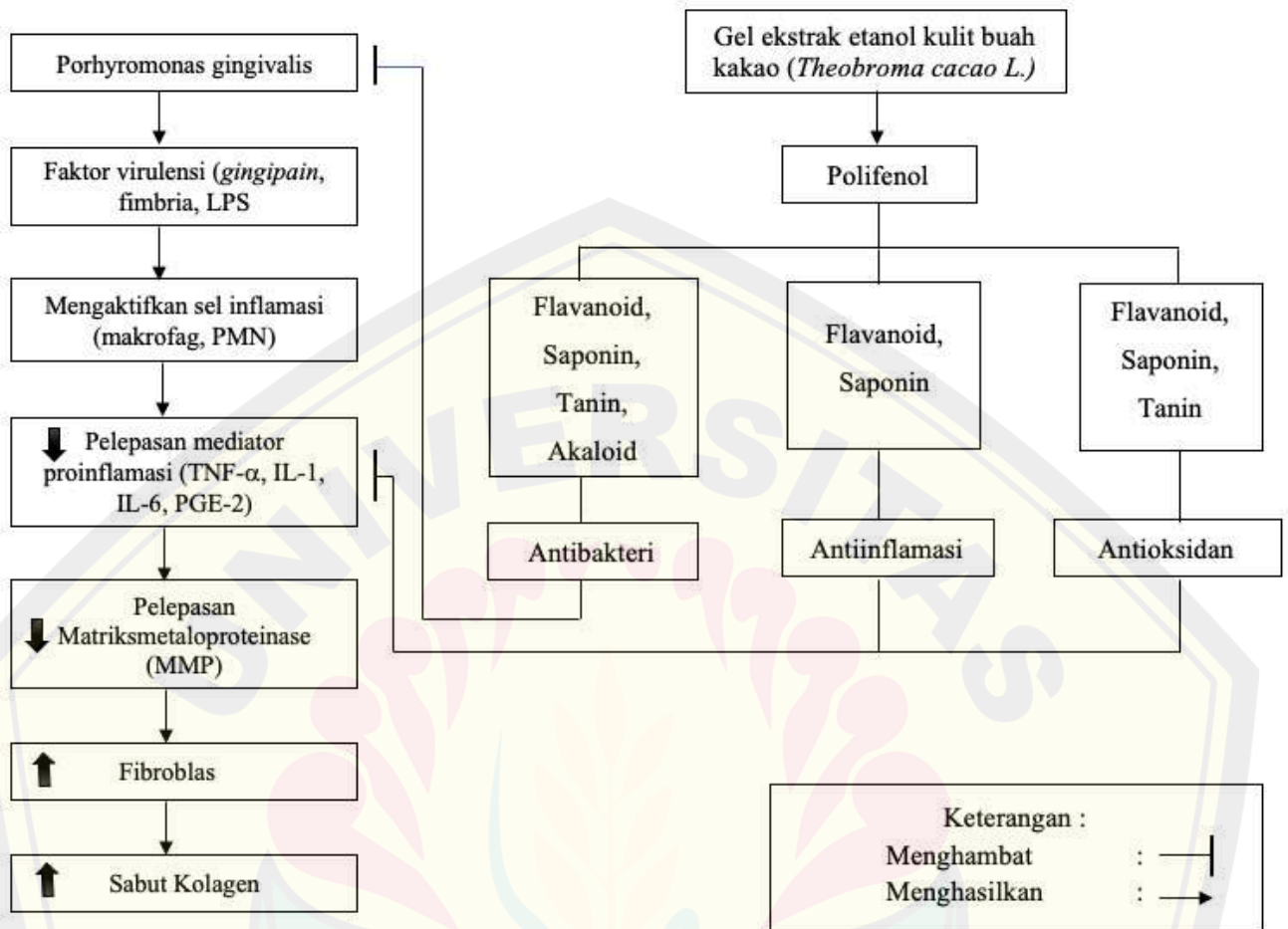
Efek samping yang ditimbulkan pada terapi metronidazole adalah sakit kepala, mual, mulut kering, muncul ruam pada kulit, dan terasa seperti mulut terdapat logam. Efek samping yang terjadi umumnya hanya bersifat sementara, dan kembali normal setelah obat dihentikan. Selain itu, dapat juga terjadi reaksi alergi serius dengan gejala berupa ruam kemerahan pada kulit disertai gatal dan edema, terutama (Sari *et al.*, 2021).

#### 2.9.4 Mekanisme Penyerapan Obat ke Sulkus

Penghantaran obat topikal memiliki memiliki keunggulan optimasi obat sampai pada lokasi target, Absorpsi obat terjadi dengan difusi pasif non ionik, sebuah proses yang dipengaruhi oleh gradien konsentrasi melalui ruang pada epitelium. Transpor pasif non ionik melintasi membran lipid pada rongga mulut merupakan mekanisme transpor utama. Mukosa bukal merupakan lapisan lipoidal yang berfungsi sebagai lintasan dari obat, sehingga semakin lipofilik sifat obat, semakin mudah obat tersebut terabsorpsi (Mishra *et al.*, 2012).



2.10 Kerangka Konsep



### 2.11 Keterangan Kerangka Konsep

Bakteri *P. gingivalis* dapat menghasilkan faktor virulensi berupa *gingipain*, *fimbrae*, dan LPS. *Gingipain*, *fimbrae* serta LPS akan membuat jaringan tubuh melakukan pengaktifan sel-sel imun seperti makrofag, neutrofil dan limfosit untuk melakukan pelepasan mediator proinflamasi seperti IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  dan PGE-2 yang dapat menyebabkan reaksi inflamasi serta mengarah pada resorpsi tulang alveolar. Proses ini menyebabkan terjadinya periodontitis dan terjadinya destruksi pada gingiva.

Untuk menghambat gingivitis ini dibutuhkan suatu penghambat berupa suatu bahan alami. Kulit buah kakao yang mengandung senyawa diantaranya, flavonoid, saponin, alkaloid serta terpenoid memiliki efek biologis yang beragam seperti antioksidan, antiinflamasi serta aktivitas antibakteri. Flavonoid memiliki sifat antioksidan untuk menghambat kerusakan membrane sel sehingga mempercepat fase proliferasi sel dan memiliki sifat antiinflamasi yang berpengaruh terhadap proliferasi dan mempercepat fase proliferasi. Aktivitas antibakteri dapat membunuh bakteri *P. gingivalis* sehingga mengurangi patogen yang menghasilkan faktor virulensi yang menyebabkan inflamasi. Kemudian antiinflamasi yang terkandung didalamnya akan menurunkan sitokin inflamasi serta mengurangi peradangan diakibatkan oleh *P.gingivalis* yang sudah terjadi. Senyawa yang terkandung pada kulit buah kakao juga dapat meningkatkan proliferasi sel fibroblas dan sabut kolagen.

### 2.12 Hipotesis

Ekstrak gel ekstrak etanol kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) berpotensi meningkatkan jumlah fibroblas dan kepadatan sabut kolagen pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang di induksi *P. gingivalis*



## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Jenis Penelitian

Penelitian yang digunakan adalah ekperimental laboratoris dengan rancangan penelitian menggunakan *the post test only control group designs*. Jenis penelitian eksperimental laboratoris merupakan penelitian dengan pemberian perlakuan terhadap variabel bebas kemudian diukur pengaruhnya (Praptomo *et al* ., 2017). Rancangan penelitian yang digunakan merupakan *Post-test Only Control Group Design* yaitu membandingkan kelompok eksperimen yang akan mendapat perlakuan dan kelompok kontrol yang tidak mendapat perlakuan (Nursalam, 2016).

### 3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

#### 3.2.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di berbagai tempat, meliputi:

- a. Laboratorium Tanaman Politeknik Negeri Jember untuk identifikasi spesies buah kakao (*Theobroma cacao* L.)
- b. Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember untuk pembuatan ekstrak etanol kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.)
- c. Laboratorium Farmestika Fakultas Farmasi Universitas Jember untuk pembuatan gel ekstrak etanol kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.)
- d. Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga untuk isolate *P. gingivalis*.
- e. Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk pembuatan dan peremajaan media suspensi *P. gingivalis*.
- f. Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk pemeliharaan dan perlakuan hewan coba.
- g. Laboratorium Histologi bagian Biomedik Fakultas kedokteran Gigi Universitas Jember untuk pembuatan preparat dan pengamatan jaringan.

### 3.2.2 Waktu Penelitian

Pelaksanaan penelitian dilakukan pada bulan Oktober 2022 – Desember 2022.

## 3.3 Variabel Penelitian

### 3.3.1. Variabel Bebas

Variabel Bebas pada penelitian ini adalah gel ekstrak etanol kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan konsentrasi 100 mg/ml.

### 3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah jumlah fibroblas dan kepadatan sabut kolagen sulkus tikus yang telah di induksi *P. gingivalis* setelah pemberian gel pada kelompok kontrol dan perlakuan dengan pengamatan hari ke-7 dan ke-14.

### 3.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini antara lain:

1. Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.)
2. Konsentrasi ekstrak etanol kulit buah kakao dari limbah kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.)
3. *P. gingivalis* ATCC 33277
4. Induksi *P. gingivalis* pada tikus secara intrasulkuler
5. Cara dan waktu pemberian gel ekstrak etanol kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.)
6. Kriteria sampel meliputi galur tikus, jenis kelamin, berat badan, umur, dan kondisi fisik.

## 3.4 Definisi Operasional

### 3.4.1 Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Kulit buah kakao yang dipakai merupakan *Theobroma cacao* L. tipe *forastero* yang diambil di pusat penelitian PTPN XII Kebun Renteng Kabupaten Jember dalam keadaan segar. Bagian yang digunakan merupakan seluruh bagian kulit buah kakao yang dipetik pada usia 6 bulan dengan warna kuning sempurna atau merata. Buah kakao yang sudah dipetik kemudian segera diambil kulitnya

untuk penelitian dengan jangka waktu tidak lebih dari seminggu dengan tujuan agar kulit buah kakao tetap segar.

#### 3.4.2 Gel Ekstrak Etanol kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Gel ekstrak etanol kulit buah kakao merupakan sediaan ekstrak kulit buah kakao tipe *forastero* selanjutnya dimasukkan ke dalam lumpang diberi pelarut etanol 70% dalam bentuk sediaan gel dengan konsentrasi 100mg/ml yang diberikan secara topikal pada sulkus tikus yang telah diinduksi *P. gingivalis*.

#### 3.4.3 Model Tikus yang telah diinduksi *P. gingivalis*

Model tikus yang digunakan pada penelitian ini merupakan tikus wistar jantan dengan berat 200-250gram yang berumur 2-3 bulan dalam keadaan sehat yang diinduksi *P. gingivalis strain* ATCC 33277 dengan konsentrasi  $2 \times 10^9$  CFU/ml, sebanyak 0,05 ml dan diberikan setiap 3 hari sekali selama 7 hari. Induksi secara intrasulkuler pada area sulkus gingiva bagian bukal gigi molar pertama kiri atas, dipilihnya lokasi ini dikarenakan pada daerah itu tulang alveolar tipis, sehingga memudahkan terjadinya gingivitis, jika gingivitis tidak dirawat dengan benar maka dapat menyebabkan terjadinya periodontitis. Gingivitis diamati secara klinis tampak kemerahan pada margin gingiva.

#### 3.4.4 Jumlah Fibroblas

Fibroblas merupakan sel yang berbentuk pipih panjang dan oval yang memiliki tonjolan sitoplasmatik pada setiap ujungnya. Sel ini memiliki inti berbentuk vesikular. Pengecetan jaringan menggunakan pewarnaan HE sehingga sel akan berwarna biru atau ungu gelap dengan pembesaran 40X untuk melihat semua lapang pandang, kemudian ditingkatkan dengan pembesaran 400X. Penghitungan jumlah fibroblas pada gingiva tikus dibantu menggunakan software kuantitatif patologi yang digunakan sebagai rujukan untuk menghitung sel, yang diambil pada bagian bukal gigi molar pertama kiri atas.

#### 3.4.5 Kepadatan Sabut Kolagen

Kepadatan kolagen merupakan salah satu parameter dan indikator penting dalam proses penyembuhan luka. Kolagen yang terbentuk akan membentuk jaringan ikat yang menghubungkan tepi-tepi luka dengan erat serta dengan adanya kolagen dapat meningkatkan pertautan antar jaringan baru sehingga dapat

memperkuat area penyembuhan Penghitungan jumlah kolagen mikroskopik dengan cara menganalisis warna biru yang terlihat pada preparat pewarnaan *Trichrome Mallory*. Jumlah kolagen diukur dengan melakukan *cropping* (pembatasan area) menggunakan mikroskop dengan pembesaran 400X. Hasil pengamatan kemudian difoto menggunakan kamera Optilab dan dianalisis menggunakan *software Adobe Photoshop CS6*. untuk melihat jumlah pixel kolagen, yaitu titik-titik kecil pada elemen gambar. Kepadatan kolagen dapat dilihat dari jumlah kepadatan sabut kolagen yang didapat dari rata-rata jumlah pixel kolagen. Kemudian hasil dianalisis menggunakan program SPSS.

### 3.5 Sampel Penelitian

#### 3.5.1 Besar Sampel Penelitian

Besar sampel yang digunakan dalam rumus (Daniel, 2018), didapatkan sebagai berikut:

$$\eta = \frac{z^2 \cdot \sigma^2}{d^2}$$

Keterangan:

$\eta$  : Besar sampel minimum

$\sigma$  : Standart deviasi sampel

$d$  : Kesalahan yang masih dapat ditoleransi, diamsusikan  $d = \sigma$

$Z$ : Konstanta pada tingkat kesalahan tertentu, jika  $\alpha = 0,05$  maka  $Z = 1,96$

Perhitungan:

$$n \geq (1,96)^2$$

$$n \geq 3,84$$

$$n \geq 4$$

Maka jumlah sampel yang digunakan untuk tiap kelompok percobaan minimal sebanyak 4 ekor. Pada penelitian ini menggunakan 3 kelompok sampel, yaitu kontrol positif, kontrol negatif serta kelompok perlakuan dengan besar sampel masing-masing kelompok terdiri atas 8 sampel sehingga didapatkan total besar sampel adalah 24 sampel.

### 3.5.2 Kriteria Sampel Penelitian

Sampel Penelitian ini adalah tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) dengan kriteria inklusi sebagai berikut:

- a. Tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*)
- b. Umur 2-3 bulan
- c. Berat badan 200-250 gram
- d. Kondisi fisik dalam keadaan sehat (warna bulu putih bersih, dan mata tikus merah normal)

Kriteria eksklusi merupakan tikus yang mati selama proses penelitian. Tikus dinyatakan *drop out* jika tikus memiliki kriteria eksklusi dan akan diganti dengan tikus lain sesuai kriteria inklusi sehingga didapatkan jumlah sampel yang sesuai dengan besar sampel.

## 3.6 Alat dan Bahan Penelitian

### 3.6.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kendang tikus, botol minum tikus, neraca digital (*Ohaus*, Indonesia), masker (*Med+*, Indonesia), sarung tangan (*Medical Care*, Indonesia), *tuberculine syringe* kapasitas 1ml (*OneMed*, Indonesia), jarum 30 *gauge*, pisau malam (*William England*), *plastic filling instrument*, mortar pastel (Indonesia), *rotary evaporator* (*B-One*, Inggris) tabung reaksi (*pyrex*), inkubator, spektrofotometer (*Perkin, Inggris*), potongan kayu 2x2 cm, lampu spiritus (Indonesia), microtom (*Tissue- Tek*, Jepang), kaca obyek (*Sail*), *waterbath* (*Memmert*, Jerman), kuas kecil (Indonesia), kompor listrik (*Maspion*, Indonesia), Mikroskop cahaya (*Olympus* Jepang), optilab (*Obtilab Advance*, Indonesia).

### 3.6.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) yang diperoleh dari kebun kakao PTPN XII Kebun Renteng Kabupaten Jember, makanan tikus wistar (turbo), aquades steril, etanol, 70% media NA, media BHI-B, suspense *P. gingivalis* strain ATCC 33277, ketamin, eter, *paraffin*, *base mole*, buffer formalin, asam formic 10%, xylol, alcohol 70%, 80%,

95%, 96%, *mayer's haematoxylin*, eosin, *mayer egg albumin*, cairan entellan, air, minyak imersi, larutan buffer, Metronidazole, pewarnaan *Tricomemallory*

### 3.7 Konsentrasi dan Dosis

#### 3.7.1 Konsentrasi Gel Ekstrak Etanol Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*)

Konsentrasi gel ekstrak kulit buah kakao yang diaplikasikan pada hewan coba tikus dalam sehari sebanyak 100mg/ml (Rahayu *et al.*,2020)

#### 3.7.2 Dosis ketamin

Dosis Ketamin yang digunakan untuk anestesi adalah ketamin 10% dosis 50mg/kg (Hartiningsih & Anggraeni, 2018). Bila dikonversikan untuk tikus coba, maka anestesi ketamin yang digunakan adalah 0,1 ml.

Ketamin 10%	= 10 g/100 ml
	= 10000 mg/ 100 ml
	= 100 mg/ml
Dosis	= (dosis x BB tikus): konsentrasi
Dosis ketamin (BB=200g)	= 50 mg/kg x 0,2 kg: 100mg/ml
	= 0,1 ml

#### 3.7.2 Dosis xylazine

Dosis *xylazine* yang digunakan untuk anestesi adalah *xylazine* 2% dosis 5mg/kg (Hartiningsih & Anggraeni, 2018). Bila dikonversikan untuk tikus coba, maka anestesi *xylazine* yang digunakan adalah 0,05 ml.

<i>Xylazine</i> 2%	= 2 g/100 ml
	= 2000 mg/100 ml
	= 1 mg/ml
Dosis	= (dosis x BB tikus): konsentrasi
Dosis <i>xylazine</i> (BB=200 g)	= 5 mg/kg x 0,2 kg: 20 mg/ml
	= 0,05 ml

sehingga dosis *xylazine* yang digunakan untuk penggunaan pada tikus dengan berat badan 200 gram adalah 0,05 ml.

