



**PEMBERIAN PROBIOTIK TERHADAP JUMLAH SEL
MAKROFAG GINGIVA TIKUS WISTAR JANTAN YANG
DIINDUKSI LIPOPOLISAKARIDA *E. COLI***

SKRIPSI

Oleh:
Ria Faisah
NIM 0816101038

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



**PEMBERIAN PROBIOTIK TERHADAP JUMLAH SEL
MAKROFAG GINGIVA TIKUS WISTAR JANTAN YANG
DIINDUKSI LIPOPOLISAKARIDA *E. COLI***

SKRIPSI

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

Oleh:
Ria Faisah
NIM 081610101038

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

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk Ayahanda dan Ibunda sebagai ungkapan rasa terima kasih, untuk pengorbanannya.

MOTTO

“Sungguh, akan kamu jalani tingkat demi setingkat (dalam kehidupan)”

(Terjemahan Surat *Al-Insyiqaq*: 19)*)

“Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan”

(Terjemahan Surat *Al-Insyiroh*: 6)*)

*⁾ Departemen Agama Republik Indonesia. 2005. *Al-Qur'an Al-Karim dan Terjemah Makna ke Dalam Bahasa Indonesia*. Kudus : Menara Kudus.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Ria Faisah

NIM : 081610101038

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Pemberian Probiotik Terhadap Jumlah Sel Makrofag Gingiva Tikus Wistar Jantan yang Diinduksi Lipopolisakarida *E. coli*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, 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 sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 18 Januari 2012

Yang menyatakan,

Ria Faisah

NIM 081610101038

SKRIPSI

**PEMBERIAN PROBIOTIK TERHADAP JUMLAH SEL MAKROFAG
GINGIVA TIKUS WISTAR JANTAN YANG DIINDUKSI
LIPOPOLISAKARIDA *E. COLI***

Oleh:

Ria Faisah
NIM 081610101038

Pembimbing

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

Dosen Pembimbing Anggota : drg. Desi Sandra Sari, MDSc.

PENGESAHAN

Skrpsi berjudul "Pemberian Probiotik terhadap Jumlah Sel Makrofag Gingiva Tikus Wistar Jantan yang Diinduksi Lipopolisakarida *E. coli*" telah diuji dan disahkan oleh pada:

Hari, tanggal : Rabu, 18 Januari 2012

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Tim Penguji

Ketua,

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

Anggota I,

Anggota II,

drg. Desi Sandra Sari, MDSc.
NIP 197512152003122005

drg. Zahara Meilawaty, M. Kes.
NIP 198005272008122002

Mengesahkan

Dekan,

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

RINGKASAN

Pemberian Probiotik terhadap Jumlah Sel Makrofag Gingiva Tikus Wistar Jantan yang Diinduksi Lipopolisakarida *E. Coli*; Ria Faisah, 081610101038; 2012; 35 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Penyakit periodontal banyak diderita oleh manusia hampir di seluruh dunia dan mencapai 50% dari jumlah populasi dewasa. Penyakit periodontal merupakan penyakit kronis yang diawali dengan gingivitis, penyebaran penyakit ke arah jaringan dibawahnya, menyebabkan resorpsi jaringan, hilangnya tulang alveolar dan terbentuknya poket. Etiologi penyakit ini disebabkan oleh bakteri plak, pada bakteri gram negatif lipopolisakarida merupakan komponen mayor yang ikut berperan dalam patogenesis penyakit periodontal karena mampu menimbulkan stimulasi pada sel-sel imun.

Kondisi peradangan yang lebih lanjut akan memicu terjadinya aktivasi dan akumulasi sel makrofag ke jaringan yang diperantari oleh mediator-mediator peradangan. Untuk mengurangi akibat buruk peradangan, maka diperlukan nutrisi yang bisa menekan produksi mediator peradangan.

Bakteri asam laktat dikenal memiliki peranan penting dalam kehidupan manusia, peranan bakteri asam laktat sebagai bakteri probiotik bisa dimanfaatkan untuk pengobatan dan pencegahan dari penyakit rongga mulut, termasuk penyakit periodontal. Oleh karena itu, tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian probiotik terhadap jumlah makrofag pada tikus wistar setelah diinduksi lipopolisakarida *E. coli*.

Penelitian ini adalah eksperimental laboratoris yang dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember pada bulan Juni-September 2011. Kondisi periodontitis didapatkan dengan menyuntikan lipopolisakarida *E. coli* pada sulkus gingiva gigi insisif pertazma kanan rahang bawah bagian labial selama 5 hari. Penelitian dilakukan pada 4 kelompok meliputi: kelompok I kontrol yang tidak

diinduksi apapun, kelompok II induksi LPS selama 5 hari, kelompok III induksi LPS dan probiotik secara bersamaan selama 5 hari, serta kelompok IV induksi LPS selama 5 hari dilanjutkan probiotik 5 hari berikutnya. Jumlah sampel masing-masing kelompok 8 ekor, data yang diperoleh dianalisis menggunakan *one way* ANOVA dan dilanjutkan dengan uji Tukey HSD.

Hasil penelitian menunjukkan rerata jumlah sel makrofag tertinggi terdapat pada kelompok IV sebesar 2,71 sel dan terendah adalah kelompok I sebesar 1,42 sel, sedangkan kelompok II serta III masing-masing sebesar 1,88 sel dan 2,04 sel. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian probiotik dapat meningkatkan jumlah sel makrofag tikus wistar jantan yang mengalami penyakit periodontal, begitu juga hasil analisis *one way* ANOVA menunjukkan hal yang sama. Akan tetapi hasil uji tukey HSD yang menunjukkan perbedaan ($p < 0,05$) hanya pada kelompok I terhadap kelompok IV dan sebaliknya. Hal ini disebabkan jumlah bakteri yang meningkat ketika diinduksi LPS selama 5 hari secara langsung akan meningkatkan invasi sel makrofag, ditambah dengan pemberian probiotik *L. casei* 5 hari berikutnya maka akan merangsang pembentukan sel makrofag yang lebih banyak, meskipun secara statistik tidak semua kelompok mempunyai perbedaan.

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat ditarik kesimpulan bahwa pemberian probiotik *L. casei* mempunyai pengaruh terhadap peningkatan jumlah sel makrofag gingiva tikus wistar jantan yang sebelumnya diinduksi lipopolisakarida *E. coli*, pengaruh tersebut lebih efektif pada kelompok yang induksi LPS selama 5 hari dan dilanjutkan *L. casei* 5 hari berikutnya.

PRAKATA

Alhamdulillah, puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT hidayah dan rahmat-Nya sehingga penulisan skripsi dengan judul “Pemberian Probiotik terhadap Jumlah Sel Makrofag Gingiva Tikus Wistar Jantan yang Diinduksi Lipopolisakarida *E. Coli*” dapat terselesaikan dengan baik. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata 1 (S1) pada Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini banyak mendapat bantuan fasilitas dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, Drg. Hj. Herniyati, K. Kes.
2. drg. M. Nurul Amin, M. Kes selaku dosen pembimbing utama, dan ucapan terima kasih pula karena telah mengizinkan penulis ikut serta dalam proyek penelitian beliau untuk menyelesaikan tugas akhir di Fakultas Kedokteran Gigi.
3. drg. Dessy Sandra Sari, MDSc selaku dosen pembimbing anggota.
4. drg. Zahara Meilawaty, M. Kes selaku sekretaris sidang.
5. drg. Melok Aris Wahyukundari, M. Kes. Sp. Perio. Selaku dosen pembimbing akademik.
6. Seluruh staf Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, mba Wahyu, mba Indri, mba Nur, pak Pin, dan mas Agus.
7. Kedua orangtua, Ibunda Nur Hidayah dan Ayahanda Hartono dengan penuh kesabaran memberikan dukungan, kasih sayang dan doa yang selalu menuntun untuk menjadi insan yang lebih baik.
8. Kakakku Deni Wahyudi dan Dedy Setiawan serta adikku M. Alfir Ridho yang selalu memberikan semangat dalam setiap langkahku.
9. Sahabat-sahabatku yang selalu memberikan motivasi untuk menuntut ilmu setinggi mungkin.
10. Teman-teman satu kos yang memberi warna dalam hidupku, Ita, Silfi, Hafida, Zia, Sofi, Del, Frecy, Dina, Putri, Tania, Vita dan Alfi.

11. Teman sebidang biologi kedokteran yang sama-sama berjuang mengerjakan skripsi.
12. Angkatan 2008, yang bersama-sama dalam duka dan tawa menjalani angkatan pertama KBK.
13. Almamater tercinta Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penulis menyadari bahwa kesempurnaan bukan milik manusia, maka saran dan kritik yang membangun sangat penulis harapkan untuk membantu melengkapi dan menyempurnakan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak, khususnya dalam bidang kedokteran gigi. Amin.

Jember, 18 Januari 2012

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBING SKRIPSI	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan	3
1.4 Manfaat	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Probiotik	5
2.1.1 Definisi Probiotik.....	5
2.1.2 <i>Lactobacillus</i>	6
2.1.3 Efek Probiotik Terhadap Jaringan Periodontal.....	7
2.2 Sel Makrofag	8
2.2.1 Morfologi Sel Makrofag.....	8
2.2.2 Fungsi Sel Makrofag.....	9
2.3 Lipopolisakaida	10

2.4 Hipotesis	12
BAB 3. METODE PENELITIAN	13
3.1 Jenis Penelitian	13
3.2 Rancangan Penelitian	13
3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian	13
3.4 Populasi dan Sampel Penelitian	13
3.4.1 Populasi Penelitian.....	13
3.4.2 Sampel Penelitian	13
3.5 Identifikasi Variabel Penelitian	15
3.5.1 Variabel Bebas	15
3.5.2 Variabel Terikat	15
3.5.3 Variabel Terkendali	15
3.6 Definisi Operasional	15
3.6.1 Probiotik	15
3.6.2 Lipopolisakarida	15
3.6.3 Sel Makrofag	16
3.7 Bahan dan Alat Penelitian	16
3.7.1 Bahan Penelitian	16
3.7.2 Alat Penelitian	17
3.8 Prosedur Penelitian	18
3.8.1 <i>Ethical Clearence</i>	18
3.8.2 Persiapan Hewan Penelitian	19
3.8.3 Pembagian Kelompok Penelitian.....	19
3.8.4 Persiapan Bahan Penelitian.....	19
3.8.5 Pelaksanaan Penelitian.....	21
3.9 Analisis Data	25
3.10 Bagan Alur Penelitian	26
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	27
4.1 Hasil Penelitian	27

4.1.1 Analisis Data.....	28
4.2 Pembahasan.....	30
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	34
5.1 Kesimpulan.....	34
5.2 Saran	34
DAFTAR BACAAN	35
LAMPIRAN	40

