



**EFEK PROANTOSIANIDIN EKSTRAK KULIT BUAH KAKAO  
(*Theobroma cacao L.*) TERHADAP EKSPRESI MMP-8 PADA JARINGAN  
GINGIVA MODEL TIKUS PERIODONTITIS**

**SKRIPSI**

Oleh:

**Anya Tania Larasati**

**161610101040**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2020**



**EFEK PROANTOSIANIDIN EKSTRAK KULIT BUAH KAKAO  
(*Theobroma cacao L.*) TERHADAP EKSPRESI MMP-8 PADA JARINGAN  
GINGIVA MODEL TIKUS PERIODONTITIS**

**SKRIPSI**

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan di Fakultas Kedokteran Gigi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran Gigi

oleh

**Anya Tania Larasati**

**NIM 161610101040**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI**

**UNIVERSITAS JEMBER**

**2020**

**PERSEMBAHAN**

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT atas limpahan rahmat, hidayah dan dan anugerah-Nya
2. Kedua orang tua saya tercinta, Ayahanda Febri Harijawan dan Ibunda Ida Fatima;
3. Adik saya, Adam Surya Saputra;
4. Dosen pembimbing saya, drg. Yani Corvianindya, M.KG dan drg. Agustin Wulan Suci, M.DSc;
5. Bapak dan ibu guru sejak TK hingga SMA serta dosen dan segenap civitas akademika Universitas Jember khususnya Fakultas Kedokteran Gigi;
6. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

**MOTTO**

“Maka sesungguhnya beserta kesulitan ada kemudahan”

(Asy-Syarh (94) : 6)\*



\*) Departemen Agama Republik Indonesia. 2011. *Al-Qur'an dan Terjemahannya*.  
Banten: PT Kalim

## PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Anya Tania Larasati

NIM : 161610101040

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Efek Proantosianidin Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma Cacao L.*) Terhadap Ekspresi MMP-8 Pada Jaringan Gingiva Model Tikus Periodontitis” adalah benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 15 April 2020

Yang menyatakan,

Anya Tania Larasati

NIM 161610101040

**SKRIPSI**

**EFEK PROANTOSIANIDIN EKSTRAK KULIT BUAH KAKAO  
(*Theobroma cacao L.*) TERHADAP EKSPRESI MMP-8 PADA JARINGAN  
GINGIVA MODEL TIKUS PERIODONTITIS**

oleh

**Anya Tania Larasati**

**NIM 161610101040**

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : drg. Yani Corvianindya R., M.KG

Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Agustin Wulan Suci D., M.DSc

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Efek Proantosianidin Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) Terhadap Ekspresi MMP-8 Pada Jaringan Gingiva Model Tikus Periodontitis” telah diuji dan disahkan pada:

Hari, Tanggal : Rabu, 15 April 2020

Tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Penguji Utama,

Penguji Anggota,

drg. Happy Harmono, M.Kes.

Dr. drg. Banun Kusumawardhani, M.Kes.

NIP 196709011997021001

NIP 197005091999032001

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,

drg. Yani Corvianindya R., M.KG

drg. Agustin Wulan Suci D., M.DSc

NIP 197308251998022001

NIP 197908142008122003

Mengesahkan

Dekan,

drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Pro.  
NIP 196901121996011001



## RINGKASAN

**Efek Proantosianidin Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*) Terhadap Ekspresi MMP-8 Pada Jaringan Gingiva Model Tikus Periodontitis;** Anya Tania Larasati; 161610101040; 2020; 85 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Periodontitis merupakan peradangan pada jaringan periodontal yang mengenai hampir 75% penduduk Indonesia yang disebabkan oleh bakteri plak atau periopatogen, seperti *Porphyromonas gingivalis*. *Porphyromonas gingivalis* merupakan salah satu bakteri proteolitik karena faktor virulensinya mengandung enzim protease yang digunakan untuk melawan sistem pertahanan *host* dan dapat menyebabkan degradasi jaringan sehingga bakteri dapat melakukan invasi ke jaringan gingiva yang lebih dalam. Jaringan gingiva tersusun atas epitel yang berfungsi sebagai *barrier* dalam mengatasi agen berbahaya, termasuk bakteri. Integritas epitel gingiva ini dapat terganggu atau rusak oleh karena aktivitas enzim protease bakteri ataupun aktivitas respon tubuh dalam mengeliminasi bakteri penyebab infeksi jaringan periodontal.

Infeksi *P.gingivalis* ini akan meningkatkan produksi MMP-8 untuk mengeliminasi infeksi *P.gingivalis*. MMP-8 (*collagenase 2*) sebagai *biomarker* peradangan jaringan periodontal merupakan enzim pemecah kolagen pada jaringan ikat yang memegang kendali aktivitas kolagenase terbesar di jaringan gingiva pada keadaan periodontitis. MMP-8 ditemukan dalam kadar yang rendah pada jaringan periodontal yang sehat dan sebaliknya akan meningkat apabila terjadi peradangan.

Guna menurunkan produksi MMP-8 pada periodontitis perlu dilakukan upaya pengobatan yang mempunyai efek antinflamasi, salah satunya dengan bahan dari kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) Proantosianidin merupakan senyawa polifenol yang paling banyak terdapat pada kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) (58%) dengan pemanfaatan yang masih belum optimal tetapi diduga memiliki efek antiinflamasi. Proses inflamasi dapat terhambat oleh karena pemberian proantosianidin diduga dapat menghambat produksi MMP-8



dengan cara memblokir aktivasi sinyal *nuclear factor-kappaB* (*NF- $\kappa$ B*) sehingga tidak terjadi kerusakan jaringan yang berlebihan.

Jenis penelitian yang digunakan adalah *eksperimental laboratories* dengan rancangan penelitian yang digunakan adalah *the post test only control group design* yang diberikan kepada 16 sampel penelitian. Sampel penelitian dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Masing-masing kelompok dibagi lagi menjadi 2 sub kelompok yang diamati pada hari ke-7 dan ke-14 dengan masing-masing sub kelompok terdiri atas 4 tikus. Pembuatan gel proantosianidin kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) dilakukan dengan cara mencampurkan aquades, CMC-Na, dan ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) hingga homogen. *Porphyromonas gingivalis* diinjeksikan ke jaringan sulkus gingiva bagian mesiobukal dan mesiopalatal molar atas kanan hingga didapatkan keadaan periodontitis lalu diberi gel proantosianidin diaplikasikan selama 7 dan 14 hari. Jaringan gingiva lalu diambil dan dilakukan pemrosesan jaringan untuk dapat diamati menggunakan mikroskop binokuler dengan perbesaran 400X yang dibantu optilab dan *software Immunoratio*. Data hasil pengamatan ekspresi MMP-8 kemudian dianalisis dengan SPSS.

Hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan ekspresi MMP-8 di jaringan gingiva pada kelompok penelitian dan waktu pengamatan. Ekspresi MMP-8 pada kelompok perlakuan (P) lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol (K). Selain itu, ekspresi MMP-8 pada kelompok kontrol hari ke-14 lebih tinggi dibandingkan hari ke-7. Sedangkan ekspresi MMP-8 pada kelompok perlakuan hari ke-14 lebih rendah dibandingkan hari ke-7. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa pemberian proantosianidin ekstrak kulit buah kakao dapat menurunkan ekspresi MMP-8.

## PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efek Proantosianidin Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*) Terhadap Ekspresi MMP-8 Pada Jaringan Gingiva Model Tikus Periodontitis”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penulisan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Kedua orang tua saya, Ayahanda Febri Harijawan dan Ibunda Ida Fatima, yang telah merawat dan mendidik saya dengan penuh kasih sayang serta memberikan doa, semangat, dukungan, perhatian dan pengorbanan kepada saya;
2. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes.Sp.Pros. sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
3. drg. Yani Corvianindya R., M.KG. sebagai Dosen Pembimbing Utama dan drg. Agustin Wulan Suci D., M.DSc. sebagai Dosen Pembimbing Pendamping yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga dan ilmu dalam membimbing saya sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik;
4. drg. Happy Harmono, M.Kes. sebagai Dosen Penguji Ketua dan Dr. drg. Banun Kusumawardhani, M.Kes. sebagai Dosen Penguji Anggota yang telah memberikan bimbingan, kritik dan saran yang membangun untuk perbaikan skripsi ini;
5. Prof. Dr. drg. Herniyati, M.Kes. sebagai Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan arahan, ilmu dan motivasi kepada saya;
6. Seluruh Dosen Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang telah memberikan ilmu dan bimbingan kepada penulis;

7. Bu Wahyu sebagai teknisi Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang turut membantu dan memberi masukan selama penelitian;
8. Adik saya, Adam Surya Saputra, yang telah memberikan kasih sayang, dukungan, semangat dan doa;
9. Rekan-rekan se-proyek skripsi, Kristin Rizki Mustika dan Nada Ocarina Savitri, yang telah berjuang bersama dan memberi dukungan dalam menyelesaikan skripsi ini;
10. Ardin Tito Febiantama yang telah memberikan dukungan dan semangat selama penyusunan skripsi;
11. Teman-teman yang selalu memberi motivasi dan berbagi suka duka: Balqis Salsabila, Najuwah Hana, Savira Aulia, Bella Saphira, Diska Fitri, Septia Rana, Sophia Adnani, Della Novi, Zevira Fitri, Niken Larasati, Syadilla Maulidyna, KKN 221, VESPA SPASA, SPADE SMASA;
12. Teman-teman seperjuangan DEXTRA 2016 di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
13. Guru-guru TK, SD, SMP, SMA yang telah mendidik saya;
14. Semua pihak yang turut membantu tetapi tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis juga sangat menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan penulisan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat

Jember, 15 April 2020

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	iii
HALAMAN MOTTO .....	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	vi
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN .....	viii
PRAKATA .....	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR TABEL .....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN .....	xvii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Latar Belakang.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Rumusan Masalah .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Tujuan.....</b>	<b>3</b>
<b>1.4 Manfaat.....</b>	<b>3</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Periodontitis.....</b>	<b>4</b>
2.1.1 Etiologi Periodontitis .....	5
2.1.2 Patogenesis Periodontitis .....	6
<b>2.2 <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....</b>	<b>8</b>
2.2.1 Taksonomi <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	9
2.2.2 Karakteristik <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	10
2.2.3 Faktor-Faktor Virulensi <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	10
<b>2.3 Jaringan Gingiva.....</b>	<b>13</b>
<b>2.4 MMPs .....</b>	<b>14</b>
2.4.1 MMP-8.....	17

2.4.2 Metode Analisis MMP-8 .....	18
<b>2.5 Kakao (<i>Theobroma cacao L.</i>) .....</b>	<b>19</b>
2.5.1 Taksonomi Kakao ( <i>Theobroma cacao L.</i> ) .....	21
2.5.2 Kulit Buah Kakao ( <i>Theobroma cacao L.</i> ) .....	22
<b>2.6 Proantosianidin .....</b>	<b>22</b>
2.6.1 Proantosianidin terhadap Ekspresi MMP-8 pada Periodontitis .....	23
<b>2.7 Kerangka Konseptual .....</b>	<b>25</b>
<b>2.8 Hipotesis .....</b>	<b>27</b>
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>28</b>
<b>3.1 Jenis Penelitian .....</b>	<b>28</b>
<b>3.2 Tempat dan Waktu Penelitian .....</b>	<b>28</b>
3.2.1 Tempat Penelitian .....	28
3.2.2 Waktu Penelitian .....	28
<b>3.3 Variabel Penelitian .....</b>	<b>28</b>
3.3.1 Variabel Bebas .....	28
3.3.2 Variabel Terikat .....	29
3.3.3 Variabel Terkendali .....	29
<b>3.4 Definisi Operasional .....</b>	<b>29</b>
3.4.1 Kulit Buah Kakao .....	29
3.4.2 Ekstrak Proantosianidin Kulit Buah Kakao ( <i>Theobroma cacao L.</i> ) .....	29
3.4.3 Ekspresi MMP-8 .....	29
3.4.4 Tikus Periodontitis .....	30
<b>3.5 Sampel Penelitian .....</b>	<b>30</b>
3.5.1 Subyek Penelitian .....	30
3.5.2 Besar Sampel .....	30
3.5.3 Kriteria Sampel .....	31
3.5.4 Pengelompokkan Hewan Coba .....	31
<b>3.6 Alat dan Bahan Penelitian .....</b>	<b>32</b>
3.6.1 Alat Penelitian .....	32
3.6.2 Bahan Penelitian .....	32
<b>3.7 Prosedur Penelitian .....</b>	<b>32</b>

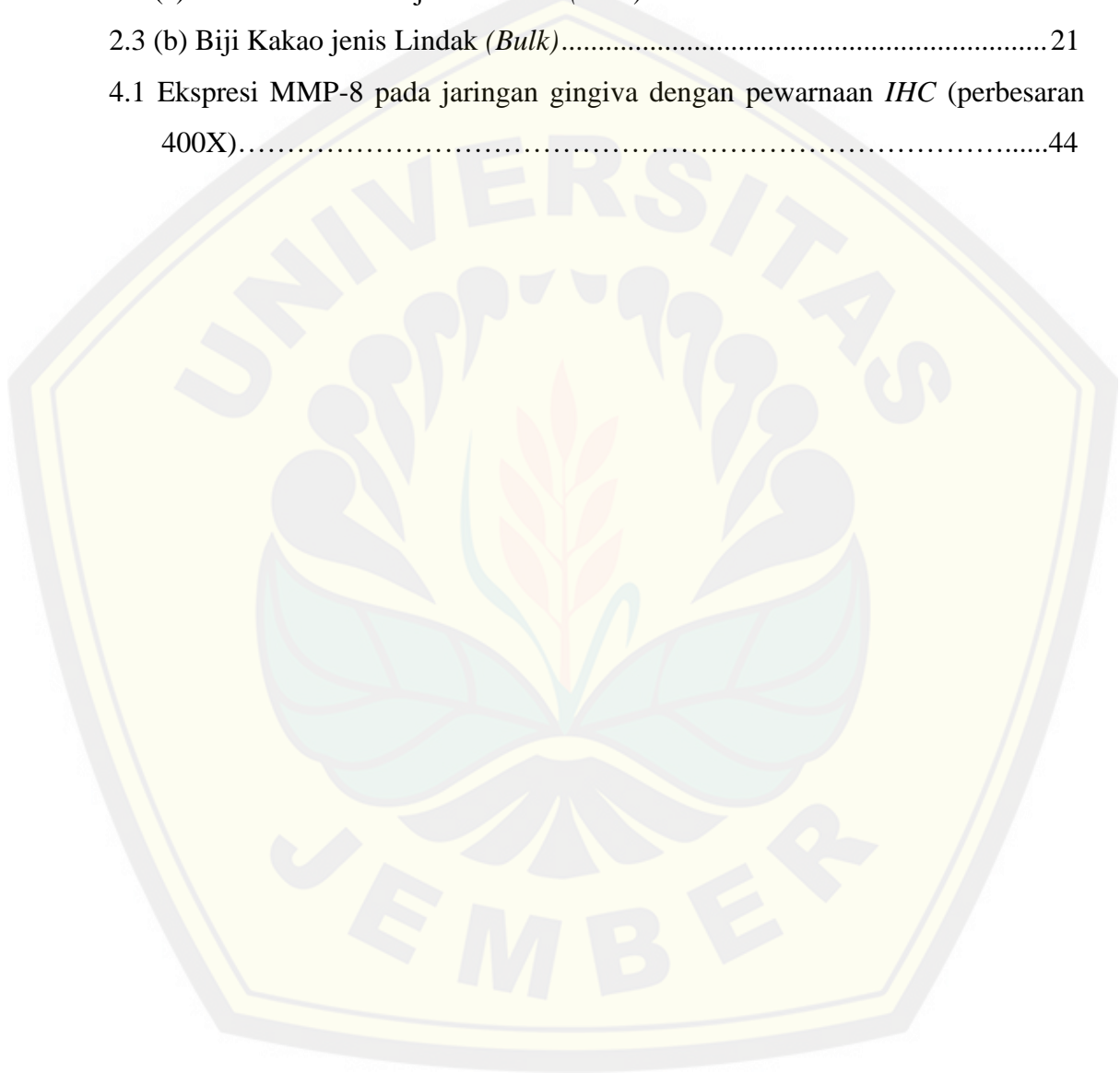


3.7.1 <i>Ethical Clearance</i> .....	32
3.7.2 Persiapan Hewan Coba .....	33
3.7.3 Uji Identifikasi Kulit Buah Kakao ( <i>Theobroma cacao L.</i> ) .....	33
3.7.4 Pembuatan Ekstrak Proantosianidin Kulit Buah Kakao .....	33
3.7.5 Pembuatan Gel Ekstrak Proantosianidin Kulit Buah Kakao.....	34
3.7.6 Pembuatan Media Kultur <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	35
3.7.7 Prosedur Perlakuan .....	35
3.7.8 Pembuatan Sediaan Histologis.....	35
<b>3.8 Tahap Pengamatan MMP-8.....</b>	<b>38</b>
<b>3.9 Analisis Data.....</b>	<b>39</b>
<b>3.10 Alur Penelitian .....</b>	<b>40</b>
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1 Hasil Penelitian dan Analisis Data .....</b>	<b>41</b>
<b>4.2 Pembahasan.....</b>	<b>44</b>
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>47</b>
<b>5.1 Kesimpulan.....</b>	<b>47</b>
<b>5.2 Saran .....</b>	<b>47</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>48</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>59</b>



**DAFTAR GAMBAR**

2.1 Sulkus Gingiva.....	13
2.2 Struktur MMPs.....	14
2.3 (a) Kulit Buah Kakao jenis Lindak ( <i>Bulk</i> ) .....	21
2.3 (b) Biji Kakao jenis Lindak ( <i>Bulk</i> ).....	21
4.1 Ekspresi MMP-8 pada jaringan gingiva dengan pewarnaan <i>IHC</i> (perbesaran 400X).....	44



**DAFTAR TABEL**

4.1 Perhitungan ekspresi MMP-8 di jaringan gingiva .....	41
4.2 Rangkuman uji <i>Post Hoc Least Significant Difference (LSD)</i> ekspresi MMP-8 pada tiap kelompok sampel.....	42
4.3 Hasil interpretasi persentase tiap sampel kedalam bentuk skor dengan “ <i>Quickscore</i> ” .....	43



**DAFTAR LAMPIRAN**

LAMPIRAN A. Surat Keterangan <i>Ethical Clearance</i> .....	59
LAMPIRAN B. Surat Keterangan Identifikasi Tanaman .....	60
LAMPIRAN C. Surat Izin Penelitian Laboratorium Bioscience .....	61
LAMPIRAN D. Surat Izin Penelitian Laboratorium Histologi .....	62
LAMPIRAN E. Data Hasil Perhitungan dengan pewarnaan IHC .....	63
LAMPIRAN F. Data Hasil Penelitian.....	64
LAMPIRAN G. Alat dan Bahan Ekstraksi .....	66
LAMPIRAN H. Prosedur Penelitian.....	76
LAMPIRAN I. Gambaran Histologis Jaringan Gingiva.....	79
LAMPIRAN J. Gambaran Hasil Ekspresi MMP-8 Jaringan Gingiva Menggunakan <i>Software Immunoratio</i> .....	82

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Periodontitis merupakan peradangan pada jaringan periodontal yang mengenai hampir 75% penduduk Indonesia dari berbagai golongan usia. Periodontitis ini merupakan kelanjutan dari gingivitis, apabila tidak dirawat akan menyebabkan kehilangan perlekatan dan berakhir pada kehilangan gigi. Periodontitis disebabkan oleh bakteri plak atau periopatogen, terutama bakteri gram negatif yang mempunyai aktivitas proteolitik (Robbihi, 2018).

*Porphyromonas gingivalis* merupakan salah satu bakteri proteolitik karena faktor virulensi bakteri ini mengandung enzim protease terlarut dan terikat, seperti *capsules*, *fimbriae*, *gingipains*, dan *lipopolisakarida*. Enzim protease ini digunakan bakteri *P.gingivalis* untuk melawan sistem pertahanan *host* dan menyebabkan degradasi protein pada jaringan dan plasma, terutama protein struktural penyusun jaringan gingiva dan periodontal sehingga mempermudah melakukan invasi ke jaringan gingiva yang lebih dalam. Degradasi protein ini akan memicu kerusakan dan kehilangan perlekatan jaringan periodontal terutama gingiva (How, 2016).

Jaringan gingiva tersusun atas *keratinized stratified squamous epithelium*, dimana epitel tersebut berfungsi sebagai pendukung integritas jaringan gingiva (Leininger, 2018). Integritas gingiva merupakan salah satu bentuk mekanisme pertahanan tubuh melalui pertahanan fisik dalam mengatasi agen berbahaya, termasuk bakteri. Integritas epitel gingiva ini dapat terganggu atau rusak dengan aktivitas enzim protease bakteri ataupun aktivitas respon tubuh dalam mengeliminasi bakteri penyebab penyakit periodontal (How, 2016).

Kolonisasi dan infeksi *P.gingivalis* ini akan meningkatkan produksi sitokin proinflamatori dari *host* sebagai upaya untuk mengeliminasi infeksi *P.gingivalis* sehingga dapat memicu produksi matriks metalloproteinase-8 (MMP-8) (Rangbulla, 2017). MMP-8 (*collagenase 2*) merupakan enzim pemecah kolagen pada jaringan ikat yang memegang kendali aktivitas kolagenase terbesar di jaringan gingiva pada keadaan periodontitis (Susilowati, 2010; Sorsa, 2016).

