

**LAPORAN HASIL PENELITIAN
PENELITIAN FUNDAMENTAL**



**MINYAK IKAN LEMURU (*SARDINELLA LONGICEPS*) MEREGLASI
SURVIVAL OSTEOLAS DAN OSTEOKLAS, EKSPRESI INTEGRIN $\alpha\nu\beta 3$
TULANG ALVEOLARIS SERTA STRUKTUR GIGI PADA TIKUS YANG
MENGALAMI INFEKSI PERIODONTAL SELAMA MASA
ODONTOGENESIS**

Penanggung Jawab Program:

Dr. drg. Didin Erma Indahyani, M.Kes
drg. Izzata Barid, M.Kes
drg. Ari Tri W. Handayani, M.Kes

DIDANAI DIPA UNIVERSITAS JEMBER NOMOR: 0175.0/023-042/XV/2009

TANGGAL 31 DESEMBER 2008

SPK No 855/H25.3.1/PL.6/2009 Tanggal 10 Juni 2009

HALAMAN PENGESAHAN

1. Judul Penelitian :

Minyak ikan lemuru (*sardinella longiceps*) meregulasi survival osteoblas dan osteoklas, ekspresi integrin $\alpha\beta3$ tulang alveolaris serta struktur gigi pada tikus yang mengalami infeksi periodontal selama masa odontogenesis

2. Ketua peneliti :

- a. Nama Lengkap : Didin Erma Indahyani
- b. Jenis Kelamin : L/P
- c. NIP : 132 162 521
- d. Jabatan Struktural : IIIc
- e. Jabatan Fungsional : Lektor
- f. Fakultas/Jurusan : Kedokteran Gigi
- g. Pusat Penelitian : Universitas Jember
- h. Alamat : Jl. Kalimantan 37 Jember
- i. Telpon/Faks : 0331-333536/0331-331991
- j. Alamat Rumah : Perum. Bumi Kaliwates, Jl. Nusantara Blok GL/10 Jember
- h. Telpon/Faks/E-mail: 08155904300/0331-331991/didinermae@yahoo.com

3. Jangka Waktu Penelitian : 2 tahun

4. Pembiayaan

- a. Jumlah yang diajukan ke Dikti : Rp. 80.000.000,-
- b. Jumlah biaya tahun ke 1 (satu) : Rp. 40.000.000,-
- Biaya tahun ke 1 (satu) yang diajukan ke Dikti : Rp. 40.000.000,-
- Biaya tahun ke – dari institusi lain : Rp. –

Jember, 4 Desember 2009

Mengetahui,

Dekan FKG Univ. Jember,

Ketua Peneliti,

drg. Herniyati, M.Kes

NIP. 131 479 783

Dr.drg. Didin Erma Indahyani, M.Kes.

NIP. 132 162 521

Menyetujui,

Ketua Lembaga Penelitian

Dr. Ir. Cahyoadi Bowo

NIP. 131 832 324

RINGKASAN

Infeksi periodontal selama odontogenesis mengakibatkan pembentukan gigi dan erupsinya akan terganggu misalnya gigi mengalami hipoplasi, hipokalsifikasi dan erupsi prematur, yang mengakibatkan gigi rentan terhadap karies. *Docohexanoic acid* (DHA) dan *eicosapentaenoic acid* (EPA) diketahui mampu menurunkan mediator-mediator resorpsi tulang yaitu prostaglandin (PGE_2) dan sitokin proinflamatori, sehingga dikatakan mampu meningkatkan pembentukan tulang. Minyak ikan limbah lemuru, mengandung DHA 8,91% dan EPA 13,70%. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis minyak ikan lemuru terhadap survival osteoblas dan osteoklas, ekspresi integrin $\alpha\beta 3$ serta struktur gigi pada tikus khususnya selama masa odontogenesis yang mengalami infeksi periodont. Selain itu penelitian ini juga untuk menganalisis potensi minyak ikan lemuru dalam menghambat terjadinya hipoplasi maupun hipokalsifikasi pada gigi tikus. Penelitian ini diharapkan memberi landasan ilmiah yang kuat mengenai potensi minyak ikan lemuru pada survival osteoblas dan osteoklas, ekspresi integrin $\alpha\beta 3$ tulang yang berperan penting pada proses remodeling tulang baik secara normal maupun patologis.

Penelitian ini direncanakan selama 2 tahun. Pada tahun I, 3 kelompok tikus Wistar, jantan, umur 5 hari masing-masing 10 ekor. Kelompok I tikus diinduksi dengan salin pada *buccal fold* rahang atas kanan regio molar (sebagai kontrol), kelompok II tikus diinduksi dengan lipopolisakarida (LPS) pada regio yang sama, untuk terjadinya infeksi periodontal. Kelompok III diinduksi LPS dan diberi minyak ikan. Masing-masing kelompok dibagi menjadi 2 sub kelompok untuk di dekapitasi pada umur 13 dan 21 hari. Survival osteoblas dan osteoklas diamati pada apoptosis osteoblas dan osteoklas dengan *DNA nick end labeling of bone sections* dan dilakukan pengamatan berdasarkan indeks *hypoplasia and hypocalcification index* (HHI) pada struktur giginya. Pada tahun ke II, dilakukan pengamatan pada ekspresi integrin $\alpha\beta 3$ tulang alveolaris diamati dengan imunohistokimia (IHC).

Hasil penelitian ini adalah tikus yang mengalami infeksi periodontal selama masa odontogenesis terjadi peningkatan survival osteoklas yang signifikan ($p < 0,05$) dan penurunan survival osteoblas yang signifikan ($p < 0,05$) dibandingkan kontrol. Hal ini dapat dilihat dengan adanya jumlah osteoklas lebih tinggi, sedangkan

osteoblas banyak mengalami apoptosis. Peningkatan survival osteoklas ini mengakibatkan terjadinya hipoplasi dan hipokalsifikasi benih gigi pada tikus, dengan skoring mencapai 9, yaitu gigi mengalami hipoplasi dan hipokalsifikasi pada seluruh permukaan giginya. Minyak ikan lemuru secara signifikan ($p < 0,05$) meningkatkan survival osteoblas dan melemahkan osteoklas. Apoptosis osteoklas nampak lebih tinggi pada kelompok yang diberi minyak ikan lemuru. Namun begitu akibat gangguan LPS, masih dapat mengakibatkan terjadinya hipoplasi dan hipokalsifikasi pada gigi tikus dengan skoring 5 dan 6, yaitu hipoplasi hanya satu permukaan gigi, bahkan beberapa tikus tidak mengalami gangguan struktur gigi.

Kesimpulan pada penelitian ini adalah bahwa minyak ikan lemuru dapat meningkatkan survival osteoblas dengan cara menurunkan apoptosis osteoklas dan meningkatkan jumlah osteoblas sehingga gangguan struktur gigi yang terjadi yaitu hipoplasi dan hipokalsifikasi email, dapat di hindari pada tikus yang mengalami infeksi selama masa odontogenesis.

SUMMARY

Periodontal infection during odontogenesis result hipoplasi, hipocalsification and eruption premature. The consequence is tooth rampant to caries. *Docohexasonoic acid* (DHA) and *eicosapentaenoic acid* (EPA) have known able decrease mediators bone resorption i.e. prostaglandin (PGE₂), cytokine proinflammatory. Fish oil lemuru (*sardinella longiceps*) contain DHA 8.91% and EPA 13.70%. The aim of study was to analyse fish oil lemuru to survival osteoblast and osteoclast, expression of integrin $\alpha\beta3$ and tooth structure on rats during odontogenesis that induced periodontal induction. The study was too analyze potency of fish oil lemuru in inhibit tooth hypoplasii and hypocalcification. The study was hoped to provide basics of science strongly to potency of fish oil lemuru on osteoblast and osteoclast survival, expression of integrin $\alpha\beta3$ that have role of important in bone remodeling normally and pathologically.

The study was arrangement during 2 years. The first year, three groups rats, Wistar, male, 5 days. The first group, rats were injected salin on carried out on buccal fold of maxilla right molar area. The second group, rats were injected LPS on similar region. The three group, rat were injected LPS and administered orally fish oil lemuru. Each of groups was divided to 2 sub groups to decapitate on 13 and 21 days age. Survival osteoblast and osteoclast were analyzed on apoptosis use DNA *nick end labeling of bone sections* and done analyze HHI on tooth structure. In the second years, was prepared analyze expression of alveolaris bone integrin $\alpha\beta3$ use IHC.

Result of the study was periodontal infection cause increase survival osteoclast significantly, and decrease osteoblast significantly. The event can be known that numbers of osteoclast higher than osteoblast and osteoblast apoptosis higher than osteoclast apoptosis. Increasing of osteoclast survival caused hypoplasia and hypocalcification on rats tooth bud. The scoring of HHI index was 9, it is mean that hypoplasia and hypocalsification involved all of tooth surface. Fish oil of lemuru increasing survivall osteoblast and reduce survival of osteoclast significantly. Apoptosis of osteoclast was higher than groups of rat that were administered fish oil of lemuru. However, consequence periodontal infection can cause tooth hypoplasia and

hypocalcification. Scoring of HHI index was 5 and 6, its means that hypoplasia involved one of tooth surface. In fact these groups could found more rats did not suffer hypoplasia and hypocalcification.

The conclusion were fish oil of lemuru increased survival of osteoblast by suppressed apoptosis osteoclast and increased numbers of osteoblast. Fish oil of lemuru can too prevent hypoplasia and hypocalcification of tooth on rats infected periodontal during odontogenesis.

PRAKATA

Puji syukur kepada Allah SWT, karena hanya dengan ijinNya penulisan karya tulis ilmiah ini dapat diselesaikan. Penulisan karya tulis ini bertujuan untuk menganalisis minyak ikan lemuru terhadap survival osteoblas dan osteoklas, ekspresi integrin $\alpha\beta 3$ serta struktur gigi pada tikus khususnya selama masa odontogenesis yang mengalami infeksi periodontal. Selain itu penelitian ini juga untuk menganalisis potensi minyak ikan lemuru dalam menghambat terjadinya hipoplasi maupun hipokalsifikasi pada gigi tikus. Penelitian ini diharapkan memberi landasan ilmiah yang kuat mengenai potensi minyak ikan lemuru pada survival osteoblas dan osteoklas, ekspresi integrin $\alpha\beta 3$ tulang yang berperan penting pada proses remodeling tulang baik secara normal maupun patologis.

Penulis mengucapkan banyak terimakasih dan penghargaan yang sedalam-dalamnya atas dukungan moril maupun materiil dari berbagai pihak yaitu kepada Dekan Fakultas Kedokteran Gigi yang telah memberikan dukungan, Lembaga Penelitian Universitas Jember yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk mendapatkan grant dana penelitian, Direktorat Pendidikan Tinggi atas seluruh dukungan pembiayaan penelitian ini. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada seluruh tim penelitian, dan teman-teman sejawat Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang telah memberikan bantuan dan dukungannya serta teknisi laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang memberikan tenaga, dan fikirannya.

Akhir kata, penulis hanya dapat berharap semoga karya tulis ilmiah ini dapat membawa kebaikan dalam pengembangan ilmu pengetahuan, khususnya dalam bidang ilmu kesehatan dan semoga menjadi salah satu bentuk ibadah kepada Allah SWT.
Amin

Jember, 3 Desember 2009

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
<i>SUMMARY</i>	v
PRAKATA	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	3
1. Sel-sel tulang	3
2. Survival osteoblas dan osteoklas	5
3. Lesi periapikal	7
4. Lipopolisakarida (LPS)	8
5. Minyak ikan	9
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....	12
1. Tujuan	12
2. Manfaat Penelitian	12
BAB III. METODE PENELITIAN	13
1. Jenis Penelitian	13
2. Variabel bebas	13
3. Variabel terikat	13
4. Variabel terkendali	13
5. Bahan dan alat penelitian	13
6. Definisi Operasional	13
7. Bagan Penelitian	14

8. Cara Penelitian	15
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	19
1. Survival osteoblas dan osteoklas	19
2. Struktur Gigi	26
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN.....	31
1. Kesimpulan	31
2. Saran	31
DAFTAR PUSTAKA	32

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Jumlah osteoblas dan osteoklas	20
Tabel 2. Jumlah apoptosis sel osteoblas dan osteoklas.....	22
Tabel 3 : Frekwensi HHI indeks	26
Tabel 4. Hasil HHI indeks uji Mann Whitney	27

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Mekanisme metabolisme n-3 dan n-6 PUFA	10
Gambar 2. Bagan penelitian.....	14
Gambar 3. Gambaran osteoblas dan osteoklas dengan pengecatan HE (pembesaran 1000x pada A dan B, pembesaran 400x pada C-F)	21
Gambar 4. Gambaran apoptosis osteoklas dan osteoblas, dengan TUNEL (pembesaran 1000x)	23
Gambar 5. Gigi Yang mengalami hipoplasi dan hipokalsifikasi	28

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Instrumen penelitian	38
Lampiran 2. Personalia tenaga peneliti beserta kualifikasinya	39
Lampiran 3. Analisis data one way anova dan LSD pada jumlah osteoblas dan osteoklas, apoptosis osteoblas dan osteoklas.	40
Lampiran 4. Hasil analisis non parametrik dengan Wilcoxon dan Mann-Whitney test pada HHI Index	46
Lampiran 5. Foto perlakuan pada tikus pada saat menginduksi LPS dan memberi minyak ikan.....	55

BAB I. PENDAHULUAN

Penyakit periodontal yang berlanjut akan menimbulkan destruksi tulang alveolaris. Apabila terjadi pada masa geligi pergantian, memudahkan infeksi menyebar 20-30% lebih cepat pada benih gigi permanen yang masih dalam tahap pertumbuhan dan perkembangan (McDonnell, dkk.,2004), akibatnya gigi permanen erupsi prematur (McNamara,dkk., 1999), mengalami hipoplasi dan hipomineralisasi email (Nicolau, dkk., 2003) yang memudahkan terjadinya karies (Wan, dkk., 2003).