DAFTAR TABEL

	Halaman
4.1. Hasil perhitungan rerata jumlah sel makrofag tikus wistar jantan pada berbagai perlakuan	27
4.2. Ringkasan hasil uji normalitas rerata jumlah sel makrofag gingiva tikus wistar jantan	28
4.3. Ringkasan hasil uji homogenitas rerata jumlah sel makrofag gingiva tikus wistar jantan pada berbagai perlakuan	29
4.4. Hasil uji <i>oneway</i> ANOVA terhadap rerata jumlah sel makrofag gingiva tikus wistar jantan pada berbagai perlakuan	29
4.5. Ringkasan signifikansi uji beda tukey HSD terhadap rerata jumlah sel makrofag gingiva tikus wistar jantan	29

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 <i>Lactobacillus casei</i>	6
2.2 Sel Makrofag pada Jaringan Ikat	9
2.3 Bakteri Gram Negatif, bagian dalam terbuat dari peptidoglikan, membran luar terdiri dari fosfolipid dan lipopolisakarida.....	11
3.1 Gambar Alur Penelitian	26
4.1 Grafik batang rerata jumlah sel makrofag gingiva tikus wistar jantan pada berbagai perlakuan	28

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Surat <i>Ethical Clearence</i>	40
B. Surat Ijin Penelitian.....	41
C. Hasil Perhitungan Jumlah Sel Makrofag.....	42
C.1 Data Jumlah Sel Makrofag Kelompok I.....	42
C.2 Data Jumlah Sel Makrofag Kelompok II	43
C.3 Data Jumlah Sel Makrofag Kelompok III	44
C.4 Data Jumlah Sel Makrofag Kelompok IV	45
C.5 Rerata Jumlah Makrofag Gingiva Tikus Wistar pada Berbagai Perlakuan.....	46
D. Analisis Data	47
D.1 Uji Normalitas Kolmogorov-Smirnov	47
D.2 Uji Homogenitas Levene	47
D.3 Uji <i>One way</i> ANOVA	48
D.4 Uji Beda Tukey HSD	48
E. Foto Alat Penelitian	49
F. Foto Bahan Penelitian	54
G. Gambaran Histologi Sel Makrofag	56

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit periodontal banyak diderita oleh manusia hampir di seluruh dunia dan mencapai 50% dari jumlah populasi dewasa. Di Indonesia penyakit periodontal menduduki urutan kedua utama yang masih merupakan masalah di masyarakat (Wahyukundari, 2009).

Penyakit yang menyerang pada gingiva dan jaringan pendukung gigi ini merupakan penyakit infeksi yang serius dan apabila tidak dilakukan perawatan yang tepat dapat mengakibatkan kehilangan gigi (Wahyukundari, 2009). Penyakit periodontal merupakan penyakit kronis yang diawali dengan gingivitis, penyebaran penyakit ke arah jaringan dibawahnya, menyebabkan resorpsi jaringan, hilangnya tulang alveolar dan terbentuknya poket (Fauziah dan Herawati, 2008).

Spesies-spesies bakteri penyakit periodontal meliputi bakteri anaerob obligat seperti *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacterioides forsythus*, dan spesies *Wollinella*, serta bakteri gram negatif lainnya seperti anaerob *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, spesies *Capnocytophaga* dan *Eikenella corrodens*. Bakteri utama yang mempunyai kemampuan menembus dan merusak jaringan periodontal adalah *Porphyromonas gingivalis* dan *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Peradangan dimulai dari respon lokal gingiva terhadap bakteri dan produk-produknya saat terjadi perubahan keseimbangan antara struktur, populasi mikroba, dan fungsi mekanisme pertahanan pada mulut (Fauziah dan Herawati, 2008).

Lipopolisakarida (LPS) adalah salah satu penyebab terjadinya kelainan periodontal. Bahan ini merupakan struktur utama dinding sel bakteri gram negatif anaerob yang berfungsi untuk integritas struktur bakteri dan melindungi bakteri dari sistem pertahanan imun *hospes* (Indahyani *et al.*, 2007). Lipopolisakarida mampu

menimbulkan stimulasi pada sel-sel imun, baik *in vitro* maupun *in vivo* substansi ini mempunyai relevansi klinis yang penting karena berperan langsung dalam patogenesis infeksi bakteri gram negatif (Susilowati *et al.*, 2009). Berbagai produk bakteri, terutama LPS *E. coli* mampu menstimulasi sel makrofag untuk mensintesis IL-1 β (Haniastuti *et al.*, 2007).

Pada lesi-lesi inflamasi kronik termasuk pada penyakit periodontal, makrofag merupakan sel yang paling banyak dijumpai (Haniastuti *et al.*, 2007). Makrofag sangat berperan dalam sistem imun, terutama pada reaksi-reaksi inflamasi dan infeksi. Peranan tersebut ditunjang oleh kemampuan makrofag mempresentasikan antigen, fagositosis bakteri-bakteri patogen, melepaskan enzim-enzim proteolitik, radikal-radikal oksigen, dan sekresi sitokin (Susilowati *et al.*, 2009).

Bakteri asam laktat dikenal memiliki peranan penting dalam kehidupan manusia, karena keterlibatannya di dalam berbagai makanan fermentasi (Purwandhani dan Rahayu, 2003). Peranan bakteri asam laktat sebagai bakteri probiotik sangat ditentukan oleh sifatnya yaitu tetap dalam keadaan hidup sejak dikonsumsi hingga mencapai usus manusia (Setioningsih *et al.*, 2004). Pada umumnya bakteri asam laktat yang berasal dari saluran pencernaan manusia seperti *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei Shirota*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus gasseri*, dan *Lactobacillus reuteri*, dapat berperan sebagai probiotik yang baik (Setioningsih *et al.*, 2004).

Mekanisme kerja mikroba probiotik dapat menghasilkan bahan antimikroba (bakteriosin) yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba lain yang tidak menguntungkan, mikroba probiotik dapat berkembang biak di dalam saluran pencernaan dan berkompetensi dengan mikroba patogen, dan mikroba probiotik berkompetensi dengan mikroba patogen untuk berikatan dengan respon yang sama (Winarsih *et al.*, 2007). Pemberian probiotik yang mengandung *Lactobacillus casei* dapat meningkatkan fagositosis makrofag (Winarsih *et al.*, 2007).

Mendasar pada permasalahan tersebut, maka peneliti ingin mengetahui lebih lanjut tentang pengaruh probiotik terhadap jumlah sel makrofag gingiva tikus wistar jantan yang diinduksi lipopolisakarida.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas, timbul suatu permasalahan diantaranya:

- 1) Bagaimana jumlah sel makrofag yang diinduksi lipopolisakarida?
- 2) Apakah pemberian probiotik mempengaruhi jumlah sel makrofag pada tikus wistar setelah diinduksi lipopolisakarida *E. coli*?
- 3) Kapan waktu pemberian probiotik yang tepat terhadap peradangan dengan melihat jumlah sel makrofag?.

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini meliputi tujuan khusus dan tujuan umum, tujuan khusus penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian probiotik terhadap jumlah makrofag pada tikus wistar setelah diinduksi lipopolisakarida *E. coli*.

Adapun tujuan umum penelitian ini adalah sebagai berikut:

- 1) Mengetahui jumlah makrofag pada tikus wistar yang induksi oleh lipopolisakarida.
- 2) Mengetahui waktu yang tepat untuk pemberian probiotik terhadap peradangan dengan melihat jumlah sel makrofag.

1.4 Manfaat

Manfaat penelitian ini diharapkan sebagai berikut:

- 1) Memberikan informasi tentang pengaruh pemberian probiotik terhadap jumlah sel makrofag tikus wistar setelah diinduksi lipopolisakarida.
- 2) Dapat memberikan informasi tentang jumlah makrofag pada tikus wistar yang diinduksi oleh lipopolisakarida.

- 3) Sebagai salah satu sumber informasi mengenai waktu yang tepat untuk pemberian probiotik terhadap peradangan dengan melihat jumlah makrofag
- 4) Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai acuan tambahan informasi dan sebagai pertimbangan untuk penelitian lebih lanjut.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Probiotik

2.1.1 Definisi Probiotik

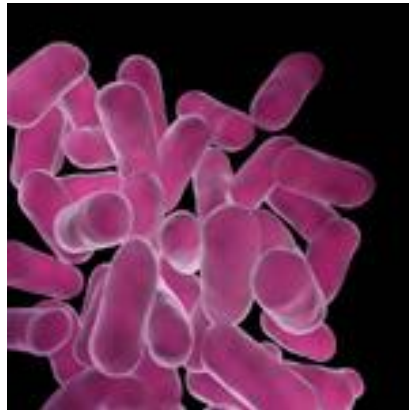
Probiotik adalah biopreparasi yang mengandung sel hidup atau organisme alami yang mampu berkolonisasi dan sebagai bagian mikroflora dalam hewan, manusia serta menstimulir proses degestif dan imunitas. Jenis bakteri “baik” yang tergolong probiotik antara lain *L. casei Shirota strain*, *L. reuteri*, *L. acidophilus LA-1*, *L. gasseri*, *L. rhamnosus*, *Bifidobacterium lactis Bb-1*, *B. breve*, *B. longum* (Harti, 2009).

Bakteri probiotik merupakan mikroorganisme non patogen, yang jika dikonsumsi memberikan pengaruh positif terhadap fisiologi dan kesehatan inangnya. Senyawa-senyawa racun yang dihasilkan dari metabolisme protein dan lemak serta hasil pemecahan enzim tertentu menjadi semakin berkurang bila bakteri probiotik mulai menjalankan peranannya dalam meningkatkan kesehatan. Berbagai senyawa hasil metabolismenya seperti asam laktat, H_2O_2 , bakteriosin yang bersifat antimikroba dan berbagai enzim yang dimiliki seperti enzim katalase (membantu mengatasi intoleransi terhadap laktosa) serta *bile salt hydrolase* (membantu menurunkan kolesterol) serta adanya aktivitas anti karsinogenik dan stimulasi imun sistem (Yulinery *et al.*, 2006).

Probiotik juga bertindak sebagai imunomodulator. Beberapa bakteri penghasil asam laktat dapat menginduksi pelepasan sitokin seperti *tumor necrosis factor* dan interleukin 6. Pemberian probiotik juga dapat mengurangi pemberian antibiotik (Winarsih *et al.*, 2007). Konsumsi probiotik yang mengandung bakteri asam laktat terbukti mencegah terjadinya kanker pada hewan percobaan (Kusumawati *et al.*, 2008).

2.1.2 *Lactobacillus*

Identifikasi isolat *Lactobacillus* didasarkan pada bentuk sel batang, pengecatan gram positif, non motil, katalase negatif, tidak membentuk dekstran, kemampuan pembentukan asam dari beberapa sumber karbon, kemampuan tumbuh dari berbagai PH maupun suhu (Purwandhani dan Rahayu, 2003).