MMP-8 sebagai *biomarker* peradangan jaringan periodontal ditemukan dalam kadar yang rendah oleh karena tingginya kadar inhibitor alami MMP-8 pada jaringan periodontal yang sehat dan sebaliknya akan meningkat apabila terjadi peradangan (Rangbulla, 2017).

Guna menurunkan produksi MMP-8 pada periodontitis perlu dilakukan upaya pengobatan yang mempunyai efek antinflamasi, salah satunya dengan bahan dari kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) yang kaya akan senyawa polifenol dan diduga memiliki efek tersebut. Kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) ini jumlahnya sangat melimpah di Kabupaten Jember sebagai limbah pertanian dan belum dimanfaatkan dengan baik. Disisi lain, kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) mempunyai banyak kandungan kimia yang sangat berguna bagi kehidupan manusia, baik di bidang kosmetik, pertanian, dan kedokteran (Mulyatni, 2012). Kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) mengandung air (85%), serat kasar (27%), dan protein (8%) (Partayasa, 2017). Senyawa polifenol yang terkandung dalam kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*), antara lain proantosianidin (58%), katekin (37%), dan antosianin (4%) (Dipahayu, 2018; Rosniati dan Kalsum, 2018).

Proantosianidin merupakan senyawa polifenol yang paling banyak terdapat pada kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) dengan pemanfaatan yang masih belum optimal. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa 10% proantosianidin kulit buah kakao mampu menurunkan kadar COX-2 pada periodontitis, dimana COX-2 ini berperan dalam regulasi MMP-8. Diduga penurunan COX-2 dapat menurunkan kadar MMP-8 sehingga aktivitas bakteri juga terhambat. Proantosianidin diduga merupakan inhibitor aktivitas MMP-8 oleh karena kemampuannya dalam menghambat sekresi MMP-8 dengan cara memblokir aktivasi sinyal *nuclear factor-kappaB (NF-κB)* (Lagha, 2015; Anajafi, 2017; Zheng, 2017; Torre, 2018).

Dari uraian diatas, dapat diketahui bahwa kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) sebenarnya memiliki potensi besar untuk dapat mengobati periodontitis oleh karena kandungan proantosianidin yang tinggi. Walaupun potensi proantosianidin masih belum tereksplorasi secara optimal. Selain itu, perlu



dilakukan penelitian mengenai kemampuan proantosianidin dalam menurunkan ekspresi MMP-8 sehingga ekstrak proantosianidin kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) kedepannya berpotensi untuk digunakan sebagai terapi periodontitis.

### **1.2 Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang diatas, maka didapatkan rumusan masalah, yaitu apakah proantosianidin ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) dapat memberikan efek menurunkan ekspresi MMP-8 pada jaringan gingiva model tikus periodontitis?

### **1.3 Tujuan**

Berdasarkan rumusan masalah diatas, tujuan yang ingin dicapai adalah menguji efek proantosianidin ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) terhadap penurunan ekspresi MMP-8 pada jaringan gingiva model tikus periodontitis.

### **1.4 Manfaat**

Dari hasil penelitian ini, diharapkan dapat memberikan beberapa manfaat, diantaranya:

1. Mengkaji efek proantosianidin ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) terhadap penurunan ekspresi MMP-8 pada jaringan gingiva model tikus periodontitis.
2. Memberikan informasi kepada masyarakat mengenai terapi alternatif ekstrak proantosianidin kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) untuk periodontitis sehingga produksi dan pemanfaatan proantosianidin ekstrak kulit buah kakao dapat ditingkatkan.



## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Periodontitis

Jaringan periodontal adalah jaringan yang mengelilingi gigi dan berfungsi sebagai penyangga gigi, terdiri atas gingiva, sementum, jaringan ikat periodontal, dan tulang alveolar. Salah satu tipe penyakit periodontal yang sering dijumpai pada masyarakat adalah periodontitis (Fauzi, 2016; Sugiarti, 2017). Periodontitis merupakan penyakit inflamasi yang disebabkan oleh pengumpulan plak bakteri yang mengakibatkan inflamasi pada jaringan gingiva, kerusakan jaringan periodonsium dan kehilangan tulang alveolar yang diakhiri dengan kehilangan gigi (Fauzi, 2016). Periodontitis menyebabkan destruksi jaringan secara permanen yang dapat dikarakteristikan dengan inflamasi kronis, timbul perdarahan saat probing dan terjadi kedalaman probing  $\geq 4$  mm oleh karena migrasi epitelium yang menyatu ke apikal, kehilangan jaringan ikat dan kehilangan tulang alveolar. Gambaran klinis dari periodontitis adalah terjadinya perubahan warna menjadi merah terang disertai dengan pembengkakan margin, kehilangan tulang alveolar dan kegoyangan gigi (Quamilla, 2016).

Beberapa faktor resiko terhadap terjadinya periodontitis bersifat multifaktorial, diantaranya faktor lokal, pekerjaan, lingkungan, merokok, jenis kelamin, stress, dan psikososial. Tidak hanya itu, tingkat pendidikan dan sosial ekonomi yang rendah ikut berpengaruh terhadap terjadinya penyakit periodontitis karena akan mengakibatkan kurangnya kesadaran akan kepentingan kebersihan rongga mulut (Afrianti, 2018). Dampak yang ditimbulkan dari penyakit periodontitis, antara lain berat bayi lahir rendah (BBLR), preeklamsia, stroke, dan infark miokard akut serta dapat mengganggu aktivitas sehari-hari karena menurunkan kemampuan pengunyahan dan berbicara (Sugiarti, 2017; Robbihi, 2018).

Bentuk paling umum dari periodontitis adalah periodontitis kronis yang tidak hanya terjadi pada orang dewasa tetapi juga menyerang anak-anak. Periodontitis kronis memiliki tingkat progresi yang lambat tetapi periode kehancurannya dapat berlangsung cepat. Peningkatan perkembangan penyakit

dapat disebabkan oleh dampak dari faktor-faktor lokal, sistemik, atau lingkungan yang dapat mempengaruhi interaksi yang normal dari inang dan bakteri (Sidiqa, 2017).

Penatalaksanaan penyakit periodontal terdiri dari empat tahap, yaitu tahap sistemik, tahap higienik, tahap koreksi, dan tahap penunjang. Tahap sistemik berhubungan dengan kondisi sistemik penderita yang berpengaruh terhadap timbulnya penyakit periodontal yang selanjutnya juga akan berdampak pada rencana terapi. Pada tahap sistemik fokus perawatan penyakit periodontal ditekankan pada masalah infeksi yang selalu terjadi, sehingga perlu dilakukan pemberian antimikroba, berupa pemberian antibiotik secara lokal atau sistemik dan antiseptik. Tahap higienik dari penatalaksanaan penyakit periodontal adalah dengan menghilangkan faktor lokal penyebab penyakit periodontal, seperti plak dan kalkulus dengan cara *scaling* dan *root planning*. Penderita juga harus diberi instruksi untuk menjaga kebersihan mulutnya sebab emulihkan kebersihan mulut yang optimal merupakan tujuan dari tahap ini. Memperbaiki kerusakan yang ditimbulkan oleh penyakit periodontal termasuk dalam tahap koreksi, seperti penyesuaian oklusi dan tindakan bedah. Setiap penderita yang mengalami terapi periodontal memerlukan tindak lanjut yang terus menerus karena penyakit periodontal merupakan penyakit kronis yang perlu dilakukan re-evaluasi (Tedjasulaksana, 2016).

### **2.1.1 Etiologi Periodontitis**

Plak merupakan penyebab utama terjadinya periodontitis yang akan berakumulasi di permukaan gigi (Asykarie, 2017). Plak gigi adalah lapisan lunak yang terdiri atas mikroorganisme yang berkembang biak diatas suatu matriks yang terbentuk dan melengket pada permukaan gigi yang tidak dibersihkan (Mirawati, 2017). Penyakit periodontal dapat disebabkan oleh bakteri gram positif dan gram negatif. Bakteri gram positif biasanya akan menstimulasi terbentuknya *chemokines* dalam level yang rendah. Sedangkan bakteri gram negatif akan mengeluarkan LPS yang dapat menstimulasi pengeluaran *chemokines* dan interleukin serta mendestruksi jaringan (Siregar, 2015). Beberapa bakteri plak

yang dapat menyebabkan periodontitis, diantaranya *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, dan *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Sudirman, 2017). Periodontitis berkembang setelah timbulnya simbiosis antara biofilm atau bakteri plak dan *host* yang berhubungan dengan kesehatan dan respons inflamasi imun *host* sehingga terjadi kerusakan jaringan ikat dan kehilangan tulang alveolar (Anwar, 2018).

### 2.1.2 Patogenesis Periodontitis

Patogenesis periodontitis erat kaitannya dengan interaksi antara plak biofilm dengan respon *host*. Interaksi antara biofilm patogenik dengan respon imun *host* beresiko 80% terhadap perkembangan penyakit periodontitis. Secara klinis, pada jaringan periodontal yang sehat sudah terdapat infiltrasi leukosit yang kemudian akan bermigrasi ke *junctional epithelium* untuk bertindak sebagai barier terhadap mikroba. Keratinosit pada epitelium gingiva juga berperan sebagai barier terhadap adanya infeksi bakteri dengan ikut mensekresi beberapa molekul inflamasi, seperti IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, dan TNF- $\alpha$  serta *antimicrobial peptides* (AMPs) (Meyle, 2015).

*Porphyromonas gingivalis* merupakan bakteri patogen bersifat anaerob gram negatif yang paling banyak menyebabkan periodontitis. Invasi *P.gingivalis* secara intraseluler diinisiasi oleh melekatnya fimbriae dengan reseptor  $\beta$ 1-integrin pada permukaan jaringan. Invasi dapat berlangsung selama sekitar 15 menit dan replikasi bakteri didalam sel akan berlangsung dalam 4 jam pertama. Enzim proteinase pada bakteri, seperti gingipains dan LPS dari *P.gingivalis* dapat menghancurkan barier epitelium sehingga bakteri dapat melakukan invasi. Kolonisasi bakteri yang semakin banyak atau yang disebut plak pada permukaan mukosa dapat mengakibatkan inflamasi yang selanjutnya akan mengaktifkan pengeluaran sitokin proinflamasi (Ji, 2015; Meyle, 2015; Sari, 2016).

Dalam fase ini tentunya terjadi aktivasi *innate immune system* yang disertai oleh migrasi leukosit ke area infeksi. *Toll-like receptors* (TLRs) akan mengenali adanya sinyal berbahaya oleh karena terjadinya suatu injuri sehingga akan mengaktifasi *intracellular signaling pathways*, termasuk NF- $\kappa$ B yang akan

mengaktivasi Sel B dan *mitogen activated protein kinases (MAPK) pathways* untuk menginduksi sitokin, *chemokines*, dan *antimicrobial peptide* sebagai respon inflamasi (Landen, 2016).

Sekresi sitokin proinflamasi akan mengakibatkan migrasi trombosit dan leukosit. Degranulasi platelet ini akan mengaktivasi *complement cascade* (C3a dan C5a) sehingga terjadi vasodilatasi pembuluh darah yang akan meningkatkan permeabilitas pembuluh darah dan memperlambat laju aliran darah. Aktivasi endotelial ini akan menyebabkan penurunan antikoagulan dan fibrinolitik sehingga akan meningkatkan aktivitas trombosis. Bersamaan dengan ini akan terjadi peningkatan adhesi leukosit, utamanya neutrofil, dengan cara melekat pada *adhesion molecules*, seperti *intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1)*, *vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1)*, dan *e-selectin (SELE)* pada sel endotelial ke area peradangan untuk memfagosit patogen yang kemudian akan dibunuh oleh AMPs, seperti *a-defensins* dan *b-defensins*. Neutrofil juga akan memproduksi berbagai sitokin, seperti IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, dan TNF- $\alpha$  untuk memperkuat respon inflamasi (Meyle, 2015; Landen, 2016; Moreira, 2018).

Diapedesis dan migrasi leukosit terjadi dari jaringan gingiva ke sulkus gingiva melewati *junctional epithelium*. Bersamaan dengan ini, terjadi pula peningkatan serum pada sulkus gingiva sebagai hasil dari peningkatan permeabilitas vaskular yang akan menjadi cairan sulkus gingiva (*Crevicular Gingival Fluid*) dan memediasi beberapa *inflammatory peptides*, seperti antibodi, *complement*, dan produk perlawanan patogen lainnya. Peningkatan cairan sulkus gingiva ini akan menyebabkan peningkatan eksudat serta pembengkakan jaringan gingiva (Meyle, 2015)

Beberapa hari kemudian, monosit akan bermigrasi ke area injuri yang kemudian akan berdiferensiasi menjadi makrofag. Makrofag akan memproduksi IL-10 dan *growth factors*, seperti *transforming growth factor (TGF $\beta$ )*, *vascular endothelial growth factor (VEGF)*, *insulin like growth factor (IGF1)*, *basic fibroblast growth factor (bFGF)* untuk menginisiasi proliferasi fibroblas, sintesis *ECM*, dan angiogenesis. Makrofag maupun fibroblas akan meregulasi *ECM* dengan mensintesis *matrix metalloproteinases (MMPs)* dan *tissue inhibitors of*



*metalloproteinase (TIMPs)* sehingga destruksi jaringan dapat terus terjadi (Landen, 2016).

Pada keadaan periodontitis, diketahui bahwa invasi bakteri banyak ditemukan di daerah membran basalis epitelium dan jaringan ikat termasuk di area dekat tulang alveolar bersamaan dengan ditemukannya infiltrasi sel T, leukosit, dan TNF $\alpha$ . Kondisi sistem imun yang semakin menurun dapat mengakibatkan proses infeksi ini menjadi inflamasi kronis dengan destruksi jaringan berlebihan (Ji, 2015).

Meningkatnya aktivitas neutrofil dalam membunuh patogen juga akan mengeluarkan ROS. ROS dapat menginduksi kerusakan protein dan DNA sel yang juga akan menghambat siklus pertumbuhan sel, menyebabkan apoptosis fibroblas, dan menginduksi MMPs untuk mendegradasi matriks protein sehingga menyebabkan destruksi jaringan. Disamping itu, ROS juga dapat menginduksi proses degenerasi jaringan keras atau resorpsi tulang alveolar melalui proses *osteoclastogenesis* (Kanzaki, 2017).

## **2.2 *Porphyromonas gingivalis***

Bakteri gram negatif banyak ditemukan saat kultur bakteri plak pada penyakit periodontitis (Tani, 2017). *Porphyromonas gingivalis* merupakan bakteri patogen bersifat anaerob gram negatif yang paling banyak menyebabkan periodontitis (Sari, 2016). Bakteri tersebut merupakan flora normal di dalam rongga mulut manusia yang banyak ditemukan pada area sulkus gingiva dan plak subgingiva (Dwipriastuti, 2017). Prevalensi *P.gingivalis* yang mendominasi pada periodontitis sebanyak 80,5% (Alibasyah, 2016). Bahkan ada pula yang mencatat bahwa sebanyak 85,75% *P.gingivalis* dapat menyebabkan periodontitis kronis (How, 2016).

Mikroorganisme yang berkoloni didalam plak tersebut memiliki beberapa faktor virulensi yang dapat merusak jaringan periodontal (Sari, 2016). Faktor-faktor virulensi pada bakteri gram negatif termasuk pada *P.gingivalis* dapat memicu terjadinya reaksi inflamasi pada jaringan periodontal dengan menderegulasi pertahanan *innate immune system* dan menstimulasi peningkatan

produk inflamasi, seperti IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, dan TNF- $\alpha$ . Destruksi jaringan periodontal dapat terjadi oleh karena peningkatan aktivitas osteoklas yang meresorpsi tulang alveolar disertai dengan penurunan diferensiasi osteoblas dan mineralisasi pada saat proses regenerasi jaringan periodontal (How, 2016).

Ketika terjadi inflamasi, IL-8 memberi sinyal kepada neutrofil untuk segera migrasi menuju *junctional epithelium* untuk membangun sistem pertahanan mukosa rongga mulut. Pada saat yang bersamaan, adanya bakteri *P.gingivalis* didalam sulkus gingiva akan bertemu dengan neutrofil lalu mensekresikan *serine phosphatase* (SerB) yang dapat menekan produksi IL-8 sehingga mencegah translokasi dan transkripsi gen IL-8. Akibat hal ini, migrasi neutrofil ikut berkurang ke jaringan terinflamasi dan semakin meningkatkan kolonisasi bakteri *P.gingivalis* pada jaringan gingiva. Disamping itu, seiring berjalannya waktu ketika makrofag akan melakukan perannya untuk memfagosit patogen, *P.gingivalis* dapat mengambil lipid yang terbentuk pada membrane makrofag menggunakan fimbriae dan asesori protein lainnya. Maka, dengan sekali *P.gingivalis* dapat masuk ke dalam makrofag, bakteri tersebut dapat mengganggu proses seluler makrofag untuk membunuh patogen (Zenobia dan Hajishengallis, 2015).

### 2.2.1 Taksonomi *Porphyromonas gingivalis*

Pada awalnya, bakteri ini bernama *Bacteriodes gingivalis* yang kemudian mengalami klasifikasi baru dengan adanya perubahan pada nama genusnya sehingga menjadi *Porphyromonas gingivalis*. Nama *Porphyromonas* berasal dari kata sifat bahasa Yunani "*Porphyreos*" yang berarti "ungu" dan kata benda bahasa Yunani "*Monas*" yang berarti "unit". Oleh karena itu, kata "*Porphyromonas*" berarti sel porphyrin sebagai koloni pada media agar yang dapat berubah warna menjadi hitam setelah 6-10 hari oleh karena akumulasinya (How, 2016).

Secara taksonomi, *P.gingivalis* dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom : *Bacteria*  
Filum : *Bacteroides*



Kelas	: <i>Bacteroidia</i>
Ordo	: <i>Bacteroidales</i>
Famili	: <i>Porphyromonadaceae</i>
Genus	: <i>Porphyromonas</i>
Spesies	: <i>Porphyromonas gingivalis</i> (Rams, 2016)

### 2.2.2 Karakteristik *Porphyromonas gingivalis*

*Porphyromonas gingivalis* merupakan bakteri obligat anaerobik gram negatif yang tidak berspora, berbentuk batang pleomorfik dengan panjang 0,5 - 2 µm, non-motil dan termasuk dalam jenis bakteri proteolitik. Bakteri ini tumbuh berkoloni pada media kultur padat (*agar plates*) berdiameter 1-2 mm, berbentuk konveks, halus, mengkilat serta berwarna coklat hingga hitam oleh karena produksi prothoheme, yaitu suatu substansi yang bertanggungjawab atas warna khas koloni bakteri ini (Samaranayake, 2011; How, 2016; Rams, 2016).

Habitat *P.gingivalis* berada pada sel-sel gingiva dan yang paling banyak terdapat pada jaringan gingiva rongga mulut manusia. Hal ini ditunjang oleh karena terdapatnya fermentasi asam amino sebagai kebutuhan bakteri tersebut dalam memproduksi energi dan bertahan hidup di poket periodontal (How, 2016; Takeuchi, 2017).

### 2.2.3 Faktor-Faktor Virulensi *Porphyromonas gingivalis*

Kerusakan periodontal sering dipicu oleh serangkaian proses kompleks yang melibatkan akumulasi plak, substansi bakteri, dan respon inflamasi. Bakteri *P.gingivalis* memiliki beberapa faktor virulensi yang merupakan komponen metabolit bakteri sehingga dapat melakukan penetrasi ke gingiva dan menyebabkan kerusakan jaringan periodontal (How, 2016).

Faktor-faktor virulensi tersebut, diantaranya:

a. Kapsul (*Capsules*)

Bakteri harus menempel pada gigi atau permukaan mukosa rongga mulut supaya dapat berpenetrasi ke dalam jaringan periodontal. Perlekatan bakteri pada mukosa dimediasi oleh adhesins yang terdapat pada permukaan bakteri dan permukaan mukosa. Adhesins ini diketahui sebagai komponen dinding sel atau

kapsul bakteri. Komposisi utama kapsul bakteri tersusun atas gula. Hasil studi sebelumnya membuktikan bahwa bakteri berkapsul termasuk *P.gingiva* memiliki pengaruh yang signifikan terhadap terjadinya adhesi awal *P.gingiva* ke sel epitel poket periodontal. Bakteri berkapsul yang melekat pada permukaan mukosa diketahui pula dapat meningkatkan resistensi terjadinya fagositosis, menurunkan induksi leukosit, dan memodulasi respon *host* dengan menurunkan sintesis beberapa sitokin, seperti IL-1, IL-6, dan IL-8. Beberapa studi juga menyebutkan bahwa semakin tebal kapsul bakteri, maka akan semakin tinggi pula kemampuan virulensinya. Ketebalan kapsul bakteri ini dapat dibedakan menurut jenis strainnya. Kapsul juga berkontribusi sebagai pertahanan bakteri itu sendiri dengan mengurangi efek bakterisid atau antimikroba peptida yang disebut defensins (How, 2016).

b. Fimbriae

Fimbriae merupakan komponen protein yang menonjol keluar dari permukaan sel membran terluar bakteri. Fimbriae memiliki panjang 3-25  $\mu\text{m}$ . *Porphyromonas gingivalis* diketahui memiliki 2 tipe fimbriae pada permukaan selnya, yaitu sub unit protein FimA/Fimbrillin (fimbriae mayor) yang dikode oleh gen Fim A dan sub unit protein Mfa (fimbriae minor) yang dikode oleh gen Mfa 1. Kedua tipe fimbriae ini dibedakan atas komposisi asam amino pada keduanya dan sama-sama berkontribusi atas peningkatan progresi reaksi inflamasi jaringan periodontal. Selain kedua tipe tersebut, ternyata *P.gingivalis* juga memiliki tipe sub unit protein lain yang tidak termasuk ke dalam salah satu tipe sub unit protein/fimbriae pada umumnya. Mfa 1 atau fimbriae minor diketahui dapat menstimulasi produksi IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, dan TNF- $\alpha$  sehingga dapat dikatakan bahwa Mfa1 menjadi faktor penyebab resorpsi tulang alveolar. Sedangkan Fim A atau fimbriae mayor diketahui dapat menyebabkan invasi awal osteoblast tapi tidak untuk diferensiasi dan mineralisasi (How, 2016).

c. Lipopolisakarida (LPS)

LPS merupakan molekul besar dengan ukuran kurang lebih 10 kDA. LPS merupakan komponen pada membran terluar bakteri yang tersusun atas polisakarida, oligosakarida, dan domain hidrofobik atau Lipid A (endotoksin).