Lipopolisakarida (LPS) dan produk bakteri lain merupakan pemicu utama terjadinya destruksi tulang pada penyakit periodontal (Stashenko, 2002) karena menstimulasi peningkatan pembentukan dan aktivitas osteoklas yang berfungsi pada destruksi tulang (Schawartz, dkk., 1997). Pada hewan coba induksi LPS pada rahang atas selama odontogenesis mengakibatkan terjadinya hipoplasi dan hipokalsifikasi dan erupsi prematur gigi pada tikus (Indahyani, dkk., 2007).

Penyembuhan destruksi tulang alveolaris oleh penyakit periodontal perlu dilakukan, supaya tidak mengganggu pertumbuhan, perkembangan benih gigi dan fungsinya. Strategi terapi pada penyakit tulang adalah menurunkan perkembangan progenitor dan rekrutmen osteoklas, memacu apoptosis osteoklas matur dan menekan terjadinya apoptosis pada osteoblas (Manologas, 2000). Integrin $\alpha\beta3$, merupakan protein transmembran, menyebabkan terjadinya proliferasi, diferensiasi dan apoptosis osteoklas (Faccio,dkk., 2003). Saat ini penghambatan integrin $\alpha\beta3$ menjadi target terapi penyakit tulang (Faccio, dkk., 2003).

Minyak ikan yang banyak mengandung EPA dan DHA berperan penting terhadap penurunan mediator inflamasi dan resorpsi tulang. Beberapa penelitian yang telah dilakukan membuktikan bahwa diet minyak ikan terbukti menurunkan jumlah dan aktivitas preosteoklas serta osteoklas pada tikus yang mengalami infeksi periodontal (Indahyani, dkk., 2002). Reinwald, dkk., (2004) menyatakan bahwa diet minyak ikan mampu memperbaiki komposisi tulang, meningkatkan *Bone mineral density* (BMD) tulang pinggul dan tulang belakang pada orang tua laki-laki dan perempuan yang berumur antara 45-90 tahun (Weiss, dkk., 2005). Minyak ikan ternyata juga mampu meningkatkan ekspresi *bone sialoprotein* (BSP) yang berfungsi

pada aktivitas osteoblas (Indahyani, dkk., 2007) dan menurunkan osteopontin yang berfungsi pada aktivitas osteoklas (Indahyani, 2008).

Minyak ikan lemuru, dihasilkan dari limbah pengalengan, penepungan dan pemindangan ikan. Di Muncar, Banyuwangi perhari jumlahnya 1,5 ton, menghasilkan 5% minyak ikan lemuru (Amri, 2006; Yunizal, dkk., 1996). Minyak ikan lemuru mengandung *n-3 polyunsaturated fatty acid* (PUFA) yaitu *eicosapentaenoic acid* 13,70% (EPA) dan *docohexanoic acid* (DHA) 8,91% (Estiasih, 1996). Oleh karena kandungan EPA dan DHA minyak ikan lemuru yang tinggi, maka minyak ikan mempunyai potensi dalam meregulasi pembentukan dan aktivitas osteoblas maupun osteoklas. Berdasarkan hal tersebut perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengungkap potensi minyak ikan lemuru dalam masalah remodeling tulang dan pembentukan gigi geligi khususnya pada survival osteoblas dan osteoklas, ekspresi integrin $\alpha\beta3$ tulang alveolaris serta hipoplasi dan hipokalsifikasi gigi perlu dilakukan.

Diet minyak ikan terbukti memperbaiki komposisi tulang, meningkatkan bone mineral density dan dapat menurunkan aktivitas osteoklas, yang berfungsi pada proses resorpsi tulang. Hal tersebut karena minyak ikan mengandung asam lemak tidak jenuh n-3 (n-3 PUFA) yaitu EPA dan DHA. n-3 PUFA terbukti menurunkan produksi sitokin proinflamatori yaitu interleukin-1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-6, *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) dan eikosanoid yaitu prostaglandin (PGE₂), yang berperan penting pada pembentukan dan peningkatan aktivitas osteoklas.

Pada proses pembentukan tulang tidak hanya dibutuhkan menurunnya resorpsi tulang saja, tetapi harus ada keseimbangan mineral dalam tulang, yang di timbulkan oleh osteoblas. Osteoblas mensekresi BSP yang berfungsi pada motilitas osteoblas ke daerah tulang yang mengalami mineralisasi. BSP mempunyai afinitas tinggi pada kalsium dan hidroksiapatit.

Sampai saat ini belum diketahui efek minyak ikan terhadap aksi osteoblas dan BSP yang berperan penting pada mineralisasi tulang. Minyak ikan lemuru mengandung 13,70% DHA dan 8,91% EPA, sehingga berpotensi terhadap modulasi mineralisasi tulang. Oleh karena potensinya tersebut penelitian pada EPA dan DHA dari minyak ikan lemuru dalam mempengaruhi proliferasi osteoblas, sekresi BSP dan pembentukan mineralisasi jaringan perlu dilakukan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

1. Sel-sel tulang

Tulang terdiri dari matriks organik yang termineralisasi dan sel tulang yaitu osteoblas, osteosit dan osteoklas. Osteoblas dan osteoklas diperoleh dari prekursor yang berasal dari sumsum tulang.

a. Osteoblas

Osteoblas berasal dari *local pluripotent mesenchymal stem cells*, yaitu dari sel stem stromal sumsum tulang (endogenous) atau sel-sel stem mesenkim jaringan ikat (periosteum). Prekursor tersebut akan distimulasi untuk berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi preosteoblas, kemudian akan berdiferensiasi lagi menjadi osteoblas yang matur (Baron, 2006). Faktor yang mampu memulai osteoblastogenesis adalah *bone morphogenic proteins* (BMPs) (Rosen, dkk., 1996 sit Manolagas, 2000). BMPs akan menstimulasi transkripsi gen yang menyandi *osteoblast-specific transcription factor* disebut juga dengan *osteoblast specific factor 2* (Osf2) atau *core binding factor a 1* (Cbfa1) (Ducy, dkk., 1997). Cbfa1 akan mengaktifkan gen-gen spesifik dalam osteoblas yaitu OPN, BSP, kolagen tipe I dan osteocalcin (OC) (Gao, dkk., 1998). Faktor-faktor lain yang dapat, menstimulasi replikasi dan diferensiasi osteoblas yaitu *transforming growth factor β* (TGF β), *platelet-derived growth factor* (PDGF), *insulin-like growth factors* (IGFs) dan kelompok-kelompok dari *fibroblast growth factor* (FGF) (Manolagas, 2000).

Selama perkembangan dan maturasi, osteoblas mengekspresikan gen-gen yang spesifik. Osteoblas tidak pernah nampak atau berfungsi secara individual, tetapi selalu dalam kelompok-kelompok sel kuboid di sepanjang permukaan tulang (100-400 sel/daerah pembentukan tulang). Osteoblas yang matur akan mensekresi osteoid, kolagen tipe I, faktor pertumbuhan, alkaline fosfatase. Proses pembentukan tulang terjadi melalui tiga proses yaitu produksi dan maturasi matriks osteoid yang kemudian dilanjutkan dengan mineralisasi (Baron, 2006).

Mineralisasi tulang terjadi dengan adanya deposisi kristal HA dalam matriks organik yang terdiri dari kolagen tipe I dan beberapa protein yang lain (Hunter, dkk., 1994; Stevens dan Lowe, 1997). Deposisi HA terjadi apabila konsentrasi lokal Ca^{++} dan PO_4^{3-} di atas nilai ambang, yang prosesnya adalah sebagai berikut.

1. Glikoprotein dalam osteoid berikatan dengan Ca^{++} ekstraselular
2. Enzim alkalin fosfatase yang banyak terdapat dalam osteoblas, meningkatkan konsentrasi lokal Ca^{++} dan PO_4^{3-}
3. Vesikel matriks yang diproduksi osteoblas akan mengalami penumpukan Ca^{++} dan PO_4^{3-} , dan alkalin fosfatase serta pirofosfatase terus menerus memecah PO_4^{3-} dari molekul-molekul besar yang berasal dari cairan ekstraseluler.

(Stevens dan Lowe, 1997).

b. Osteoklas

Osteoklas berasal dari sel stem hematopoetik dalam sumsum tulang. Osteoklas dibentuk oleh fusi progenitor *mononuclear* dari monosit-makrofag *lineage*. Osteoblas dalam periosteum dan sel stromal yang menyerupai osteoblas (*osteoblast-like*) dalam jaringan hematopoetik mengontrol pembentukan dan aktivasi osteoklas melalui kontak sel ke sel dengan sel progenitor (Lerner, 2004). Diferensiasi prekursor osteoklas menjadi osteoklas multinuklear yang matur dan fungsi osteoklas diatur secara lokal yaitu sitokin dan secara sistemik yaitu hormonal (Zheng, dkk., 1991; Baron, 2006).

Osteoblas/sel stromal mengekspresikan *osteoclast differentiation factor* (ODF) atau *stromal osteoclast forming activity* (SOFA) dalam merespon $1\alpha,25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$ ($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), PTH dan IL-11. Prekursor osteoklas akan mengenali ODF/SOFA (*Receptor activator for NF- κ B ligand* (RANKL, disebut juga TRANCE, ODF dan OPGL) melalui RANK *receptor* (TRANCER) yang terletak dalam osteoklas yang kemudian akan berdiferensiasi menjadi osteoklas. Sel stromal maupun osteoblas juga akan menstimulasi *macrophag colony stimulating factors* (M-CSF yang juga dikenal sebagai CSF-1) dalam merespon $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ dan IL. M-CSF, IL-1, RANKL akan menyebabkan prekursor osteoklas berdiferensiasi dan mengalami fusi kemudian aktif menjadi osteoklas multinuklear (Suda, dkk., 1999).

Osteoklas merupakan sel multinuklear dengan diameter besar yang mengandung 4-20 nukleus. Osteoklas ditemukan kontak dengan permukaan tulang dan dalam lakuna (*Howship's lacuna*). Pada daerah resorpsi dapat ditemukan osteoklas kurang lebih 4-5 osteoklas tetapi biasanya hanya 1 atau 2 osteoklas (Baron, 2006).

Dalam sitoplasma osteoklas, *carbonic anhidrase II* (CA II) membentuk asam karbonat (H_2CO_3) dari karbondioksida (CO_2) dan air. Asam karbonat terurai menjadi bikarbonat (HCO_3^-) dan proton (H^+). Proton digerakkan melalui *ruffled border* ke dalam lakuna dengan *vacuolar proton pump* (H^+ -ATPase). Membran *ruffled border* dipertahankan oleh *channel chlorid* yang berpasangan dengan H^+ -ATPase dan menghasilkan HCL yang mengakibatkan celah/rongga ekstraselular yang dekat dengan tulang mempunyai pH 4-5. Lingkungan yang asam menyebabkan degradasi HA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) yang merupakan komponen mineral tulang. Proton mendegradasi HA menjadi Ca^{2+} yang larut dalam fosfat anorganik (HPO_4^{2-}) dan air. Selain itu osteoklas juga mensekresi *tartrate-resistant acid phosphatase* dan thiol proteinase yang merupakan *acidic collagenase*, *cathepsin K*, yang diperlukan untuk efisiensi degradasi tulang (Blair, dkk., 2002).

Penurunan resorpsi ditimbulkan oleh keseimbangan kalsium dan kandungan mineral tulang yang dilakukan oleh sel-sel tulang yaitu osteoblas dan osteoklas (Mühlbauer dan Fleisch, 1990). Ketidakseimbangan mineralisasi sering ditemukan karena adanya inflamasi, keganasan maupun proses degenerasi (Fohr, dkk., 2003). Pada proses regenerasi, tulang yang dihilangkan oleh osteoklas diganti oleh osteoblas. Pembentukan tulang oleh osteoblas merupakan proses yang lama dan berlangsung beberapa bulan. Peristiwa seluler yang terjadi pada pembentukan tulang merupakan peristiwa pergerakan prekursor osteoblas ke daerah resorpsi dengan proses kemotaksis, dan juga adanya proliferasi prekursor osteoblas yang diikuti oleh diferensiasi untuk menjadi sel yang matur. Osteoblas matur mampu mensintesis protein tulang yaitu kolagen type I, osteokalsin, osteopontin, alkalin fosfatase, proteoglikan dan komponen-komponen faktor regulasi pertumbuhan yang disimpan dalam matriks tulang (Mundy, 1991).

2. Survival osteoblas dan osteoklas

Perubahan pada pembentukan tulang merupakan akibat dari rekrutment prekursor osteoblas yang berhubungan erat dengan terjadinya perubahan fungsi dan diferensiasi osteoblas. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa perubahan survival osteoblas ataupun osteosit berperan penting pada pengurangan pembentukan tulang. Survival osteoblas merupakan bagian penting yang tergantung dengan adanya

perlekatan sel yang dimediasi oleh integrin matriks ekstraselular. Penurunan ekspresi mRNA $\alpha\beta3$ di dalam sel osteoprogenitor menghasilkan perubahan aktivasi signaling IGF-1 dan proliferasi osteoblas (Sakata, dkk., 2009)..

Apoptosis merupakan komponen penting yang terlibat dalam osteogenesis secara normal dan patologis. Abnormalitas patologis pada kematian sel bisa disebabkan dari perubahan target yang beragam. Di dalam sel mamalia, proses apoptosis melalui beberapa tahap yang melibatkan pada induksi fase upstream dan downstream. Peristiwa upstream melibatkan induksi signal transduction cascades dan aktivasi molekul intraselular. Peristiwa downstream, melibatkan pelepasan protein dari mitokondria dan aktivasi protease dan nuklease yang berperan pada degradasi DNA, dan terutama kematian sel (Schwartzman dan Cidlowski, 1993).