Gambar 2.1 *Lactobacillus casei* (Sumber: Wong, 2010)

Lactobacillus mempunyai potensi sangat besar sebagai produk probiotik karena keunggulannya dibandingkan bakteri asam laktat lain. Filtrat *Lactobacillus* dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* bahkan filtrat yang sudah disimpan selama 6 bulan memiliki kemampuan yang sama (Hardiningsih *et al.*, 2006).

L. casei merupakan salah satu spesies bakteri asam laktat yang telah banyak dimanfaatkan sebagai probiotik. Keunggulan dari *L. casei* sebagai probiotik diantaranya:

- a. Membantu aktifitas *Bifidobacteria* dan bakteri berguna lainnya.
- b. Menyerap bahan berbahaya dalam sistem pencernaan.
- c. Mempunyai efek antagonis dengan membunuh bakteri patogen.

- d. Mempunyai efek anti tumor.
- e. Mempunyai efek klinis dalam pengobatan berbagai penyakit (Widodo *et al.*, 2003).

Probiotik dapat meningkatkan pertahanan tubuh inang. Pemberian *L. casei* dan *L. bulgaricus* dapat meningkatkan aktifitas fagositosis pada mencit. Mencit gremfree yang diberi bakteri asam laktat *Lactobacillus* selama 7 hari dapat meningkatkan kapasitas makrofag dalam memfagosit *Eschechia coli* (*E. coli*), hal ini disebabkan bakteri *Lactobacillus* tersebut dapat menginduksi sitokin (Winarsih *et al.*, 2007).

2.1.3 Efek Probiotik Terhadap Jaringan Periodontal

Mengingat aktifitas khusus probiotik dan efek inhibitor dari pertumbuhan bakteri patogen, penelitian telah berkembang pada bakteri patogen dalam rongga mulut yang juga dapat menggunakan probiotik untuk terapi atau pencegahan dalam perkembangan progresif penyakit mulut secara umum (Stamatova dan Meurman, 2009).

Kombinasi dua probiotik, *L. casei* Shirota dan *L. acidophilus* dari model karies buatan telah menunjukkan hasil konklusif tentang potensi yang khusus dalam keterlibatan karies yang progresif (Stamatova *et al.*, 2009). Menurut penelitian yang dilakukan Grudianov *et al.* (2002) menyatakan efek tablet probiotik pada gingivitis dan beberapa tingkatan periodontitis. Penggunaan probiotik menghasilkan bakteri normal yang lebih baik dari kelompok kontrol. Krasse *et al.* melihat berkurangnya indek gingiva yang signifikan dan jumlah bakteri plak pada pasien yang diberi perlakuan *L. reuteri* dari pada kelompok placebo dan disimpulkan bahwa probiotik tersebut efektif untuk mengurangi gingivitis dan bakteri plak pada pasien dengan gingivitis sedang sampai parah (Flichy-Fernandez *et al.*, 2010).

Bakteri probiotik pada umumnya dianggap aman, dapat mendukung kesehatan jaringan periodontal, apabila mampu membangun biofilm dalam rongga mulut dan dapat menghambat pertumbuhan serta metabolisme bakteri patogen (Stamatova dan Meurman, 2009). Strategi pengobatan agen probiotik penyakit periodontal

mengutamakan pencegahan yang lebih baik dengan menghambat secara spesifik bakteri patogen atau mengubah respon sistem imun *host* melalui multifaktorial (Gupta dan Gupta, 2010).

Probiotik menghambat bakteri patogen secara spesifik dengan cara: menghambat adesi, kolonisasi dan formasi biofilm, serta menghambat pertumbuhan bakteri patogen dari berbagai substansi. Strategi pengobatan agen probiotik juga mempunyai efek pada respon imun *host*, yaitu:

- a. Menghambat kolonisasi dan reduksi asosiasi molekul
- b. Induksi ekspresi dari sitoprotektif protein pada permukaan sel *host*
- c. Induksi jalur modulator proinflamasi dari bakteri patogen
- d. Mencegah induksi sitokin apoptosis
- e. Modulator respon sistem imun *host* (Gupta dan Gupta, 2010).

2.2 Sel Makrofag

2.2.1 Morfologi Sel Makrofag

Makrofag umumnya bulat dengan garis batas sedikit tak teratur, tampilan makrofag dapat bervariasi pada gambar, makrofag terlihat berinti kecil, berkromatin banyak, dan bersitoplasma agak asidofilik (Eroschenko, 2003).

Pada umumnya makrofag merupakan sel berbentuk tidak beraturan dengan cabang-cabang bisa pendek buntek. Kadang-kadang mempunyai cabang langsing panjang. Bila dirangsang, makrofag dapat melakukan gerakan ameboid dan pada tahap ini mereka mempunyai bentuk sangat tidak teratur, dengan kaki-kaki terjulur ke segala arah. Membran plasma melipat-lipat dan bertonjol-tonjol kecil, keadaan demikian membantu perluasan, fagositosis, dan gerakan sel. Inti lonjong kadang-kadang berlekuk, lebih kecil dan lebih heterokromatik dari inti fibroblas. Anak inti tidak mencolok. Sitoplasma terpusat gelap dan mungkin mengandung sedikit vakuola kecil yang terpusat secara supravital dengan merah netral (Lesson, 1996). Makrofag mengambil zat warna atau partikel tidak aktif dan menyimpannya dalam vakuola, dan dengan demikian mudah diidentifikasi (Lesson, 1996).



Gambar 2.2 Sel Makrofag pada Jaringan Ikat (Sumber: Niedobecki, 2011)

2.2.2 Fungsi Sel Makrofag

Fungsi makrofag adalah sebagai mekanisme pertahanan tubuh, reaksi imunologik untuk menangkap serta menimbun antigen dan dapat memberi informasi yang spesifik pada sel-sel yang bersangkutan dalam pembuatan antibodi, misalnya limfosit dan plasma cells (Herniyati *et al.*, 2008).

Makrofag berperan sebagai salah satu sel dalam sistem pertahanan tubuh melawan invasi bakteri dengan cara fagositosis. Selain itu makrofag juga mempunyai kemampuan untuk memproduksi sitokin yang berperan dalam proses fagositosis yaitu IL-1 β , IL-6, IL-8 dan TNF α . Sitokin ini dapat memediasi makrofag mensintesis reaksi inflamasi untuk melindungi terhadap bakteri. Pada saat fagositosis, bakteri dikenali dan diikat dengan reseptor sel fagosit, kemudian ditelan. Pada saat bersamaan, reseptor mengirimkan sinyal untuk mengaktifkan enzim-enzim yang terdapat di fagolisosom yang berperan untuk membunuh bakteri tersebut (Handajani, 2006).

Fagositosis merupakan proses yang kompleks, meliputi pengikatan sel target pada permukaan sel fagosit, penelanan dan stimulasi aktivitas mikrobisidal dari sel. Pada fase awal fagositosis, makrofag ditarik dan bergerak ke arah benda asing tersebut, proses ini disebut kemotaksis. Fase selanjutnya terjadi perlekatan antigen

pada membran sel makrofag. Perlekatan ini menginduksi penonjolan membran atau pseudopodia yang akan mengelilingi material yang melekat. Pseudopodia kemudian akan berfusi dengan material, masuk ke dalam sel yang tertutup dalam organela yang terikat membran yang disebut fagosom. Selanjutnya lisosom akan berfusi dengan fagosom membentuk fagolisosom. Proses fagositosis dipercepat dengan adanya antibodi, karena partikel-partikel yang diselubungi antibodi dapat ditelan secara lebih efisien, proses ini disebut opsonisasi (Handajani, 2006).

Lipopolisakarida merupakan produk bakteri gram negatif yang berada pada membran sel, pada saat bakteri mengalami lisis di dalam aliran darah, LPS akan berikatan dengan reseptor pada makrofag, monosit, atau sel-sel sistem retikuloendothelial lain sehingga sel-sel tersebut memproduksi sitokin (Susilowati *et al.*, 2009).

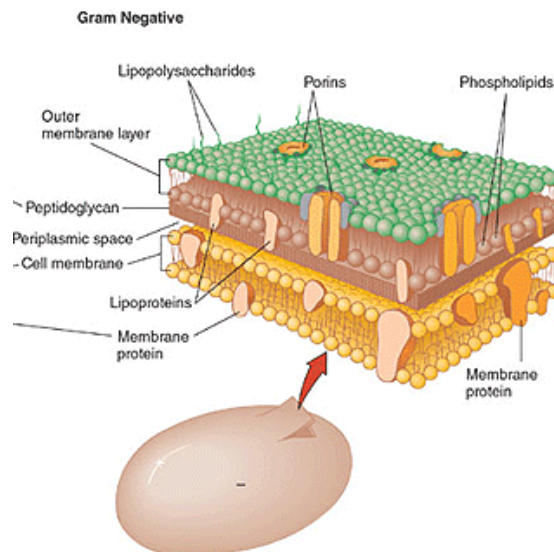
2.3 Lipopolisakarida

Penelitian Simon (dalam Kusumawardani, 2005) mengindikasikan bahwa level LPS pada krevikuler gingiva berhubungan dengan peningkatan keparahan gingivitis. Fine *et al.* (1992) menunjukkan bahwa level LPS berkorelasi dengan persentase bakteri gram-negatif pada jaringan periodontal sehat dan periodontitis. Hal ini menunjukkan bahwa LPS mempunyai aktifitas biologis yang berperan pada patogenesis penyakit periodontal (Kusumawardani, 2005).

Penelitian *in vivo* yang dilakukan oleh Bergman *et al.* (2002) menyatakan LPS *E. coli* mampu menstimulasi makrofag untuk mensintesis IL-1 β . Penelitian terdahulu oleh Roberts *et al.* (1997) diketahui bahwa terjadi peningkatan sintesis IL-1 β oleh sel makrofag mencit yang distimulasi dengan LPS *E. coli* bila dibandingkan dengan tanpa stimulasi LPS *E. coli* (Haniastuti *et al.*, 2007).

Lipopolisakarida ialah komponen mayor dinding sel bakteri gram negatif, lipopolisakarida merupakan endotoksin dan antigen grup spesifik yang penting (antigen O). Molekul lipopolisakarida terdiri dari tiga bagian. Lipid A, suatu

glikolipid yang bertanggung jawab terhadap aktivitas endotoksik, yang terikat secara kovalen pada rantai heteropolisakarida yang mempunyai dua bagian, inti polisakarida yang konstan dalam strain terkait, dan rantai spesifik-O yang sangat bervariasi (Dorland, 2002).



