



**PENGARUH PEMAPARAN BAKTERI *Porphyromonas gingivalis*
TERHADAP PRODUKSI SUPEROKSID NETROFIL**

SKRIPSI

Oleh

**Nahdiya Fitriyana
NIM 071610101058**

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



**PENGARUH PEMAPARAN BAKTERI *Porphyromonas gingivalis*
TERHADAP PRODUKSI SUPEROKSID NETROFIL**

SKRIPSI

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

Oleh :

**Nahdiya Fitriyana
NIM 071610101058**

**BAGIAN PERIODONSIA
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER**

2012

PERSEMBAHAN

1. Skripsi ini saya persembahkan untuk Allah SWT yang telah memberikan segala nikmat dan rahmat-NYA dan junjungan kita Rasulullah SAW untuk syafaatnya di kemudian hari.
2. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
3. Tak lupa ku persembahkan pada orang tuaku, Ibunda Hj. Ellys Junaidah, Amd.Keb dan Ayahanda tercinta H. Nurchasan Achmad atas do'a, cinta, kasih, keringat serta air mata yang tak henti-hentinya mengiringi setiap langkahku Serta Kakakku Achmad Zukruf Firdausi dan adikku Ika Rachmi Nirmala atas semangat dan dukungan yang diberikan.
4. Persembahan spesial untuk dosen pembimbing skripsiku, drg. Yuliana MD Arina, M.Kes dan drg. Happy Harmono, M.Kes yang senantiasa meluangkan waktu untuk kesempurnaan skripsiku serta memberikan bimbingan yang tidak kenal lelah, membuka wawasan hidupku atas pengetahuan yang ingin aku ketahui, dan Dr. drg. I.D.A Susilawati, M.Kes yang telah memberikan ide penelitian sehingga memberikan kesempatan untuk melakukan hal terbaik dalam hidup.

MOTTO

Menunda Pekerjaan, Menabung Kesulitan.*)

Sekeras apapun kau berusaha jika tidak ada kehendak Allah, maka hal yang kau cita-citakan tak akan terjadi, oleh karena itu sering berdoalah kepadaNya,
Tawakkal,dan Bersabar**)

Jika ada permasalahan dalam hidupmu, katakan pada hatimu ‘semua akan baik-baik saja’ maka kekuatan bertahan akan terkumpul***)

*) Penulis.

***) Ibundaku, Ellys Junaidah.2010

****) 3 idiots

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Nahdiya Fitriyana

NIM : 071610101058

Menyatakan dengan sungguh-sungguh bahwa karya ilmiah yang berjudul: *Pengaruh Pemaparan Bakteri Porphyromonas gingivalis Terhadap Produksi Superoksid Netrofil* 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 keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 31 Januari 2012

Yang menyatakan,

Nahdiya Fitriyana

NIM. 071610101058

SKRIPSI

PENGARUH PEMAPARAN BAKTERI *Porphyromonas gingivalis* TERHADAP PRODUKSI SUPEROKSID NETROFIL

Oleh

Nahdiya Fitriyana
NIM 071610101058

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : drg. Yuliana MD. Arina, M.Kes.

Dosen Pembimbing Anggota : drg. Happy Harmono, M.Kes.

PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul "Pengaruh Pemaparan Bakteri *Porphyromonas gingivalis* Terhadap Produksi Superoksid Netrofil" telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember pada :

hari, tanggal : Selasa, 31 Januari 2012

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Tim Penguji
Ketua,

drg. Yuliana MD Arina, M.Kes.
NIP. 197506182000122001

Anggota I,

Anggota II,

drg. Happy Harmono, M.Kes.
NIP. 196709011997021001

Dr. drg. I.D.A Susilawati, M.Kes.
NIP.196109031986022001

Mengesahkan
Dekan,

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

RINGKASAN

Pengaruh Pemaparan Bakteri *Porphyromonas gingivalis* Terhadap Produksi Superoksida Netrofil; Nahdiya Fitriyana, 071610101058; 2012; 41 halaman; Jurusan Pendidikan Dokter Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember.

Sel pertahanan tubuh manusia yang utama adalah netrofil. Sel ini berguna untuk melawan adanya invasi bakteri. Salah satu mekanisme yang digunakan adalah mekanisme mikrobisidal, yaitu dengan cara memproduksi radikal bebas superoksida. Radikal bebas superoksida bila dihasilkan melebihi batas kemampuan proteksi antioksidan seluler maka dia akan menyerang sel itu sendiri.

P. gingivalis telah diketahui merupakan bakteri yang menginduksi respon inflamasi periodontal. Berdasarkan penelitian sebelumnya bakteri ini dapat menstimulasi aktivitas netrofil.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui produksi superoksida yang dihasilkan netrofil karena stimulasi bakteri *P. gingivalis*.

Penelitian ini dilakukan di dua tempat yaitu Laboratorium Mikrobiologi FKG Universitas Jember untuk kultur bakteri *P. gingivalis* dan Laboratorium Bioscience RSGM FKG Universitas Jember untuk deteksi produksi superoksida netrofil. Jenis penelitian ini adalah *experimental laboratories (in vitro)*. Sampel yang digunakan adalah sel darah manusia yang diisolasi sehingga tersisa netrofilnya saja. Lalu sel netrofil tersebut dibagi dua kelompok, yaitu kelompok perlakuan yang diberi bakteri *P. gingivalis* dan kelompok kontrol tanpa pemberian bakteri. Untuk mengetahui diproduksinya superoksida intraseluler digunakan deteksi dengan metode NBT yang dapat dilihat dengan pengamatan mikroskop dan untuk mengetahui produksi superoksida ekstraseluler yang dihasilkan netrofil, diukur dengan spektrofotometer.

Hasil penelitian menunjukkan adanya produksi superoksida netrofil karena stimulasi bakteri *P. gingivalis*. Hasil pengamatan mikroskop menunjukkan bahwa terdapat gambaran granula biru pada kelompok perlakuan yang mengindikasikan

adanya produksi superoksida intraseluler sedangkan pada kelompok kontrol sel netrofil berwarna merah. Hasil pengukuran superoksida ekstraseluler dengan spektrofotometer pada kelompok perlakuan menunjukkan hasil yang lebih besar dibandingkan dengan kelompok kontrol, tapi tidak signifikan ($p > 0,05$). Hal ini dapat terjadi karena adanya kontaminasi atau aktivasi dari netrofil.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah pemaparan bakteri *P. gingivalis* menyebabkan terjadinya produksi superoksida netrofil baik secara intraseluler maupun ekstraseluler.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas limpahan rahmat, karunia, taufik dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul " Pengaruh Pemaparan Bakteri *Porphyromonas gingivalis* Terhadap Produksi Superoksid Netrofil ". Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini dapat terselesaikan berkat bantuan, dukungan dan bimbingan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis menyampaikan ucapan terima kasih sebanyak-banyaknya kepada:

1. drg. Hj. Herniyati, M.Kes; selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
2. drg. Yuliana MD Arina, M.Kes; selaku Dosen Pembimbing Utama (DPU), dan drg. Happy Harmono, M.Kes; selaku Dosen Pembimbing Anggota (DPA) yang telah meluangkan waktu dan memberikan saran-saran dalam penyusunan skripsi ini;
3. Dr. drg. I.D.A Susilawati, M.Kes, yang telah mengikutsertakan saya dalam penelitian ini, memberikan ide penelitian sehingga saya berkesempatan untuk melakukan hal terbaik dalam hidup saya;
4. drg. Pujiana Endah Lestari, M.Kes; selaku Dosen Pembimbing Akademik, yang telah banyak memberikan nasehat;
5. Seluruh Staf pengajar dan karyawan di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
6. Ibunda tersayang Hj. Ellys Junaidah, Amd.Keb dan Ayahanda tercinta H. Nurchasan Achmad yang telah memberikan dukungan moril dan materi, serta semangat dalam perjuangan ananda untuk menggapai cita-cita melalui FKG Universitas Jember;

7. Staf Laboratorium Mikrobiologi FKG Universitas Jember yaitu Setyo Pinardi, Amd dan juga Staf Laboratorium Bioscience RSGM FKG Universitas Jember atas kerja samanya selama ini;
8. Teman seperjuangan penelitian: Ulfa, Ardi, Tectona, Yasinta, Tiwi, Aulia Suhermawan, dan Arif;
9. Teman-teman FKG angkatan 2007 yang telah memberikan bantuan dan kerja samanya, semoga kita semua diberikan kemudahan dan kesuksesan;
10. Teman kos: Alfa, Ajeng, Amel, Kiki, Riska, Gesti, Mayra, Tata, Edietya, Cindy, Iik, Lini, Mbak Dyah, Risha, dan Aima yang selalu menghiburku dan menghapus kerinduanku pada keluarga di rumah;
11. Teman subyek penelitian: Tegar, Windu, Endiki, Tectona terimakasih atas kontribusinya dalam penelitian ini;
12. Teman main: Febby, Noviana, Alfa, Ajeng, Tectona, Edietya, Riane, Yaya jaga terus persahabatan ini sampai nanti;

Penulis telah berusaha menyusun skripsi dengan sebaik-baiknya. Akhirnya, penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat dan sumbangsiah yang berharga bagi khasanah keilmuan di bidang kedokteran gigi terutama pada bagian Periodonsia.

Jember, 31 Januari 2012

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBING	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Netrofil	4
2.1.1 Definisi Netrofil	4
2.1.2 Fungsi Netrofil	6
2.2 Radikal Bebas Superoksid	7
2.2.1 Radikal dan Oksidan	7
2.2.2 Sumber Radikal Bebas	8
2.2.3 <i>Reactive Oxygent Species</i> (Superoksid) pada Proses inflamasi	12
2.2.4 Mekanisme Pembentukan ROS (superoksid) oleh Netrofil	14

2.2.5 ROS dan Penyakit Periodontal.....	15
2.3 Bakteri <i>Porphyromonas gingivalis</i>	16
2.3.1 Taksonomi.....	16
2.3.2 Morfologi bakteri <i>Porphyromonas gingivalis</i>	16
2.3.3 Patogenesis bakteri <i>Porphyromonas gingivalis</i>	17
2.4 Hipotesis	17
BAB 3. METODE PENELITIAN	18
3.1 Jenis Penelitian	18
3.2 Rancangan Penelitian	18
3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian	18
3.4 Populasi dan Sampel Penelitian	18
3.4.1 Populasi Penelitian.....	18
3.4.2 Sampel Penelitian.....	18
3.4.3 Kriteria Populasi Penelitian.....	18
3.4.4 Jumlah Sampel.....	19
3.5 Identifikasi Variabel Penelitian	19
3.5.1 Variabel Bebas.....	19
3.5.2 Variabel Terikat.....	19
3.5.3 Variabel Terkendali.....	19
3.6 Definisi Operasional	19
3.6.1 Isolasi Netrofil.....	19
3.6.2 Bakteri <i>P. gingivalis</i>	19
3.6.3 Produksi Superoksid.....	20
3.7 Bahan dan Alat Penelitian	20
3.7.1 Bahan Penelitian.....	20
3.7.1.1 Bahan untuk Suspensi Bakteri <i>P.gingivalis</i>	20
3.7.1.2 Bahan pengecatan Preparat Mikroskopik.....	20
3.7.2 Alat Penelitian.....	21
3.8 Prosedur Penelitian	22

3.8.1 Persiapan Bahan Perlakuan.....	22
3.8.2 Pelaksanaan Penelitian.....	22
3.9 Analisis Data.....	24
3.10 Alur Penelitian.....	25
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	26
4.1 Hasil.....	26
4.1.1 Hasil Kultur Bakteri <i>P. gingivalis</i>	26
4.1.2 Hasil Isolasi Netrofil.....	27
4.1.3 Hasil Produksi Radikal Superoksid.....	28
4.2 Analisis Data.....	30
4.3 Pembahasan.....	31
BAB 5. PENUTUP.....	37
5.1 Kesimpulan.....	37
5.2 Saran.....	37
DAFTAR BACAAN	38
LAMPIRAN.....	42

DAFTAR TABEL

	Halaman
4.1 Hasil spektrofotometer superoksid netrofil.....	29
4.2 Hasil <i>Independent T-test</i> produksi superoksid ekstraseluler.....	31

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Sel netrofil yang dikelilingi eritrosit, pembesaran 1000x	4
2.2 Silsilah sel darah.....	5
2.3 Sumber radikal bebas.....	10
2.4 <i>Porphyromonas gingivalis</i>	17
3.1 Alur penelitian.....	25
4.1 Bakteri <i>P. gingivalis</i> dengan pembesaran 1000x.....	27
4.2 Sel netrofil pembesaran (a) 400x dan (b) 1000x.....	27
4.3 Gambaran superoksida dengan pembesaran (a) 400x dan (b)1000x.....	28
4.4 Netrofil tanpa pemaparan bakteri <i>P. gingivalis</i>	29
4.5 Diagram batang rata-rata produksi superoksida ekstraseluler.....	30
4.6 Radikal superoksida dan derivatnya.....	33
4.7 Dampak ROS pada jaringan periodontal	35

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Perhitungan Jumlah Sampel.....	43
B. Surat Persetujuan Subyek Penelitian.....	44
C Hasil Analisis Data.....	45
D. Foto Alat dan Bahan penelitian.....	47
E Foto Penelitian.....	48

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kehidupan manusia mutlak memerlukan oksigen. Peran utama oksigen dalam kehidupan manusia adalah dalam proses oksidasi pembentukan energi (aerob). Dalam tahap akhir proses oksidasi ini oksigen direduksi untuk membentuk molekul H_2O . Tetapi pada proses ini tidak seluruh oksigen tereduksi menjadi H_2O . Proses reduksi oksigen dalam rangkaian elektron transport yang terjadi di mitokondria merupakan contoh salah satu awal yang berpeluang untuk terbentuknya radikal bebas (Muhilal, 1991).

