



**PENGARUH PROBIOTIK (*Lactobacillus Casei*) TERHADAP JUMLAH SEL
OSTEOKLAS TULANG ALVEOLAR TIKUS WISTAR JANTAN
YANG DIINDUKSI LIPOPOLISAKARIDA**

SKRIPSI

Oleh :
Darra Ayu Nindyasari
NIM 071610101067

**BAGIAN BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2012**



**PENGARUH PROBIOTIK (*Lactobacillus Casei*) TERHADAP JUMLAH SEL
OSTEOKLAS TULANG ALVEOLAR TIKUS WISTAR JANTAN
YANG DIINDUKSI LIPOPOLISAKARIDA**

SKRIPSI

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

Oleh

Darra Ayu Nindyasari
NIM 071610101067

BAGIAN BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2012

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT sumber dari suara hati yang bersifat mulia, sumber ilmu pengetahuan dan sumber dari segala kebenaran yang senantiasa menuntunku dalam setiap langkah dan senantiasa menguatkanmu dalam menghadapi setiap tantangan.
2. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
3. Kedua orangtuaku, Ibunda Nur Hidayatin Ekayani tersayang dan Ayahanda Drs. Muryono S.pd, yang telah memberikan segala hal terbaik dalam hidup ini;
4. Kakak-kakakku tersayang Dian Ayu Novitasari dan Dinda Ayu Novasari S.E, serta kakak iparku H. Win Warsono S.T.Msi yang telah mengisi hari-hari dalam hidup saya;
5. Dosen pembimbing saya drg. M. Nurul Amin, M.Kes, terima kasih telah mengikutsertakan saya dalam penelitian ini, dan memberi saya kesempatan untuk melakukan hal yang terbaik dalam hidup saya, serta drg. Amandia Dewi Permana Shita dan drg. Desi Sandra Sari, MD.Sc, terima kasih banyak atas bimbingan dan bantuan yang diberikan selama ini demi kesempurnaan penulisan skripsi saya.
6. Gilang Wahyu Pratama S.KG terima kasih atas segala cinta, kasih sayang, dukungan, dan doa yang telah diberikan
7. Teman-teman seperjuangan penelitianku, Lintang Nurina S.KG, Endiki Surya Wira Pratama S.KG dan Magestien Yanuaria Miswandar Sheila terimakasih atas kerjasamanya
8. Guru-guruku sejak taman kanak-kanak sampai dengan Perguruan Tinggi yang terhormat, yang telah memberikan ilmu dan membimbing dengan penuh ketulusan dan kesabaran;

MOTTO

Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman di antara kamu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat.

(*Terjemahan Surat Al-Mujadalah Ayat 11*)^{*)}

Peganglah teguh mimpi-mimpimu karena Tuhan akan memeluk erat mimpi-mimpi itu. ^{**)}

Keindahan yang sebenarnya adalah keindahan akhlaq, kecantikan yang sebenarnya adalah kecantikan etika dan kebaikan yang sebenarnya adalah kebaikan akal. ^{***)}

^{*)} Kementrian Agama Republik Indonesia. 1998. *Al-Quran dan Terjemahannya*. Semarang: PT Kumudasmoro Grafindo.

^{**)} Hirata, Andrea. 2005. *Laskar Pelangi*. Yogyakarta: PT Bentang.

^{***)} Aidh. 2004. *Jadilah Wanita Paling Bahagia*. Bandung: Irsyad Baitus Salam.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Darra Ayu Nindyasari

NIM : 071610101067

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Pengaruh probiotik (*Lactobacillus Casei*) terhadap jumlah sel osteoklas tulang alveolar tikus wistar jantan yang diinduksi Lipopolisakarida” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas kesalahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 31 Januari 2012

Yang menyatakan,

Darra Ayu Nindyasari

071610101067

SKRIPSI

**PENGARUH PROBIOTIK (*Lactobacillus Casei*) TERHADAP
JUMLAH SEL OSTEOKLAS TULANG ALVEOLAR
TIKUS WISTAR JANTAN YANG DIINDUKSI
LIPOPOLISAKARIDA**

Oleh

Darra Ayu Nindyasari
NIM 071610101067

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : drg. M. Nurul Amin, M. Kes

Dosen Pembimbing Anggota : drg. Amandia Dewi Permana Shita

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Pengaruh probiotik (*Lactobacillus Casei*) terhadap jumlah sel osteoklas tulang alveolar tikus wistar jantan yang diinduksi lipopolisakarida” telah diuji dan disahkan pada:

hari : Selasa, 31 Januari 2012

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Tim Penguji:

Ketua,

drg. M. Nurul Amin, M.Kes
NIP 197702042002121002

Anggota I,

Anggota II,

drg. Amandia Dewi Permana Shita
NIP 198006032006042002

drg. Desi Sandra Sari, M.D.Sc.
NIP 197512152003122005

Mengesahkan

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember,

drg. Hj. Herniyati, M.Kes
NIP 195909061985032001

RINGKASAN

Pengaruh Pemberian Bakteri Probiotik (*Lactobacillus casei*) terhadap Jumlah Sel Osteoklas Tulang Alveolar Tikus Wistar Jantan yang Diinduksi Lipopolisakarida; Darra Ayu Nindyasari, 071610101067; 2012: 49 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember.

Bakteri merupakan organisme rongga mulut yang dapat mempunyai potensi patogen dan merusak jaringan rongga mulut, contohnya adalah jaringan periodontal. Bakteri gram negatif anaerob memiliki endotoksin biologi aktif atau lipopolisakarida (LPS) yang dapat menyebabkan aktivitas biologis sehingga terjadi peradangan. LPS dapat dideteksi pada plak dan permukaan akar gigi, serta berperan pada patogenesis penyakit periodontal. Osteoklas adalah sel yang berinti banyak yang terlibat dalam proses resorpsi tulang. Berdasarkan hasil penelitian pada kultur sel osteoklas, LPS dapat mempengaruhi jumlah sel osteoklas semakin meningkat pada tulang alveolar.

Probiotik merupakan mikroorganisme hidup yang bersifat menguntungkan bagi yang mengkonsumsinya melalui penyeimbangan mikroflora pencernaan. Bakteri probiotik mampu menstimulasi sistem imun antara lain meningkatkan fungsi fagositosis makrofag, *NK cells*, neutrofil, merangsang sekresi IgM dan meningkatkan produksi IgA, dengan hasil akhir meningkatkan produksi antibodi secara lokal maupun sistemik. *Lactobacillus* lebih umum digunakan sebagai probiotik sebab mudah didapat dan efektif dalam mencegah perlekatan bakteri patogen seperti *Escheria coli* pada sel epitel.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian probiotik (*L.casei*) terhadap jumlah sel osteoklas pada tulang alveolar tikus wistar jantan setelah diinduksi lipopolisakarida (LPS). Hasil penelitian diharapkan dapat dijadikan referensi dalam hal penggunaan bakteri probiotik *Lactobacillus casei* sebagai suatu alternatif penatalaksanaan dan pencegahan keparahan penyakit periodontal.

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian *post test control group design*. Jumlah sampel yang digunakan adalah 32 ekor tikus wistar jantan. Sampel tersebut dibagi menjadi 4 kelompok. Kelompok I (8 ekor) merupakan kelompok kontrol yang tidak diberi perlakuan. Kelompok II (8 ekor) merupakan kelompok perlakuan yang diberi induksi LPS selama 5 hari dan tidak diberi suntikan bakteri probiotik. Kelompok III (8 ekor) merupakan kelompok perlakuan yang diberi induksi LPS dan serta diberikan suntikan bakteri probiotik bersama-sama mulai awal selama 5 hari. Sedangkan kelompok IV (8 ekor) merupakan kelompok perlakuan yang diberi induksi LPS selama 5 hari kemudian dilanjutkan dengan suntikan bakteri probiotik selama 5 hari berikutnya.

Data hasil penelitian dianalisis dengan uji parametrik *one way ANOVA* dan dilanjutkan uji beda Tukey HSD. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri probiotik *L. casei* dapat meningkatkan jumlah sel osteoklas tulang alveolar tikus wistar jantan yang dipapar LPS pada taraf uji 95%. Jumlah sel osteoklas pada kelompok IV (pemberian LPS selama 5 hari dilanjutkan *L. casei* 5 hari berikutnya didapatkan lebih tinggi) daripada kelompok III (pemberian LPS secara bersamaan selama 5 hari) pada taraf uji 95%.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat ditarik kesimpulan bahwa terdapat pengaruh pemberian probiotik *L. casei* yaitu meningkatkan jumlah sel osteoklas tulang alveolar tikus wistar jantan yang diinduksi LPS. Pemberian probiotik secara bersamaan dengan LPS selama 5 hari lebih efektif dalam mencegah meningkatnya jumlah osteoklas tulang alveolar tikus wistar jantan dibandingkan dengan pemberian probiotik yang diberikan 5 hari berikutnya setelah induksi LPS.

PRAKATA

Alhamdulillahirobbilalamin, Puji syukur ke hadirat Allah Swt, atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengaruh probiotik (*Lactobacillus Casei*) terhadap jumlah sel osteoklas tulang alveolar tikus wistar jantan yang diinduksi lipopolisakarida”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada bagian Biologi Kedokteran Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penulis mengucapkan terimakasih yang tak terhingga dan penghargaan yang sedalam-dalamnya atas dukungan moril maupun materiil dari berbagai pihak yaitu:

1. drg. Hj. Herniyati, M.Kes., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
2. drg. M. Nurul Amin, M.Kes., selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah memberikan bimbingan, arahan, dan dukungan moral yang tidak terhingga;
3. drg. Amandia Dewi Permana Shita, selaku Dosen Pembimbing Anggota, terima kasih yang tak terhingga atas segala bantuan, ilmu, motivasi serta kesabaran dalam memberikan bimbingan selama ini.
4. drg. Desi Sandra Sari, M.D.Sc. selaku Sekretaris terima kasih atas segala motivasi serta telah merelakan waktu demi membimbing penyelesaian skripsi ini.
5. drg. Pujiana Endah Lestari, M.Kes. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah menjadi orang tua ku di FKG UNEJ;
6. Orangtuaku tercinta, Ayahanda Drs. Muryono, S.pd dan ibunda Nur Hidayatin Ekayani tersayang, terimakasih atas segala hal terbaik yang tak akan pernah bisa diuraikan dengan kata-kata yang selalu tercurah untukku;
7. Kakakku tersayang Dian Ayu Novitasari, Dinda Ayu Novasari, S.E dan kakak iparku H.Win Warsono, S.T.Msi, terimakasih telah mengisi hari-hari dalam hidupku;

8. Keponakanku tercinta Latisha Putri Kamila dan Muhamad Riffat Alraziq Murpratomo yang telah menghiburku disaat gundah.
9. Gilang Wahyu Pratama S.KG terima kasih atas segala cinta, kasih sayang, dukungan, kesabaran dan doa yang telah diberikan
10. Sahabatku si kembar Dinda Ayu Sukma Pangestuti, Jehan Suci Sukma Saraswati dan sahabat-sahabatku yang menyatu menjadi keluarga besar FKG 2007 serta rekan kerjaku Lintang Nurina S.KG, Magestien Yanuaria Miswandar Sheila, Endiki Surya Wira Pratama S.KG yang telah banyak membantu dalam penelitian ini, terimakasih atas segalanya yang telah membuatku semakin memahami jika hidup itu adalah untuk berbagi bersama dan saling menopang;
11. Analis Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, Sri Wahyuni, A. Md., Agus Murdojohadi, A. Md., Bagus Setiawan, A. Md., Nuraini H., A.Md., yang telah banyak membantu dalam penelitian;
12. Saudara-saudara satu atap di mastrip 2/24, mbak Ina, Adel, Naya,Wiwik, Aras, Anggie terimakasih atas kebersamaan dan motifasinya;
13. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu. Terimakasih atas segala bantuan dan motifasinya.

Penulis menyadari masih banyak kekurangan dan ketidaksempurnaan dalam penulisan Karya Tulis Ilmiah ini. Untuk itu, kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan demi kesempurnaan penulisan selanjutnya. Semoga Karya Tulis Ilmiah ini dapat memberikan manfaat bagi kita semua. Amin.

Jember, 30 Januari 2012

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA.....	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan.....	3
1.3 Manfaat.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	
2.1 Lipopolisakarida (LPS).....	4
2.2 Tulang	5
2.2.1 Definisi dan Komposisi	5
2.2.2 Struktur Anatomi Tulang Alveolar	7
2.2.3 Sel – sel Tulang	8
2.3 Osteoklas dan Osteoblas.....	8
2.3.1 Definisi Osteoblas.....	8
2.3.2 Definisi Osteoklas.....	8

2.4 Mekanisme Kerusakan Tulang	9
2.4.1 Pembentukan Tulang Pada Penyakit Periodontal	12
2.4.2 Pola kerusakan Tulang Pada Penyakit Periodontal	13
a. Resorpsi Tulang Horizontal	13
b. Defek Vertikal dan Angular	14
2.4.3 Regulasi Aktivasi Osteoklas dalam Resorpsi Tulang Alveolar	15
2.5 Probiotik	17
2.5.1 Definisi Probiotik.....	17
2.5.2 <i>Lactobacillus</i>	17
2.5.3 Efek probiotik Terhadap Jaringan Periodontal	18
2.5.4 Efek Probiotik Terhadap tulang Alveolar.....	19
2.6 Kerangka Konseptual Penelitian.....	22
2.7 Hipotesis Penelitian.....	23
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	
3.1 Jenis Penelitian.....	24
3.2 Rancangan Penelitian.....	24
3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian	24
3.4 Populasi dan Sampel Penelitian	24
3.4.1 Populasi Penelitian.....	24
3.4.2 Sampel Penelitian	24
3.5 Identifikasi Variabel Penelitian.....	26
3.5.1 Variabel Bebas.....	26
3.5.2 Variabel Terikat	26
3.5.3 Variabel Terkendali	26
3.6 Definisi Operasional	26
3.6.1 Probiotik	26
3.6.2 LPS	26
3.6.3 Jumlah Sel Osteoklas.....	26

3.7 Bahan dan Alat Penelitian	27
3.7.1 Bahan Penelitian :	27
3.7.2 Alat Penelitian :	28
3.8 Prosedur Penelitian.....	29
3.8.1 <i>Ethical Clearence</i>	29
3.8.2 Persiapan Hewan Coba	29
3.8.3 Pembagian Kelompok Perlakuan.....	30
3.8.4 Persiapan Bahan Perlakuan.....	30
3.8.5 Prosedur perlakuan	31
3.9 Analisis Data.....	36
3.10 Bagan Alur Penelitian	37
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	38
4.1 Hasil Penelitian	38
4.1.1 Analisis Data.....	40
4.2 Pembahasan.....	42
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	45
5.1 Kesimpulan.....	45
5.2 Saran	45
DAFTAR PUSTAKA.....	46
LAMPIRAN.....	50

DAFTAR TABEL

	Halaman
4.1 Hasil perhitungan rerata jumlah sel osteoklas tulang alveolar tikus wistar jantan.....	38
4.2 Hasil uji <i>one way</i> ANOVA terhadap rerata jumlah sel osteoklas tulang alveolar tikus wistar jantan pada perlakuan kontrol, induksi LPS selama 5 hari, induksi LPS dan <i>L. casei</i> secara bersamaan selama 5 hari, serta induksi LPS selama 5 hari dilanjutkan <i>L. casei</i> 5 hari berikutnya.....	40
4.3 Signifikansi uji beda <i>Tukey HSD</i> terhadap rerata jumlah sel osteoklas tulang alveolar tikus wistar jantan.....	41

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1	Morfologi dari sel-sel tulang..... 7
2.2	Aktivitas resorpsi tulang alveolar oleh LPS..... 12
2.3	Gambaran skematik defek tulang..... 15
2.4	Molekul-molekul yang berperan dalam regulasi diferensiasi dan fungsi osteoklas..... 16
2.5	Osteoklas dan mekanisme resorpsi tulang akibat probiotik..... 21
3.1	Bagan Alur Penelitian..... 37
4.1	Daerah perlakuan induksi LPS dan <i>L. Casei</i> (pembesaran 400x)..... 39
4.2	Gambaran mikroskopis sel osteoklas pada berbagai kelompok (pencetakan HE, pembesaran 1000x)..... 39

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Surat keterangan <i>Ethical Clearance</i>	50
B. Hasil Perhitungan Jumlah Sel Osteoklas tulang alveolar.....	51
C. Analisis Data Penelitian.....	54
D. Foto Alat Penelitian.....	58
E. Foto Bahan Penelitian.....	62

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit periodontal merupakan penyakit umum dan tersebar luas di masyarakat, bisa menyerang anak-anak, orang dewasa maupun orang tua. Salah satu bentuk penyakit periodontal adalah peradangan yang menyerang jaringan periodontal, dapat hanya mengenai gingiva yang disebut dengan gingivitis atau mengenai jaringan periodontal yang lebih luas (ligamen periodontal, sementum dan tulang alveolar) yang disebut dengan periodontitis (Kurniawati, 2005). Faktor penyebab utama periodontitis yaitu bakteri plak (Fitria, 2006). Sifat penyakit periodontal ini kurang memberi keluhan rasa sakit, kecuali jika ada komplikasi yang akut, sehingga sering ditemukan dalam keadaan lanjut (Kurniawati, 2005). Bakteri yang paling banyak berperan terhadap timbulnya periodontitis adalah bakteri Gram negatif, diantaranya yaitu *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, dan *Bacteriodes forsythus*. Bakteri Gram negatif anaerob ini, mengeluarkan produk-produk diantaranya endotoksin biologi aktif atau lipopolisakarida (LPS) yang menyebabkan aktivitas biologis sehingga terjadi peradangan (Djais, 2006 dan Fitria, 2006).