Lipid A sebagai penyusun terbanyak pada LPS dapat menyebabkan regulasi *innate immune system* dengan cara berinteraksi dengan *Toll-like Receptor (TLR)* 2 dan 4. LPS juga berperan untuk menjaga integritas structural sel bakteri dengan cara mengontrol masuknya molekul hidrofobik dan substansi beracun. LPS merupakan faktor petogenik terpenting pada bakteri periopatojen termasuk pada *P.gingivalis* (How, 2016).

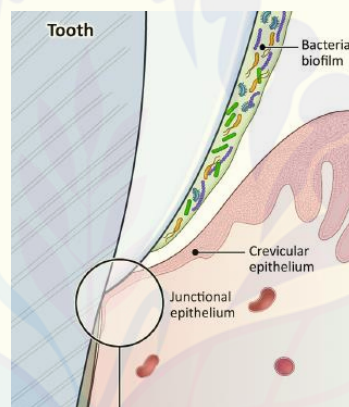
Kemampuan LPS ini dapat mengaktifkan respon inflamasi pada *host* dan mengganggu proses remodeling. LPS juga dapat mengganggu distribusi leukosit dan menurunkan kemampuan sel epitel gingiva untuk mensekresi kemokin IL-8 sehingga hal ini berdampak pada aktivitas neutrofil, eosinofil, dan basofil. Menurunnya sistem imun *host* akan semakin meningkatkan kolonisasi bakteri dan meningkatkan LPS. Pada periodontitis, LPS juga dapat menghalangi diferensiasi dan mineralisasi osteoblas pada stem cell ligamen periodontal dan memicu respon inflamasi dengan meningkatkan kadar MMP-8 di jaringan periodontal (How, 2016).

#### d. Gingipains

Gingipains merupakan protease yang bersifat proteolitik dan termasuk substansi beracun yang disekresi oleh *P.gingivalis*. Terdapat 2 jenis gingipains, yaitu gingipains R dan K. Ada 2 macam gingipains R, yaitu Rgp A dan Rgp B serta hanya ada 1 macam gingipains K, yaitu Kgp. Gingipains R dapat mendegradasi komponen matriks ekstraseluler, termasuk perlekatan integrin-fibronectin, sitokin, immunoglobulin, dan faktor komplemen. Banyak studi yang membuktikan bahwa gingipains pada poket periodontal dapat menyebabkan destruksi jaringan periodontal karena dapat mengaktifkan MMP-8 sehingga terjadi degradasi kolagen. Gingipains juga dapat menghalangi koagulasi darah sehingga meningkatkan perdarahan. Selain itu, gingipains dapat mendegradasi *antimicrobial peptides*, seperti defensins dan faktor komplemen. *Innate immune system* juga dapat semakin menurun oleh karena adanya gingipains sehingga lemah melawan bakteri (How, 2016).

### 2.3 Jaringan Gingiva

Gingiva merupakan sarana klinis untuk mendiagnosa penyakit periodontal dan evaluasi terapinya. Salah satu bagian terpenting dari jaringan gingiva ini adalah kedalaman sulkusnya (Vandana, 2017). Sulkus gingiva adalah cekungan dangkal berbentuk *V-shaped* yang dibatasi oleh permukaan gigi dan lapisan epitel margin gingiva. Sulkus gingiva ini meluas disekitar lingkaran gigi daerah servikal. Seperti yang kita ketahui dari gambar 2.1, gingiva dapat melekat ke permukaan gigi dengan bantuan *junctional epithelium* yang berada di dasar sulkus gingiva. Tanda awal terjadinya penyakit periodontal diketahui dari hilangnya perlekatan *junctional epithelium* ke permukaan gigi sehingga menyebabkan sulkus menjadi lebih dalam (Pathak, 2016).



Gambar 2.1 Jaringan Gingiva

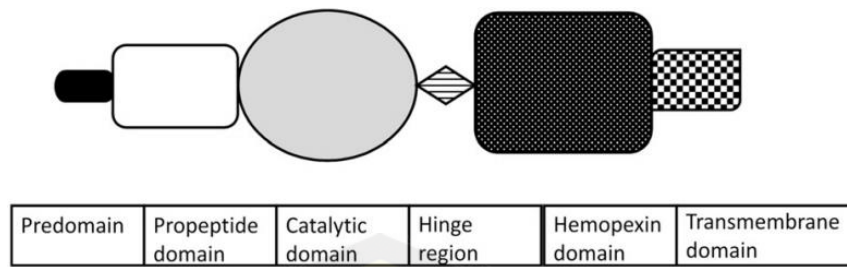
Dari gambar 2.1 dapat kita lihat bahwa jaringan gingiva dibatasi oleh *non-keratinized epithelium* yang sering disebut sebagai *crevicular epithelium* yang semakin menipis ke arah dasar sulkus. Sulkus gingiva atau *crevice gingival* juga berperan sebagai barrier terhadap infeksi bakteri. Sel-sel inflamasi yang terdapat di mukosa rongga mulut paling banyak ditemukan pada daerah ini. Neutrofil bahkan ditemukan sekitar 96% di jaringan gingiva sehat dan akan meningkat apabila terjadi suatu injuri (Bostanci dan Belibasakis, 2018; Moutsopoulos, 2018). Neutrofil dapat mencapai jaringan gingiva dalam 20 menit setelah stimulasi bakteri pada jaringan yang kemudian akan mensekresi enzim proteolitik dan mediator inflamasi ke dalam sulkus gingiva (Bostanci dan Belibasakis, 2018).



Ditemukannya beberapa sitokin proinflamasi seperti, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, dan TNF- $\alpha$ , serta *chemokines* yang diproduksi oleh makrofag saat terjadi inflamasi jaringan periodontal, immunoglobulin, produk kerusakan jaringan dan produk sel yang lisis akibat metabolisme bakteri didalam cairan sulkus gingiva menyebabkan sulkus gingiva beserta cairannya disebut sebagai alat penunjang untuk diagnosa suatu penyakit periodontal. Faktor molekuler lain yang berpotensi kuat sebagai *marker* diagnosa periodontitis adalah *Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ B Ligand* (RANKL) dan osteoprotegerin yang berperan dalam regulasi resorpsi tulang alveolar. Pada keadaan periodontitis diketahui bahwa kadar RANKL pada sulkus gingiva meningkat untuk diferensiasi dan aktivasi osteoklas sedangkan kadar osteoprotegerin pada sulkus gingiva untuk menghambat aktivitas RANKL menurun sehingga dapat terjadi peningkatan resorpsi tulang alveolar (Hikmah, 2013; Bostanci dan Belibasakis, 2018).

#### 2.4 MMPs

Kolagen merupakan salah satu penyusun matriks ekstraseluler di jaringan periodontal yang akan mengalami degradasi saat remodeling atau repair jaringan. Degradasi kolagen melibatkan beberapa macam protease, seperti MMPs atau *matrixin*. MMPs yang termasuk didalam kelompok endopeptidase diketahui memegang peranan paling besar dalam proses degradasi kolagen. Terdapat 24 MMPs yang teridentifikasi pada golongan vertebrata, 23 diantaranya pada manusia. Masing-masing jenisnya dibedakan berdasarkan angka, dimulai dari MMP-1 dan diakhiri dengan MMP-28, tetapi tidak termasuk MMP-4, MMP-5, MMP-6, dan MMP-22. MMP-4 dan MMP-6 diketahui identik dengan MMP-3, sedangkan MMP-5 identik dengan MMP-2. MMP-22 diketahui memiliki identitas yang berbeda dari jenis MMP lainnya sehingga tidak teridentifikasi kedalam MMPs (Trypuc, 2016).



Gambar 2.2 Struktur MMPs

Dari gambar 2.2, dapat kita ketahui struktur dari MMPs. MMPs tersusun atas beberapa domain, seperti *predomain*, *propeptide domain*, *catalytic domain*, dan *hemopexin domain*. *Propeptide domain* tersusun atas 80-90 asam amino dan mengandung residu sistein untuk berinteraksi dengan atom zinc pada *catalytic domain*. Pada *catalytic domain*, terdiri atas dua ion zinc dan ion kalsium. Satu dari dua ion zinc terlibat dalam proses katalisis pada MMPs sedangkan peran ion zinc lainnya serta ion kalsium tidak banyak diketahui. MMPs juga memiliki penghubung atau lengan peptida yang disebut *hinge region* dengan panjang yang bervariasi. *Hemopexin domain* ditemukan memiliki kemiripan dengan plasma protein yang berperan terhadap interaksi dengan MMPs lainnya maupun dengan TIMPs. Namun, *hinge region* dan *hemopexin domain* tidak ditemukan pada MMP-7, MMP-23, dan MMP-26 (Kapoor, 2016; Trypuc, 2016)

MMPs dibagi menjadi enam kelompok, yaitu *collagenases*, *gelatinases*, *stromelysins*, *matrilysins*, *membrane-type*, dan *non-classified*. MMPs kelompok *collagenases*, antara lain MMP-1, MMP-8, MMP-13, dan MMP-18. MMPs kelompok *gelatinases*, antara lain MMP-2 dan MMP-9. MMPs kelompok *stromelysins*, antara lain MMP-3, MMP-10, MMP-11 dan MMP-17. MMPs kelompok *matrilysins*, antara lain MMP-7 dan MMP-26. MMPs kelompok *membrane-type*, antara lain MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, dan MMP-25. MMPs kelompok *non-classified*, antara lain MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-22, MMP-23, dan MMP-28 (Kapoor, 2016).

MMPs dapat diaktivasi oleh plasmin, ROS, pH rendah dan *heat treatment* (Dhalla, 2014). Ekspresi MMPs terdapat pada sel-sel jaringan ikat, yaitu pada fibroblas, neutrofil, monosit, makrofag, dan sel endotelial. MMPs terkeksresi



pada jaringan dalam kadar yang rendah. Aktivasi maupun penghambatan MMPs berdasarkan pengontrolan proses *cascade*. Beberapa faktor yang dapat meningkatkan ekspresi MMPs, diantaranya sitokin proinflamasi (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ), *growth factors* (TGF $\beta$ , *epidermal growth factor* (EGF), *platelet-derived growth factor* (PDGF), dan bFGF). Sedangkan penghambat MMPs, diantaranya kortikosteroid, *retinoid acid*, heparin, dan IL-4. Didalam plasma, inhibitor aktivitas MMPs paling banyak diperankan oleh  *$\alpha$ 1-macroglobulin* dan  *$\alpha$ 1-antiprotease*. Pada jaringan, terdapat empat *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs) yang telah teridentifikasi, yaitu TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, dan TIMP-4. TIMPs dapat menghambat proses aktivasi dari pro-MMP (zymogen) menjadi MMP. TIMPs ini diregulasi oleh sitokin dan *growth factors* (Robert, 2016; Trypuc, 2016). TIMPs disekresi dengan perbandingan 1:1 terhadap MMPs. Apabila sekresi keduanya tidak seimbang, maka dapat mengarah pada terjadinya proses patologis dengan jalan destruksi membran basalis sehingga dapat terjadi invasi tumor, angiogenesis, serta proses penyembuhan luka. Oleh karena itu, disregulasi aktivitas MMPs dapat menyebabkan kerusakan jaringan dan perubahan fungsi tubuh (Duarte, 2015).

MMPs bertugas mengaktifkan *growth factors* inaktif yang melekat pada permukaan sel. Selain itu, MMPs juga mengaktifkan TNF- $\alpha$  sebagai salah satu sitokin proinflamasi yang terkespresi sebagai *membrane bound precursor* pada permukaan makrofag dan sel T. MMPs mampu berinteraksi dengan beberapa reseptor permukaan sel, seperti *cadherins*, *integrins*, dan molekul adhesi lainnya, terutama molekul adhesi pada ECM (Trypuc, 2016).

MMPs berperan sebagai *anti* dan *pro-inflammatory pathways* dengan terlibat dalam aktivasi respon imun dalam MAPK *pathways* dan aktivasi *NF- $\kappa$ B pathways* (Kapoor, 2016). *NF- $\kappa$ B* dan sitokin inflamasi mampu meregulasi ekspresi MMPs dan TIMPs. Meningkatnya MMPs diketahui berkaitan dengan adanya proses inflamasi. MMPs mampu mendestruksi membran basalis dan menyediakan tempat untuk migrasi sel-sel inflamasi (Guo, 2017)

Disamping itu, dengan terjadinya angiogenesis melalui *angiogenic factors*, seperti VEGF dan bFGF yang disekresi oleh sel-sel inflamasi, akan

melekat pada suatu reseptor di permukaan sel endotelial. Aktivasi ini akan menyebabkan sel endotelial mensekresi MMPs untuk memicu *integrin intracellular signaling* dan jaringan mengalami proliferasi. MMPs juga dapat meregulasi pertumbuhan tumor dengan mendorong pengeluaran IGF. Pada intinya, MMPs mampu meregulasi proliferasi sel, adhesi, migrasi, *growth factors*, kemotaksis, dan *signaling* sehingga penting dalam proses angiogenesis, tumorigenesis, metastasis, inflamasi, dan penyembuhan luka (Kapoor, 2016; Franco, 2017).

#### 2.4.1 MMP-8

MMP-8 (*collagenase 2*) merupakan enzim pemecah kolagen yang terdapat pada jaringan ikat dan disekresi oleh sel turunan PMN (neutrofil) maupun bukan turunan PMN, seperti fibroblas dan makrofag (Susilowati, 2010). Pada sebuah penelitian yang dilakukan oleh Paivi Mantyla, dkk didapatkan adanya peningkatan MMP-8 (*collagenase-2*) di jaringan gingiva pada penderita periodontitis. Hal ini selanjutnya akan memobilisasi dan mengaktivasi sel-sel inflamasi dan produk-produk inflamasi yang dihasilkan. Kadar MMP-8 kemudian ditemukan menurun setelah periodontitis diobati (Mantyla, 2003; Rai, 2010). Penurunan kadar MMP-8 dapat memberikan hasil penyembuhan terhadap periodontitis karena ditemukan bahwa terjadi pengurangan kedalaman poket dan terbentuknya kembali perlekatan klinis (Sorsa, 2016). Penelitian lain juga membuktikan bahwa ditemukannya MMP-8 sebagai *pro-inflammatory product* pada tikus dapat memperlambat proses penyembuhan luka apabila terjadi degradasi *ECM* yang berlebihan (Omar, 2015; Williams, 2016).

Didalam rongga mulut, beberapa tipe sel mampu mensekresi MMPs. Salah satunya, yaitu neutrofil yang berperan sebagai komponen barier utama di jaringan gingiva dalam melawan bakteri biofilm mampu melepaskan MMP-8 (*neutrophilic collagenase-2*) pada saat fase inflamasi akut sehingga menjadi komponen penting terhadap *etiopathogenesis* dari penyakit periodontal. Pada periodontitis, MMP-8 merupakan enzim kolagenase paling penting di jaringan periodontal yang memegang kendali aktivitas kolagenase sebesar 90-95% pada gingiva.

Peningkatan kadar MMP-8 berkaitan dengan peningkatan progresi periodontitis oleh karena perannya dalam mendestruksi jaringan maupun tulang alveolar sehingga MMP-8 dijadikan *diagnostic marker* terhadap terjadinya periodontitis (Gursoy, 2010; Gupta, 2014; Sorsa, 2016; Noack, 2017; Gursoy, 2018).

Pengeluaran dan aktivasi MMP-8 dari neutrofil diregulasi oleh bakteri, terutama bakteri patogen yang berkaitan dengan periodontitis. Enzim bakteri mampu mengubah *pro-neutrophilic* MMP-8 menjadi bentuk aktif. Aktivasi dari pro-MMP-8 menjadi MMP-8 juga diperankan oleh MMP-7. Selain itu, MMP-8 juga dapat diaktifkan dengan adanya *ROS* melalui mekanisme oksidatif akibat terjadinya inflamasi pada jaringan periodontal. Maka dari itu, semakin parah periodontitis akan semakin meningkat pula kadar MMP-8 (Alfakry, 2016; Sorsa, 2016; Gursoy, 2018).

MMP-8 dapat menginisiasi degradasi kolagen tipe I dan III yang merupakan komponen utama pada ECM jaringan periodontal. MMPs lainnya, seperti *gelatinases*, hanya melanjutkan aktivitas degradasi kolagen yang telah diinisiasi oleh MMP-8. Proses degradasi ini akan berlanjut kearah kerusakan jaringan periodontal. Kadar MMP-8 kemudian diketahui mengalami penurunan setelah perawatan, seperti *scaling & root planning* serta pemberian *inhibitor* MMP-8 (Gupta, 2014; Alfakry, 2016).

#### 2.4.2 Metode Analisis MMP-8

Beberapa contoh metode untuk menganalisis ekspresi MMP-8, diantaranya:

a. IHC (*Immunohistochemical*)

*Immunohistochemical* (IHC) merupakan salah satu metode untuk mendeteksi suatu antigen pada jaringan dengan prinsip reaksi antibodi yang berikatan terhadap antigen pada jaringan. IHC memiliki kemampuan tinggi untuk memisahkan, menseleksi dan bersifat spesifik dalam mendeteksi substansi di jaringan oleh karena adanya ikatan spesifik antara antibodi dan antigen. Hasil reaksi antibodi dan antigen dapat diidentifikasi bila antibodi diikat oleh enzim (HRP) lalu direaksikan dengan substrat kromogen hingga menghasilkan produk

akhir berwarna coklat dan tidak larut sehingga dapat diamati dibawah mikroskop. Salah satu antigen yang dapat dideteksi keberadaannya dengan metode IHC adalah MMP-8. Hasil yang didapat dari metode ini dapat berupa gambaran kualitatif maupun kuantitatif dari intensitas warna yang terbentuk (Ramos, 2014). Jaringan yang akan diteliti biasanya diberi formalin serta difiksasi terlebih dahulu dengan paraffin yang kemudian dipotong menjadi setebal 4  $\mu\text{m}$  lalu dideparafinisasi menggunakan xylene dan rehidrasi bertingkat menggunakan alkohol yang selanjutnya dapat divisualisasikan menggunakan mikroskop cahaya atau elektron (Omar, 2015; Jakubowska, 2016).

b. ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

Ekspresi MMP-8 juga dapat diketahui melalui analisis teknik ELISA dengan menggunakan sebuah perangkat buatan pabrik yang dinamakan “ELISA kit”. Metode ELISA ini melalui beberapa tahap, diantaranya persiapan *standard*, persiapan larutan pencuci, analisis, dan pembacaan (*reading*). Persiapan *standard* dilakukan dengan menyiapkan 5 eppendorf tube dengan ukuran 1,5 ml yang kemudian masing-masing tube ditambahkan larutan pengencer (*diluent*) sesuai petunjuk masing-masing ELISA kit. Pada tube ke-5 diisi *standard* yang dibutuhkan lalu dicampur menggunakan vortex selama 10 detik. Setelah selesai, *standard* pada tube ke-5 diambil menggunakan pipet dan dimasukkan pada tube ke-4 lalu dilakukan hal yang sama hingga tube ke-1 (Aydin, 2015).

Prosedur pembacaan segera dilakukan dengan menambahkan *standard* ke dalam ELISA *reader* dan diinkubasi pada suhu 37° selama 90 menit, 1 jam, dan 30 menit. ELISA *reader* kemudian akan menampilkan hasil kadar yang diteliti dengan panjang gelombang 450 nm (Aydin, 2015).

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

Beberapa komoditas perkebunan mempunyai peran penting bagi perekonomian Indonesia, salah satunya adalah tanaman kakao (*Theobroma cacao L.*) (Robiyan, 2014). Kakao (*Theobroma cacao L.*) merupakan salah satu komoditas unggulan di Indonesia dengan nilai jual yang cukup tinggi (Mulyatni, 2012). Perkebunan kakao (*Theobroma cacao L.*) di Indonesia tercatat seluas



1.677.245 ha, dengan sebagian besar (94,51%) dikelola oleh rakyat sedangkan selebihnya 5,49% dikelola oleh perkebunan besar negara serta dikelola oleh perkebunan besar swasta (Robiyan, 2014).

Bukan hanya di Indonesia, kakao (*Theobroma cacao L.*) juga ditanam pada total lahan lebih dari 70,000 km<sup>2</sup> di seluruh dunia. Hampir sekitar 70% produksi kakao (*Theobroma cacao L.*) didunia berasal dari Afrika bagian barat, Amerika bagian tengah dan selatan, India bagian barat, dan wilayah tropis di Asia. Tinggi rata-rata pohon kakao (*Theobroma cacao L.*) sekitar 8-15 meter serta membutuhkan suasana lembab atau *moist* untuk dapat tumbuh subur. Karakteristik buah kakao (*Theobroma cacao L.*) pada setiap varietas memiliki ukuran, bentuk, dan warna yang berbeda-beda (Kongor, 2016).