Menurut Merawati (1996) radikal bebas merupakan atom-atom yang mengandung elektron satu atau lebih yang tidak berpasangan. Elektron ini menarik elektron yang ada orbitnya, biasanya *acceptor electron* adalah O_2 . Jika sudah terbentuk dalam tubuh maka akan terjadi reaksi berantai dan menghasilkan radikal bebas baru yang akhirnya jumlahnya terus bertambah. Sedangkan menurut Droge (2002) radikal bebas adalah sekelompok bahan kimia berupa atom maupun molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan pada lapisan luarnya, yang juga merupakan suatu kelompok bahan kimia dengan reaksi jangka pendek yang memiliki satu atau lebih elektron bebas.

Radikal bebas terpenting dalam tubuh adalah radikal derivat dari oksigen yang disebut kelompok oksigen reaktif (*reactive oxygen species/ROS*), termasuk didalamnya adalah triplet ($3O_2$), tunggal (singlet/ 1O_2), anion superoksida (O_2^-), radikal hidroksil ($-OH$), nitrit oksida (NO^-), peroksinitrit ($ONOO^-$), asam hipoklorus ($HOCl$), hidrogen peroksida (H_2O_2), radikal alkoksil (LO^-), dan radikal peroksil (Araujo, 1998).

Radikal bebas termasuk ROS, penting artinya bagi kesehatan dan fungsi tubuh yang normal dalam memerangi peradangan, membunuh bakteri, dan mengendalikan

tonus otot polos pembuluh darah dan organ-organ dalam tubuh kita. Namun bila dihasilkan melebihi batas kemampuan proteksi antioksidan seluler, maka dia akan menyerang sel itu sendiri. Struktur sel yang berubah turut merubah fungsinya, yang akan mengarah pada proses munculnya penyakit (Cooper, 2000).

Netrofil adalah leukosit terbanyak dalam sirkulasi darah, yang berperan sebagai barisan pertama sistem pertahanan tubuh dengan cara menghancurkan patogen-patogen yang mengancam melalui mekanisme oksidatif dan non oksidatif (Kirkwood, 2006). Menurut Susilawati (2008) mekanisme mikrobisidal yang utama pada netrofil adalah mekanisme oksidatif yang diperankan oleh metabolit-metabolit oksigen yang sangat aktif (*ROS: reactive oxygen species*). Pada saat leukosit memfagosit bakteri, terjadi *respiratory burst* yang merupakan peningkatan penggunaan oksigen yang disertai produksi sejumlah besar derivat reaktif, yaitu O_2^- , H_2O_2 , OH dan OCL^- . Superoksid (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan ion-ion hidroksil ($-OH$), semua radikal bebas tersebut bersifat mematikan bagi sebagian besar bakteri, bahkan bila jumlahnya sedikit (Guyton and Hall, 2008).

Sistem rantai transpor elektron yang bertanggung jawab terhadap *respiratory burst* ini memiliki komponen-komponen, yaitu NADPH oksidase (NADPH: O_2^- oksidoreduktase) dan Sitokrom tipe b (Lautan,1997). (NADPH) oksidase yang teraktivasi, akan mengkonversi molekul oksigen menjadi ion superoksid (O_2^-). Substansi yang toksik dan tak stabil ini diketahui berguna untuk membunuh mikroorganisme (Cotran dan Collins, 1999).

Periodontitis adalah suatu inflamasi kronis pada jaringan pendukung gigi. Terdapat 10 jenis bakteri yang bersifat patogen pada periodontitis, salah satunya adalah *P. gingivalis*. Bakteri ini sangat berpengaruh dalam inisiasi dan keparahan penyakit periodontal. *P. gingivalis* telah diketahui merupakan bakteri yang menginduksi respon inflamasi periodontal (Susilawati, 2008).

Menurut Susilawati (2008), adanya bakteri *P. gingivalis* diduga akan menyebabkan rekrutmen netrofil yang selanjutnya disusul dengan aktivasi netrofil. Aktivasi netrofil berupa proses fagositosis, dimana terjadi penggunaan oksigen (O_2)

dalam jumlah besar pada sel fagositik. Oksigen yang ada akan direduksi menjadi ion superoksida untuk menghancurkan *P. gingivalis*, tapi bila hal ini berlangsung berat dan lama, maka akan menimbulkan kerusakan pada netrofil itu sendiri.

Berdasarkan uraian di atas, peneliti ingin mengetahui pengaruh pemaparan bakteri *P. gingivalis* terhadap produksi superoksida netrofil.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dikemukakan, dapat dirumuskan suatu permasalahan yaitu bagaimana pengaruh pemaparan bakteri *P. gingivalis* terhadap produksi superoksida netrofil?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui produksi superoksida yang dihasilkan netrofil karena stimulasi bakteri *P. gingivalis*.

1.4 Manfaat Penelitian

Setelah diketahui besarnya produksi superoksida netrofil karena pemaparan bakteri *P. gingivalis*, maka selanjutnya dapat diketahui :

- 1) Faktor virulensi bakteri *P. gingivalis* yang merupakan penyebab utama penyakit periodontitis.
- 2) Sebagai dasar ilmiah pertimbangan pemilihan antioksidan dalam mengurangi dampak buruk dari produksi superoksida netrofil karena pemaparan bakteri *P. gingivalis*.
- 3) Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai sumber referensi untuk penelitian sejenis.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Netrofil

2.1.1 Definisi Netrofil

Netrofil adalah leukosit granular matur polimorfonuklear (inti memiliki hingga lima lobus yang dihubungkan oleh benang kromatin tipis, dan sitoplasma mengandung granula halus (Dorland, 2006). Netrofil adalah fagosit utama dalam sirkulasi darah yang berfungsi mengenali, mencerna dan menghancurkan mikroba. Netrofil juga disebut *polymorphonuclear leucocytes* (PMN), adalah jenis leukosit terbanyak dalam sirkulasi darah, yang berperan memediasi fase awal respon inflamasi (Susilawati, 2008).

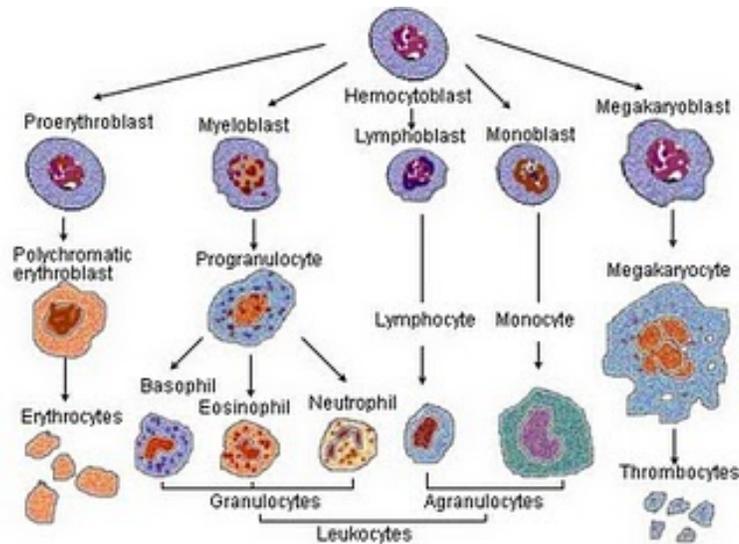


Gambar 2.1 Sel netrofil yang dikelilingi eritrosit, pembesaran 1000x

Sumber: www.wcelneut.htm

Leukosit darah terdiri dari suatu kumpulan heterogen sel-sel berinti yang satu sama lain berbeda morfologi dan fungsinya (Sodeman, 1991). Normalnya ada 4000-11.000 leukosit permikroliter darah manusia (Ganong, 2002). Leukosit merupakan unit mobil atau aktif dari sistem kosit yang sebagian dibentuk di sumsum tulang (granulosit dan monosit serta sedikit limfosit) dan sebagian lagi di jaringan limfe

(limfosit dan sel-sel plasma). Setelah dibentuk, sel-sel ini diangkut dalam darah menuju berbagai bagian tubuh untuk digunakan (Guyton and Hall,1997).



Gambar 2.2 Silsilah sel darah
 Sumber: www.wikipedia.com

Ada enam macam sel darah putih yang secara normal ditemukan dalam darah. Keenam sel tersebut adalah netrofil polimorfonuklear, eosinofil polimorfonuklear, basofil polimorfonuklear, monosit, limfosit dan sel plasma. Selain itu, terdapat sejumlah besar trombosit, yang merupakan pecahan dari tipe ketujuh sel darah putih yang dijumpai dalam sumsum tulang, yakni megakariosit. Persentase normal dari sel darah putih kira-kira sebagai berikut:

Netrofil polimorfonuklear	62,0%
Eusinofil polimorfonuklear	2,3%
Basofil polimorfonuklear	0,4%
Monosit	5,3%
Limfosit	30,0%
Trombosit (fragmen-fragmen sel)	300.000/mikroliter darah

(Guyton and Hall, 2008).

2.1.2 Fungsi Netrofil

Netrofil adalah sel matang yang dapat menyerang dan menghancurkan bakteri dan virus bahkan dalam sirkulasi darah (Guyton and Hall,1997). Dalam sistem pertahanan tubuh, netrofil merupakan fagosit utama terhadap bakteri ekstraseluler (Roeslan, 2002). Netrofil ialah sel utama yang tampak dalam ruang perivaskuler, biasanya disusul oleh monosit (setelah keluar dari lumen pembuluh darah, monosit disebut makrofag atau histiosit). Selain karena mobilitasnya yang tinggi dan jumlah yang banyak dalam sirkulasi darah, faktor yang mempengaruhi penampakan netrofil pertama adalah awal reaksi radang (Robbins dan Kumar, 1995).

Walaupun perannya adalah untuk pertahanan primer, PMN juga dapat memproduksi enzim proteolitik yang dapat merusak jaringan disekitarnya (Manson dan Elley, 1993). Enzim proteolitik ini mampu menghidrolisis kolagen, jaringan elastik dan kartilago. Dengan demikian, netrofil mampu menghancurkan membran basalis dan struktur-struktur penyokong yang lain. Paling sedikit beberapa enzim ini dilepaskan dan dilibatkan dalam kerusakan dinding pembuluh darah dan nekrosis dari lesi yang dirangsang oleh kelompok imun (Bellanti, 1993).

Fungsi netrofil dan makrofag yang terpenting adalah fagositosis, yang berarti pencernaan terhadap agen yang mengganggu. Sel fagosit harus memilih bahan-bahan yang akan difagositosis; kalau tidak demikian, sel normal tubuh akan dicerna pula. Terjadinya fagositosis terutama bergantung pada tiga prosedur selektif berikut: Pertama, sebagian besar struktur alami dalam jaringan memiliki permukaan halus, yang dapat menahan fagositosis. Tetapi jika permukaannya kasar, maka kecenderungan fagositosis akan meningkat. Kedua, sebagian besar bahan alami tubuh mempunyai selubung protein pelindung yang menolak fagositosis. Sebaliknya, sebagian besar jaringan mati dan partikel asing tidak mempunyai selubung pelindung, sehingga jaringan atau partikel tersebut menjadi subyek untuk difagositosis.

Ketiga, sistem imun tubuh membentuk antibodi untuk melawan agen infeksius seperti bakteri. Antibodi kemudian melekat pada membran bakteri dan dengan demikian membuat bakteri menjadi rentan khususnya terhadap fagositosis (Guyton and Hall, 2008).

Selain mencerna bakteri yang dicerna dalam fagosom, netrofil dan makrofag juga mengandung bahan bakterisidal yang membunuh sebagian besar bakteri, bahkan bila enzim lisosomal gagal mencerna bakteri tersebut. Hal ini menjadi demikian penting sebab beberapa bakteri mempunyai selubung pelindung atau faktor lain yang mencegah penghancurannya oleh enzim pencernaan. Banyak efek pembunuhan merupakan hasil dari beberapa bahan pengoksidasi kuat yang dibentuk oleh enzim dalam membran fagosom, atau oleh organel khusus yang disebut peroksisom. Bahan pengoksidasi ini ialah sejumlah besar superoksid (O_2), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan ion-ion hidroksil ($\bullet OH$), semuanya bersifat mematikan bagi sebagian besar bakteri, bahkan bila bahan pengoksidasi itu jumlahnya sedikit. Salah satu enzim lisosom, yaitu mieloperoksidase, mengatalisis reaksi antara H_2O_2 dan ion klorida untuk membentuk hipoklorit, yang secara luas bersifat bakterisid. Namun beberapa bakteri, khususnya basil *tuberculosis*, mempunyai selubung yang bersifat resisten terhadap pencernaan oleh lisosom dan juga menyekresikan zat-zat yang memiliki ketahanan parsial terhadap efek pembunuhan dari netrofil dan makrofag. Bakteri seperti ini berperan pada banyak penyakit kronik, dan salah satu contohnya adalah *tuberculosis* (Guyton and Hall, 2008).