Lipopolikarida menginduksi osteoblast untuk mengekspresikan NOD1 and NOD2, yaitu dua kelompok *nucleotide-binding domain* dan *leucine-rich repeat region* yang mengandung kelompok protein reseptor biasa disebut NLRs, yang bertindak sebagai sensor intraselular untuk bakteri peptidoglikan dan menginisiasi produksi mediator proinflamatori. *NLR family CARD domain* yang terdiri dari 4 (NLRC4, yang saat ini dikenal sebagai Ipaf, Card12, atau CLAN) dan *NLR family pyrin domain* yang terdiri dari 3 (NLRP3, yaitu dikenal sebagai CIAS1, cryopyrin, PYPAF1, atau NALP3) telah diimplikasikan dalam menginduksi kematian sel dalam merespon bakteri dan komponennya (Gumucio, dkk., 2002; Sutterwala, dkk., 2006). Kedua molekul tersebut dapat berhubungan dengan protein adaptor yaitu *apoptosis-associated speck-like protein* (ASC) untuk menstimulasi aktivasi caspase-1 and caspase-8 yaitu enzim yang menunjukkan peningkatan aktivitas osteoblas setelah terinduksi bakteri. Aktivasi caspase-1 dan caspase 8 menginduksi apoptosis osteoblas (Mariathasan, dkk., 2007; McCall, dkk., 2008).

Apoptosis osteoblas juga diakibatkan meningkatnya produksi Nitric oxide (NO) akibat induksi lipopolisakarida. Lipopolisakarida dan sitokin proinflamatori, terbukti menstimulasi peningkatan iNOS. Kuzushima, dkk., (2006), menyatakan bahwa Tumour necrosis factor- α , interleukin- 1β and interferon- γ menyebabkan kematian sel osteoblas yang di mediasi oleh apoptosis bukan nekrosis. Sitokin terbukti menghasilkan peningkatan Inducible nitric-oxide synthase (iNOS) mRNA dan nitric-oxide (NO) dalam sel. NO menginduksi apoptosis osteoblas melalui

synthesis Bax protein (Mungrue, dkk., 2003). Selain itu NO menyebabkan penekanan pada viabilitas sel, potensial membran mitokondria dan sintesis ATP, yang mengakibatkan gangguan pada fungsi mitokondria, reaksi spesies oksigen intraseluler dan protein Bcl-2 yang berperan penting pada apoptosis osteoblas (Ruei-Ming Chen, 2006).

3. Lesi periapikal

Infeksi pulpa gigi terjadi sebagai akibat adanya karies, prosedur operatif gigi dan trauma yang melibatkan bakteri anaerobik Gram negatif dalam rongga mulut. Infeksi tersebut meningkatkan respons imun pulpa gigi, tetapi sering tidak efektif dalam mengeliminasi invasi bakteri, akibatnya terjadi nekrosis pulpa totalis yang selanjutnya akan menstimulasi respons imun sekunder di regio periapikalis. Respons imun periapikalis dikenal sebagai periodontitis apikalis. Salah satu akibat terjadinya respons imun yang kurang baik adalah adanya kerusakan tulang (Stashenko, 2002). Miyauchi (1992) menyatakan bahwa inflamasi pulpa bagian atas terjadi 3 hari setelah pembukaan ruang pulpa dan akan meluas ke daerah apikal dalam waktu 2 minggu setelahnya. Selanjutnya terjadi abses dan resorpsi tulang di regio periapikalis. Keluhan penderita adalah tidak mampu mengunyah pada sisi tersebut, sangat sakit dan terjadi mobilitas gigi (Gonzalez-Moles dan Gonzalez, 2004). Penelitian Anan, dkk. (1993) menunjukkan 2-3 hari setelah pembukaan pulpa pada gigi tikus terlihat peningkatan aktivitas *tartrate-resistant acid phosphatase* (TRAP) di daerah tulang periapikalis, yang merupakan petanda aktivitas osteoklas. Komponen bakteri yang terlibat yaitu LPS, menginduksi beberapa mediator polipeptida dan sitokin proinflamatori (Stashenko, 1990). LPS *A. actinomycetemcomitans* menyebabkan resorpsi tulang karena adanya peningkatan prostaglandin E-2 (PGE₂) dan IL-1 (Ishihara, dkk., 1991). Kultur sel prekursor osteoklas yang diinduksi dengan LPS *E. coli* menyebabkan pembentukan osteoklas (Jiang, dkk., 2003). Empat kali injeksi LPS *E. coli* setiap 48 jam pada mukosa alveolaris di daerah labial menyebabkan adanya inflamasi dan peningkatan jumlah osteoklas. Inflamasi tersebut berubah menjadi inflamasi kronik setelah 8 kali injeksi. Pada inflamasi kronik ini terjadi peningkatan ukuran dan jumlah intisel osteoklas. Penambahan dosis LPS yang dimulai dari 5µg, 50 µg dan 500 µg menyebabkan peningkatan jumlah dan aktivitas osteoklas (Umezu, dkk., 1989).

4. Lipopolisakarida (LPS)

LPS adalah molekul besar yang mengandung lemak dan karbohidrat, merupakan struktur utama dinding sel bakteri Gram negatif yang berfungsi untuk integritas struktur bakteri dan melindungi bakteri dari sistem pertahanan imun *host*. LPS terdiri dari 3 bagian yaitu rantai O-polisakarida, inti polisakarida dan *lipid A*. Rantai O-polisakarida dikenal sebagai O-antigen bakteri yang meluas dari inti polisakarida, yang mudah dikenali oleh antibodi *host*. Inti polisakarida dilekati oleh *lipid A*, merupakan bagian yang bertanggung jawab untuk toksisitas bakteri Gram negatif. LPS bersifat endotoksin karena LPS mengikat reseptor CD14 (Janeway, dkk., 2001). CD14 merupakan reseptor permukaan sel pada makrofag dan monosit untuk karbohidrat (Akashi, dkk., 2000; Ziegle-Heitbrock dan Ulevith, 1993). *Toll-like receptor-4* (TLR4) makrofag dan monosit yang berikatan dengan bakteri oleh karena adanya CD14 akan menginduksi sekresi sitokin dan *mediator lipid inflammation* (Janeway, dkk., 2001)

P. gingivalis, *A. actinomycetemcomitans* dan *bacteroides Sp* terdeteksi pada gingivitis marginalis maupun infeksi periapikalis (Imai, dkk., 2005; Geibel, dkk., 2005). Bakteri-bakteri lain yang juga terdeteksi pada lesi periapikal adalah *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *F. nucleatum* atau *S. sanguinis* (Geibel, dkk., 2005). LPS bakteri Gram negatif yaitu *A. actinomycetemcomitans* mempunyai struktur O-antigen yang sama dengan LPS *E. Coli* (Lakio, dkk., 2003). *A. actinomycetemcomitans* dan *E. coli* mempunyai potensi patogenesitas yang identik oleh karena *outer membrane protein* (OMP) *A. actinomycetemcomitans* dan *E. coli* mengandung protein yang mampu mengikat bagian Fc imunoglobulin. Hal tersebut merupakan salah satu faktor mekanisme virulensi bakteri (White, dkk., 1998). Lipopolisakarida *A. Actinomycetemcomitans* dan *E. coli* mampu menginduksi sitokin proinflamatori IL-1 β , IL-6, IL-8 dan TNF- α dari fibroblas gingiva (Agarwal, dkk., 1995). Penelitian Yoshimura, dkk. (1997) menunjukkan bahwa LPS *A. actinomycetemcomitans* dan *E. coli* mampu menginduksi PMN untuk mensekresi IL-1 β , IL-8, TNF- α dan *interleukin receptor antagonis* (IL-1ra) dalam jumlah yang besar, sedangkan PMN yang diinduksi dengan LPS *P. gingivalis*, IL-1 β tidak terdeteksi. Monosit yang diinduksi dengan LPS *P. gingivalis* dan *E. coli* mensekresi IL-1 β lebih tinggi daripada PMN.

Deteksi secara imunohistokimia pada infeksi pulpa dan lesi periapikal, terdapat ekspresi IL-1 α , IL-1 β dan TNF- α , ekspresi tersebut meningkat pada hari ke 4 setelah pulpa terbuka dan mencapai puncaknya pada hari ke 14 setelah terdapat lesi periapikal (Tani-Ishii, dkk., 1995). Dengan *polymerase chain reaction* (PCR), ekstrak gen-gen yang diperoleh dari lesi periapikal, menunjukkan ekspresi yang tinggi (Wang, dkk., 1997). Interleukin-1 dan TNF- α merupakan elemen kunci sitokin proinflamatori yang diaktifkan dalam merespons infeksi. Interleukin-1 sendiri lebih berpotensi dari pada TNF, tetapi keduanya menstimulasi resorpsi tulang (Wang dan Stashenko, 1993).

Prostaglandin meningkat pada lesi pulpa dan periapikal manusia (Cohen, dkk., 1985). Hal ini sesuai dengan penelitian Takayama, dkk. (1996), bahwa konsentrasi PGE₂ terlihat tinggi pada eksudat lesi periapikal yang ditentukan dengan *radioimmunoassay*. Tingginya PGE₂ dihubungkan dengan adanya gejala klinis yang direfleksikan pada lesi periapikal yang akut, dan destruksi jaringan yang ditunjukkan dengan meningkatnya ukuran daerah radiolusen. Hal ini oleh karena keberadaan dan aksi PGE₂ dikaitkan dengan inflamasi dan terjadinya destruksi periapikal seperti vasodilatasi, peningkatan permeabilitas vaskular, degradasi kolagen dan resorpsi tulang (Offenbacher, dkk., 1993).

5. Minyak ikan

a. Metabolisme minyak ikan

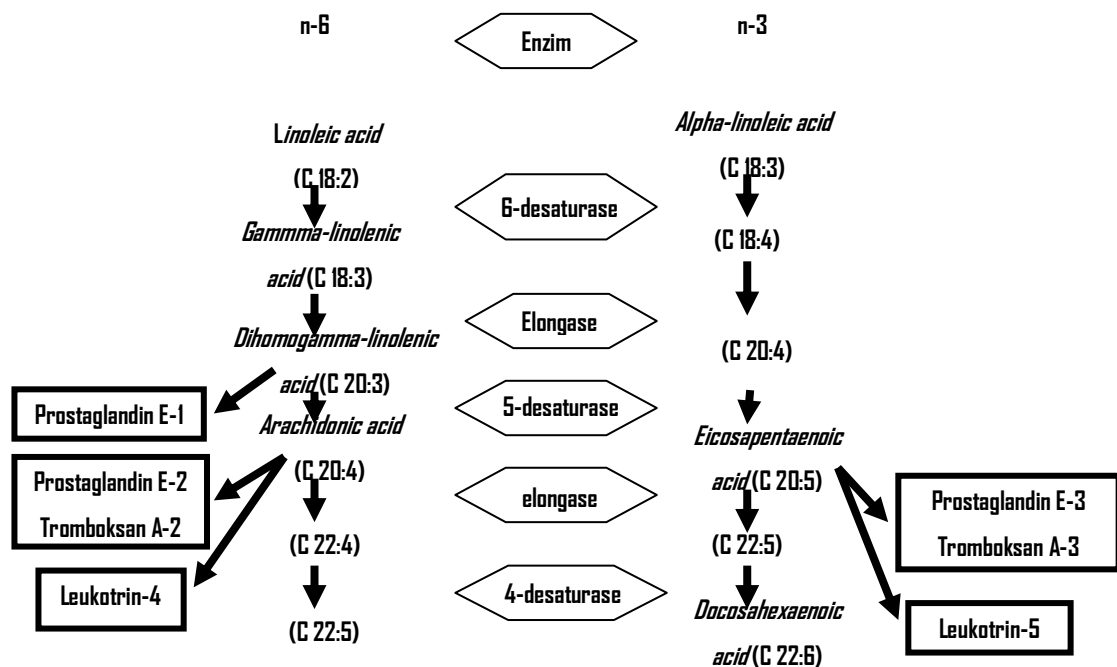
Minyak ikan merupakan lemak ikan yang berbentuk cair. Minyak tersebut diisolasi dari ikan yang hidup pada tumbuhan di bawah permukaan laut, misalnya ikan cod, hiu dan hering (Peck, 1994a; Winarno, 1997). Minyak ikan mempunyai bau dan rasa agak amis, tetapi tidak berbau tengik, sedikit larut dalam alkohol tetapi dengan bebas larut dalam eter, kloroform, karbon disulfat dan etil asetat (Tyler, dkk., 1981). Asam lemak tidak jenuh disebut juga *polyunsaturated fatty acid* (PUFA), dibagi menjadi dua keluarga besar yaitu n-6 PUFA dan n-3 PUFA, yang keduanya mempunyai fungsi fisiologis berbeda (Winarno, 1997). n-6 PUFA banyak ditemukan terutama pada minyak nabati sedang n-3 PUFA banyak ditemukan terutama dalam minyak ikan. *Eicosapentaenoic acid* (EPA) dan *docosahexaenoic acid* (DHA) hanya ditemukan pada minyak ikan (Newton, 1996), kandungannya sebesar \pm 25%-35%

(Galli sit Raz, dkk., 1997). Satu gram minyak ikan mengandung ±180 mg EPA dan 120 mg DHA (Kelley, 1996). Minyak ikan dari ikan menhaden mempunyai kandungan EPA dan DHA lebih tinggi dari pada minyak yang lain.

n-6 PUFA (*linolenic acid*) diubah menjadi rantai panjang melalui proses desaturasi dan elongasi menjadi γ -asam linolenat (GLA) dan asam arakhidonat (AA) sedang n-3 *fatty acid* α *linolenic acid* diubah menjadi EPA dan DHA. Proses metabolisme minyak ikan yang potensial adalah :

1. EPA mengganti sebagian asam arakhidonat (AA) dalam jaringan atau kumpulan prekursor eikosanoid (prostaglandin (PGE₂), tromboksan (TXA₂), leukotrin (LTB, LTC), dengan demikian mengurangi persediaan AA untuk mensintesis eikosanoid.
2. EPA sebagai antagonis menggantikan peranan AA untuk oksigenase dengan enzim yang mensintesis eikosanoid (siklooksigenase dan lipoksigenase).
3. Eikosanoid yang disintesis dari EPA (contoh PGE₃, TXA₃, LTB₅ atau LTC₅) mengurangi sifat inflamasi (Galli, dkk., sit Raz, dkk., 1997; Calder, 1998).