Kebanyakan konsumen menyukai produk-produk kakao (*Theobroma cacao L.*) karena cita rasa yang khas dan aroma yang menggugah selera oleh karena komponen kimia yang menyusun. Kakao (*Theobroma cacao L.*) memiliki cita rasa yang khas, teksturnya berbentuk padat pada suhu kamar, cepat meleleh di mulut, menjadi cair dan terasa lembut di lidah. Karakteristik ini dipengaruhi oleh karakteristik kristal lemak coklat yang terbentuk (Salma, 2015).

Karakteristik dari buah dan biji kakao dapat digunakan sebagai dasar klasifikasi dalam sistem taksonomi. Berdasarkan bentuk buahnya, ada yang mengelompokkan kakao (*Theobroma cacao L.*) menjadi beberapa jenis, yaitu Cundeamor, Criollo, Amelonado, Angoleta, Forastero, dan Trinitario (Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia, 2006)





Gambar 2.3 (a) Kulit Buah Kakao jenis Lindak (*bulk*)



Gambar 2.3 (b) Biji Kakao jenis Lindak (*bulk*)

Disamping itu, terdapat pula varietas kakao lindak (*bulk*) seperti yang terlihat pada gambar 2.3 (a). Kakao lindak ini termasuk subjenis *Sphaerocarpum* yang banyak tersebar didaerah tropis. Seperti yang terlihat pada gambar 2.3 (b), bentuk bijinya lonjong atau oval, pipih, serta memiliki keping biji berwarna ungu gelap. Permukaan kulit buahnya relatif halus karena alurnya dangkal. Kulit buahnya tipis tetapi keras (Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia, 2006).

### 2.5.1 Taksonomi Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Kingdom : *Plantae*

Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Subdivisi	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Dicotyledonaeae</i>
Subkelas	: <i>Dialypetalae</i>
Ordo	: <i>Malvales</i>
Famili	: <i>Sterculiaceae</i>
Genus	: <i>Theobroma</i>
Spesies	: <i>Theobroma cacao L.</i> (Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia, 2010)

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

Kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) adalah bagian mesokarp atau bagian dinding buah kakao yang mencakup kulit terluar sampai daging buah sebelum kumpulan biji. Kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) merupakan bagian terbesar dari buah kakao (*Theobroma cacao L.*), yakni sebanyak sekitar 75,52% dari buah kakao segar. Setiap tahun produksi biji kakao (*Theobroma cacao L.*) meningkat. Hal ini juga mengakibatkan semakin meningkatnya kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) yang terbuang karena kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) masih belum dimanfaatkan secara optimal bahkan sebagian besar masih merupakan limbah yang hanya dikumpulkan pada lubang kemudian ditimbun atau dibuang. Kulit kakao (*Theobroma cacao L.*) sebagian besar terdiri dari polisakarida (selulosa dan hemiselulosa) dan lignin serta sebagian kecil terdiri dari senyawa fenolik, tanin, alkaloid purin, dan *cocoa butter* (Jusmiati, 2015).

Kandungan kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) terdiri atas air sekitar 85%, serat kasar 27%, dan protein 8% (Partayasa, 2017). Disamping itu, kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) kaya akan senyawa polifenol, antara lain 58% proantosianidin, 37% katekin, dan 4% antosianin (Dipahayu, 2018).

## 2.6 Proantosianidin

Proantosianidin merupakan senyawa polifenol yang paling banyak terdapat didalam kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*), yaitu sebanyak 58% (Liu, 2015). Selain di kulit, proantosianidin juga sering ditemukan pada tanaman bagian daun,

daging buah, dan biji. Proantosianidin ini berperan terhadap warna dan integritas pelapisan biji, pengobatan, dan nilai gizi (Jun, 2018). Beberapa tanaman yang diketahui memiliki kandungan proantosianidin, diantaranya kacang (*hazelnut*), anggur, bluberi, mangrove, kakao, tanaman beluntas, dan lain-lain (Kurniawaty, 2016; Lainas, 2016; Linasari, 2016; Usman, 2017).

Pada beberapa tanaman yang telah disebutkan sebelumnya, proantosianidin memiliki manfaat sebagai antiinflamasi (Vermitha, 2018). Proantosianidin juga bertindak sebagai antioksidan dan berpotensi sebagai pencegah beberapa penyakit, seperti kardiovaskular, diabetes mellitus, dan lainnya (Arifin, 2019).

Terdapat dua mekanisme yang menjelaskan aksi biologis proantosianidin, yaitu *basic biochemical mechanisms* dan *epigenetic mechanisms*. *Basic biochemical mechanisms* berfokus pada kemampuan proantosianidin untuk melekat ke protein sedangkan *epigenetic mechanisms* membutuhkan modifikasi DNA dan modulasi *microRNAs* (miRNA). Kedua mekanisme ini sama-sama memodulasi aktivitas enzimatik, pengiriman sinyal *cascades* dan ekspresi gen yang secara tidak langsung akan mempengaruhi fungsi sel (Blade, 2016).

### **2.6.1 Proantosianidin terhadap Ekspresi MMP-8 pada Periodontitis**

Proantosianidin diketahui mampu meningkatkan resistensi kolagen di jaringan terhadap peristiwa kolagenase. Hal ini dikarenakan proantosianidin dapat menggantikan air yang berada diantara mikrofibril kolagen dengan membentuk ikatan hidrogen baru diantara fibril-fibril kolagen sehingga dapat semakin merapatkan fibril-fibril kolagen dan menjaga integritas kolagen. Semakin tinggi konsentrasi proantosianidin, maka dapat membentuk matriks kolagen menjadi lebih padat karena dapat mencegah keluarnya air diantara fibril-fibril kolagen (Balalaie, 2018).

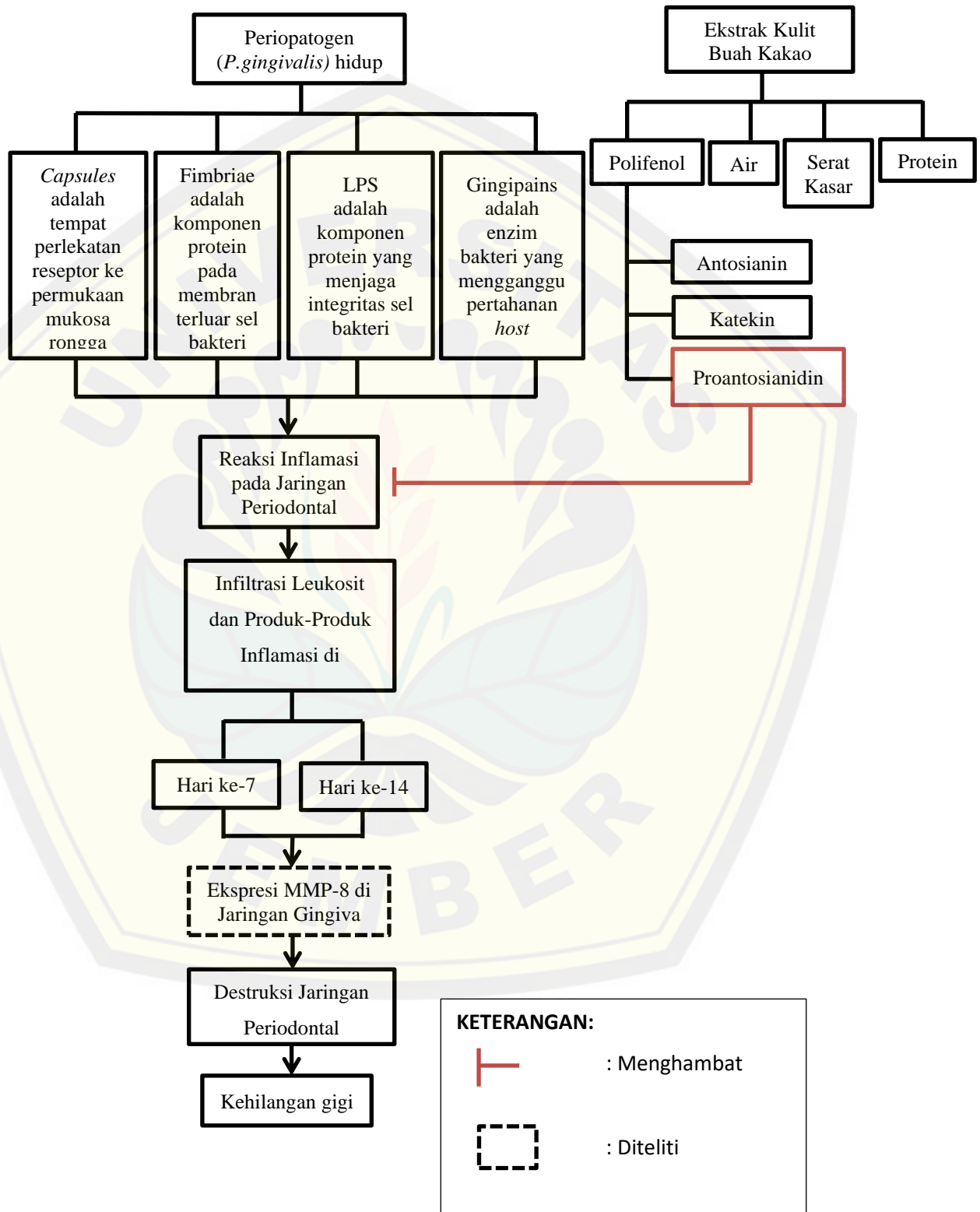
MMPs diketahui berperan dalam degradasi matriks kolagen, seperti MMP-8 yang mendegradasi kolagen tipe I dan III di jaringan yang berperan dalam proses periodontitis. Beberapa bahan alami maupun sintetis diketahui sebagai MMPs inhibitor yang dapat menghambat aktivitas MMPs, salah satunya adalah

proantosianidin. MMPs inhibitor memberikan efek penghambatan melalui penghambatan MMPs untuk mengikat dan membelah kolagen sehingga terjadi proses degradasi. Beberapa studi menyebutkan mekanisme penghambatan proantosianidin terhadap ekspresi MMPs. Proantosianidin yang dianggap sebagai molekul antagonis ditargetkan ke *catalytic domain* pada MMPs sehingga dapat menyebabkan perubahan aktivitas enzim yang irreversibel. Ada pula yang menyebutkan bahwa proantosianidin dapat mengganggu aktivitas molekuler MMPs secara langsung. Disamping itu, ada pula yang menyebutkan bahwa mekanisme penghambatan proantosianidin terhadap MMPs dilakukan dengan cara mengganggu produksi dan aktivasi MMPs dengan memodulasi respon imun *host* (Balalaie, 2018).

Suatu studi juga menyebutkan bahwa proantosianidin mampu mengurangi sekresi sitokin dan MMPs, salah satunya MMP-8 yang berperan dalam progresi periodontitis, dengan cara memblokir aktivasi sinyal *NF- $\kappa$ B* (Lagha, 2015). Seperti yang telah diketahui bahwa *NF- $\kappa$ B* diaktifkan oleh adanya *ROS* yang diinduksi oleh adanya pelepasan LPS bakteri, IL-1 dan TNF $\alpha$ . Sitokin IL-1 dan TNF $\alpha$  ini akan mengaktifkan *NF- $\kappa$ B* melalui protein kinase C dan protein kinase lainnya yang kemudian akan menstimulasi transkripsi mRNA sitokin pro inflamasi lainnya dan mensekresi MMPs (La, 2009; Kundalic, 2016). Oleh karena pemberian proantosianidin, maka sekresi MMP-8 dapat dihambat pada proses inflamasi jaringan periodontal (La, 2009).



2.7 Kerangka Konseptual





### Penjelasan Kerangka Konseptual

Terjadinya periodontitis diawali oleh karena adanya periopatogen, seperti *Porphyromonas gingivalis* yang melekat di permukaan gigi sehingga dapat melakukan invasi ke jaringan periodontal melalui sulkus gingiva. *P.gingivalis* atau bakteri proteolitik merupakan bakteri anaerob gram negatif yang memiliki beberapa faktor virulensi, diantaranya *capsules*, *fimbriae*, LPS, dan *gingipains*. Masing-masing faktor virulensi pada *P.gingivalis* memiliki perannya dalam menyebabkan infeksi periodontal. *Capsules* merupakan selubung terluar pada bakteri *P.gingivalis* yang ditempati oleh berbagai reseptor yang dapat melakukan perlekatan pada permukaan mukosa rongga mulut. *Fimbriae* merupakan komponen protein yang terdapat pada membran terluar sel bakteri *P.gingivalis*. LPS merupakan komponen protein yang terdapat pada membran terluar sel bakteri *P.gingivalis* yang menjaga integritas sel bakteri. *Gingipains* merupakan enzim bakteri *P.gingivalis* yang mengganggu pertahanan *host*.

Faktor-faktor virulensi tersebut dapat menyebabkan bakteri *P.gingivalis* berinvasi ke jaringan gingiva dan mengganggu sistem pertahanan *host* sehingga memicu terjadinya proses peradangan pada jaringan periodontal yang ditandai dengan peningkatan sitokin-sitokin proinflamasi di jaringan gingiva. Respon inflamasi jaringan akan berlanjut pada terjadinya destruksi jaringan periodontal oleh karena adanya peningkatan aktivitas MMP-8 yang diteliti pada hari ke-7 dan ke-14. Apabila ekspresi MMP-8 masih terlihat tinggi, maka proses peradangan jaringan dapat berlanjut hingga mengakibatkan kehilangan gigi.

Ekstrak kulit buah kakao yang terdiri atas beberapa senyawa, seperti polifenol, air, serat kasar, dan protein diberikan untuk mempercepat penyembuhan periodontitis sehingga dapat menurunkan ekspresi MMP-8 dan tidak akan mengakibatkan kehilangan gigi. Hal ini dikarenakan salah satu senyawa polifenol, yaitu proantosianidin, diduga memiliki efek antiinflamasi sehingga dapat mengobati periodontitis.

## 2.8 Hipotesis

Pemberian ekstrak proantosianidin kulit buah kakao dapat memberikan efek menurunkan ekspresi MMP-8 pada jaringan gingiva model tikus periodontitis.



## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah *eksperimental laboratories* dengan rancangan penelitian yang digunakan adalah *the post test only control group design* dimana terdapat dua kelompok dalam penelitian sebagai kelompok eksperimen dan kelompok kontrol. Pada kelompok eksperimen akan diberikan perlakuan dan setelah itu dilakukan tes sedangkan pada kelompok kontrol tidak diberi perlakuan tetapi tetap dilakukan tes (Ismail, 2018).

### 3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

#### 3.2.1 Tempat Penelitian

Beberapa tempat yang digunakan untuk penelitian ini, diantaranya adalah Laboratorium Tanaman Politeknik Negeri Jember untuk identifikasi spesies buah kakao (*Theobroma cacao L.*), Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Jember untuk pembuatan ekstrak proantosianidin kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*), Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk pembuatan dan peremajaan media suspensi *P. gingivalis*, Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk pemeliharaan dan perlakuan terhadap hewan coba dan Laboratorium Histologi bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk uji *Immunohistochemical (IHC)*.

#### 3.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei 2019-Desember 2019

### 3.3 Variabel Penelitian

#### 3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah senyawa proantosianidin ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) sebanyak 100 mg/ml.

### 3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah ekspresi MMP-8 pada jaringan gingiva model tikus periodontitis.

### 3.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini, diantaranya kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) yang segar dan matang, dosis proantosianidin ekstrak kulit buah kakao dari limbah kulit buah kakao, cara dan waktu pemberian proantosianidin ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) dan kriteria sampel meliputi galur tikus, jenis kelamin, berat badan, umur, dan kondisi fisik.

## 3.4 Definisi Operasional

### 3.4.1 Kulit Buah Kakao

Kulit buah kakao adalah kulit buah kakao jenis *Theobroma cacao L.* tipe lindak yang diambil dari limbah buah kakao (*Theobroma cacao L.*) dalam keadaan segar dan matang berasal dari petani kakao Desa Pondok Rejo, Kabupaten Jember.

### 3.4.2 Senyawa Proantosianidin Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*)

Senyawa proantosianidin ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) adalah senyawa proantosianidin yang terkandung dalam ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) berbentuk gel yang digunakan secara topikal pada tikus model periodontitis yang merupakan hasil ekstraksi dari kulit buah kakao jenis lindak serta diekstraksi menggunakan metode ekstraksi pemurnian proantosianidin dengan teknik HPLC-MS.

### 3.4.3 Ekspresi MMP-8

MMP-8 merupakan enzim penyebab destruksi jaringan periodontal pada jaringan gingiva tikus wistar jantan yang dipapar *Porphyromonas gingivalis* dengan konsentrasi  $2 \times 10^9$  CFU/ml dan diberi pewarnaan *immunohistochemical*

(IHC) dengan pemberian antibodi MMP-8 yang ekspresinya akan tampak sebagai pulasan warna coklat pada sel-sel epitel jaringan gingiva lalu diamati dibawah mikroskop dengan bantuan optilab pada perbesaran 100X dan dianalisis menggunakan *software Immunoratio* yang hasilnya ditetapkan berdasarkan persentase yang muncul dari *software* tersebut lalu hasil persentase dari tiap kelompok sampel dijumlah dan dirata-rata serta hasil persentase dari tiap sampel diinterpretasikan kedalam bentuk skor untuk mengetahui adanya perubahan ekspresi MMP-8.

#### 3.4.4 Tikus Periodontitis

Tikus periodontitis merupakan tikus wistar jantan yang diinduksi *Porphyromonas gingivalis* setiap 3 hari sekali selama 14 hari pada margin gingiva bagian mesial gigi molar pertama rahang atas regio kanan secara injeksi.

### 3.5 Sampel Penelitian

#### 3.5.1 Subyek Penelitian

Subyek yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus wistar (*Rattus norvegicus*) dengan jenis kelamin jantan yang dipelihara di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

#### 3.5.2 Besar Sampel

Besar sampel pada penelitian ini ditentukan berdasarkan rumus (Daniel, 2005), yaitu :

$$\frac{n \geq Z^2}{d^2} \times \sigma^2$$

Keterangan:

n : Besar sampel minimum

$\sigma$  : Standart deviasi sampel

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

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

$$Z=1,96$$

Jadi, perhitungannya adalah sebagai berikut:



$$\frac{n \geq 1,96^2}{d^2} \times \sigma^2$$

$$n \geq 3.84$$

$$n \geq 4$$

Jadi, jumlah sampel minimum yang harus digunakan adalah 4 sampel untuk masing-masing kelompok. Penelitian ini menggunakan 2 kelompok sampel, yaitu kelompok kontrol dan perlakuan. Masing-masing kelompok sampel terdiri atas 8 sampel sehingga didapatkan total besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini berjumlah 16 sampel.

### 3.5.3 Kriteria Sampel

Kriteria sampel dalam penelitian ini, yaitu tikus putih galur Wistar jenis kelamin jantan yang berusia 2-3 dengan berat badan 200-250 gram dan dalam keadaan umum baik.

### 3.5.4 Pengelompokkan Hewan Coba

Hewan coba tikus wistar jantan sebanyak 16 ekor dibagi menjadi dua kelompok, yang terdiri dari kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

- a. Kelompok I merupakan kelompok kontrol. Kelompok ini terdiri dari 8 ekor tikus wistar jantan. Kelompok ini dibagi menjadi 2 sub kelompok yang diamati pada hari ke-7 dan ke-14, masing-masing sub kelompok terdiri dari 4 ekor tikus wistar jantan. Hewan coba diinduksi *Porphyromonas gingivalis* setiap 3 hari sekali selama 14 hari. Setelah itu, pada margin gingiva bagian mesial gigi molar pertama rahang atas regio kanan diberi gel plasebo satu hari sekali selama 7 hari dan 14 hari. Hewan coba lalu dilakukan pengambilan jaringan gingiva setelah dianestesi menggunakan anestesi ketamin.
- b. Kelompok II merupakan kelompok perlakuan. Kelompok ini terdiri dari 8 ekor tikus wistar jantan. Kelompok ini dibagi menjadi 2 sub kelompok yang diamati pada hari ke-7 dan ke-14, masing-masing sub kelompok terdiri dari 4 ekor tikus wistar jantan. Hewan coba diinduksi *Porphyromonas gingivalis* setiap 3 hari sekali selama 14 hari. Setelah itu, pada margin gingiva bagian mesial gigi molar pertama rahang atas regio kanan diberi gel ekstrak

proantosianidin kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) satu hari sekali selama 7 hari dan 14 hari. Hewan coba lalu dilakukan pengambilan jaringan gingiva setelah dianestesi menggunakan anestesi ketamin.

### 3.6 Alat dan Bahan Penelitian

#### 3.6.1 Alat Penelitian

Timbangan analitik, oven, labu penakar 100 ml, erlenmeyer 1000 ml, pengaduk kaca, corong kecil, rotavapor, waterbath shaker, falcon tube 15 ml, lumpang dan alu, kandang hewan coba, timbangan hewan, tempat minum dan makan hewan coba, tabung reaksi, ose, sentrifuge, desicator agar, inkubator, laminar flow cabinet, *rat dental chair*, syringe kecil kapasitas 1 ml (terumo, Jepang), kaca mulut, pinset berkerat (dentica, Usa), ekskavator kecil, sonde setengah lingkaran, artery clamp, syringe, mikrotom (Leica RM 2135, Jerman), stopwatch, base mole, eppendorf tube 1,5 ml, rak eppendorf, lemari pendingin penyimpan sampel suhu minus 60°C, vortex, yellow tip, mikropipet, mikropipet channel 8, 96-well plate, *object glass*, *deck glass*, mikroskop cahaya, inkubator.