Sel-sel dalam tulang yang terutama berperan dalam pembentukan tulang adalah sel osteoblas, Sedangkan sel osteosit merupakan sel osteoblas yang diserap akibat terjadinya proses pertumbuhan pada tulang tersebut, dan osteoklas yang membentuk tulang dan membentuk suatu saluran yang garis tengahnya mungkin sebesar 1mm. Sehingga dalam waktu singkat, jaringan osteoblastik dan matrik tulang organik baru yang merupakan sel induk tulang, yang segera diikuti oleh pengendapan garam-garam kalsium yang timbul diantara dinding ujung tulang yang rusak (Fitria, 2006).

LPS adalah salah satu penyebab terjadinya kelainan periodonsium. Bahan ini merupakan struktur utama dinding sel bakteri Gram negatif yang berfungsi untuk integritas struktur bakteri dan melindungi bakteri dari sistem pertahanan imun *hospes*. LPS bersifat endotoksin yang menginduksi diproduksi faktor lokal yaitu sitokin proinflamatori seperti interleukin- 1α (IL- 1α), IL- 1β , IL-6, *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) dan eikosanoid yaitu prostaglandin (PGE2). Prostaglandin dan sitokin proinflamatori mengakibatkan terjadinya destruksi jaringan periodonsium, dengan cara menstimulasi pembentukan dan peningkatan aktivitas osteoklas serta penurunan jumlah dan aktivitas osteoblas (Indahyani, 2007).

Penelitian Umezu dkk. menunjukkan bahwa tikus yang diinjeksi dengan LPS *E. coli* di daerah mukosa regio molar pertama rahang atas, jumlah dan ukuran osteoklas meningkat dalam setiap penambahan dosis LPS dan menyebabkan resorpsi tulang alveolar. Resorpsi tulang terjadi oleh adanya degradasi struktur kristal hidroksiapatit (HA) dan struktur organik kolagen, akibat pH rendah berkisar $\pm 3,0-4,5$ yang ditimbulkan oleh aktivitas osteoklas (Indahyani, 2007).

Penyakit periodonsium yang diakibatkan oleh LPS menunjukkan terjadinya destruksi tulang alveolar. Apabila penyakit periodontium tersebut terjadi pada masa erupsi, menyebabkan peningkatan osteoklas di tulang alveolar, akibatnya terjadi erupsi premature (Indahyani, 2007).

Probiotik adalah mikroba dari golongan bakteri asam laktat yang bekerja mempertahankan kesehatan *host*. Terdapat lebih dari 100 spesies dan lebih dari 10 milyar bakteri dalam usus manusia. Bakteri probiotik mampu menstimulasi sistem imun antara lain meningkatkan fungsi fagositosis makrofag, *natural killer cell*, monosit dan neutrofil, serta mampu merangsang sekresi IgM dan meningkatkan produksi IgA dengan hasil akhir meningkatkan produksi antibodi secara lokal maupun sistemik. Probiotik juga memiliki kemampuan memperbaiki keseimbangan mikroflora usus, sehingga dapat mempertahankan kesehatan *host* (Endaryanto dan Harsono, 2006; Soebijanto, 2006 dalam Amin dkk., 2010). Kelompok bakteri asam laktat yang dapat digunakan sebagai probiotik antara lain; *Lactobacillus*,

Streptococcus, *Enterococcus*, dan *Bifidobacteria*. *Lactobacillus* lebih umum digunakan sebagai probiotik sebab mudah didapat dan efektif dalam mencegah perlekatan bakteri patogen seperti *Escheria coli* pada sel epitel (Fuller, 1997).

Mendasar pada permasalahan tersebut, maka peneliti ingin mengetahui lebih lanjut tentang pengaruh pemberian probiotik terhadap jumlah sel osteoklas pada tulang alveolar tikus wistar jantan yang diinduksi LPS.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas maka timbul permasalahan, yaitu bagaimanakah pengaruh pemberian probiotik terhadap jumlah sel osteoklas pada tulang alveolar tikus wistar jantan setelah di induksi LPS?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian probiotik terhadap jumlah sel osteoklas pada tulang alveolar tikus wistar jantan setelah diinduksi LPS.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi tentang pengaruh pemberian probiotik terhadap jumlah sel osteoklas pada tulang alveolar tikus wistar jantan setelah di induksi LPS, sehingga masyarakat dapat mengetahui manfaat probiotik yang dapat berperan dalam kesehatan gigi dan mulut khususnya dalam mencegah penyakit periodontal. Serta dapat dijadikan acuan untuk penelitian lebih lanjut.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Lipopolisakarida (LPS)

Lipopolisakarida (LPS) yang disebut juga dengan endotoksin, merupakan sebuah molekul berukuran besar yang mengandung lipid dan karbohidrat. Lipopolisakarida merupakan suprastruktur utama bakteri Gram-negatif dalam membangun integritas struktural bakteri, dan melindungi bakteri dari pertahanan imunitas *host* (Murray dan Wilton, 2003).

Periodontopatogen yang di duga sebagai penyebab penyakit periodontal adalah mikroorganisme Gram negatif. Spesies bakteri Gram negatif ini mempunyai LPS, yang merupakan komponen struktural dari selaput luar bakteri Gram negatif. LPS disebut juga dengan *endotoksin*, yaitu sebuah molekul berukuran besar yang mengandung lipid dan karbohidrat. LPS dapat dideteksi pada plak gigi dan permukaan akar gigi (Kusumawardani, 2005).

Penelitian Simon dkk. dalam Kusumawardani (2005) mengindikasikan bahwa level LPS pada cairan krevikuler gingiva berhubungan dengan peningkatan keparahan gingivitis. Fine dkk. dalam Kusumawardani (2005) menunjukkan bahwa level LPS berkorelasi dengan persentase bakteri Gram negatif pada jaringan periodontal sehat dan periodontitis. Hal ini menunjukkan bahwa LPS mempunyai aktivitas biologis yang berperan pada patogenesis penyakit periodontal.

LPS terdiri dari tiga bagian: rantai samping polisakarida (O); inti polisakarida; dan lipid A. Lipid A biasanya mengandung asam lemak (seperti: *hydroxy-myristic acid*). Inti polisakarida mengandung gula (seperti: KDO, keto-deoxyoctulonate and heptulose). Inti polisakarida yang melekat pada lipid A merupakan bagian yang bertanggung jawab terhadap toksisitas bakteri Gram-negatif (Abbas dan Lichtman, 2001).

Menurut Fuller (1997), bakteri Gram negatif merupakan stimulus efektif dalam produksi derivat sitokin dan makrofag. LPS dan senyawa lain dapat meningkatkan akses ke jaringan gingival, mengawali dan menimbulkan inflamasi yang menyebabkan produksi sitokin pro inflamatori dengan kadar tinggi.

LPS beraksi sebagai *protypical endotoxin*, karena mengikat kompleks reseptor CD14/TLR4/MD2, yang memacu sekresi sitokin pro inflamatori pada berbagai tipe sel. LPS terdiri dari tiga bagian: rantai samping polisakarida (O); inti polisakarida ; dan lipid A. Lipid A biasanya mengandung asam lemak (seperti: hydroxy-myristic acid). Inti polisakarida mengandung gula (seperti: KDO, keto-deoxyoctulonate and heptulose). Inti polisakarida yang melekat pada lipid A merupakan bagian yang bertanggung jawab terhadap toksisitas bakteri gram-negatif (Abbas dan Lichtman, 2001).

Pemicu penyakit periodontal adalah bakteri Gram negatif di permukaan akar gigi sebagai biofilm. LPS dan senyawa lain meningkatkan akses ke jaringan gingival, mengawali dan menimbulkan inflamasi yang menyebabkan produksi sitokin pro inflamatori dengan kadar tinggi yang kemudian akan menginduksi produksi matrik metalloproteinase sehingga terjadi destruksi jaringan ikat, ligamen periodontal dan resorpsi tulang alveolar (Roelan,2002).

2.2 Tulang

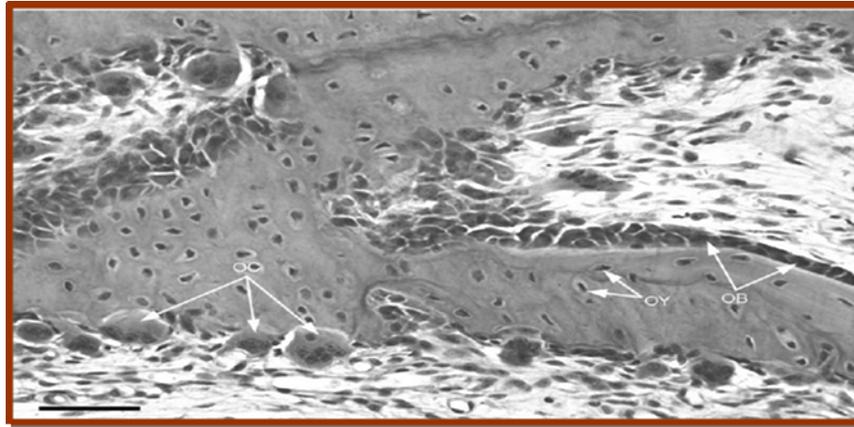
2.2.1 Definisi dan Komposisi

Tulang adalah bentuk khusus jaringan ikat yang tersusun oleh kristal – kristal mikroskopik fosfat kalsium, terutama hidroksi apatit, dalam matrik kolagen (Ganong,1999). Tulang terdiri atas materi intersel yang mengapur, yaitu matrik tulang dan tiga jenis sel : osteosit, terdapat dalam rongga (*lacuna*) didalam matrik; osteoblas, membentuk komponen organik dari matrik; osteoklas, merupakan sel raksasa berinti banyak yang berperan pada resorpsi dan pembentukan kembali jaringan tulang (Juncqueira, dkk, 1997). Tulang merupakan jaringan tubuh yang selalu melakukan proses remodeling sepanjang hidup (Rifas, 2002).

Tulang terdiri atas 75% unsur anorganik meliputi mineral hidroksiapatit berupa kalsium dan fosfor, magnesium, natrium, dan air. Sisanya 25% terdiri atas unsur organik, yang terdiri atas kolagen (90%), glukosamin, glikoprotein, lemak dan peptide (Rahardja, 2002).

Osteoklas matang dihasilkan oleh hasil akhir dari proses differensiasi dan tidak mampu untuk proliferasi mereka sendiri. Osteoklas dalam melaksanakan fungsinya memproduksi daerah yang disebut sebagai *resorption pits* atau *Howship's lacunae* pada permukaan tulang yang termineralisasi. Selama proses resorpsi, osteoklas membentuk sebuah *tight annular seal* dengan tulang (the "clear zone"), mengeluarkan asam yang bertujuan untuk memecah komponen mineral dan enzim proteolitik (seperti cysteine proteinases) untuk memisahkan bahan organik. Osteoklas berinteraksi dengan daerah permukaan yang luas terhadap tulang atas bantuan dari sebuah *convoluted membranous organ*, yang sering disebut sebagai "ruffled border"; daerah resorpsi dapat diartikan sebagai sebuah *specialised extracellular lysosome*. Osteoklas mengekspresikan dalam jumlah besar *enzyme tartrate-resistant acid phosphatase* (TRAP), yang fungsinya masih belum jelas. Osteoklas yang matang mengekspresikan reseptor untuk calcitonin dan prostaglandin, yang merupakan inhibitor terhadap hormon-hormon atau *growth factor* meskipun secara tidak langsung (Arnett, 2003).

Gambaran morfologis dari osteoklas dan osteoblas dapat dilihat pada Gambar:



Gambar 2.1 Morfologi dari sel-sel tulang (OC=osteoklas, OB=osteoblas, OY=osteosit)
(Sumber: Arnett, 2003).

2.2.2 Struktur Anatomi Tulang Alveolar

Secara anatomis *procesus alveolaris* merupakan bagian dari tulang maksila dan mandibula. Terdiri dari 2 bagian yakni, *alveolus proper* (*alveolus bone proper*) dan *alveolar supporting bone*.

a) *Alveolus proper*

Alveolus proper merupakan lembaran tulang tipis yang membentuk dinding dalam soket atau alveolus yang mengelilingi akar gigi dan merupakan tempat tertanamnya serabut ligament periodontal. Alveolus proper disebut juga sebagai *cribiform plate* atau lamina dura. Secara rongenologis lamina dura tampak *radiopaque*.

b) *Alveolar supporting bone*

Alveolar supporting bone adalah bagian tulang alveolar yang terdiri dari *cancellous trabeculars* dari sumsum tulang (mendukung alveoli) dan tulang kortikal (kompak) bagian fasial dan lingual. Alveolar yang terdiri dari *cancellous trabeculars* dari sumsum tulang (mendukung alveoli) dan tulang kortikal (kompak) bagian fasial dan lingual (Caranza,2002).

2.2.3 Sel- Sel Tulang

Sel-sel tulang merupakan sel-sel jaringan ikat khusus yang diturunkan dari sel-sel mesenchim yang terdapat banyak dengan adanya peningkatan suplai darah dan membentuk sel-sel osteogenik atau osteoprogenitor. Sel-sel ini ditransformasikan menjadi osteoblas dan osteosit, sedangkan osteoklas merupakan turunan dari sel-sel mesenchim yang lain (Bajpai, 1991).

2.3 Osteoklas dan Osteoblas

Sel-sel yang terutama berperan dalam pembentukan dan resorpsi tulang adalah osteoblas dan osteoklas. Keduanya berasal dari sumsum tulang (Ganong, 2003).