Gambaran metabolisme n-3 dan n-6PUFA dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Mekanisme metabolisme n-3 dan n-6 PUFA

Sumber: Newton (1996)

n-3 PUFA dikatakan mempunyai efek anti inflamasi karena kemampuannya merubah komposisi membran fosfolipid yang mengakibatkan terjadinya perubahan fluiditas membran, ikatan sitokin dan reseptornya, aktivitas protein (Grimble dan Tappia, 1998), serta berintegrasi langsung dengan aktivitas seluler (Peck,1994b). Fluiditas membran mempunyai pengaruh kuat pada fungsi membran yang penting, seperti pembentukan dan aktivitas membran yang dihubungkan dengan enzim dan reseptor *second messenger system* dan signaling sel (Wiseman, 1996).

BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

1. TUJUAN

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk menganalisis pengaruh minyak ikan lemuru pada proses remodeling tulang terhadap tikus yang mengalami infeksi periodontal selama masa odontogenesis.

Tujuan khusus penelitian ini adalah

Tahun I:

1. Struktur gigi yaitu terjadinya kelainan hipoplasi dan hipokalsifikasi email
2. Survival osteoblas dan osteoklas, dengan mengetahui tingkat apoptosisnya

Tahun II:

1. Ekspresi integrin $\alpha\beta3$ tulang alveolaris

2. MANFAAT PENELITIAN

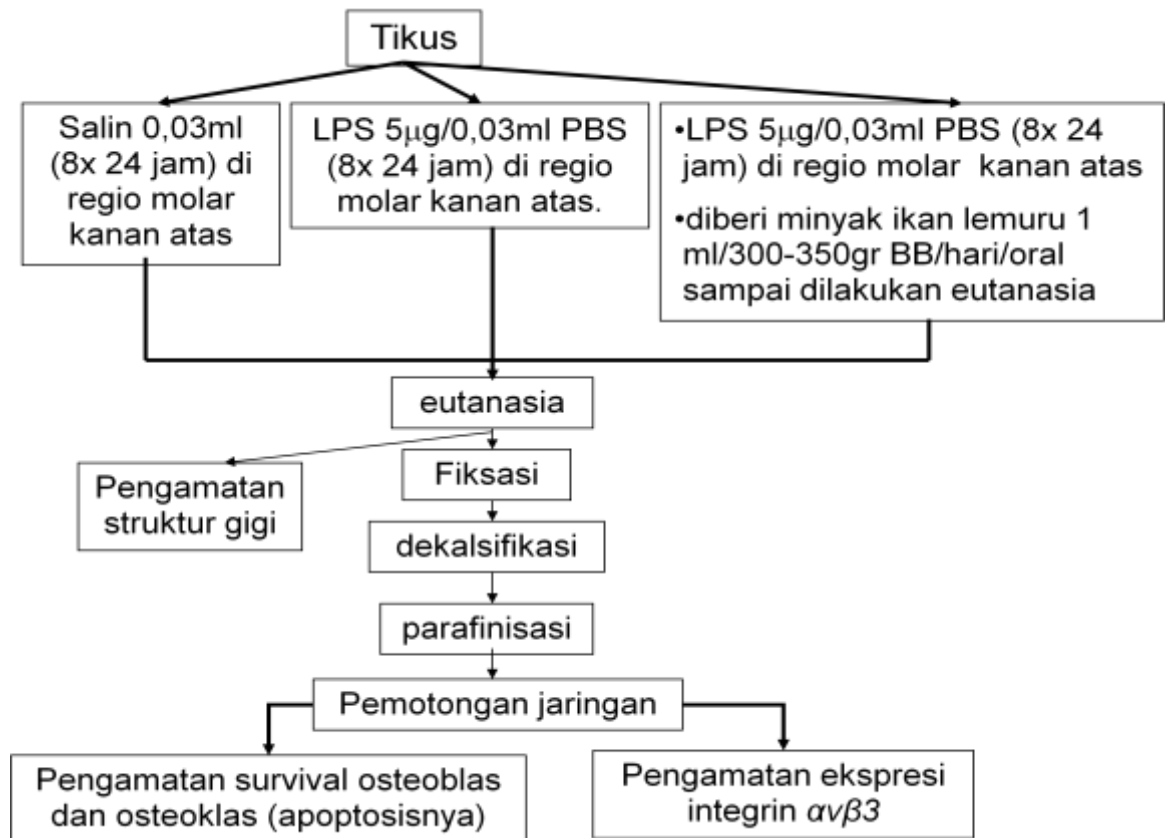
- Memberi landasan yang kuat dan rasional pada penggunaan minyak ikan lemuru sebagai bahan untuk remodeling tulang alveolaris ataupun tulang di bagian tubuh lain, baik normal maupun patologis.
- Penelitian tentang minyak ikan lemuru ini penting artinya, karena dapat memberikan alternatif terapi dengan biaya yang jauh lebih murah dan mudah didapat.
- Memberikan manfaat yang maksimal dalam pemanfaatan sumberdaya alam kelautan untuk kemajuan ilmu pengetahuan pengobatan dan kesehatan.

BAB III. METODE PENELITIAN

1. Jenis Penelitian : eksperimental laboratoris murni
2. Variabel bebas : Minyak ikan lemuru
3. Variabel terikat :
 - Survival osteoblas dan osteoklas
 - Integrin $\alpha\beta3$
 - Struktur gigi (enamel hipoplasi dan hipokalsifikasi)
4. Variabel terkendali :
 - Jenis kelamin tikus : jantan
 - Umur tikus : 5 hari
 - Galur tikus : Wistar
 - Makanan standart induk tikus : AIN 93
 - Jenis LPS : LPS Pg (Sigma)
 - Minyak ikan lemuru : diperoleh dari minyak ikan limbah lemuru secara tradisional dari Muncar, Banyuwangi
5. Bahan dan alat penelitian
 - a. Bahan : LPS *phorphyromonas gingivalis* (Pg), DHA dan EPA, fosphat buffer salin (PBS), *Transferase-mediated digoxigenin-deoxy-UTP nick end labeling* *Mouse monoclonal antibody against rat integrin $\alpha\beta3$* , *Bovine Serum Albumin* (BSA), *substrat buffer* pH 9,8, *substrat* (4-nitrophenyl phosphate) Bouin's fixative, asam asetat/formal salin, blok parafin, etanol, , amino-hexanoyl biotin dan streptavidine, metil green, *biotinylated anti mouse IgG* (skunder antibodi untuk IHC), *Avidin-biotin peroxidase*, 3,3'-*diaminobenzidine tetrahydrochloride* (DAB), *counter stain Mayer's Hematoxylin*
 - b. Alat : mikropipet, sonde lambung, syring unit, autoklaf, mikrotom, mikroskop cahaya, oven, mikroskop
6. Definisi Operasional:
 - a. Minyak ikan , merupakan lemak yang berbentuk cair, berasal dari limbah ikan lemuru (*S. longiceps*), yang diolah secara tradisional oleh para nelayan di daerah Muncar Banyuwangi.

- b. Survival osteoklas dan osteoblas adalah dengan membedakan terjadinya apoptosis pada sel osteoblas maupun osteoklas yang dilakukan dengan melakukan mengamatan menggunakan *DNA nick end labeling of bone sections*, nukleus sel akan tampak gelap
- c. Integrin $\alpha\beta3$ merupakan sel yang transmembran yang mempunyai fungsi untuk perlekatan osteoklas, apabila dilakukan pewarnaan dengan kromogen DAB akan nampak berwarna coklat.
- d. Struktur gigi pada penelitian ini meliputi gangguan srtruktur pada enamel gigi berupa enamel hipoplasi dan hipokalsifikasi. Hipoplasi adalah defisiensi ketebalan email yang terlihat seperti sumur-sumur kecil di email dan terkadang gigi akan nampak kuning, karena email yang tipis. Hipokalsifikasi adalah gangguan mineralisasi pada email yang terlihat adanya bintik putih yang terbatas jelas pada email.

7. Bagan Penelitian



Gambar 2. Bagan penelitian

8. Cara Penelitian

Tahun I : Pengujian pemberian minyak ikan lemuru terhadap survival osteoblas dan osteoklas serta pengamatan struktur gigi

A. Persiapan subyek penelitian

Tiga puluh ekor tikus Wistar, jantan, umur 5 hari, dibagi menjadi 3 kelompok yaitu :

- a. Kelompok I tikus diinduksi dengan salin normal
- b. Kelompok II tikus diinduksi dengan LPS
- c. Kelompok III tikus diinduksi dengan minyak ikan dan LPS

Masing-masing kelompok dibagi menjadi 2 sub kelompok yaitu kelompok yang akan didekapitasi pada umur 13 hari dan umur 21 hari.

Minyak ikan lemuru diberikan dengan dosis 1ml/300-350 gram berat badan tikus, secara peroral, menggunakan sonde lambung, dan diberikan tiap hari sampai tikus dilakukan dekapitasi. Lipopolisakarida (LPS) diinduksikan dengan tujuan untuk menyebabkan infeksi periodontal. Induksi LPS dilakukan di bukal fold regio molar rahang atas, dengan dosis 5 μ l LPS/0,03PBS yang dilakukan 24 jam sekali sebanyak 8 kali (Indahyani, 2007a). Tikus didekapitasi bila telah berumur 13 dan 21 hari. Tikus yang telah didekapitasi diambil rahang atas kanannya.

B. Kelainan struktur gigi yang telah erupsi diamati adanya hipoplasi ataupun hipokalsifikasi email giginya, berdasarkan indeks hipoplasi dan hipokalsifikasi email sebagai berikut.

1. 0 = tidak ada hipoplasi atau hipokalsifikasi
2. 1 = hipokalsifikasi terjadi pada setengah insisal atau oklusal mahkota gigi
3. 2 = hipokalsifikasi terjadi pada setengah servikal mahkota gigi
4. 3 = hipoplasi terjadi pada setengah insisal atau oklusal mahkota gigi
5. 4 = hipoplasi terjadi pada setengah servikal mahkota gigi
6. 5 = hipokalsifikasi < setengah permukaan fasial mahkota gigi
7. 6 = hipokalsifikasi > setengah permukaan fasial mahkota gigi atau yang terlibat lebih dari satu permukaan gigi
8. 7 = hipoplasi < setengah permukaan fasial mahkota gigi

9. 8 = hipoplasi > dari setengah permukaan fasial mahkota gigi atau yang terlibat lebih dari satu permukaan gigi
10. 9 = hipokalsifikasi/hipoplasi tidak termasuk diatas (hipoplasi yang *diffuse*, dan terbatas pada satu permukaan selain fasial.
(Hargreaves, dkk., 1989)

C. Pengamatan apoptosis osteoblas dan osteoklas dengan *DNA nick end labeling of bone sections*

- a. Rahang atas kanan dibagi menjadi 2. Bagian pertama difiksasi, bagian yang lain difiksasi dengan Bouin's fixative 4°C semalam, spesimen didemineralisasi menggunakan asam asetat/formal salin dan ditanam dalam blok parafin (disimpan)
- b. Potongan yang tanpa didekalsifikasi ditanam dalam metil metakrilat
- c. Dipotong dan irisan diletakkan di atas *slide* yang dilapisi *silane*
- d. *Slide* kemudian diletakkan dalam pepsin 0,5% dalam 0,1 N HCL selama 20 menit suhu 37C.
- e. Fragmentasi DNA dideteksi dengan *TUNEL reaction (Transferase-mediated digoxigenin-deoxy-UTP nick end labeling)*.
- f. Irisan dikonterstain dengan 3% *metil green*.
- g. Irisan diinkubasi selama 1-2 menit dengan 0,15% CuSO₄ dalam 0,9% NaCl.
- h. *TUNEL reactions* nampak pada nukleus sel dan sel yang nukleusnya nampak coklat gelap yang jelas adalah positif. *TUNEL reactions* yang positif adalah sel yang mengalami proses apoptosis
(Weinstein, dkk., 1998).

Tahun II

A. Pengamatan ekspresi integrin $\alpha\beta 3$ secara imunohistokimia

1. spesimen yang telah ditanam dalam blok parafin (pada tahun I),dipotong secara seri setebal 6 μ m, diletakkan di atas slide yang di lapisi dengan TES (3-aminopropyltriethoxysilane).
2. Spesimen didemineralisasi menggunakan asam asetat/formal salin (AFS: 4% formaldehyde dalam 10% asam asetat dan 0,85% sodium klorida (NaCl)).

3. Spesimen yang sudah didemineralisasi ditanam dalam blok parafin dan dipotong secara seri setebal 6 μ m dalam arah bukolingual dan diletakkan pada *slide* yang dilapisi dengan TES (*3-aminopropyltriethoxysilane*).
4. Deparafinisasi, dengan mencelupkan *slide* yang berisi irisan jaringan dalam xilol 1, xilol 2, xilol 3, alkohol absolut 3, alkohol absolut 2, alkohol absolut 1, alkohol 90%, alkohol 80%, alkohol 70%, masing-masing 2 menit.
5. *Slide* dimasukkan dalam 0,3% H₂O₂ dalam metanol 100ml, 10 menit
6. Cuci dalam air mengalir 10-15 menit, air distilasi, dikocok-kocok, PBS 3x masing-masing 5 menit
7. Teteskan *non immune serum* 1: 50 pada *slide*, inkubasi selama 30 menit.
8. Cuci dengan PBS 3x, masing-masing 5 menit
9. Teteskan antibodi primer (*Mouse monoclonal antibody against rat integrin $\alpha\beta$ 3*) yang telah diencerkan dengan *diluent buffer* dengan pengenceran 1:500, pada masing-masing *slide*, (untuk kontrol negatif diteteskannya hanya dengan *diluent buffer*). Letakkan pada tempat yang lembab dan inkubasi semalaman pada suhu 4°C
10. Cuci dengan PBS 3x, masing-masing 5 menit
11. Teteskan antibodi skunder (*biotinylated anti mouse IgG*) yang telah diencerkan dengan *diluent buffer* 1:200, inkubasi selama 30 menit
12. Cuci dengan PBS 3x, masing-masing 5 menit
13. Teteskan avidin-biotin, yang telah diencerkan dengan *diluent buffer* 1:100, inkubasi selama 30 menit
14. Cuci dengan PBS 3x, masing-masing 5 menit
15. Teteskan 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) atau 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC), inkubasi 10-20 menit, observasi di bawah mikroskop sampai muncul warna coklat untuk kromogen DAB dan merah untuk kromogen AEC. Untuk kontrol negatif tidak menunjukkan perubahan warna.
16. Cuci dengan PBS 3x, masing-masing 10 menit, kemudian cuci dalam air mengalir 10-15 menit
17. *Counterstain* dengan *Mayer's Hematoxylin* 5 detik
18. Cuci dalam air mengalir 10 – 15 menit

19. Rehidrasi dengan alkohol 70%, 80%, 90%, absolut 1, absolut 2, absolut 3, xilol 1, xilol 2 dan xilol 3.
20. Bersihkan dengan tisu, dan tutup *cover slip*.
21. *Slide* diamati di bawah mikroskop cahaya
(Syigeyama, dkk., 1996).

BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil analisis pada survival osteoblas dan osteoklas, dengan mengamati pada ekspresi sel osteoblas dan osteoklas, jumlah sel osteoklas dan osteoblas yang mengalami apoptosis dan struktur gigi yang mengalami hipoplasi dan hipokalsifikasi yang di nilai berdasarkan HHI indeks adalah sebagai berikut.

1. Survival osteoblas dan osteoklas

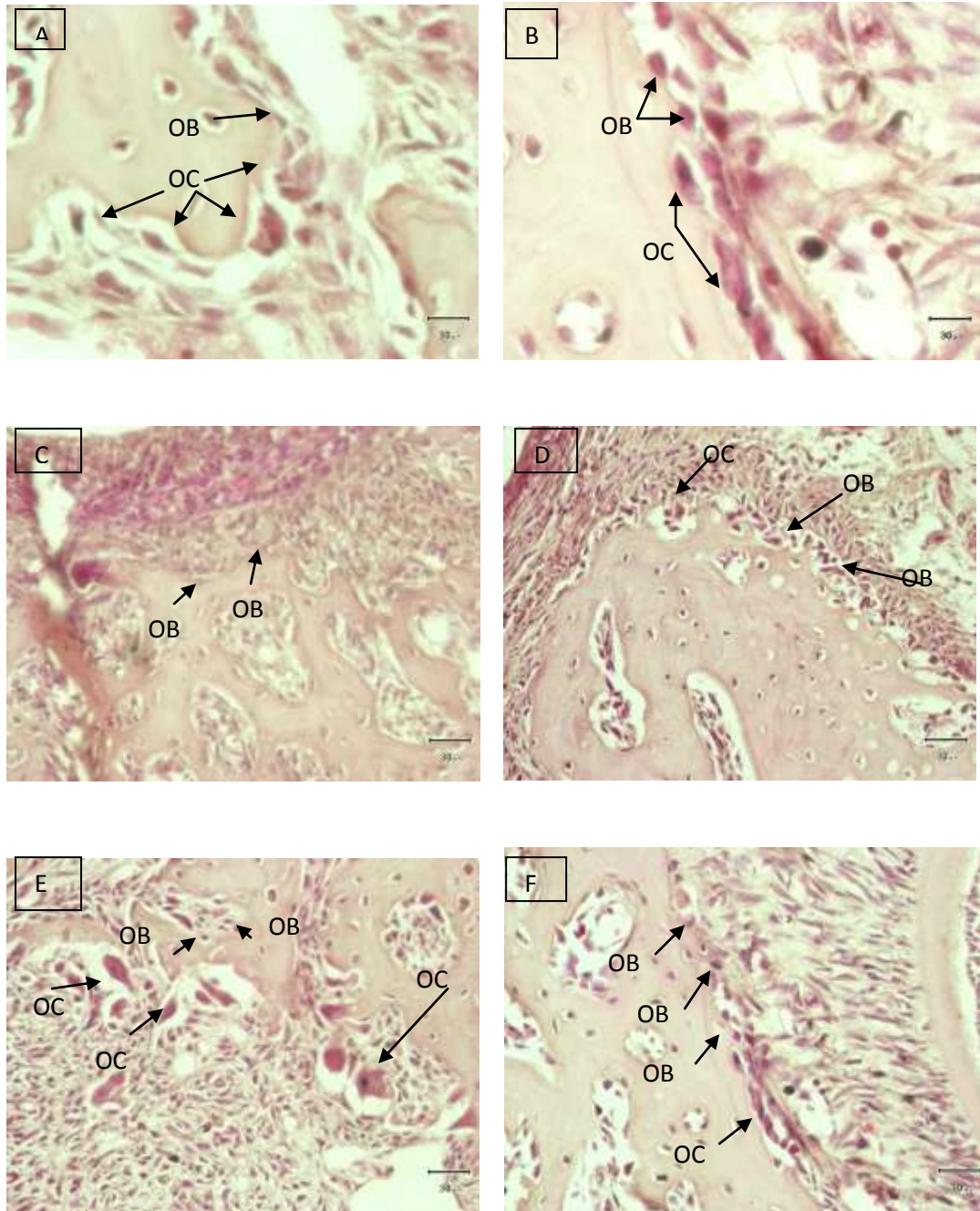
Survival osteoklas maupun osteoblas berperan penting pada turnover tulang. Rata-rata resorpsi dan pembentukan tulang ditentukan oleh jumlah dan aktivitas osteoklas dan osteoblas. Jumlah osteoklas dan osteoblas tergantung pada rata-rata relatif diferensiasi dan kematian sel (apoptosis). Diferensiasi dan apoptosis sel osteoblas maupun osteoklas, dipengaruhi berbagai faktor, termasuk faktor pertumbuhan, imunitas dan sebagainya. Salah satu strategi untuk menurunkan resorpsi tulang patologis, di samping menurunkan pembentukan osteoklas, adalah dengan meningkatkan dan mempercepat rata-rata apoptosis osteoklas. Apoptosis merupakan merupakan bentuk program kematian sel yang berperan penting dalam perkembangan dan fungsi jaringan dan sel (Xiaojun Wu, dkk., 2003).

Hasil penelitian ini setelah dilakukan analisis ANOVA yang dilanjutkan dengan uji LSD, menunjukkan bahwa, pada tikus yang berumur 13 hari post kelahiran jumlah osteoklas secara signifikan ($p < 0,05$) lebih tinggi di dibandingkan osteoblas, kemudian osteoblas secara bermakna ($p < 0,05$) menurun dibandingkan osteoklas pada tikus umur 21 hari (Tabel 1).

Tabel 1. Jumlah osteoblas dan osteoklas

	N	Osteoklas		Osteoblas	
		Mean	Std. Deviation	Mean	Std. Deviation
kontrol - 13 hari	5	7.40	.89	7.40	.89
kontrol - 21 hari	5	4.20	.83	11.00	1.73
LPS 13 hari	5	7.60	3.78	3.00	4.79
LPS 21 hari	4	9.00	2.00	6.25	2.62
LPS MI 13 hari	5	4.80	2.16	5.20	2.38
LPS MI 21 hari	5	4.20	2.86	5.60	4.77
Total	29	6.10	2.83	6.41	3.87

Osteoklas yang lebih tinggi jumlahnya menunjukkan adanya proses resorpsi tulang yang tinggi juga di daerah tersebut. Pada masa erupsi, osteoklas akan meningkat di sekitar benih gigi. Osteoklas tersebut berperan untuk resorpsi tulang yang berfungsi membuat saluran erupsi (Nancy, 2003). Hal ini sesuai dengan penelitian (Indahyani, 2008) sebelumnya bahwa pada tikus umur 9 dan 13 hari OPN terdeteksi lebih tinggi kemudian akan menurun dengan bertambahnya umur tikus. Umur 9 hari proses erupsi gigi pada tikus masih pada tahap intraoseus sehingga gigi masih terdapat di bawah tulang alveolaris dan dalam proses menembus tulang alveolaris sampai tikus berumur 14 hari. OPN disekresi osteoklas yang berfungsi untuk pergerakan osteoklas di daerah resorpsi. Keadaan tersebut mengakibatkan resorpsi tulang alveolaris di sekitar benih gigi lebih tinggi, karena digunakan untuk pembuatan saluran erupsi yang digunakan untuk pergerakan gigi ke arah rongga mulut. Peningkatan osteoblas pada tikus umur 21 hari, menunjukkan adanya pembentukan tulang yang tinggi di tulang alveolaris, karena gigi pada tikus sudah terjadi erupsi sempurna. Hal ini juga ditunjukkan bahwa hasil penelitian ini, tikus umur 21 hari telah mengalami erupsi sempurna (Gambar 3).



Gambar 3. Gambaran osteoblas dan osteoklas dengan pengecatan HE (pembesaran 1000x pada A dan B, pembesaran 400x pada C-F)

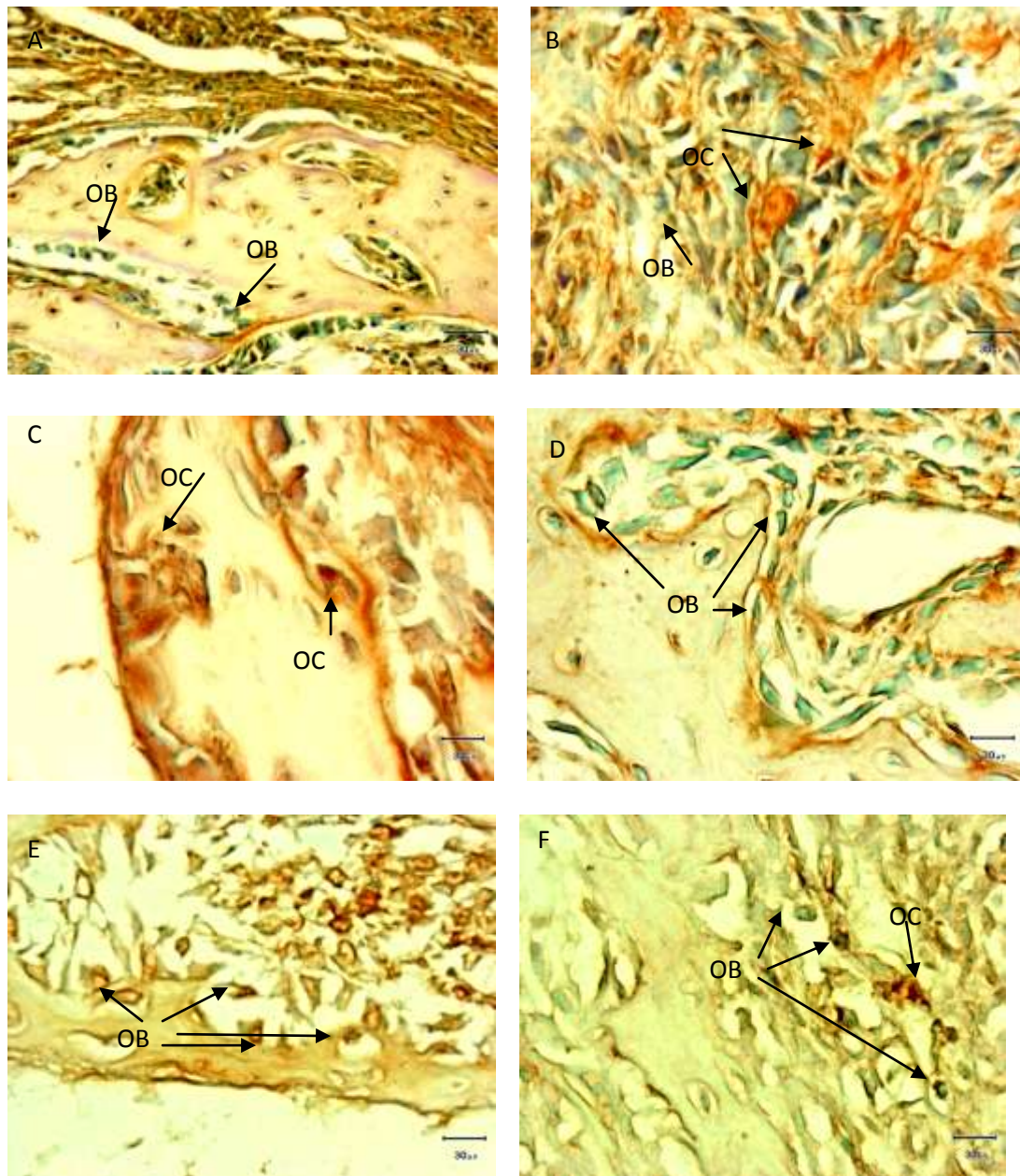
Keterangan Gambar 2. A. Tulang alveolaris tikus umur 21 hari yang diinduksi LPS. B. tulang alveolaris tikus yang diinduksi LPS dan diberi minyak ikan lemuru. Nampak jumlah osteoblas lebih banyak dibandingkan tikus yang diinduksi LPS. C. Kontrol, D. Diinduksi LPS dan diberi minyak ikan, E. Tikus yang diinduksi LPS (Osteoklas lebih banyak dan aktif), F. Tikus yang diinduksi LPS dan diberi minyak ikan lemuru.

Apoptosis osteoklas yang terjadi pada tulang alveolaris tikus umur 13 hari secara bermakna lebih rendah dibandingkan osteoblas. Apoptosis osteoklas akan meningkat secara signifikan pada tikus umur 21 hari, sedangkan osteoblas menurun (Tabel 2). Rendahnya apoptosis osteoklas pada tikus umur 13 hari menunjukkan tingginya survival osteoklas di bandingkan osteoblas. Hal ini mengindikasikan rendahnya pembentukan tulang alveolaris pada tikus umur 13 hari dibandingkan umur 21 hari. Secara fisiologis, apoptosis osteoklas terjadi pada jaringan ataupun sel yang sedang mengalami perkembangan.