#### 3.6.2 Bahan Penelitian

Kulit buah kakao, CMC-Na, makanan hewan coba, aseton, aquades steril, BHI-B, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 0,05 ml konsentrasi  $2 \times 10^9$  CFU/ml, cotton roll, xylol, alkohol bertingkat (96%, 95%, 80%, 70%), *Phosphate buffersolutions* (PBS), formalin 10%, Hidrogen peroksida 3%, larutan kromogen *diaminobenzidine* (DAB), *Super Block*, antibodi primer MMP-8, *Biotinylated Link Antibody*, *Streptavidin/HRP label*, *Meyer's haematoxilin*.

### 3.7 Prosedur Penelitian

#### 3.7.1 Etichal Clearance

Sebelum dilaksanakan penelitian, prosedur perlakuan terhadap hewan coba telah memenuhi syarat kelayakan oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

### 3.7.2 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba diadaptasi terlebih dahulu selama 7 hari dalam kandang tertutup dan diberi makan standart serta minum. Hal tersebut bertujuan untuk memperoleh keseragaman sebelum dilakukan penelitian untuk mengontrol hewan coba.

### 3.7.3 Uji Identifikasi Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*)

Kulit buah kakao yang digunakan dalam penelitian ini terlebih dahulu dilakukan uji identifikasi untuk mengetahui bahwa kulit buah kakao yang digunakan berasal dari buah kakao dengan spesies *Theobroma cacao L.* Uji identifikasi ini dilakukan di Laboratorium Tanaman Politeknik Negeri Jember. Kulit buah kakao yang digunakan adalah semua bagian kulit dengan jenis *Theobroma cacao L.* tipe kakao lindak (Forastero).

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

#### 1. Kriteria Kulit Buah Kakao

Kriteria kulit buah kakao yang dipakai adalah spesies *Theobroma cacao L.* dengan tipe kakao lindak (Forastero). Bagian yang digunakan meliputi semua bagian kulit buah kakao yang dipetik pada usia 6 bulan dengan warna kuning yang sempurna atau merata. Buah kakao yang sudah dipetik kemudian segera dikuliti dan digunakan untuk penelitian dengan jangka waktu tidak lebih dari seminggu supaya tetap segar.

#### 2. Prosedur Ekstraksi

Buah kakao sebanyak 5 kg dibersihkan dari kotoran yang menempel lalu dikupas. Kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) dipotong dan dijemur sampai kering selanjutnya dilakukan penyerutan sampai terbentuk serutan-serutan halus. Hasil serutan diblender hingga mendapatkan serbuk halus dan ditimbang. 100 gram bubuk kulit buah kakao dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 700 ml larutan aseton 70% dan 300 ml akuades, kemudian diaduk sampai homogen dan

dimasukkan ke dalam *waterbath shaker* dengan suhu 50°C selama 20 menit. Larutan ekstrak dipisahkan dari supernatannya dengan cara menyentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 10 menit. Larutan ekstrak kemudian dimasukkan ke dalam rotavapor, setelah itu dipindahkan ke dalam cawan petri dan dimasukkan ke dalam oven. Cawan petri dikeluarkan dari oven, kemudian bagian yang kental yang berada di dasar cawan petri diambil dan diletakkan di gelas kimia (Wissam, 2013).

### 3. Pemurnian Proantosianidin dengan metode HPLC-MS

Sampel proantosianidin yang sudah dilarutkan diinjeksikan ke dalam kolom kromatografi dengan menggunakan syringe khusus dengan volume yang ditampung sebanyak 0,2 ml dan dialirkan dengan menggunakan pompa. Sampel yang masuk ke dalam kolom akan didorong oleh fase gerak sehingga zat-zat yang terkandung dalam sampel akan dianalisis dan bereaksi dengan fase diam. Kemudian detektor akan membaca dan hasil akan dikeluarkan dalam bentuk grafik (Murningsih dan Chairul, 2000).

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

Aquades 96 ml diukur dengan labu ukur dan dituangkan ke dalam lumpang. Kemudian 4 gram CMC-Na diukur dengan timbangan analitik dan dimasukkan ke dalam lumpang yang berisi aquades. Diamkan sekitar 10-15 menit, aduk hingga mengembang dan digerus hingga membentuk gel berwarna kuning. Timbang campuran CMC-Na dan aquades yang sudah menjadi gel sebanyak 45 gram dan ekstrak proantosianidin kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) 100% sebanyak 5 gram, lalu masukkan ke dalam lumpang dan digerus hingga homogen untuk mendapatkan gel ekstrak proantosianidin kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) dengan sebesar 100 mg/ml.



### 3.7.6 Pembuatan Media Kultur *Porphyromonas gingivalis*

Pertama dilakukan pembuatan media kultur *P. gingivalis*, yaitu dengan BHI-A yang diperkaya hemin dan vitamin K. Pembuatannya dibutuhkan *hemin solution* sebanyak 50 µl, vitamin K 10 µl, ekstrak *yeast* 500 µl, dan BHI-A sebanyak 3,7 gram dalam 100 ml akuades steril yang dicampur pada tabung *erlenmeyer* kemudian dihomogenkan. Selanjutnya, tabung ditutup menggunakan kapas dan disterilkan pada *autoclave* dengan suhu 121<sup>0</sup> selama 15 menit. Media tersebut dibagi empat, masing-masing 25 ml lalu dimasukkan ke dalam *petridish* tidak bersekat lalu ditunggu sampai padat. Satu *ose P. gingivalis* jenis ATCC 33277 murni diinokulasi pada masing-masing *petridish* kemudian diinkubasi selama 2x24 jam (Fitriyana dkk., 2013).

### 3.7.7 Prosedur Perlakuan

Kelompok kontrol negatif dan perlakuan diinjeksi dengan 0,05 ml *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 hidup dengan konsentrasi 2x10<sup>9</sup> CFU/ml pada margin gingiva bagian mesial gigi molar pertama rahang atas regio kanan. Injeksi diulang setiap 3 hari sekali selama 2 minggu (Ermawati, 2015). Setelah diperoleh model tikus periodontitis, selanjutnya mengaplikasikan gel plasebo untuk kelompok kontrol dan gel ekstrak proantosianidin kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) sebanyak 100 mg/ml untuk kelompok perlakuan setiap hari selama 7 dan 14 hari serta dilakukan pengambilan jaringan gingiva pada hari ke-7 dan ke-14. Gel plasebo dan gel ekstrak proantosianidin kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) sebanyak 100 mg/ml diaplikasikan pada margin gingiva bagian mesial gigi molar pertama rahang atas regio kanan menggunakan *syringe* (Ammar dkk., 2013).

### 3.7.8 Pembuatan Sediaan Histologis

#### 1. Pengambilan sampel untuk sediaan

Pengambilan sampel dilakukan dengan cara melakukan pemotongan rahang atas regio kanan bagian posterior dari bagian mesial gigi molar pertama hingga distal gigi molar kedua atau ketiga. Untuk pembuatan preparat jaringan



diambil dengan arah transversal. Setelah itu sampel dimasukkan ke dalam buffer formalin selama 24 jam agar jaringan yang akan diamati tidak rusak.

## 2. Dekalsifikasi

Dekalsifikasi dengan tujuan untuk melepaskan bahan anorganik dalam tulang tanpa merusak protein yang ada. Dekalsifikasi ini dilakukan dengan memakai larutan formalin 10% selama 7 hari atau hingga jaringan keras (tulang) dapat ditembus dengan jarum tanpa hambatan.

## 3. Pemrosesan jaringan

Setelah proses dekalsifikasi lengkap, maka dilanjutkan dengan pemrosesan jaringan yang berfungsi untuk mempersiapkan jaringan sebelum dilakukan penyayatan dengan mikrotom. Pemrosesan jaringan meliputi beberapa prosedur, yaitu:

### a. Dehidrasi

Dehidrasi merupakan penarikan air dari dalam jaringan yang sudah dicelupkan kedalam larutan formalin dengan menggunakan alkohol dengan konsentrasi rendah ke tinggi (bertingkat). Tahapan dehidrasi antara lain menggunakan alkohol 70% selama 15 menit, alkohol 80% selama 1 jam, alkohol 95% selama 2 jam, alkohol 95% selama 1 jam, dan alkohol 96% selama 1 jam yang diulang sebanyak 3 kali.

### b. Clearing

Clearing merupakan proses penjernihan jaringan dari alkohol sebelum jaringan ditanam dalam paraffin dengan menggunakan bahan-bahan, antara lain xylol, toluen dan benzen. Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember menggunakan xylol. Tahapan clearing antara lain menggunakan xylol I selama 1 jam, xylol II selama 2 jam dan xylol III selama 2 jam.

### c. Impregnasi

Impregnasi merupakan proses infiltrasi bahan *embedding* ke dalam jaringan pada suhu 56°-58°C sebagai penyangga sediaan agar dapat dilakukan

penyimpanan dengan cara jaringan dibungkus menggunakan kertas saring yang sudah diberi label, kemudian dimasukkan ke dalam paraffin cair (TD 56°-58°C). Tahapan impregnasi antara lain menggunakan paraffin 1 selama 2 jam, paraffin 2 selama 2 jam dan paraffin 3 selama 2 jam.

d. Penanaman dalam paraffin (*Embedding*)

Merupakan proses penanaman jaringan ke dalam suatu bahan *embedding*, yaitu paraffin. Tahapan *Embedding* antara lain menggunakan base mole yang terbuat dari logam berbentuk siku-siku disusun diatas permukaan kaca. Base mole diolesi gliserin untuk mempermudah pemisahan alat cetak dengan blok paraffin yang sudah beku. Paraffin lalu dituangkan ke dalam base mole hingga penuh kemudian jaringan ditanam pada posisi sedemikian rupa sehingga didapatkan penampang jaringan dengan arah pemotong secara koronal dan dibiarkan membeku. Selanjutnya, blok paraffin dapat dikeluarkan dan dapat dilakukan penyayatan.

e. Penyayatan Jaringan

Penyayatan menggunakan alat mikrotom, sebelumnya bersihkan pisau mikrotom dengan kasa/ kertas saring yang telah dibasahi dengan xylol dengan arah tegak lurus. Ketebalan sayatan mikrotom diatur menjadi sebesar 4 mikron. Sayatan yang telah diperoleh diambil dengan kuas kemudian sayatan diletakkan diatas permukaan air *waterbath* dengan temperatur 56°-60°C hingga sayatan mekar. Sayatan yang sudah mekar diambil menggunakan *object glass* yang telah diolesi dengan *meyer egg albumin*. Selanjutnya dikeringkan dengan *slide warmer* minimal 12 jam suhu 30°-35°C.

4. Pewarnaan *Immunohistochemical (IHC)*

Pewarnaan IHC diawali dengan deparafinisasi dan rehidrasi preparat jaringan. Preparat jaringan lalu diinkubasi dengan hidrogen peroksida selama 10-15 menit. Cuci preparat jaringan dengan *Phosphat Buffer Saline (PBS)* sebanyak 2 kali. Tetesi pada preparat jaringan dengan *Super Block (Blue cap)* lalu inkubasi selama 5-10 menit pada suhu ruang. Preparat jaringan lalu dicuci dengan

*Phosphat Buffer Saline (PBS)* sebanyak 1 kali. Setelah dicuci, preparat jaringan ditetesi dengan antibodi primer. Cuci lagi preparat jaringan dengan *Phosphat Buffer Saline (PBS)* sebanyak 4 kali. Tetesi preparat jaringan dengan *Biotinylated Link Antibody (yellow cap)* lalu inkubasi selama 15-20 menit pada suhu ruang. Cuci lagi preparat jaringan dengan *Phosphat Buffer Saline (PBS)* sebanyak 4 kali. Tetesi preparat jaringan dengan *Streptavidin/HRP label (red cap)* lalu inkubasi selama 20 menit pada suhu ruang. Cuci preparat jaringan dengan *Phosphat Buffer Saline (PBS)* sebanyak 4 kali. Beri 4 tetes (200 µl) DAB Kromogen ke DAB Substrat, campur dan aduk, lalu tambahkan ke preparat jaringan dan inkubasi selama 5-15 menit. Cuci preparat jaringan dengan *Phosphat Buffer Saline (PBS)* sebanyak 4 kali. Preparat jaringan diberi aquadest pada selama 5 menit, *hematoxilin* selama 1 menit dan aquadest selama 10 menit. Setelah itu, dehidrasi preparat jaringan dengan alkohol bertingkat. Kemudian lakukan clearing dengan xylol yang dilanjutkan dengan mounting preparat jaringan dan terakhir slide ditutup dengan *coverslip*.

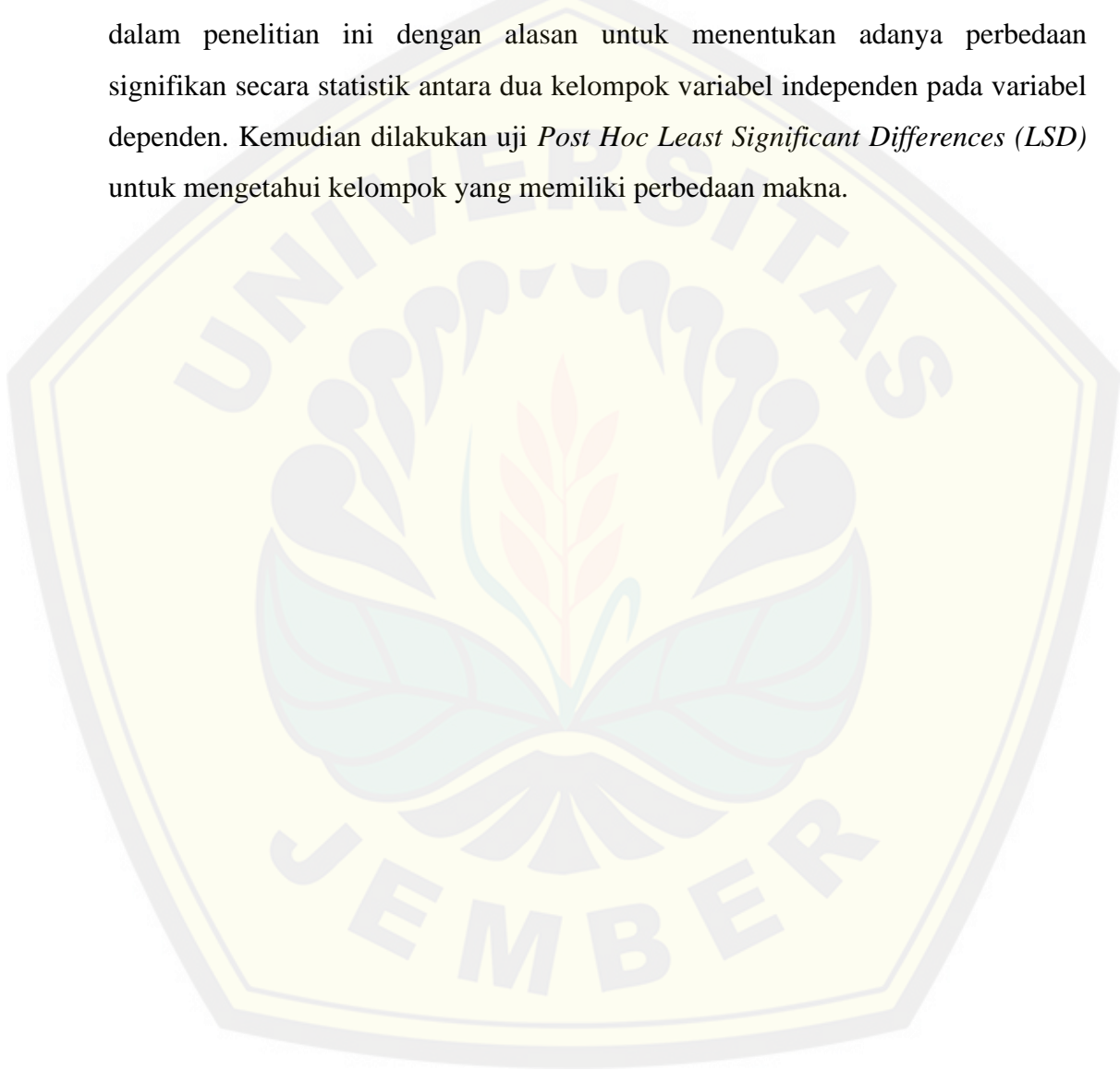
### 3.8 Tahap Pengamatan MMP-8

Data penelitian diperoleh dari pengamatan sediaan histologis dari tiap kelompok. Analisis ekspresi MMP-8 pada jaringan gingiva dilakukan pada hari ke-7 dan 14. Pengamatan dilakukan oleh satu orang menggunakan mikroskop binokuler dengan pembesaran 100X dan bantuan *Optilab* lalu dianalisis dengan *software Immunoratio*. Ekspresi MMP-8 diamati pada sampel tersebut berdasarkan warna kecoklatan yang timbul akibat pewarnaan dengan metode *IHC* dan hasilnya ditetapkan berdasarkan persentase yang muncul dari *software Immunoratio*.

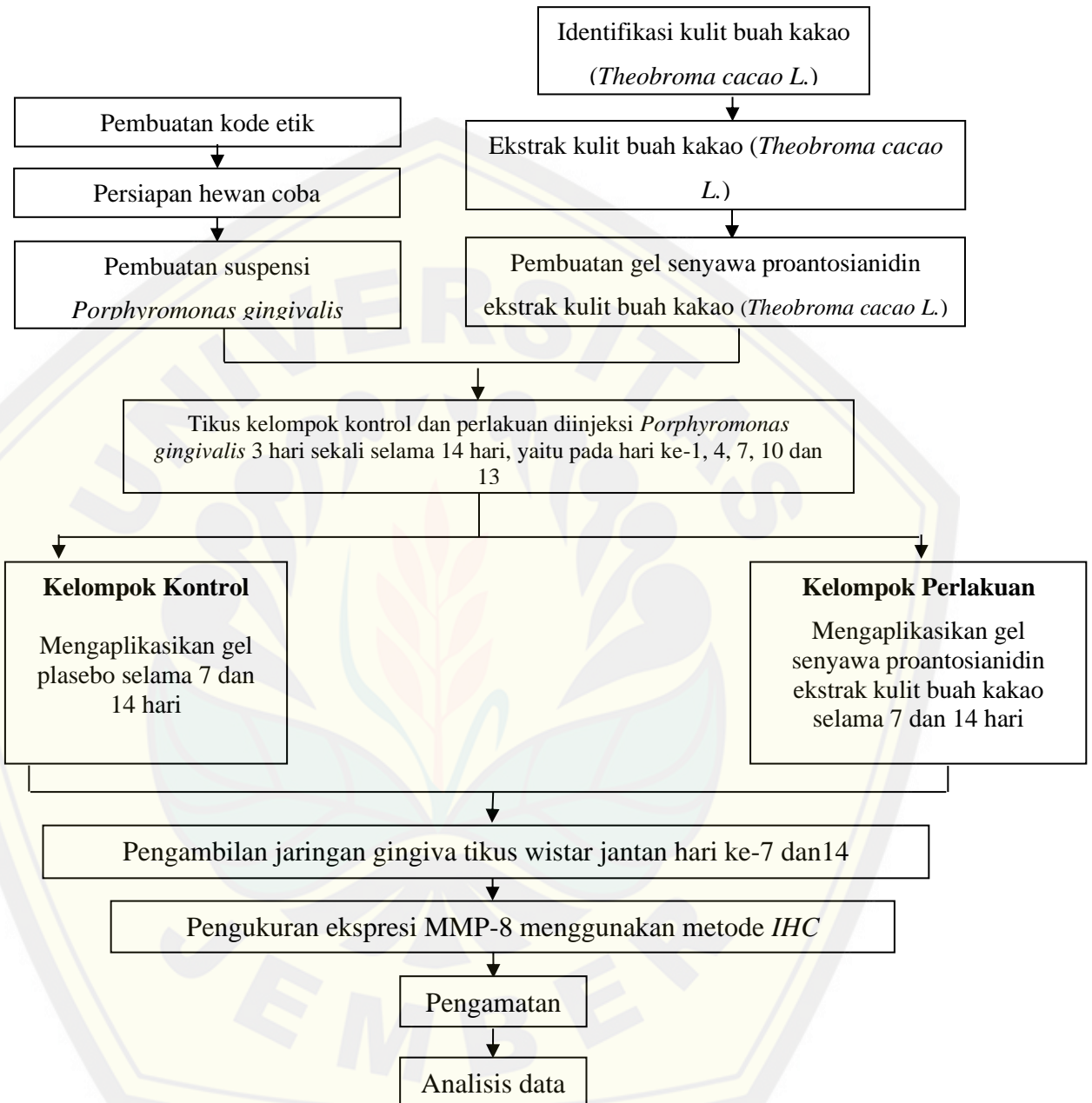
Hasil persentase dari tiap kelompok sampel lalu dijumlah dan dirata-rata untuk mengetahui adanya perbedaan ekspresi MMP-8 pada tiap kelompok sampel. Kemudian, hasil persentase dari tiap sampel diinterpretasikan kedalam bentuk skor yang disebut "*Quickscore*" (0-4%; 1 = negatif, 5-19%; 2 = *very low*, 20-39%; 3 = *low*, 40-59%; 4 = *moderate*, 60-79%; 5 = *high*, 80-100%; 6 = *very high*) (Fedchenko, 2014).