2.3.1 Definisi Osteoblas

Osteoblas adalah sel yang bertanggung jawab pada pembentukan serabut kolagen dan substansi dasar yang menyusun matriks organik tulang (osteosid). Penampakan sel-sel ini bervariasi sejalan dengan aktivitasnya. Aktivitasnya berkaitan dengan adanya osteogenesis.

Osteoblas adalah sel-sel pembentuk tulang yang berasal dari precursor sel stroma di sumsum tulang. Sel-sel ini menyekresikan sejumlah besar kolagen tipe I, protein matriks tulang yang lain, dan fosfatase alkali. Sel-sel ini berdeferensiasi menjadi osteosit (Ganong, 2003).

2.3.2 Definisi osteoklas

Osteoklas adalah sel yang berinti banyak yang terlibat dalam proses resorpsi tulang. Sel-sel ini sering terletak pada cekungan dangkal pada permukaan tulang (cekungan ini disebut *Howship's lacunae*). Osteoklas merupakan sel yang besar mengandung banyak nucleus (dapat sampai 100), banyak mengandung badan golgi dan mitokondria (Caranza,2002).

Osteoklas merupakan sel multinukleus yang mengerosi dan menyerap tulang yang sebelumnya telah terbentuk. Sel-sel ini berasal dari sel bakal (stem sel)

hematopoietic melalui monosit. Sel-sel ini melekat ke tulang melalui monosit. Sel-sel ini melekat ke tulang melalui integrin diperluas membran yang dinamakan zona tertutup. Keadaan ini menciptakan suatu daerah yang terisolasi antara tulang dan bagian dari osteoklas (Ganong, 2003).

Pompa proton, yang merupakan ATPase yang bergantung pada H^+ , kemudian bergerak dari endosom kedalam membran sel yang berhadapan dengan arah terpisah tersebut, dan mengasamkan daerah tersebut sehingga pH-nya sekitar 4. Pompa proton serupa ditemukan di endosom dan lisosom semua sel eukariotik. Tetapi hanya pada beberapa keadaan pompa tersebut bergerak kedalam membran sel. Dalam hal ini dapat dilihat bahwa rongga tertutup yang terbentuk oleh osteoklas mirip dengan suatu lisosom besar. pH asam melarutkan hidroksi apatit, dan protease asam yang disekresikan oleh sel menguraikan kolagen, membentuk cekungan dangkal pada tulang. Produk-produk digesti ini kemudian mengalami endositosis dan bergerak menyebrangi osteoklas dengan cara transitosi, dan dilepaskan oleh cairan interstisial. Produk-produk hasil penguraian kolagen mengandung struktur piridolin dapat diukur dalam kemih sebagai indeks laju resorpsi tulang (Ganong, 2003).

2.4 Mekanisme Kerusakan Tulang

Faktor yang terlibat dalam kerusakan tulang pada penyakit periodontal adalah bakteri dan host. Produk bakteri plak menyebabkan differensiasi sel progenitor tulang menjadi osteoklas dan menstimulasi sel gingiva untuk mengeluarkan mediator yang mempunyai efek yang sama. Pada penyakit dengan perkembangan yang cepat seperti localized juvenile periodontitis, terdapat mikrokoloni bakteri atau satu sel bakteri yang berada diantara serat kolagen dan diatas permukaan tulang yang dapat memberikan efek langsung (Carranza, 2002).

Beberapa faktor host yang dikeluarkan oleh sel inflamasi dapat menyebabkan resorpsi tulang secara in vitro dan berperan dalam penyakit periodontal, termasuk prostaglandin dan prekursornya, interleukin 1- α dan - β , dan Tumor Necrosis Factor (TNF)- α yang dihasilkan oleh host (Carranza, 2002).

Ketika diinjeksikan secara intradermal, prostaglandin E_2 menyebabkan perubahan vaskular yang terlihat pada inflamasi, apabila diinjeksikan diatas permukaan tulang akan menyebabkan resorpsi tulang tanpa adanya sel inflamasi dan dengan sedikit multinukleasi osteoklas. Obat anti-inflamasi non steroid (AINS) seperti flurbiprofen atau ibuprofen dapat menghambat produksi prostaglandin E_2 , memperlambat kehilangan tulang pada penyakit periodontal. Efek ini terjadi tanpa perubahan pada inflamasi gingiva dan kambuh kembali 6 bulan setelah penghentian obat (Carranza, 2002).

Resorpsi tulang alveolar dapat menyebabkan kehilangan perlekatan periodontal, walaupun mekanisme biologis yang menyebabkan kerusakan tulang alveolar masih belum diketahui secara pasti (Klaus dkk, 1989).

Ada cukup bukti yang menunjukkan bahwa prostaglandin E_2 dihasilkan oleh sel host yang bereaksi terhadap bakteri dan produknya yang menyebabkan kerusakan jaringan pada penyakit periodontal. Dilaporkan bahwa 10 sampai 15 kali lipat peningkatan prostaglandin E_2 pada biopsi gingiva dari kasus periodontitis dibandingkan dengan pasien yang sehat. Pemberian obat anti-inflamasi non steroid juga efektif dalam mengontrol perkembangan penyakit periodontal (Varma & Nayak, 2002).

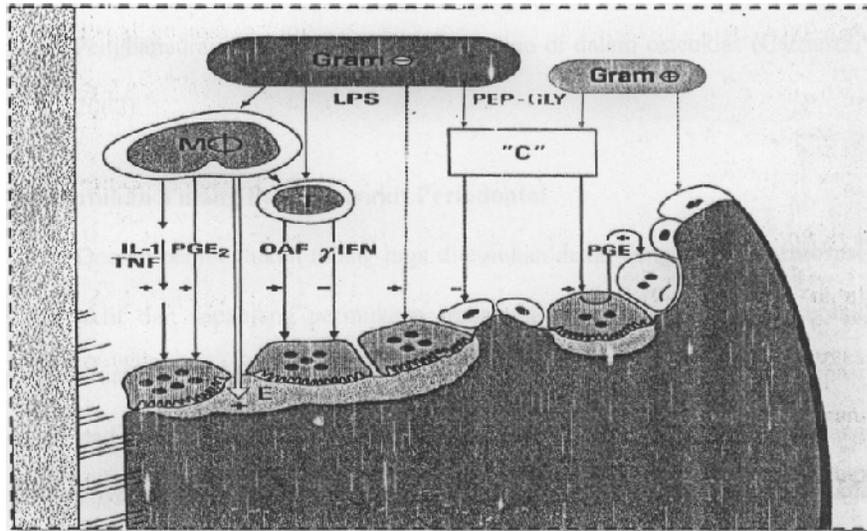
Produk plak dan mediator inflamasi juga dapat bertindak secara langsung pada osteoblas atau progenitornya yang dapat menghambat aksi dan menurunkan jumlahnya (Carranza, 2002). Lipopolisakarida dan toksin bakteri lainnya berperan pada sel imun dan osteoblas yang terdapat di dalam jaringan gingiva yang akan mengeluarkan $IL-1\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$, prostaglandin E_2 dan Tumor Necrosis Factor (TNF)- α . Faktor-faktor ini mengatur pembentukan dan aktivitas osteoklas (Varma & Nayak, 2002). Lipopolisakarida bekerja di dalam makrofag untuk menghasilkan prostaglandin E_2 dalam jumlah yang banyak. Cytokinin dihasilkan oleh sel inflamasi yang bereaksi terhadap endotoksin yang berperan dalam sel mesenkim dan mengeluarkan prostaglandin E_2 (Varma & Nayak, 2002).

Limfosit dan makrofag pada periodontitis dapat mengeluarkan IL-1 dengan kadar yang tinggi. Limfosit dan makrofag juga mengeluarkan sebagian besar IL-6. IL-1 β menyebabkan produksi IL-6 dari fibroblas gingival (Varma & Nayak, 2002).

Tumor Necrosis Factor (TNF)- α dihasilkan dari polimorfonuklear (PMN) leukosit, limfosit, dan makrofag yang terdapat di dalam jaringan inflamasi (Varma & Nayak, 2002). IL-6 bersama-sama dengan IL-3 secara sinergis menstimulasi pembentukan sel progenitor osteoklas. Prekursor osteoklas berasal dari koloni yang membentuk rangkaian unit granulosit-makrofag. IL-6 membantu maturasi sel menjadi osteoklas (Varma & Nayak, 2002). Osteoklas menunjukkan *ruffled border* yang khas dan dibatasi oleh zona clear. Zona clear terdiri dari membran ventral osteoklas yang disebut podosomes. Podosomes melekat pada matriks yang termineralisasi dan larut didalamnya melalui pompa proton, sehingga tulang alveolar menjadi teresorpsi (Varma & Nayak, 2002).

Resorpsi tulang alveolar juga dapat dimulai melalui aktivasi sistem complement. Mediator inflamasi menstimulasi pembentukan osteoklas baru dari prekursor sel, atau meningkatkan kemampuan resorpsi sel. Beberapa mediator juga dapat menghambat atau sebaliknya mengatur regenerasi tulang (Klaus dkk, 1989).

Mekanisme lain dari resorpsi tulang terdiri dari kumpulan lingkungan yang bersifat asam pada permukaan tulang yang akan mengakibatkan hilangnya komponen mineral tulang. Hal ini dapat ditimbulkan oleh kondisi yang berbeda diantaranya terdapat proton yang mengalir melalui membran sel osteoklas, tumor tulang, atau tekanan lokal keluar melalui aktivitas sekretori dari osteoklas (Carranza, 2002).



Gambar 2.2 Aktivitas resorpsi tulang alveolar oleh LPS (Sumber: Klaus dkk, 1989).

Panah double dari MØ menunjukkan pemecahan matriks organik tulang secara enzimatik. MØ = makrofag, T = limfosit T, "C" = sistem komplemen aktif, LPS = lipopolisakarida dari dinding sel bakteri gram (-), PEP-GLY = peptidoglikan dari dinding sel bakteri, IL-1 =interleukin-1, TNF = tumor necrosis factor, PG- E_2 = prostaglandin E_2 , OAF = osteoklas activating factor (cytokinin, contohnya : IL-1 β), γ -IFN = γ interferon (Klaus dkk, 1989). Urutan terjadinya proses resorpsi sebagai berikut :

1. Perlekatan osteoklas pada permukaan tulang yang termineralisasi.
2. Pembentukan penutup lingkungan asam melalui aksi pompa proton, dimana tulang terdemineralisasi dan terbukanya matriks organik.
3. Degradasi matriks organik yang telah terbuka dengan unsur pokok asam amino oleh aksi enzim yang dikeluarkan, seperti asam fosfat dan cathepsine.
4. Penghancuran ion mineral dan asam amino di dalam osteoklas (Carranza, 2002).

2.4.1 Pembentukan Tulang Pada Penyakit Periodontal

Daerah pembentukan tulang juga ditemukan dekat dengan daerah resorpsi tulang aktif dan sepanjang permukaan trabekula pada daerah inflamasi untuk

memperkuat bagian tulang yang tersisa. Respon tulang alveolar terhadap inflamasi terjadi pada saat pembentukan dan resorpsi tulang, sehingga kehilangan tulang pada penyakit periodontal bukan hanya proses destruksi yang sederhana tetapi merupakan hasil dari resorpsi predominan di atas pembentukan tulang. Pembentukan tulang baru rata-rata memperlambat kehilangan tulang dan mengganti sebagian tulang dan mengganti sebagian tulang yang rusak karena inflamasi (Carranza, 2002).

Pada penyakit periodontal yang tidak dirawat sering memperlihatkan daerah resorpsi tulang yang telah berhenti dan terbentuk tulang baru pada margin tulang yang sebelumnya telah terkikis. Ini menegaskan bahwa karakter intermitten dari resorpsi tulang pada penyakit periodontal konsisten dengan variasi rata-rata perkembangan yang ditemukan secara klinis pada penyakit periodontal yang tidak dirawat (Carranza, 2002).

Periode remisi dan eksaserbasi ini hampir sama dengan periode eksaserbasi pada inflamasi gingiva yang ditandai dengan perubahan dalam peningkatan perdarahan, eksudat, dan komposisi bakteri plak. Adanya pembentukan tulang pada respon inflamasi dan penyakit periodontal terbukti berhubungan dengan hasil perawatan. Tujuan dasar perawatan periodontal adalah mengeliminasi inflamasi untuk menghilangkan stimulus terhadap resorpsi tulang (Carranza, 2002).

2.4.2 Pola Kerusakan Tulang Pada Penyakit Periodontal

Penyakit periodontal dapat merubah gambaran morfologi tulang alveolar sehingga terjadi penurunan ketinggian tulang. Patogenesis perubahan ini penting untuk penegakan diagnosa dan perawatan.

a. Resorpsi Tulang Horizontal

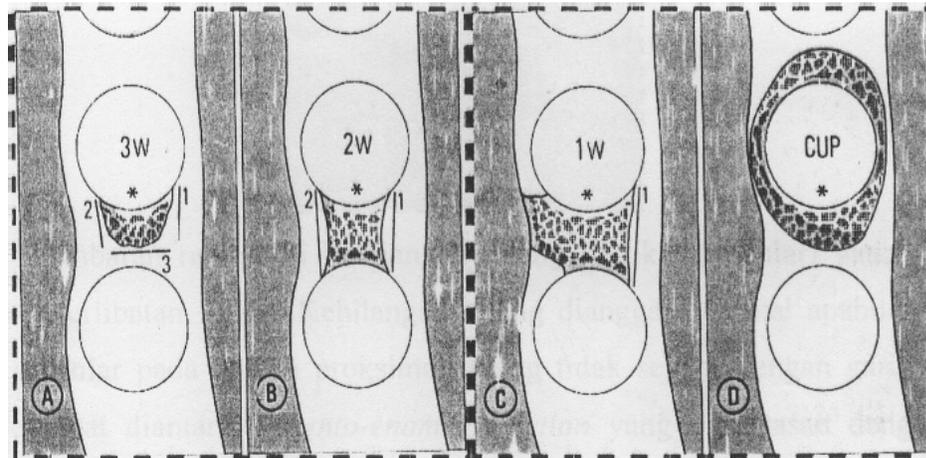
Resorpsi tulang horizontal merupakan pola kehilangan tulang yang paling sering ditemukan pada penyakit periodontal. Puncak tulang alveolar mengalami penurunan, tetapi margin tulang yang tersisa tegak lurus terhadap permukaan gigi. Septum interdental serta bagian facial dan lingual juga mengalami kerusakan, tetapi derajat kerusakan di sekeliling gigi berbeda-beda (Carranza, 2002).

b. Defek Vertikal atau Angular

Defek vertikal atau angular terjadi dalam arah oblique, membuat lubang yang menembus ke dalam tulang di sepanjang akar; dasar defek terletak ke arah apikal di sekitar tulang. Defek angular disertai poket infrabony yang mendasari defek angular. Defek angular diklasifikasikan berdasarkan jumlah dinding osseus. Defek angular dapat memiliki satu, dua, atau tiga dinding. Jumlah dinding pada bagian apikal defek lebih besar daripada bagian oklusal yang disebut dengan *combined osseous defect*. Defek vertikal terjadi pada interdental yang dapat terlihat secara jelas pada gambaran radiografis, walaupun kadang tertutup oleh kepingan tulang yang tebal. Defek angular juga terdapat pada permukaan facial dan lingual atau palatal, tetapi defek ini tidak terlihat pada gambaran radiografis. Pembedahan merupakan cara yang pasti untuk mengetahui adanya bentuk defek tulang vertikal (Carranza, 2002). Skematik morfologi defek tulang diklasifikasikan menjadi :

- Defek tulang 3 dinding yang dibatasi oleh 1 permukaan gigi dan 3 permukaan tulang,
- Defek tulang 2 dinding (crater interdental) yang dibatasi oleh 2 permukaan gigi dan 2 permukaan tulang,
- Defek tulang 1 dinding dibatasi oleh 2 permukaan gigi dan 1 permukaan tulang serta jaringan lunak,
- Defek tulang kombinasi (Cup-shaped defect) dibatasi oleh beberapa permukaan gigi dan beberapa permukaan tulang (Klaus dkk, 1989).