2.2 Radikal Bebas Superoksid

2.2.1 Radikal dan Oksidan

Pengertian oksidan dan radikal bebas (*free radicals*) sering dibaurkan karena keduanya memiliki sifat-sifat yang mirip. Aktivitas kedua jenis senyawa ini sering menghasilkan akibat yang sama walaupun prosesnya berbeda.

Oksidan adalah senyawa penerima elektron, (*electron acceptor*), yaitu senyawa-senyawa yang dapat menarik elektron. Ion ferri (Fe^{+++}), misalnya, adalah suatu oksidan. Sebaliknya, radikal bebas adalah atom atau molekul (kumpulan atom) yang memiliki elektron yang tak berpasangan (*unpaired electron*). Elektron yang tak berpasangan cenderung untuk membentuk pasangan, dan ini terjadi dengan menarik elektron dari senyawa lain sehingga terbentuk radikal baru (Suryohudoyo,1993).

Radikal bebas memiliki dua sifat, yaitu reaktivitas tinggi, karena kecenderungan menarik elektron dan dapat mengubah suatu molekul menjadi suatu radikal. Sifat radikal bebas yang mirip dengan oksidan terletak pada kecenderungannya untuk menarik elektron. Jadi sama halnya dengan oksidan, radikal bebas adalah penerima elektron. Itulah sebabnya dalam kepustakaan kedokteran, radikal bebas digolongkan dalam oksidan. Namun perlu diingat bahwa radikal bebas adalah oksidan tetapi tidak setiap oksidan adalah radikal bebas (Suryohudoyo,1993).

Radikal bebas lebih berbahaya dibanding dengan oksidan yang bukan radikal. Hal ini disebabkan oleh kedua sifat radikal bebas diatas, yaitu reaktifitas yang tinggi dan kecenderungannya membentuk radikal baru, yang pada gilirannya apabila menjumpai molekul lain akan membentuk radikal baru lagi, sehingga terjadilah rantai reaksi (*chain reaction*) Reaksi rantai tersebut baru berhenti apabila radikal bebas tersebut dapat diredam (*quenched*).

Daya perusak radikal bebas dengan demikian jauh lebih besar dibandingkan dengan oksidan biasa. Karena reaktifitasnya yang tinggi, radikal bebas tak stabil dan berumur sangat pendek sehingga sulit dideteksi kecuali dengan metoda-metoda khusus seperti pengukuran EPR (*Electron Paramagnetic Resonance*)

2.2.2 Sumber Radikal Bebas

Radikal bebas adalah molekul yang tidak stabil, mempunyai satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan di orbit luarnya. Molekul tersebut bersifat reaktif dalam mencari pasangan elektronnya. Jika sudah terbentuk dalam tubuh maka akan terjadi reaksi berantai yang disebut peroksidasi lipid dan menghasilkan radikal bebas baru yang akhirnya jumlahnya terus bertambah (Harahap, 2002). Sedangkan menurut

Lautan (1997) radikal bebas adalah atom atau molekul yang pada kulit terluarnya mengandung satu atau lebih elektron tak berpasangan. Radikal bebas yang ada ditubuh manusia berasal dari dua sumber, dari dalam tubuh (endogen) dan luar tubuh (eksogen). Berikut adalah contoh radikal bebas yang berasal dari dalam tubuh:

1. Autoksidasi

Autooksidasi merupakan produk dari proses metabolisme aerobik. Molekul yang mengalami autooksidasi berasal dari katekolamin, hemoglobin, mioglobin, sitokrom C yang tereduksi, dan thiol. Autooksidasi dari molekul di atas menghasilkan reduksi dari oksigen diradikal dan pembentukan kelompok reaktif oksigen. Superoksida merupakan bentuk awal radikal. Ion ferrous (Fe II) juga dapat kehilangan elektronnya melalui oksigen untuk membuat superoksida dan Fe III melalui proses autooksidasi.

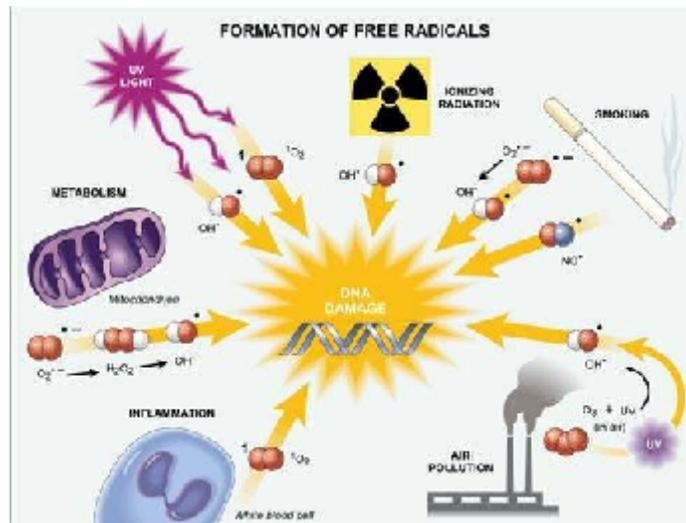
2. Oksidasi enzimatik

Terdapat beberapa jenis sistem enzim yang mampu menghasilkan radikal bebas dalam jumlah yang cukup bermakna, meliputi *xanthine oxidase (activated in ischemia-reperfusion)*, *prostaglandin synthase*, *lipoxygenase*, *aldehyde oxidase*, dan *amino acid oxidase*. Enzim *myeloperoxidase* hasil aktivasi netrofil, memanfaatkan hidrogen peroksidase untuk oksidasi ion klorida menjadi suatu oksidan yang kuat asam hipoklor.

3. *Respiratory burst*

Respiratory burst merupakan terminologi yang digunakan untuk menggambarkan proses dimana sel fagositik menggunakan oksigen dalam jumlah yang besar selama fagositosis. Lebih kurang 70-90% penggunaan oksigen tersebut dapat diperhitungkan dalam produksi superoksida. Fagositik sel memiliki sistem *membran bound flavoprotein cytochrome-b-245 NADPH oxidase*. Enzim membran sel seperti *NADPH-oxidase* keluar dalam bentuk inaktif. Paparan terhadap bakteri yang diselimuti imunoglobulin, kompleks imun, komplemen 5a atau leukotrien dapat mengaktifkan enzim *NADPH-oxidase*.

Aktifasi tersebut mengawali *respiratory burst* pada membran sel untuk memproduksi superoksida. Kemudian H_2O_2 dibentuk dari superoksid dengan cara dismutase bersama generasi berikutnya dari OH dan HOCl oleh bakteri (Arief, 2010).



Gambar 2.3 Sumber radikal bebas (Mercredi, 2010)

Radikal bebas yang berasal dari luar tubuh, diantaranya adalah :

1. Obat-obatan

Obat-obatan bereaksi bersama hiperoksida dapat mempercepat tingkat kerusakan. Termasuk didalamnya antibiotika kelompok *quinoid* atau berikatan logam untuk aktifitasnya (*nitrofurantoin*), obat kanker seperti *bleomycin*, *anthracyclines* (*adriamycin*), dan *methotrexate* yang memiliki aktifitas pro-oksidan. Selain itu, radikal juga berasal dari fenilbutason, beberapa asam fenamat dan komponen aminosalisilat dalam jumlah banyak yang mempercepat peroksidasi lemak.

2. Radiasi

Radioterapi memungkinkan terjadinya kerusakan jaringan yang disebabkan oleh radikal bebas. Radiasi elektromagnetik (sinar X, sinar gamma) dan radiasi partikel (partikel elektron, proton, neutron, alfa, beta) menghasilkan radikal primer dengan cara memindahkan energinya pada komponen seluler seperti air. Radikal primer

tersebut dapat mengalami reaksi sekunder bersama oksigen yang terurai atau bersama cairan seluler.

3. Asap rokok

Oksidan dalam rokok mempunyai jumlah yang cukup untuk memainkan peranan yang besar terjadinya kerusakan saluran napas. Telah diketahui bahwa oksidan asap tembakau menghabiskan antioksidan intraseluler dalam sel paru (*in vivo*) melalui mekanisme yang dikaitkan terhadap tekanan oksidan. Diperkirakan bahwa tiap hisapan rokok mempunyai bahan oksidan dalam jumlah yang sangat besar, meliputi *aldehida*, *epoxida*, *peroxide*, dan radikal bebas lain yang mungkin cukup berumur panjang dan bertahan hingga menyebabkan kerusakan alveoli. Bahan lain seperti nitrit oksida, radikal peroksil, dan radikal yang mengandung karbon ada dalam fase gas. Juga mengandung radikal lain yang relatif stabil dalam fase tar. Contoh radikal dalam fase tar meliputi *semiquinoine moieties* dihasilkan dari bermacam-macam *quinine* dan *hydroquinone*. Perdarahan kecil berulang merupakan penyebab yang sangat mungkin dari desposisi besi dalam jaringan paru perokok. Besi dalam bentuk tersebut menyebabkan pembentukan radikal hidroksil yang mematikan dan hidrogen peroksida. Juga ditemukan bahwa perokok mengalami peningkatan netrofil dalam saluran napas bawah yang mempunyai kontribusi pada peningkatan lebih lanjut konsentrasi radikal bebas (Arief, 2010).

4. Polusi udara

Polusi mengandung polutan yang biasanya memang ada dalam udara luar. Sumber-sumber utama polutan ialah industri, kendaraan dan bencana alam. 98% dari semua polutan udara berupa CO, SO₂, berbagai gas hidrokarbon dan apa yang disebut *particulate matter* (PM).

Polusi udara dalam rumah dan kantor dapat berasal dari polusi udara di luar rumah (yang masuk melalui jendela, lubang angin, dan sebagainya), tetapi dapat juga timbul dari dalam rumah itu sendiri, misalnya dari asap rokok, berbagai macam pengharum ruangan, alat pendingin, penggunaan alat foto-kopi, kompor, dan bahan-bahan bangunan tertentu (Donno, 2010).

Polusi udara akan menyebabkan peningkatan luar biasa dari ROS udara yang kemudian secara langsung akan mengakibatkan stres oksidatif pada paru. Disamping itu, secara tidak langsung polusi udara akan mengakibatkan sel-sel saluran pernapasan yang terpapar untuk ikut mensintesis ROS melalui berbagai mekanisme yang berbeda. Dengan demikian bila keadaan ini berkepanjangan, maka dapat mengakibatkan timbulnya beberapa penyakit paru (Danusantoso, 2003).

Hal lain yang dapat menjadi sumber radikal bebas adalah bahan kimia pengawet-perasa-pewarna yang terkandung dalam makanan.

Dalam tubuh, radikal bebas beredar ke seluruh sistem. Selama terjadinya proses oksidasi dalam tubuh, yaitu pada saat proses metabolisme, radikal bebas akan menyerang lemak dalam jaringan. Hasil reaksinya akan membentuk senyawa-senyawa yang akan bereaksi dengan protein yang akhirnya menimbulkan kerusakan (Merawati, 1996).

2.2.3 *Reactive Oxygen Species* (Superoksid) pada Proses inflamasi

Inflamasi merupakan respons protektif setempat yang ditimbulkan oleh cedera atau kerusakan jaringan, yang berfungsi menghancurkan, mengurangi, atau mengurung (sekuestrasi) baik agen pencedera maupun jaringan yang cedera itu (Dorland, 2002).

Apabila jaringan cedera misalnya karena terbakar, teriris atau karena infeksi kuman, maka pada jaringan ini akan terjadi rangkaian reaksi yang memusnahkan agen yang membahayakan jaringan atau yang mencegah agen menyebar lebih luas. Reaksi-reaksi ini kemudian juga menyebabkan jaringan yang cedera diperbaiki atau diganti dengan jaringan baru. Rangkaian reaksi ini disebut radang.

Pada proses peradangan terdapat substansi yang dikeluarkan secara endogen yang dikenal sebagai mediator dari respon peradangan. Identifikasinya saat ini sulit dilakukan. Walaupun daftar mediator yang diusulkan panjang dan kompleks, tetapi mediator yang lebih dikenal dapat digolongkan menjadi golongan amina vasoaktif (histamin dan serotonin), protease plasma (sistem kinin, komplemen, dan koagulasi fibrinolitik), metabolit asam arakidonat (leukotrien dan prostaglandin), produk

leukosit (enzim lisosom dan limfokin), dan berbagai macam mediator lainnya seperti radikal bebas yang berasal dari oksigen (Abrams, 1995; Robbins & Kumar, 1995).