### 3.7.3 Dosis Plasebo

Gel plasebo merupakan gel pembanding dari suatu kandungan zat yang bersifat netral atau tidak berefek pada jaringan. Gel plasebo yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 4% CMC-Na, garam dari poli-karboksi-metil-eter dari selulosa berwarna putih, tidak berbau, tidak berasa dan tidak berefek pada jaringan. Pembuatan gel plasebo dalam penelitian ini dilakukan dengan menuangkan aquades yang telah diukur menggunakan gelas ukur sebanyak 96 ml ke dalam lumpang. Setelah itu, CMC-Na sebanyak 4 g ditimbang dengan timbangan analitik dan ditaburkan ke dalam lumpang berisi aquades. Campuran tersebut didiamkan sekitar 10-15 menit. Kemudian, aduk dan gerus hingga mengembang dan membentuk gel bening.

### 3.7.4 Dosis Metronidazole

Konsentrasi metronidazole yang digunakan dalam pembuatan gel adalah 2% sehingga perhitungan dalam kebutuhan tablet metronidazole sebagai berikut:

Konsentrasi gel metronidazole	= 2%
1 tablet metronidazole 500 mg	= 500 mg metronidazole + 100 mg campuran tablet
Gel metronidazole yang akan dibuat sebesar 25 gram	= 0.5 gram metronidazole + 24.5 gram CMC Na
Tablet 500 mg yang dibutuhkan	= 1 tablet

## 3.8 Prosedur Penelitian

### 3.8.1 Persiapan Penelitian

Prosedur pertama sebelum penelitian pada hewan coba, dilakukan pengajuan *etical clearance* kepada Komite Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember (No.1760/UN 25.8/KEPK/DL/2022)

Sebelum penelitian, alat yang akan digunakan harus disterilisasi terlebih dahulu. Sterilisasi merupakan proses menghilangkan semua mikroorganisme (bakteria, virus, fungi dan parasit) termasuk endospora dengan bantuan uap tekanan tinggi (autoklaf) atau panas kering (oven) (Prestiandari *et al.*, 2018).

#### 1. Sterilisator Uap Tekanan Tinggi (autoklaf)

Sterilisasi alat ini menggunakan sterilisator uap tekanan tinggi (autoklaf) dengan suhu 121°C dan tekanan 106 kPa selama 20 menit untuk alat yang tidak terbungkus dan 30 menit untuk alat yang terbungkus. Sebelum diambil dari sterilisator, semua peralatan dibiarkan hingga kering (Prestiandari *et al.*, 2018).

#### 2. Sterilisator Panas Kering (oven)

Sterilisasi panas kering dengan suhu lebih tinggi hanya digunakan untuk benda-benda berbahan kaca atau logam karena akan melelehkan bahan lainnya. Instrumen diletakkan di dalam oven dengan suhu 170° C, selama 1 jam lalu didinginkan selama 2-2,5 jam atau 160°C selama 2jam (Prestiandari *et al.*, 2018).

#### 3.8.2 Persiapan Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus dengan kriteria inklusi yang sudah ditentukan. Sebelum penelitian, tikus diaklimatisasi dalam ruangan penelitian selama  $\pm$  1 minggu pada suhu kamar. Pada saat aklimatisasi, tikus diberi makan dan minum secara libitium. Setelah dilakukan aklimatisasi, tikus ditimbang berat badannya. Selanjutnya hewan coba dikelompokkan menjadi 3 kelompok secara acak.

#### 3.8.3 Identifikasi Tanaman Kulit Buah Kakao

Uji identifikasi tanaman kulit buah kakao dilakukan untuk mengetahui bahwa jenis yang digunakan berasal dari buah kakao spesies *Theobroma cacao* Linn. Uji identifikasi bertempat di Laboratorium Tanaman Universitas Politeknik Negeri Jember.

#### 3.8.4 Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Buah kakao (*Theobroma cacao* L.) sebanyak 5 kg dicuci terlebih dahulu untuk membuang kotoran yang menempel kemudian dipotong dan dikeluarkan isinya. Kulit buah kakao lalu dipotong kecil seukuran 5 mm setelah dibiarkan pada tempat terbuka hingga kering. Potongan kecil kulit buah kakao yang sudah



dikeringkan dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 50 selama 2x24 jam dengan dibalik setiap 24 jam agar semua sisi dapat terkena panas secara merata. Setelah dioven, kulit buah kakao diblender hingga menjadi serbuk halus dan ditimbang, Kulit buah kakao seberat 5 kg akan menghasilkan 500gram serbuk halus kulit buah kakao. 50gr serbuk kulit buah kakao ditambah 30 ml pelarut etanol 70%, setelah itu diultrasonik selama 9 menit. Setiap 3 menit sekali dilakukan pengadukan sebelum diultrasonik kembali. Hasilnya disaring kemudian filtrat ditampung dan residu yang didapatkan dimasukkan ke dalam wadah gelas serta ditambahkan 300 ml pelarut etanol 70% kemudian diultrasonik kembali selama 9 menit. Filtrat yang didapatkan digabung dengan filtrat yang pertama. Hal ini dilakukan terus menerus hingga total pelarut etanol 70% sebanyak 900ml. Filtrat yang diperoleh kemudian dimasukkan kedalam rotavapor, lalu dipindahkan ke dalam cawan petri dan dimasukkan ke dalam oven untuk diuapkan dengan suhu 40 derajat hingga diperoleh ekstrak dengan berat konstan. Ekstrak yang dihasilkan adalah ekstrak kulit buah kakao dengan konsentrasi 100mg/ml (Rahayu *et al.*, 2020).

#### 3.8.5 Pembuatan Gel Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*)

Pembuatan gel ekstrak kulit buah kakao menggunakan aquades 96 ml yang diukur dengan labu ukur dan dituangkan ke dalam lumpang. Sebanyak 4 gram CMC-Na ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam lumping berisi aquades lalu didiamkan selama 10 hingga 15 menit. Aduk hingga mengembang kemudian digerus hingga menjadi gel berwarna kuning. Timbang campuran CMC-Na tadi dengan aquades yang sudah menjadi gel sebanyak 45 gram kemudian ekstrak etanol kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) konsentrasi 100% sebanyak 5 gram dimasukkan ke dalam lumping dan digerus hingga adonan homogen sehingga didapatkan gel ekstrak etanol kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) dengan konsentrasi 100mg/ml (Rahayu *et al.*, 2020).

#### 3.8.6 Pembuatan Gel Metronidazole

CMC-Na dipersiapkan dengan cara dilarutkan dengan aquades 48 ml diukur menggunakan labu ukur dan dimasukkan ke dalam lumpang. Sebanyak 2 gram Na-CMC ditimbang lalu dimasukkan ke dalam lumping yg diisi aquadest untuk

dikembangkan selama 10-15 menit. Setelah mengembang lalu dilakukan pengadukan hingga gel mengembang. Timbang campuran Na-CMC dengan aquadest yang telah menjadi gel sebanyak 24,5 gram. Penambahan metronidazole sebanyak 0,5 gram sehingga menghasilkan dengan konsentrasi 2%.

### 3.8.7 Pengelompokan Hewan Coba

Hewan coba yang telah diaklimatisasi akan dibagi menjadi 3 kelompok, kelompok I (kelompok kontrol negatif), kelompok II (kelompok kontrol positif), kelompok III (kelompok perlakuan) yang diamati pada hari ke-7 dan ke-14 tiap masing-masing kelompok. Pembagian kelompok sebagai berikut:

- a. Kontrol (-) 7 merupakan kelompok kontrol negatif tikus yang diinduksi *P. gingivalis* selama 14 hari kemudian diaplikasikan topical gel placebo CMC-Na 1% selama 7 hari dan didekaputasi pada hari ke-8.
- b. Kontrol (-) 14 merupakan kelompok kontrol negatif tikus yang diinduksi *P. gingivalis* selama 14 hari kemudian diaplikasikan topical gel placebo CMC-Na 1% selama 14 hari dan didekaputasi hari ke-15.
- c. Kontrol (+) 7 merupakan kelompok kontrol positif tikus yang diinduksi *P. gingivalis* selama 14 hari kemudian diaplikasikan topikal gel metronidazole selama 7 hari dan didekaputasi pada hari ke-8.
- d. Kontrol (+) 14 merupakan kelompok kontrol positif tikus yang diinduksi *P. gingivalis* selama 14 hari kemudian diaplikasikan topical gel metronidazole selama 14 hari dan didekaputasi hari ke-15.
- e. Kelompok Perlakuan 7 merupakan kelompok perlakuan tikus yang diinduksi *P. gingivalis* selama 14 hari kemudian diaplikasikan topikal gel ekstrak kulit buah kakao konsentrasi 100mg/ml selama 7 hari dan didekaputasi pada hari ke-8.
- f. Kelompok Perlakuan 14 merupakan kelompok perlakuan tikus yang diinduksi *P. gingivalis* selama 14 hari kemudian diaplikasikan topikal gel ekstrak kulit buah kakao konsentrasi 100mg/ml selama 14 hari dan didekaputasi pada hari ke-15.

### 3.8.8 Identifikasi dan pembuatan sediaan *P. gingivalis*

Isolat murni *P. gingivalis* pada penelitian ini didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga. Kemudian dilakukan uji identifikasi *P. gingivalis* strain ATCC 33277 yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. *P. gingivalis* ditanam pada media *Nutrient Agar* (NA) untuk pembuatan kultur lalu media NA diinkubasi dalam inkubator dalam keadaan anaerob selama 1x24 jam pada suhu 37C. Kemudian dilakukan pembuatan suspensi dengan cara mengambil *P. gingivalis* dari media kultur menggunakan ose lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 1 ml BHI-B steril. Masukkan ke dalam *desicator*, setelah itu diinkubasi dalam keadaan anaerob selama 1x24 jam pada suhu 37C. Kemudian melakukan pengenceran dengan menambah akuades steril lalu dihomogenkan diatas *sentrifuge* sampai kekeruhannya sebanding  $2,5 \times 10^9$  CFU/ml dengan absorbansi 0,05 dan Panjang gelombang 560 nm menggunakan spektrofotometer (Amanda *et al.*, 2019; Dwiangraini *et al.*, 2013).

### 3.8.9 Tahap Induksi *P. gingivalis*

Sebanyak 24 tikus wistar yang masuk dalam kriteria inklusi dan sudah diaklimatisasi menggunakan *rat dental chair*. Kemudian diinduksi *P. gingivalis* 0,05 ml dengan konsentrasi  $2,5 \times 10^9$  CFU/ml pada intra sulkuler gigi molar 1 rahang atas bagian bukal menggunakan *tuberculine syringe*. Induksi *P. gingivalis* diberikan 3 kali dalam seminggu secara berselang-seling selama 2 minggu hingga didapatkan model tikus gingivitis pada hari ke-14. Tikus dinyatakan gingivitis bila secara klinis tampak kemerahan pada jaringan periodontal, pembesaran margin gingiva, resesi gingiva (Xu *et al.*, 2014)

### 3.8.10 Aplikasi Gel Plasebo, Gel Metronidazole, dan Gel Ekstrak Etanol Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*)

Aplikasi gel plasebo CMC-Na 1%, gel metronidazole, dan gel ekstrak etanol kulit buah kakao dengan konsentrasi 100mg/ml dilakukan sehari sekali pada pagi hari setelah tikus makan. Pengaplikasiannya dilakukan secara topikal dengan menggunakan syringe yang telah dimodifikasi dengan dilepaskan jarumnya dan dipotong ujungnya untuk mempermudah pengaplikasiannya. Pemberian dilakukan selama 7 hari (pada kelompok tikus yang telah diinduksi *P. gingivalis* yang akan diamati pada hari ke-8), dan selama 14 hari (pada kelompok tikus yang telah diinduksi *P. Gingivalis*) yang akan diamati pada hari ke-15.

### 3.8.11 Eutanasia Hewan Coba

Sebanyak 4 ekor tikus wistar pada setiap kelompok (kontrol negatif, kontrol positif, serta kelompok perlakuan) dilakukan eutanasia di hari ke-8 serta hari ke-15 setelah diperoleh tikus model periodontitis dan pemberian topikal gel kelompok kontrol serta kelompok perlakuan. Eutanasia hewan coba dilakukan menggunakan metode injeksi ketamin HCl dengan takaran 0,2 ml/250 gram BB tikus secara intramuskular pada otot paha belakang (Kusumastuti *et al.*, 2014).

### 3.8.12 Pembuatan Sediaan Histologi

Tahap Pembuatan sediaan histologi adalah sebagai berikut (Syafriadi *et al.*, 2008)

#### a. Pengambilan Sampel Jaringan

Pengambilan sampel jaringan dilakukan dengan cara melakukan pemotongan rahang bawah kiri bagian posterior yang diambil dengan melebihi pemotongan jaringan sepanjang 5mm pada bagian mesial dan distal dari sulkus gigi molar pertama. Untuk pembuatan preparat jaringan diambil dengan arah buko-lingual agar bentukan sulkus gigi dapat terlihat dengan jelas. Setelah itu, sampel dimasukkan ke dalam buffer formalin selama 24 jam agar jaringan yang akan diamati tidak rusak, mencegah terjadinya autolisis, mempertahankan morfologi, dan mencegah pertumbuhan jamur dan bakteri. Setelah dilakukan fiksasi, jaringan dicuci dengan air mengalir.

#### b. Dekalsifikasi

Sampel yang telah dimasukkan ke dalam buffer formalin selanjutnya dilakukan dekalsifikasi. Proses dekalsifikasi menggunakan larutan asam formic yang berguna untuk menghilangkan garam-garam kalsium dari jaringan tulang dan gigi sebelum pemotongan sehingga tulang dan gigi menjadi lebih lunak dan memudahkan dalam pemotongan. Tahap dekalsifikasi meliputi:

- 1) Sampel yang telah direndam formalin 10% dicuci dengan air bersih yang mengalir pelan.
- 2) Sampel dimasukkan ke dalam larutan asam formic 10% selama 14 hari dan dilakukan vibrasi setiap hari agar proses dekalsifikasi merata.
- 3) Sampel dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan sisa-sisa bahan dekalsifikasi.

#### c. Pemrosesan Jaringan

Setelah melalui tahap dekalsifikasi, dilanjutkan tahap pembuatan sediaan histologi sebagai berikut:

##### 1. Dehidrasi

Dehidrasi merupakan penarikan air dari dalam jaringan yang telah dimasukkan dalam *embedding cassette* dengan menggunakan alkohol konsentrasi rendah ke tinggi. Tujuan dehidrasi adalah untuk mengubah fase air menjadi minyak. Dehidrasi dimulai dengan alkohol 70% selama 15 menit, 80% selama 1 jam, 95% selama 2 jam, dan 100% selama 3 jam.

##### 2. Clearing

Clearing merupakan proses penjernihan jaringan. Bahan-bahan yang dapat digunakan antara lain: *xylol*, toluene, dan benzene. Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember menggunakan *xylol*. Bahan ini digunakan selama 3 kali masing-masing selama 1 jam, 2 jam, 2 jam.

##### 3. Impregnasi

Impregnasi merupakan proses infiltrasi bahan *embedding* ke dalam jaringan pada suhu 56-60°C. Caranya, jaringan dibungkus dengan kertas saring kemudian dimasukkan ke dalam bahan *embedding* (paraffin TD 56-60°C) sebanyak 3 kali masing-masing 2 jam.

#### 4) *Embedding*

*Embedding* merupakan proses penanaman jaringan dengan arah transversal ke dalam suatu bahan *embedding* yaitu paraffin. Tahapan *embedding* ini antara lain:

- a) Mempersiapkan alat cetak blok paraffin (*base mould*). Alat cetak tersebut terbuat dari logam berbentuk siku-siku yang disusun di atas permukaan kaca yang rata. Kemudian, alat cetak diolesi gliserin untuk mempermudah pemisahan alat cetak dan kaca dengan blok paraffin.
- b) Menuangkan paraffin cair ke dalam *base mould*, kemudian memasukkan jaringan yang telah diimpregnasi menggunakan pinset. Selanjutnya, ditunggu beberapa menit sampai paraffin beku.
- c) Paraffin blok siap dipotong setelah dilepas dari alat cetakan.

#### 5) *Penyayatan*

Penyayatan blok paraffin dengan menggunakan mikrotom. Sebelum penyayatan jaringan, alat yang perlu dipersiapkan antara lain *object glass* yang diolesi dengan *meyer egg albumin*. Tahapan penyayatan jaringan antara lain:

- a) Penyayatan menggunakan mikrotom, sebelumnya pisau mikrotom dibersihkan dengan kasa atau kertas saring yang dibasahi dengan xylol arah tegak lurus.
- b) Mengatur ketebalan sayatan mikrotom 4-6 $\mu$ m.
- c) Mengambil sayatan yang telah diperoleh dengan kuas, lalu diletakkan diatas permukaan air *waterbath* dengan temperature tetap 56°C-58°C hingga sayatan mekar.
- d) Mengambil sayatan yang sudah mekar dengan *object glass* yang diolesi dengan *meyer egg albumin*, kemudian dikeringkan dengan suhu 30°C-35°C minimal selama 12jam.
- e) Pengecatan preparat jaringan dengan Teknik *Haematoxilin* dan *Eosin*

Teknik pengecatan HE dan *Trichrome Mallory* yang dilakukan adalah sesuai dengan standar rutin dari Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Metode pengecatan preparat jaringan antara lain:

- 1) Deparafinasasi dengan larutan *xylol*, preparat dimasukkan ke dalam *xylol* selama 2-3 menit lalu diulangi dengan memasukkan kembali ke wadah yang berbeda selama 2-3 menit.
- 2) Redehidrasi dengan larutan alkohol 100% dan 95% masing-masing selama 3 menit sebanyak 2 kali dalam wadah berbeda.
- 3) Preparat dibilas dengan air selama 10-15 menit, mula-mula dengan aliran lambat kemudian lebih kuat untuk menghilangkan kelebihan alkohol.
- 4) Preparat diwarnai dengan pewarna Hematoxylin Mayer's selama 15 menit.
- 5) Dibilas ulang dengan air mengalir selama 20 menit.
- 6) Preparat direndam eosin selama 15 detik sampai 2 menit.
- 7) Dehidrasi Kembali dengan konsentrasi meningkat 95% dan 100% masing-masing 3 menit sebanyak 2 kali dalam wadah berbeda.
- 8) Kemudian, Preparat dimasukkan ke dalam *xylol* tiga kali masing-masing 3 menit dengan wadah berbeda.
- 9) Mounting menggunakan cairan entellan lalu ditutup dengan *deck glass*.