Gambaran skematik morfologi defek tulang dapat dilihat pada Gambar 2.3



(A) Defek tulang 3 dinding; (B) Defek tulang 2 dinding; (C) Defek tulang 1 dinding; (D) Cup-shaped defect.

Gambar 2.3 Gambaran skematik morfologi defek tulang. (Sumber: Klaus dkk, 1989).

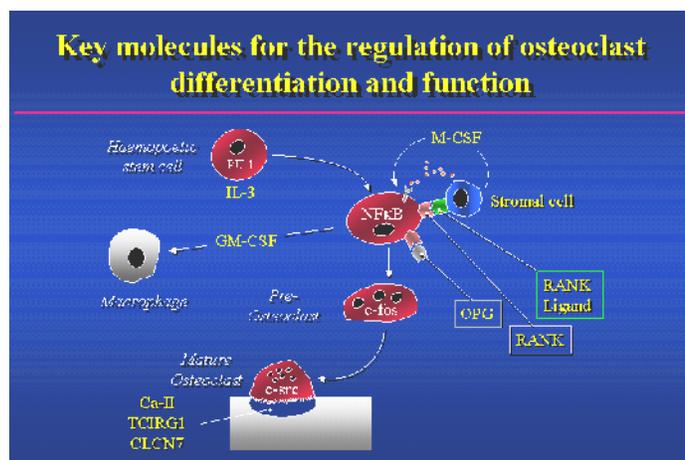
Defek vertikal meningkat sesuai dengan usia. Hampir 60% orang dengan defek angular interdental hanya mempunyai satu defek. Defek vertikal dapat dideteksi dengan pemeriksaan radiografi yang telah dilaporkan bahwa banyak terlihat pada permukaan distal dan mesial, akan tetapi defek dengan tiga dinding lebih sering ditemukan pada permukaan mesial molar atas dan bawah (Carranza, 2002). Defek vertikal dengan tiga dinding biasa disebut dengan defek intrabony. Defek ini paling sering terdapat pada bagian mesial dari molar kedua dan ketiga rahang atas dan bawah. Defek vertikal dengan satu dinding disebut juga ennisseptum (Carranza, 2002).

2.4.3 Regulasi Aktivasi Osteoklas dalam Resorpsi Tulang Alveolar

Setiap perubahan yang terjadi pada tulang diterima oleh mekanoreseptor yang dimainkan oleh peran dari osteosit. Hal ini akan merangsang proliferasi dan diferensiasi osteoklas. Osteoklas merupakan sel fagositik multinuklear, kaya enzim tartrat yang tahan terhadap asam fosfat, dimana pembentukan osteoklas dibentuk melalui penggabungan dari prekursor-prekursor yang berasal dari sel galur monosit/makrofag. Penelitian terbaru menyebutkan bahwa diidentifikasi beberapa

molekul yang memegang peranan penting dalam regulasi diferensiasi osteoklas. *Transcription factor PU-1*, akan diekspresikan sejak awal oleh prekursor osteoklas, membutuhkan peranan mediator sitokin IL-3 dalam fase awal dari diferensiasi osteoklas dan monosit. Sedangkan *transcription factors* lain seperti *c-fos* dan *NFκB* juga memainkan peran penting di dalam menstimuli diiferensiasi prekursor yang terpilih untuk matang menjadi osteoklas (Ralston, 2002).

Pembentukan dan aktivasi osteoklas juga tergantung pada interaksi tertutup antara prekursor osteoklas dan sel stromal sumsum tulang. Sel stromal mensekresikan sitokin *M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor)*, yang penting untuk diferensiasi osteoklas dan makrofag dari prekusornya. Sel stromal juga mengekspresikan molekul yang disebut sebagai *RANK ligand (RANKL)* pada permukaan sel, yang molekul ini nantinya berinteraksi dengan reseptor permukaan sel lainnya yang terdapat pada prekursor osteoklas yang disebut *RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B)* untuk promosi diferensiasi prekursor osteoklas menjadi osteoclas matang. Interaksi *RANK-RANKL* dihambat oleh molekul lainnya yang disebut sebagai Osteoprotegerin (*OPG*), yang berperan sebagai ligand untuk *RANK* dan dengan aksi ini maka menjadikan aksi inhibitor yang poten dalam pembentukan osteoklas (Ralston, 2002).



Gambar 2.4 Molekul-molekul yang berperan dalam regulasi diferensiasi dan fungsi osteoklas (sumber: Ralston, 2002).

2.5 Probiotik

2.5.1 Definisi Probiotik

Probiotik adalah bakteri asam laktat hidup atau bakteri campuran yang memiliki efek menguntungkan pada saluran cerna dan saluran nafas host melalui kemampuannya memperbaiki keseimbangan mikroflora usus (Soebijanto, 2006 dalam Amin dkk., 2010). Spesies bakteri asam laktat yang umum digunakan sebagai probiotik antara lain; *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* dan *Bifidobacterium* (Fuller, 1997). Fuller (1997) menyebutkan bahwa ada tiga karakteristik dari probiotik yang efektif, antara lain:

- (1) meningkatkan resistensi kolonisasi bakteri patogen;
- (2) mengaktifkan aktivitas metabolik yang berguna bagi kesehatan host; dan
- (3) menstimulasi respon imun host.

Faktor penting lainnya dari probiotik yang ideal adalah kemampuan mempertahankan viabilitas saluran cerna selama proses pencernaan, serta tidak adanya efek samping pada asam lambung dan sel epitel usus.

Menurut Fuller (1997), bakteri asam laktat mengalami fermentasi yang dapat menurunkan level derajat keasaman (pH) usus sehingga bakteri patogen tidak dapat bekerja secara efektif. Fuller (1997) juga menyebutkan bahwa bakteri asam laktat dapat memproduksi substansi antibakteri, yaitu:

- (1) produk fermentasi dan hasil metabolisme bakteri probiotik; asam laktat, karbon dioksida, diacetyl, acetaldehyde, dan hidrogen peroksida, serta;
- (2) bacteriocins, yaitu senyawa berprotein bersifat antimikroba.

2.5.2 *Lactobacillus*

Lactobacillus adalah bakteri endogenous yang terdapat pada rongga mulut dan saluran pencernaan. Eksogenous *Lactobacillus* memegang peranan dalam pencegahan dan perawatan kerusakan gastrointestinal. Rongga mulut merupakan bagian pertama dari gastrontestinal sehingga beberapa aksi dari probiotik juga ikut berperan dalam ekosistem rongga mulut. Jumlah *lactobacillus* dalam rongga mulut

kurang lebih 1%, dan beberapa studi menunjukkan bahwa *Lactobacillus* dapat menurunkan karies yang disebabkan oleh *S. mutans*. Selain itu *Lactobacillus* dalam rongga mulut yang berasal dari jaringan periodontal yang sehat dan yang sakit menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap bakteri penyebab periodontitis seperti *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* dan *Prevotella intermedia* (Sugano dkk., 2007).

Menurut Fuller (1997), konsumsi oral *Lactobacillus casei* sebagai probiotik dapat meningkatkan sintesis IgA di usus, dan mengaktifkan respon inflamatori seperti proliferasi sel plasma, limfosit, dan makrofag. Selain itu, *L. casei* juga dapat mengaktifkan respon imun lokal dan sistemik dengan memproduksi sitokin, limfosit, *NK cells*, antibodi, monosit dan makrofag yang dapat memfagositosis bakteri patogen. Seperti pada penelitian De Simone (1993) dalam Fuller (1997) disebutkan bahwa yoghurt mengandung *L. casei* hidup dapat membunuh bakteri patogen *Salmonella Typhimurium* melalui beberapa mekanisme:

- (1) meningkatkan aktivitas antibakteri melalui produksi sel PMN dan IgA;
- (2) meningkatkan jumlah makrofag untuk memfagosit bakteri patogen, dan;
- (3) meningkatkan proliferasi splenosit, seperti mitogen sel-T dan sel-B.

Pada penelitian lainnya dari Fuller (1997), *L. casei* dapat digunakan untuk perawatan sel endotel vaskuler pada tikus yang mengalami arteritis koroner. Dalam penelitian tersebut, *L. casei* terbukti dapat menstimulasi sel PMN pada sel endotel, serta meningkatkan molekul adhesi interseluler-1 (ICAM-1). Peningkatan bahan-bahan tersebut dapat mengurangi peradangan pada pembuluh koroner hewan coba.

2.5.3 Efek Probiotik Terhadap Jaringan Periodontal

Beberapa studi melaporkan bahwa *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* dapat mencegah penyakit di rongga mulut seperti karies dan penyakit periodontal (Amin dkk., 2010). Probiotik digunakan dalam rongga mulut untuk menolong dokter gigi dalam mengontrol bakteri patogen yang menyebabkan penyakit di dalam rongga mulut. Keradangan pada gingiva salah satu penyebabnya adalah pembusukan

makanan oleh bakteri patogen. Probiotik mengontrol pertumbuhan bakteri patogen untuk mencegah gingivitis. Probiotik memiliki pH yang rendah sehingga bakteri plak tidak dapat membentuk dental plak dan kalkulus yang menyebabkan penyakit periodontal. Probiotik juga memproduksi antioksidan, dimana antioksidan dapat mencegah stain dan pembentukan plak dengan cara menetralkan dari elektron bebas yang dibutuhkan untuk pembentukan mineral atau kalkulus. Selain itu probiotik dapat merusak *putrescence odors* dengan memfiksasi gas yang toksik dan merubahnya menjadi gas yang diperlukan untuk metabolisme (Anonim, 2001; Endaryanto dan Harsono, 2006).

2.5.4 Efek probiotik terhadap tulang alveolar

Osteoklas adalah sel tulang yang menghilangkan jaringan tulang dengan menghapus mineralisasi matriks tulang itu. Proses ini dikenal sebagai resorpsi tulang. Osteoklas dan osteoblas yang berperan dalam mengendalikan jumlah jaringan tulang. Osteoblas membentuk tulang, kemudian osteoklas menyerap. Osteoklas dibentuk oleh fusi sel dari garis sel monosit dan makrofag. Osteoklas ditandai dengan ekspresi tinggi resisten terhadap fosfat asam tatarat (TRAP) dan cathepsin K. Cathepsin K adalah anggota dari superfamili papain dari proteasesistein dan berperan penting dalam resorpsi tulang osteoklas yang bermediasi. Enzim ini adalah target yang sangat baik untuk terapi anti resorpsi pada gangguan osteopenic seperti osteoporosis (Wiley John, 2003).

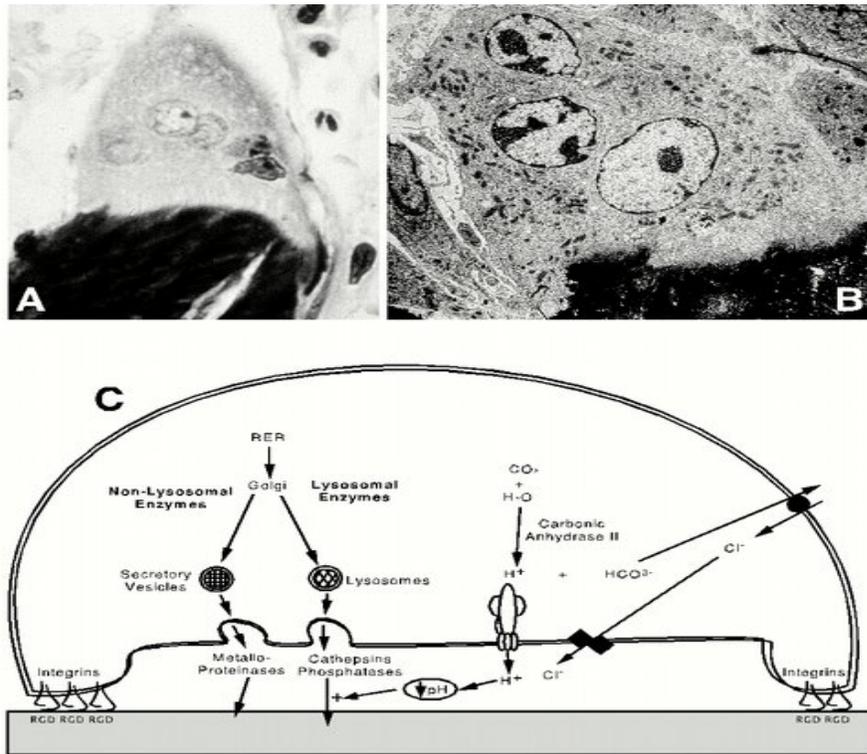
Osteoklas adalah lapisan sel tulang yang bertanggung jawab untuk resorpsi tulang. Osteoklas adalah sel berinti raksasa dengan diameter sampai 100 mm dan berisi 4-20 inti sel. Hal ini biasanya ditemukan pada kontak dengan permukaan klasifikasi dan kekosongan tulang yang merupakan hasil dari kegiatan resorbsinya. Hal ini memungkinkan untuk menemukan osteoklas hingga empat atau lima di tulang yg teresorpsi yang sama tetapi biasanya hanya ada satu atau dua. Di bawah mikroskop cahaya inti tampak berbeda-beda dalam badan sel yang sama, ada yg bulat dan eukromatik serta ada juga beberapa yang tidak teratur dalam kontur dan

heterokromatik, mungkin mencerminkan fusi *asynchronous precursor mononuclear*, zona tulang ditandai dengan adanya perbatasan tidak beraturan dan tepi sangat jelas (Baron, 2006).

Probiotik berpengaruh pada osteoklas dipermukaan tulang yang teresorpsi. Proses ini melibatkan reseptor adhesi transmembran dari integrin. Integrin menyebabkan sekuen asam amino dalam protein atau pada permukaan matriks tulang. 5 integrin sebagian besar adalah $\beta\alpha1$ (reseptor kolagen) dan $v\beta2\alpha3$ (reseptor vitronectin), $\beta\alpha$ dalam osteoklas itu apabila tidak ada sel mikro diasamkan maka tidak dapat dibangun dan osteoklas tidak dapat terbentuk, alat fungsionalnya yang berhubungan dengan pembentukan podosomes (Baron, 2006).

Mekanisme kerja probiotik dalam tulang alveolar adalah pertama, dapat menghasilkan asam sehingga pH menjadi rendah. Keadaan ini tidak menguntungkan bagi mikroorganisme patogen. Kedua, beberapa mikroba probiotik dapat menghasilkan bahan antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba lain yang tidak menguntungkan. Ketiga, mikroba probiotik dapat berkembang biak di dalam tulang dan berkompetisi dengan mikroba patogen. Keempat, mikroba probiotik berkompetisi dengan mikroba patogen untuk berikatan dengan reseptor yang sama (Winarsih dkk, 2007).