Tabel 2. Jumlah apoptosis sel osteoblas dan osteoklas.

	N	Apoptosis osteoklas		Apoptosis osteoblas	
		Mean	Std. Deviation	Mean	Std. Deviation
kontrol - 13 hari	5	.60	.89	1.80	.83
kontrol - 21 hari	5	.80	.44	1.20	1.30
LPS 13 hari	5	1.20	1.30	5.80	3.96
LPS 21 hari	4	1.50	1.00	10.00	5.22
LPS MI 13 hari	5	5.80	4.81	3.80	2.28
LPS MI 21 hari	5	4.20	1.92	2.60	2.70
Total	29	2.37	2.89	4.00	3.95

Gambaran mikroskopis pada apoptosis osteoklas dan osteoblas dapat dilihat pada gambar 4 berikut ini.



Gambar 4. Gambaran apoptosis osteoklas dan osteoblas, dengan TUNEL (pembesaran 1000x)

Keterangan gambar : sel yang menunjukkan warna hijau merupakan sel yang survive, sedangkan sel yang berwarna coklat merupakan sel yang mengalami apoptosis. A. Tikus kontrol, C,E Tikus yang diinduksi LPS. D,F, tikus yang diinduksi LPS diberi minyak ikan;

Induksi LPS menyebabkan terjadinya peningkatan secara signifikan jumlah osteoklas dan penurunan secara signifikan jumlah osteoblas, baik pada tikus umur 13 hari dan tikus umur 21 hari (Tabel 1). Selain itu induksi LPS mengakibatkan

apoptosis pada osteoblas dan osteoklas pada tikus umur 13 hari. Secara signifikan apoptosis sel osteoblas lebih besar jumlahnya di bandingkan osteoklas. Hal tersebut juga terjadi pada tikus yang berumur 21 hari (Tabel 2). Oleh karena itu dapat dinyatakan bahwa LPS menyebabkan rendahnya survival osteoblas dan tingginya survival osteoklas. LPS bersifat endotoksin karena LPS mengikat reseptor CD14 di permukaan sel makrofag dan monosit. *Toll-like receptor-4* (TLR4) makrofag dan monosit yang berikatan dengan bakteri oleh karena adanya CD14 akan menginduksi sekresi sitokin dan *mediator lipid inflammation*. Sitokin dan mediator inflamasi tersebut termasuk IL-1, TNF- α juga PGE-2. Mediator-mediator tersebut berperan pada diferensiasi dan aktifitas osteoklas dan menekan jumlah osteoblas. Mediator tersebut memacu terbentuknya osteoklas dari sel stromal/osteoblas melalui ikatan sel ke sel yaitu RANKL dalam osteoblas dengan RANK pada progenitor osteoklas (Suda, dkk., 1999). Oleh karena itu pada penelitian ini diketahui bahwa jumlah osteoblas jauh lebih kecil dibandingkan osteoklas. Lipopolisakarida di ketahui berperan penting pada apoptosis osteoblas. Lipopolisakarida menginduksi osteoblast untuk mengekspresikan NOD1 and NOD2, yaitu dua kelompok *nucleotide-binding domain* dan *leucine-rich repeat region* yang mengandung kelompok protein reseptor biasa disebut NLRs, yang bertindak sebagai sensor intraselular untuk bakteri peptidoglikan dan menginisiasi produksi mediator proinflamatori. *NLR family CARD domain* yang terdiri dari 4 (NLRC4, yang saat ini dikenal sebagai Ipaf, Card12, atau CLAN) dan *NLR family pyrin domain* yang terdiri dari 3 (NLRP3, yaitu dikenal sebagai CIAS1, cryopyrin, PYPAF1, atau NALP3) telah diimplikasikan dalam menginduksi kematian sel dalam merespon bakteri dan komponennya (Gumucio, dkk., 2002; Sutterwala, dkk., 2006). Kedua molekul tersebut dapat berhubungan dengan protein adaptor yaitu *apoptosis-associated speck-like protein* (ASC) untuk menstimulasi aktivasi caspase-1 and caspase-8 yaitu enzim yang menunjukkan peningkatan aktivitas osteoblas setelah terinduksi bakteri. Aktivasi caspase-1 dan caspase 8 menginduksi apoptosis osteoblas (Mariathan, dkk., 2007; McCall, dkk., 2008).

Apoptosis osteoblas juga diakibatkan meningkatnya produksi Nitric oxide (NO) akibat induksi lipopolisakarida. Lipopolisakarida dan sitokin proinflamatori, terbukti menstimulasi peningkatan iNOS. Kuzushima, dkk., (2006), menyatakan

bahwa Tumour necrosis factor- α , interleukin-1 β and interferon- γ menyebabkan kematian sel osteoblas yang di mediasi oleh apoptosis bukan nekrosis. Sitokin terbukti menghasilkan peningkatan Inducible nitric-oxide synthase (iNOS) mRNA dan nitric-oxide (NO) dalam sel. NO menginduksi apoptosis osteoblas melalui synthesis Bax protein (Mungrue, dkk., 2003). Selain itu NO menyebabkan penekanan pada viabilitas sel, potensial membran mitokondria dan sintesis ATP, yang mengakibatkan gangguan pada fungsi mitokondria, reaksi spesies oksigen intraseluler dan protein Bcl-2 yang berperan penting pada apoptosis osteoblas (Ruei-Ming Chen, 2006).

Pemberian minyak ikan lemuru mengakibatkan penurunan jumlah osteoklas dan peningkatan jumlah osteoblas secara signifikan ($P < 0,05$), sedangkan apoptosis pada sel osteoblas lebih rendah dibandingkan pada sel osteoklas. (Tabel 1 dan 2). Minyak ikan lemuru banyak mengandung EPA dan DHA. Konsumsi minyak ikan yang banyak mengandung EPA dan DHA, mengakibatkan terjadinya peningkatan komposisi EPA dan DHA dan rendahnya AA dalam membran sel. Akibat hal tersebut terjadi perubahan fluiditas membran sel menjadi lebih tinggi. Fluiditas membran yang tinggi menyebabkan proses metabolisme terjadi lebih cepat. Apabila metabolisme lebih cepat maka proses resorpsi dan aposisi yang terjadi pada tulang alveolaris pada proses erupsi akan terjadi seimbang. Selain hal tersebut dikatakan oleh Kew, dkk. (2004) bahwa konsumsi EPA dan DHA pada kondisi sehat, tidak mempunyai efek yang bermakna pada penurunan fagositosis monosit dan netrofil ataupun pada sekresi proinflamatori dan molekul adhesi pada sel mononuklear darah perifer, walaupun komposisi fosfolipid plasma dan netrofil menurun. Menurut Montzioris, dkk. (2000), bahwa konsumsi n-3 PUFA, selama 2 minggu mengakibatkan peningkatan *α -linolenic acid* (ALA) sebanyak 3-4 x lipat, EPA 3 x lipat, DHA 1,5 x. Minyak ikan menurunkan sitokin proinflamatori maupun PGE₂ sehingga jumlah maupun aktivitas osteoklas tidak setinggi pada tikus yang hanya diinduksi LPS. Penurunan sitokin ini dihubungkan dengan penurunan aktivitas APC, yaitu dengan berkurangnya ekspresi molekul MHC kelas II dan ICAM. Ekspresi MHC kelas II merupakan salah satu syarat untuk fungsi APC dan ICAM merupakan molekul reseptor pada APC yaitu makrofag. Selain itu EPA dan DHA mengakibatkan penurunan PGE₂, oleh karena perubahan EPA dan DHA dalam

membran sel menyebabkan terjadinya peningkatan PGE₃ yang bersifat antiinflamatori. Aktivitas APC yang menurun dan rendahnya PGE-2, menyebabkan sitokin proinflamatori (IL-1 dan TNF-alpha) juga menurun. Rendahnya sitokin tersebut berperan untuk menghambat pembentukan NO yang tinggi dan juga menghambat stimulasi kelompok protein reseptor yaitu NLRs yang berperan pada apoptosis osteoblas.

2. Struktur Gigi

Pemberian minyak ikan lemuru selama masa odontogenesis pada gigi yang mengalami infeksi periodontal, dapat mencegah kegagalan pembentukan gigi. Hal ini dapat dilihat pada hasil penelitian adalah sebagai berikut.

Tabel 3 : Frekwensi HHI indeks

PERLAKUAN	HHI INDEKS									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Kontrol 13 hari	5									
Kontrol 21 hari	5									
LPS 13 hari									2	3
LPS 21 hari										4
LPS Minyak ikan 13 hari	2					2	1			
LPS Minyak ikan 21 hari						3	2			

Pada kelompok kontrol (yang hanya di induksi dengan salin, gigi mempunyai waktu erupsi yang normal, dan struktur enamel dan dentin yang normal pula. Induksi LPS, mengakibatkan terjadinya hipoplasi dan hipoklasifikasi enamel, serta erupsi sebelum waktunya (erupsi prematur). Data menunjukkan bahwa, kelompok kontrol pada hari ke 13 dan 21, semua tikus (masing-masing 5 tikus), mempunyai HHI indeks 0, artinya struktur gigi tidak mengalami kelainan. Pada tikus yang diinduksi LPS, hari ke 13 belas, mempunyai HHI indeks 8 sebanyak 2 ekor tikus dan 9 pada 3 ekor tikus, artinya bahwa, gigi tikus mengalami gangguan struktur dengan skor 8 dan sembilan yaitu pada skor 8 menunjukkan terjadi hipoplasi pada hipoplasi > dari setengah permukaan fasial mahkota gigi atau yang terlibat lebih dari satu permukaan

gigi, sedang 9 adalah hipoplasi > dari setengah permukaan fasial mahkota gigi atau yang terlibat lebih dari satu permukaan gigi. Pada tikus yang diinduksi LPS umur 21 hari, semua tikus memiliki skor 9, artinya semua tikus mengalami hipolas dan hipoklasifikasi email. Tikus yang diberi minyak ikan lemuru, mempunyai HHI dengan skor lebih rendah, yaitu skor 5 dan 6, yaitu gigi tikus mengalami gangguan kalsifikasi, bahkan pada tikus yang berumur 13 hari 2 ekor tikus tidak mengalami hipoplasi maupun hipokalsifikasi.

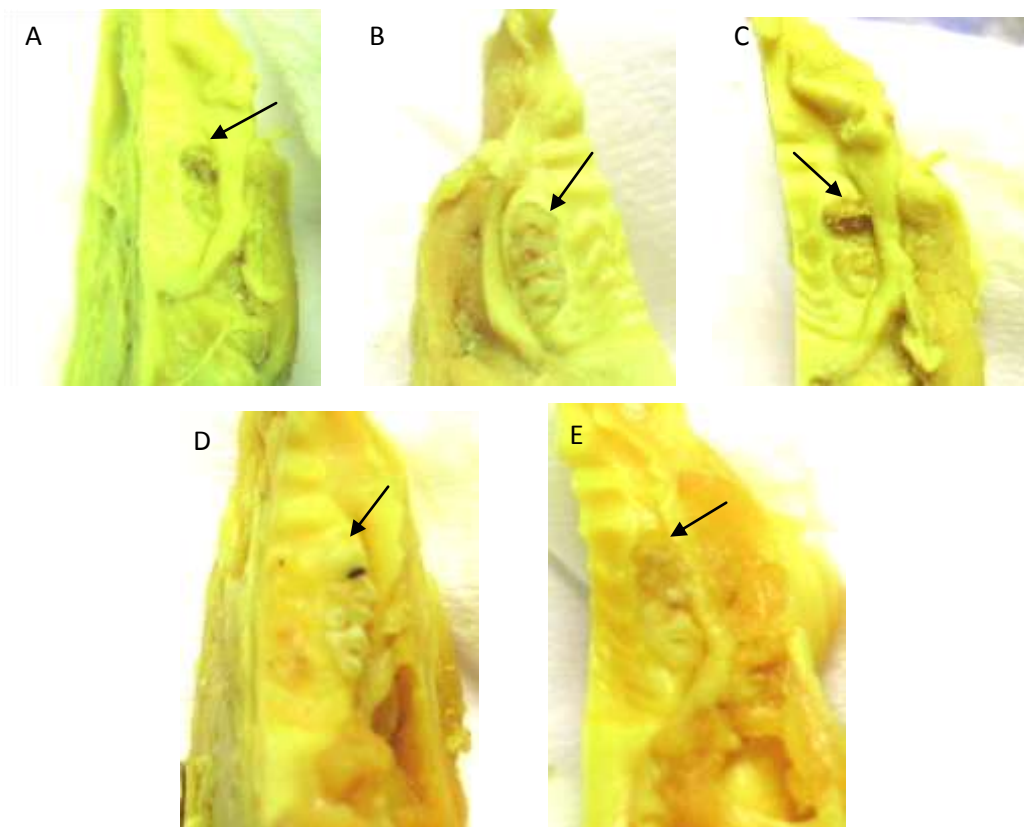
Data tersebut dilakukan uji Mann Whitney, untuk mengetahui apakah ada perbedaan yang signifikan. Hasilnya menunjukkan sebagai berikut.