Sediaan dilakukan deparafinisasi menggunakan larutan *clearing* dengan cara sediaan dimasukkan ke dalam *xylol* dalam 2 wadah masing-masing selama 3 menit. Setelah itu, rehidrasi dilakukan dengan meletakkan sediaan ke dalam alkohol bertingkat 100%, 95%, dan 80% masing-masing selama 3 menit kemudian mencuci sediaan menggunakan air mengalir. Setelah itu, *object glass* direndam ke dalam larutan *weigert's hematoxylin* selama 7 menit, dicuci menggunakan air mengalir selama 10 menit, dan dibilas dengan aquades. *Object glass* selanjutnya direndam ke dalam larutan *acid fuchsin* selama 4 menit dan dicuci menggunakan air mengalir selama 30 detik. Sesudah itu, *object glass* direndam ke dalam larutan *phosphomolybdic-phosphotungstic acid* selama 5 menit lalu direndam ke dalam larutan *aniline blue* selama 12 menit. *Object glass* kemudian dicuci menggunakan air mengalir selama 30 detik dan dibilas dengan aquadest. Selanjutnya *Object glass* dilakukan dehidrasi dengan alkohol bertingkat 95%, dan 100% dan dikeringkan. Tahapan selanjutnya yaitu proses *clearing* pada jaringan dengan cara direndam dalam *xylol* sebanyak 2 kali dalam wadah yang berbeda masing-masing selama 2

menit. Setelah itu, tahapan diakhiri dengan proses *mounting* (Suvik & Effendy, 2012; Murti, 2017).

#### 3.8.13 Pengamatan dan Perhitungan Jumlah Fibroblas dan Sabut Kolagen

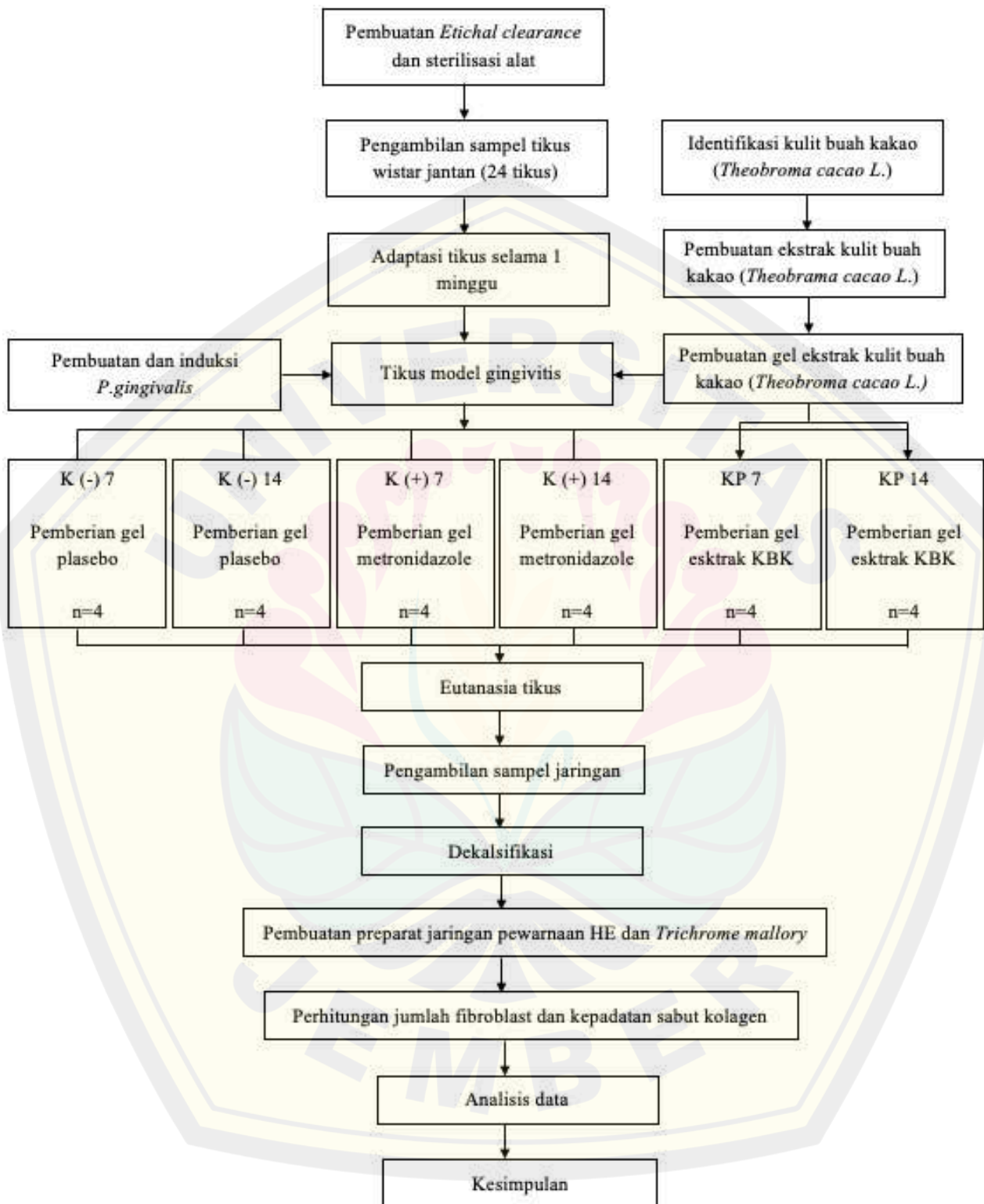
fibroblas pada gingiva tikus yang dihitung merupakan fibroblas muda yang memiliki banyak prosesus sitoplasmik tidak teratur, nukleus bulat besar, berwarna muda, dan sitoplasma penuh dengan retikulum sitoplasmik granuler serta aparatus golgi berkembang dengan baik. Seluruh pengamatan sediaan histologis dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Perhitungan jumlah fibroblas dengan cara melihat 3 lapang pandang sepanjang lamina propia didekat injeksi *p.gingivalis* gingiva tikus, kemudian hasil ketiga lapang pandang setiap pengamat dijumlahkan dan dirata-rata, sehingga didapatkan data jumlah fibroblas dan pengukuran pixel kepadatan kolagen menggunakan *software Adobe Photoshop CS6*.

#### 3.9 Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini kemudian dilakukan analisis statistika menggunakan program *software Statistical Product dan Service Solutions* (SPSS). Data dilakukan uji normalitas dengan *Shapiro-Wilk test* dan uji homogenitas dengan *Levene test*. Penelitian menggunakan uji parametrik *One Way ANOVA* dengan tingkat kepercayaan 95% ( $\alpha=0,05$ ) kemudian uji *LSD (Least Significant Difference)* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok

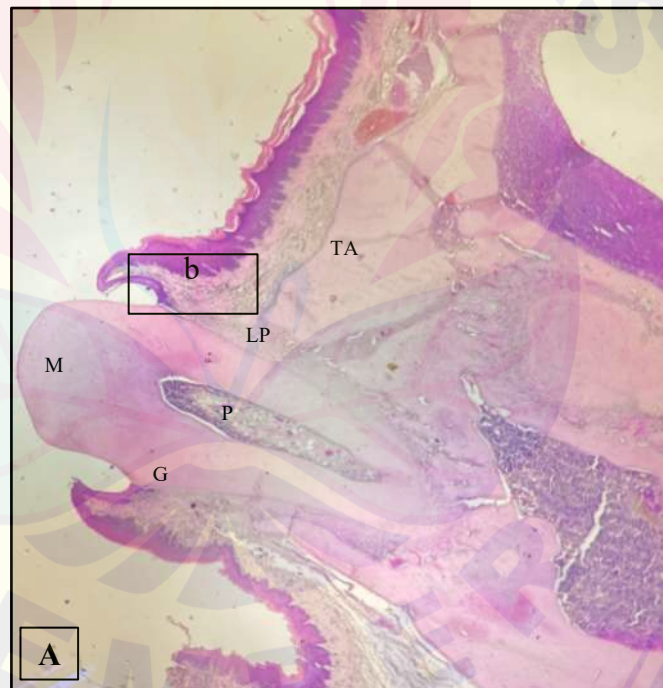


### 3.10 Alur Penelitian

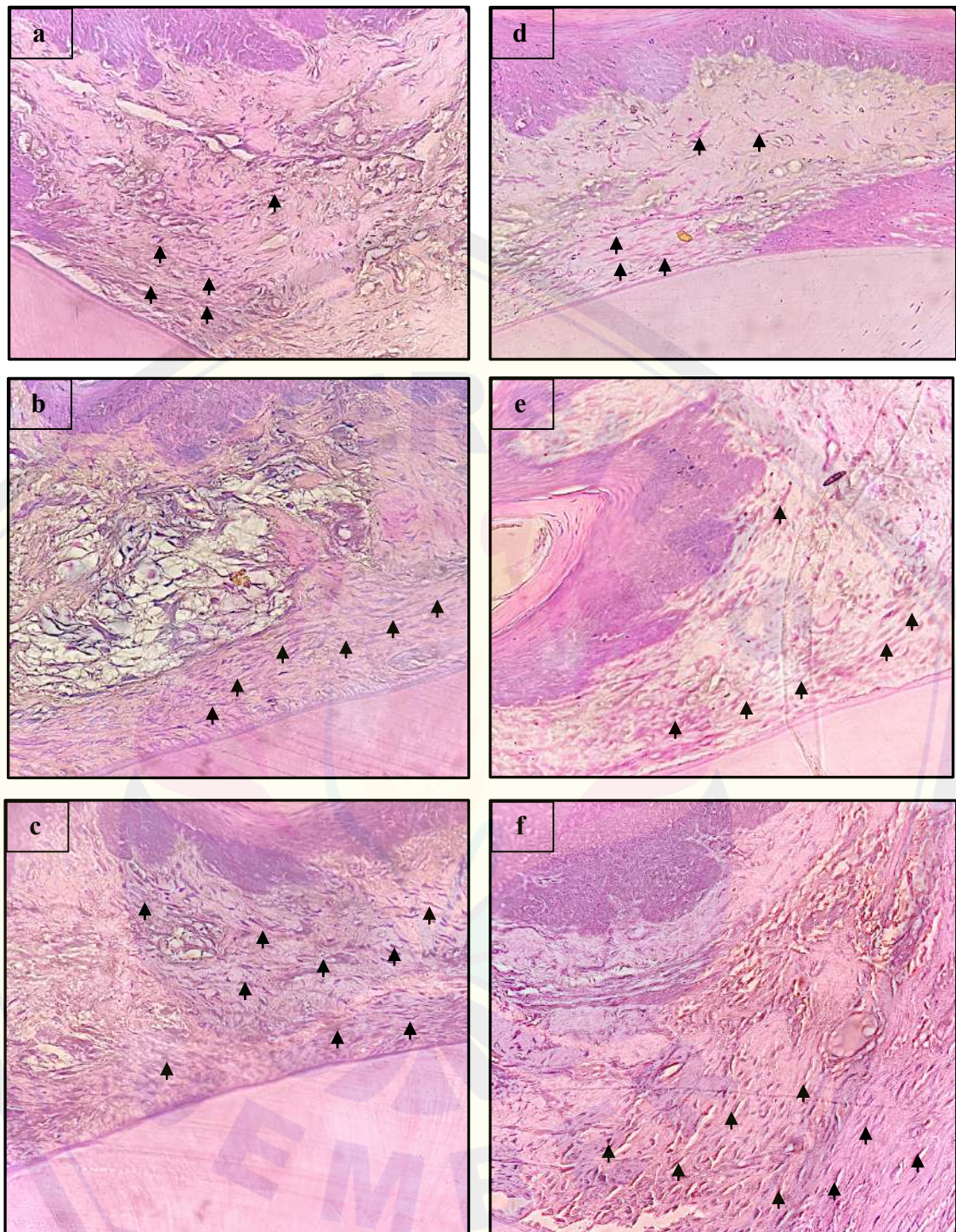


**BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN****4.1 Hasil Penelitian****4.1.1 Fibroblas**

Penelitian ini tentang mengkaji efek pemberian gel ekstrak etanol kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap jumlah fibroblas dan sabut kolagen pada gingiva model tikus gingivitis telah dilaksanakan pada bulan oktober 2022 – Januari 2023 di Laboratorium Biomedik Bagian Histologi dan Fisiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Berdasarkan penelitian diperoleh gambaran histologi dengan pewarnaan *Haematoksin Eosin* (HE) jaringan gigi dengan pembesaran 40x dan 100x tertera pada Gambar 4.1 A dan B. Hasil pewarnaan HE untuk mengamati jumlah fibroblas diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x pada masing-masing kelompok tertera pada Gambar 4.2

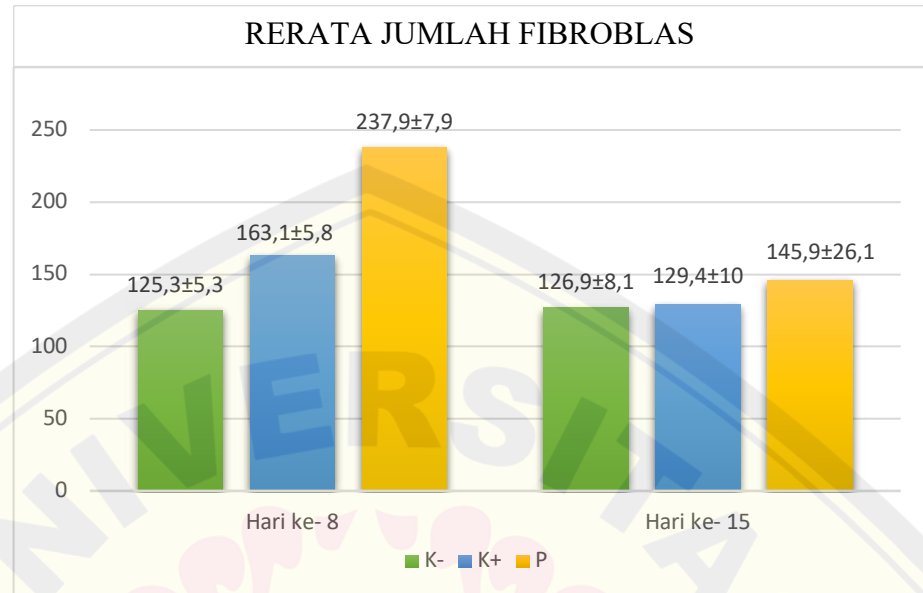


**Gambar 4.1** Gambaran histologi gigi dan jaringan periodontal dengan pewarnaan HE. A) Gambaran histologi gigi dan jaringan periodontal perbesaran 40x. M) Mahkota gigi, G) Gingiva, P) Pulpa, TA) Tulang alveolar, LP) Ligamen periodontal.; a) Gingival Bukal (bagian yang diamati)



**Gambar 4.2** Gambaran histologis Fibroblas dengan pewarnaan HE (400x). a) kelompok kontrol negatif hari ke-7 dengan pemberian gel placebo CMC-Na; b) kelompok kontrol positif hari ke-7 dengan pemberian gel metronidazole;; c) kelompok kontrol perlakuan hari ke-7 dengan pemberian gel ekstrak KBK; d) kelompok kontrol negatif hari ke-14 dengan pemberian gel placebo CMC-Na; e);

kelompok kontrol positif hari ke-14 dengan pemberian gel metronidazole; f) kelompok perlakuan hari ke-14 dengan pemberian gel ekstrak KBK.



**Gambar 4.3** Histogram batang rata-rata jumlah fibroblas gingiva tikus pada hari ke-8 dan hari ke-15

Gambaran histologis gingiva pada Gambar 4.2 menunjukkan bahwa fibroblas ditandai dengan sel berbentuk besar, pipih dan bercabang-cabang, terpulas gelap dengan pewarnaan *Hematoksiilin-Eosin* nampak berwarna ungu pekat, serta inti sel lonjong atau memanjang. Pada kebanyakan sediaan histologi, batas dari sel tidak terlihat secara jelas, maka dari itu inti sel ini merupakan pedoman untuk mengenalinya. Hasil penghitungan rata-rata jumlah fibroblas gingiva yang disajikan pada Gambar 4.3 menunjukkan bahwa jumlah fibroblas paling tinggi pada kelompok gel ekstrak kulit buah kakao dan jumlah fibroblas paling rendah pada kelompok kontrol negatif. Kelompok gel ekstrak kulit buah kakao dan kelompok kontrol positif memiliki jumlah fibroblas yang lebih tinggi daripada kelompok kontrol negatif yang berarti terdapat peningkatan jumlah fibroblas.