Radikal bebas yang terbanyak pada manusia adalah radikal bebas dari oksigen atau radikal bebas oksigen. Hasil akhir dari reaksi berantai dalam membentuk radikal bebas berupa oksidasi berbagai zat yang diperlukan untuk fungsi sel secara optimal. Misalnya DNA, membran sel, aktivitas enzim. Pada reaksi tersebut terjadi perubahan struktur molekul protein, lipid dan karbohidrat (Merawati, 1996).

Ada beberapa *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang dijumpai dalam tubuh, menurut Lautan (1997) sbb:

- Radikal bebas superoksida ($O_2\cdot^-$)
- Radikal bebas hidroksil ($\bullet OH$)
- Radikal bebas alkoksil ($RO\bullet$)
- Radikal bebas Peroksil ($\bullet OOH$)
- Peroksida lipid (LOOH)
- Hidrogen peroksida (H_2O_2)
- Singlet oksigen (1O_2)
- Ion hipoklorit (ClO^-)

Saat ini dipercaya bahwa mekanisme mikrobisidal yang utama pada netrofil adalah mekanisme oksidatif yang diperankan oleh metabolit-metabolit oksigen yang sangat aktif (ROS: *reactive oxygen species*). ROS berasal dari reduksi oksigen, sehingga dihasilkan metabolit-metabolit oksigen reaktif yang bersifat toksik, seperti radikal superoksid (O_2^-) yaitu molekul oksigen dengan ekstra satu elektron tidak berpasangan (suatu radikal bebas), hidrogen peroksida (H_2O_2), radikal hidroksil (OH) dan asam hipoklorit (Carranza, 2006).

Radikal bebas dianggap berbahaya karena menjadi sangat reaktif dalam upaya mendapatkan pasangan elektronnya; dapat pula terbentuk radikal bebas baru dari atom atau molekul yang elektronnya terambil untuk berpasangan dengan radikal

bebas sebelumnya. Dalam gerakannya yang tidak beraturan, karena sangat reaktif, radikal bebas dapat menimbulkan kerusakan di berbagai bagian sel (Muhilal, 1991).

Pada keadaan normal, radikal bebas terbentuk sangat perlahan, 5% dari konsumsi oksigen akan membentuk radikal bebas kemudian dinetralisir oleh antioksidan yang ada dalam tubuh. Namun jika laju pembentukan radikal bebas sangat meningkat melebihi 5% karena terpicu oleh aktivitas yang berat dan melelahkan, jumlah radikal bebas akan melebihi kemampuan kapasitas sistem pertahanan antioksidan (Cooper, 2000).

2.2.4 Mekanisme Pembentukan ROS (Superoksid) oleh netrofil

Pada saat fagositosis bakteri, netrofil meningkatkan konsumsi oksigen (disebut *respiratory burst*). Peningkatan konsumsi oksigen bisa mencapai 10 atau 20 kali lipat dibanding netrofil saat *resting*/tidak terstimuli (Gough, 2006). Pada saat yang sama juga terjadi peningkatan konsumsi glukosa oleh sel, utamanya karena peningkatan jalur pentose fosfat yang menghasilkan NADPH. Peningkatan oksigen dan NADPH yang terjadi secara cepat ini menginduksi aktivitas enzim NADPH oksidase, yang kemudian mereduksi oksigen menjadi superoksid. Secara ringkas proses tersebut ditulis sebagai berikut: $\text{NADPH} + 2\text{O}_2 \longrightarrow \text{NADP}^+ + \text{H}^+ + 2\text{O}_2^-$. *Respiratory burst* dapat dipicu oleh bakteri, zimosan yang diopsonin, beberapa kimia seperti PMA (*phorbol myristic acid*) dan karsinogen (Susilawati, 2008). Secara umum, respon awal netrofil terhadap injuri bakterial adalah *respiratory burst* disusul dengan *oxidative burst*. Pada proses tersebut netrofil menghasilkan ROS (terutama radikal superoksid) dalam jumlah besar (Poon dkk., 2001).

Mekanisme antimikrobal oksidatif pada netrofil yang melibatkan ROS terbagi menjadi dua jalur utama yaitu, sistem NAD(P)H (*nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate*) oksidase dan enzim mieloperoksidase (MPO). Sistem NAD(P)H oksidase dibutuhkan untuk mentransport elektron dari NAD(P)H sitosol menuju membran permukaan eksternal membran plasma, selanjutnya, NAD(P)H oksidase secara univalent atau divalent mereduksi oksigen berturut-turut menjadi anion superoksid

atau hidrogen peroksida (Kirkwood, 2006). Superoksid yang dihasilkan dapat disalurkan secara intraseluler maupun ekstraseluler.

Aktivasi NAD(P)H oksidase netrofil dapat diinduksi oleh produk bakterial seperti LPS, lipoprotein, atau sitokin seperti IFN- γ , IL-1 β , atau IL-8. Faktor lain yang dapat menginduksi aktivitas NAD(P)H oksidase adalah faktor kekuatan hemodinamik, perubahan metabolik, thrombin, PDGF, dan beberapa hormon (Susilawati, 2008).

2.2.5 ROS dan Penyakit Periodontal

Netrofil memegang peran penting dalam mekanisme pertahanan tubuh. Netrofil adalah sel yang pertama kali keluar bila terdapat inflamasi periodontal. Sel ini memiliki mekanisme selektif untuk mengontrol invasi bakteri, yaitu mekanisme oksidatif yang diperankan oleh ROS.

Pada fisiologi normal, terdapat keseimbangan antara aktivitas ROS dan antioksidan. Tapi bila keseimbangan ini mengarah ke ROS, maka akan terjadi *Oxidative Stress*. Salah satu manifestasi *Oxidative stress* adalah daerah injuri pada penyakit periodontitis. Dampak dari ketidakseimbangan ROS dan antioksidan adalah penyakit periodontal (Ritchie, 2003).

Pada onset awal periodontitis, telah terjadi sedikit pembentukan ROS sitokin dari netrofil karena adanya aktivasi netrofil oleh bakteri, konsentrasinya semakin meningkat sejalan dengan keparahan penyakit. Bahkan pada pasien dengan *adult periodontitis*, selain terjadi peningkatan superoksid juga terjadi peningkatan pengeluaran elastase dan laktoferin dari netrofil sehingga terjadi destruksi jaringan.

Pada pasien *Chronic* dan *Adult periodontitis*, terjadi peningkatan ROS netrofil dikarenakan adanya stimuli bakteri penyebab penyakit periodontal (*Fusobacteria nucleatum*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*). Hal ini membuktikan bahwa aktivitas netrofil yang berlebihan dapat menyebabkan kerusakan jaringan secara lokal (Sharma, 2011).

Saat netrofil teraktivasi oleh bakteri periodontal maka enzim *myeloperoxidase* dikeluarkan ke fagosom, terbentuk juga superoksid dan asam hipoklorat di membran sel. Bila enzim atau superoksid tersebut tumpah ke ekstraseluler, maka akan terjadi

destruksi jaringan karena terjadi kerusakan DNA dan protein sehingga terjadi peroksida lipid dan oksidasi enzim (antiprotease) yang dapat menyebabkan resorpsi tulang alveolar (Newman,1999).

2.3 Bakteri *Porphyromonas gingivalis*

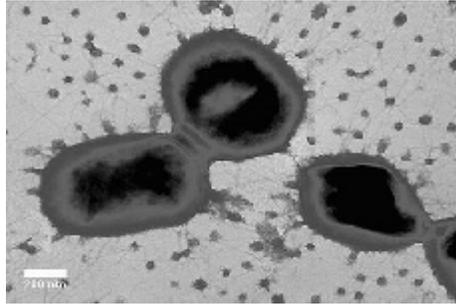
2.3.1 Taksonomi

Kingdom :Eubacteria
Phylum :Bacteroidetes
Class :Bacteroides
Genus :Porphyromonas
Species :Porphyromonas gingivalis

(www.Porphyromonas_gingivalis.htm)

2.3.2 Morfologi bakteri *Porphyromonas gingivalis*

Porphyromonas gingivalis merupakan bakteri anaerob gram negatif yang tidak berspora (non-spore forming) dan tak punya alat gerak (non motile). Bakteri ini berbentuk coccobacilli dengan panjang 0,5 – 2 µm. Koloni bakteri ini bila terdapat pada agar darah tampak lembut, berkilauan dan terlihat cembung serta 1-2 mm di dalam garis tengah dan menggelap dari tepi koloni ke pusat diantara 4-8 hari (Anonim, 2008). Terkadang warna koloni berubah menjadi hitam akibat produksi yang berlebih dari protohaem. Temperatur maksimal untuk pertumbuhan adalah 37⁰C. pertumbuhan yang signifikan dapat dipengaruhi oleh adanya karbohidrat. Substrat nitrogenous seperti proteose peptone, trypticase dan ekstrak yeast dengan nyata dapat meningkatkan pertumbuhan *Porphyromonas gingivalis* (Leslie *at al*,1998).



Gambar 2.4 *Porphyromonas gingivalis* (www.Porphyromonas_gingivalis.htm)

2.3.3 Patogenesis bakteri *Porphyromonas gingivalis*

Sebuah penelitian yang dilakukan Noril *et al* (1997) mengatakan bahwa *Porphyromonas gingivalis* merusak jaringan dengan interaksi langsung antara bakteri dan sel inang. Ketika kontak langsung dengan epitel di sulkus periodontal, *Porphyromonas gingivalis* mampu menyerang berbagai jaringan host termasuk tulang alveolar. Faktor-faktor virulensi yang terlibat dalam kolonisasi jaringan akan dapat mengubah pertahanan jaringan host (Imamura, 2003). *Porphyromonas gingivalis* adalah stimulator poten dari mediator inflamasi seperti Interleukin-1 (IL-1) dan Prostaglandin E₂ yang akhirnya dapat menyebabkan resorpsi tulang (Cutler *et al*, 1995). *Porphyromonas gingivalis* dapat memetabolisme asam amino dan menghasilkan sejumlah metabolit atau produk akhir, di mana metabolit tersebut bersifat toksik terhadap jaringan gingival pada manusia. Selain itu berpengaruh terhadap perkembangan suatu penyakit periodontal (Nester *at al*, 1998).

2.4 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah pemaparan bakteri *P.gingivalis* menstimulasi produksi superoksida netrofil

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah *experimental laboratories*.

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah desain *post test only (control group desain)*.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Agustus-September 2011 di dua tempat, yaitu:

1. Laboratorium Mikrobiologi FKG Universitas Jember untuk kultur bakteri *P. gingivalis*
2. Laboratorium Bioscience RSGM FKG Universitas Jember untuk deteksi produksi superoksida netrofil

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

3.4.1 Populasi penelitian

Populasi penelitian adalah darah vena peripheral manusia

3.4.2 Sampel penelitian

Sel netrofil yang diambil dari darah vena peripheral manusia. Isolasi netrofil dilakukan dengan metode *ficoll hypaque centrifugation* (modifikasi Romanelli, 1999).

3.4.3 Kriteria populasi penelitian

Pemilihan populasi penelitian dipilih berdasarkan berbagai pertimbangan dari peneliti dengan kriteria-kriteria tertentu yang diterapkan berdasarkan tujuan penelitian, yaitu darah yang berasal dari *volunter* dengan kriteria:

1. Manusia sehat, tidak memiliki riwayat kelainan darah dan penyakit sistemik berdasarkan hasil anamnesa.
2. Tidak merokok
3. Mengisi *informed consent* yang telah disediakan sebagai tanda persetujuan bahwa darah yang diambil akan dijadikan sampel penelitian.

3.4.4 Jumlah sampel

Jumlah sampel dihitung menggunakan rumus dari Daniel (2005), dan hasilnya adalah minimal 4 ulangan untuk tiap kelompok.

3.5 Identifikasi Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah bakteri *P. gingivalis*

3.5.2 Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah produksi superoksida

3.5.3 Variabel terkontrol

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah:

- a. Sel netrofil
- b. Jenis dan konsentrasi *P.gingivalis*
- c. Prosedur laboratoris

3.6 Definisi Operasional

3.6.1 Isolasi netrofil

Merupakan pemurnian sel darah dengan metode *ficoll hypaque centrifugation* (modifikasi Romanelli dkk, 1999) yang berasal dari darah vena peripheral orang sehat, sehingga tersisa netrofil murni yang memiliki tiga hingga lima lobus.

3.6.2 Bakteri *P. gingivalis*

Bakteri *P. gingivalis* yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari *whole cell P. gingivalis* strain ATCC 33277, satu macam konsentrasi $1,5 \times 10^6$ sel/ml.

3.6.3 Produksi superoksida

Superoksida adalah salah satu radikal bebas yang diproduksi oleh netrofil setelah terstimulasi oleh bakteri *P.gingivalis*. Deteksi superoksida dilakukan dengan metode NBT atau *Nitroblue Tetra Zolium* (Halliwell dan Gutteridge, 1999). Superoksida intraseluler dilihat secara mikroskopis sedangkan superoksida ekstraseluler diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 580 nm.