Tabel 4. Hasil HHI indeks uji Mann Whitney

PERLAKUAN	N	Mean Rank	Sum of Ranks	signifikansi
<u>kontrol - 13 hari</u>	5	5.50	27.50	<u>1.000</u>
<u>kontrol - 21 hari</u>	5	5.50	27.50	
LPS 13 hari	5	4.20	21.00	<u>.176</u>
LPS 21 hari	4	6.00	24.00	
LPS MI 13 hari	5	3.90	19.50	<u>.058</u>
LPS MI 21 hari	5	7.10	35.50	
kontrol - 13 hari	5	3.00	15.00	<u>.005</u>
LPS 13 hari	5	8.00	40.00	
kontrol - 13 hari	5	4.00	20.00	<u>.050</u>
LPS MI 13 hari	5	7.00	35.00	
kontrol - 21 hari	5	3.00	15.00	<u>.005</u>
LPS 21 hari	4	7.50	30.00	
kontrol - 21 hari	5	3.00	15.00	<u>.005</u>
LPS MI 21 hari	5	8.00	40.00	
LPS 13 hari	5	8.00	40.00	<u>.007</u>
LPS MI 13 hari	5	3.00	15.00	
LPS 21 hari	4	7.50	30.00	<u>.009</u>
LPS MI 21 hari	5	3.00	15.00	

Induksi LPS secara signifikan menyebabkan hipoplasi dan hipoklasifikasi. Minyak ikan lemuru mengurangi terjadinya hipoplasi dan hipokalsifikasi pada email maupun dentin. Hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa induksi LPS pada masa pertumbuhan dan perkembangan gigi mengakibatkan terjadinya hipoplasia email. Induksi LPS mengakibatkan stimulasi sel-sel osteoklas yang dapat meresorpsi jaringan. Prisma email yang telah terdeposit pada tahap aposisi dan deposisi akan

mengalami kerusakan (Heiserman, 2006). Hal ini disebabkan karena osteoklas yang distimulasi oleh LPS aktivitasnya mengakibatkan terjadinya resorpsi. Selain itu sel ameloblas merupakan sel yang paling sensitif terhadap adanya perubahan lingkungan (Navarro, dkk., 1999). Perubahan fisiologis maupun patologis akan mempengaruhi ameloblas dan menimbulkan perubahan struktural email. Biasanya perubahan yang terjadi tidak nampak secara klinis tetapi hanya tampak dengan mikroskop. Gangguan atau infeksi bisa mengakibatkan gangguan sekresi matriks email oleh ameloblas atau menyebabkan kematian ameloblas. Kelainan yang ditimbulkan biasanya akan nampak secara klinis. Gambaran klinis hipoplasi dan hipokalsifikasi dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 5. Gigi Yang mengalami hipoplasi dan hipokalsifikasi
 Keterangan gambar : A, C, tikus yang diinduksi dengan LPS, gigi mengalami hipoplasi dan hipokalsifikasi di seluruh permukaan gigi; B. Adalah kontrol, terlihat gigi yang erupsi mempunyai struktur gigi yang baik; D,E, gigi mengalami hipokalsifikasi atau hipokalsifikasi di salah satu permukaan gigi
 Infeksi lokal pada jaringan periodontal yang bersifat akut maupun kronis yang terjadi pada masa perkembangan gigi, dapat menyebabkan kegagalan sel-sel benih gigi melakukan tahap-tahap perkembangan yaitu inisiasi (*bud stage*),

proliferasi (*cup stage*), histodiferensiasi dan morfodiferensiasi (*bell stage*), aposisi serta kalsifikasi yang mengakibatkan terjadinya kelainan pada bentuk, jumlah, kualitas maupun kuantitas gigi yang erupsi (Osborn dan Ten Cate, 1983; Nancy dan Ten Cate's, 2000). Pada hipoplasia email biasanya terjadi kegagalan pada proses amelogenesis. Amelogenesis (pembentukan email) merupakan bagian dari keseluruhan proses perkembangan gigi. Amelogenesis terjadi setelah pembentukan dentin sempurna, yang dilakukan oleh ameloblas. Ada 2 tahap amelogenesis yaitu tahap sekretori (aposisi), yang melibatkan pembentukan matriks organik dan protein dan disebut sebagai matriks email. Tahap ini berperan pada proses mineralisasi email. Tahap yang kedua adalah maturasi yaitu matriks email mengalami kalsifikasi yang sempurna. Gangguan (infeksi) yang terjadi pada masa pembentukan matriks email menyebabkan terjadinya hipoplasia dan yang terjadi pada masa kalsifikasi menyebabkan hipokalsifikasi pada email.

Tahap aposisi dan deposisi matriks oleh sel formatif merupakan tahap yang paling sensitif pada masa pertumbuhan. Pada dasarnya perkembangan gigi molar pada tikus dan manusia menunjukkan tahap-tahap yang sama pada masa embrional sampai erupsi. Amelogenesis gigi molar pada tikus dimulai sejak berumur 20-21 hari intrauterin dan terbentuk sempurna pada umur 11 hari *post* uterin. Induksi LPS yang dilakukan pada tikus umur 5 hari, mengakibatkan terjadinya gangguan pada proses amelogenesis yang masih berlangsung. LPS mengakibatkan terjadinya peningkatan IL-1 α , IL-1 β , IL-6, *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) dan PGE₂, yang menimbulkan peningkatan jumlah dan aktivitas osteoklas. Hal ini menyebabkan kerusakan tulang alveolaris, dan tubuh gagal menstimulasi pembentukan dinding fibrous yang akan melokalisir infeksi, akibatnya terjadi penyebaran infeksi pada benih gigi. Jumlah dan aktivitas osteoklas dan odontoklas akan terus melakukan degradasi matriks tulang maupun matriks email yang baru terbentuk pada benih gigi dan mengganggu sel ameloblas. Pada tikus umur 5 hari sel ameloblas sedang membentuk matriks email dan proses deposisi bahan organik maupun anorganik sedang berlangsung. Induksi LPS mengakibatkan beberapa kematian sel ameloblas sehingga matriks email gagal dibentuk. Pada keadaan normal sel ameloblas mensekresi matriks email dengan ketebalan tertentu (Nancy dan Ten Cate's, 2000). Oleh karena tidak terbentuk matriks email, maka ada beberapa email yang tidak terbentuk sampai

waktunya gigi tersebut erupsi. Akibatnya email menjadi tipis dan terdapat beberapa lubang maupun cekungan di permukaannya.

Setelah ketebalan matriks email dianggap cukup oleh sel ameloblas, fungsi sel ameloblas akan berganti dan berperan pada proses maturasi email. Selama proses maturasi berlangsung terjadi perubahan kualitatif maupun kuantitatif komponen organik email. Perubahan lain juga terjadi dalam komponen organik email yaitu terjadinya influks kalsium dan fosfat dalam waktu yang cepat. Aksi ini menyebabkan terjadinya pertumbuhan kristal yang menempati celah yang terbentuk oleh karena bahan organik dan air akan menghilang. *Striated border* dan alkaline fosfatase dalam ameloblas berperan penting pada transport ion-ion anorganik melalui membran sel selama maturasi email. Berkurangnya dan terjadinya perubahan pada sel ameloblas oleh karena induksi LPS, proses deposisi bahan-bahan organik maupun anorganik tersebut terganggu, sehingga proses mineralisasi email tidak sempurna. Email yang tipis karena gangguan mineralisasi mengakibatkan gigi nampak berwarna kuning kecoklatan. Warna kuning kecoklatan ini karena dentin akan tampak transparan dan ada beberapa daerah dentin yang terbuka. Dentin mempunyai warna lebih kuning oleh karena kandungan anorganiknya lebih rendah dibandingkan email.

Tikus yang beri minyak ikan dan diinduksi LPS mempunyai indeks HHI lebih rendah daripada tikus yang hanya diinduksi dengan LPS, dan tidak berbeda bermakna dengan kontrol. Minyak ikan akan menghambat terjadinya resorpsi tulang alveolaris yang distimulasi oleh LPS. Oleh karena induksi LPS untuk mestimulasi resorpsi tulang dapat dihambat, maka amelogenesis akan terjadi sempurna, dan erupsi gigi tepat pada waktunya. Tikus yang diinduksi LPS setelah tikus mendapatkan minyak ikan, terlihat skor HHI nya lebih rendah dari tikus yang diberi minyak ikan dan diinduksi LPS pada waktu yang sama. Hal ini terjadi karena pada saat dilakukan induksi LPS, amelogenesis telah sempurna, sehingga tidak mengganggu proses amelogenesis, tetapi pada tikus ini mempunyai fase erupsi lebih tinggi.

BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN

1. Kesimpulan

Hasil penelitian dan pembahasan ini dapat disimpulkan sebagai berikut.

- a. Lipopolisakarida menyebabkan peningkatan survival osteoklas oleh karena terjadi proses pembentukan osteoklas yang meningkat dan peningkatan apoptosis osteoblas.
- b. Minyak ikan yang diberikan pada tikus yang diinduksi LPS menyebabkan terjadinya penurunan survival osteoklas dan peningkatan survival osteoblas, karena minyak ikan memacu terjadinya apoptosis osteoklas dan membantu meningkatnya pembentukan osteoblas.
- c. Minyak ikan lemuru mampu memperkecil terjadinya kelainan struktur gigi yaitu terjadinya hipoplasi dan hipokalsifikasi pada gigi, olehkarena stimulasi osteoklas pada masa odontogenesis akibat infeksi periodontal.

2. Saran

Disarankan bahwa penelitian ini dapat dilanjutkan untuk mengetahui mekanisme seluler yang menyebabkan terjadinya apoptosis osteoklas oleh karena minyak ikan lemuru, sehingga tujuan pemanfaatan minyak ikan lemuru yang melimpah dapat dilakukan dengan optimal.

DAFTAR PUSTAKA

- Agtini, MD., 2000, Metoda Pelayanan Kesehatan Gigi pada Murid Sekolah Dasar dalam Rangka Peningkatan Pemerataan Pelayanan, <http://digilib.litbang.depkes.go.id/go.php> (diakses tanggal 2 November 2005)
- Akashi, S., Shimazu, R., Ogata, H., Nagai, Y., Takeda, K., Kimoto, M., Miyake, K., 2000, Cutting Edge: Cell Surface Expression and Lipopolysaccharide Signaling Via the Toll-Like Receptor 4-MD-2 Complex on Mouse Peritoneal Macrophages. *J Immunol.*, 164: 3471-3475
- Amri, W., Limbah yang Menghasilkan Uang, www.indonesia.com/intisari, (diakses tanggal 3 Maret 2006)
- Anan, H., Akamine, A., Hara, Y., Maeda, K., Hashiguchi, I., Aono, M., 1991, A Histochemical Study of Bone Remodeling During Experimental Apical Periodontitis in Rats, *J Endod.*, 17(17): 232-337.
- Anan, H., Akamine, A., Maeda, K., 1993, An Enzyme Histochemical Study of the Behavior of Rat Bone Cells during Experimental Apical Periodontitis, *J Endodon.*, 19(10): 83-86
- Argarwal, S., Baran, C., Piesco, NP., Uintero, JC., Langkamp, HH., Johns, LP., Chandra, CS., 1995, Synthesis of Proinflammatory Cytokines by Human Gingival Fibroblasts in Response to Lipopolysaccharides and Interleukin-1 β , *J Periodont Res.*, 30: 382-389
- Baron, R., 2006, Anatomy and ultrastructure of bone histogenesis, growth and remodeling, www.endotext.org/parathyroid/parathyroid1/chOISO2.html, (diakses tanggal 25 Juni 2007)
- Blair, HC., Zaidi, M., Schlesinger, PH., 2002 Mechanisms Balancing Skeletal Matrix Synthesis and Degradation, *Biochem J.*, 364: 332-341
- Calder, PC., 1997, n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Cytokine production in Health and Diseases, *Ann Nutr Metab.*, 41(4): 203-234.
- Calder, PC., 1998, Immunoregulatory and Anti Inflammatory Effects of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids, *Braz J Med Biol Res.*, 31(4): 467-490.
- Chen Ruei-Ming, Chen Ta-Liang, Chiu Wen-Ta, Chang Chia-Chen, 2006, Molecular mechanism of nitric oxide-induced osteoblast apoptosis, *J of Orthop. Res.*, 23 (2): 462 – 468
- Cohen, J.S., Reader, A., Fertel, R., Beck, M., Meyers, WJ., 1985, A radioimmunoassay Determination of The Concentrations of Prostaglandin E2 and F2 α in Painful and Asymptomatic Human Dental Pulps., *J Endod.*, 11: 330-335
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, AL., Karsenty, G., 1997, Osf2/Cbfa 1: a Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation, *Cell*, 89: 747-754
- Estiasih, T., 1996, Mikroenkapsulasi Konsentrat Asam Lemak Omega 3 dari Limbah Cair Pengalengan Ikan Lemuru, Thesis, Pasca Sarjana, Universitas Gadjah Mada
- Faccio, R., Takeshita, S., Zallone, A., Ross PF., Teitelbaum, SL., 2003, c-Fms and the $\alpha\beta 3$ Integrin Collaborate during Osteoclast differentiation, *J.clin.Invest.*, 111:749-758
- Fohr, B., Dunstan, CR., Seibel, MJ., 2003, Marker of Bone Remodeling in Metastatic Bone Diseases, *J Clin Endocrinol Metab.*, 88: 5059-5075