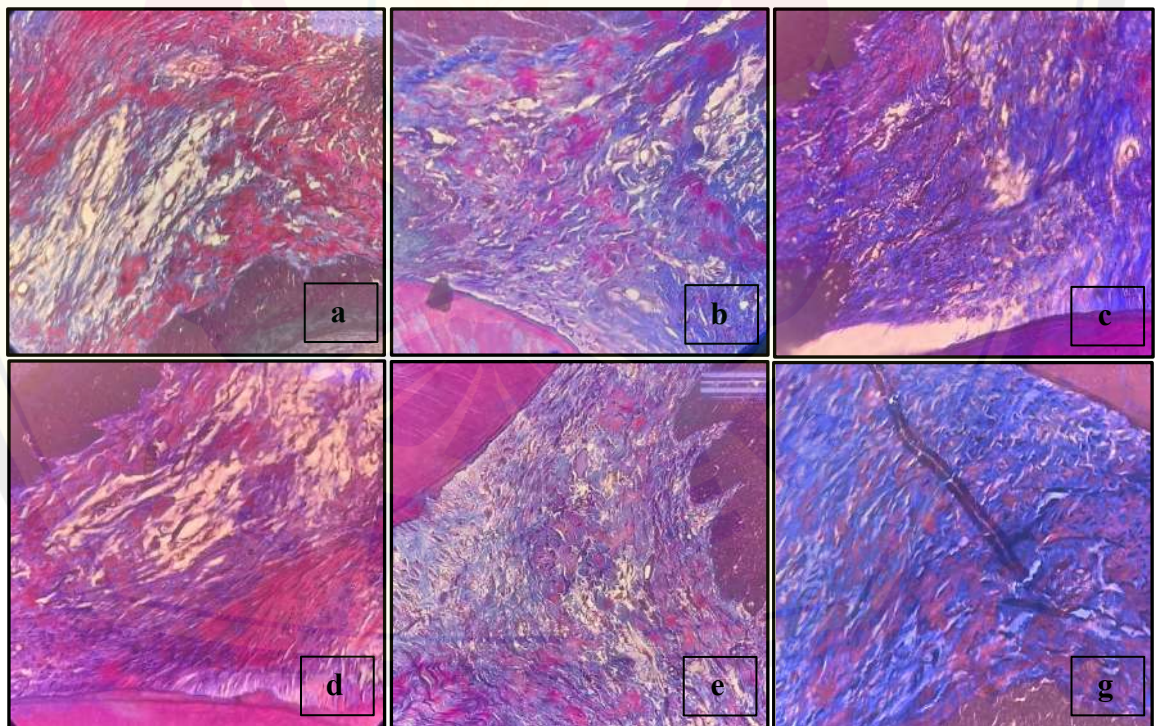
#### 4.1.2 Sabut Kolagen

Gambaran sabut kolagen gingiva tikus dengan pewarnaan *Trichrome Mallory* perbesaran 40x disajikan pada Gambar 4.4. Hasil pewarnaan *Trichrome*

*Mallory* untuk mengamati kepadatan kolagen gingiva tikus dengan perbesaran 400x disajikan pada Gambar 4.5.

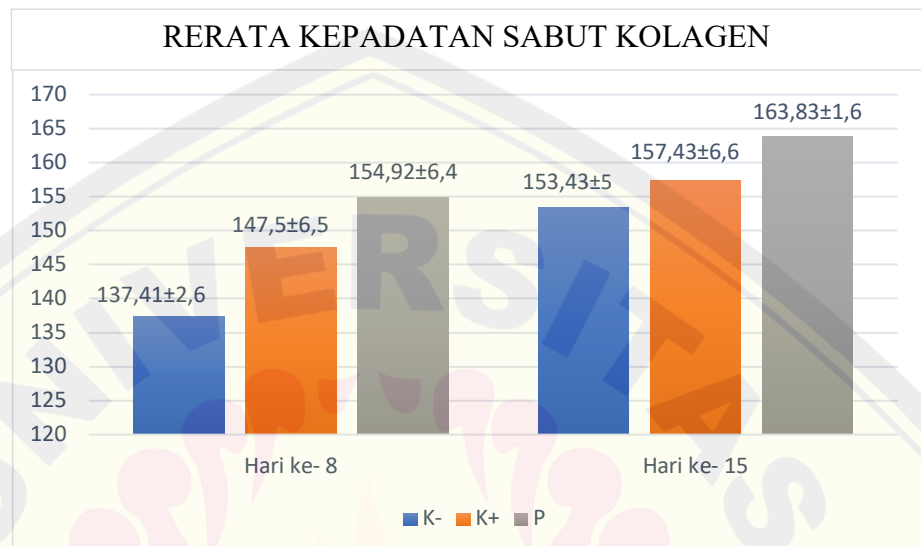


**Gambar 4.4** histologi gigi dan jaringan periodontal dengan pewarnaan *Trichrome Mallory* dan perbesaran 40X pada tikus gingivitis. Keterangan gambar : M) Mahkota gigi, G) Gingiva, P) Pulpa, TA) Tulang alveolar.



**Gambar 4.5** Gambaran histologis sabut kolagen dengan pewarnaan *Trichrome Mallory* (400x). a) kelompok kontrol negatif hari ke-7 dengan pemberian gel

placebo CMC-Na; b) kelompok kontrol positif hari ke-7 dengan pemberian gel metronidazole; c) kelompok perlakuan hari ke-7 dengan pemberian gel ekstrak KBK; d) kelompok kontrol negatif hari ke-14 dengan pemberian gel placebo CMC-Na; e) kelompok positif perlakuan hari ke-14 dengan pemberian gel metronidazole; f) kelompok perlakuan hari ke-14 dengan pemberian gel ekstrak KBK; Tanda panah hitam menunjukkan kolagen yang berwarna biru.



**Gambar 4.6** Histogram rata-rata jumlah kolagen kelompok kontrol negatif, positif dan perlakuan pada hari ke-8 dan ke-15.

Berdasarkan Gambar 4.6, kelompok perlakuan menunjukkan rata-rata kepadatan kolagen yang paling tinggi jika dibandingkan dengan kelompok lain, baik pada hari ke-7 (154,9) maupun hari ke-14 (163,83). Selain itu, menunjukkan bahwa kepadatan kolagen paling tinggi pada kelompok gel ekstrak kulit buah kakao dan kepadatan kolagen paling rendah pada kelompok kontrol negatif. Kelompok gel ekstrak kulit buah kakao dan kelompok kontrol positif memiliki kepadatan kolagen yang lebih tinggi daripada kelompok kontrol negatif yang berarti terdapat peningkatan kepadatan Kolagen.

## 4.2 Analisis Data

### 4.2.1 Fibroblas

Data hasil penelitian dilakukan uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas menggunakan *Levene*. Hasil uji *Shapiro-Wilk* menunjukkan semua data berdistribusi normal dengan nilai signifikansi  $>0,05$ , dan hasil uji *Levene* menunjukkan data homogen dengan nilai signifikansi  $>0,05$ .

Selanjutnya, data dilakukan uji parametrik menggunakan *One-way Anova* untuk mengetahui perbedaan seluruh kelompok. Hasil uji *One-way Anova* disajikan pada Tabel 4.1.

**Tabel 4.3** Hasil uji *One-way Anova* jumlah fibroblas gingiva tikus

	<i>Sum Of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F</i>	<i>Sig.</i>
<b>Between Groups</b>	36068.517	5	7213.703	44.189	.000
<b>Within Groups</b>	2938.423	18	163.246		
<b>Total</b>	39006.940	23			

Hasil uji *one-way Anova* pada Tabel 4.3 menunjukkan bahwa nilai signifikansi  $<0,05$ , yaitu 0,000 yang berarti bahwa terdapat perbedaan signifikan, minimal terdapat satu pasang kelompok yang berbeda signifikan. Kemudian uji berikutnya yaitu *Least Significant Difference* (LSD) untuk mengetahui perbedaan antar dua kelompok yang berbeda, disajikan pada Tabel 4.2 di bawah ini.

**Tabel 4.4** Hasil uji LSD jumlah fibroblas gingiva tikus

	<b>K-7</b>	<b>K+7</b>	<b>P7</b>	<b>K-14</b>	<b>K+14</b>	<b>P14</b>
<b>K-7</b>	-	0.006*	0.006*	1.000	0.787	0.250
<b>K+7</b>		-	0.000*	0.009*	0.086	0.433
<b>P7</b>			-	0.000*	0.000*	0.000*
<b>K-14</b>				-	0.869	0.325
<b>K+14</b>					-	0.913
<b>P14</b>						-

\* :Terdapat perbedaan yang bermakna ( $p \leq 0,05$ )

K-7 :Induksi P. gingivalis + gel CMC-Na selama 7 Hari

K+7 :Induksi P. gingivalis + gel Metronidazole selama 7 hari

P7 :Induksi P. gingivalis + gel Ekstrak Kulit Buah Kakao selama 7hari

K-14 :Induksi P. gingivalis + gel CMC-Na selama 14 hari

K+14 :Induksi P. gingivalis + gel Metronidazole selama 14 hari

P14 :Induksi P. gingivalis + gel Ekstrak Kulit Buah Kakao selama 14 hari

Berdasarkan hasil uji LSD didapatkan nilai signifikan ( $p < 0,05$ ) menunjukkan terdapat perbedaan bermakna antara kelompok K-7 terhadap K+7 dan KP7; antara kelompok K+7 terhadap KP7 dan K-14; antara kelompok KP7 terhadap kelompok K-14, kelompok K+14, kelompok KP14. Sedangkan pada kelompok K-7 terhadap K-14, K+14 dan KP14; antara kelompok K+7 terhadap kelompok K+14, kelompok KP14; antara kelompok K-14 dengan kelompok KP+14, kelompok KP14; antara kelompok K+14 dengan kelompok KP14 tidak terdapat perbedaan bermakna dengan nilai signifikansi ( $p > 0,05$ ). Kelompok yang tidak berbeda signifikan berarti memiliki jumlah fibroblas yang setara. Hal ini menunjukkan bahwa gel ekstrak kulit buah kakao dan gel metronidazole memiliki kemampuan yang setara dalam meningkatkan jumlah fibroblas.

#### 4.2.2 Sabut Kolagen

Data hasil penelitian dilakukan uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas menggunakan *Levene*. Hasil uji *Shapiro-Wilk* menunjukkan semua data berdistribusi normal dengan nilai signifikansi  $> 0,05$ , dan hasil uji *Levene* menunjukkan data homogen dengan nilai signifikansi  $> 0,05$ . Selanjutnya, data dilakukan uji parametrik menggunakan *One-way Anova* untuk mengetahui perbedaan seluruh kelompok. Hasil uji *One-way Anova* disajikan pada Tabel 4.5.

	<i>Sum Of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F</i>	<i>Sig.</i>
<i>Between Groups</i>	1749.262	5	349.852	12.773	.000
<i>Within Groups</i>	493.024	18	27.390		
<b>Total</b>	2242.286	23			



Hasil analisis uji *One Way* ANOVA menunjukkan nilai signifikansi 0,000( $p < 0,05$ ) yang berarti terdapat perbedaan bermakna dari seluruh kelompok kepadatan kolagen hari ke-8 dan ke-15. Analisis kemudian dilanjutkan dengan melakukan uji LSD untuk mengetahui kelompok yang berbeda secara signifikan. Hasil analisis uji LSD disajikan pada Tabel 4.6.

	K-7	K+7	P7	K-14	K+14	P14
K-7	-	0.045*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
K+7		-	0.019*	0.036*	0.004*	0.000*
P7			-	0.762	0.506	0.027*
K-14				-	0.037*	0.014*
K+14					-	0.101
P14						-

\* :Terdapat perbedaan yang bermakna ( $p \leq 0,05$ )

K-7 :Induksi *P. gingivalis* + gel CMC-Na selama 7 hari

K+7 :Induksi *P. gingivalis* + gel Metronidazole selama 7 hari

P7 :Induksi *P. gingivalis* + gel Ekstrak Kulit Buah Kakao selama 7hari

K-14 :Induksi *P. gingivalis* + gel CMC-Na selama 14 hari

K+14 :Induksi *P. gingivalis* + gel Metronidazole selama 14 hari

P14 :Induksi *P. gingivalis* + gel Ekstrak Kulit Buah Kakao selama14 hari

Berdasarkan Tabel 4.6, terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol negatif hari ke-7 terhadap kelompok K+7, KP7, K-14, K+14; antara kelompok K+7 terhadap kelompok KP7, K-14, K+14, KP14; antara kelompok KP7 dan KP14; antara kelompok K-14 terhadap K+14, KP14. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pemberian gel ekstrak kulit buah kakao dapat meningkatkan kepadatan kolagen secara signifikan pada tikus yang diinduksi *P. gingivalis*. Selain itu, terdapat perbedaan yang tidak bermakna antara kelompok kontrol perlakuan hari ke-7 dan kelompok negatif hari ke-14 dan kelompok perlakuan 14 serta kelompok kontrol positif hari ke-14 dan kelompok perlakuan hari ke-14. Hasil tersebut menunjukkan bahwa gel ekstrak kulit buah kakao memiliki pengaruh yang

sama dengan gel placebo dalam meningkatkan kolagen pada tikus yang diinduksi *P. gingivalis*.

### 4.3 Pembahasan

#### 4.3.1 Jumlah Fibroblas

Penelitian ini menganalisis potensi gel ekstrak etanol kulit buah kakao terhadap peningkatan jumlah fibroblas pada gingiva model tikus gingivitis yang diinduksi oleh *P. gingivalis*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa gel ekstrak etanol kulit buah kakao meningkatkan jumlah fibroblas pada gingiva tikus gingivitis setelah induksi *P. gingivalis*. Hal tersebut ditunjukkan dengan rata-rata jumlah fibroblas pada gingiva tikus gingivitis yang diberi gel ekstrak etanol kulit buah kakao lebih tinggi dibandingkan dengan tikus gingivitis yang diberi gel metronidazole dan gel placebo.

Rerata Jumlah fibroblas pada kelompok positif menunjukkan hasil yang lebih tinggi dari kelompok kontrol negatif dengan pemberian gel CMC-Na. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian gel metronidazole dapat meningkatkan jumlah fibroblas, gel metronidazole mengeliminasi *P. gingivalis* dengan mengganggu sintesis DNA dan inti sel bakteri untuk mencegah kolonisasi atau infeksi yang lebih lanjut. Dengan demikian, peradangan dapat terjadi dalam waktu singkat dan diikuti dengan regenerasi jaringan, salah satunya proses proliferasi fibroblas (Wijayanto dan Herawati, 2014; Atiqah *et al.*, 2021).

Tikus gingivitis yang diberi gel ekstrak kulit buah kakao memiliki jumlah fibroblas yang berbeda signifikan ( $p < 0,05$ ) dengan tikus gingivitis yang diberi gel placebo. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian gel ekstrak kulit buah kakao dapat meningkatkan jumlah fibroblas. Kulit buah kakao memiliki kandungan flavonoid, saponin, tannin, alkaloid yang dapat membantu memperbaiki kualitas jaringan ikat dan epitel pada proses penyembuhan. Pada proses penyembuhan dibutuhkan senyawa yang dapat pembentukan kolagen dengan cara memicu proliferasi sehingga terdapat peningkatan jumlah fibroblas. Selain itu, sediaan ekstrak kulit kakao dengan basis gel memiliki kandungan air yang lebih banyak sehingga memiliki efek dingin dan membantu proses penyembuhan luka, sehingga

mendukung proses penyembuhan luka dan perbaikan jaringan (Megawati *et al.*, 2020).

Kandungan flavonoid, saponin, tannin, alkaloid memiliki efek yang dapat berperan dalam terjadinya peningkatan fibroblast dalam jaringan. Mekanisme antiinflamasi pada flavonoid yaitu dengan menghambat kerja enzim siklooksigenase (COX) serta lipoxigenase secara irreversible yang mengakibatkan berkurangnya sintesis mediator inflamasi seperti prostaglandin terutama PGE<sub>2</sub>, protasiklin, tromboksan, dan leukotrin yang menyebabkan waktu dari proses inflamasi yang semakin cepat yang ditandai dengan peningkatan proliferasi fibroblas (Kusumawardhani *et al.*, 2016; Luthfi *et al.*, 2020). Kandungan saponin kulit buah kakao berperan sebagai antiinflamasi dan meningkatkan jumlah fibroblas sehingga memicu vascular endothelial growth factor (VEGF) dan meningkatkan jumlah makrofag yang bermigrasi ke daerah jejas, sehingga meningkatkan produksi sitokin dan mengaktifkan fibroblas. (Kusumawardhani *et al.*, 2016). Saponin menghambat pertumbuhan bakteri dengan masuk ke membran sel secara difusi. Kemudian, saponin akan mengikat sitoplasma sehingga tekanan pada permukaan membran sel menurun. Menurunnya tekanan membran sel menyebabkan terganggunya permeabilitas membran sitoplasma. Kandungan tanin pada kulit buah kakao yang berpotensi sebagai antioksidan dan antibakteri yang berguna untuk menghentikan pendarahan, mempercepat inflamasi serta penyembuhan membran mukosa, dan regenerasi jaringan baru (Deru *et al.*, 2019). Adanya kandungan tanin dapat mempercepat proses penyembuhan dengan memproduksi jumlah fibroblas dan meningkatkan pembentukan pembuluh darah (Hertian *et al.*, 2022).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa jumlah fibroblas pada tikus yang diberi gel ekstrak kulit buah kakao pada hari ke-7 maupun ke-14 tidak berbeda signifikan ( $p < 0,05$ ) dengan tikus gingivitis yang diberi gel metronidazole, yang artinya gel ekstrak kulit buah kakao dan gel metronidazole memiliki kemampuan yang sama dalam meningkatkan jumlah fibroblas. Gel metronidazole mampu mengeliminasi *P. gingivalis* dan mencegah terjadinya inflamasi yang lebih lanjut, sehingga inflamasi terjadi dalam waktu singkat dan dilanjutkan dengan regenerasi

jaringan. Gel ekstrak kulit buah kakao diketahui memiliki efek antiinflamasi dan antibakteri. Pada kulit buah kakao terdapat flavonoid, saponin dan tanin yang dapat mempersingkat proses inflamasi dan mempercepat regenerasi jaringan dengan meningkatkan jumlah fibroblas. fibroblas pada semua kelompok yang di euthanasia pada hari ke-7 lebih tinggi secara signifikan dibandingkan kelompok yang di euthanasia pada hari ke-14. Peningkatan jumlah fibroblas pada hari ke-7 menunjukkan sedang terjadinya proses fibroplasia (Dwita *et al*, 2020). Fibroblas ini kemudian berperan dalam sintesis kolagen yang merupakan unsur utama matriks ekstraseluler yang berguna membentuk kekuatan pada jaringan parut pada luka (Rowan *et al*, 2015). Setelah memasuki hari ke-14, terjadi penurunan jumlah fibroblas. Hal ini diduga terjadi karena fibroblas sudah digantikan oleh matriks kolagen yang mengisi kavitas yang menunjukkan berakhirnya fase proliferasi.

#### 4.3.2 Kepadatan Sabut Kolagen

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok ekstrak kulit buah kakao memiliki rata-rata kepadatan sabut kolagen gingiva yang lebih tinggi dibandingkan kelompok tikus yang diberi gel placebo dan metronidazole dan dibuktikan dengan uji LSD ( $p=0,000$ ) yang menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna. Hal ini dikarenakan ekstrak kulit buah kakao yang memiliki komponen senyawa aktif sebagai antibakteri untuk menghambat pertumbuhan *P. gingivalis*, sehingga proses inflamasi dapat ditekan.