3.7 Bahan dan Alat Penelitian

3.7.1 Bahan Penelitian

- a. darah vena perifer (heparinized whole blood)
- b. HBSS (*Hans Balance Salt Solution*)
- c. *ficoll-hypaque gradient* (d=1,077)
- d. dextran
- e. histopaque 1077
- f. alkohol
- g. NaCl (merck)
- h. antikoagulan (heparin atau EDTA)
- i. NBT

3.7.1.1 Bahan untuk Suspensi Bakteri *P. gingivalis*

- a. *P. gingivalis* (ATCC 33277) dengan medium kulturnya yaitu medium BHI yang diperkaya dengan hemin dan vitamin K1
- b. aquadest steril
- c. yeast ekstrak

3.7.1.2 Bahan Pengecatan Preparat Mikroskopik

- a. cat gram (-)
- c. safranin
- d. methanol absolute
- e. entelan

3.7.2 Alat Penelitian:

- a. sarung tangan
- b. masker
- c. pipet mikro
- d. erlenmeyer
- e. becker glass
- f. semprit dan jarum injeksi 5 ml
- g. inkubator untuk kultur bakteri
- h. *laminar flow*
- i. petridish
- j. coverslip
- k. *deck glass*
- l. *glass chamber* (8 chamber)
- m. mikroskop binokuler
- n. mikroskop *inverted*
- o. vortex
- p. *refrigerated centrifuse*
- q. autoclave
- r. torniquet
- s. *blue and yellow tip*
- t. tabung falcon
- u. gelas ukur
- v. spektrofotometer

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Persiapan Bahan Perlakuan

a. Pembuatan media agar untuk kultur bakteri *P. gingivalis*

Media kultur bakteri *P.gingivalis* adalah BHI-A yang diperkaya hemin dan vitamin K. untuk membuat 100 ml BHI-A dibutuhkan hemin solution sebanyak 50µl, vitamin K 10µl, BHI-A 37 gram dalam 100 ml aquadest steril dan *yeast extract* 500µl. Media tersebut dibagi empat, lalu dimasukkan kedalam petridish @25 ml dan ditunggu sampai padat. Satu ose Bakteri *P. gingivalis* murni (F0) diinokulasikan pada masing-masing petridish kemudian diinkubasi selama 2x24 jam.

b. Pembuatan suspensi bakteri *P. gingivalis*

Media cair 10 ml dibuat dari 0,37 gram BHI-B , 1µl vitamin K, 5µl hemin dan 50µl yeast ekstrak. *P.gingivalis* Media cair tersebut dibagi menjadi 2 bagian @ 5 cc, pada masing-masing media cair diberi satu ose bakteri *P.gingivalis* yang berasal dari pembiakan di media agar BHI-A. suspensi bakteri *P. gingivalis* yang didapat lalu dimasukkan desicator dan dinkubasi selama 2x24 jam.

Setelah diinkubasi, suspensi bakteri *P. gingivalis* diukur konsentrasinya hingga didapatkan $1,5 \times 10^6$. Kemudian dibuat preparat dengan pengecatan gram untuk mengetahui bahwa bakteri dalam keadaan baik dan tidak terkontaminasi.

3.8.2 Pelaksanaan Penelitian

a. Prosedur isolasi netrofil

Disiapkan 6 cc darah (*heparinized whole blood*) yang didapat dari darah vena peripheral orang sehat yang telah mengisi *informed consent*. Darah dibagi menjadi dua tabung dan diencerkan dengan HBSS (1:3). Kemudian dilapiskan pada ficoll (1:3) dan disentrifus selama 30 menit dengan kecepatan 1400 rpm, sehingga terbentuk empat lapisan. Lapisan terbawah mengandung netrofil bercampur dengan RBC (*Red Blood Cell*) dipisahkan dengan cara ditambahkan dextran (6%) dan dibiarkan 1,5 jam agar RBC turun. Supernatan yang mengandung netrofil diaspirasi, di sentrifus lalu dicuci 2x dengan cara diencerkan dengan HBSS (1:2), disentrifus 1700 RPM, 10 menit, RT (*room temperature*). Resuspensi dalam 500 µl HBSS.

b. Pemaparan sel netrofil dengan bakteri *P. gingivalis*

Disiapkan 8 coverslip (telah dibersihkan dengan asam), diletakkan dalam *glass chamber* (8 well) kemudian dibagi dalam 2 kelompok, yaitu:

Kelompok 1: chamber 1-4 sebagai perlakuan

Kelompok 2: chamber 5-8 sebagai kontrol

Sebanyak 400 μ l suspensi netrofil dilapiskan pada coverslip (@50 μ l), diinkubasi 30 menit, pada suhu 37°C. Netrofil dicuci 2x dengan cara diresuspensi dengan 1000 μ l HBSS. Secara perlahan, pada masing-masing chamber 1-4, ditambahkan 300 μ l suspensi *P.gingivalis* (kelompok 1), sedangkan pada chamber 5-8 ditambahkan 300 μ l HBSS (kelompok 2). *Glass chamber*, baik pada kelompok kontrol maupun perlakuan ditambahkan 1000 μ l NBT. Tutup chamber, inkubasi 37°C, 10% CO₂ selama 16 jam.

c. Deteksi superoksid pada sel netrofil

Setelah 16 jam, medium di *glass chamber* pada dua kelompok diambil untuk dilakukan spektrofotometer sedangkan netrofil yang menempel di coverslip dicuci dengan 1 ml HBSS, diangin-anginkan lalu di fiksasi dengan alkohol 96% dan dicat dengan pewarnaan safranin (counter strain). Setelah *mounting* pada slide, preparat dilihat dengan mikroskop.

Cara kerja penghitungan produksi superoksid yang dilakukan dengan spektrofotometer adalah sebagai berikut:

1. Menyalakan alat dan dibiarkan selama 15 menit untuk memanaskan alat
2. Memilih panjang gelombang yang akan dipakai dengan memutar pengaturan panjang gelombang (580 nm)
3. Mengatur meteran ke pembacaan 0%
4. Memasukkan larutan blanko (aquadest) dalam tabung reaksi khusus ke tempat yang tersedia
5. Mengatur meteran ke pembacaan 100%
6. Mengganti larutan blanko dengan medium superoksid lalu dilakukan pengukuran

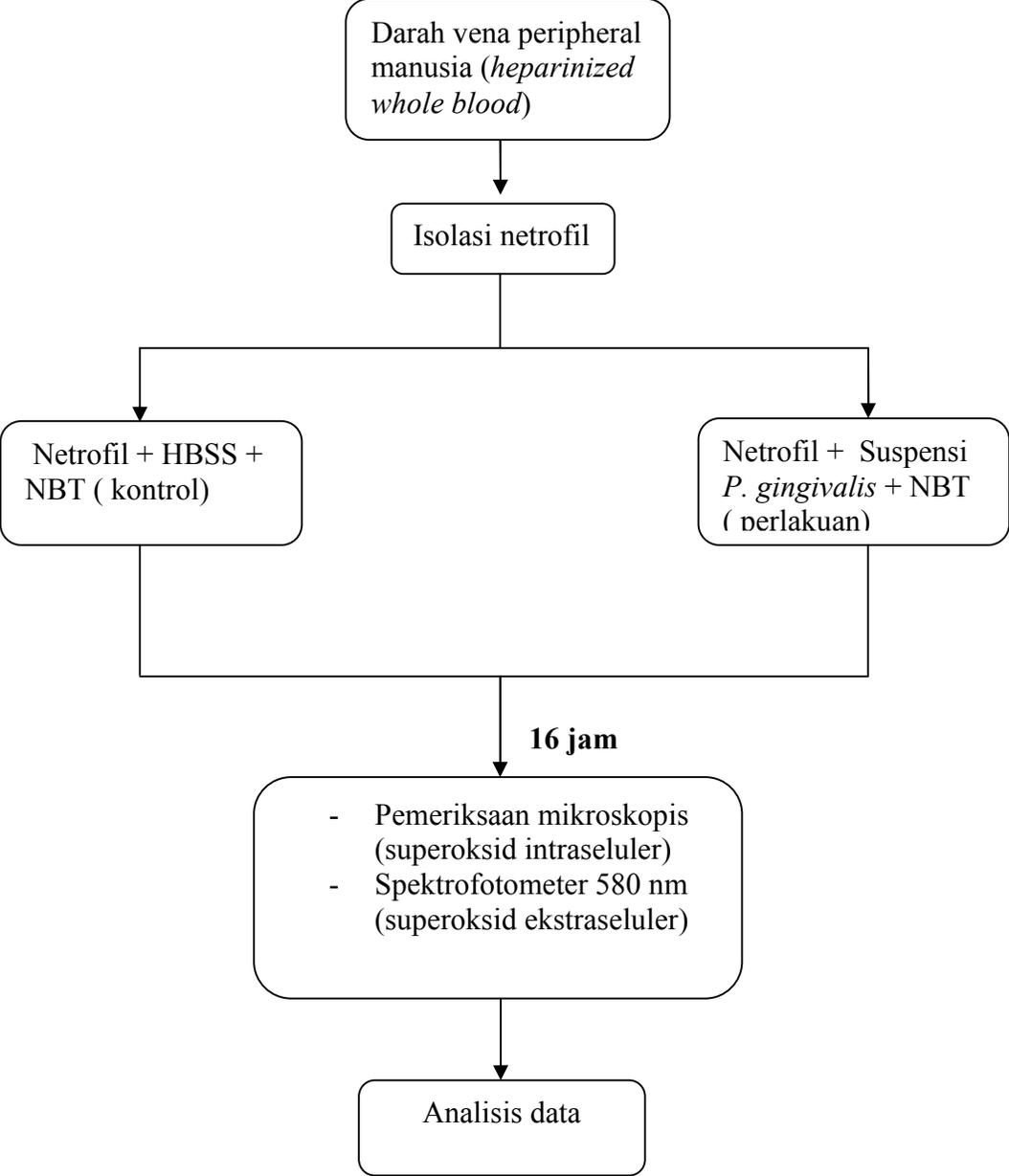
Pemeriksaan secara mikroskopis digunakan untuk membuktikan bahwa telah dihasilkan radikal bebas superoksid intraseluler sedangkan pemeriksaan spektrofotometer digunakan untuk deteksi besarnya konsentrasi superoksid ekstraseluler. Data akan ditampilkan dalam bentuk foto, diagram, dan tabel.

3.9 Analisis Data

Dalam penelitian ini, data yang didapatkan dianalisis dengan menggunakan uji statistik parametrik sebagai berikut :

- a. Uji *Kolmogorov smirnov* untuk uji normalitas.
- b. *Levene test* untuk uji homogenitas.
- c. Jika data yang dihasilkan normal dan homogen, maka selanjutnya dilakukan uji statistik *independent T-test*.

3.10 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur penelitian

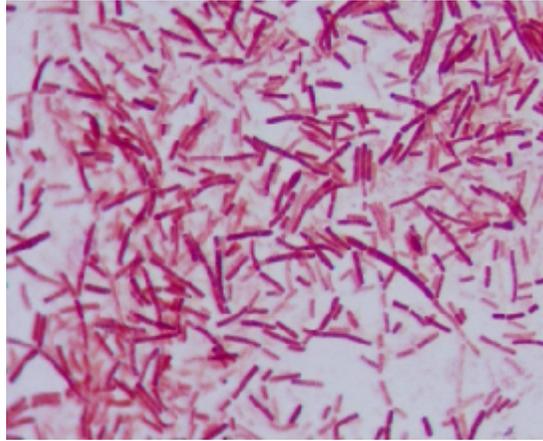
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

Penelitian telah dilaksanakan pada bulan Agustus-September 2011 di laboratorium Mikrobiologi FKG Universitas Jember dan Laboratorium Bioscience RSGM FKG Universitas Jember. Penelitian ini menggunakan sampel sel netrofil yang diambil dari vena peripheral manusia. Isolasi netrofil dilakukan dengan metode *ficoll hypaque centrifugation* sehingga dihasilkan netrofil murni. Hasil dari isolasi netrofil kemudian diletakkan pada 8 chamber dan dibagi menjadi dua kelompok, kelompok perlakuan (kelompok sel netrofil dengan pemaparan bakteri *P. gingivalis*) dan kelompok kontrol (kelompok sel netrofil tanpa pemaparan bakteri). Kemudian, untuk mendeteksi adanya superoksida yang keluar dari netrofil, dilakukan dua pemeriksaan yaitu pemeriksaan mikroskop pada pelet sel untuk melihat produksi superoksida intraseluler dan spektrofotometer pada medium untuk melihat produksi superoksida ekstraseluler.

4.1.1 Hasil Kultur Bakteri *P. gingivalis*

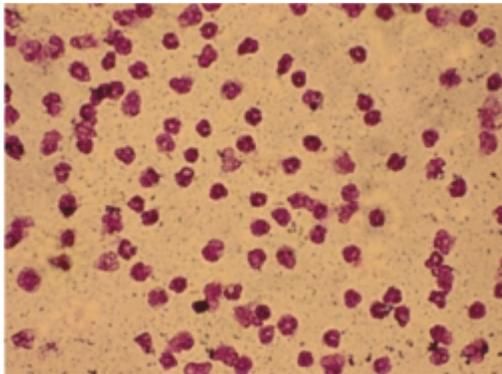
Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini berwujud suspensi dengan konsentrasi $1,5 \times 10^6$. Diperlukan pembuatan hapusan bakteri *P. gingivalis* dari suspensi untuk memastikan bahwa bakteri yang digunakan tidak terkontaminasi oleh bakteri lain. Hasil kultur didapatkan koloni bakteri berbentuk batang dan pada pewarnaan gram berwarna merah yang menunjukkan bahwa bakteri ini termasuk golongan bakteri gram negatif (gambar 4.1).