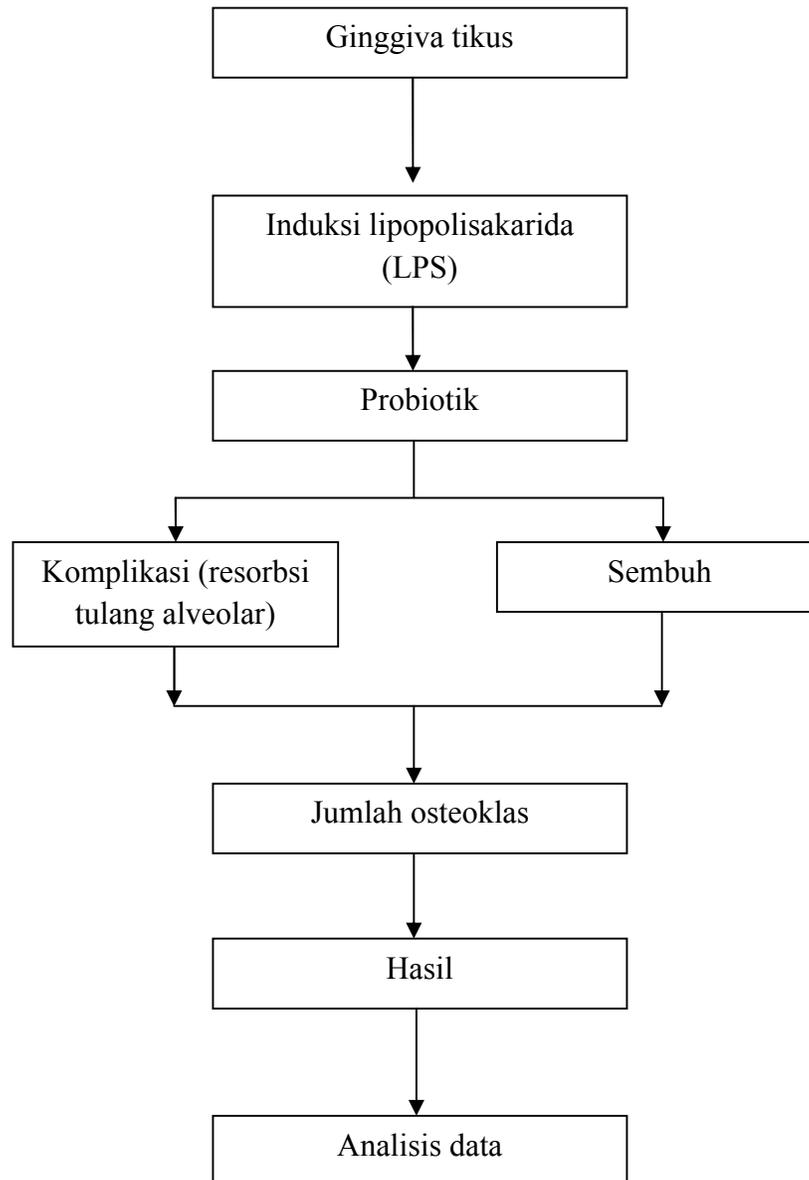
Pada osteoklas, jaringan terjadi melalui podosomes. Podosomes adalah struktur lebih dinamis daripada adesi fokus dan terjadi pada sel-sel yang bergerak. Ini adalah perakitan terus-menerus dan pergerakan podosomes yang memungkinkan pergerakan di seluruh permukaan osteoklas tulang selama resorpsi tulang. Pembentukan integrin podosomes yang selanjutnya tergantung pada sejumlah kinase adhesi termasuk secara proto onkogen yang sementara tidak diperlukan untuk pematangan osteoklas, beberapa protein juga telah terbukti hadir dalam podosomes dan diperlukan untuk tulang, anggota lain dari keluarga adhesi kinase juga diaktifkan oleh resorpsi, ini menunjukkan pentingnya integrin dan pembentukan podosome dan pembongkaran pada fungsi osteoklas (Baron, 2006).



(A) Cahaya mikrograf; (B) Mikrograf elektron dari osteoklas, menunjukkan batas jelas dan berinti banyak; (C) Resorpsi osteoklas.

Gambar 2.5 Osteoklas dan mekanisme resorpsi tulang akibat probiotik. (Sumber: Baron, 2006).

2.6 Kerangka Konseptual Penelitian



2.7 Hipotesis Penelitian

Hipotesis dari penelitian ini adalah pemberian probiotik akan menurunkan jumlah sel osteoklas tulang alveolar setelah diinduksi lipopolisakarida.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris. Dipilih jenis ini karena sampel dan perlakuan termasuk dalam variabel terkontrol, terukur dan pengaruh perlakuan lebih dapat dipercaya (Notoatmojo, 2002).

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *post test control group design* (Notoatmojo, 2002).

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember pada bulan Agustus 2010 - Maret 2011.

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

3.4.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian adalah hewan coba tikus (*ratus*) jenis wistar jantan.

3.4.2 Sampel Penelitian

a. Besar Sampel Penelitian

Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 8 ekor tikus tiap kelompok perlakuan.

Adapun besar sampel didapat dari perhitungan rumus sebagai berikut:

$$n = \frac{(Z\alpha + Z\beta)^2 \sigma^2_D}{\delta^2}$$

Keterangan:

n = jumlah sampel minimal

$Z\alpha$ = batas atas nilai konversi pada tabel distribusi normal untuk batas kemakmuran (1,96)

$Z\beta$ = batas bawah nilai konversi pada tabel distribusi normal untuk batas kemakmuran (0,85)

α = tingkat signifikansi (0,05)

β = 0,20

$\sigma^2_D/\delta^2 = 1 \rightarrow$ diasumsikan $\sigma^2_D = \delta^2$

maka, hasil perhitungan sampel minimal adalah sebagai berikut:

$$n = \frac{(1,96 + 0,85)^2 \sigma^2_D}{\delta^2}$$

$$= (2,81)^2 = 7,9 \approx \mathbf{8}$$

(Steel dan Torie, 1995).

b. Kriteria Sampel Penelitian

Pemilihan sampel penelitian menggunakan teknik *purposive sampling*, yaitu sampel dipilih berdasarkan berbagai pertimbangan dari peneliti dengan kriteria-kriteria tertentu yang diterapkan berdasarkan tujuan penelitian.

Adapun kriteria sampel, antara lain:

1. Jenis wistar
2. Kondisi fisik sehat dan tidak mengalami kelainan
3. Jenis kelamin jantan
4. Umur 3 bulan dan berat badan 170 – 200 gram
5. Pakan yang sesuai dan seragam.

3.5 Identifikasi Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah:

- a. Pemberian Probiotik
- b. Induksi LPS

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah sel osteoklas

3.5.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah:

- a. Kriteria hewan coba
- b. Prosedur Penelitian

3.6 Definisi Operasional

3.6.1 Probiotik

Bakteri Probiotik yang digunakan adalah *Lactobacillus casei*, yang diaplikasikan pada hewan coba dengan cara disuntikkan pada *Junctional epithelium* di sulkus gingival pada gigi insisif pertama kanan rahang bawah bagian labial, dengan dosis 0,2ml dan menggunakan jarum 30G.

3.6.2 LPS

LPS adalah LPS yang berasal dari Bakteri *E.coli* (Sigma), yang diaplikasikan pada hewan coba dengan cara disuntikkan pada *Junctional epithelium* di sulkus gingival pada gigi insisif pertama kanan rahang bawah bagian labial, dengan dosis 0,2ml dan menggunakan jarum 30G.

3.6.3 Jumlah Sel Osteoklas

Jumlah sel raksasa dengan multinukleus yang berada pada sisi tulang yang mengalami resorpsi (*lacuna howships*), sitoplasma seperti busa, sedikit asidofilik. Metode histologi digunakan untuk menghitung jumlah sel berdasarkan morfologi sel.

3.7 Bahan dan Alat Penelitian

3.7.1 Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- a. Tikus wistar jantan
- b. LPS *E. coli* (Sigma)
- c. Probiotik *L. casei*
- d. Media Cair *Monitol Rogosa Salt Broth (MRS-B)*
- e. Media Agar *Monitol Rogosa Salt Agar (MRS-A)*
- f. Ketamin (KTM 1000)
- g. *Phosphate Buffer Saline*
- h. Formalin 10%
- i. EDTA 10%
- j. *Ammonium Hydroxide* 5%
- k. *Ammonium Oxalate* 5%
- l. Alkohol 70%, 80%, 95%, 100%
- m. Xylol
- n. Gliserin
- o. *Meyer Egg Albumin*
- p. *Embedding Paraffin* (Paraplast Plus)
- q. *Dry Ice* (VWR International)
- r. *Haematoksin Eosin*
- s. *Entellan*
- t. Aquades steril
- u. Spiritus
- v. Kapas steril
- w. Kertas saring (Whatmann filter paper No.1)
- x. Minuman dan makanan standar tikus wistar (Feedmill-Malindo, Gresik).

3.7.2 Alat Penelitian :

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- a. Kandang pemeliharaan hewan coba
- b. Kandang perlakuan hewan coba
- c. Tempat makan dan minum hewan coba
- d. Jarum insulin 30G (Terumo, Jepang)
- e. Tabung reaksi (Pyrex)
- f. Petridish tidak bersekat
- g. Neraca (Ohaus, Jerman)
- h. Inkubator (Binder, Jerman)
- i. *Autoclave*
- j. *Laminar Flow*
- k. Gelas Ukur
- l. *Erlenmeyer* (Pyrex)
- m. *Beaker Glass*
- n. Pengaduk
- o. Ose
- p. Lampu spiritus
- q. *Cutter*
- r. *Refrigerator*
- s. Gunting bedah
- t. Pinset
- u. Botol untuk dekalsifikasi
- v. *Vibrator* (Vortex)
- w. Stopwatch (Diamond, Cina)
- x. Besi bentuk L untuk alat cetak blok paraffin
- y. Kompor
- z. Panci
- aa. Mikrotom (Leica RM 2135)

- bb. *Microtom Blade System* (Tissue-Tek, Jepang)
- cc. *Block holder* mikrotom
- dd. *Waterbath* (Memmert)
- ee. *Hot Plate* (Labinco B.V., Belanda)
- ff. Oven (Memmert)
- gg. Kuas kecil
- hh. Mikroskop cahaya (Olympus)
- ii. *Obyek glass* (Citoplus)
- jj. *Deck glass*
- kk. Sarung tangan (Latex)
- ll. Masker

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 *Ethical Clearence*

Sebelum dilakukan penelitian, maka hewan coba dan prosedur penelitian akan dilakukan pengurusan *ethical clearance* di Komisi Etik Penelitian Kesehatan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

3.8.2 Persiapan Hewan Coba

Penelitian ini dilakukan pada hewan coba tikus (*ratus*) dengan persyaratan sebagai berikut:

1. Jenis wistar
2. Kondisi fisik sehat dan tidak mengalami kelainan
3. Jenis Kelamin Jantan
4. Umur 3 bulan dan berat badan 170-200 gram
5. Pakan yang sesuai dan seragam

Hewan coba dilakukan aklimatisasi selama seminggu sebelum diberi perlakuan untuk mengadaptasikan tikus dengan tempat dan makanan.

3.8.3 Pembagian Kelompok Perlakuan

Hewan coba yang sudah diadaptasikan akan dikelompokkan menjadi 4 kelompok yaitu

1. Kelompok I (8 ekor) merupakan kelompok kontrol yang tidak diberi perlakuan,
2. Kelompok II (8 ekor) merupakan kelompok perlakuan yang diberi induksi LPS,
3. Kelompok III (8 ekor) merupakan kelompok perlakuan yang diberi induksi LPS dan diberikan suntikan bakteri probiotik bersama-sama mulai awal,
4. Kelompok IV (8 ekor) merupakan kelompok perlakuan yang diberi induksi LPS selama 5 hari kemudian dilanjutkan dengan suntikan bakteri probiotik selama 5 hari berikutnya.

3.8.4 Persiapan Bahan Perlakuan

Bahan yang dipakai pada kelompok perlakuan terdiri dari LPS *E. coli* (Sigma) yang dipakai untuk menginduksi dan menghasilkan infeksi pada jaringan periodontal. Bakteri probiotik *L. casei*, dimana bakteri probiotik yang dipakai adalah bakteri probiotik yang sudah jadi.

a. Pembuatan Sediaan LPS

1. Membeli LPS dengan sediaan yang sudah jadi dengan jumlah 2 ml
2. Pembuatan stok LPS didapat dengan cara 10 mg LPS dilarutkan dalam 2 ml PBS (*Phosphate Buffer Salin*).
3. Stok LPS dikemas dalam wadah tertutup dan disimpan dalam suhu ruang.

b. Pembuatan Sediaan Bakteri *L. casei*

1. *Monitol Rogosa Salt Broth (MRS-B)*

Pembuatan larutan *MRS-Broth* adalah dengan menimbang 5,52 gram *MRS-Broth* menggunakan neraca dan mengukur 100 ml aquades steril dengan gelas ukur. Bahan tersebut dicampur dalam *erlenmeyer*, kemudian dipanaskan

di atas kompor listrik sampai mendidih sambil diaduk dengan pengaduk agar homogen. Bahan kemudian disterilkan dalam *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit. Media tersebut kemudian dimasukkan kedalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam untuk memastikan media cair *MRS-Broth* dalam keadaan steril.

2. Suspensi

Indukan bakteri *L. casei* dilakukan kultur untuk keperluan perlakuan. Inokulasikan swap yang berisi bakteri yang sebelumnya diambil dari media indukan ke agar plate dengan menekan dan memutarinya dengan membuat area melingkar dengan diameter sekitar 25 mm. Gunakan sengkeli steril untuk menggores area yang telah di inokulasi sekitar 10 sampai 20 kali dan goresan ini untuk memudahkan penyebaran isolasi koloni. Bahan tersebut kemudian dibuatkan suspensi ke dalam tabung dengan 2 ml yang di ambil menggunakan ose steril dari media agar.

3. *Monitol Rogosa Salt Agar (MRS-A)*

Pembuatan larutan *MRS-Agar* adalah dengan menimbang 6,62 gram *MRS-Agar* menggunakan neraca dan mengukur 100 ml aquades steril dengan gelas ukur. Bahan tersebut kemudian dicampur dalam *erlenmeyer*, kemudian dipanaskan di atas kompor listrik sampai mendidih sambil diaduk dengan pengaduk agar homogen. Bahan tersebut disterilkan dalam *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit. Hasilnya kemudian ditunggu sampai media tersebut dingin dan mengeras.

3.8.5 Prosedur Perlakuan

1. Pembedusan Hewan Coba

Hewan coba sebelum diberi perlakuan, dilakukan pembedusan dengan menggunakan Ketamin (KTM 100). Dosis yang diberikan adalah 80 mg/kg berat

badan yang disuntikkan pada daerah kaki belakang sebelah kanan di muskulus quadriceps atau tricep.

2. Aplikasi Bahan Perlakuan

Infeksi pada jaringan periodontal dilakukan dengan induksi LPS *E. coli*. LPS disuntikkan pada sulkus gingiva gigi insisif pertama kanan rahang bawah bagian labial dengan dosis 5 µg/0,05 ml PBS menggunakan jarum insulin 30G sebanyak 0,02 ml, dimana diberikan 1 kali sehari selama 5 hari.

Pemberian bakteri probiotik dilakukan dengan menyuntikkan pada daerah yang sama seperti pada saat induksi LPS dengan dosis 2×10^8 sel/ml menggunakan jarum insulin 30G sebanyak 0,02 ml, dimana diberikan 1 kali sehari selama 5 hari. Pemberian bakteri probiotik ini dilakukan dengan dua cara, yaitu: untuk Kelompok III diberikan secara bersamaan dengan LPS, sedangkan untuk Kelompok IV diberikan setelah induksi LPS selama 5 hari dalam jangka waktu 5 hari.