Kelompok tikus yang diberikan metronidazole memiliki rerata kepadatan kolagen yang lebih tinggi daripada tikus dengan gel placebo karena metronidazole merupakan antibakteri yang memiliki spektrum luas yang dapat mematikan bakteri Gram negatif khususnya *P. gingivalis*. Hal tersebut didukung oleh penelitian (Tani *et al*, 2017) yang mengatakan bahwa metronidazole dapat menghambat pertumbuhan *P. gingivalis*. Metronidazole bersifat antibakteri terhadap bakteri anaerob, sehingga efektif untuk penyakit yang disebabkan oleh *P. gingivalis*, yaitu bekerja dengan masuk ke dalam sel bakteri dan bereduksi menjadi produk polar yang menghasilkan 2-hydroxymethyl metronidazole yang akan berikatan dengan DNA bakteri dan mengganggu struktur heliks metronidazole tersebut, lalu

menghambat sintesis asam nukleat dan mengakibatkan kematian sel bakteri (Setiawan *et al.*, 2013; Tani *et al.*, 2017).

Kemampuan kandungan zat-zat aktif dalam ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) dalam meningkatkan kepadatan kolagen disebabkan oleh ada efek antiinflamasi dari flavonoid yang terdiri dari katekin, antosianin dan tanin. Katekin dan antosianin dalam konsentrasi tinggi berperan sebagai agen antiinflamasi bekerja dengan menghambat pelepasan asam arakhidonat dan pelepasan enzim lisosom dari membran dengan memblok jalur siklooksigenase. Tanin yang terkandung dalam ekstrak kulit buah kakao memiliki kemampuan sebagai bahan antibakteri sehingga menghambat pertumbuhan bakteri dan berperan dalam migrasi dan proliferasi fibroblast (Isnadia *Et al.*, 2015). Saponin dapat meningkatkan permeabilitas membran sel bakteri ketika berinteraksi dengan sel bakteri sehingga terjadi hemolisis sel bakteri (Megawati *et al.*, 2020).

Peningkatan kepadatan sabut kolagen rata-rata pada kelompok perlakuan juga disebabkan kemampuan flavonoid terutama kuersetin yang terkandung dalam ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) yang dapat merangsang induksi *transforming growth factor* (TGF- $\beta$ ). TGF- $\beta$  mempunyai peran untuk merangsang kolagenisasi dan TGF- $\beta$  memiliki tiga isoform yakni TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3. TGF- $\beta$  merupakan komponen utama. TGF- $\beta$ 1 ini berfungsi meningkatkan migrasi dan proliferasi fibroblas pada daerah inflamasi. Peningkatan pada sekresi faktor pertumbuhan dapat mempercepat migrasi dan proliferasi fibroblast, selanjutnya fibroblas berperan sangat penting dalam pembentukan kolagen (Isnadia *Et al.*, 2015; Fatimatuzzahro *et al.*, 2021)

### 4.3.3 Korelasi Jumlah Fibroblas dan Kepadatan Sabut Kolagen

Ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) memiliki kandungan senyawa, seperti Flavonoid, saponin, tannin, alkaloid yang dapat meningkatkan proliferasi fibroblas serta dapat meningkatkan kepadatan kolagen (Luthfi *et al.*, 2020). Selain kulit buah kakao, terdapat juga bahan lain seperti metronidazole yang memiliki efek yang sama yaitu dapat meningkatkan proliferasi fibroblas dan dapat memicu matriks ekstraseluler (kolagen) (Atiqah *et al.*, 2021). Hal ini selaras dengan hasil penelitian ini yang menunjukkan tikus gingivitis yang diberi gel ekstrak kulit buah kakao dan metronidazole mengalami peningkatan proliferasi fibroblast yang sangat signifikan ( $P < 0,05$ ). Pada tikus gingivitis yang diberi ekstrak kulit buah kakao dan metronidazole menunjukkan hasil yang serupa yaitu terjadi peningkatan pembentukan kolagen. Peningkatan proliferasi fibroblast akan memicu pembentukan matriks ekstraseluler yaitu kolagen yang digunakan untuk proses antiinflamasi

Pada hasil penelitian ini jumlah fibroblas pada tikus gingivitis yang diberi gel ekstrak kulit buah kakao maupun metronidazole pada hari ke - 7 dan hari ke - 14 tidak terdapat perbedaan yang signifikan ( $P < 0,05$ ). Jumlah fibroblas pada tikus gingivitis hari ke-8 memiliki jumlah yang lebih tinggi dibandingkan di hari ke-15. Hal ini dikarenakan pada hari ke-7 terjadi proses fibroplasia, tetapi pada hari ke-14 terjadi penurunan jumlah fibroblas yang dikarenakan terdapat beberapa sel fibroblas yang digantikan oleh matriks ekstraseluler (kolagen) yang menandai berakhirnya fase proliferasi.

Kepadatan kolagen pada tikus gingivitis yang diberikan gel ekstrak kulit buah kakao maupun metronidazole pada hari ke - 7 dan hari ke - 14 tidak terdapat perbedaan yang signifikan ( $P < 0,05$ ). Kepadatan kolagen pada tikus gingivitis hari ke-8 sampai hari ke-15 terjadi peningkatan. Hal ini dikarenakan terdapat beberapa fibroblas yang sudah menjadi matriks kolagen sehingga terdapat penambahan kepadatan kolagen tiap waktu pengamatan.

Ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) dan metronidazole memiliki kemampuan yang sama untuk meningkatkan jumlah fibroblas dan kepadatan kolagen. Kedua bahan tersebut memiliki efek yang sama dalam proses

penyembuhan salah satunya antiinflamasi. Daya antiinflamasi didapatkan melalui penghambatan enzim *cyclooxygenase* untuk mensintesis mediator inflamasi sehingga proses inflamasi akan segera berhenti dan memasuki fase selanjutnya. Di samping itu, aktivitas inflamasinya juga dapat merangsang makrofag dalam menghasilkan sitokin dan *growth factor* seperti IL-4 dan TGF- $\beta$  yang dapat menginduksi fibroblas untuk berproliferasi setelah fase inflamasi berhenti (Haris M, Panickal 2017). Substansi hasil proliferasi fibroblas yang paling berperan dalam penyembuhan adalah kolagen. Kolagen berperan sebagai komponen kunci penyembuhan luka, karena merupakan protein utama matriks ekstraseluler yang berguna membentuk kekuatan pada jaringan parut dan sebagai rangka struktural pada jaringan (Brahman *et al.*, 2007)



## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini yaitu gel ekstrak etanol kulit buah kakao (*Theobroma cacao L*) pada hari ke-7 dan ke-14 efektif dalam meningkatkan jumlah fibroblas dan kepadatan kolagen pada gingiva tikus pasca induksi *P. gingivalis*.

### 5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian tentang variasi dosis dari gel ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao L*) yang dapat meningkatkan fibroblas gingiva tikus pasca induksi *P.gingivalis*
2. Perlu dilakukan penelitian tentang pemberian ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao L*) dengan waktu yang lebih lama, sehingga dapat diketahui jumlah fibroblas dan peningkatan sabut kolagen gingiva pada tikus yang telah diinduksi *P.gingivalis*.



## DAFTAR PUSTAKA

- Amanda, E. A., Oktiani, B. W. dan Panjaitan, F.U. 2019. Efektivitas antibakteri ekstrak flavonoid propolis *Trigona Sp (Trigona thorasica)* terhadap pertumbuhan bakteri *phorphyromonas gingivalis*. *Dentin*. 3(1) : 23-28.
- Ali Taqwim. 2011 Peran fibroblas pada proses penyembuhan luka. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. <https://dentosca.wordpress.com/2011/04/18/peran-fibroblas-pada-proses-penyembuhan-luka/>
- Ardila, C. M., M, A Lopez, dan I. C Guzman. 2010. High resistance against clindamycin, metronidazole and amoxicillin in phorphyromonas gingivalis and aggregatibacter actinomycetesmcomitans isolates of periodontal disease. *Medicine Oral, Patologia oral y Cirugia Bucal*. 4(2): 143-150.
- Ariyati Retno Pratiwi, Hamzah Sahag Zulkarnai . 2020. Penurunan Jumlah Koloni Bakteri *Porphyromonas Gingivalis* Setelah Pemberian Nano Gel Ekstrak *Sida Rhombifolia*. *E-Prodenta Journal of Dentistry*. 4(1): 302-306.
- Atiqah, A.N., Poetri, A.R. dan Niam, M.H. 2021. The Difference Of Effectivity Between Mangosteen Peel Extract and Metronidazole On Fibroblast Proliferation. *Odonto: Dental Journa*. 8(1) : 80-85.
- Ayndri Nico Prayudo, Okky Novian. 2015. Koefisien Transfer Massa Kurkumin Dari Temulawak. *Jurnal Ilmiah Widya Teknik*. 14(1).
- Azah, N.I., Muchtarichie, R. & Iskandar, Y. 2020. Standardization Parameters For Cocoa Pods (*Theobroma cacao L.*). *Jurnal Ilmiah Farmasi*, 16(2): 182–195.
- Bainbridge, P. 2013. Wound healing and the role of fibroblasts. *Journal of Wound Care*, 22(8): 407-412.
- Baek, K. J., Ji,S.,Kim, Y.C., & Choi, Y. 2015. Association Of The Invasion Ability Of Porphyromonas Gingivalis With The Severity Of Periodontitis. *Virulence* 6(3), 274-281.
- Braiman-Wiksman L, Solomonik I, Spira R, Tennenbaum T. Novel insights into wound healing sequence of events. *Toxicologic Path*. 2007;35(6):767-79
- Campos-Vega, R., Nieto-Figueroa, K. H., & Oomah, B. D. 2018. *Cocoa (Theobroma cacao L.) Pod Husk: Renewable Source Of Bioactive Compounds. Trends in Food Science and Technology*, 81, 172–184.
- Choirul Anam, Tri Winarni Agustini, Romadhon. 2014. Pengaruh Pelarut Yang Berbeda Pada Ekstraksi Spirulina Platensis Serbuk Sebagai Antioksidan

- Dengan Metode Soxhletasi *Jurnal Pengolahan dan Bioteknologi Hasil Perikanan*. 3(4), 106-112.
- Collyer, C.A., N.Li. 2011. Gingipains from *Porphyromonas gingivalis*- Complex domain confer diverse functions. *Jurnal Microbiol Immunol* 1(1), 41-58
- Daniel, W. W. dan Cross, C. L. 2018. *Biostatistics: A Foundation For Analysis In The Health Sciences*. Wiley.
- Daniswara, L., & Mujiburohman, M. 2020. Isolasi Senyawa Flavonoid Dari Limbah Kulit Buah Kakao Dengan Variabel Mesh Partikel Dan Suhu Evaporasi. *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia "Kejuangan"*, ISSN 1693-, 141.
- Daniswara, L., & Mujiburohman, M. 2020. *Isolasi Senyawa Flavonoid dari Limbah Kulit Buah Kakao dengan Variabel Mesh Partikel dan Suhu Evaporasi*. 1–4.
- Deru, C. A., Salosso, Y., & Eoh, C. B. 2019. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle*) terhadap Tingkat Kesembuhan dan Kelulushidupan Kepiting Bakau (*Scylla seratta*) yang Dimutilasi. *Jurnal Aquatik*, 2(1): 1-13.
- Diah., Widodorini, T., & Engar N. N., .2018. Perbedaan Angka Kejadian Gingivitis Antara Usia Pra-Pubertas dan Pubertas Di Kota Malang. *Journal of Dentistry* 2(1): 108-115
- Dwita, L.L., Vera R., Aisyah A., Augusta D. R., dan Saufia, R. 2020. Manfaat Ekstrak Etanol Daun Remek Daging (*Hemigraphis colorata W. Bull*) Terhadap Luka Bakar Pada Tikus. *Jurnal Tumbuhan Obat Indonesia*. 13. 32-41. 10.22435/jtoi.v13i1.2823.
- Dwiangraini, R., Pujiastuti, P., & Ermawati, T. 2013. Perbedaan Efektifitas Antibakteri Antara Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) dan Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle L.*) Terhadap *Porphyromonas gingivalis*. *STOMATOGNATIC- Jurnal Kedokteran Gigi*, 10(1), 1–5.
- Eming S, Krieg T, Davidson J. Inflammation in wound repair: Molecular and cellular mechanisms. *J Investig Dermatol*. 2007;127(3):514-25
- Febri Korompot., Krista V. Siagan., Damajanty H.C. Pangemanan., Johanna Khoman. 2019. Efektivitas Tindakan Skeling Terhadap Perawatan Gingivitis Di Rumah Sakit Gigi Dan Mulut Universitas Sam Ra Tulangi Manado. *Jurnal e-Gigi (eG)*, 7(2).
- Fitriyana, N., Arina, Y.M. D., Harmono, H., dan Susilawati, I. 2013. Pemaparan bakteri *porphyromonas gingavalis* mempengaruhi produksi superoksid netrofil. *Journal of Dentomaxillofacial Science*. 12 (3): 152-158 Hariyatmi. (2004).

Kemampuan Vitamin E Sebagai Antioksidan Terhadap Radikal Bebas Pada Lanjut Usia. *Journal MIPA*, 14(1), 52–60.

Giri, I.M.D.S., Wardani, I.G.A.A.K. & Suena, N.M.D.S. 2021. Peran Metabolit Sekunder Tumbuhan Dalam Pembentukan Kolagen Pada Kulit Tikus Yang Mengalami Luka Bakar. , 1(1): 23–29.

Handika, P. P. (2018). *Pengaruh Berbagai Konsentrasi Ekstrak Biji Kakao (Theobroma cacao L.) Terhadap Diameter Zona Hambat Bakteri Staphylococcus Aureus*. Universitas Muhammadiyah Malang

Harismah, K., & Chusniatun. 2016. Pemanfaatan Daun Salam (*Eugenia Polyntha*) Sebagai Obat Herbal Dan Rempah Penyedap Makanan. *WARTA LPM*, 19(2), 110-118.

Hartiningsih, & Anggraeni, D. (2018). Respon Tulang Femur Tikus Osteoporosis yang Mengonsumsi Calcitrol. *Jurnal Sain Veteriner*, 36(1), 1–10.

Henaulu AH, Kaihena M. Potensi antibakteri ekstrak etanol daun kecipir (*psophorcorpus tetragonolobus L.*) Terhadap pertumbuhan Escherichia coli dan staphylococcus aureus in vitro. *Biofaal J.* 2020;1(1): 44-54.

Hertian, R., Muhaimin, M., & Sani K, F. (2022). uji efektivitas ekstrak daun ekor naga (*rhapidohora pinnata (l.f) schott*) terhadap penyembuhan luka sayatan pada mencit putih JANTAN. *Indonesian Journal of Pharma Science*, 3(1), 11-20. Retrieved from <https://online-journal.unja.ac.id/IJPS/article/view/13593>

How, K. Y., Song, K. P., & Chan, K. G. 2016. *Porphyromonas gingivalis*: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. *Frontiers in microbiology*. 7(53).

Isnadia Naba'atin , Melok Aris Wahyukundari, Happy Harmono. 2015. Penambahan Ekstral Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*) Pada Periodontal Dressing Terhadap Kepadatan Kolagen Luka Gingiva Kelinci. *BMKGI Volume 3 No. 2 | Juli-Desember 2015*

Junqueira, L.C.U. dan Mescher, A.L. 2016. *Junqueira's basic histology text and atlas 14th edition*. McGraw-Hill Medical,.

Junqueira LC. *Histologi Dasar Teks dan Atlas*. Jakarta: EGC; 2007.

Karim CAA, Gunawan P, Wicaksono D. 2013. Gambaran Status Gingiva Pada Anak Usia Sekolah Dasar Di SD GMIM Tonsea Lama. *e-GiGi*. 1(2).

Kasiha HE, Kawengian SES, Juliatri. Gambaran tingkat pengetahuan ibu hamil tentang gingivitis di puskesmas Kakaskasen Tomohon. *eG*. 2017;5(2): 166-71.

- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2013. *Laporan Nasional RISKESDAS 2018*. Lembaga Penerbit Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
- Kumar, V., Abbas, A., dan Fausto, N., 2006, *Robbins and Cotran, Pathologic Basis of Disease, 8<sup>th</sup> edition*, Philadelphia: Saunders, hal. 48-85.
- Kusumawardhani, A.D., Kalsum, U. dan Rini, I.S. 2016. Pengaruh sediaan salep ekstrak daun sirih (*Piper betle Linn.*) terhadap jumlah fibroblas luka bakar derajat IIA pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar. *Majalah Kesehatan FKUB*. 2(1) : 16- 28.
- Kusumastuti, E., Handajani, J., Susilowati, H. 2014. Ekspresi COX-2 dan Jumlah Neutrofil Fase Inflamasi pada Proses Penyembuhan Luka Setelah Pemberian Sistemik Ekstrak Etanolik Rosela (*Hibiscus sabdariffa*) (studi in vivo pada Tikus Wistar) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. *Maj Ked Gi. J.* 21(1): 13–19.
- Lalu Mulyawan Mustika Candra, Yayuk Andayan, Dyke Gita Wirasisya. 2021. Pengaruh Metode Ekstraksi Terhadap Kandungan Fenolik Total Dan Flavonoid Total Pada Ekstrak Etanol Buncis (*Phaseolus vulgaris L.*) *J. Pijar MIPA*, 16(3), 397-405.
- Laut, M.M., Ndaong, N., Utami, T., Junersi, M. dan Seran, Y.B. 2019. Efektivitas Pemberian Salep Ekstrak Etanol Daun Anting–Anting (*Acalypha Indica Linn*) Terhadap Kesembuhan Luka Insisi Pada Mencit (*Mus Musculus*). *Jurnal Kajian Veteriner*. 7(1) : 1-11.
- Luthfi, M., Juliastuti, W.S., Risky, Y.A., Wijayanti, E.H., Rachmawati, A.E. dan Asyhari, N.P.O. 2020. Expression of fibroblast cells after extraction of wistar rat teeth after topical application of okra fruit (*Abelmoschus esculentus*) gel. *Infectious disease reports*. 12(1) : 40-43.
- Megawati, S. and Kurniasih, D., 2020. Uji Efektivitas Gel Ekstrak Etanol 96% Daun Singkong (*Manihot Esculenta Crantz.*) Pada Penyembuhan Luka Sayat Kelinci Jantan Galur New Zealand White. *Jurnal Farmagazine*, 7(1), pp.1-12.
- Malangngi, L., Sangi, M. & Paendong, J. 2012. Penentuan Kandungan Tanin Dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Biji Buah Alpukat (*Persea Americana Mill.*). *Jurnal Mipa*, 1(1): 5.
- Mercandetti M, Cohen A. 2002. Wound Healing and Repair. *E Medicine*.
- Mescher, Anthony L. 2018. *Junqueira’s Basic Histology Text and Atlas*. 15<sup>th</sup> ed. New Yorks: Mc Graw-Hill Education. 109-110.