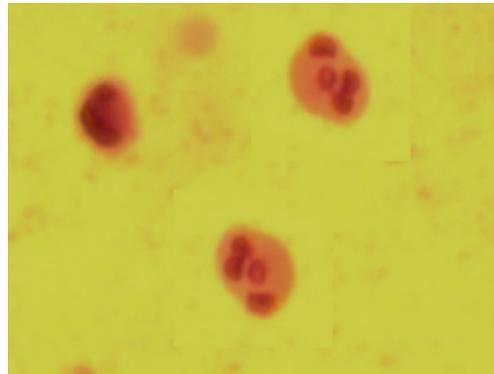
Gambar 4.1 Bakteri *P. gingivalis* dengan pembesaran 1000x

4.1.2 Hasil Isolasi Netrofil

Isolasi netrofil yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan metode *ficoll hypque centrifugation* sehingga didapatkan netrofil murni. Hasil isolasi dibuat preparat untuk memastikan bahwa hanya ada satu jenis sel yaitu netrofil yang digunakan dalam penelitian ini. Dengan pewarnaan giemsa sel netrofil tampak memiliki banyak inti sekitar 3-5 segmen dan sitoplasmanya mengandung granul (gambar 4.2).



(a)

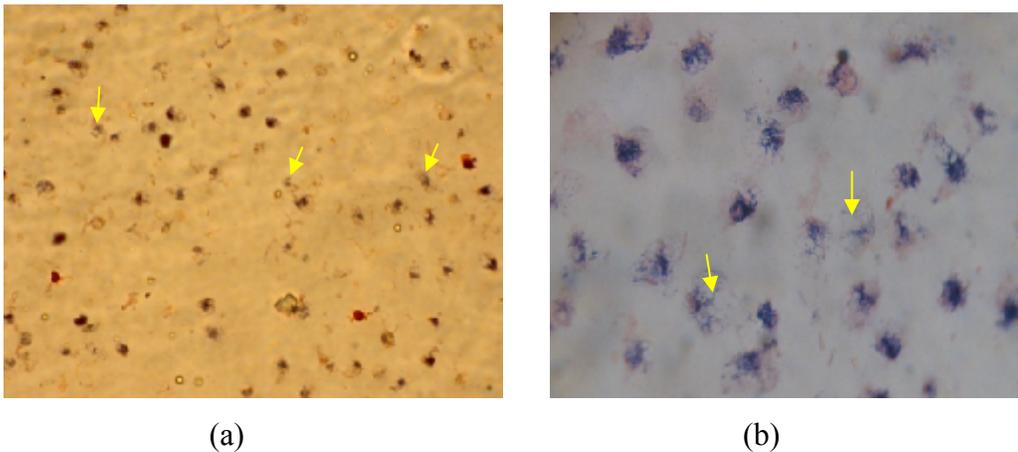


(b)

Gambar 4.2 Sel netrofil pembesaran (a) 400x dan (b) 1000x

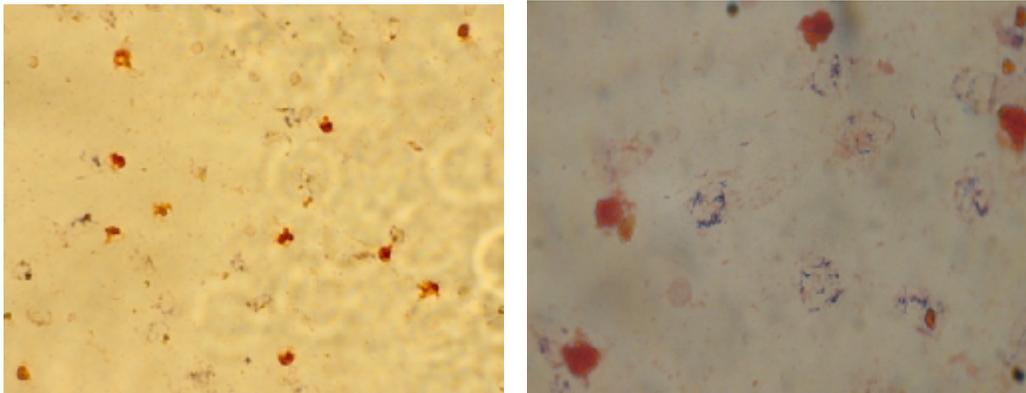
4.1.3 Hasil Produksi Radikal Superoksida Intraseluler

Produksi radikal superoksida intraseluler, ditentukan dengan cara mikroskopis. Hasil penelitian dengan pewarnaan safranin menunjukkan netrofil yang terstimulasi oleh bakteri atau produknya akan memproduksi radikal superoksida yang dapat dilihat sebagai granula biru (gambar 4.3), sedangkan netrofil yang tidak memproduksi radikal superoksida akan terlihat berwarna merah (gambar 4.4)



Gambar 4.3 Gambaran superoksida dengan pembesaran (a) 400x dan (b) 1000x Radikal superoksida tampak sebagai granula biru (panah)

Hasil penelitian mendapatkan bahwa pada kelompok perlakuan ada banyak netrofil yang berwarna biru yang berarti sel netrofil mengeluarkan superoksida (gambar 4.3) dan juga terdapat sel yang lisis, Pada kelompok kontrol (gambar 4.4) netrofil tampak utuh, dominan berwarna merah dengan sedikit semburat biru di sekeliling sel.



(a)

(b)

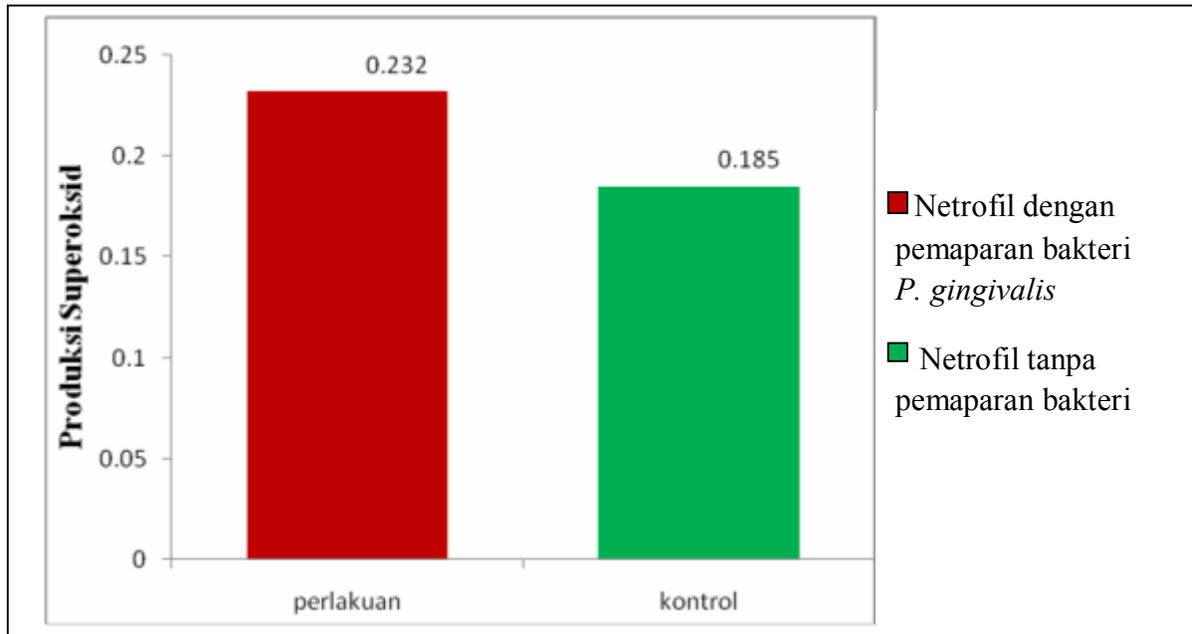
Gambar 4.4 Netrofil tanpa pemaparan bakteri *P. gingivalis* pembesaran (a) 400x dan (b) 1000x

Selain dengan pemeriksaan mikroskopis, radikal bebas superoksida ekstraseluler yang dihasilkan netrofil diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 580 nm. Hasil pengukuran disajikan pada tabel 4.1

Tabel 4.1 Hasil spektrofotometer produksi superoksida netrofil ekstraseluler

Sampel	Produksi Superoksida Ekstraseluler	
	Kontrol	Perlakuan
A	0,160	0,185
B	0,190	0,285
C	0,140	0,200
D	0,250	0,260
Rata-rata	0,185	0,232
Standar Deviasi	±0,048	±0,048

Dari spektrofotometer didapatkan hasil bahwa produksi superoksida ekstraseluler pada kelompok perlakuan lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol dengan rentang beda terbesar terjadi pada sampel B dan yang terkecil pada sampel D.



Gambar 4.5 Diagram batang rata-rata produksi superoksid ekstraseluler

4.2 Analisis Data

Data hasil pengukuran superoksid netrofil dengan spektrofotometer dilakukan uji normalitas dengan *Kolmogorov-smirnov* untuk mengetahui apakah data tersebut terdistribusi normal atau tidak, kemudian dilakukan uji homogenitas dengan *Leven's test* untuk mengetahui data berasal dari populasi yang homogen atau tidak. Selanjutnya dilakukan *independent T test* dengan derajat kemaknaan 95% untuk mengetahui apakah ada perbedaan yang bermakna antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

Hasil uji normalitas *kolmogorov-smirnov* menunjukkan nilai probabilitas dari kelompok perlakuan ($p=0,961$) dan kelompok kontrol ($p=0,995$) adalah lebih besar dari 0,05 ($p>0,05$), yang diasumsikan data tersebut terdistribusi normal sebagaimana hasil analisis yang tersaji pada lampiran C. sedangkan hasil uji *levene* mendapatkan nilai probabilitas 0,737 ($p>0,05$) maka dapat diketahui bahwa ragam dari semua kelompok adalah sama (homogen). Karena data yang diperoleh normal dan homogen, maka hasil spektro produksi superoksid netrofil memenuhi syarat untuk dilakukan

analisis data menggunakan uji parametrik *Independent T-test* dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$).

Tabel 4.2 Hasil *Independent T-test* produksi superoksida ekstraseluler

Kelompok	Produksi Superoksida ($\bar{X}\pm SD$)	Sig (2-tailed)	Ket
Perlakuan	0,232 \pm 0,04	0,210	Tidak signifikan
Kontrol	0,185 \pm 0,04		

Hasil produksi superoksida netrofil pada kelompok kontrol maupun perlakuan (tabel 4.2) menunjukkan tidak ada perbedaan secara signifikan dengan nilai probabilitas ($p>0,05$). Hal ini berarti bahwa bakteri *P.gingivalis* sedikit meningkatkan produksi superoksida netrofil.

4.3 Pembahasan

P. gingivalis adalah bakteri penyebab terjadinya penyakit periodontal. Bakteri ini merupakan salah satu organisme yang paling sangat terkait dengan *chronic adult periodontitis*. *P. gingivalis* termasuk dalam golongan *black-pigmented gram-negative anaerobes*. Faktor virulensi *P. gingivalis* yang potensial, yaitu fimbriae, hemagglutinins, lipopolisakarida, dan berbagai enzim protease bakteri mampu hidrolisis kolagen, imunoglobulin, besi-mengikat protein, dan faktor komplemen yang dapat menyebabkan penyakit secara langsung maupun tidak langsung sehingga mengaktifkan sel tubuh untuk melepaskan mediator-mediator kimiawi (Cutler, dkk, 1995; Lynch dan Kuramitsu, 1999)

Netrofil adalah sel pertahanan tubuh pertama dalam melawan jejas. Jejas dapat berupa bakteri, virus, jamur ataupun bahan lain yang dianggap berdampak merugikan bagi tubuh. Karena fungsinya dalam melawan jejas, maka sel ini juga disebut sel fagosit. Menurut Arraes *et all* (2006) dan Effendi (2003) netrofil memiliki peran utama yaitu sebagai pertahanan seluler terhadap invasi jasad renik dan memfagosit partikel kecil terutama bakteri.