3. Pengambilan Sampel Penelitian

Hewan coba baik dari kelompok kontrol maupun perlakuan akan dimatikan dengan cara dislokasi. Kemudian dilakukan pengambilan sampel tulang alveolar, gingiva, dan gigi pada regio insisif pertama kanan rahang kanan sebelah labial. Sampel yang sudah diambil dilakukan fiksasi dengan menggunakan formalin 10% selama 5 hari.

4. Dekalsifikasi Sampel Penelitian

Sampel yang telah difiksasi menggunakan formalin 10% dilakukan dekalsifikasi dengan tujuan untuk melepaskan bahan anorganik dalam tulang tanpa merusak protein yang ada, dengan memakai larutan EDTA 10% (pH 7,4) pada suhu 4°C. Adapun urutan dekalsifikasinya sebagai berikut:

- 1) Sampel yang sudah difiksasi dicuci dengan air bersih yang mengalir pelan selama minimal 30 menit
- 2) Dimasukkan pada larutan EDTA yang sudah ada dan dilakukan vibrasi 2x agar proses dekalsifikasi merata
- 3) Untuk mengetahui proses dekalsifikasi sudah lengkap/selesai dilakukan pengetesan dengan cara mengambil 5 ml larutan yang digunakan untuk dekalsifikasi bahan dan dicampur dengan 5 ml campuran *Ammonium Hydroxide* 5%/ *Ammonium Oxalate* 5% (volumenya seimbang). Bahan tersebut dicampur hingga merata dan ditunggu semalaman. Bila tidak ada presipitat, maka proses dekalsifikasi sudah lengkap. Cara ini diulang dalam 3 hari sekali
- 4) Sampel yang sudah terdekalsifikasi lengkap dibersihkan dengan air mengalir dan segera ditransfer pada larutan ammonia selama 30 menit (*ammonia concentrated* 5 tetes dalam 100 ml *distilled water*) dengan tujuan untuk menghilangkan larutan dekalsifikasi yang tersisa
- 5) Setelah itu dicuci dengan air mengalir selama 24 jam.

5. Pemrosesan Jaringan

Setelah proses dekalsifikasi telah selesai dilakukan, maka dilakukan pemrosesan jaringan yang berfungsi untuk mempersiapkan jaringan sebelum dilakukan penyayatan dengan mikrotom. Tahapan pemrosesan jaringan menurut Syafridi dkk. (2008) adalah sebagai berikut:

(1) Dehidrasi

Dehidrasi merupakan penarikan air dari dalam jaringan dengan menggunakan konsentrasi rendah ke tinggi (bertingkat). Tahapan dehidrasi antara lain:

- (1) Alkohol 70% : 15 menit
- (2) Alkohol 80% : 1 jam
- (3) Alkohol 95% : 2 jam
- (4) Alkohol 95% : 1 jam
- (5) Alkohol 100% : 1 jam

(6) Alkohol 100% : 1 jam

(7) Alkohol 100% : 1 jam

(2) *Clearing*

Clearing merupakan proses penjernihan jaringan menggunakan bahan-bahan *clearing*. Bahan-bahan yang dapat digunakan antara lain: xylol, toluen, dan benzen. Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember menggunakan xylol. Tahapan *clearing* antara lain:

(1) Xylol : 1 jam

(2) Xylol : 2 jam

(3) Xylol : 2 jam

(3) Impregnasi

Impregnasi merupakan proses infiltrasi bahan *embedding* ke dalam jaringan pada suhu 56° - 60° C. Caranya yaitu jaringan dibungkus dengan kertas saring yang sudah diberi label untuk menghindari kekeliruan identitas sampel. Kemudian dimasukkan ke dalam bahan *embedding* yaitu paraffin TD 56° - 60° C. Tahapan impregnasi antara lain:

(1) Paraffin (56° - 58° C) : 2 jam

(2) Paraffin (56° - 58° C) : 2 jam

(3) Paraffin (56° - 58° C) : 2 jam

(4) *Embedding*

Embedding merupakan proses penanaman jaringan ke dalam suatu bahan *embedding*. Bahan-bahan yang dapat digunakan untuk menanam jaringan antara lain: paraffin, *cellulose*, dan *tissue text*. Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember menggunakan paraffin TD 56° - 60° C.

6. Penyayatan

Sebelum dilakukan penyayatan jaringan, sebelumnya dilakukan beberapa persiapan, antara lain:

a. Mengolesi *obyek glass* dengan *meyer egg albumin*

b. Menempelkan blok paraffin pada *block holder* mikrotom dengan bantuan pemanasan

Setelah itu, dilakukan proses penyayatan jaringan dengan tahapan sebagai berikut:

- (1) Penyayatan menggunakan mikrotom, dimana sebelumnya pisau mikrotom dibersihkan dengan kasa/kertas saring yang telah dibasahi dengan xylol dengan arah tegak lurus
- (2) Mengatur ketebalan sayatan mikrotom sebesar 6 mm dengan arah bukolingual
- (3) Mengambil sayatan yang telah diperoleh dengan kuas lalu letakkan di atas permukaan air *waterbath* dengan temperatur tetap 56-60⁰C hingga sayatan mekar
- (4) Mengambil sayatan yang telah mekar dengan obyek glass yang telah diolesi dengan *meyer egg albumin*, dikeringkan di atas *hot plate*, kemudian dimasukkan dalam oven dengan suhu sekitar 30-35⁰C minimal selama 12 jam.

7. Pengecatan Haematoksilin Eosin (HE)

Pengecatan HE digunakan untuk melihat jumlah sel fibroblas. Teknik pengecatan HE yang dilakukan adalah sesuai standar rutin Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Metode pengecatan *Haematoksilin Eosin* secara progresif menurut Syafriadi dkk. (2008) antara lain:

- (1) Xylol : 2-3 menit
- (2) Xylol : 2-3 menit
- (3) Alkohol absolut : 3 menit
- (4) Alkohol absolut : 3 menit
- (5) Alkohol 95% : 3 menit
- (6) Alkohol 95% : 3 menit
- (7) Bilas air hangat : 10-15 menit
- (8) *Mayer's Haematoksilin* : 10 menit

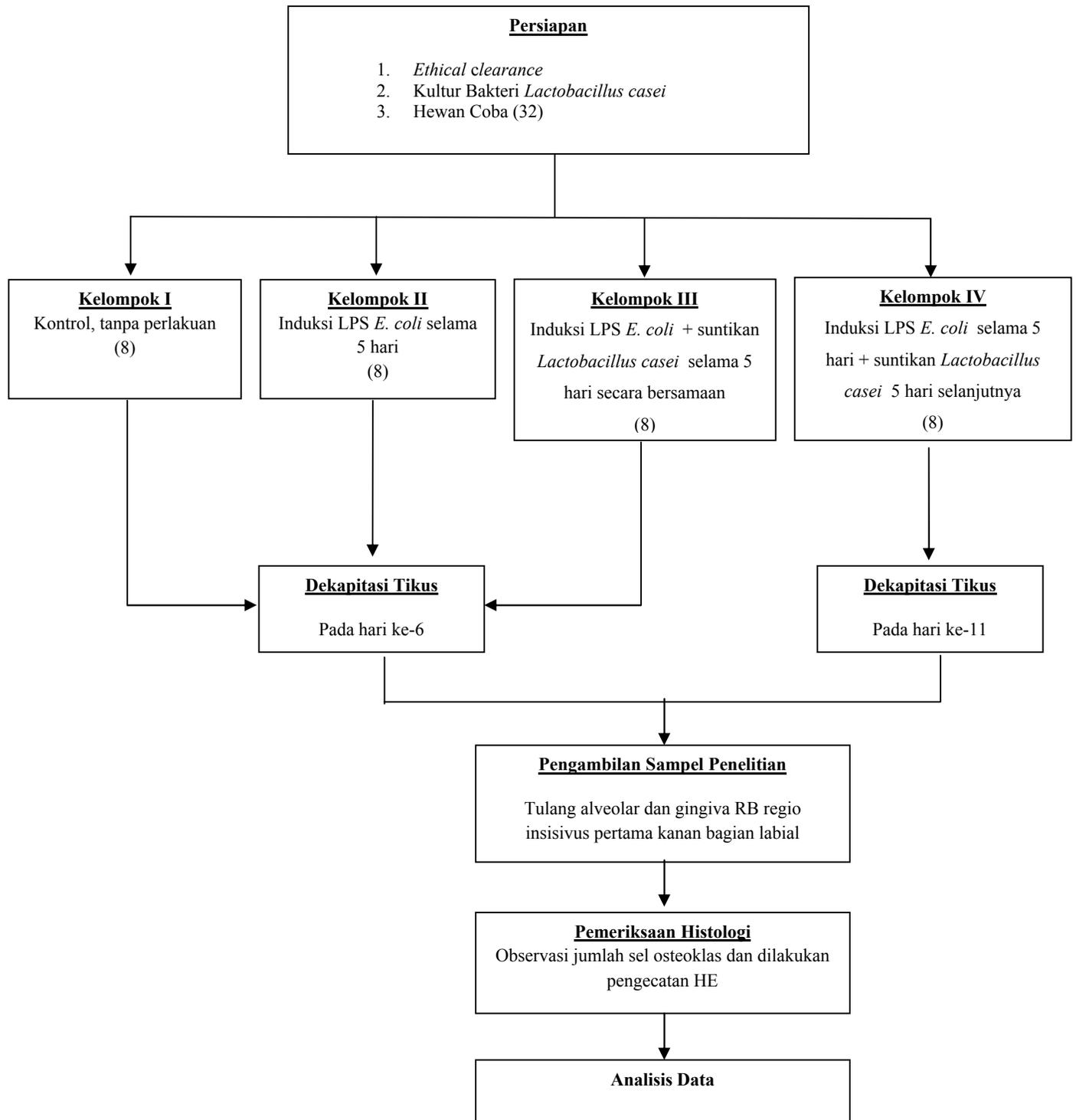
- (9) Bilas air hangat : 20 menit
- (10) Eosin : 15 detik-2 menit
- (11) Bilas air hangat : 20 menit
- (12) Alkohol 95% : 2-3 menit
- (13) Alkohol 95% : 2-3 menit
- (14) Alkohol absolut : 2-3 menit
- (15) Alkohol absolut : 2-3 menit
- (16) Xylol : 3 menit
- (17) Xylol : 3 menit
- (18) Xylol : 3 menit
- (19) *Mounting* menggunakan cairan *Entellan* lalu ditutup dengan obyek glass.

Sedangkan hasil pengecatan yang didapatkan antara lain: inti sel (biru), eritrosit (merah), sitoplasma (merah), dan otot (merah). Jumlah sel osteoklas dihitung dengan bantuan mikroskop cahaya pada 5 *slide* dari masing-masing ulangan.

3.9 Analisis Data

Data hasil penelitian ini akan diuji normalitasnya dengan uji Kolmogrov-Smirnov dan diuji homogenitasnya dengan uji Levene. Kemudian dianalisis menggunakan *one way* ANOVA dengan tingkat kepercayaan 95% ($p < 0,05$), apabila terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) dilanjutkan dengan uji Tukey HSD.

3.10 Bagan Alur Penelitian



Gambar 3.1 Bagan alur penelitian

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

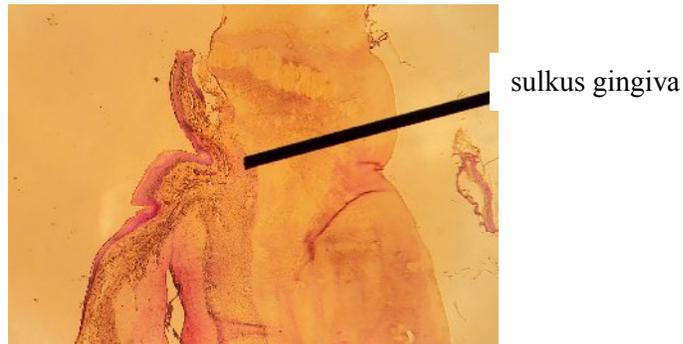
Berdasarkan hasil penelitian pengaruh probiotik terhadap jumlah sel osteoklas tulang alveolar tikus wistar jantan yang diinduksi LPS yang telah dilaksanakan pada bulan Agustus 2010-Maret 2011, diperoleh data sebagaimana tercantum pada Tabel 4.1

Tabel 4.1 Hasil perhitungan rerata jumlah sel osteoklas tulang alveolar tikus wistar jantan

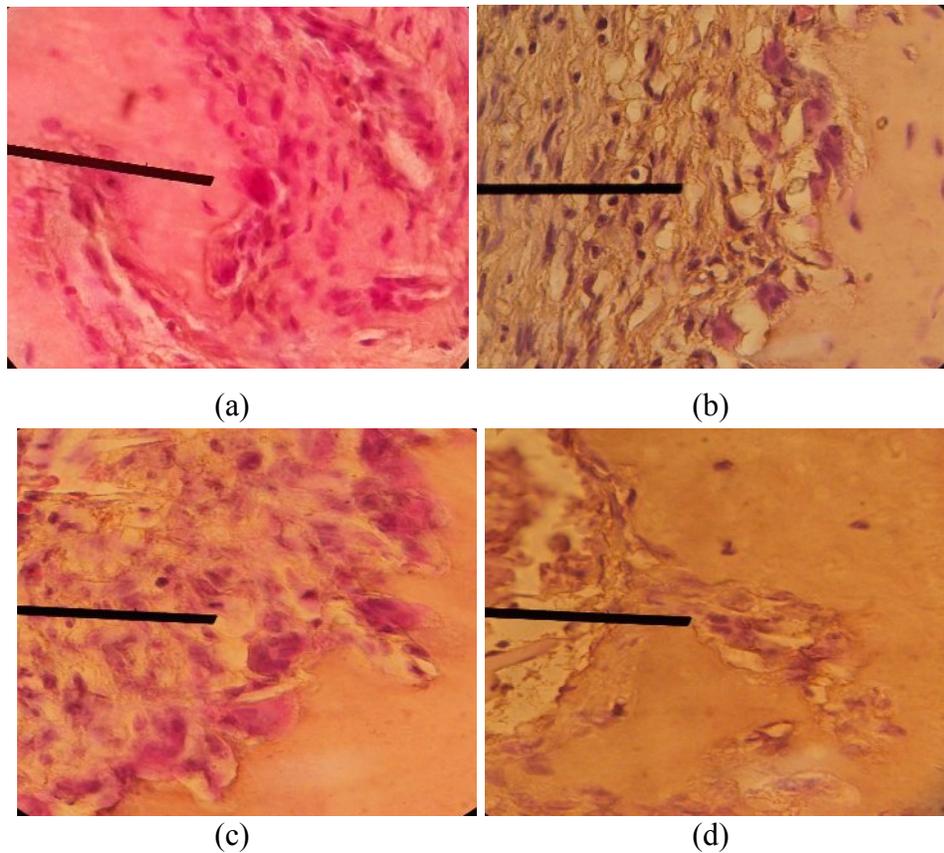
No.	Kelompok Perlakuan	N	Rerata Jumlah Sel Osteoklas	Std. Deviasi
1	I	8	1,04	0,27
2	II	8	2,21	0,89
3	III	8	2,91	0,54
4	IV	8	3,08	0,79

Keterangan: Kelompok I : Kontrol
Kelompok II : Induksi LPS
Kelompok III : Induksi LPS dan *L. casei* secara bersamaan selama 5 hari
Kelompok IV : Induksi LPS selama 5 hari dilanjutkan *L. casei* 5 hari berikutnya

Tabel 4.1 menunjukkan bahwa jumlah sel osteoklas terendah adalah pada perlakuan kontrol sebesar 1,04 sel, kemudian perlakuan induksi LPS sebesar 2,21 sel, secara bersamaan induksi LPS dan *L. casei* secara berturut - turut sebesar 2,91 sel, dan jumlah sel osteoklas terbanyak pada perlakuan induksi LPS dan *L. casei* secara berurutan sebesar 3,08 sel. Secara mikroskopis gambaran histologi dari sel limfosit dilihat pada gambar berikut:



Gambar 4.1 Daerah perlakuan induksi LPS dan *L. Casei* (pembesaran 400x)



(a) Jumlah sel osteoklas tulang alveolar pada perlakuan kontrol; (b) Jumlah sel osteoklas tulang alveolar pada perlakuan pemberian LPS selama 5 hari; (c) Jumlah sel osteoklas tulang alveolar pada perlakuan pemberian LPS dan *L. casei* secara bersamaan selama 5 hari; (d) Jumlah sel osteoklas tulang alveolar pada perlakuan pemberian LPS selama 5 hari dilanjutkan *L. casei* 5 hari berikutnya.