- Morten Enersen, Kazuhiko Nakano, Atsuo Amano. 2013. Porphyromonas gingivalis fimbriae. *Journal of Oral Microbiology* 2013, 5: 20265 - <http://dx.doi.org/10.3402/jom.v5i0.20265>
- Naito, M., Hideki, H., Atsushi, Y., Naoya, O., Mikio, S., Hideharu, Y., Koji, N. (2008). Determination of the Genom Sequence of Porphyromonas gingivalis Strain ATCC 33277 and Genomic Comparison with Strain W83 Revealed Extensive Genom Rearrangements in P.gingivalis.
- Nadie Fatimatuzzahro, Peni Pudjiastuti, Renda Shania Alicia. 2021. Potensi Gel Ekstrak cocoon Laba-laba Argiope Modesta 5% Terhadap Jumlah Sel Fibroblas dan Kepadatan Kolagen Pada Penyembuhan Luka Gingiva. *Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Padjadjaran*. Desember 2021;33 (3) : 233-239
- N. Li and C. A. Collyer 2011. Gingipains From Porphyromonas Gingivalis – Complex Domain Structures Confer Diverse Functions. *European Journal of Microbiology and Immunology*, pp. 41–58
- Ni Putu Meilisa Nitawani, Dwi Merry Christmarini Robin, Mei Syafriadi. 2014. Respon Limfosit T Sitotoksik pada gingivitis setelah pemberian kurkumin. *e Jurnal Pustaka Kesehatan*, 2(1).
- Nugroho, S. W., Rukmo, M., Prasetyo, E. A., & Yuanita, T. 2019. Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao*) Streptococcus sanguinis. *Conservative Dentistry Journal*, 9(1), 19–21.
- Nursalam. 2016. Metodologi Penelitian Ilmu Keperawatan Pendekatan Praktis Edisi.4. Jakarta : Salemba Medika.
- Newman, M. G., Takei, H. H., Klokkevold, P. R., & Carranza, F. A. (2019). *Newman and Carranza's Clinical Periodontology* (13th ed.). Elsevier.
- Praptomo, A. J. 2017. *Metodologi riset kesehatan teknologi laboratorium medik dan bidang kesehatan lainnya*. Yogyakarta: Deepubli
- Prasetya, R.C. 2014. Efek pemberian ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana L.*) terhadap jumlah sel fibroblas gingiva pada tikus wistar jantan dengan periodontitis. *Proceding Ikatan Periodonsia Indonesia Surabaya*. 1(1): 82-86.
- Pratama, R. N, I Wayan R, W., & Luh Putu T, R. 2017. Pengaruh Jenis Pelarut dan Waktu Ekstraksi dengan Metode Soxhletasi terhadap Aktivitas Antioksidan Minyak Biji Alpukat (*Persea americana Mill.*) *Media Ilmiah Teknologi Pangan (Scientific Journal of Food Technology)* Vol. 4 No. 2, 85-93, September 2017.
- Pratiwi, A.R., Hamzah, S.Z. (2020). Penurunan Jumlah Koloni Bakteri Gingivalis Setelah Pemberian Nano Gel Ekstrak Sida Rhombifolia E-Prodenta *Journal of*

Dentistry. 2020. 4(1): 302-306 E-Prodenta Journal of Dentistry. 2020. 4(1): 302-306.

Prayudo, A.N., Novian, O., Setyadi., Antaresti. (2015). Koefisien Transfer Massa Kurkumin Dari Temulawak. Fakultas Teknik. Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya. Jurnal Ilmiah Widya Teknik, Volume 14 Nomor 01 Mei 2015.

Primadina Nova., Basori, A., & Perdanakusuma S, D. 2019. Proses Penyembuhan Luka Ditinjau dari Aspek Mekanisme Seluler dan Molekelur. Qanun Medika Vol. 3 No.1

Prestiandari, E., Hernawati, S., & Dewi, L. R. (2018). Daya Hambat Ekstrak Buah Delima Merah (*Punica granatum* Linn) terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* (The Inhibition of Red Pomegranate Fruit Extract (*Punica granatum* Linn) on The Growth of *Staphylococcus aureus*). *Pustaka Kesehatan*, 6(1), 192. <https://doi.org/10.19184/pk.v6i1.7157>

Rahayu, Y. C., Wulan, A., Dharmayanti, S., & Larasati, A. T. 2020. The Effect of Proanthocyanidin Cocoa Pod Rind Extract (*Theobroma cacao* L.) on MMP-8 Expression in Gingival Tissue of Periodontitis Rats Model. *Denta Jurnal Kedokteran Gigi*. 14(28): 88–93.

Rachmawaty, Mu'nisa, A., & Hasri. 2017. Analisis Fitokimia Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) sebagai Kandidat Antimikroba. *Proceedings of National Seminar*, 667–670.

Ratna Newita Pratama, I Wayan Rai Widarta, Luh Putu Trisna Darmayanti. 2017. Pengaruh Jenis Pelarut dan Waktu Ekstraksi Dengan Metode Soxhletasi Terhadap Aktivitas Antioksidan Minyak Biji Alpukat (*Persea americana* Mill.). *Media Ilmiah Teknologi Pangan (Scientific Journal of FoodTechnology)*, 4(2), 85 – 93.

Rohani, S. 2021. Isolation And Characterization Of Wound Healing Compounds From Chloroform Extract Of Binahong Leaves (*Anredera Cordifolia* (Ten.) Steenis). *Magna Medica Berkala Ilmiah Kedokteran Dan Kesehatan*, 8(1): 40.

Rowan, M. P., Cancio, L. C., Elster, E. A., Burmeister, D. M., Rose, L. F., Natesan, S., ... Chung, K. K. (2015). Burn wound healing and treatment: Review and advancements. *Critical Care*, 19(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13054-015-0961-2>

Rajan V, Murray R. The duplicitous nature of inflammation in wound repair. *Wound Pract Res*. 2008;16(3):122-9

- Sahriwati. 2016. Optimasi Proses Ekstraksi Minyak Ikan Metode Soxhletasi Dengan Variasi Jenis Pelarut Dan Suhu Berbeda. *JurnalGalung Tropika*, 5 (3), hlmn. 164 - 170
- Samaranayake, L.h. 2012. *Essential Microbiology For Denstistry*. Churchill Livingstone: Elsevier Limited.
- Sari, L. M., Meilawaty, Z., Astuti, P., Shita, A. D. P., Dharmayanti, A. W. S., dan Hamzah, Z. 2021. Potensi ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) terhadap profil leukosit darah tepi model tikus disfungsi ovarium dan periodontitis. *Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Padjadjaran*. 33(1): 44-52.
- Sartini, S., Asri, R. M., & Ismail, I. 2017. Pengaruh Pra Perlakuan Sebelum Pengeringan Sinar Matahari Dari Kulit Buah Kakao Terhadap Kadar Komponen Fenolik Dalam Ekstrak. *Bioma : Jurnal Biologi Makassar*, 2(1), 15–20.
- Siregar, E. B., & Nurbaiti. (2018). Pengaruh Naungan dan Pupuk NPK terhadap Pertumbuhan Bibit Kakao (*Theobroma cacao* L.). *JOM Faperta*, 10(1), 1–9.
- Septiwidyati T. R., E. W. Bachtiar. 2020. The Role of phorphyromonas gingivalis Virulence Factors in Periodontitis Immunopathogenesis. *dentika Dental Journal*, Vol 23, No.1, 2020: 6-12
- Setiawan, A., Lastianny, S. P., Herawati, D., Periodonsia, P. S., Pendidikan, P., Gigi, D., Gigi, F. K., Periodonsia, B., Gigi, F. K., & Mada, U. G. 2013. Efektivitas Aplikasi Madu Murni Terhadap Penyembuhan Jaringan Periodontal Pada Perawatan Periodontal Pada Perawatan Periodontitis Penderita Hipertensi. *Journal Kedokteran Gigi*, 4(4), 228-235.
- Sinthusamran S, Benjakul S, Kishimura H. 2013. Comparative study on molecular characteristics of acid soluble collagens from skin and swim bladder of seabass (*Lates calcarifer*). *Food Chemistry*. 2013;138(4):2435-41.
- Smith, P.C., Martínez, C., Martínez, J. dan McCulloch, C.A. 2019. Role of fibroblast populations in periodontal wound healing and tissue remodeling. *Frontiers in physiology*. 10(270): 1-11.
- Sugiaman VK. Peningkatan Luka di Mukosa Oral Melalui Pemberian Aloe Vera (Linn.) Secara Topikal. *Jurnal Kedokteran Maranatha*; 2011: 11(1): 70–79.
- Sumbayak, E. M. 2016. Fibroblas: Struktur dan Peranannya dalam Penyembuhan Luka. *Jurnal Kedokteran Meditek*, 21(57). Retrieved from <http://ejournal.ukrida.ac.id/ojs/index.php/Meditek/article/view/1169>
- Sumerti, N. (2013). Faktor – faktor yang Berhubungan dengan Perilaku Ibu dalam Deteksi Dini Karies Gigi pada Anak Balita Di Kecamatan Kuta Utara Kabupaten Badung. *Jurnal Kesehatan Gigi*. 1 (1). 1-9.

- Susanty , Fairus Bachmid. 2016. Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi Dan Refluks Terhadap Kadar Fenolik Dari Ekstrak Tongkol Jagung (*Zea Mays L.*). *KONVERSI*, 5(2).
- Suvik & Effendy. 2012. The Use Of Modified Masson's Trichrome Staining In Collagen Evaluation In Wound Healing Study. *Malaysian Journal Of Veterinary Research*, 3(1): 39–47.
- Syafriadi, M., Kusumawardani, B., Setyorini, D., & Joelianto, R. (2008). *Petunjuk Praktikum Patologi Anatomi, Degenerasi dan Radang*. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Tandellin RTC, Sofro ASM, Santoso AS, Soesatyo MHNE, Asmara W. 2006. The Density of collagen fiber in Alveolus Mandibular Bone of Rabbit After Augmentation with Powder Demineralized Bone Matrix Posti Incisivus Extraction. *Mal. Ked Gigi* 39(2):43-44.
- Tani, G. P., P. M. Worwor, dan J. A Khoman. 2017. Uji daya hambat daging buah sirsak (*Annona muricata L.*) terhadap pertumbuhan bakteri *poprhromonas gingvalis*. *PHARMACON Jurnal ilmiah farmasi – UNSRAT* 6(3):99-104
- Thaib C.M., Supartiningsih, Sofwan A. G. 2021. Review Tanaman Obat Yang Mempunyai Efek Penyembuhan Luka Bakar. *Jurnal FARMANESIA* Vol. 8, No. 1, 06/2021
- Tedjasulaksana, R. 2016. Metronidasol sebagai salah satu obat pilihan untuk periodontitis marginalis. *Jurnal Kesehatan Gigi*. 4(1): 19-23.
- Tetti, M. (2014). Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Jurnal Kesehatan*, 7(2), 362–363. <https://doi.org/10.17969/agripet.v16i2.4142>
- Wijayanto, R., D. Herawati, dan Sudiby. 2014. Perbedaan Efektivitas Topikal Gel Asam Hialuronat Dan Gel Metronidazol Terhadap Penyembuhan Jaringan Periodontal Setelah Kuretase Pada Periodontitis Kronis. *Jurnal Kedokteran Gigi*. 5(3): 307-325.
- Winata, E. W., & Yunianta. (2015). Ekstraksi Antosianin Buah Murbei (*Morus alba L.*) Metode Ultrasonic Bath (Kajian Waktu Dan Rasio Bahan : Pelarut). *Jurnal Pangan Dan Agroindustri*, 3(2), 773–783.
- Xu, X. C., Chen, H., Zhang, X., Zhai, Z. J., Liu, X. Q., Qin, A., dan Lu, E. Y. 2014. Simvastatin Prevents Alveolar Bone Loss In An Experimental Rat Model Of Periodontitis After Ovariectomy. *Journal Of Translational Medicine*. 12(1): 284.
- Yuliani, F. & Gazali, F. 2020. Pemanfaatan Kulit Buah Kakao Sebagai Sumber Antioksidan Alami. , 2(4): 6.






Zefanya G. Pontoluli., Johanna A. Khoman., Vonny N.S Wowor. 2021. Kebersihan Gigi Mulut dan Kejadian Gingivitis pada Anak Sekolah Dasar. E-Gigi Volume 9(1): 21-28



## Lampiran

### Lampiran 1 Surat Keterangan *Etichal Clearance*

 <b>KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK) FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS JEMBER (THE ETHICAL COMMITTEE OF MEDICAL RESEARCH FACULTY OF DENTISTRY UNIVERSITY OF JEMBER)</b>	
No.1760/UN25.8/KEPK/DL/2022	
Title of research protocol :	" The Effect Of Cocoa (Theobroma Cacao L.) Fruit Extract Ethanol Gel On The Number Of Gingiva Fibroblasts And Collagen Fibers In Wistar Rats Induced By Phorphyromonas Gingivalis."
Document Approved :	Research Protocol
Principal investigator :	Raikhan Mahadi
Member of research :	-
Physician :	Raikhan Mahadi
Date of approval :	September-Desember 2022
Place of research :	1.Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember 2.Laboratorium Farmestika Fakultas Farmasi Universitas Jember 3.Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga 4. Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember 5.Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember 6.Laboratorium Histologi bagian Biomedik Fakultas kedokteran Gigi Universitas Jember
<p>The Research Ethic Committee Faculty of Dentistry University of Jember States That the above protocol meets the ethical principle outlined and therefore can be carried out.</p> <p style="text-align: right;">Jember, September 04<sup>th</sup> 2022</p> <p style="text-align: right;">Chairperson of Research Ethics Committee Faculty of Dentistry University of Jember</p> <div style="text-align: right;">               (Prof. Dr. Ayu Ratna Dewanti, M.Si)         </div>	

## Lampiran 2 Surat Izin Laboratorium Biomedik



**KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,  
RISET, DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI**

Jalan Kalimantan 37, Kampus Tegal Boto Jember 68121  
Telepon (0331) 333536, 331743 Faksimili (0331) 331991  
Laman [fkg.unej.ac.id](http://fkg.unej.ac.id); email: [fkg@unej.ac.id](mailto:fkg@unej.ac.id)

---

Nomor : 5144/UN25.8/PG/2022  
Perihal : Ijin Penelitian 30 NOV 2022

**Kepada Yth.  
Kepala Laboratorium Biomedik Kedokteran Gigi  
FKG Universitas Jember  
Di -  
Jember**

Dalam rangka penelitian, maka dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan Ijin Penelitian bagi Mahasiswa kami:

1. Nama	: Raikhan Mahadi
2. NIM	: 191610101165
3. Semester/Tahun Akademik	: VII - 2021/2022
4. Fakultas	: Fakultas Kedokteran Gigi
5. Alamat	: Jl. Mastrip Timur No.99-Jember
6. Lokasi Penelitian	: Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
7. Judul Penelitian	: Pengaruh Gel Ekstrak Etanol Kulit Buah Kakao ( <i>Theobroma Cacao L.</i> ) Terhadap Jumlah Fibroblas Gingiva Dan Intensitas Sabut Kolagen Pada Tikus Wistar Yang Di Induksi <i>Phorphyromonas Gingivalis</i>
8. Dosen Pembimbing	: 1. Dr. drg Sukanto. M.Kes 2. drg. Yani Corvianindya R., M.KG
9. Tujuan Penelitian	: 1. Pemeliharaan dan perlakuan hewan coba 2. Penyimpanan bakteri dan pengembangbiakan bakteri 3. Pembuatan preparat dan pengamatan jaringan
10. Alat yang digunakan	: Kandang hewan coba, neraca digital, Petridish, kulkas, Alat cetak <i>paraffin</i> , mikrotom, <i>slide warmer</i> , <i>waterbath</i> , <i>object glass</i> , <i>deck glass</i> , rak pengecatan, mikroskop binokuler, kamera optilab, dll
11. Waktu	: Desember 2022 – Februari 2023

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih



**Dr. drg. Masniari Novita, M.Kes., Sp.OF (K)**  
NIP.196811251999032001



Raikhan Mahadi 3 of 4

## Lampiran 3 Surat Izin Laboratorium Biologi Farmasi dan Farmestika



**KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,  
RISET, DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI**

Jalan Kalimantan 37, Kampus Tegal Boto Jember 68121  
Telepon (0331) 333536, 331743 Faksimili (0331) 331991  
Laman fkg.unej.ac.id, email: fkg@unej.ac.id

---

Nomor : 5143/UN25.8/PG/2022  
Perihal : Ijin Penelitian

30 NOV 2022

**Kepada Yth.  
Dekan Fakultas Farmasi  
Universitas Jember  
Di -  
Jember**

Dalam rangka penelitian, maka dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan Ijin Penelitian bagi Mahasiswa kami:

1. Nama	: Raikhan Mahadi
2. NIM	: 191610101165
3. Semester/Tahun Akademik	: VII - 2021/2022
4. Fakultas	: Fakultas Kedokteran Gigi
5. Alamat	: Jl. Mastrip Timur N0.99 -Jember
6. Lokasi Penelitian	: 1. Lab. Biologi Farmasi F. Farmasi Universitas Jember 2. Lab. Farmasetika F. Farmasi Universitas Jember
7. Judul Penelitian	: Pengaruh Gel Ekstrak Etanol Kulit Buah Kakao ( <i>Theobroma Cacao L.</i> ) Terhadap Jumlah Fibroblas Gingiva Dan Intensitas Sabut Kolagen Pada Tikus Wistar Yang Di Induksi <i>Phorphyromonas Gingivalis</i>
8. Dosen Pembimbing	: 1. Dr. drg Sukanto. M.Kes 2. drg. Yani Corvianindya R., M.KG.
9. Tujuan Penelitian	: 1. Pembuatan ekstrak etanol kulit buah kakao ( <i>Theobroma cacao L.</i> ) 2. Pembuatan gel ekstrak etanol kulit buah kakao ( <i>Theobroma cacao L.</i> )
10. Alat yang digunakan	: 1. Labu ukur, rotary evaporator, ultrasonik, oven, dll 2. Lumpang, alu, cawan petri, dll
11. Waktu	: Desember 2022 – Februari 2023