- Gao, YH., Shinki, T., Yuasa, T., Kataoka-Enomoto, H., Komori, T., Suda, T., Yamaguchi, A., 1998, Potential Role of Cbfa1, an Essential Transcriptional Factor for Osteoblast Differentiation, in Osteoclastogenesis: Regulation of mRNA Expression of Osteoclast Differentiation Factor (ODF), *Biochem Biophys Res Commun.*, 252: 697-702
- Geibel, MA., Schu, B., Callaway, AS., Gleissner, C., Willershausen, B., 2005, Polymerase Chain Reaction-based Simultaneous Detection of Selected Bacterial Species Associated With Closed Periapical Lesions, *Eur J Med Res.*, 10(8):333-338.
- Gonzalez-Moles, MA., Gonzales, NM., 2004, Bacterial Infections of Pulp and Periodontal Origin, *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 34(6) (suppl): 32-34
- Grimble, RF., Tappia, PS., 1998, Modulation of Pro Inflammatory Cytokines Biology by Unsaturated Fatty Acids, *Ernahrungswiss*, 37(1) (suppl): 57-65.
- Gumucio DL, Diaz A, Schaner P, Richards N, Babcock C, Schaller M, Cesena T, 2002, Fire and ICE: The role of pyrin domain-containing proteins in inflammation and apoptosis. *Clin Exp Rheumatol* 20, (Suppl 26):S45–S53.
- Hargreaves, JA., Cleaton-Jones, PE., Williams, SDL., 1989, Hypocalcification and Hypoplasia in Permanent Teeth of Children From Different Ethnic Groups in South Africa Assessed With a New Index, *Adv Dent Rest.*, 3(2):126-131
- Hunter, GK., Kyle, CL., Goldberg, HA., 1994, Modulation of Crystal Formation by Bone Phosphoproteins: Structural Specificity of The Osteopontin-Mediated Inhibition of Hydrxyapatite Formation, *Biochem J.*, 300:723-728
- Imai, M., Murakami, Y., Nagano, K., Nakamura, H., Yoshimura, F., 2005, Major Outer Membrane Proteins from *Porphyromonas gingivalis*: Strain Variation, Distribution, and Clinical Significance in Periradicular Lesions, *Eur J Oral Sci.*, 113(5):391-399.
- Indahyani, DE., 2008, Pengaruh Pemberian Minyak Ikan terhadap Proses Erupsi Gigi dengan Infeksi Tulang Alveolaris pada Tikus yang Diinduksi Lipopolisakarida (LPS) (*kajian pada ekspresi bone sialoprotein, osteopontin dan fase erupsi gigi*), *Disertasi*, Universitas Gadjahmada.
- Indahyani, DE., Pudyani, PS., Santoso, ALS., Jonarta, AL., Sosroseno, W., 2002, The Effect of Fish Oil on Bone Resorption Following Pulp Exposure in Rats, *Dent Traumatol*, 18: 206-211
- Indahyani, DE., Pudyani, PS., Santoso, ALS., Jonarta, AL., Sosroseno, W., 2002, The Effect of Fish Oil on Bone Resorption Following Pulp Exposure in Rats, *Dent Traumatol*, 18: 206-211
- Indahyani, DE., Santoso, ALS., Utoro, T., Soesatyo MH., 2007a, Lipopolysaccharide (LPS) introduction during growth and development period of rat's tooth toward the occurrence of enamel hypoplasia, *Dent J (Maj Ked Gigi) FKG-Unair*, 40 (2): 85-88.
- Indahyani, DE., Santoso, ALS., Utoro, T., Soesatyo, MH., 2007b, Pengaruh Induksi Lipopolisakarida (LPS) terhadap Osteopontin Tulang Alveolaris Pada Masa Erupsi Gigi, *IJD FKG-UI*, 14 (1): 2-7.
- Ishihara, Y., Nishihara, T., Maki, E., Noguchi, T., Koga, T., 1991, Role of Interleukin-1 and Prostaglandin in *in vitro* Bone Resorption Induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Lipopolysaccharide, *J Periodont Res.*, 26: 155-160

- Janeway, CA., Tarvers, P., Walport, M., Shlomchik, M., 2001, *Immuno Biology*. 5th Ed. New York: Garland Publishing : 67-68
- Jiang, J., Zuo, J., Hurst, IR., Holliday, SL., Gainesville, 2003, The Sinergistic Effect of Peptidoglycan and Lipopolysaccharide on Osteoclast Formation, *Oral surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 96: 738-743
- Kelley, S., 1996, Dietary Fat and Human Immune Response, *Inform*, 7(8):852-858
- Kuzushima M., Mogi M., Togari, A., 2006, Cytokine-induced nitric-oxide-dependent apoptosis in mouse osteoblastic cells: Involvement of p38MAP kinase, *Arc_of Oral Biol.*, 51(11): 1048-1053
- Lakio, L., Paju, S., Alfthan, G., Tirola, T., Asikainen, S., Pussinen, PJ., 2003, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Serotype d-Specific Antigen Contains the O Antigen of Lipopolysaccharide, *Infect Immun.*, 71(9): 5005-5011
- Lerner, UH., 2004, New Molecules in The Tumor Necrosis Factor Ligand and Receptor Super Families with Importance for Physiological and Pathological Bone Resorption, *Crit Rev Oral Biol Med.*, 15(2): 64-81
- Manolagas, SC., 2000, Birth and death of bone cells: Basic regulatory mechanism and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis, *Endocr Rev.*, 21(2):115-137
- Mariathasan S, 2007, ASC, Ipaf and Cryopyrin/Nalp3: Bonafide intracellular adapters of the caspase-1 inflammasome. *Microbes Infect* 9:664–671.
- McCall SH, Sahraei M, Young AB., Worley SC., Duncan JA., Pan-Yun Ting J., Marriott I., 2008, Osteoblasts Express NLRP3, a Nucleotide-Binding Domain and Leucine-Rich Repeat Region Containing Receptor Implicated in Bacterially Induced Cell Death, *J. bone and min. Res.*, 23:1
- McDonnell, ST., Liversidge, H., Kinirons, M., 2004, Temporary arrest of root Development in Premolar of a Child With Hypodontia and Extensive Caries, *Int J of Paed Dent*, 14 :455-460
- McNamara, CM., Foley, TF., Garvey, MT., Kavanagh, P.T., 1999, Premature Dental Eruption : report of Case, *J of Dent for Child.*, Jan-Feb: 70-72
- Miyauchi, M., Ijuhin, N., Nikai, H., Takata, T., Ito, H., Ogawa, I., 1992, Effect of Exogenous Applied Prostaglandin E-2 on Alveolar Bone Loss- Histometric Analysis, *J Periodontol*, 63:405-411.
- Mühlbauer, RC., Fleisch, H., 1990, A Method For Continual Monitoring of Bone Resorption in Rats: Evidence for a Diurnal Rhythm, *Am J Physiol.*, 259: R679-89
- Mundy, R., 1991, Inflammatory Mediator and The Destruction of Bone, *J. Periodont Res.*, 26: 213-217
- Mungrue IN, Bredt DS, Stewart DJ, Husain M, 2003, From molecules to mammals: what's NOS got to do with it. *Acta Physiol scand* , 179:123-135.
- Newton, IS., 1996, Food Enrichment with Long-Chain n-3 PUFA, *Inform*, 7(2):169-178
- Nicolau, B., Marcenes, W., Bartley, M., Sheiham, A., 2003, A Life Course Approach to Assessing Causes of Dental Caries Experience: The Relationship between biological, Behavioral, Socio-Economic and Psychological Conditions and Caries in Adolescents, *Caries Res.*, 37:319-326.

- of Osteoblastogenesis and Promotion of Apoptosis of Osteoblast and Osteocytes by Glucocorticoids, *J. Clin. Invest.*, 102: 274-282
- Offenbacher, S., Heasman, PA., Collins, JG., 1993, Modulation of Host PGE-2 Secretions as a Determinant of Periodontal Disease Expression, *J Periodontol.*, 64: 432-444.
- Peck, MD., 1994a, Interaction of Lipids with Immune Function I : Biochemical Affects of Dietary Lipids on Plasma Membranes, *J Nutr Biochem.*, 5: 466-478
- Peck, MD., 1994b, Interaction of Lipids with Immune Funtion II: Experimental and Clinical Studies of Lipids and Immunity, *J Nutr Biochem.*, 5:514-521.
- Raz, A., Kamin-Blesky, N., Przeddecki, F., Obukowicz, MG., 1997, Fish Oil Inhibits Δ -6 Desaturase Activity in-vivo: Utility in a Dietary Paradigm to Obtain Mice Depleted of Arachidonic Acid, *J Nutr Biochem.*, 8:558-565.
- Reinwald, S., Li, Y., Moriguchi, T., Salem Jr, N., Watkins, BA., 2004, Repletion with (n-3) Fatty Acids Reverses Bone Structural Deficits in (n-3)-Deficient Rats,*J Nutr.*, 134:388-394
- Sakata T, Wang Y, Halloran BP, Elalieh HZ, Cao J, Bikle DD., 2004, Skeletal unloading induces resistance to insulin-like growth factor-I (IGF-I) by inhibiting activation of the IGF-I signaling pathways. *J Bone Miner Res* 19: 436–446,
- Schwartzman RA, Cidlowski JA, 1993, Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev*, 14:133-151
- Schwartz, Z., Goultschin, J., Dean, DD., Byan, BD., 1997, Mechanisms of Alveolar Bone Destruction in Periodontitis *dalam* The Pathogenesis of Periodontitis, Hubert E Schroeder (eds), *Periodontology* 2000, 14:158-172.
- Shigeyama, Y., Grove, TK., Strayhorn, C., Somerman, MJ., 1996, Expression of Adhesion Molecules During Tooth Resorption in Feline Teeth: A Model System for Aggressive Osteoclastic Activity, *J Dent Res.*, 75(9): 1650-1657
- Stashenko, P., 1990, The Role of Immune Cytokines in The Pathogenesis of Periapical Lesions, *Endod Dent Traumatol.*, 6: 89-96
- Stashenko,P., 2002, *Interrelationship of Dental Pulp and Apical Periodontitis*, (*dalam* Dental Pulpa, di edit oleh Kenneth M.Hargreaves dan Harold E. Goodis), Quintessence Publishing Co, Inc., Chicago
- Stevens, A., Lowe, JS., 1997, *Human Histology*, Mosby, London
- Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, MT., Martin, TJ., 1999, Modulation of Osteoclast Differentiation and Function by the New Members of the Tumor Necrosis Factor Receptor and Ligand Families, *Endocr Rev.*, 20(3): 345-357
- Sutterwala FS, Ogura Y, Szczepanik M, Lara-Tejero M, Lichtenberger GS, Grant EP, Bertin J, Coyle AJ, Galan JE, Askenase PW, Flavell RA, 2006, Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity* 24:317–327.
- Takayama, S.I., Yasuo, M., Shimauchi, H., Okada, H., 1996, Relationship between Prostaglandin E2 Concentrations in Periapical Exudates from Root Canals and Clinical Findings of Periapical Periodontitis, *J Endod.*, 22(12):677-680

- Tani-Ishii, N., Wang, CY., Stashenko, P., 1995, Immunolocation of Bone-Resorptive Cytokines in Rat Pulp and Periapical Lesions Following Surgical Pulp Exposure, *Oral Microbiol Immunol.*, 10:213-219
- Tyler, VE., Brady, LR., Robbers, JE., 1981, *Pharmacognosy*, Lea & Febiger, Philadelphia.
- Umezu, A., Kaneko, N., Toyama, Y., Wanatabe, Y., Itoh, H., 1989, Appearance of Osteoclast by Injections of Lipopolysaccharides in Rat Periodontal Tissue, *J Periodont Res.*, 24: 378-383
- Wan, AKL., Seow, WK., Purdie, DM., Bird, PS., Walsh, LJ., Tudehapse, DI., 2003, A Longitudinal Study of Streptococcus mutans Colonization in Infants after Tooth Eruption, *J Dent Res.*, 82(7):504-508
- Wang, CY., Stashenko, P., 1993, The Role of Interleukin-1 α in The Pathogenesis of Periapical Bone Destruction in a Rat Model System, *Oral Microbiol Immunol.*, 8: 50-56
- Wang, CY., Tani-Ishii, N., Stashenko, P., 1997, Bone-Resorptive Cytokines Gene Expression in Periapical Lesions in The Rat, *J Nutr Biochem.*, 12:65-71
- Weinstein, RS., Jilka, RL., Parfitt, M., Manolagas, SC., 1998, Inhibition
- Weiss, LA., Barrett-Connor, E., Von Muhlen, D., 2005, Ratio of n-6 to n-3 Fatty Acids and Bone Mineral Density in Older Adults: The Rancho Bernardo Study, *American J of Clin Nutr*, 81(4): 934-938
- White, PA., Nair, SP., Kim, Mi-Jurung, Wilson, M., Henderson, B., 1998, Molecular Characterization of an Outer Membrane Protein of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Belonging to the OmpA Family, *Infect Immun.*, Jan : 369-372
- Winarno, FG., 1997, *Kimia Pangan dan Gizi*, Penerbit PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Wiseman, H., 1996, Dietary Influences on Membrane Function: Importance in Protection Against Oxidative Damage and Disease, *J Nutr Biochem.*, 7: 2-15
- Yoshimura, A., Hara, Y., Kaneko, T., Kato, I., 1997, Secretion of IL-1 β , TNF- α , IL-8 and IL-1ra by Human Polymorphonuclear Leukocytes in Response to Lipopolysaccharides from Periodontopathic Bacteria, *J Periodont Rest.*, 32: 279-286
- Yunizal, JT., Murtini, Suparno, S., Saleh, M., Tampubolon, YN., Fawzya, HE., Irianto, TD., Suryaningrum, N., Fadi, B., Purdiwoto, Sabarudin., 1996, Pengolahan Konsentrat Asam Lemak n-3 dari Hasil Samping Pengalengan dan Penepungan Ikan Lemuru (*Sardenella longiceps*), *Laporan teknis*, Balai Penelitian Perikanan Laut, Pusat Penelitian dan Pengembangan Perikanan, Jakarta.
- Zheng, MH., Papadimitriou JM., Nicholson GC., 1991, A Quantitative Cytochemical Investigation of Osteoclast and Multinucleate Giant Cells, *Histochem J.*, 23: 180-88
- Ziegler-Heitbrock HWL., Ulevitch RJ., 1993, CD14: Cell surface receptor and differentiation Marker, *Immunol Today*, 14:121-5.

Tabel 2. Hasil uji ANAVA satu jalur pada jumlah osteoklas dan osteoblas

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
--	----------------	----	-------------	---	------

Between Groups	278.371	11	25.306	3.157	.003
Within Groups	368.750	46	8.016		
Total	647.121	57			

Tabel 3. Hasil uji LSD pada jumlah osteoblas dan osteoklas

	Osteoblas <> osteoklas	<u>Mean Difference (I-J)</u>	<u>Sig.</u>		
1	Kontrol hari ke 13	<u>3.600</u>	<u>.050</u>		
2	Kontrol hari ke 21	<u>000</u>	<u>1.000</u>		
3	LPS hari 13	<u>-4.600</u>	<u>.014</u>		
4	LPS hari 21	<u>2.050</u>	<u>.286</u>		
5	LPSMI hari 13				
6	LPSMI hari 21				