### 3.9 Analisis Data

Data yang telah diperoleh dilakukan uji normalitas dengan test *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas dengan *Levene Test*. Oleh karena data yang diperoleh berupa data yang normal dan homogen maka analisa data dapat menggunakan uji parametrik, yaitu *One-way ANOVA*. Uji parametrik *One-way ANOVA* digunakan dalam penelitian ini dengan alasan untuk menentukan adanya perbedaan signifikan secara statistik antara dua kelompok variabel independen pada variabel dependen. Kemudian dilakukan uji *Post Hoc Least Significant Differences (LSD)* untuk mengetahui kelompok yang memiliki perbedaan makna.



### 3.10 Alur Penelitian





## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa ekstrak proantosianidin kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) dapat memberi efek menurunkan ekspresi MMP-8 pada jaringan gingiva tikus model periodontitis.

### 5.2 Saran

1. Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai variasi konsentrasi gel ekstrak proantosianidin kulit buah kakao untuk mendapatkan konsentrasi yang paling efektif dalam menurunkan ekspresi MMP-8 pada jaringan gingiva model tikus periodontitis.
2. Perlu adanya tambahan waktu pengamatan untuk mendapatkan hasil yang lebih efektif terhadap penurunan ekspresi MMP-8 pada jaringan gingiva model tikus periodontitis.

## DAFTAR PUSTAKA

- Afrianti. 2018. Analisis Faktor Risiko Kejadian Penyakit Periodontal Pada Usia Dewasa Muda (20-44 Tahun) Di Puskesmas Poasia Kota Kendari Tahun 2017. Kendari: Jimkesmas (Jurnal Ilmiah Mahasiswa Kesehatan Masyarakat), 3(2), ISSN 2502-731X
- Alfakry, Hatem. 2016. *Neutrophil Proteolytic Activation Cascades: A Possible Mechanistic Link Between Chronic Periodontitis And Coronary Heart Disease*. New York: Sage Pub, *Innate Immunity*, 22(1): 85–99
- Alibasyah, Zulfan M. 2016. Potensi Antibakteri Ekstrak Jahe (*Zingiber Officinale Roscoe*) Terhadap *Porphyromonas Gingivalis* Secara *In Vitro*. Banda Aceh: Dent Soc, 1(2): 147-152, E-ISSN : 2502-0412
- Ammar, E.S.M., S.A. Said, S.L. El-Damarawy, dan G.M. Suddek. 2013. *Cardioprotective Effect of Grape-Seed Proanthocyanidins on Doxorubicin-Induced Cardiac Toxicity in Rats*. Britania Raya: Taylor & Francis, *Pharmaceutical Biology*. 51(3): 339–344.
- Anajafi, Tayebbeh. 2017. *Naturally Occurring Matrix Metalloproteinase Inhibitors: A Group of Promising Cardioprotective Agents*. Singapura: *Cardioprotective Natural Products*, Downloaded from [www.worldscientific.com](http://www.worldscientific.com), Chapter 2, 9-46
- Anwar, Ayub I. 2018. Hubungan Antara Status Periodontal Dan Status Gigi Geligi Usia Dewasa Masyarakat Kelurahan Malino Kabupaten Gowa. Makassar: *Cakradonya Dent J*; 10(2): 71-77
- Arabaci. Taner. 2010. *Immunohistochemical and Stereologic Analysis of NF- $\kappa$ B Activation in Chronic Periodontitis*. Erzurum: *European Journal of Dentistry*, Vol.4: 459-461
- Arifin, Arfina S. 2019. Aktivitas Antioksidan pada Beras Berpigmen dan Dampaknya terhadap Kesehatan. Bogor: *Jurnal Pangan*, 28(1): 11 – 22
- Asykarie, Ichda N. 2017. Kontrol Kualitas Poli Gigi Di RS PKU Muhammadiyah Delanggu Menggunakan Analisa Swot. Surakarta: *Jurnal Ilmu Kedokteran Gigi*, 1(1)

- Aydin, Suleyman. 2015. *A Short History, Principles, And Types Of ELISA, And Our Laboratory Experience With Peptide/Protein Analyses Using ELISA*. Amsterdam: Elsevier, Peptides 72: 4–15
- Balalaie, Azadeh. 2018. *Dual Function Of Proanthocyanidins As Both MMP Inhibitor And Crosslinker In Dentin Biomodification: A Literature Review*. Teheran: Dental Materials Journal 2018; 37(2): 173–182, doi:10.4012/dmj.2017-062 JOI JST.JSTAGE/dmj/2017-062
- Blade, Cinta. 2016. *Review Article: Proanthocyanidins in health and disease*. Tarragona: Bio Factors, International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 42(1): 5–12
- Bostanci dan Belibasakis. 2018. *Gingival Crevicular Fluid And Its Immune Mediators In The Proteomic Era*. Singapura: John Wiley & Sons Ltd, Periodontology 2000, Vol. 76: 68–84
- Daniel, W. W. 2008. *Biostatic: A Foundation for Analysis in the Health Sciences*. 8th ed. Georgia Widley.
- Dhalla, Naranjan. 2014. *Mechanisms Of Subcellular Remodeling In Heart Failure Due To Diabetes*. Berlin: Springer, Heart Fail Rev, DOI 10.1007/s10741-013-9385-8
- Dipahayu, Damaranie. 2018. Karakteristik Fisika Masker Gel Peel Off dan Krim Wajah dengan Kandungan Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao, L.*) Sebagai Antioksidan Topikal. Surabaya: Journal of Pharmacy and Science, 3(2), P-ISSN : 2527-6328, E-ISSN : 2549-3558
- Duarte, Sergio. 2015. *Matrix Metalloproteinases In Liver Injury, Repair And Fibrosis*. Amsterdam: Elsevier, <http://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2015.01.004>
- Dwipriastuti, Devi. 2017. Perbedaan Efektivitas Chlorhexidine Glukonat 0,2% Dengan Teh Hijau (*Camellia Sinensis*) Terhadap Jumlah *Porphyromonas Gingivalis*. Semarang: ODONTO Dental Journal. 4(1), DOI: <http://dx.doi.org/10.30659/odj.4.1.50-54>

- Fauzi, Afifah R. 2016. Kesan Perencanaan Madu Gelam terhadap Kehilangan Tulang pada Tikus Periodontitis. Malaysia: Sains Malaysiana 45(12), 1923–1930
- Fedchenko, Nickolay. 2014. *Different Approaches for Interpretation and Reporting of Immunohistochemistry Analysis Results in the Tissue – a Review*. London: BioMed Central, Diagnostic Pathology, 9:221, 1-12
- Fitriyana, dkk. 2013. Pemaparan Bakteri *Porphyromonas Gingivalis* Mempengaruhi Produksi Superoksid Netrofil. Jember: Dentofasial, 12(3): 152-158, ISSN: 1412-8926
- Franco, Cavalla. 2017. *Matrix Metalloproteinases as Regulators of Periodontal Inflammation*. Maryland: NCBI, Int. J. Mol. Sci., 18, 440; doi:10.3390/ijms18020440
- Grenier, Daniel. 2011. *Proteases of Porphyromonas gingivalis as Importance Virulence Factors in Periodontal Disease and Potential Targets for Plant-Derived Compounds: A Review Article*. Quebec: Bentham Science Publishers, Ltd., Current Drug Targets, 12(3): 322-331
- Guo, J. 2017. *MMP-8-Responsive Polyethylene Glycol Hydrogel for Intraoral Drug Delivery*. New York: Sage Pub, Journal of Dental Research 00(0), <https://doi.org/10.1177/00220345198319>
- Gupta, Namita. 2014. *Role Of Salivary Matrix Metalloproteinase-8 (MMP-8) In Chronic Periodontitis Diagnosis*. Berlin: Front. Med. 2015, 9(1): 72–76, DOI 10.1007/s11684-014-0347-x
- Gursoy, Ulvi K. 2010. *Salivary MMP-8, TIMP-1, And ICTP As Markers Of Advanced Periodontitis*. Berlin: Researchgate, J Clin Periodontol 2010; 37: 487–493 doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01563.x
- Gursoy, Ulvi K. 2018. *Molecular Forms and Fragments of Salivary MMP-8 in Relation to Periodontitis*. Berlin: Researchgate, Journal of Clinical Periopathology, 45(12), doi: 10.1111/jcpe.13024
- Hikmah, Nuzulul. 2013. Peran Rankl Pada Proses Resorpsi Tulang Alveolar Kondisi Diabetes. Jember: Stomatognatic (J. K. G Unej), 10(3): 105-109



- How, Kah Yan. 2016. *Porphyromonas gingivalis: An Overview of Periodontopathic Pathigen below the Gum*. Malaysia: Frontiers in Microbiology, Vol.7, doi:10.3389/fmicb.2016.00053
- Hu, Yan. 2017. *Expressions and Significance of Metalloproteinase and Collagen in Vaginal Wall Tissues of Patients with Pelvic Organ Prolapse*. Shenzhen: Association of Clinical Scientists, Inc., Annals of Clinical and Laboratory Science, 47(6)
- Irie, Koichiro. 2015. *Impact of Oral Commensal Bacteria on Degradation of Periodontal Connective Tissue in Mice*. Okayama: J Periodontol, 86(7)
- Jakubowska, Katarzyna. 2016. *Expressions of Matrix Metalloproteinases (MMP-2, MMP-7, and MMP-9) and Their Inhibitors (TIMP-1, TIMP-2) in Inflammatory Bowel Diseases*. London: Hindawi, Article ID 2456179, 7 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2456179>
- Ji. 2015. *Bacterial Invasion And Persistence: Critical Events In The Pathogenesis Of Periodontitis*. Singapura: John Wiley & Sons Ltd, J Periodont Res; 50: 570–585, doi:10.1111/jre.12248
- Jun, Ji Hyung. 2018. *Proanthocyanidin Subunit Composition Determined By Functionally Diverged Dioxygenases*. London: Nature Research Journal, <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0292-9>
- Jusmiati. 2015. *Aktivitas Antioksidan Kulit Buah Kakao Masak Dan Kulit Buah Kako Muda*. Samarinda: Jurnal Sains dan Kesehatan, 1(1), p-ISSN: 2303-0267, e-ISSN: 2407-6082
- Kanzaki, Hiroyuki. 2017. *Pathways that Regulate ROS Scavenging Enzymes, and Their Role in Defense Against Tissue Destruction in Periodontitis*. United States: Frontiers in Physiology, Volume 8, Article 351, doi: 10.3389/fphys.2017.00351
- Kapoor, Charu. 2016. *Seesaw Of Matrix Metalloproteinases (MMPS)*. Pradesh: Journal of Cancer Research and Therapeutics, 12(1), DOI: 10.4103/0973-1482.157337
- Kartika, Ronald W. 2015. *Perawatan Luka Kronis dengan Modern Dressing*. Jakarta: Wound Care/Diabetic Center, CDK-230, 42(7)



- Kongor, John E. 2016. *Factors Influencing Quality Variation In Cocoa (Theobroma Cacao) Bean Flavour Profile — A Review*. Amsterdam: Elsevier, Food Research International 82: 44–52
- Kundalic, Jasen. 2016. *Oxidative Stress In The Pathogenesis Of Periodontal Disease*. Serbia: Acta Medica Medianae 2016, 55(4), doi:10.5633/amm.2016.0409
- Kurniawaty, Evi. 2016. Pengaruh Konsumsi Bluberi (*Vaccinium cyanococcus*) Terhadap Penurunan Oksidasi LDL sebagai Pengobatan untuk Penyakit Jantung Koroner. Bandar Lampung: Majority, 5(3)
- La. 2009. *Cranberry Proanthocyanidins Inhibit MMP Production and Activity*. New York: Sage Pub, J Dent Res 88(7), DOI: 10.1177/0022034509339487
- Lagha, Amel Ben. 2015. *Wild Blueberry (Vaccinium Angustifolium Ait.) Polyphenols Target Fusobacterium Nucleatum And The Host Inflammatory Response: Potential Innovative Molecules For Treating Periodontal Diseases*. Canada: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63(31), 6999–7008., doi:10.1021/acs.jafc.5b01525
- Lainas, Katherine. 2016. *Effects Of Roasting On Proanthocyanidin Contents Of Turkish Tombul Hazelnut And Its Skin*. Amsterdam: Elsevier, Journal of Functional Foods 23: 647–653
- Landen, Ning Xu. 2016. *Transition From Inflammation To Proliferation: A Critical Step During Wound Healing*. Berlin: Springer, Cellular and Molecular Life Sciences, 73:3861–3885, DOI 10.1007/s00018-016-2268-0
- Leininger, Joel R. 2018. *Oral Cavity, Teeth And Gingiva*. Amsterdam: Boorman's Pathology of the Rat, Elsevier, 15-21, Chapter 4, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-391448-4.00004-6>
- Linajari, Listika M. 2016. Pengaruh Pemberian Air Beluntas Terhadap Kadar Asam Urat Pada Wanita Menopause. Kediri: Jurnal Care Vol. 4, No.1
- Liu, Yi. 2015. *Tc-MYBPA Is An Arabidopsis TT2-Like Transcription Factor And Functions In The Regulation Of Proanthocyanidin Synthesis In*

- Theobroma Cacao*. Berlin: BMC Plant Biology (2015) 15:160, DOI 10.1186/s12870-015-0529-y
- Mantyla. 2003. *Gingival Crevicular Fluid Collagenase-2 (MMP-8) Test Stick For Chair-Side Monitoring Of Periodontitis*. Singapura: John Wiley & Sons Ltd, J Periodont Res 2003; 38; 436–439, ISSN 0022-3484
- Mester, Alexandru. 2019. *Periodontal Disease May Induce Liver Fibrosis in an Experimental Study on Wistar Rats*. Romania: American Academy of Periodontology, Journal of Periodontology, DOI 10.1002/JPER.18-0585, ISSN 1943-3670
- Meyle, Joerg. 2015. *Molecular Aspects Of The Pathogenesis Of Periodontitis*. Singapura: John Wiley & Sons Ltd, Periodontology 2000, Vol. 69, 7–17
- Mirawati, Ellis. 2017. Efektivitas Obat Kumur Yang Mengandung Cengkeh Dan *Chlorhexidine Gluconat* 0,2 % Dalam Pencegahan Pembentukan Plak. Makassar: Jurnal Media Kesehatan Gigi, 16(2), ISSN 2087-0051
- Moreira, Marina Beltrami. 2018. *Endothelium: A Coordinator of Acute and Chronic Inflammation*. Amsterdam: Elsevier, *Endothelial Dysfunction And Clinical Syndromes*, Chapter 32, 485-491, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812348-5.00032-5>
- Moutsopoulos, Niki M. 2018. *Tissue-Specific Immunity at the Oral Mucosal Barrier*. Amsterdam: Elsevier, Cell Press Review, 39(4), <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2017.08.005>
- Mulyatni, Agustin Sri. 2012. Aktivitas antibakteri ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) terhadap *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, dan *Staphylococcus aureus*. Bogor: Menara Perkebunan, 80(2), 77-84
- Murningsih dan Chairul. 2000. Mengenal HPLC: Peranannya Dalam Analisa Dan Proses Isolasi Bahan Kimia Alam. Bogor: Berita Biologi, 5(2)
- Noack, B. 2017. *Association Between Serum And Oral Matrix Metalloproteinase-8 Levels And Periodontal Health Status*. New York: WILEY Online Library, Journal of Periodontal Research, DOI: 10.1111/jre.12450

- Omar, Abdirisak A.H. 2015. *MMP-7, MMP-8, And MMP-9 In Oral And Cutaneous Squamous Cell Carcinomas*. Helsinki: Oral And Maxillofacial Pathology, 119(4)
- Partayasa, I Nyoman. 2017. Kapasitas Antioksidan Suplemen Pada Berbagai Berat Ekstrak Bubuk *Pod Husk* Kakao. Palu: e-J. Agrotekbis 5 (1): 9 - 17, ISSN : 2338-3011
- Pathak, Anukriti. 2016. *Clinical Evaluation Of Gingival Sulcus Depth In Primary Dentition By Computerized, Pressure-Sensitive Florida Probe*. Karnataka: Gulf Medical Journal, GMJ, 5(S1): S43–S51
- Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia, 2006, Panduan Lengkap Budidaya Kakao. Jakarta: Agromedia Pustaka
- Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia, 2010, Panduan Lengkap Budidaya Kakao. Jakarta: Agromedia Pustaka
- Quamilla, Nadia. 2016. Stres Dan Kejadian Periodontitis (Kajian Literatur). Banda Aceh: Dent Soc, 2016, 1 (2): 161 – 168, E-ISSN : 2502-0412
- Rai, Balwant. 2010. *Levels Of Gingival Crevicular Metalloproteinases-8 And -9 In Periodontitis*. Saudi: The Saudi Dental Journal (2010) 22, 129–131
- Ramos, J. 2014. When Tissue Antigens and Antibodies Get Along: Revisiting the Technical Aspects of Immunohistochemistry-The Red, Brown, and Blue Technique. New York: Sage Pub, Veterinary Pathology, 51(1): 42-87, DOI 10.117/0300985813505879
- Rams, Thomas E. 2016. *Phenotypic Identification Of Porphyromonas Gingivalis Validated With Matrixassisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*. Amsterdam: Elsevier, Microbial Pathogenesis, doi: 10.1016/j.micpath.2016.01.021
- Rangbulla, Vanik. 2017. *Salivary IgA, Interleukin 1 $\beta$ , and MMP-8 as Salivary Biomarkers in Chronic Periodontitis Patients*. Panchkulla: The Chinese Journal of Dental Research, 20(1), 43-51
- Robbihi, Hilmy Ila. 2018. *Path Analysis: The Effect of Smoking on the Risk of Periodontal Disease*. Surakarta: Indonesian Journal of Medicine, 3(2): 99-109, e-ISSN: 2549-0265

- Robert, Sacha. 2016. *Involvement Of Matrix Metalloproteinases (Mmps) And Inflammasome Pathway In Molecular Mechanisms Of Fibrosis*. Portland: Portland Press, Biosci. Rep., doi 10.1042/BSR20160107
- Robiyan, Rendi. 2014. Persepsi Petani Terhadap Program SI-Pht Dalam Meningkatkan Produktivitas Dan Pendapatan Usaha Tani Kakao (Studi Kasus Petani Kakao di Desa Sukoharjo 1 Kecamatan Sukoharjo Kabupaten Pringsewu). Bandar Lampung: JIIA, 2(3)
- Rosniati dan Kalsum. 2018. Pengolahan Kakao Bubuk Dari Biji Kakao Fermentasi Dan Tanpa Fermentasi Sebagai Sediaan Bahan Pangan Fungsional. Makassar: Balai Besar Industri Hasil Perkebunan, Jurnal Industri Hasil Perkebunan, 13(2): 107-116
- Sabahannur. 2016. Kajian Mutu Biji Kakao Petani Di Kabupaten Luwu Timur, Soppeng Dan Bulukumba. Makassar: Balai Besar Industri Hasil Perkebunan, Jurnal Industri Hasil Perkebunan, 11(2): 59-66
- Salma, Irfa'ina R. 2015. Kopi Dan Kakao Dalam Kreasi Motif Batik Khas Jember. Yogyakarta: Balai Besar Kerajinan dan Batik, Dinamika Kerajinan dan Batik, 33(2):63-72
- Samaranayake. 2011. *Essential Microbiology for Dentistry*, 4<sup>th</sup> Edition. Edinburgh: Churchill Livingstone.
- Sari, Dewi P. 2016. Uji Daya Hambat Ekstrak Alga Coklat (*Padina Australis Hauck*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Porphyromonas Gingivalis* Secara In Vitro. Manado: Jurnal e-GiGi (eG), 4(2)
- Sidiqa, Atia N. 2017. Efektifitas Gel Daun Sirih Merah (*Piper Crocatum*) Pada Perawatan Periodontitis Kronis. Cimahi: KARTIKA-JURNAL ILMIAH FARMASI, 5(1), 1-61, p-ISSN 2354-6565 /e-ISSN 2502-3438
- Siregar, Irma H.Y. 2015. The Effect of Paste of Sukun Leaves Extract (*Artocarpus Altilis*) towards Fibroblast cell and Collagen Tissues on Periodontitis. Semarang: Jurnal Riset Kesehatan , 4(3): 786-792
- Sorsa, Timo. 2016. *Analysis Of Matrix Metalloproteinases, Especially MMP-8, In Gingival Crevicular Fluid, Mouthrinse And Saliva For Monitoring*



- Periodontal Diseases*. Singapura: John Wiley & Sons Ltd, Periodontology 2000, Vol. 70: 142–163
- Sudirman, Putu L. 2017. Skeling Dan Terpinen-4-Ol Type 1% Menurunkan Kadar Kolagenase Lebih Banyak Daripada Skeling Dan Chlorhexidine Digluconate 0,12% Pada Periodontitis Kronis Akibat Kalkulus. Denpasar: MEDICINA, 48(1): 67-71, P-ISSN.2540-8313, E-ISSN.2540-8321
- Sugiarti, Titik. Kejadian Periodontitis Di Kabupaten Magelang. Semarang: HIGEIA Journal Of Public Health Research And Development, 1 (4), p ISSN 1475-362846, e ISSN 1475-222656
- Susilowati, 2010. Peran Matriks Metaloproteinase-8 Pada Cairan Krevikuler Gingiva Selama Pergerakan Gigi Ortodontik. Makassar: Dentofasial, 48(1): 47-54
- Takeuchi. 2017. *Intracellular Porphyromonas gingivalis Exploits Recycling Pathway to Exit from Infected Cells*. Osaka: OUKA, 61(2), 5-10
- Tani, Priskila Gabriella. 2017. Uji Daya Hambat Daging Buah Sirsak (*Annona Muricata L.*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Porphyromonas Gingivalis*. Manado: PHARMACON, Jurnal Ilmiah Farmasi, 6(3), ISSN 2302 – 2493
- Tedjasulaksana, Regina. 2016. Metronidasol Sebagai Salah Satu Obat Pilihan Untuk Periodontitis Marginalis. Denpasar: Jurnal Kesehatan Gigi, 4(1)
- Toker, H. 2018. *Morphometric And Histopathological Evaluation Of The Effect Of Grape Seed Proanthocyanidin On Alveolar Bone Loss In Experimental Diabetes And Periodontitis*. Singapura: Wiley Online Library, Periodont:1-9
- Torre, Elisa. 2018. *Potentials of Polyphenols in Bone-Implant Devices*. Portacomaro: Web of Science™ Core Collection (BKCI), <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.76319>, Chapter 4
- Trypuc, Agata J. 2016. *Matrix Metalloproteinases (Mmps), The Main Extracellular Matrix (ECM) Enzymes In Collagen Degradation, As A Target For Anticancer Drugs*. Britania Raya: Taylor & Francis, Enzyme Inhib Med Chem, 2016; 31(S1): 177–183, ISSN: 1475-6366 (print), 1475-6374 (electronic), DOI: 10.3109/14756366.2016.1161620