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih



**Dr. drg. Masniari Novita, M.Kes., Sp.OF (K)**  
NIP.196811251999032001

**Tembusan Yth.**

- Kepala Lab. Biologi Farmasi
- F. Farmasi Universitas Jember
- Kepala Lab. Farmasetika  
F. Farmasi Universitas Jember
- Arsip



Raikhan Mahadi 2 of 4

## Lampiran 4 Surat Izin Identifikasi Tanaman



**KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,  
RISET, DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI**

Jalan Kalimantan 37, Kampus Tegal Boto Jember 68121  
Telepon (0331) 333536, 331743 Faksimili (0331) 331991  
Laman fkg.unej.ac.id, email: [fkg@unej.ac.id](mailto:fkg@unej.ac.id)

---

Nomor : 5142/UN25.8/PG/2022  
Perihal : Ijin Penelitian 30 NOV 2022

**Kepada Yth.  
Kepala UPT Pengembangan Pertanian Terpadu  
Politeknik Negeri Jember  
Di –  
Jember**

Dalam rangka penelitian, maka dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan Ijin Penelitian bagi Mahasiswa kami:

1. Nama : Raikhan Mahadi
2. NIM : 191610101165
3. Semester/Tahun Akademik : VII - 2022/2023
4. Fakultas : Fakultas Kedokteran Gigi
5. Alamat : Jl. Mastrip Timur N0. 99-Jember
6. Lokasi Penelitian : Laboratorium Tanaman Politeknik Negeri Jember
7. Judul Penelitian : Pengaruh Gel Ekstrak Etanol Kulit Buah Kakao (*Theobroma Cacao L.*) Terhadap Jumlah Fibroblas Gingiva Dan Intensitas Sabut Kolagen Pada Tikus Wistar Yang Di Induksi *Phorphyromonas Gingivalis*
8. Dosen Pembimbing : 1. Dr. drg Sukanto. M.Kes  
2. drg. Yani Corvianindya Rahayu, M.KG
9. Tujuan Penelitian : Identifikasi buah kakao (*Theobroma cacao L.*)
10. Alat yang digunakan : Alat Identifikasi Tanaman
11. Waktu : Desember 2022 – Februari 2023

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih.



**Dr. drg. Masniari Novita, M.Kes., Sp.OF (K)**  
NIP.196811251999032001



Raikhan Mahadi 1 of 4

## Lampiran 5 Surat Izin Instalasi Radiologi RSGM Universitas Jember



**KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,  
RISET, DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI**

Jalan Kalimantan 37, Kampus Tegal Boto Jember 68121  
Telepon (0331) 333536, 331743 Faksimili (0331) 331991  
Laman fkg.unej.ac.id, email: [fkg@unej.ac.id](mailto:fkg@unej.ac.id)

---

Nomor : 5145/UN25.8/PG/2022  
Perihal : Ijin Penelitian 30 NOV 2022

**Kepada Yth.  
Direktur Rumah Sakit Gigi dan Mulut  
Universitas Jember  
Di -  
Jember**

Dalam rangka penelitian, maka dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan Ijin Penelitian bagi Mahasiswa kami:

1. Nama : Raikhan Mahadi
2. NIM : 191610101165
3. Semester/Tahun Akademik : VII - 2021/2022
4. Fakultas : Fakultas Kedokteran Gigi
5. Alamat : Jl. Mastrip Timur No.99-Jember
6. Lokasi Penelitian : Instalasi Radiologi RSGM Universitas Jember
7. Judul Penelitian : Pengaruh Gel Ekstrak Etanol Kulit Buah Kakao (*Theobroma Cacao L.*) Terhadap Jumlah Fibroblas Gingiva Dan Intensitas Sabut Kolagen Pada Tikus Wistar Yang Di Induksi *Phorphyromonas Gingivalis*
8. Dosen Pembimbing : 1. Dr. drg Sukanto. M.Kes  
2. drg. Yani Corvianindya R., M.KG
9. Tujuan Penelitian : Mengamati gambaran radiografi resorpsi tulang alveolar pada tikus
10. Alat yang digunakan : Dental X-Ray
11. Waktu : Desember 2022 – Februari 2023

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih



**Dr. drg. Masruri Novita, M.Kes., Sp.OF (K)**  
NIP.196811251999032001





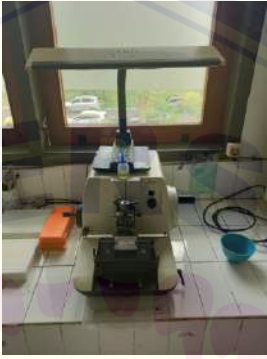













Raikhan Mahadi 4 of 4








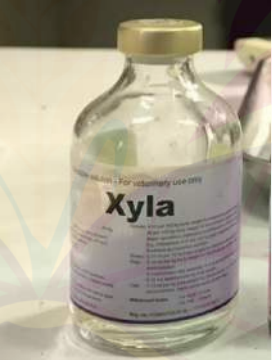

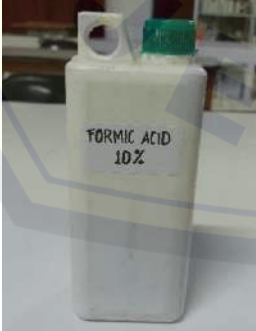
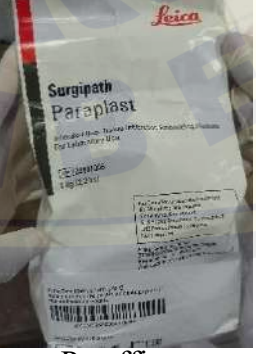

Lampiran 6 Alat Penelitian

 <p>Kandang Tikus</p>	 <p>Tempat makan &amp; minum tikus</p>	 <p>Rat dental chair</p>
 <p>Handsocon</p>	 <p>Neraca digital</p>	 <p>Artery clamp</p>
 <p>Pinset Berkerat</p>	 <p>Sonde half moon</p>	 <p>Excavator</p>
 <p>Disposable syringe</p>	 <p>Lumpang dan alu</p>	 <p>Rotary evaporator</p>
 <p>Gelas ukur</p>	 <p>Oven</p>	 <p>Beaker glass</p>

 <p><i>Ultrasonic</i></p>	 <p><i>Base mould</i></p>	 <p><i>Cassette</i></p>
 <p><i>Automatic tissue processing</i></p>	 <p><i>Mikrotom (Leica)</i></p>	 <p><i>Waterbath (Memmert®)</i></p>
 <p><i>Slide warmer (Sakura)</i></p>	 <p><i>Deck glass (Thermo®)</i></p>	 <p><i>Object glass (Sail®)</i></p>
 <p><i>Rak pengecatan</i></p>	 <p><i>Corong</i></p>	 <p><i>Pipet</i></p>
 <p><i>Rak pengecatan</i></p>	 <p><i>Mikroskop</i></p>	



Lampiran 7 Bahan Penelitian

		
<p>Kulit buah kakao</p>	<p>Alvogyll</p>	<p>Pakan</p>
		
<p>CMC-Na</p>	<p>Aquadest steril</p>	<p>Alkohol 70%</p>
		
<p>Ketamin</p>	<p>Xylazin</p>	<p>Buffer formalin</p>
		
<p>Asam formiat 10%</p>	<p>Paraffin</p>	<p>Entellan</p>



Xylol dan Alkohol



*Masson's Trichrome*

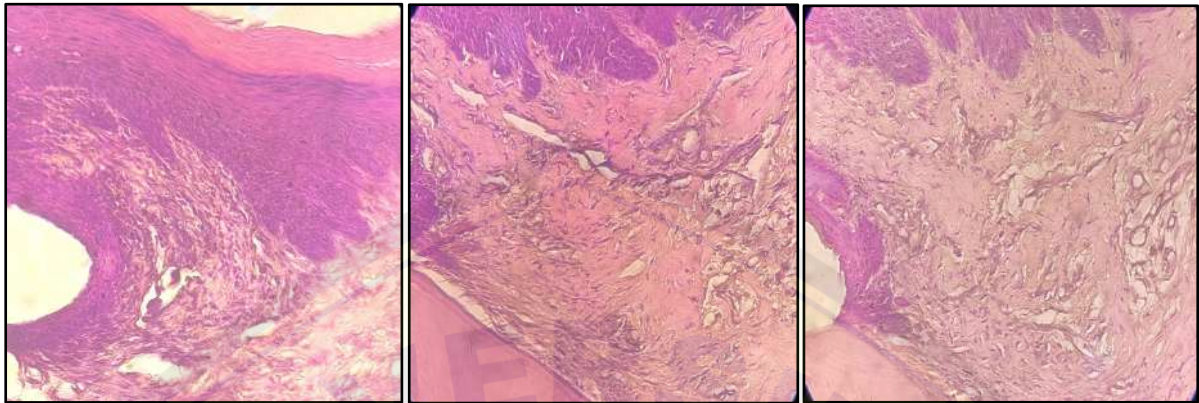


## Lampiran 8 Hasil Perhitungan dan Uji Statistik pada Fibroblas

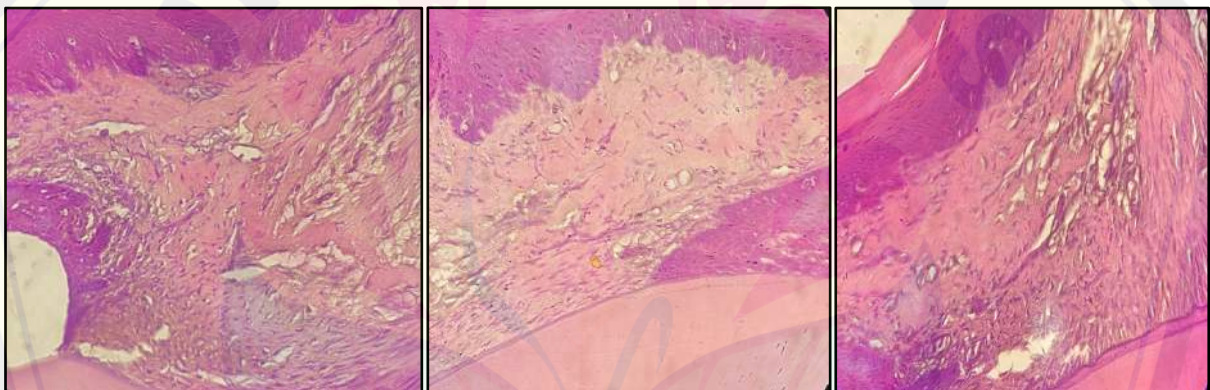
Kelompok		Fibroblas			
		1	2	3	$\bar{x}$
K-7	1	133	131	135	133
	2	123	121	119	121
	3	122	125	120	122,3
	4	127	125	123	125
K+7	1	160	164	162	162
	2	155	157	156	156
	3	165	163	166	164,6
	4	170	171	169	170
P7	1	230	232	230	230,6
	2	248	250	249	249
	3	235	233	236	234,6
	4	240	237	236	237,6
K-14	1	121	125	126	124
	2	115	117	119	117
	3	132	130	131	131
	4	136	134	137	135,6
K+14	1	137	137	138	137,3
	2	114	112	116	114
	3	123	123	122	122,6
	4	143	144	145	144
P14	1	165	166	167	166
	2	172	170	171	171
	3	126	125	128	126,3
	4	120	119	123	120,6

**Lampiran 9** Hasil Gambar Penelitian Fibroblas yang telah diinduksi

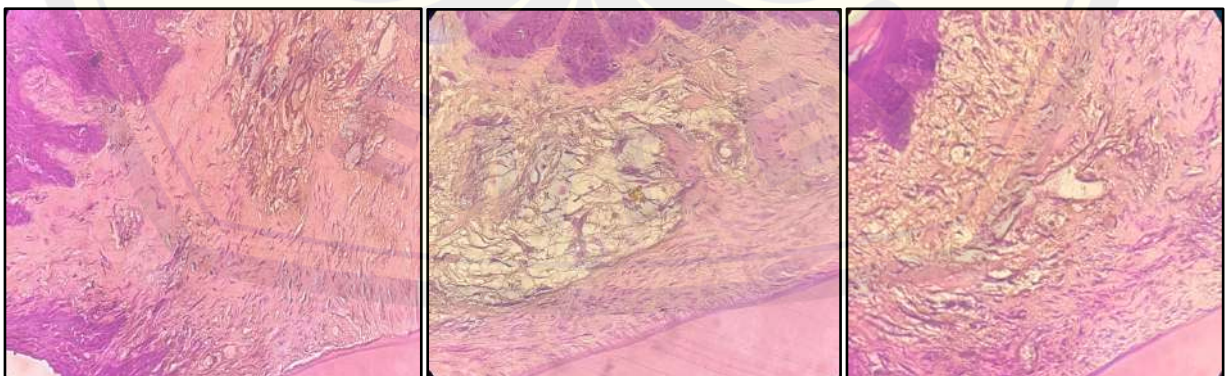
**Gambar 9.1** Kelompok K-7 : Kelompok Negatif (Plasebo) Hari ke-7



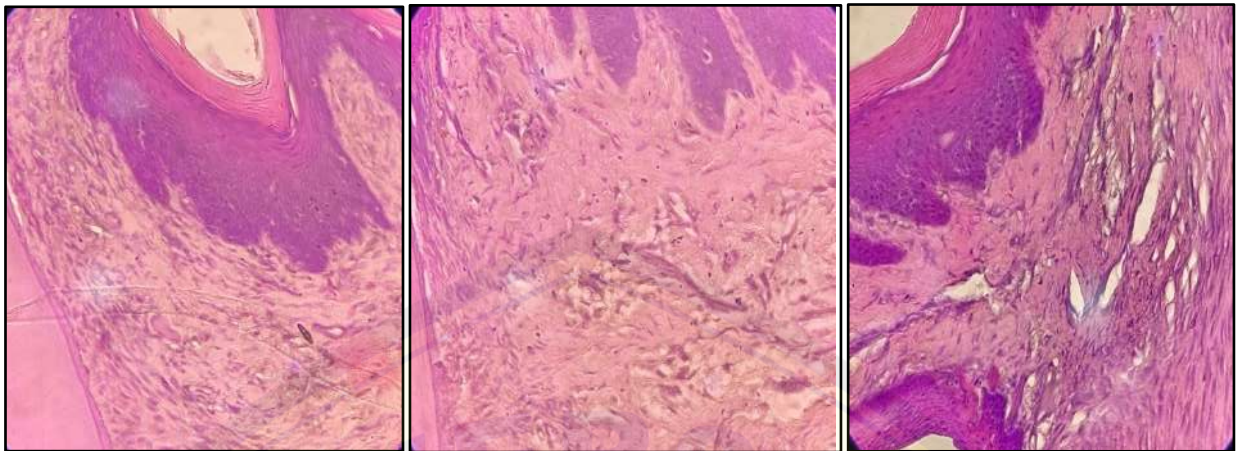
**Gambar 9.2** Kelompok K-14 : Kelompok Negatif (Plasebo) Hari ke-14



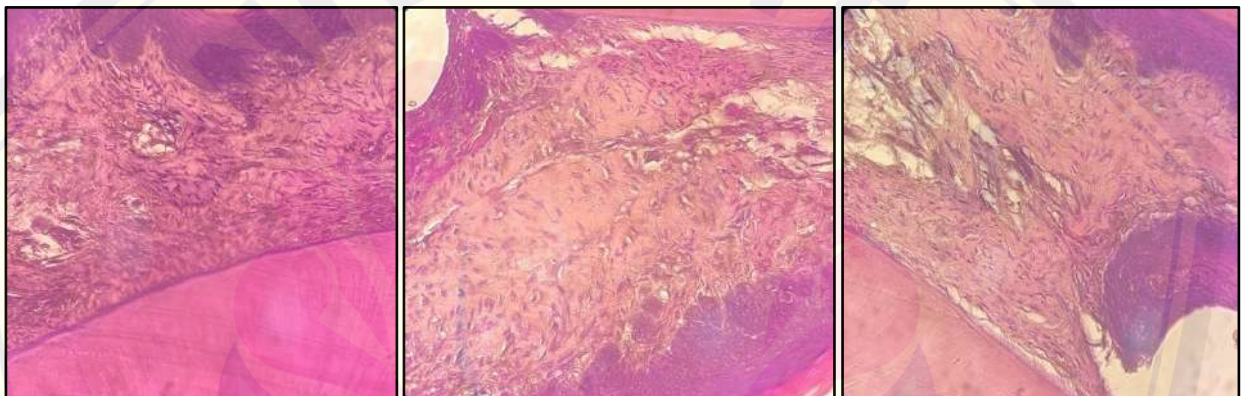
**Gambar 9.3** Kelompok K+7 : Kelompok Positif (Metronidazole) Hari ke-7



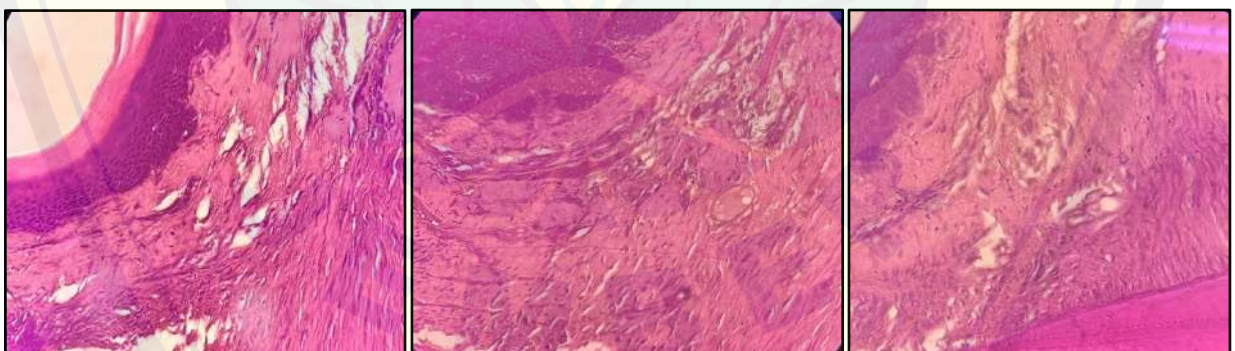
**Gambar 9.4** Kelompok K+14 : Kelompok Positif (Metronidazole) Hari ke-14