Gambar 4.2 Gambaran mikroskopis sel osteoklas pada berbagai kelompok (pengecatan HE, pembesaran 1000x)

4.1.1 Analisis Data

Data hasil penelitian terlebih dahulu dilakukan uji normalitas serta homogenitas terhadap data hasil penelitian. Uji normalitas menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* sedangkan untuk uji homogenitas menggunakan uji Levene. Hasil uji *Kolmogorov-Smirnov* menunjukkan probabilitas masing-masing kelompok perlakuan, yaitu kontrol, induksi LPS selama 5 hari, induksi LPS dan *L. casei* secara bersamaan selama 5 hari, serta induksi LPS selama 5 hari dilanjutkan *L. casei* 5 hari berikutnya, adalah lebih besar dari 0,05 ($p > 0,05$). Nilai tersebut mempunyai arti bahwa semua data ditarik dari distribusi yang simetris atau normal sebagaimana hasil analisis yang tersaji pada Lampiran B.2. Sedangkan pada hasil uji *Levene* terlihat bahwa *Levene* test adalah 1,284 dengan nilai probabilitas atau signifikansi sebesar 0.299 atau 29% yang lebih besar daripada nilai $\alpha = 0.05 = 5\%$ yang ditetapkan. Berarti keempat perlakuan terhadap sel osteoklas identik atau memiliki varians yang sama sebagaimana hasil analisis yang tersaji pada Lampiran B.3.

Karena data yang diperoleh telah diketahui normal dan homogen, maka selanjutnya dilakukan uji *one way ANOVA* untuk mengetahui pengaruh probiotik terhadap jumlah sel osteoklas tulang alveolar tikus wistar jantan yang diinduksi LPS. Hasil analisis *one way ANOVA* tercantum pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil uji *one way ANOVA* terhadap rerata jumlah sel osteoklas tulang alveolar tikus wistar jantan pada perlakuan kontrol, induksi LPS selama 5 hari, induksi LPS dan *L. casei* secara bersamaan selama 5 hari, serta induksi LPS selama 5 hari dilanjutkan *L. casei* 5 hari berikutnya.

	Kuadrat Jumlah	Derajat Kebebasan	Kuadrat Rerata	P
Antar Perlakuan	21,979	3	7,326	0.000*
Dalam Perlakuan	11,471	28	0,410	
Jumlah	33,450	31		

Keterangan: * : berbeda signifikan ($p < 0,05$)

Hasil dari uji *one way ANOVA* di atas menunjukkan angka probabilitas yang didapat adalah 0,000 (Lampiran B.4). Angka probabilitas yang lebih kecil daripada

0,05 ($p < 0,05$) mempunyai arti adanya perbedaan signifikan terhadap rerata jumlah sel osteoklas tulang alveolar tikus wistar jantan pada perlakuan kontrol, induksi LPS selama 5 hari, induksi LPS dan *L. casei* secara bersamaan selama 5 hari, serta induksi LPS selama 5 hari dilanjutkan *L. casei* 5 hari berikutnya.

Untuk mengetahui kelompok yang mempunyai perbedaan signifikan tersebut, selanjutnya dilakukan uji beda *Tukey HSD* dengan tingkat kepercayaan 95% dan hasilnya ditunjukkan pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Signifikansi uji beda *Tukey HSD* terhadap rerata jumlah sel osteoklas tulang alveolar tikus wistar jantan

Perlakuan	Kelompok I	Kelompok II	Kelompok III	Kelompok IV
I	-	0.00*	0.00*	0.00*
II	0.00*	-	0,066	0.00*
III	0.00*	0,066	-	0.999
IV	0.00*	0.00*	0,999	-

Keterangan: * : berbeda signifikan ($p < 0,05$)
 Kelompok I : Kontrol
 Kelompok II : Induksi LPS
 Kelompok III : Induksi LPS dan *L. casei* secara bersamaan selama 5 hari
 Kelompok IV : Induksi LPS selama 5 hari dilanjutkan *L. casei* 5 hari berikutnya

Hasil dari uji *Tukey HSD* menunjukkan probabilitas antar kelompok perlakuan kurang dari 0,05 ($p < 0,05$) artinya terdapat perbedaan signifikan rerata jumlah sel osteoklas. Akan tetapi, pada kelompok II dan III menunjukkan probabilitas sebesar 0,066 ($p > 0,05$) artinya tidak terdapat perbedaan signifikan rerata jumlah sel osteoklas pada kedua kelompok perlakuan tersebut.

4.2 Pembahasan

Hasil penelitian ini menunjukkan adanya pengaruh pemberian probiotik terhadap jumlah sel osteoklas tulang alveolar tikus wistar jantan yang diinduksi LPS.

Bakteri probiotik *L. casei* dapat meregulasi keseimbangan respon imun lokal dan sistemik dalam melawan infeksi dengan cara melepaskan sitokin proinflamatori dan aktivasi *NK cells* untuk memfagositosis bakteri patogen (Winkler dkk, 2007). Selain itu, bakteri probiotik juga dapat membentuk biofilm sebagai lapisan pertahanan mukosa mulut terhadap penyakit rongga mulut. Lapisan biofilm tersebut dapat mencegah bakteri patogen menginvasi jaringan dengan cara mengisi rongga-rongga kosong pada jaringan yang dapat dimasuki bakteri patogen. Selain itu, biofilm dapat mencegah pertumbuhan bakteri kariogenik dan bakteri penyebab penyakit periodontal (Flichy-Fernández dkk, 2010).

Pada perlakuan pemberian LPS selama 5 hari (kelompok II), jumlah sel osteoklas pada tulang alveolar meningkat, jumlahnya lebih banyak daripada kelompok kontrol yang tanpa diberi LPS. Hal ini sesuai dengan penelitian Fine dkk. dalam Kusumawardani (2005) yang menunjukkan bahwa level LPS berkorelasi dengan persentase bakteri Gram negatif pada jaringan periodontal sehat dan periodontitis. Hal ini menunjukkan bahwa LPS mempunyai aktivitas biologis yang berperan pada patogenesis penyakit periodontal.

Menurut Fuller (1997), bakteri Gram negatif merupakan stimulus efektif dalam produksi derivat sitokin dan makrofag. LPS dan senyawa lain dapat meningkatkan akses ke jaringan gingival, mengawali dan menimbulkan imunoinflamasi yang menyebabkan produksi sitokin pro inflamatori dengan kadar tinggi. Kemudian LPS akan menginduksi produksi matrik metalloproteinase sehingga terjadi destruksi jaringan ikat, ligamen periodontal dan resorpsi tulang alveolar.

Pada perlakuan pemberian LPS dan probiotik secara bersamaan selama 5 hari (kelompok III) didapatkan bahwa jumlah sel osteoklasnya lebih tinggi daripada jumlah sel osteoklas pada perlakuan pemberian LPS selama 5 hari (kelompok II) namun tidak ada perbedaan yang bermakna, hal tersebut dapat dilihat pada hasil

signifikansi uji beda *Tukey HSD* (Tabel 4.3) yang diperoleh menunjukkan bahwa pada kelompok II dan III menunjukkan probabilitas sebesar 0,066 ($p > 0.05$) artinya tidak terdapat perbedaan signifikan rerata jumlah sel osteoklas pada kedua kelompok perlakuan tersebut. Hal ini disebabkan karena adanya peningkatan jumlah sel osteoklas setelah diinduksi LPS. Namun, karena pada kelompok III diberikan probiotik pada waktu yang hampir bersamaan, maka peningkatan jumlah sel osteoklas tidak berbeda bermakna, oleh karena kemampuan probiotik untuk segera menetralsisir inflamasi akibat induksi LPS.

Pada penelitian lainnya dari Tomita (1993) dalam Fuller (1997), *L. casei* dapat digunakan untuk perawatan sel endotel vaskuler pada tikus yang mengalami arteritis koroner. Dalam penelitian tersebut, *L. casei* terbukti dapat menstimulasi sel PMN pada sel endotel, serta meningkatkan molekul adhesi interseluler-1 (ICAM-1). Peningkatan bahan-bahan tersebut dapat mengurangi peradangan pada pembuluh koroner hewan coba. Probiotik mengontrol pertumbuhan bakteri patogen untuk mencegah gingivitis. Probiotik memiliki pH yang rendah sehingga bakteri plak tidak dapat membentuk dental plak dan kalkulus yang menyebabkan penyakit periodontal.

Probiotik juga memproduksi antioksidan, dimana antioksidan dapat mencegah stain dan pembentukan plak dengan cara menetralsisir dari elektron bebas yang dibutuhkan untuk pembentukan mineral atau kalkulus. Selain itu probiotik dapat merusak *putrescence odors* dengan memfiksasi gas yang toksik dan merubahnya menjadi gas yang diperlukan untuk metabolisme (Anonim, 2001; Endaryanto dan Harsono, 2006).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa rata-rata jumlah osteoklas terbesar terdapat pada kelompok IV yaitu tikus wistar jantan setelah diinduksi LPS dan dilanjutkan dengan probiotik pada 5 hari berikutnya. LPS akan menstimulasi peningkatan jumlah RANKL osteoblas yang berfungsi untuk pembentukan osteoklas, sehingga osteoblas dalam melakukan differensiasi dan proliferasi untuk memperbanyak diri terganggu (Indayani, 2008), hal ini disebabkan pada 5 hari berikutnya probiotik masih belum mampu meregulasi keseimbangan respon imun

secara sistemik untuk segera menetralsisir inflamasi yang ditimbulkan oleh LPS. Terdapat aktivitas destruktif oleh LPS pada sel osteoklas sehingga tidak dapat segera dinetralsisir oleh aktivitas antimikroba probiotik *L. casei*. Peningkatan jumlah sel osteoklas tidak segera dihambat oleh probiotik yang diberikan setelah hari kelima induksi LPS, sehingga sel dapat terus berproliferasi sampai jumlahnya lebih tinggi daripada kelompok III yang diberi LPS dan probiotik secara bersamaan selama 5 hari (Tabel 4.3).

Menurut Kusuma dkk. (2008) probiotik itu sendiri dapat menurunkan jumlah sel osteoklas tulang alveolar pada tikus wistar jantan apabila waktu pengamatan penelitian dilakukan pemberian LPS pada hari pertama kemudian diikuti probiotik pada hari ke 3 sampai hari ke 9 (7 hari berturut-turut). Selain itu, pada Arul dkk. (2001) dijelaskan bahwa overproduksi sitokin proinflamatori ini menyebabkan aktivasi respon sistemik yang mempengaruhi permeabilitas vaskuler dan menginduksi perubahan metabolik yang menyebabkan kematian sel.

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat ditarik kesimpulan bahwa terdapat pengaruh pemberian probiotik *L.casei* yaitu meningkatkan jumlah sel osteoklas tulang alveolar tikus wistar jantan yang diinduksi LPS. Pemberian probiotik secara bersamaan dengan LPS selama 5 hari lebih efektif dalam mencegah meningkatnya jumlah osteoklas tulang alveolar tikus wistar jantan dibandingkan dengan pemberian probiotik yang diberikan 5 hari berikutnya setelah induksi LPS.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai:

- Pengaruh probiotik terhadap jumlah sel osteoklas tulang alveolar tikus wistar jantan yang diinduksi bakteri penyebab penyakit periodontal lainnya.
- Pengaruh probiotik terhadap jumlah sel osteoklas tulang alveolar tikus wistar jantan yang diinduksi probiotik dengan jangka waktu penelitian yang lebih lama.
- Pengaruh probiotik terhadap jumlah osteoklas tulang alveolar tikus wistar jantan dengan perlakuan pemberian LPS yang sebelumnya diberikan probiotik terlebih dahulu.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. K. and Lichtman, A. H., 2001, *Basic Immunology, Function and Disorders of the Immune System*, Philadelphia, W. B. Saunders Co. <http://www.scribd.com/doc/47176191/Imunitas>. [29 April 2011]
- Amin, M.N., Sari, D.S., Meilawaty, Z. 2010. Prospek Probiotik dalam Pencegahan Agresifitas Resorpsi Osteoklastik Tulang Alveolar yang Diinduksi Lipopolisakarida (LPS) pada Penyakit Periodontal. *Dentika Dental Journal. Vol 15, No. 2, 2010: 150-153*
- Anonym. 2011. *Lactobacillus casei* [serial online]. <http://microbiologyglossary.wikispaces.com/Lactobacillus+casei>. [31 April 2011]
- Arina, Y.M.D. 2005. Mekanisme Pertahanan Jaringan Periodontal. *Stomatognatic (J. KG. Unej Sept 2005)*, 2(3): 14-18
- Arnett, T., 2003. *Bone Structure and Bone Remodelling*. London: University College London. <http://ucl.ac.uk/ani/GB's%20PDF%20file%20copies/CV1420.pdf>. [29 April 2011]
- Arul, M.C., Markus, H.L., Chandan, K.S., Terrence, R.B., Sunita, S.S., Vidya, J.S., Vaishale, A.P., dan Peter A.W. 2001. Molecular Signatures of Sepsis Multiorgan Gene Expression Profiles of Systemic Inflammation. *Am. J. Pathol. Oct 2001, 159(4):1199-1209*
- Bajpai, R. N. 1991. *Osteologi Tubuh Manusia*. Terjemahan Ridwan Harianto dari "Human Osteologi (1990)". Jakarta: Binarupa Aksara. Hal 8-17
- Baron, R., 2006, *Anatomy and Ultrastructure of Bone Histogenesis, Growth and Remodeling*, www.endotext.org/parathyroid1/chOISO2.html. [20 April 2011]
- Carranza, F.A., Newman, M.J., dan Takei H.H. 2002. *Clinical Periodontology*. (Edisi Kesepuluh). Philadelphia: W.B. Saunders Company Hal 133-134