Gambar 2.3 Bakteri gram negatif, bagian dalam terbuat dari peptidoglikan, membran luar terdiri dari fosfolipid dan lipopolisakrida (Sumber: Ogonnaya, 2005)

Lipopolisakarida bersifat endotoksin yang menginduksi diproduksinya faktor lokal yaitu sitokin proinflamasi seperti interleukin 1α (IL- 1α), IL- 1β , IL-6, *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), dan eikosanoid yaitu prostaglandin (PGE₂) (Indahyani *et al*, 2007). LPS mengaktifkan sel-sel monosit dan makrofag untuk memproduksi sitokin-sitokin, protein adhesi sel, dan enzim-enzim yang terlibat dalam produksi mediator proinflamasi (Susilowati, 2009).

LPS *E. coli* mampu menstimulasi sel makrofag untuk mensintesis IL- 1β , IL- 1β sendiri menyebabkan destruksi jaringan dengan meningkatkan produksi matriks metalloproteinase, mestimulasi terbentuknya osteoklas serta meningkatkan resorpsi tulang (Haniastuti *et al.*, 2007).

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Kusumawardni (2005), disimpulkan bahwa lipopolisakarida *E. coli* mempunyai kapasitas yang mirip untuk menghambat pertumbuhan fibroblas gingiva. Meskipun sel fibroblas dapat pulih kembali kemudian berpoliferasi dan mencapai densitas sel yang ekuvalen dengan sel yang dipajan.

2.4 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah pemberian probiotik akan meningkatkan jumlah sel makrofag gingiva tikus wistar jantan yang diinduksi lipopolisakarida *E. coli*.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

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

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah desain *post test only control group design* (Notoatmojo, 2010).

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember pada bulan Juni - September 2011.

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

3.4.1 Populasi Penelitian

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

3.4.2 Sampel Penelitian

a. Besar Sampel Penelitian

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

Adapun besar sampel didapat dari perhitungan rumus (Steel dan Torrie, 1995).

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

Keterangan:

- n = jumlah sampel minimal
 $Z\alpha$ = batas atas nilai konversi pada tabel distribusi normal untuk batas kemakmuran (1,96)
 $Z\beta$ = batas bawah nilai konversi pada tabel distribusi normal untuk batas kemakmuran (0,85)
 α = tingkat signifikansi (0,05)
 β = 0,20
 $\sigma^2_D/\delta^2 = 1 \rightarrow$ diasumsikan $\sigma^2_D = \delta^2$

maka, hasil perhitungan sampel minimal adalah sebagai berikut:

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

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

b. Kriteria Sampel Penelitian

Pemilihan sampel penelitian menggunakan teknik non random sampling yaitu *purposive sampling*, sampel dipilih berdasarkan pertimbangan tertentu yang dibuat oleh peneliti (Notoatmojo, 2010).

Adapun kriteria sampel, antara lain:

- 1) Jenis wistar
- 2) Kondisi fisik sehat dan tidak mengalami kelainan
- 3) Jenis kelamin jantan
- 4) Umur 3 bulan dan berat badan 170-200 gram
- 5) Pemberian pakan dan minuman yang sesuai sereta seragam.

3.5 Identifikasi Variabel Penelitian

3.5.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah:

- a. Pemberian Probiotik
- b. Induksi Lipopolisakarida

3.5.2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah sel makrofag

3.5.3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah:

- a. Kriteria hewan coba
- b. Prosedur penelitian

3.6 Definisi Operasional

3.6.1 Probiotik

Bakteri probiotik yang digunakan adalah *L. casei* ATCC 4224, diaplikasikan pada hewan coba dengan cara disuntikkan pada sulkus gingiva gigi insisif pertama kanan rahang bawah bagian labial, dengan dosis 2×10^8 sel/ml dan menggunakan jarum insulin 30 G sebanyak 0,02 ml.

3.6.2 Lipopolisakarida

Lipopolisakarida yang digunakan berasal dari *E. coli* (Sigma), diaplikasikan pada hewan coba dengan cara disuntikkan pada sulkus gingiva gigi insisif pertama kanan rahang bawah bagian labial, dengan dosis 5 µg/0,05 ml PBS dan menggunakan jarum insulin 30 G sebanyak 0,02 ml.

3.6.3 Sel Makrofag

Jumlah sel makrofag pada gingiva adalah banyaknya pembentukan sel makrofag gingiva setelah perlakuan yang diamati secara histologis menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x. Secara histologi sitoplasma terpulsa gelap dengan permukaan yang tidak teratur dan lipatan serta tonjolan yang menandakan aktifitas fagositosisnya.

3.7 Bahan dan Alat Penelitian

3.7.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- a. Tikus wistar jantan
- b. LPS *E. coli* (Sigma)
- c. Probiotik *L. casei* ATCC 4224
- d. Media Cair *Monitol Rogosa Salt Broth (MRS-B)*
- e. Media Agar *Monitol Rogosa Salt Agar (MRS-A)*
- f. Ketamin (KTM 1000)
- g. *Phosphate Buffer Saline*
- h. Formalin 10%
- i. EDTA 10%
- j. *Ammonium Hydroxide* 5%
- k. *Ammonium Oxalate* 5%
- l. Alkohol 70%, 80%, 95%, 100%
- m. Xylol
- n. Gliserin
- o. *Meyer Egg Albumin*
- p. *Embedding Paraffin* (Paraplast Plus)
- q. *Dry Ice* (VWR International)
- r. *Haematoksin Eosin*
- s. *Entellan*

- t. Aquades steril
- u. Spiritus
- v. Kapas steril
- w. Kertas saring (Whatmann filter paper No.1)
- x. Minuman dan makanan standar tikus wistar.

3.7.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- a. Kandang pemeliharaan hewan coba
- b. Kandang perlakuan hewan coba
- c. Tempat makan dan minum hewan coba
- d. Jarum insulin 30G (Terumo, Jepang)
- e. Tabung reaksi (Pyrex)
- f. Petridish tidak bersekat
- g. Neraca (Ohaus, Jerman)
- h. Inkubator (Memmert, Jepang)
- i. Filing cabinet (Sakura, Jepang)
- j. *Autoclave*
- k. *Laminar Flow*
- l. Gelas Ukur
- m. *Erlenmeyer* (Pyrex)
- n. *Beaker Glass*
- o. Pengaduk
- p. Ose
- q. Lampu spiritus
- r. *Cutter*
- s. *Refrigerator*
- t. Gunting bedah
- u. Pinset

- v. Botol untuk dekalsifikasi
- w. *Vibrator* (Vortex)
- x. Stopwatch (Diamond, Cina)
- y. Besi bentuk L untuk alat cetak blok paraffin
- z. Kompor
- aa. Panci
- bb. Mikrotom (Leica RM 2135)
- cc. *Block holder* mikrotom
- dd. *Waterbath* (Mommert, Jepang)
- ee. *Slide Warmer* (Sakura, Jepang)
- ff. Oven (Mommert, Jepang)
- gg. Automatic Staining (Sakura, Jepang)
- hh. Kuas kecil
- ii. Mikroskop (Olympus CX21LED, Jepang)
- jj. *Obyek glass* (Citoplus)
- kk. *Deck glass*
- ll. Sarung tangan (Latex)
- mm. Masker

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 *Ethical Clearence*

Sebelum dilakukan penelitian, maka hewan coba dan prosedur penelitian dilakukan pengurusan *ethical clearance* di Komisi Etik Penelitian Kesehatan, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada.

3.8.2 Persiapan Hewan Coba

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

3.8.3 Pembagian Kelompok Perlakuan

Hewan coba yang sudah diadaptasikan akan dikelompokkan menjadi 4 kelompok, yaitu:

- a. Kelompok I (8 ekor) merupakan kelompok kontrol yang tidak diberi perlakuan
- b. Kelompok II (8 ekor) merupakan kelompok perlakuan yang diberi induksi LPS dan tidak diberi suntikan probiotik
- c. Kelompok III (8 ekor) merupakan kelompok perlakuan yang diberi induksi LPS dan suntikan bakteri probiotik bersama-sama mulai awal
- d. Kelompok IV (8 ekor) merupakan kelompok perlakuan yang diberi induksi LPS selama 5 hari kemudian dilanjutkan dengan suntikan bakteri probiotik selama 5 hari berikutnya.

3.8.4 Persiapan Bahan Perlakuan

Bahan yang dipakai pada kelompok perlakuan terdiri dari LPS *E. Coli* (Sigma) yang dipakai untuk menginduksi dan menghasilkan infeksi pada jaringan periodontal. Bakteri probiotik yang digunakan adalah *L. Casei* ATCC 4224, bakteri tersebut adalah bakteri probiotik yang sudah jadi.

- a. Pembuatan Sediaan LPS
 - 1) Membeli LPS dengan sediaan yang sudah jadi dengan jumlah 10 mg
 - 2) Pembuatan stok LPS didapat dengan cara 10 mg LPS dilarutkan dalam 2 ml *Phosphate Buffer Saline* (PBS)
 - 3) Stok LPS dikemas dalam wadah tertutup dan disimpan dalam suhu ruang
- b. Pembuatan Sediaan Bakteri Probiotik
 - 1) Pembuatan Media Cair *Monitol Rogosa Salt Broth* (MRS-B)

Pembuatan larutan *MRS-Broth* adalah dengan menimbang 5,52 gram *MRS-Broth* menggunakan neraca dan mengukur 100 ml aquades steril dengan gelas ukur. Kedua bahan tersebut dicampur dalam *erlenmeyer*, kemudian dipanaskan di atas kompor listrik sampai mendidih sambil diaduk dengan pengaduk agar homogen. Setelah itu disterilkan dalam *autoclave* dengan suhu

121°C selama 15 menit. Media tersebut kemudian dimasukkan kedalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam untuk memastikan media cair *MRS-Broth* dalam keadaan steril.

2) Pembuatan Media Agar *Monitol Rogosa Salt Agar (MRS-A)*

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

3) Suspensi

Indukan bakteri *L. casei* ATCC 4224 dikultur untuk keperluan perlakuan. Inokulasikan swap berisi bakteri yang sebelumnya diambil dari media cair *MRS-Broth* ke media agar *MRS-A* dengan menekan dan memutar, lalu membuat area melingkar dengan diameter sekitar 25 mm. Gunakan ose steril untuk menggores area yang telah diinokulasi sekitar 10 sampai 20 kali dan goresan ini untuk memudahkan penyebaran isolasi koloni. Kemudian dibuat suspensi ke dalam tabung reaksi sebanyak 2 ml yang diambil menggunakan ose steril dari media agar.