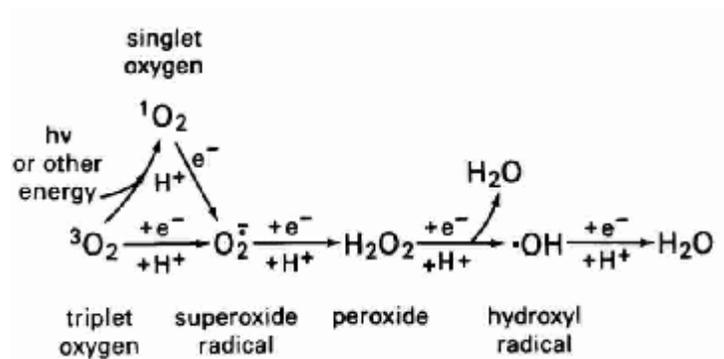
Penelitian Susilawati (2008) menyatakan bahwa terdapat interaksi antara netrofil dengan bakteri *P. gingivalis* yang ditunjukkan oleh adesi *P. gingivalis* pada netrofil. Hal ini diduga karena komponen sel *P. gingivalis* adalah *chemoattractan* bagi netrofil. *Chemoattractan* kadar rendah menunjukkan adanya respon khemotaksis, sedangkan kadar tinggi menimbulkan degranulasi dan meningkatnya metabolisme fosfolipid dan pelepasan granula protein dan produk oksigen reaktif dari netrofil (Hendiani,1997).

Produk oksigen reaktif yang diukur dalam penelitian ini adalah produksi superoksida (O_2^-). Pengukuran banyaknya superoksida ekstraseluler diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 580 nm sedangkan produksi superoksida intraseluler dilakukan dengan pengamatan mikroskopis.

Hasil pemeriksaan mikroskopis pada penelitian ini terlihat banyak sel yang berwarna biru pada kelompok perlakuan yang mengindikasikan diproduksi radikal superoksida intraseluler yang melimpah. Warna biru terjadi karena netrofil yang terstimulasi oleh bakteri atau produknya akan memproduksi radikal superoksida yang dapat mereduksi senyawa NBT menjadi bentuk tidak terlarut (formazan). Formazan dapat dideteksi dengan mikroskop sebagai granula biru (Halliwell and Gutteridge, 1999). Hasil spektrofotometer menunjukkan rata-rata produksi superoksida ekstraseluler yang lebih besar dibandingkan kelompok kontrol. Hasil ini menunjukkan bahwa telah terjadi pembentukan radikal superoksida netrofil untuk melawan adanya invasi bakteri *P.gingivalis*. Pembentukan radikal ini berguna untuk mengeliminasi dan membunuh bakteri.

Netrofil pada kelompok perlakuan menjadi aktif setelah mengenali bakteri dan berupaya untuk mengeliminasinya. Pengenalan tersebut terjadi menggunakan reseptor pada permukaan netrofil, sehingga dapat membedakan antara antigen asing dan self-antigen. Reseptor *scavenger* yang mengikat ligan-ligan bermuatan dan CD14 yang merupakan reseptor *lipopolysacharide* (LPS) bakteri ditemukan baik pada makrofag maupun netrofil. Patogen dapat berinteraksi dengan netrofil melalui reseptor komplemen yang berada pada sel tersebut.

Netrofil yang aktif akan menghancurkan bakteri dengan mekanisme yang mencakup sistem oksidatif dan non oksidatif. Mekanisme oksidatif dimediasi oleh pembentukan ROS (*Reactive Oxygen Spesies*) dan produksi sejumlah besar *derivate* oksigen seperti O_2^- , H_2O_2 , OH^- dan $HOCl$. Mekanisme oksidatif netrofil terbagi menjadi dua jalur utama, yaitu NADPH-oksidade yang digunakan saat netrofil mengenali bakteri dan enzim myeloperoksidase saat netrofil melakukan proses fagositosis.



Gambar 4.6 Radikal superoksid dan derivatnya (Arief, 2010).

Pengenalan bakteri oleh netrofil membuat enzim NADPH-oksidade yang berada di membran netrofil teraktivasi dan memicu peningkatan konsumsi oksigen yang cepat (*Respiratory burst*) karena adanya penggunaan glikogen yang tinggi. NADPH oksidade dapat mereduksi oksigen menjadi anion superoksid (O_2^-). Netrofil yang terstimuli bakteri dapat meningkatkan penggunaan oksigen hingga berlipat ganda dari keadaan normal (Gough, 2006).

Pada saat proses fagositosis bakteri oleh netrofil, dimana patogen yang terikat segera dikelilingi oleh membran sel fagosit dengan penjuluran sitoplasma dan segera diinternalisasi ke dalam vesikel bermembran yang disebut fagosom. Di samping bersifat fagosit, netrofil mempunyai granula lisosom yang berisi enzim, protein, dan peptida yang memperantarai respon antimikroba intraselluler. Fagosom dapat mengadakan fusi dengan beberapa lisosom membentuk fagolisosom. Pada

fagolisosom ini kandungan lisosom (utamanya enzim *myeloperoxidase*) dikeluarkan untuk menghancurkan patogen. Selama proses fagositosis, netrofil menghasilkan molekul toksik untuk membantu pembunuhan mikroorganismenya yang ditelan oleh sel tersebut. Molekul toksik yang paling penting adalah hidrogen peroksida (H_2O_2), anion superoksida (O_2^-), dan *nitric oxide* (NO), yang langsung meracuni bakteri (Kirkwood, 2006).

Superoksida (O_2^-) yang terbentuk dari hasil pengenalan netrofil dan proses fagositosis, dapat disalurkan secara intraseluler dan ekstraseluler yang selanjutnya digunakan untuk proses pertahanan netrofil terhadap serangan patogen. Adanya aksi kombinasi dari pH yang tinggi, ion superoksida, derivat oksigen, peptida atau protein yang bersifat bakterisida dapat membunuh bakteri.

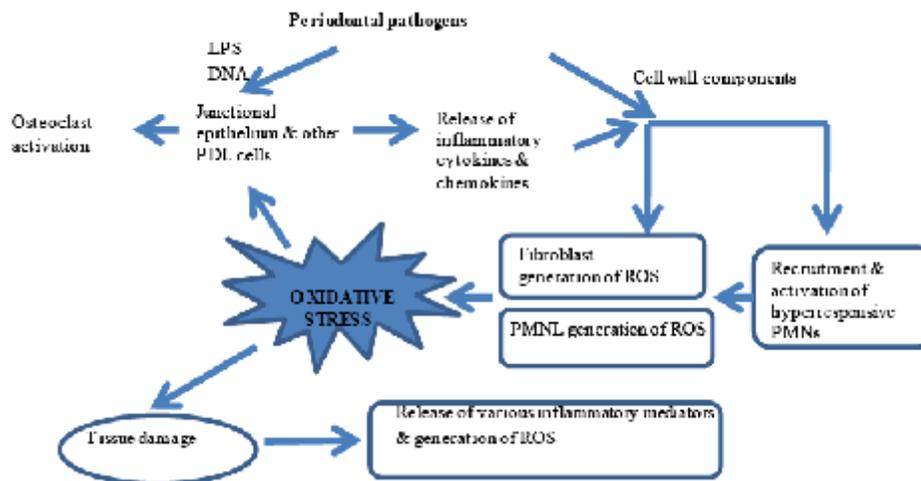
Perangsangan netrofil yang terus-menerus oleh bakteri *P.gingivalis*, dapat menyebabkan aktivasi netrofil yang berlebihan dalam mengeluarkan radikal bebas superoksida. Hal ini terlihat bahwa warna biru pada kelompok perlakuan lebih dominan daripada kelompok kontrol yang mengindikasikan produksi superoksida yang lebih besar (gambar 4.3 dan gambar 4.4). Aktivasi yang berlebihan dapat berdampak pada degranulasi dan lisisnya netrofil. Hal ini bisa menimbulkan konsekuensi yang fatal, karena selain mengandung enzim-enzim sumber ROS (terutama NADPH oksidase dan myeloperoxidase), granula-granula lisosomal netrofil juga mengandung enzim hidrolitik dan proteolitik. Sehingga bila netrofil lisis dan enzim-enzim tumpah ke jaringan, potensial menimbulkan kerusakan pada berbagai molekul organik di sekitarnya (Susilawati, 2008). Hal ini menunjukkan bahwa adanya bakteri *P.gingivalis* dapat menstimulasi netrofil secara berkepanjangan untuk mengeluarkan superoksida yang berfungsi sebagai bentuk pertahanan diri. Di sisi lain pengeluaran superoksida yang terus-menerus dapat mengakibatkan kerusakan bagi sel itu sendiri yaitu berupa lisisnya sel seperti yang tampak pada penelitian ini, ataupun kerusakan fatal bagi molekul seluler lain di sekitarnya.

Pada jaringan periodontal, produksi ROS utamanya superoksida berguna dalam melawan bakteri penyebab penyakit periodontitis. Agen utama penyebab inflamasi

periodontal adalah bakteri *gram negative* anaerob fakultatif dalam subgingiva yang salah satunya adalah bakteri *P.gingivalis*.

Netrofil adalah sel yang pertama kali keluar bila terdapat Inflamasi periodontal, oleh karena itu sel ini memiliki mekanisme selektif dalam upayanya untuk mempertahankan sel host. Tapi, respon host yang berlebihan dapat menyebabkan destruksi jaringan periodontal.

Hasil akhir dari terbentuknya superoksida netrofil dapat menginduksi kolagenolisis yang dapat menginduksi keluarnya kolagen dari jaringan ikat, memicu *pro-inflammatory* sitokin berlebihan yang merupakan penyebab inflamasi periodontal dan jika terjadi berkelanjutan dapat menyebabkan hilangnya perlekatan jaringan periodontal dari tulang alveolar serta terjadi juga peningkatan PG-E₂ yang dapat menstimulasi resorpsi tulang.



Gambar 4.7 Dampak ROS pada jaringan periodontal (Sharma,2011)

Pemeriksaan mikroskopis pada kelompok kontrol menunjukkan adanya gambaran semburat biru yang mengindikasikan terbentuknya radikal bebas, meskipun lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok perlakuan. Demikian juga dengan hasil spektro kelompok kontrol, Meskipun tanpa pemaparan *P.gingivalis* terdapat superoksida pada netrofil kelompok kontrol, Hal ini sebenarnya tidak diharapkan, akan

tetapi sifat netrofil yang sensitif terhadap adanya benda asing, memungkinkan terbentuknya superoksida. Terbentuknya superoksida pada kelompok kontrol diduga karena adanya kontaminasi atau aktivasi dari netrofil.

Kontaminasi diduga terjadi antara rentang waktu proses pipetting di atas coverslip hingga saat proses inkubasi bahan penelitian ke dalam inkubator anaerob. Kontaminasi yang terjadi dapat dikarenakan udara, bahan atau alat penelitian yang tidak steril atau oleh karena hal lain yang tidak bisa dikendalikan oleh peneliti. Sedangkan aktivasi netrofil dapat terjadi karena netrofil merupakan sel yang mudah teraktivasi oleh sedikit gerakan atau adanya partikel asing. Dalam penelitian ini, sedikit getaran, pipetting yang terlalu kuat ataupun perlakuan yang tidak steril dapat mengaktifkan netrofil. Hal ini karena netrofil bereaksi secara nonspesifik terhadap partikel asing, artinya pengenalannya tidak tergantung pada jenis maupun sifat keantigennya. Hal ini bertujuan agar sel dapat mempertahankan hidup dengan cara memakan partikel lain di sekitarnya (Hendiani,1997). Dengan demikian sedikit jejas saja, baik itu debris jaringan, sel rusak, bakteri atau non-bakteri dianggap oleh netrofil sebagai hal yang membahayakan bagi tubuh sehingga dapat membuatnya teraktivasi dan berusaha mengeliminasinya dengan cara memproduksi radikal bebas superoksida.

Oleh karena itu, diperlukan ketelitian dan kesterilan bahan atau alat penelitian yang baik karena netrofil merupakan sel yang sangat sensitif terhadap adanya partikel asing.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat ditarik kesimpulan bahwa pemaparan bakteri *P. gingivalis* menstimulasi terjadinya produksi superoksida neutrofil baik secara intraseluler maupun ekstraseluler.