- Djais, A.I. 2006. Periodontitis sebagai Faktor Resiko Jantung Koroner Aterosklerosis. *J. PDGI*, 56(2): 53-59
- Endayanto, A., Harsono, A, 2006, Prospek Probiotik dalam Pencegahan Alergi Melalui Induksi Aktif Toleransi Immunologis, <http://www.pediatrik.com>. [20 April 2007]
- Fitria, E. 2006. *Kadar IL-1B dan IL-8 sebagai Penanda Periodontitis, Faktor Resiko Kelahiran Prematur. Jurnal PDGI*. 56 (2):60-64
- Flichy-Fernández, A.J., Alegre-Domingo, T., Peñarrocha-Oltra, D., dan Peñarrocha-Diago, M. 2010. Probiotic Treatment in the Oral Cavity: An Update. *J. Oral Med. Pathology* 2010, 15 (5): 272-275
- Fuller, R. 1997. *Probiotic 2: Applications and Practical Aspects*. Great Britain: Chapman & Hall. p 439 - 442
- Ganong , W.F. 1995. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Edisi 14. Terjemahan Petrus Andriato dari “Review Of Medical Physiology”. Jakarta: EGC. Hal 366-377
- Indahyani, D.E., Santoso, A.S., Utoro, T., dan H.N.E., M. 2007. Pengaruh Induksi Lipopolisakarida (LPS) terhadap Osteopontin Tulang Alveolaris Tikus pada Masa Erupsi Gigi. *Ind. J. Dent.* 2007, 14(1): 2-7
- Klaus H, dkk. 1989. *Color Atlas of Dental Medicine 1 Periodontology 2nd ed*. Theme Medical Publisher Inc, New York. http://repository.unpad.ac.id/bitstream/handle/123456789/974/resorpsi_tulang_alveolar.pdf?sequence=1. [20 April 2011]
- Kurniawati, A. 2005. Hubungan Kehamilan dan Kesehatan Periodontal. *J. Biomed. Unej Mei 2005, II(2): 43-51*
- Kusuma, T.S., Riawan, W., Ranuh, I.G.M.R.G., dan Surono, I.S. 2008. Kemampuan dari *Lactobacillus plantarum* GALUR IS-10506 dan IS-20506 dalam Menghambat Aktivasi NfeB, Meregulasi Turun TNF-Receptor 1 (TNF-R1) dan Ooptosis pada Brush Sel Epitel Border *Rattus novergicus* yang Diinduksi LPS. *J. Ked. Braw. Apr 2008, XXIV (1): 22-29*
- Kusumawardani, Banun. 2005. Pengaruh Pajanan Lipopolisakarida Bakteri Gram Negatif terhadap Viabilitas Sel pada Kultur Fibroblas Gingiva. *Stomatognatic (J. KG. Unej)*, 2 (3): 14-18

- Kusumawati, N., Jenie, B.S.L., Setyahadi, S., Hariyadi, R.D. 2008. Aktivitas Antibakteri Laktobaseli Asal Makanan Fermentasi Indonesia Terhadap Patogen Dan Pengaruhnya Terhadap Mikroflora Usus Tikus. *J. Obat Bahan Alam* 2008, 7(1):69-75
- Murray, J. A. and Wilton, J. M. A., 2003. LPS from Periodontal Pathogen *P. gingivalis* Prevents Apoptosis of HL60- Derived Neutrophils In Vitro, *Infect Immun*; 71(12): 7232-7235
- Notoadmodjo, S. 2002. *Metodologi Penelitian*. (Edisi Revisi). Jakarta: Penerbit Rineka Pustaka. p 59-60
- Rahardja, S. 2002 “Pengaruh Hormon Paratiroid, Kalsitonin, dan 1,25 Dihidrokokalsiferol pada resorpsi Tulang.” Dalam *Majalah Ilmiah Kedokteran Gigi. Edisi FORIL VII*. Jakarta. Hal 17-20
- Ralston, H., 2002. *Bone Anatomy and Cell Biology*, Department of Medicine and Therapeutics, University of Aberdeen. Hal 569-577
- Roelan, B, O., 2002,” Aspek Immunologik Hubungan Beberapa Penyakit Periodntal Dan Penyakit sistemik”, *Majalah Kedokteran Gigi Edisi Khusus Foril: 15-21*
- Rifas, L. 2002. *Cell anMolecular Biology Of The Osteoblast*. Department of internal Medicine. <http://www.Yahoo.com/research.medicine.wustl.edu/.../Abstracts>, (diakses 20 Maret 2003)
- Steel, R.G.D. & Torrie, J.H.. 1995. *Prinsip dan Prosedur Statistika*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama. p 145 - 147
- Sugano, N., Matsuoka, T., Koga, Y., dan Ito, K, 2007, Effects of Probiotics on Periodontal Disease. *Japan. J. Dent.*, 43: 123-126
- Syafriadi, M., Subiyantoro, S., Setyorini, D., dan Joelijanto, R. 2008. *Petunjuk Praktikum Patologi Anatomi, Degenerasi dan Radang*. Jember: FKG Universitas Jember. Tidak dipublikasikan. p 2 - 7
- Varma B. R. R., Nayak R. P. 2002. Current Concepts In Periodontics 1st ed. Arya Publishing House, New Delhi. http://repository.unpad.ac.id/bitstream/handle/123456789/974/resorpsi_tulang_alveolar.pdf?sequence=1. [20 April 2011]

- Wiley, John and sons. 2003. *A cytochemical assay for osteoclast cathopsin K activity*. National library of medicine. <http://www.antibodybeyond.com/reviews/cell-markers/osteoclast-marker.htm>. [20 April 2011]
- Winarsih, Priosoeryanto, Lay, Wibaeen, Kompiang. 2007. Pengaruh Probiotik Terhadap Fagositosis Sel Polimorfonuklear Ayam broiler. *J. Med. Vet. Ind.* 2007, 11(2): 37-4
- Winkler, P., Ghadimi, D., Schrezenmeir, J., Kraehenbuhl, J.P. 2007. Molecular dan Cellular Basis of Microflora-Host Interactions. *J. Nutr.* 2007, 137: 756S–772S

Lampiran A

Surat keterangan *Ethical Clearance*



KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KETERANGAN KELOMPOK ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")
No. 0252/EC/KEPK-SI-JK/07/2010

Setelah Tim Etik Penelitian Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya mempelajari dengan seksama rancangan penelitian yang diuraikan :

Judul : Pengaruh Probiotik Terhadap Jumlah Sel Osteoklas Pada Tulang Alveolar Yang diinduksi Liposakarida (*Penelitian experimental*)
 Peneliti : Darra Ayu Ninyasari
 NIM : 971610101067
 Unit / Lembaga : Jurusan Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
 Tempat Penelitian : Laboratorium Biomedik Universitas Jember

Maka dengan ini menyatakan bahwa penelitian tersebut telah memenuhi syarat atau laik etik.

Malang,

22 JUL 2010

Ketua,

Komisaris Divisi I,



Prof. Dr. Teguh W. Sardjono, DTM&H, MSc, SpParK
NIP.195204101980021001

Lampiran B. Hasil Penghitungan Jumlah sel osteoklas

Judul Penelitian : Pengaruh Probiotik (*Lactobacillus Casei*) Terhadap Jumlah Sel osteoklas tulang alveolar Tikus Wistar Jantan Yang Diinduksi Lipopolisakarida

Nama Peneliti / NIM : Darra Ayu Nindyasari / 071610101067

Dosen pembimbing : 1. drg. M. Nurul Amin, M.Kes. (DPU)
2. drg. Amandia Dewi Permana Shita (DPA)

Fak. / Universitas : Fakultas Kedokteran Gigi / Universitas Jember

Tahun Penelitian : 2011

Perlakuan	Preparat								Rerata
	1	2	3	4	5	6	7	8	
I	1,33	0,67	0,67	1,33	1,00	1,00	1,33	0,67	1,00
II	1,67	2,00	1,33	2,00	2,00	4,00	2,33	2,33	2,21
III	3,00	3,00	2,33	2,33	3,33	4,00	3,33	3,00	2,91
IV	3,67	3,00	2,33	2,67	2,67	4,67	3,33	2,33	3,08

Jember, 17 April 2011

Mengetahui,

Penanggung Jawab
Kepala Bagian Lab. Histologi

Pemeriksa

drg. Happy Harmono, M.Kes
NIP. 196709011997021001

Sri Wahyuningsih, A. Md
NIP. 197601211999032009

DATA JUMLAH SEL OSTEOKLAS

KELOMPOK	LAPANG PANDANG	RERA-TA	KELOMPOK	LAPANG PANDANG	RERA-TA
I.1	1	1,33	II.1	3	1,67
	2			1	
	1			1	
I.2	1	0,67	II.2	3	2,00
	0			1	
	1			2	
I.3	1	0,67	II.3	2	1,33
	0			1	
	1			2	
I.4	2	1,33	II.4	2	2,00
	1			1	
	1			3	
I.5	2	1,00	II.5	2	2,00
	0			1	
	1			3	
I.6	1	1,00	II.6	5	4,00
	1			4	
	1			3	
I.7	2	1,33	II.7	3	2,33
	1			2	
	1			2	
I.8	1	0,67	II.8	2	2,33
	0			2	
	1			3	

III.1	3	3,00	IV.1	3	3,67
	2			5	
	4			3	
III.2	2	2,33	IV.2	2	3,00

	3			2	
	4			3	
III.3	2	2,33		3	2,33
	2			2	
	3			2	
III.4	3	2,33		2	2,67
	2			3	
	2			3	
III.5	3	3,33		2	2,67
	4			3	
	3			3	
III.6	4	4,00		5	4,67
	5			5	
	3			4	
III.7	4	3,33		3	3,33
	4			4	
	3			3	
III.8	4	3,00		3	2,33
	3			2	
	2			3	

Jember, 17 April 2011

Mengetahui,

Penanggung Jawab
Kepala Bagian Lab. Histologi

Pemeriksa

drg. Happy Harmono, M.Kes
NIP. 196709011997021001

Sri Wahyuningsih, A. Md
NIP. 197601211999032009

Lampiran C. Analisis Data Penelitian

C.1 Rerata Jumlah Sel Osteoklas tulang alveolar Pada Berbagai Perlakuan

PREPARAT	PERLAKUAN			
	I	II	III	IV
1	1.33	1.67	3.00	3.67
2	0.67	2.00	3.00	3.00
3	0.67	1.33	2.33	2.33
4	1.33	2.00	2.33	2.67
5	1.00	2.00	3.33	2.67
6	1.00	4.00	4.00	4.67
7	1.33	2.33	3.33	3.33
8	0.67	2.33	3.00	2.33
RERATA	1.04	2.21	3.04	3.08
SD	0.27	0.89	0.54	0.79

C.2 Uji Normalitas Kolmogorov-Smirnov

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Kontrol	LPS	Bersamaa n	Beruruta n
N		8	8	8	8
Normal Parameters(a,b)	Mean	1,0413	2,7488	3,4988	3,1263
	Std. Deviation	,27539	1,64922	1,35723	1,15603
Most Extreme Differences	Absolute	,228	,350	,299	,168
	Positive	,185	,350	,299	,168
	Negative	-,228	-,195	-,195	-,159
Kolmogorov-Smirnov Z		,644	,991	,847	,477
Asymp. Sig. (2-tailed)		,801	,280	,470	,977

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

C.3 Uji Homogenitas Levene

Descriptives

Osteoklas

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	8	1,0413	,27539	,09737	,8110	1,2715	,67	1,33
LPS	8	2,2075	,79563	,28130	1,5423	2,8727	1,33	4,00
Bersamaan	8	3,0400	,54809	,19378	2,5818	3,4982	2,33	4,00
Berurutan	8	3,0838	,79338	,28050	2,4205	3,7470	2,33	4,67
Total	32	2,3431	1,03877	,18363	1,9686	2,7176	,67	4,67

Test of Homogeneity of Variances

Osteoklas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,284	3	28	,299

C.4 Analisis One Way ANOVA

ANOVA

Osteoklas

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	21,979	3	7,326	17,883	,000
Within Groups	11,471	28	,410		
Total	33,450	31			

C.5 Uji Beda Tukey HSD

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Osteoklas

(I) Perlakuan (J) Perlakuan		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
					Lower Bound	Upper Bound	
Tukey HSD	Kontrol	LPS	-1,16625*	,32003	,006	-2,0400	-,2925
		Bersamaan	-1,99875*	,32003	,000	-2,8725	-1,1250
		Berurutan	-2,04250*	,32003	,000	-2,9163	-1,1687
	LPS	Kontrol	1,16625*	,32003	,006	,2925	2,0400
		Bersamaan	-,83250	,32003	,066	-1,7063	,0413
		Berurutan	-,87625*	,32003	,049	-1,7500	-,0025
	Bersamaan	Kontrol	1,99875*	,32003	,000	1,1250	2,8725
		LPS	,83250	,32003	,066	-,0413	1,7063
		Berurutan	-,04375	,32003	,999	-,9175	,8300
LSD	Berurutan	Kontrol	2,04250*	,32003	,000	1,1687	2,9163
		LPS	,87625*	,32003	,049	,0025	1,7500
		Bersamaan	,04375	,32003	,999	-,8300	,9175
	Kontrol	LPS	-1,16625*	,32003	,001	-1,8218	-,5107
		Bersamaan	-1,99875*	,32003	,000	-2,6543	-1,3432
		Berurutan	-2,04250*	,32003	,000	-2,6981	-1,3869
	LPS	Kontrol	1,16625*	,32003	,001	,5107	1,8218
		Bersamaan	-,83250*	,32003	,015	-1,4881	-,1769
		Berurutan	-,87625*	,32003	,011	-1,5318	-,2207
LSD	Bersamaan	Kontrol	1,99875*	,32003	,000	1,3432	2,6543
		LPS	,83250*	,32003	,015	,1769	1,4881
		Berurutan	-,04375	,32003	,892	-,6993	,6118
	Berurutan	Kontrol	2,04250*	,32003	,000	1,3869	2,6981
		LPS	,87625*	,32003	,011	,2207	1,5318
		Bersamaan	,04375	,32003	,892	-,6118	,6993

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

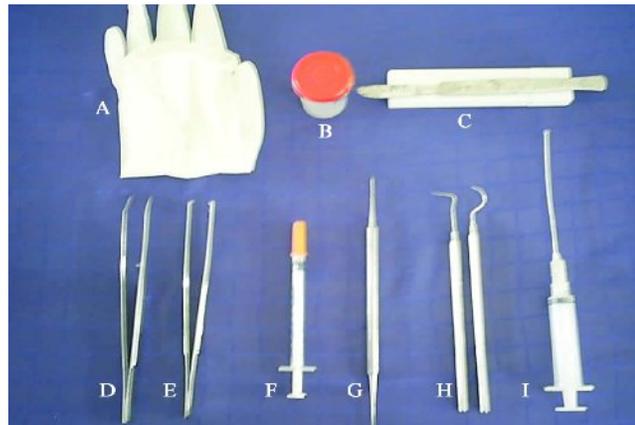
Homogeneous Subsets

Osteoklas

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Tukey HSD ^a Kontrol	8	1,0413		
LPS	8		2,2075	
Bersamaan	8		3,0400	3,0400
Berurutan	8			3,0838
Sig.		1,000	,066	,999

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 8,000.

Lampiran D. Foto Alat Penelitian

Gambar D.1 A. Sarung tangan; B. Wadah jaringan; C. *Blade, scalpel*; D. Pinset cirurgis; E. Pinset anatomis; F. *Syringe* insulin 30G merek Terumo; G. Escavator; H. Sonde lurus dan setengah lingkaran; I. Sonde lambung.



Gambar D.2 A. Petridish; B. Neirbeken.



Gambar D.3 Mikroskop binokuler merek Leica



Gambar D.4 A. Neraca; B. Gelas ukur; C. Kapas; D. Tempat air



Gambar D.5 Inkubator (Binder, Jerman)



Gambar D.6 Mikrotom (Leica RM 2135)



Gambar D.7 *Waterbath* (Memmert)



Gambar D.8 *Hot Plate* (Labinco B.V., Belanda)

Lampiran E. Foto Bahan Penelitian



Gambar E.1 Aquabidest; B. Ketamin (*anestesi inject*);



Gambar E.2 A. *Decalsification agent*; B. Parafin; C. *Eosine 5%*; D. *Formalin 10%*; E. *Minyak emersi*; F. *Haematoxilin*; G. *Entelan*; H. *Deck glass*; I. *Object glass*



Gambar E.3 A. Alkohol 70%; B. Aquabidest; C. Aquadest steril



Gambar E.4 Tikus wistar jantan dan kandang tikus