3.8.5 Pelaksanaan Penelitian

a. Pembedahan Hewan Coba

Hewan coba sebelum diberi perlakuan, dilakukan pembiusan dengan menggunakan Ketamin (KTM 100). Dosis yang diberikan adalah 80 mg/kg berat badan yang disuntikkan pada daerah kaki belakang sebelah kanan di muskulus *quadriceps/triceps*.

b. Aplikasi Bahan Perlakuan

Infeksi pada jaringan periodontal dilakukan dengan induksi LPS *E. Coli* (Sigma). LPS disuntikan pada sulkus gingiva gigi insisif pertama kanan rahang bawah bagian labial sebanyak 0,02 ml, diberikan 1 kali sehari selama 5 hari.

Pemberian bakteri probiotik dilakukan dengan menyuntikkan pada daerah yang sama seperti pada saat induksi LPS. Dosis yang dipakai adalah 0,02 ml, diberikan 1 kali sehari selama 5 hari. Pemberian bakteri probiotik ini dilakukan dengan cara, yaitu: untuk Kelompok III diberikan secara bersamaan dengan LPS, sedangkan untuk Kelompok IV diberikan setelah induksi LPS selama 5 hari dalam jangka waktu 5 hari.

c. Pengambilan Sampel Penelitian

Hewan coba baik dari kelompok kontrol maupun perlakuan didekapitasi dengan cara dislokasi kepala ditekan dengan gunting lalu ekor ditarik sampai mati. Kemudian dilakukan pengambilan sampel jaringan ikat gingiva, dan gigi pada regio insisif pertama kanan rahang bawah sebelah labial. Sampel yang sudah diambil dilakukan fiksasi dengan menggunakan formalin 10% selama 5 hari.

d. Dekalsifikasi Sampel Penelitian

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

- 1) Sampel yang sudah difiksasi dicuci dengan air bersih yang mengalir pelan selama minimal 30 menit
- 2) Dimasukkan pada larutan EDTA yang sudah ada dan dilakukan vibrasi 2x agar proses dekalsifikasi merata
- 3) Sampel yang sudah terdekalsifikasi lengkap dibersihkan dengan air mengalir dan segera ditransfer pada larutan ammonia selama 30 menit (*ammonia concentrated* 5 tetes dalam 100 ml *distilled water*) dengan tujuan untuk menghilangkan larutan dekalsifikasi yang tersisa
- 4) Setelah itu dicuci dengan air mengalir selama 24 jam.

e. Pemrosesan Jaringan

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

1) Dehidrasi

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

- a) Alkohol 70% : 15 menit
- b) Alkohol 80% : 1 jam
- c) Alkohol 95% : 2 jam
- d) Alkohol 95% : 1 jam
- e) Alkohol 100% : 1 jam
- f) Alkohol 100% : 1 jam
- g) Alkohol 100% : 1 jam

2) *Clearing*

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

- a) Xylol : 1 jam
- b) Xylol : 2 jam
- c) Xylol : 2 jam

3) Impregnasi

Impregnasi merupakan proses infiltrasi bahan *embedding* ke dalam jaringan pada suhu 56⁰-60⁰C. Caranya yaitu jaringan dibungkus dengan kertas saring yang sudah diberi label untuk menghindari kekeliruan identitas sampel. Kemudian dimasukkan ke dalam bahan *embedding* yaitu paraffin TD 56⁰-60⁰C. Tahapan impregnasi antara lain:

- a) Paraffin (56⁰-58⁰C) : 2 jam
- b) Paraffin (56⁰-58⁰C) : 2 jam
- c) Paraffin (56⁰-58⁰C) : 2 jam

4) *Embedding*

Embedding merupakan proses penanaman jaringan ke dalam suatu bahan *embedding*. Bahan-bahan yang dapat digunakan untuk menanam jaringan antara lain: paraffin, *cellulose*, dan *tissue text*. Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember menggunakan paraffin TD 56⁰-60⁰C.

5) Penyayatan

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

- a) Mengolesi *obyek glass* dengan *meyer egg albumin*
- b) Menempelkan blok paraffin pada *block holder* mikrotom dengan bantuan pemanasan

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

- a) Penyayatan menggunakan mikrotom, dimana sebelumnya pisau mikrotom dibersihkan dengan kasa/kertas saring yang telah dibasahi dengan xylol dengan arah tegak lurus
- b) Mengatur ketebalan sayatan mikrotom sebesar 6 mm dengan arah buko-lingual
- c) Mengambil sayatan yang telah diperoleh dengan kuas lalu letakkan di atas permukaan air *waterbath* dengan temperatur tetap 56⁰-60⁰C hingga sayatan mekar
- d) Mengambil sayatan yang telah mekar dengan obyek glass yang telah diolesi dengan *meyer egg albumin*, dikeringkan di atas *hot plate*, kemudian dimasukkan dalam oven dengan suhu sekitar 30⁰-35⁰C minimal selama 12 jam.

f. Pengecatan *Haematoksin Eosin* (HE)

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

- 1) Xylol : 2-3 menit
- 2) Xylol : 2-3 menit
- 3) Alkohol absolut : 3 menit
- 4) Alkohol absolut : 3 menit
- 5) Alkohol 95% : 3 menit
- 6) Alkohol 95% : 3 menit
- 7) Bilas air hangat : 10-15 menit
- 8) *Mayer's Haematoksin* : 10 menit
- 9) Bilas air hangat : 20 menit
- 10) Eosin : 15 detik-2 menit
- 11) Bilas air hangat : 20 menit
- 12) Alkohol 95% : 2-3 menit
- 13) Alkohol 95% : 2-3 menit
- 14) Alkohol absolut : 2-3 menit
- 15) Alkohol absolut : 2-3 menit
- 16) Xylol : 3 menit
- 17) Xylol : 3 menit
- 18) Xylol : 3 menit
- 19) *Mounting* menggunakan cairan *Entellan* lalu ditutup dengan obyek glass.

Sedangkan hasil pengecatan yang didapatkan antara lain: inti sel (biru), eritrosit (merah), sitoplasma (merah), dan otot (merah).

g. Tahap Penghitungan Jumlah Makrofag

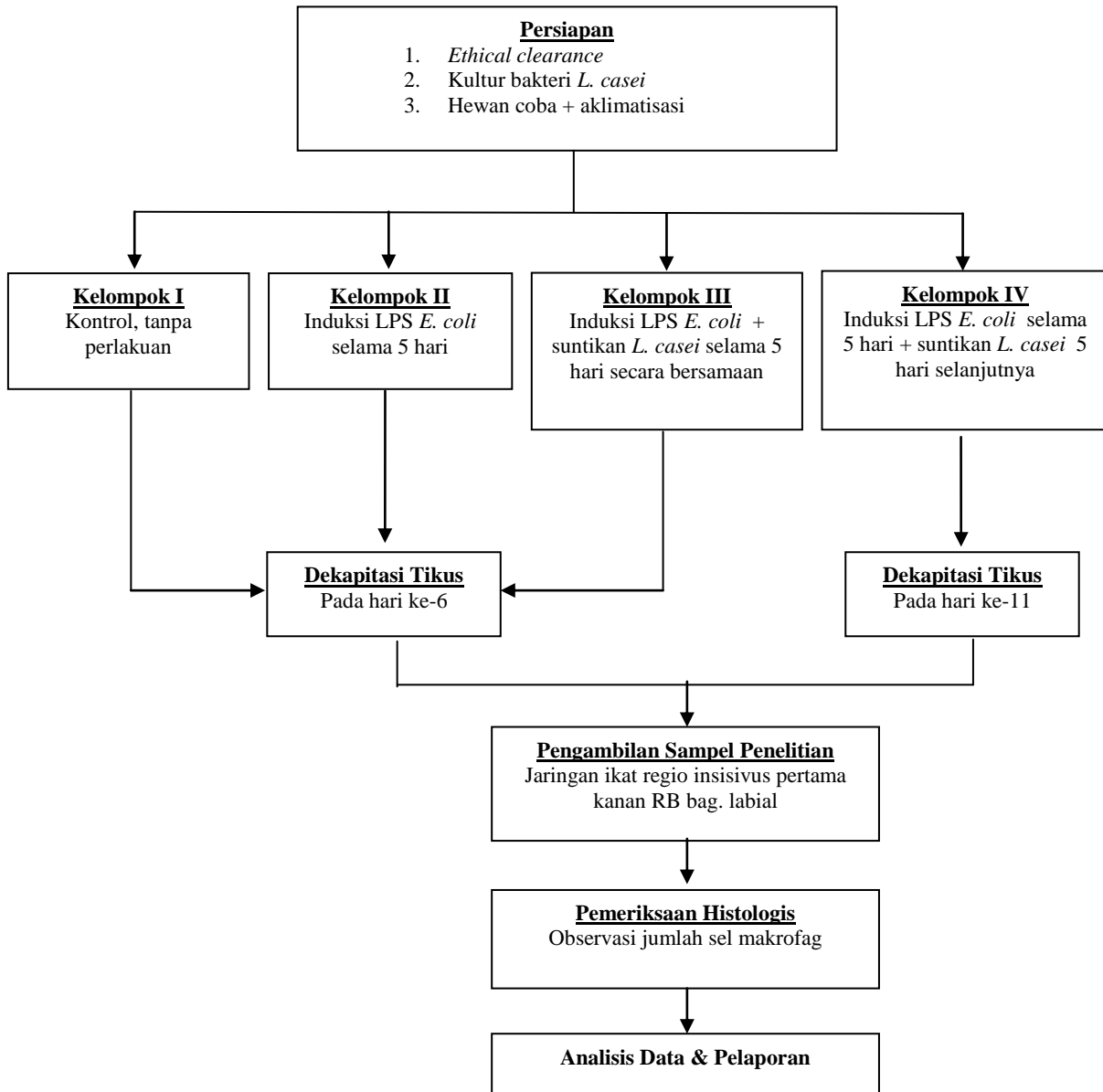
Sel makrofag gingiva setelah perlakuan kemudian diamati secara histologis menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x. Sel makrofag dihitung

dengan bantuan mikroskop cahaya pada 3 *slide* dari masing-masing ulangan. Setiap preparat secara sistematis dihitung mulai dari pojok kiri bawah kemudian digeser ke atas hingga tepi atas jaringan, lalu digeser ke kanan kemudian ditarik ke bawah demikian seterusnya hingga ujung kanan jaringan sehingga semua lapangan terbaca. Jumlah makrofag tiap sampel ditentukan dengan menghitung jumlah rata-rata makrofag dari keempat perlakuan.

3.9 Analisis Data

Data hasil penelitian ini diuji normalitasnya dengan uji *Kolmogrov-Smirnov* untuk menentukan apakah distribusi keempat kelompok adalah normal. Kemudian data didapatkan berdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji homogenitas varian untuk menguji variasi populasi dengan menggunakan uji *Levene*. Data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan *one way ANOVA* dengan tingkat kepercayaan 95% ($p < 0,05$), terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) sehingga dilakukan dengan uji Tukey HSD untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok.