5.2 Saran

1. Penelitian eksperimental laboratoris membutuhkan ketelitian dan kesterilan alat yang baik.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang pengaruh radikal superoksida yang distimulasi bakteri *P.gingivalis* pada molekul seluler lain
3. Perlu dilakukan penelitian secara in-vivo untuk mengetahui pengaruh radikal bebas superoksida yang distimulasi bakteri *P.gingivalis* terhadap jaringan periodontal

DAFTAR BACAAN

- Anonim. 2008. *Porphyromonas gingivalis*. [www.mikrobia.files.wordpress.com 2008 /05/ blog- mikro.pdf](http://www.mikrobia.files.wordpress.com/2008/05/blog-mikro.pdf) [diakses tanggal 12 november 2010].
- Anonim. 2010. Sel Neutrofil. www.wikipedia.com [diakses tanggal 25 november 2010]
- Araujo V, Arnal C, Boronat M, et al. 1998. Oxidant-anti oxidant imbalance in blood of children with juvenile rheumatoid arthritis. *Bio Factor*. 8:155-59.
- Arraes, S.M.A., Freitas, M.S., Silva, S.V.d., Neto, H.A.d.P., Filho, J.C.A., Martins, M.A., Filho, A.B., Murta B.M.T., Fidalgo, C.B., dan Cunha, F.Q. 2006. *Impaired Neutrophil Chemotaxis in Sepsis Associates with GRK Expression and Inhibition of Actin Assembly and Tyrosin Phosphorylation*. *J.Am. Soc. Hematol*
- Arief, S. 2010. *Radikal Bebas*. Surabaya: SMF Ilmu Kesehatan Anak FK UNAIR. www.pediatrik.com/buletin/06224113752-x0zu6l.doc [diakses tanggal 28 Oktober 2010]
- Bellanti, J. A. 1985. *Imunologi III*. Terjemahan oleh A. Samik Wahab. 1993. Jogjakarta: Gadjah Mada University press.
- Cooper, K. H. 2000. *Antioxidant Revolution*. Tennessee: Thomas Nelson Publisher.
- Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Pathology Basic of Disease*. 6th ed. Philadelphia : WB Saunders Company; 1999; 21-31.
- Cutler, C. W., J.R. Kalmar, and C.A. Genco. 1995. Pathogenic Strategies of Oral Anaerob Porphyromonas gingivalis. *Trends Microbiol*. 3:45. 4556-4567
- Danusantoso, Halim. 2003. Peran Radikal Bebas Terhadap Beberapa Penyakit Paru. *J.Kedokteran Trisakti*. Vol 22 No.1
- Donno MD, Verduri A. 2000. Oxidants and antioxidants in pulmonary diseases, European Respiratory News, VIII, Suppl. *World Congress on Lung Health and 10th ERS Annual Congress*.
- Dorland. 2006. *Kamus Saku Kedokteran Dorland, Edisi 29*. Jakarta: EGC.

- Droge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82:47-95.
- Effendi, Z. 2003. *Peranan Leukosit sebagai Antiinflamasi Alergik dalam Tubuh*. Medan: Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara
- Galis ZS., Khatri J. 2002. Matrix Metalloproteinases in Vascular Remodeling and Atherogenesis. *Circulation Research.* 90:251
- Ganong, W. F. 2002. *Fisiologi Kedokteran*, Edisi 20. Terjemahan Widjadjakusumah, M. Dj. Jakarta: EGC
- Gough, P. J., Gomez I. G., Wille P.t., and Raines E. W. 2006. Macrophage expression of active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 116: 59-69.
- Guyton, A. C., dan Hall, J. E. 1997. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran, Edisi 9*. Terjemahan Irawati dkk. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Guyton, A. C., dan Hall, J. E. 2008. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran, Edisi 11*. Terjemahan Irawati dkk. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Halliwell B and Gutteridge JMC. 1999. *Free radical in Biology and Medicine 3rd edition*. Osaka: University Press.
- Harahap, N. S. 2008. *Pengaruh Aktivitas Fisik Maksimal terhadap Jumlah Leukosit dan Hitung Jenis Leukosit pada Mencit (Mus musculus L) Jantan*. Tesis. Sumatra Utara: USU e-repository
- Hendiani, Ina. 1997. Peranan Sel L PMN pada Penyakit Periodontal. *Cermin Dunia Kedokteran* (118):51-55
- Imamura, T. 2003. in novel gingipain of periodontal disease pathogenic. *J Periodontol* Vol.74: 111-8.
- Kirkwood, Nisengard, Haake and Miyasaki. 2006. *Carranza's Clinical Periodontology 10th ed*. London: WB. Saunders.
- Lautan, J. 1997. Radikal Bebas pada Eritrosit dan Lekosit. *Cermin Dunia Kedokteran*, (116): 49-51.
- Leslie, C., at all., 1998, *Topley Wilson's Microbiology and microbial infection : Systematic bacteriology 9th ed*. Oxford University Press, Inc., New York.

- Manson, J. D. dan Elley, B. M. 1993. *Buku Ajar Periodonti*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Mars, P and Michael V Martind. 2000. *Oral Microbiology fourth edition*. Britain: Wright
- Merawati, D. 1996. Vitamin E dapat Menangkal Timbulnya Radikal Bebas (Oksidan). *Wahana*. 8: 22-3.
- Mercredi. 2010. Memahami Antioksidan dan Radikal Bebas. <http://fr-fr.facebook.com/notes/tanaman-obat-alternatif/memahami-antioksidan-dan-radikal-bebas-artikel-2-terakhir/439480394519?ref=nf>. [diakses tanggal 2 februari 2012]
- Muhilal. 1991. Teori Radikal Bebas dalam Gizi dan Kedokteran. *Cermin Dunia Kedokteran*, (73): 9-11.
- Nester, et al. 1998. *Microbiology a human perspective* 4th edition, 646-648, Mc Graw Hill, New York
- Newman, H., M. Battino., P. Bullon and M. Wilson. 1999. Oxidative Injury and Inflammatory Periodontal Diseases: The Challenge of Anti-Oxidants To Free Radicals and Reactive Oxygen Species. *Crit Rev Oral Biol Med*. 10(4):458-476
- Newman, Michael., et al. 2006. *Carranza's Clinical Periodontology 10th ed*. London: WB. Saunders.
- Noril, Y., Ozaki, K., Nakae, H., Matsuo, T., Ebisu, S. 1997. Immunohistochemistry experimental study of localized *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter rectus*, and *Viscivus actinomyces* in periodontal pocket. *J Periodontol* Vol.32: 598-607.
- Notoadmodjo, S. 2002. *Metodologi Penelitian (Edisi Revisi)*. Jakarta: PT Rineka Pustaka
- Poon B. Y., Ward C. A., Cooper C. B., Giles W. R., Burns A.R., Kubes P. 2001. α_4 -Integrin Mediates Neutrophil-induced Free Radical Injury to cardiac Myocytes. *J. Cell Biol*, 152 (5): 857-866.
- Ritchie, Christine., MD, MSPH and Denis F. Kinase. 2003. Nutrition, Inflammation, and Periodontal Disease. *Nutrition*.19:5

- Robbins, S., dan Kumar. 1995. *Buku Ajar Patologi I, Edisi 4*. Jakarta: EGC.
- Roeslan, B. U. 2002. *Imunology Oral: kelainan dalam Rongga Mulut*. Jakarta: FKG Universitas Trisakti.
- Romanelli R., Mancini., Laschinger C., Overall CM., Sodek J., McCulloch CAG. 1999. Activation of Neutrophil Collagenase in Periodontitis. *Infection and immunity*. 69: 5
- Sharma, Alok and Swati Sharma. 2011. Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Periodontics. *International Journal of Dental Clinic*. 3:2
- Sodeman, W. A., dan Sodeman, T. M. 1991. *Patofisiologi*. Jakarta: Hipokrates.
- Suryohudoyo, Purnomo. 1993. *Oksidan, Antioksidan, dan Radikal Bebas*. Surabaya: Lab. Biokimia FK Unair
- Susilawati, I.D.A., 2008. “Induksi *Porphyromonas gingivalis* terhadap Aktivitas Kolagenolisis Netrofil pada Kolagen Tipe IV (Studi in vitro Mekanisme Kolagenolisis Plak aterosklerotik).” Tidak Diterbitkan. Disertasi. Malang: Program Pascasarjana Universitas Brawijaya.
- Tihnulat, An nisaa Utami. 2009. Efek Bawang Putih (*Allium sativum*) dan Cabe Jawa (*Piper retrofactum* Vahl) terhadap jumlah neutrofil pada tikus yang diberi suplemen kuning telur. Karya Tulis Ilmiah. Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro
- Vojdani A. 2003. A look at infectius Agents as a Possible Causative Factor in cardiovascular Disease: Part I. *Ascp journal*

LAMPIRAN

Lampiran A. Perhitungan Jumlah Sampel

Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah berdasarkan rumus dari Daniel (2005), yaitu :

$$n = \frac{z^2 \sigma^2}{d^2}$$

Keterangan :

n = Besar sampel tiap kelompok

σ = Standart deviasi sampel

d = Kesalahan yang masih dapat ditolerir, diasumsikan $\sigma = d$

z = Nilai pada tingkat kesalahan tertentu, jika $\alpha = 0,05$ maka $z = 1,96$

perhitungannya adalah sebagai berikut :

$$\begin{aligned} n &= \frac{z^2 \sigma^2}{d^2} \\ n &= \frac{(1,96)^2 \sigma^2}{d^2} \\ &= (1,96)^2 \\ &= 3,84 \\ &= 4 \end{aligned}$$

Jadi besar sampel minimal berdasarkan perhitungan diatas adalah empat sampel untuk tiap kelompok.

Lampiran B. Surat Persetujuan Subyek Penelitian

SURAT PERSETUJUAN
INFORMED CONSENT

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama :

Umur :

J.kelamin :

Menyatakan bersedia untuk menjadi subyek penelitian dari :

Nama : Nahdiya Fitriyana

NIM : 071610101058

Fakultas : Kedokteran Gigi

Alamat : Jl. Mastrip gg.Blora No.28, Jember

Dengan judul penelitian “Pengaruh Pemaparan Bakteri *Porphyromonas gingivalis* Terhadap Produksi Superoksid Netrofil”, dimana prosedur pelaksanaan penelitian untuk penganbilan sampel ini tidak akan menimbulkan resiko bagi subyek yang bersangkutan.

Saya telah membaca atau dibacakan prosedur penelitian yang terlampir dan telah diberi kesempatan untuk menanyakan hal-hal yang belum jelas dan diberi jawaban dengan jelas.

Surat persetujuan ini saya tulis dengan sebenar-benarnya tanpa suatu paksaan dari pihak manapun. Dengan ini saya menyatakan dengan sukarela sanggup menjadi subyek dalam penelitian ini.

Jember,.....2011

Yang menyatakan

.....

Lampiran C. Hasil Analisis Data

NPar Tests

NPar Tests

Lampiran D. Foto Alat dan Bahan Penelitian



Foto 1. Mikroskop inverted



Foto2. Spektrofotometer



Foto 3. Laminar flow



Foto 4. Sentrifus



Foto 5. A. Syringe B. Torniquet
C. Coverslip D. Deck glass



Foto 6. A. Dextran B. NaCl

Lampiran E. Foto Penelitian

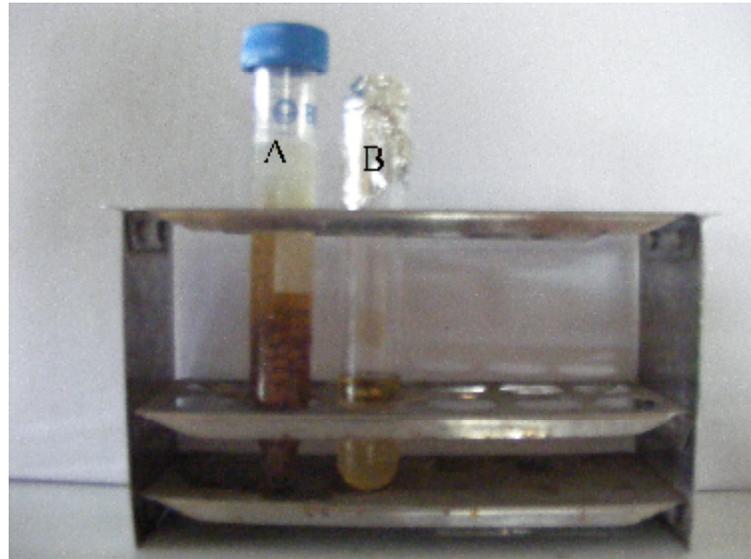


Foto 1. A. whole cell *P.gingivalis* (ATCC 33277)
B. Suspensi *P.gingivalis* $1,5 \times 10^6$ sel/ml

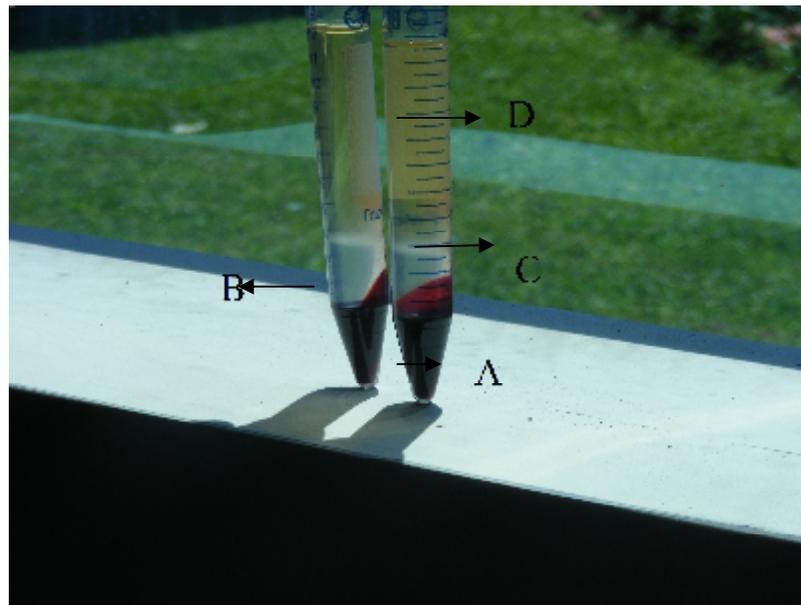


Foto 2. A Eritrosit, B. Netrofil, C. Monosit (buffy coat) dan D. plasma



Foto 3. Pengambilan sel netrofil