- Usman. 2017. Uji Fitokimia Dan Uji Antibakteri Dari Akar Mangrove *Rhizophora Apiculata* Terhadap Bakteri *Escherichia Coli* Dan *Staphylococcus aureus*. Surakarta: JKPK (Jurnal Kimia Dan Pendidikan Kimia), 2(3), 169-177, ISSN 2503-4146, ISSN 2503-4154 (online)
- Vandana, K.L. 2017. *Assessment of Gingival Sulcus Depth, Width of Attached Gingiva, and Gingival Thickness in Primary, Mixed, and Permanent Dentition*. Karnataka: Journal of Dental Research and Review, Wolters Kluwer – Medknow, 4(2)
- Vayalil, Praveen K. 2014. *Proanthocyanidins From Grape Seeds Inhibit Expression of Matrix Metalloproteinases in Human Prostate Carcinoma Cells, Which is Associated with The Inhibition of Activation of MAPK and NfKB*. Birmingham: Oxford University Press, Carcinogenesis, 25(6), 987-995, DOI 10.1093/carcin/bgh095
- Vermitia. 2018. Potensi Anggur Merah (*Vitis vinifera*) sebagai Pencegahan Aterosklerosis. Bandar Lampung: J Agromedicine, 5(1)
- Williams, Rachel. 2016. *Leptin and Pro-Inflammatory Stimuli Synergistically Upregulate MMP-1 and MMP-3 Secretion in Human Gingival Fibroblasts*. San Francisco: PLOS ONE, 11(2): e0148024, DOI:10.1371/journal.pone.0148024
- Wissam, Z., G. Bashour, W. Abdelwahed, dan W. Khayata. 2013. *Simple And Fast Method For The Extraction Of Polyphenol And The Separation Of Proanthocyanidins From Carob Pods*. SAJP. 2(5): 375-380.
- Zenobia dan Hajishengallis. 2015. *Porphyromonas Gingivalis Virulence Factors Involved In Subversion Of Leukocytes And Microbial Dysbiosis*. Philadelphia: Taylor & Francis Group, Virulence 6:3, 236—243, ISSN: 2150-5594 (Print) 2150-5608 (Online), DOI: 10.1080/21505594.2014.999567
- Zheng, Pei. 2017. *Evaluate The Effect Of Different MMPs Inhibitors On Adhesive Physical Properties Of Dental Adhesives, Bond Strength And Mmp*

*Substare Activity.* Berlin: Scientific Report, 7: 4975,  
DOI:10.1038/s41598-017-04340-1



## LAMPIRAN

Lampiran A. Surat Keterangan *Ethical Clearance*

	KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK) FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS JEMBER (THE ETHICAL COMMITTEE OF MEDICAL RESEARCH FACULTY OF DENTISTRY UNIVERSITAS JEMBER)
<b>ETHIC COMMITTEE APPROVAL</b> <u>No.440/UN25.8/KEPK/DL/2019</u>	
Title of research protocol	: "Effect Of Pod Husk Cacao Proanthocyanidin (Theobroma Cacao L.) For MMP-8 Expression In Gingival Sulcus Periodontitis Rat"
Document Approved	: Research Protocol
Principal investigator	: Anya Tania Larasati
Member of research	: -
responsible Physician	: Anya Tania Larasati
Date of approval	: May-July 27 <sup>th</sup> , 2019
Place of research	: Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
The Research Ethic Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember States That the above protocol meets the ethical principle outlined and therefore can be carried out.	
Jember, May 28 <sup>th</sup> , 2019	
 Dean of Faculty of Dentistry Universitas Jember (drg. R. Pujiardyan P. M. Kes, Sp. Pros)	 Chairperson of Research Ethics Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember (Prof. Dr. drg. Y. Dewa Ayu Ratna Dewanti, M.Si)



**Lampiran B. Surat Keterangan Identifikasi Tanaman**

Kode Dokumen : FR-AUK-064  
Revisi : 0



**KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
POLITEKNIK NEGERI JEMBER  
LABORATORIUM TANAMAN**

Jalan Mastrip Kotak Pos 164 Jember - 68101 Telp. (0331) 333532 - 333534 Fax. (0331) 333531  
E-mail : [Polije@polije.ac.id](mailto:Polije@polije.ac.id) Web Site : <http://www.Polije.ac.id>

**SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN**

No: 12/PL17.3.1.02/LL/2019

Menindaklanjuti surat dari Wakil Dekan I Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember No: 2188/UN25.8.TL/2019 perihal Permohonan Identifikasi Tanaman dan berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke Laboratorium Tanaman, Jurusan Produksi Pertanian, Politeknik Negeri Jember oleh:

Nama : Anya Tania Larasati  
NIM : 161610101040  
Jur/Fak/PT : Fakultas Kedokteran Gigi/ Universitas Jember

maka dapat disampaikan hasilnya bahwa spesimen tersebut di bawah ini (terlampir) adalah:  
*Kingdom: Plantae; Devisio: Spermatophyta; Sub Devisio: Magnoliophyta; Kelas: Magnoliopsida; Ordo: Malvales; Famili: Sterculiaceae; Genus: Theobroma; Spesies: Theobroma cacao, L.*

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 22 Mei 2019

Ka. Laboratorium Tanaman



*[Signature]*  
Iradik Mastuti, MP

NIP. 195808201987032001

## Lampiran C. Surat Izin Penelitian Laboratorium Bioscience



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
Jl. Kalimantan No. 37 Jember, (0331) 333536, Fak. 331991

Nomor : 1705/UN25.8.TL/2019  
Perihal : Ekstraksi Kulit Buah Kakao

16 APR 2019

Kepada Yth  
Direktur Rumah Sakit Gigi dan Mulut  
Universitas Jember  
Di Jember

Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan skripsi, maka dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk melakukan ekstraksi kulit buah kakao yang digunakan sebagai objek penelitian bagi mahasiswa kami dibawah ini:

- |    |                        |                                                                                                                                                              |
|----|------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1  | Nama                   | : Anya Tania Larasati                                                                                                                                        |
| 2  | NIM                    | : 161610101040                                                                                                                                               |
| 3  | Semester/Tahun         | : 2018/2019                                                                                                                                                  |
| 4  | Fakultas               | : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember                                                                                                                |
| 5  | Alamat                 | : Jl. Letjend. Suprpto XVIII/48 Jember                                                                                                                       |
| 6  | Judul Penelitian       | : Efek Ekstrak Proantosianidin Kulit Buah Kakao ( <i>Theobroma cacao L.</i> ) terhadap Ekspresi MMP-8 pada Jaringan Sulkus Gingiva Model Tikus Periodontitis |
| 7  | Lokasi Penelitian      | : Laboratorium Bioscience Rumah Sakit Gigi dan Mulut Universitas Jember                                                                                      |
| 8  | Data/alat yg di pinjam | : -                                                                                                                                                          |
| 9  | Waktu                  | : April 2019 s/d Selesai                                                                                                                                     |
| 10 | Tujuan Penelitian      | : Untuk menganalisis ef- <i>k</i> ekstrak proantosianisin kulit buah kakao terhadap penurunan MMP-8 pada jaringan sulkus gingiva model tikus periodontitis   |
| 11 | Dosen Pembimbing       | : 1. drg. Yani Corvianindya Rahayu M.KG.<br>: 2. drg. Agustin Wulan Suci D. MDSc.                                                                            |

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih



Dekan  
Wakil Dekan I  
**Dr. drg. IBA Susilawati, M.Kes**  
NIP.196109031986022001



## Lampiran D. Surat Izin Penelitian Laboratorium Histologi



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
Jl. Kalimantan No. 37 Jember ☎(0331) 333536, Fak. 331991

Nomor : 5789/UN25.8.TL/2019

Perihal : Izin Penelitian Gel Proantosiandin Ekstrak Kulit Buah Kakao

12 SEP 2019

Kepada Yth  
Kepala Bagian Laboratorium Histologi  
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember  
Di Jember

Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan izin penelitian menguji senyawa proantosiandin ekstrak kulit buah kakao bagi mahasiswa kami dibawah ini:

- 1 Nama : Anya Tania Larasati
- 2 NIM : 161610101040
- 3 Semester/Tahun : 2019/2020
- 4 Fakultas : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
- 5 Alamat : Jl. Letjend. Suprpto XVIII/48 Jember
- 6 Judul Penelitian : Analisis Senyawa Proantosiandin Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*) terhadap Ekspresi MMP-8 pada Jaringan Gingiva Model Tikus Periodontitis.
- 7 Lokasi Penelitian : Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
- 8 Data/alat yg di pinjam : Mikroskop, alkohol, xylol, haematoxilin, dll.
- 9 Waktu : September 2019 s/d Selesai
- 10 Tujuan Penelitian : Untuk menguji senyawa proantosiandin kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) terhadap ekspresi MMP-8 pada jaringan gingiva model tikus periodontitis.
- 11 Dosen Pembimbing : 1. drg. Yani Corvianindya, M.KG  
2. drg. Agustin Wulan Suci D., M.DSc

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih

an. Dekan  
Wakil Dekan I,



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

## Lampiran E. Data Hasil Perhitungan dengan pewarnaan IHC

Kelompok	Ekspresi MMP-8		
	Hewan Coba	Hasil Persentase dari <i>Immunoratio</i>	Total
Kontrol Hari ke-7	1	52%	47.25%
	2	44%	
	3	45%	
	4	48%	
Kontrol Hari ke-14	1	66%	55.75%
	2	67%	
	3	44%	
	4	46%	
Perlakuan Hari ke-7	1	41%	39.50%
	2	40%	
	3	38%	
	4	39%	
Perlakuan Hari ke-14	1	36%	36.50%
	2	38%	
	3	37%	
	4	35%	

**Lampiran F. Data Hasil Penelitian**Uji Normalitas (*Shapiro-Wilk*)

		Tests of Normality					
		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	KELOMPOK	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
TUJUH	1	.234	4	.	.928	4	.584
	2	.151	4	.	.993	4	.972
EMPATBELAS	1	.278	4	.	.943	4	.676
	2	.151	4	.	.993	4	.972

a. Lilliefors Significance Correction

Uji Homogenitas (*Levene Test*)**Test of Homogeneity of Variances**

		Levene			
		Statistic	df1	df2	Sig.
JUMLAH RATA-RATA	Based on Mean	2.636	3	12	.098
	Based on Median	1.945	3	12	.176
	Based on Median and with adjusted df	1.945	3	3.456	.281
	Based on trimmed mean	2.509	3	12	.108

Uji *One-Way ANOVA***ANOVA**

## JUMLAH RATA-RATA








	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	891.500	3	297.167	9.062	.002
Within Groups	393.500	12	32.792		
Total	1285.000	15			

## Uji Post Hoc LSD








Multiple Comparisons						
Dependent Variable: JUMLAH RATA-RATA						
LSD						
(I) KELOMPOK	(J) KELOMPOK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
KELOMPOK KONTROL NEGATIF HARI KE-7	KELOMPOK KONTROL NEGATIF HARI KE-14	-8.500	4.049	.058	-17.32	.32
	KELOMPOK PERLAKUAN HARI KE-7	7.750	4.049	.080	-1.07	16.57
	KELOMPOK PERLAKUAN HARI KE-14	10.750*	4.049	.021	1.93	19.57
KELOMPOK KONTROL NEGATIF HARI KE-14	KELOMPOK KONTROL NEGATIF HARI KE-7	8.500	4.049	.058	-.32	17.32
	KELOMPOK PERLAKUAN HARI KE-7	16.250*	4.049	.002	7.43	25.07
	KELOMPOK PERLAKUAN HARI KE-14	19.250*	4.049	.000	10.43	28.07
KELOMPOK PERLAKUAN HARI KE-7	KELOMPOK KONTROL NEGATIF HARI KE-7	-7.750	4.049	.080	-16.57	1.07
	KELOMPOK KONTROL NEGATIF HARI KE-14	-16.250*	4.049	.002	-25.07	-7.43
	KELOMPOK PERLAKUAN HARI KE-14	3.000	4.049	.473	-5.82	11.82
KELOMPOK PERLAKUAN HARI KE-14	KELOMPOK KONTROL NEGATIF HARI KE-7	-10.750*	4.049	.021	-19.57	-1.93
	KELOMPOK KONTROL NEGATIF HARI KE-14	-19.250*	4.049	.000	-28.07	-10.43
	KELOMPOK PERLAKUAN HARI KE-7	-3.000	4.049	.473	-11.82	5.82

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

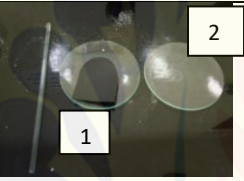
**Lampiran G. Alat dan Bahan Ekstraksi****a. Alat dan Bahan Ekstraksi**

<b>Gambar</b>	<b>Keterangan</b>
	Timbangan
	Oven
	Cawan porselen
	Sentrifuge
	Pengaduk kaca
	Erlenmeyer
	Falcon tube

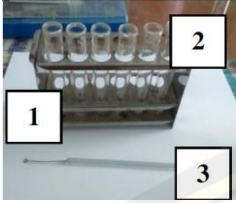







	Gelas ukur
	Rotavapor
	Water bath shaker
	Corong <i>buchner</i>
	Kulit buah kakao ( <i>Theobroma cacao</i> L.)
	Aseton
	Aquades

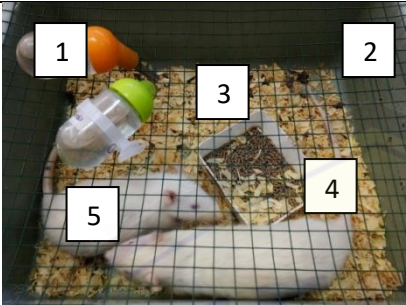

**b. Alat dan Bahan Pembuatan Gel**

Gambar	Keterangan
	Timbangan
	1. Pestle 2. Mortar
	1. Pengaduk kaca 2. Gelas arloji
	Tempat gel ekstrak
	CMC-Na
	Aquades

## c. Alat Kultur

Gambar	Keterangan
	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Tabung Reaksi</li><li>2. Rak Tabung Reaksi</li><li>3. Ose</li></ol>
	<i>Autoclave</i>
	Inkubator
	Petridish tidak bersekat
	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Spektrometrik</li><li>2. <i>Vibrator</i></li></ol>
	Spektrofotometer

**d. Alat dan Bahan Pemeliharaan Hewan Coba**




Gambar	Keterangan
	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Tempat minum</li><li>2. Kandang</li><li>3. Sekam</li><li>4. Tempat makan</li><li>5. Tikus</li></ol>
	Timbangan



## e. Alat dan Bahan Pengambilan Jaringan Gingiva


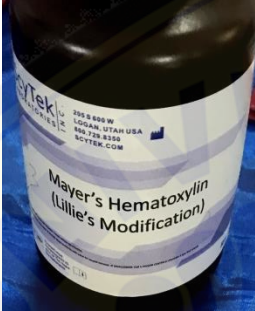
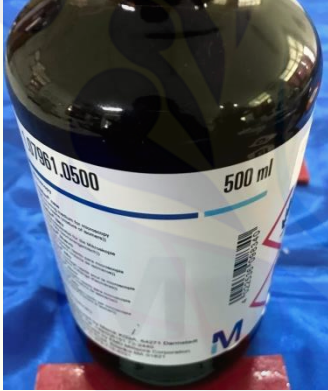
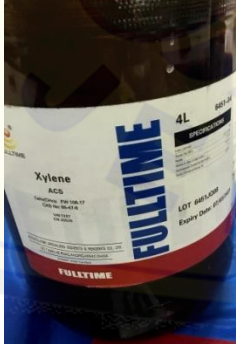
Gambar	Keterangan
	<p>E: Papan bedah  F: Handscoon  G: Masker  H: Kain lap</p>
	<p>I: Cotton roll  J: Baki <i>stainless steel</i>  K: <i>Disposable syringe 1 ml</i>  L: <i>Disposable syringe 5 ml</i></p>
	<p>M: Pisau malam  N: Pinset  O: Arteri clam  P: Gunting bedah  Q: Sonde setengah  R: Eskavator kecil  S: Eskavator besar  T: Blade dan scalpel  U: Spidol</p>

**f. Alat dan Bahan Penyuntikan *Porphyromonas gingivalis***






Gambar	Keterangan
	Jarum insulin 26G
	Rat dental chair
	Suspensi <i>P.gingivalis</i>

g. Alat dan Bahan Pewarnaan *IHC* dan Pengamatan Jaringan

Gambar	Keterangan
	DAB Anti-Polyvalent
	Deckglass
	Formic Acid 10%
	Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7,4

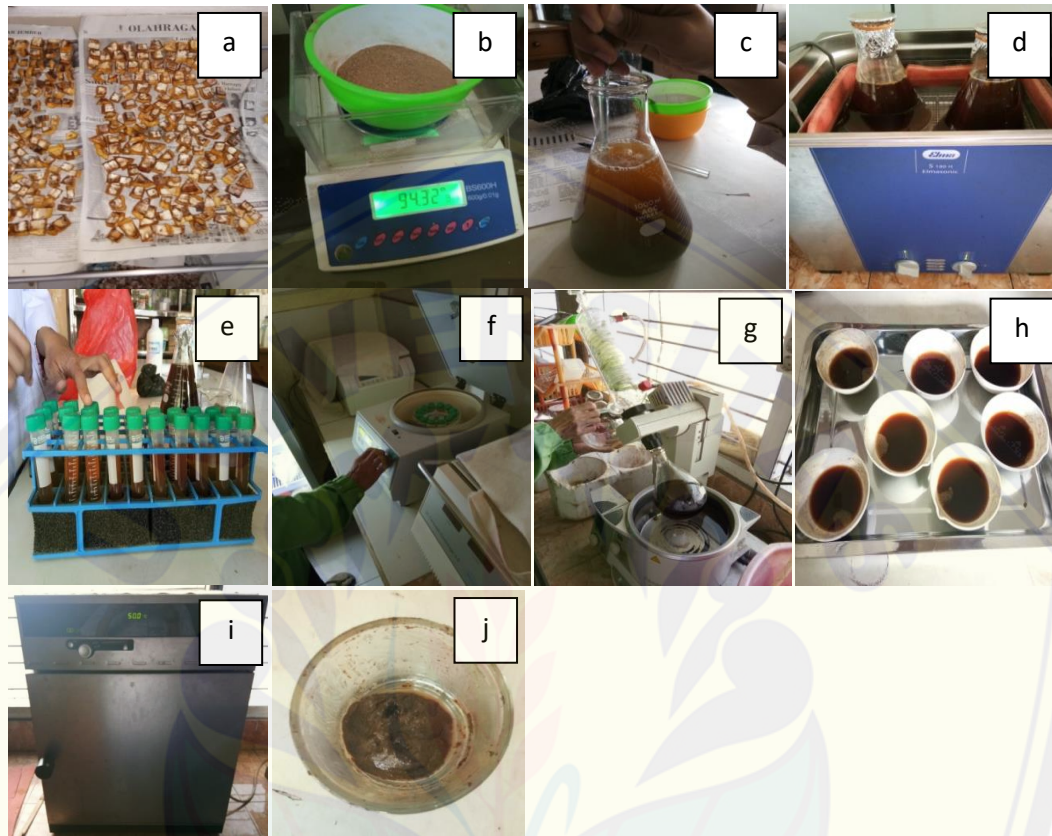
	<p><i>Poly-L-Lysine Coated Slides</i></p>
	<p><i>Mayer's Hematoxylin</i></p>
	<p>Eter</p>
	<p><i>Xylene</i></p>



	<p>Antibodi Primer MMP-8</p>
	<p><i>Ethanol</i></p>
	<p>Parafin</p>
	<p>Optilab</p>
	<p>Mikroskop</p>

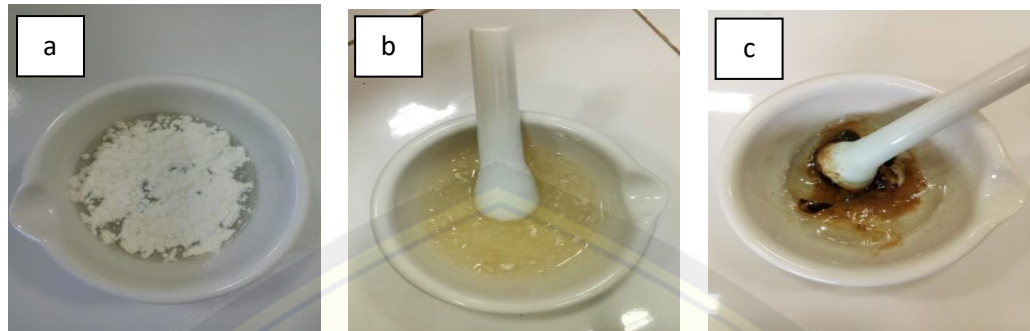
## Lampiran H. Prosedur Penelitian

### 1. Pembuatan Ekstrak



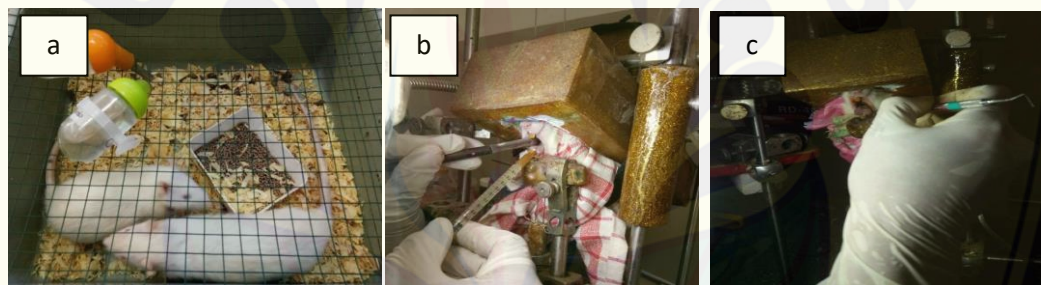
Gambar 1. (a) Mengeringkan kulit buah kakao (b) menimbang kulit buah kakao yang sudah menjadi bubuk (c) mencampurkan bubuk kulit buah kakao dengan aseton 70% dan akuades (d) dimasukkan kedalam mesin ultrasonic (e) dimasukkan kedalam valcon tube (f) disentrifuge dengan kecepatan 200 rpm selama 10 menit (g) lauratan ekstrak dimasukkan kedalam rotavapor (h) larutan yang telah dirotavapor dileatakan dicawan petri (i) larutan yang ada dicawan petri dioven (j) bagian yang kental yang berada didasar cawan petri diambil dan diletakkan dalam gelas kecil.