3.10 Bagan Alur Penelitian



Gambar 3.1 Bagan Alur Penelitian

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

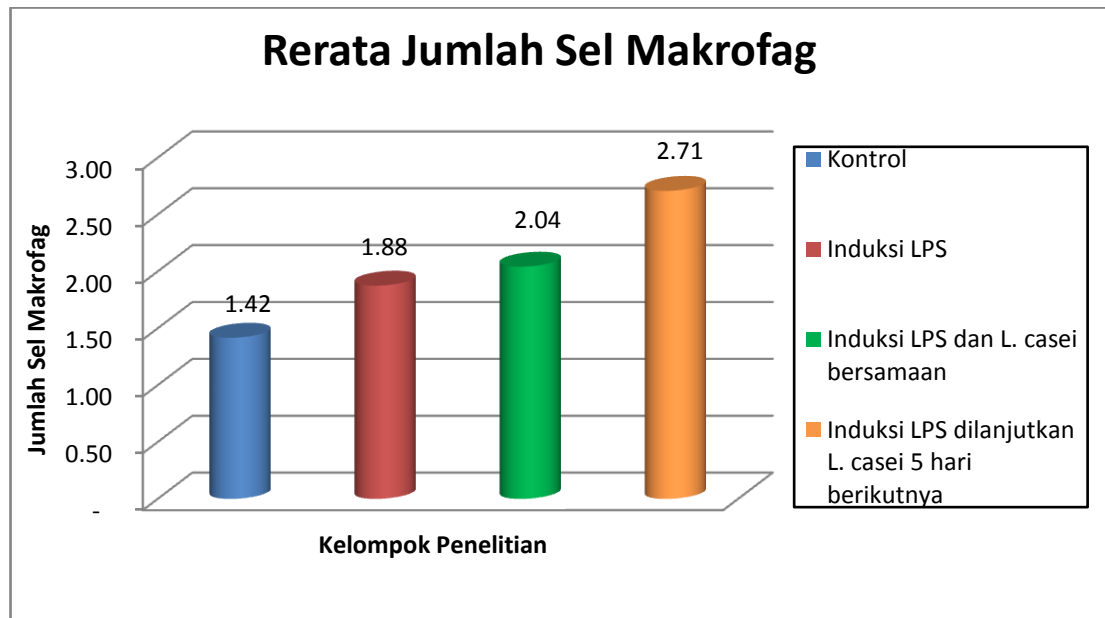
Berdasarkan hasil penelitian pemberian probiotik terhadap jumlah sel makrofag yang diinduksi lipopolisakarida *E.coli* yang dilaksanakan di laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember pada bulan Juli - September 2011, didapatkan data seperti tercatum pada tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil perhitungan rerata jumlah sel makrofag tikus wistar jantan pada beberapa kelompok.

No	Kelompok Perlakuan	N	Rerata (X)	Std. Deviasi (SD)
1	I	8	1,42	0,49
2	II	8	1,88	0,73
3	III	8	2,04	0,72
4	IV	8	2,71	0,8

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

Tabel 4.1 menunjukkan bahwa dari keempat kelompok percobaan diketahui rerata jumlah sel makrofag yang terendah adalah pada kelompok I yang merupakan kelompok kontrol tanpa diberi perlakuan sebesar 1,42 sel, kemudian kelompok kedua yang diinduksi LPS *E. coli* sebesar 1,88 sel, serta 2,04 sel induksi LPS dan probiotik *L. casei* secara bersamaan pada kelompok ke III, dan jumlah tertinggi pada kelompok IV yakni pemberian LPS dan *L. casei* secara berurutan sebesar 2,71 sel. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada gambar 4.1.



Gambar 4.1 Grafik batang rerata jumlah sel makrofag gingiva tikus wistar jantan pada berbagai kelompok

4.1.1 Analisis Data

Data hasil penelitian yang diperoleh terlebih dahulu diuji normalitas dengan menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov*. Ringkasan data hasil uji normalitas tersaji pada tabel 4.2 dan selengkapnya tersaji dalam lampiran D.1.

Tabel 4.2 Ringkasan hasil uji normalitas rerata jumlah sel makrofag gingiva tikus wistar jantan.

	Kontrol	LPS	Bersamaan	Berurutan
Kolmogorov-Smirnov Z	0,549	0,658	0,503	0,661
Asymp. Sig. (2-tailed)	0,924	0,78	0,962	0,775

Keterangan: Sig : data berdistribusi normal ($p > 0.05$)

Berdasarkan tabel di atas, diketahui dari keempat kelompok yaitu I, II, III dan IV adalah lebih besar dari 0,05 ($p > 0,05$), yang berarti semua kelompok berdistribusi normal. Selanjutnya data diuji dengan uji homogenitas varian menggunakan uji *Levene*. Ringkasan hasil data dapat dilihat pada tabel 4.3 di bawah ini.

Tabel 4.3 Ringkasan hasil uji homogenitas rerata jumlah sel makrofag gingiva tikus wistar jantan pada berbagai perlakuan.

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,621	3	28	,608

Keterangan: Sig : data homogen ($p > 0,05$)

Uji *Levene* tersebut menunjukkan nilai probabilitas 0,608 ($p > 0,05$) yang berarti ragam dari semua perlakuan adalah sama atau homogen. Setelah diketahui bahwa data berdistribusi normal dan homogen maka analisis statistik dilanjutkan dengan menggunakan uji statistik parametrik *oneway* ANOVA untuk mengetahui kemaknaan perbedaan dari keempat kelompok penelitian. Berdasarkan uji *oneway* ANOVA diketahui secara statistik menunjukkan nilai probabilitas sebesar 0,009 ($p < 0,05$) yang berarti adanya perbedaan signifikan terhadap rerata jumlah sel makrofag (tabel 4.4).

Tabel 4.4 Hasil uji *oneway* ANOVA terhadap rerata jumlah sel makrofag gingiva tikus wistar jantan pada berbagai perlakuan.

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6,881	3	2,294	4,706	,009*
Within Groups	13,647	28	,487		
Total	20,528	31			

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

Setelah diketahui bahwa ada perbedaan dari kelompok penelitian, maka untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok perlu dilakukan uji statistik lanjutan yaitu uji beda menggunakan uji tukey HSD, berikut ringkasan hasilnya.

Tabel 4.5 Ringkasan signifikansi uji beda tukey HSD terhadap rerata jumlah sel makrofag gingiva tikus wistar jantan.

Kelompok	Kelompok I	Kelompok II	Kelompok III	Kelompok IV
I	-	0,562	0,297	0,005*
II	0,562	-	0,963	0,103
III	0,297	0,963	-	0,247
IV	0,005*	0,103	0,247	-

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

Keompok I : Kontrol

Kelompok II : Induksi LPS

Kelompok III : Induksi LPS dan *L. casei* secara bersamaan selama 5 hari

Kelompok IV : Induksi LPS selama 5 dilanjutkan *L.casei* 5 hari berikutnya

Tabel 4.5 yang menunjukkan hasil uji tukey HSD rerata jumlah sel makrofag antar kelompok perlakuan, pada kelompok I, dan IV menunjukkan probabilitas sebesar 0,005 ($p < 0,05$) artinya terdapat perbedaan signifikan rerata jumlah sel makrofag. Namun, yang terlihat pada kelompok II dan IV menunjukkan probabilitas sebesar 0,103 ($p > 0,05$), pada kelompok III dan IV menunjukkan probabilitas sebesar 0,247 ($p > 0,05$), juga terlihat pada kelompok I dan III menunjukkan probabilitas sebesar 0,297 ($p > 0,05$), pada kelompok I dan II menunjukkan probabilitas sebesar 0,562 ($p > 0,05$), serta pada kelompok II dan III menunjukkan probabilitas sebesar 0,963 ($p > 0,05$), yang berarti tidak terdapat perbedaan yang signifikan rerata jumlah sel makrofag pada keempat kelompok perlakuan tersebut.

4.2 Pembahasan

Hasil penelitian yang dilakukan di laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember menunjukkan perbedaan dari masing-masing kelompok meskipun perbedaan tersebut tidak bermakna secara statistik, namun baik dari kelompok kontrol, yang diinduksi LPS maupun diinduksi LPS dan probiotik *L. casei* mempunyai jumlah sel makrofag yang berbeda.

Kelompok perlakuan yang diinduksi LPS selama 5 hari menunjukkan peningkatan jumlah makrofag dibandingkan dengan kelompok I yaitu kelompok kontrol, hal ini menunjukkan proses peradangan oleh LPS *E. coli* mampu

menstimulasi pembentukan makrofag yang berperan dalam garis pertahanan pertama terhadap infeksi.

Aktivitas makrofag tergantung pada sebuah lipopolisakarida (LPS) yang merupakan unsur utama dari permukaan bakteri gram negatif, dan pada interferon gamma (INF), sebuah sitokin yang diproduksi oleh limfosit-T terangsang antigen (Fawcett, 2002).

Peningkatan sistem pertahanan non-spesifik diantaranya fagositosis terjadi akibat adanya LPS (lipopolisakarida) atau peptidoglikan (PG) atau keduanya yang dilepas secara terus menerus oleh bakteri. PG merupakan komponen dinding sel bakteri gram positif dan negatif dan LPS komponen dinding sel bakteri gram negatif. Sejumlah kecil LPS dan PG dilepaskan secara terus menerus dan berinteraksi dengan permukaan sel inang, sehingga mengaktifkan sel makrofag, sel retikuloendotelial (RES) dan neutrofil untuk melepaskan berbagai mediator. (Winarsih *et al.*, 2007).

Lipopolisakarida bersifat endotoksik karena LPS mengikat reseptor CD14 yang mengakibatkan sekresi sitokin proinflamasi dari beberapa tipe sel. CD14 merupakan reseptor permukaan sel pada makrofag dan monosit untuk karbohidrat. Makrofag yang berikatan dengan bakteri oleh karena adanya CD14, akan mensekresi sitokin [interleukin-1 α (IL-1 α), IL-1 β , *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) dan *mediator lipid inflammation* yaitu prostaglandin (PGE₂)] (Indahyani *et al.*, 2007).

Dalam waktu beberapa menit setelah peradangan dimulai, makrofag telah ada di dalam jaringan berupa histosit di dalam subkutan, makrofag alveolus di paru, mikroglia di otak, atau yang lainnya, dan segera memulai kerja fagositiknya. Bila diaktifkan oleh produk infeksi dan peradangan, efek yang mula-mula terjadi adalah pembengkakan setiap sel-sel ini dengan cepat. Selanjutnya, banyak makrofag yang sebelumnya terikat kemudian lepas dari perlekatan dan menjadi *mobile*, membentuk lini pertama pertahanan tubuh terhadap infeksi selama beberapa jam pertama. Jumlah makrofag yang mengalami mobilisasi dini ini seringkali tidak banyak tetapi dapat menyelamatkan jiwa (Guyton dan Hall, 2007).