**Gambar 9.5** Kelompok KP 7 : Kelompok Perlakuan (KBK) Hari ke-7



**Gambar 9.6** Kelompok KP 14 : Kelompok Perlakuan (KBK) Hari ke – 14

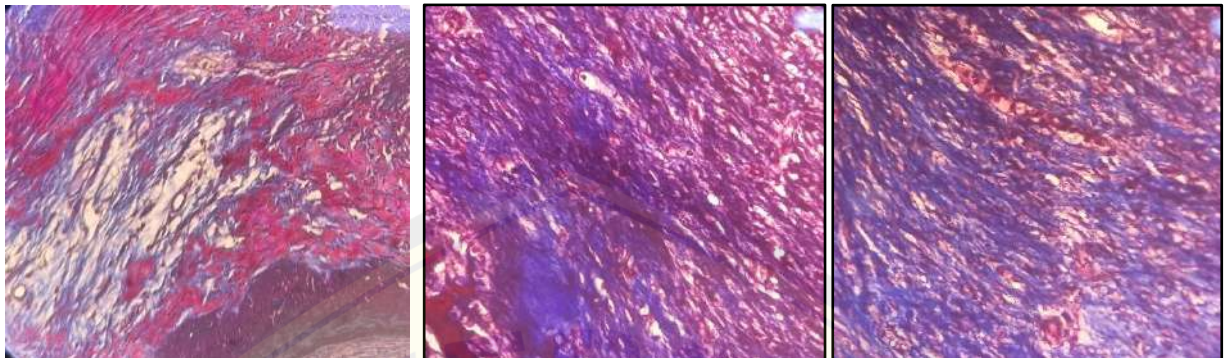


**Lampiran 10** Hasil Perhitungan dan Uji Statistik pada sabut kolagen

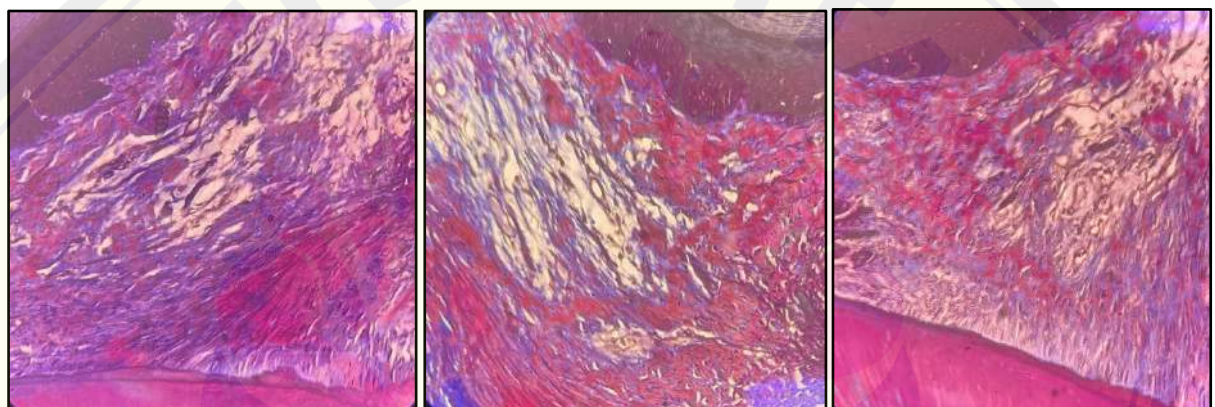
Kelompok		Sabut Kolagen			
		1	2	3	$\bar{x}$
K-7	1	150,59	148,53	121,24	140,12
	2	140,87	138,54	135,55	138,32
	3	139,48	133,51	128,29	133,76
	4	140,63	136,74	134,98	137,45
K+7	1	150,21	144,88	133,19	142,76
	2	153,61	150,56	131,52	145,23
	3	165,53	158,67	139,33	154,51
	4	144,77	135,13	137,46	139,12
P7	1	161,32	152,33	141,99	151,88
	2	179,92	164,25	148,76	164,31
	3	155,39	143,6	150,17	149,72
	4	169,34	143,35	148,65	153,78
k-14	1	149,16	155,08	152,3	152,18
	2	152,31	148,86	141,99	147,72
	3	154,76	164,59	158,91	159,42
	4	160,82	153,7	152,94	155,82
K+14	1	166,42	159,48	138,26	154,72
	2	160,78	158,49	152,36	157,21
	3	151,36	145,23	156,77	151,12
	4	167,16	163,41	169,47	166,68
P14	1	169,89	163,78	160,68	163,45
	2	164,28	159,36	161,73	161,79
	3	165,97	163,11	168,26	165,78
	4	164,87	160,35	167,65	164,78

**Lampiran 11** Hasil Gambar Penelitian SabutKolagen Yang Telah Diinduksi

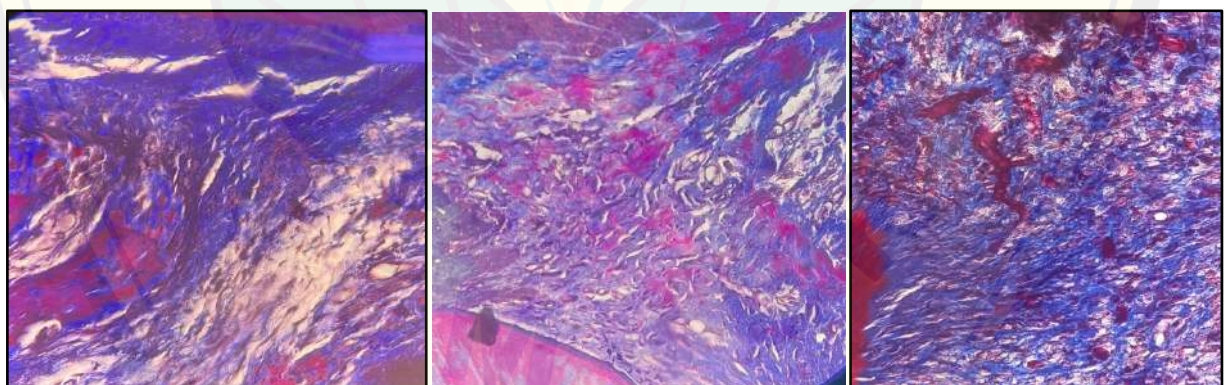
**Gambar 11.1** Kelompok K-7 : Kelompok Negatif (Plasebo) Hari ke-7



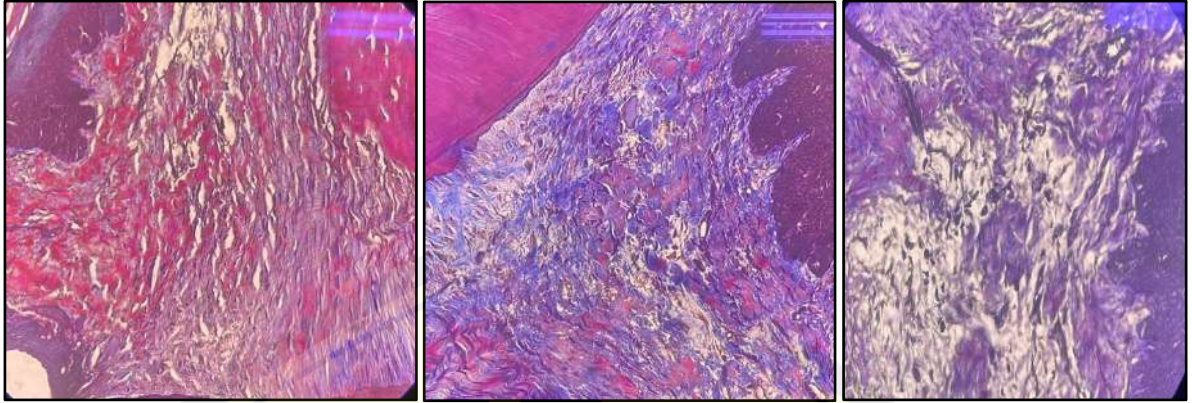
**Gambar 11.2** Kelompok K-14 : Kelompok Negatif (Plasebo) Hari ke-14



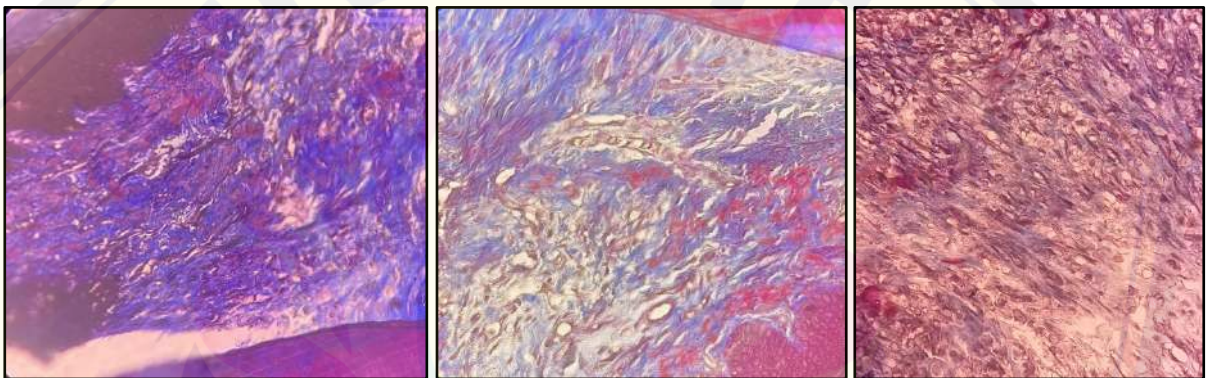
**Gambar 11.3** Kelompok K+7 : Kelompok Positif (Metronidazol) Hari Ke+7



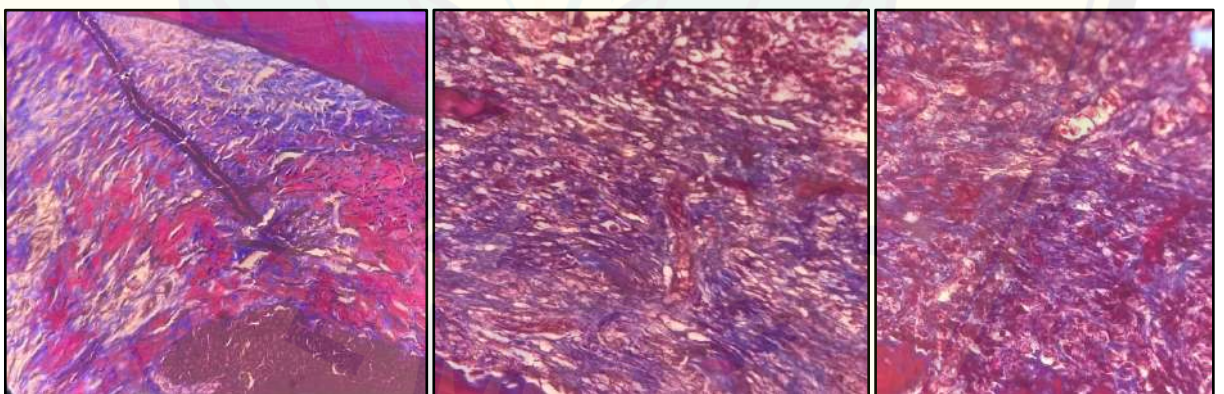
**Gambar 11.4** Kelompok K+14 : Kelompok Positif (Metronidazole) Hari Ke-14



**Gambar 11.5** Kelompok KP 7 : Kelompok Perlakuan (KBK) Hari ke-7



**Gambar 11.6** Kelompok KP 14 : Kelompok Perlakuan (KBK) Hari ke-14





## Lampiran 12. Analisis Data Fibroblas

Tests of Normality							
	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Jumlah Fibroblas	K-7	.274	4	.	.871	4	.300
	K+7	.172	4	.	.996	4	.987
	P7	.268	4	.	.922	4	.546
	K-14	.193	4	.	.978	4	.890
	K+14	.263	4	.	.820	4	.142
	P14	.278	4	.	.826	4	.159

a. Lilliefors Significance Correction

## Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Jumlah Fibroblas	Based on Mean	12.578	5	18	.000
	Based on Median	9.388	5	18	.000
	Based on Median and with adjusted df	9.388	5	11.766	.001
	Based on trimmed mean	11.940	5	18	.000

## ANOVA

ANOVA					
Jumlah Fibroblas	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	36068.517	5	7213.703	44.189	.000
Within Groups	2938.423	18	163.246		
Total	39006.940	23			

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Jumlah Fibroblas

Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K-7	K+7	-37.8250*	9.0345	.006	-66.537	-9.113
	P7	-112.6250*	9.0345	.000	-141.337	-83.913
	K-14	-1.5750	9.0345	1.000	-30.287	27.137
	K+14	-11.6500	9.0345	.787	-40.362	17.062
	P14	-20.6500	9.0345	.250	-49.362	8.062
K+7	K-7	37.8250*	9.0345	.006	9.113	66.537
	P7	-74.8000*	9.0345	.000	-103.512	-46.088
	K-14	36.2500*	9.0345	.009	7.538	64.962
	K+14	26.1750	9.0345	.086	-2.537	54.887
	P14	17.1750	9.0345	.433	-11.537	45.887
P7	K-7	112.6250*	9.0345	.000	83.913	141.337
	K+7	74.8000*	9.0345	.000	46.088	103.512
	K-14	111.0500*	9.0345	.000	82.338	139.762
	K+14	100.9750*	9.0345	.000	72.263	129.687
	P14	91.9750*	9.0345	.000	63.263	120.687
K-14	K-7	1.5750	9.0345	1.000	-27.137	30.287
	K+7	-36.2500*	9.0345	.009	-64.962	-7.538
	P7	-111.0500*	9.0345	.000	-139.762	-82.338
	K+14	-10.0750	9.0345	.869	-38.787	18.637
	P14	-19.0750	9.0345	.325	-47.787	9.637
K+14	K-7	11.6500	9.0345	.787	-17.062	40.362
	K+7	-26.1750	9.0345	.086	-54.887	2.537
	P7	-100.9750*	9.0345	.000	-129.687	-72.263
	K-14	10.0750	9.0345	.869	-18.637	38.787
	P14	-9.0000	9.0345	.913	-37.712	19.712
P14	K-7	20.6500	9.0345	.250	-8.062	49.362
	K+7	-17.1750	9.0345	.433	-45.887	11.537
	P7	-91.9750*	9.0345	.000	-120.687	-63.263
	K-14	19.0750	9.0345	.325	-9.637	47.787
	K+14	9.0000	9.0345	.913	-19.712	37.712

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

Lampiran 13. Analisis Data Kepadatan Kolagen

Tests of Normality							
	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
intensitas kolagen	K-7	.256	4	.	.949	4	.707
	K+7	.261	4	.	.933	4	.611
	P7	.320	4	.	.851	4	.229
	K-14	.158	4	.	.993	4	.974
	K+14	.263	4	.	.929	4	.590
	P14	.160	4	.	.998	4	.994

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances						
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.	
	Based on Median	.676	5	18	.647	
	Based on Median and with adjusted df	.676	5	11.343	.650	
	Based on trimmed mean	.968	5	18	.463	

ANOVA					
intensitas kolagen					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1749.262	5	349.852	12.773	.000
Within Groups	493.024	18	27.390		
Total	2242.286	23			

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: kepadatan kolagen

	(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	K-7	K+7	-7.99250*	3.70069	.045	-15.7674	-.2176
		P7	-17.51000*	3.70069	.000	-25.2849	-9.7351
		K-14	-16.37250*	3.70069	.000	-24.1474	-8.5976
		K+14	-20.02000*	3.70069	.000	-27.7949	-12.2451
		P14	-26.41500*	3.70069	.000	-34.1899	-18.6401
	K+7	K-7	7.99250*	3.70069	.045	.2176	15.7674
		P7	-9.51750*	3.70069	.019	-17.2924	-1.7426
		K-14	-8.38000*	3.70069	.036	-16.1549	-.6051
		K+14	-12.02750*	3.70069	.004	-19.8024	-4.2526
		P14	-18.42250*	3.70069	.000	-26.1974	-10.6476
	P7	K-7	17.51000*	3.70069	.000	9.7351	25.2849
		K+7	9.51750*	3.70069	.019	1.7426	17.2924
		K-14	1.13750	3.70069	.762	-6.6374	8.9124
		K+14	-2.51000	3.70069	.506	-10.2849	5.2649
		P14	-8.90500*	3.70069	.027	-16.6799	-1.1301
	K-14	K-7	16.37250*	3.70069	.000	8.5976	24.1474
		K+7	8.38000*	3.70069	.036	.6051	16.1549
		P7	-1.13750	3.70069	.762	-8.9124	6.6374
		K+14	-3.64750	3.70069	.337	-11.4224	4.1274
		P14	-10.04250*	3.70069	.014	-17.8174	-2.2676
K+14	K-7	20.02000*	3.70069	.000	12.2451	27.7949	
	K+7	12.02750*	3.70069	.004	4.2526	19.8024	
	P7	2.51000	3.70069	.506	-5.2649	10.2849	
	K-14	3.64750	3.70069	.337	-4.1274	11.4224	
	P14	-6.39500	3.70069	.101	-14.1699	1.3799	
P14	K-7	26.41500*	3.70069	.000	18.6401	34.1899	
	K+7	18.42250*	3.70069	.000	10.6476	26.1974	
	P7	8.90500*	3.70069	.027	1.1301	16.6799	
	K-14	10.04250*	3.70069	.014	2.2676	17.8174	
	K+14	6.39500	3.70069	.101	-1.3799	14.1699	

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