## 2. Pembuatan Gel



Gambar 2. (a) Menambahkan aquades dan CMC-Na. (b) Mengaduk CMC-na dan Aquades dan didiamkan hingga mengembang. (c) Memasukkan ekstrak proantosianidin dan diaduk hingga merata.

## 3. Perlakuan Hewan Coba



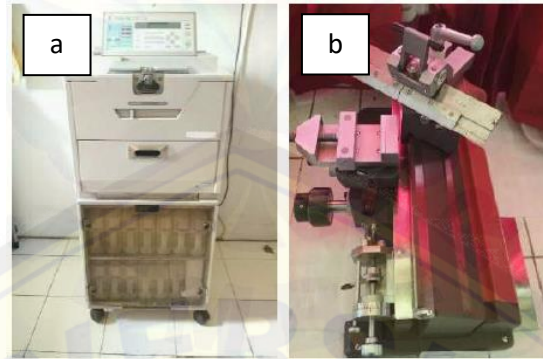
Gambar 3. (a) Adapatasi hewan coba. (b) Injeksi *Porphyromonas gingivalis* pada area sulkus gingiva bagian mesiobukal dan mesiopalatal molar pertama kanan rahang atas. (c) Pengolesan gel plasebo, dan gel proantosianidin kulit buah kakao.

## 4. Pengambilan Sampel



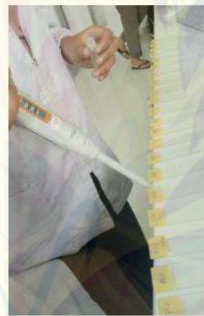
Gambar 4. Pengambilan jaringan gingiva tikus

## 5. Pemotongan dan Pemrosesan Jaringan



Gambar 5. (a) Pemrosesan jaringan dengan menggunakan mesin *automatic processing tissue*. (b) Pemotongan jaringan menggunakan *microtome*.

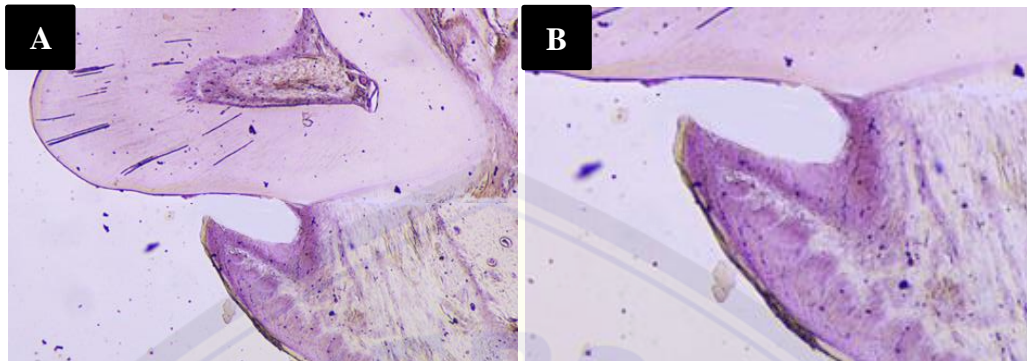
## 6. Pewarnaan Jaringan Menggunakan Pewarnaan Immunohistokimia (IHC)



Gambar 6. Pewarnaan jaringan dengan menggunakan pewarnaan *IHC* dengan antibodi primer MMP-8



### Lampiran I. Gambaran Histologis Jaringan Gingiva

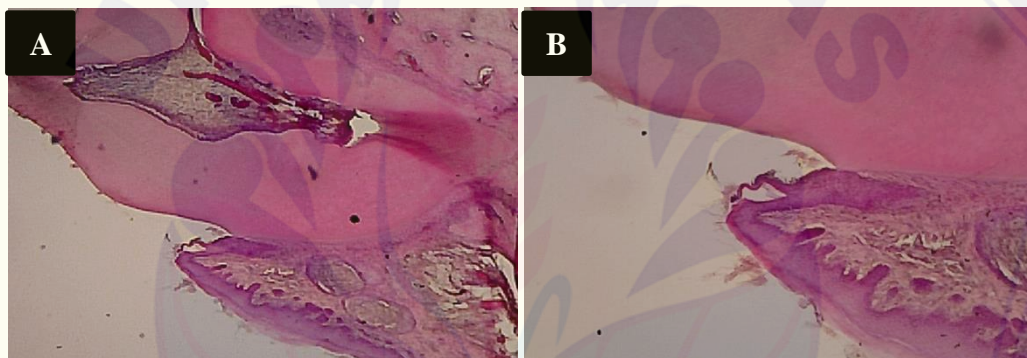


Gambar 1. Gambaran histologis jaringan gingiva tikus normal dengan pewarnaan *Immunohistochemical (IHC)*

Keterangan:

A: Perbesaran 40X

B: Perbesaran 100X

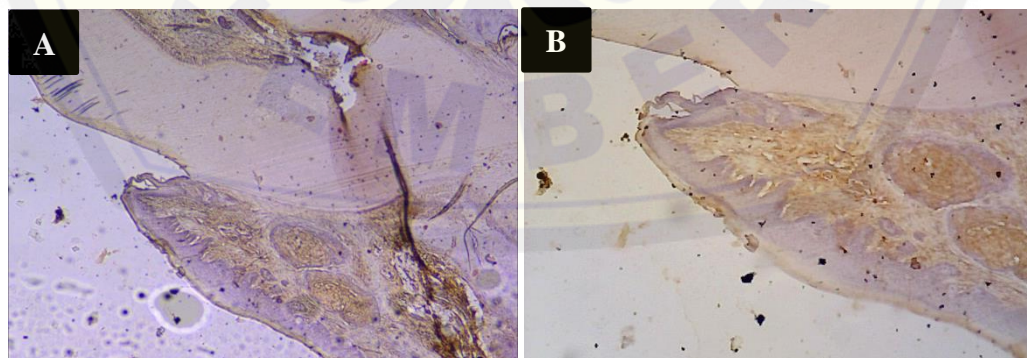


Gambar 2. Gambaran histologis jaringan gingiva tikus kelompok kontrol hari ke-7 dengan pewarnaan *Haematoxylin Eosin (HE)*

Keterangan:

A: Perbesaran 40X

B: Perbesaran 100X

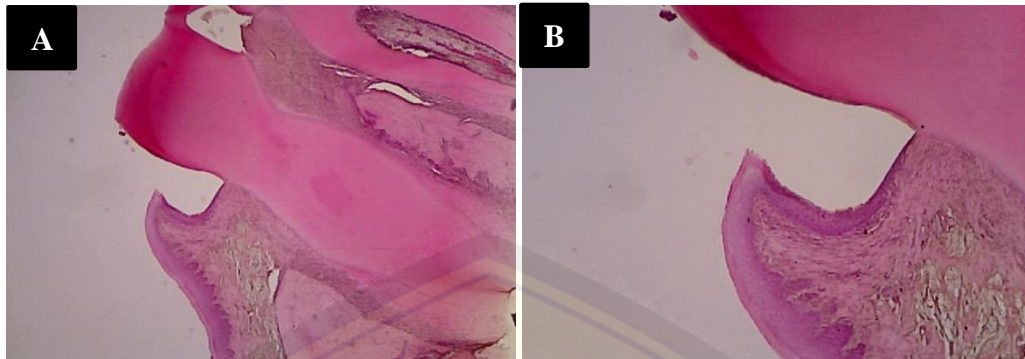


Gambar 3. Gambaran histologis jaringan gingiva tikus kelompok kontrol hari ke-7 dengan pewarnaan *Immunohistochemical (IHC)*

Keterangan:

A: Perbesaran 40X

B: Perbesaran 100X

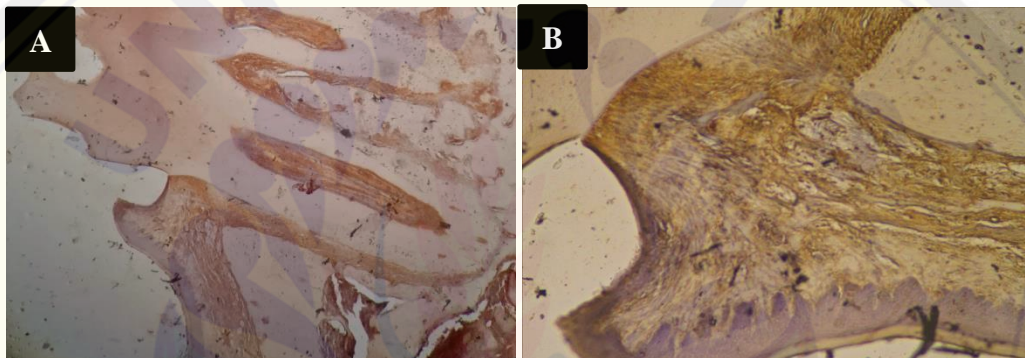


Gambar 4. Gambaran histologis jaringan gingiva tikus kelompok kontrol hari ke-14 dengan pewarnaan *Haematoxylin Eosin (HE)*

Keterangan:

A: Perbesaran 40X

B: Perbesaran 100X

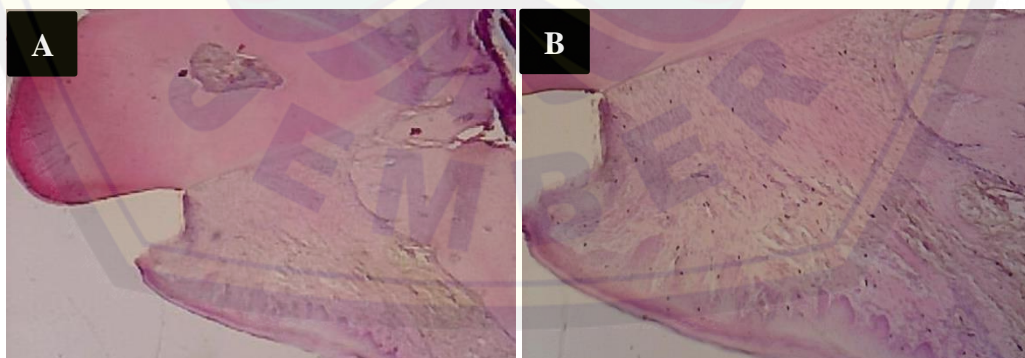


Gambar 5. Gambaran histologis jaringan gingiva tikus kelompok kontrol hari ke-14 dengan pewarnaan *Immunohistochemical (IHC)*

Keterangan:

A: Perbesaran 40X

B: Perbesaran 100X



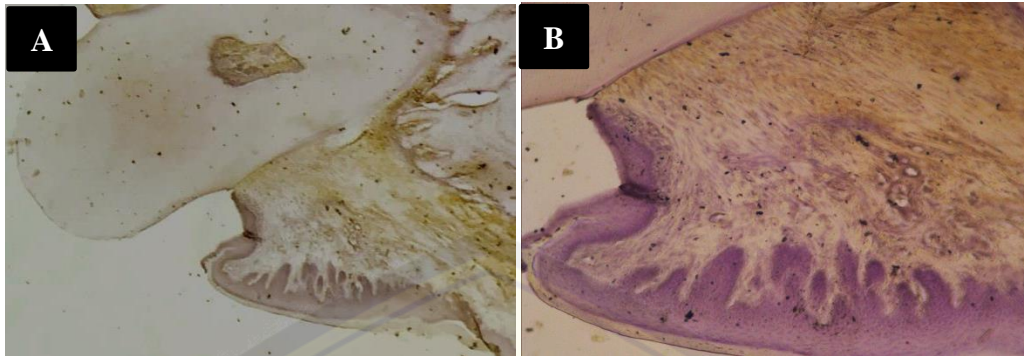
Gambar 6. Gambaran histologis jaringan gingiva tikus kelompok perlakuan hari ke-7 dengan pewarnaan *Haematoxylin Eosin (HE)*

Keterangan:

A: Perbesaran 40X

B: Perbesaran 100X



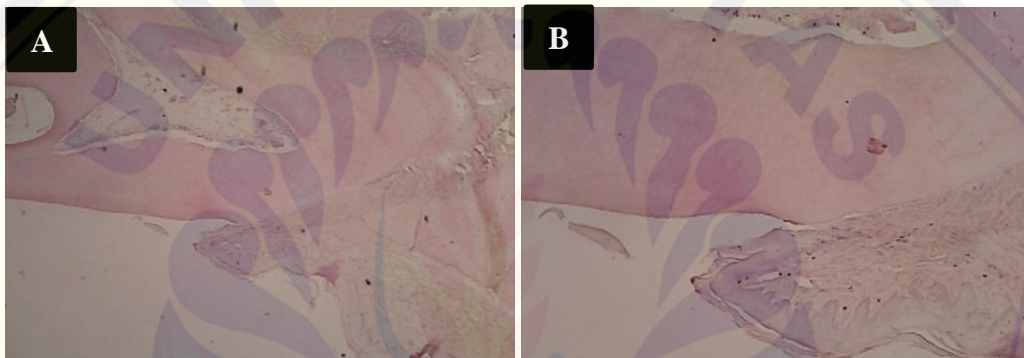


Gambar 7. Gambaran histologis jaringan gingiva tikus kelompok perlakuan hari ke-7 dengan pewarnaan *Immunohistochemical (IHC)*

Keterangan:

A: Perbesaran 40X

B: Perbesaran 100X

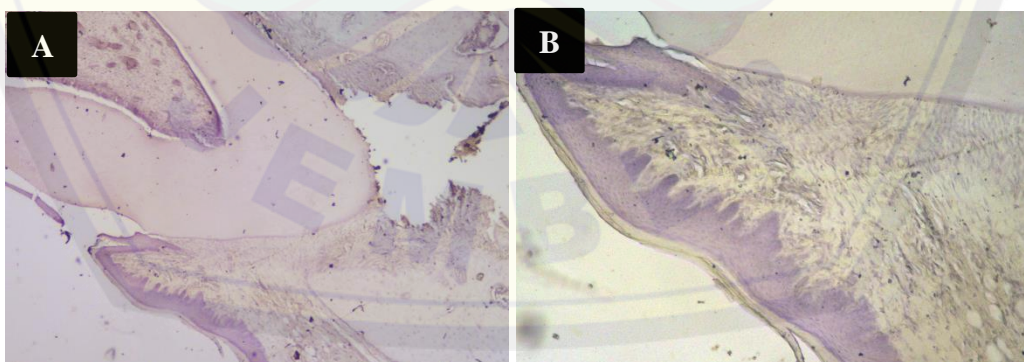


Gambar 8. Gambaran histologis jaringan gingiva tikus kelompok perlakuan hari ke-14 dengan pewarnaan *Haematoxylin Eosin (HE)*

Keterangan:

A: Perbesaran 40X

B: Perbesaran 100X



Gambar 9. Gambaran histologis jaringan gingiva tikus kelompok perlakuan hari ke-14 dengan pewarnaan *Immunohistochemical (IHC)*

Keterangan:

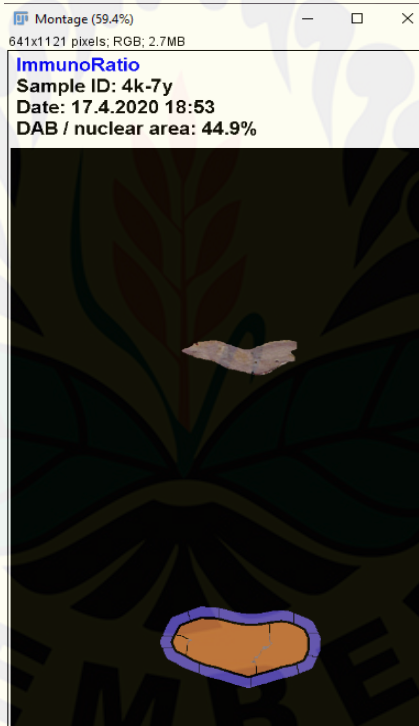
A: Perbesaran 40X

B: Perbesaran 100X

**Lampiran J. Gambaran Hasil Ekspresi MMP-8 Jaringan Gingiva Menggunakan *Software Immunoratio***

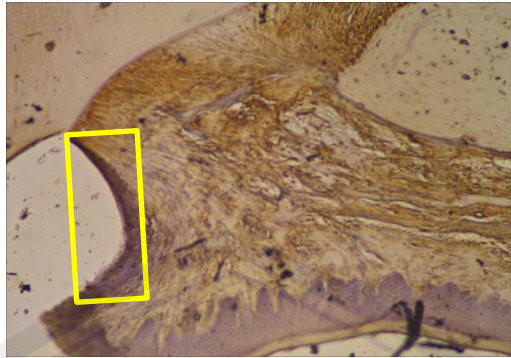


Gambar 1. Gambaran histologis jaringan gingiva tikus kelompok kontrol hari ke-7 dengan pewarnaan *Immunohistochemical (IHC)* (100X)

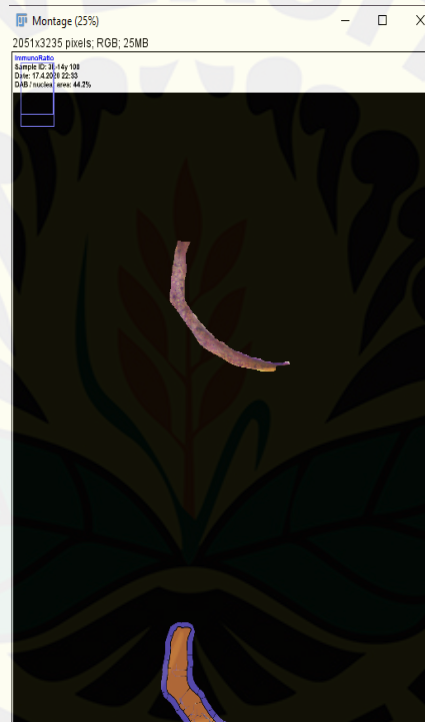


Gambar 2. Hasil Ekspresi MMP-8 menggunakan *Software Immunoratio* kelompok kontrol Hari ke-7

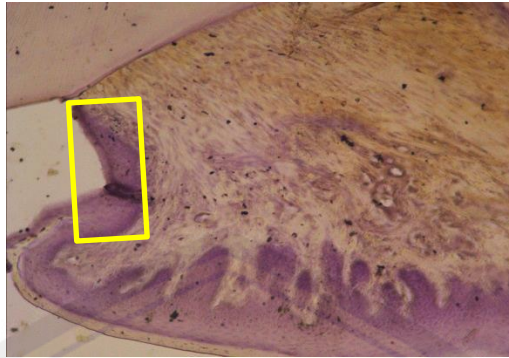




Gambar 3. Gambaran histologis jaringan gingiva tikus kelompok kontrol hari ke-14 dengan pewarnaan *Immunohistochemical (IHC)* (100X)



Gambar 4. Hasil Ekspresi MMP-8 menggunakan *Software Immunoratio* kelompok kontrol Hari ke-14



Gambar 5. Gambaran histologis jaringan gingiva tikus kelompok perlakuan hari ke-7 dengan pewarnaan *Immunohistochemical (IHC)* (100X)



Gambar 6. Hasil Ekspresi MMP-8 menggunakan *Software Immunoratio* kelompok perlakuan Hari ke-7



Gambar 7. Gambaran histologis jaringan gingiva tikus kelompok perlakuan hari ke-14 dengan pewarnaan *Immunohistochemical (IHC)* (100X)



Gambar 8. Hasil Ekspresi MMP-8 menggunakan *Software Immunoratio* kelompok perlakuan Hari ke-14