Waktu paruh monosit dalam sirkulasi sekitar 1 hari dibawah pengaruh molekul adhesi dan faktor kemotaksis, monosit mulai beremigrasi ke tempat jejas dalam waktu 1-2 hari pertama setelah onset inflamasi akut (Kumar *et al.*, 2007). Sumber lain mengatakan, dalam proses inflamasi jika keadaan homeostatis tercapai, maka PMN akan mengalami apoptosis dan berkurang jumlahnya pada hari ke 3-5 dan digantikan fungsinya oleh makrofag (Putu *et al.*, 2007).

Jumlah sel makrofag pada kelompok III dan IV yaitu induksi probiotik *L. casei* lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok yang hanya diberi LPS saja, hal ini disebabkan oleh pemberian *L. casei* dapat menstimulasi sistem pertahanan tubuh non-spesifik sehingga mampu meningkatkan jumlah sel makrofag untuk membantu proses fagositosis.

Beberapa strain bakteri asam laktat yang berpotensi sebagai agensia probiotik adalah *Lactobacillus acidophilus*, *L. reuteri*, *L. casei* demikian pula strain *Bifidobacterium*, karena bakteri ini memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen enterik (Purwandhani dan Rahayu, 2003).

Ada beberapa senyawa yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat yang bersifat antimikroba diantaranya adalah asam organik, hidrogen peroksida dan senyawa protein atau kompleks protein spesifik yang disebut bakteriosin (Kusumawati *et al.*, 2008). *Lactobacillus* mempunyai pengaruh antagonis terhadap berbagai jenis dan strain *Salmonella* dan *Escherichia coli*. Kemampuan bakteri asam laktat untuk menekan pertumbuhan berbagai bakteri baik gram positif maupun gram negatif sudah lama diketahui. Proses penekanan itu diduga karena produksi asam-asam organik, misalnya asam laktat dan asam asetat, yang dapat menghambat pertumbuhan berbagai bakteri, produksi hidrogen peroksida yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen melalui pengaruh oksidasi yang kuat pada sel bakteri atau melalui perusakan struktur molekul dasar dari pada asam-asam nukleat dan protein sel dan produksi protein yang spesifik yang disebut bakteriosin (Widyastuti, 1997).

Beberapa studi melaporkan peran probiotik untuk imunitas non-spesifik, adanya kemampuan memproduksi asam laktat, probiotik mampu meningkatkan efek

fagositosis terhadap patogen. *Lactobacillus* mampu menstimulasi sistem imun antara lain meningkatkan fungsi fagositosis makrofag, natural *killer cell*, monosit dan neutrofil (Sari, 2008).

Mencit *gremfree* yang diberi bakteri asam laktat selama 7 hari dapat meningkatkan kapasitas makrofagnya dalam memfagosit *Eschericia coli* (*E. coli*). Hal ini disebabkan bakteri *Lacobacillus* tersebut dapai menginduksi sitokin (Winarsih *et al.*, 2007).

Kelompok IV merupakan kelompok yang memiliki rerata paling besar dibandingkan kelompok lain, meskipun secara statistik perbedaan tersebut tidak signifikan. Hal ini dikarenakan jumlah bakteri yang meningkat ketika diinduksi LPS selama 5 hari secara langsung akan meningkatkan invasi sel makrofag, ditambah dengan pemberian probiotik *L. casei* 5 hari berikutnya maka akan merangsang pembentukan sel makrofag yang lebih banyak. Selain itu respon sel makrofag saat terjadi inflamasi seperti pada penjelasan sebelumnya bahwa dalam beberapa menit makrofag yang keluar hanya beberapa, namun setelah beberapa hari maka sel fagosit ini akan terlihat dominan pada jaringan yang mengalami peradangan.

Monosit dari darah akan memasuki jaringan yang meradang dan membesar menjadi makrofag bersama dengan invasi neutrofil. Namun jumlah monosit dalam sirkulasi darah sedikit, tempat penyimpanan monosit di sumsum tulang juga jauh lebih sedikit dari pada neutrofil. Oleh karena itu, pembentukan makrofag di area jaringan meradang jauh lebih lambat, dan memerlukan waktu beberapa hari supaya menjadi efektif. Selanjutnya bahkan setelah menginvasi jaringan yang meradang, monosit masih merupakan sel yang imatur, dan memerlukan waktu 8 jam atau lebih untuk membengkak ke ukuran yang jauh lebih besar dan membentuk lisosom dalam jumlah yang sangat banyak, barulah kemudian mencapai kapasitas penuh sebagai makrofag jaringan untuk proses fagositosis. Ternyata setelah beberapa hari sampai beberapa minggu, makrofag akhirnya datang dan mendominasi sel-sel fagositik di area yang meradang, karena monosit baru yang sangat meningkat dalam sumsum tulang (Guyton dan Hall, 2007).

Jika terus-menerus terdapat perangsangan dari jaringan yang meradang maka sumsum tulang dapat terus memproduksi sel-sel granulosit dan monosit dalam jumlah yang banyak sekali selama berbulan-bulan dan bahkan bertahun-tahun (Guyton dan Hall, 2007).

Berdasarkan hasil penelitian, diketahui bahawa pemberian probiotik mampu meningkatkan jumlah sel makrofag yang sebelumnya telah diinduksi LPS *E. coli*, pemberian LPS selama 5 hari dilanjutkan pemberian probiotik 5 hari berikutnya yaitu pada kelompok IV lebih efektif dalam meningkatkan jumlah sel makrofag dibandingkan dengan pemberian LPS dan probiotik selama 5 hari secara bersamaan.

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

- 1) Peningkatan jumlah sel makrofag dikarenakan adanya peradangan akibat induksi lipopolisakarida *E. coli* yang mampu menstimulasi makrofag.
- 2) Pemberian probiotik *L. casei* dapat mempengaruhi peningkatan jumlah sel makrofag gingiva tikus wistar jantan yang sebelumnya diinduksi lipopolisakarida *E. coli*.
- 3) Pemberian lipopolisakarida *E. coli* selama 5 hari dilanjutkan dengan pemberian probiotik *L. casei* 5 hari berikutnya lebih efektif untuk meningkatkan jumlah sel makrofag, dibandingkan dengan pemberian secara bersamaan.

5.2 Saran

- 1) Penelitian ini dapat digunakan sebagai acuan penelitian selanjutnya dengan menggunakan bakteri probiotik yang berbeda.
- 2) Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pemberian probiotik terhadap jumlah sel makrofag gingiva tikus wistar jantan yang diinduksi bakteri penyebab periodontal lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Dorland, W. A. N. 2002. *Kamus Kedokteran Dorland*. Alih bahasa oleh Huriawati Hartanto, *et al.* Jakarta: EGC. 1242.
- Bergman, M., Salma, H., Bessler, H., Omanski, M., Punskey, I., dan Djaldetti. 2002. Interaction Between Phagocytosis and IL-1 Production by Rat Peritoneal Macrophage. *Biomed Pharmacother.* 56: 1-4.
- Eroschenko, V.P. 2005. *diFiore's Atlas of Histology*. (Edisi Kesepuluh). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 28.
- Fauziah, dan Herawati. D., 2008. Aplikasi Subgingiva Gel Metronidasol 25% Sebagai Bahan Tambahan pada Scaling dan Root Planing. *Maj, Ked, Gigi.* 15 (2): 183-186.
- Fawcett, D. W. *Buku Ajar Histologi*. 2002. Alih bahasa oleh Jan Tamboyang. (Edisi Keduabelas). Jakarta: EGC. 138.
- Fine, D. H., Mendieta, C, Barnett, M. L., Furgang, D., Naini, A., dan Vincent, J. W. 1992. Endotoxin Levels in Periodontally Healthy and Diseased Site: Correlation With Levels Of Gram-Negative Bacteria. *J. Periodontal.* 63: 897-901.
- Flichy-Fernández, A.J., Alegre-Domingo, T., Peñarrocha-Oltra, D., dan Peñarrocha-Diago, M. 2010. Probiotic Treatment in the Oral Cavity: An Update. *J. Oral Med. Pathology.* 15 (5): 272-275.
- Grudianov, A. I., Dmitriev, N. A., dan Fomenko, E. V. 2002. Use of Probiotics Bifidumbacterin and Acilact in Tables in Therapy of Periodontal Inflammations. *Stomatologiia Mosk.* 81: 39-43
- Gupta, V., dan Gupta, B. 2010. Probiotic and Periodontal Disease:A current Update. *J. Oral heath comm. Dent.* 4(spl): 35-37.
- Guyton, A. C., dan Hall, J. E. 2007. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Alih bahasa oleh Irawati, *et al.* Editor Luqman Yanuar Rachman, *et al.* (Edisi Kesebelas). Jakarta: EGC. 456-457.
- Handajani, Supartinah, Marsetyawan, Asmara. 2006. Aktivitas Fagositosis Sel Makrofag Tikus Wistar Setelah Diinduksi Ekstrak Teh (*Camellia sinensis*) Konsentrasi 2 %. *Ind, J. Dent.* 13 (1): 7-8.

- Haniastuti, T., Susilowati, H., dan Djais, A.A. 2007. Sintesis Interleukin 1 β Makrofag Mencit yang Diinduksi Lipopolisakarida *E.coli* dan Minyak Atsiri Kencur (*Kaempferia galanga* L.) In Vitro. *Ind. J. Dent.* 14 (3): 194-198.
- Hardiningsih, R., Napitupulu, R. N. R., dan Yulinery, T. 2006. Isolasi dan Uji Resistensi Beberapa Isolat *Lactobacillus* pada pH Rendah. *Biodiversitas*, 7 (1): 15-17.
- Harti, A. S. 2009. Kajian Efek Sinergistik Probiotik dengan Prebiotik terhadap Diaregenik *Escherichia coli*. *Biomedika*, 2 (1).
- Herniyati, Sutjiat, Harmono, Arina, dan Hikmah. 2008. *Diktat Histologi*. (Tidak dipublikasikan). Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Unuversitas Jember. 14.
- Indahyani, D.E., Santoso, A.S., Utoro, T., dan H.N.E., M. 2007. Pengaruh Induksi Lipopolisakarida (LPS) terhadap Osteopontin Tulang Alveolaris Tikus pada Masa Erupsi Gigi. *Ind. J. Dent.* 14 (1): 2-7.
- Krasse, P., Carlsson, B., Dahl C., Paulsson, A., dan Nilsson, A. 2006. Decreased Gum and Gingivitis by the Probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Swed. Dent.* 30 (2): 55-60.
- Kumar, V., Cotran, R. S., dan Robbins, L. 2007. *Buku Ajar Patologi*. Cetakan I. Alih bahasa oleh Huriawati Hartanto, *et al.* Editor Muhammad Asroruddin, *et al.* (Edisi Ketuju). Jakarta: EGC. 43.
- Kusumawardani, B. 2005. Pengaruh Pajanan Lipopolisakarida Bakteri Gram Negatif terhadap Viabilitas Sel pada Kultur Fibroblas Gingiva. *Stomatognatic J. KG. Unej.* 2(3):14-18.
- Kusumawati, N., Jenie, B.S.L., Setyahadi, S., dan Hariyadi, R.D. 2008. Aktivitas Antibakteri Laktobasili Asal Makanan Fermentasi Indonesia Terhadap Patogen Dan Pengaruhnya Terhadap Mikroflora Usus Tikus. *J. Obat Bahan Alam*, 7 (1): 69-75.
- Lesson, C. R., Lesson, T. S., dan Paparo, A. A. 1992. *Buku Ajar Histologi*. Cetakan VI. Alih bahasa oleh Yan Tambayong, dkk. Jakarta: EGC. 117-118; 130.
- Niedobecki, D. 2011. Wybuch tlenowy. <http://bioinfo.mol.uj.edu.pl/articles/Niedobecki05>. [6 April 2011].
- Notoadmodjo, S. 2010. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta: PT Rineka Cipta. 59-60; 124-125.

- Ogbonnaya, C. 2005. Lesson 5: Bacteria. http://water.me.vccs.edu/courses/env108/Lesson5_print.htm. [7 April 2011].
- Purwandhani, S. N., dan Rahayu, E. S. 2003. Isolasi dan Seleksi *Lactobacillus* yang Berpotensi Sebagai Agensia Probiotik. *Agritec*, 23 (2): 67-74.
- Putu, A., M, Bakta., dan K, Budha. 2007. Makrofag Pengekspresi IL-1 β Serta Respon Inflamasi Sistemik pada Fiksasi Internal Dini Fraktur Femur Tertutup Lebih Rendah dibandingkan dengan yang tertunda. *J. Udayana*. 1 (3).
- Roberts, F. A., Richardson, G. J., dan Michalek, S. M. 1997. Effects of *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli* Lipopolysaccharides on Mononuclear Phagocytes. *Infect immun*. 65 (3): 248-254.
- Sari, D. S. 2008. Pengaruh Probiotik Terhadap Penyakit Periodontal. *Stomatognatic*, 5 (2): 106-109.
- Setioningsih, E., Setyaningsih, R., dan Susilowato, A. 2004. Pembuatan Minuman Probiotik dari Susu Kedelai dengan Inokulum *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*. *Bioteknologi*, 1 (1): 1-6.
- Susilowati, H., Haniastuti, T., Santoso, A. S. 2009. Produksi Nitrit Oksida dan Aktivitas Fagositosis Makrofag Mencit Setelah Stimulasi dengan Lipopolisakarida. *Maj. Ked. Gigi*. 16 (1): 19-24.
- Stamatova, I., dan Meurman, J. H. 2009. Probiotics: Health Benefits In The Mouth. *Am. J. Of Den*. 22 (6).
- Steel, R.G.D. & Torrie, J.H.. 1995. *Prinsip dan Prosedur Statistika*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama. 145-147.
- Syafriadi, M.,Subiyantoro, S., Setyorini, D., dan Joelijanto, R. 2008. *Patologi Anatomi, Degenerasi dan Radang*. (Tidak dipublikasikan). Petunjuk Praktikum. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Unuversitas Jember. 2-7.
- Wahyukundari, M. A. 2009. Perbedaan Kadar *Matrix Metalloproteinase-8* Setelah *Scaling* dan Pemberian Tetrasiklin pada Penderita Periodontitis Kronis. *Jurnal PDGI*, 58 (1): 1-6.

- Widodo, Suparno, dan Endang,W. 2003. Bioenkapsulasi Probiotik (*Lactobacillus casei*) dengan Pollard dan Tepung Terigu serta Pengaruhnya terhadap Viabilitas dan Laju Pengasaman. *Jurnal Teknologi Dan Industri Pangan*, XIV (2).
- Widyastuti, Yantyati. 1997. Probiotik, Pakan Tambahan untuk Ternak. *Biotek*. XI (1-2): 8-9.
- Winarsih, Priosoeryanto, Lay, Wibawan, KOMPIANG. 2007. Pengaruh Probiotik terhadap Fagositosis Polimorfonuklear Ayam Broiler. *J. Med.Vet. Indones*. 11 (2): 37-43.
- Wong. A. 2010. *Lactobacillus casei*. http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Lactobacillus_casei. [9 April 2010].
- Yulinery, T., Yulianto, E., dan Nurhidayat, N. 2006. Uji Fisiologis Probiotik *Lactobacillus sp.* Mar 8 yang Telah Dienkapsulasi dengan Menggunakan *Spray Dryer* untuk Menurunkan Kolesterol. *Biodiversitas*, 7 (2): 118-122.

LAMPIRAN

Lampiran A. Surat *Ethical Clearence*



KETERANGAN KELAIKAN ETIK PENELITIAN ("ETHICAL CLEARANCE")

No. 173/KKEP/FKG-UGM/EC/ 2011

Setelah Tim Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada mempelajari dengan seksama rancangan penelitian yang diusulkan:

Judul : "Pemberian Probiotik terhadap Jumlah Sel Makrofag
 Gingiva Tikus Wistar Jantan yang Diinduksi
 Lipopolisakarida E.Coli"

Peneliti Utama : Ria Faisah

Penanggung jawab medis : drg. M. Nurul Amin, M.Kes
 drg. Desi Sandra Sari, MD.Sc.

Unit/Lembaga : FKG Universitas Jember

Tempat Penelitian : 1. Lab. Histologi FKG Universitas Jember
 2. Lab Fisiologi FKG Universitas Jember

Waktu Penelitian : Agustus 2011 - Selesai

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

Yogyakarta, 24 Agustus 2011

Ketua Komisi Etik Penelitian FKG UGM

drg. Suryono, S.H., Ph.D.

Lampiran B. Surat Ijin Penelitian



KEMENTERIAN PENDIDIKAN NASIONAL RI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
Jl. Kalimantan No. 37 Jember ☎ (0331) 333536, Fak. 331991

Nomor : 1536 /H25.1.8/PL.5/2011
Lampiran : -
Perihal : Ijin Penelitian

Kepada Yth.
Ka. Bag. BIOMEDIK FKG Universitas Jember
c.q PJMK. HISTOLOGI FKG Universitas Jember
di
Jember

Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan Skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan ijin Penelitian bagi mahasiswa di bawah ini :

1. Nama : Ria Faisah
2. NIM : 081610101038
3. Tahun Akademik : 2010/2011
4. Fakultas : Kedokteran Gigi Universitas Jember
5. Alamat : Jl. Mastrip II/31 Jember
6. Judul Penelitian : Pemberian Probiotik Terhadap Jumlah Sel Makrofag Gingiva Tikus Wistar Jantan Yang Diinduksi Lipopolisakarida E.Coli
7. Lokasi Penelitian : Lab. Histologi FKG UNEJ
8. Data/Alat yg dipinjam : Petridish, Autoclave, dll
9. Waktu : Juni 2011 -Selesai
10. Tujuan Penelitian : Untuk Mengetahui Pemberian Probiotik Terhadap Jumlah Sel Makrofag Gingiva Tikus Wistar Jantan Yang Diinduksi Lipopolisakarida E.Coli
11. Dosen Pembimbing : 1. drg. M. Nurul Amin, M.Kes
2. drg. Dessi Sandra Sari, MD.Sc

Demikian atas perkenan dan kerjasama yang baik disampaikan terima kasih.

Jember, 22 Juni 2011
an. Dekan
Penyulu Dekan I



Gardian Parnaadij, M.Kes, Sp.Prost
☎ 6901219996011001

Tembusan Kepada Yth.
- PJMK Histologi FKG Universitas Jember

Acc. Sekbag Paomedik. 30/6/11

Lampiran C. Hasil Perhitungan Jumlah Sel Makrofag

C.1 Data Jumlah Makrofag Kelompok I

PREPARAT	POTONGAN	L. PANDANG	RERATA
1	1	3	1,67
	2	1	
	3	1	
2	1		1,33
	2	1	
	3	1	
3	1	2	1,67
	2	1	
	3	2	
4	1	1	1,33
	2	2	
	3	1	
5	1	3	2,33
	2	2	
	3	2	
6	1	0	0,67
	2	1	
	3	1	
7	1	2	1,33
	2	1	
	3	1	
8	1	1	1,00
	2	2	
	3	0	

C.2 Data Jumlah Makrofag Kelompok II

PREPARAT	POTONGAN	L. PANDANG	RERATA
1	1	0	0,67
	2	1	
	3	1	
2	1	1	1,33
	2	2	
	3	1	
3	1	2	1,67
	2	2	
	3	1	
4	1	1	1,33
	2	2	
	3	1	
5	1	2	2,33
	2	3	
	3	2	
6	1	3	2,67
	2	2	
	3	3	
7	1	2	2,67
	2	3	
	3	3	
8	1	3	2,33
	2	3	
	3	1	

C.3 Data Jumlah Makrofag Kelompok III

PREPARAT	POTONGAN	L. PANDANG	RERATA
1	1	2	2,67
	2	3	
	3	3	
2	1	2	2,33
	2	3	
	3	2	
3	1	1	0,67
	2	1	
	3	0	
4	1	3	1,67
	2	1	
	3	1	
5	1	1	1,67
	2	2	
	3	2	
6	1	3	3,00
	2	3	
	3	3	
7	1	2	2,33
	2	3	
	3	2	
8	1	2	2,00
	2	1	
	3	3	

C.4 Data Jumlah Makrofag Kelompok IV

PREPARAT	POTONGAN	L. PANDANG	RERATA
1	1	3	3,00
	2	3	
	3	3	
2	1	2	2,67
	2	3	
	3	3	
3	1	2	3,00
	2	3	
	3	4	
4	1	2	2,00
	2	2	
	3	2	
5	1	1	1,67
	2	2	
	3	2	
6	1	3	2,67
	2	2	
	3	3	
7	1	5	4,33
	2	4	
	3	4	
8	1	2	2,33
	2	3	
	3	2	

C.5 Rerata Jumlah Makrofag Gingiva Tikus Wistar pada Berbagai Perlakuan

Preparat	Pelakuan			
	I	II	III	IV
1	1,67	0,67	2,67	3,00
2	1,33	1,33	2,33	2,67
3	1,67	1,67	0,67	3,00
4	1,33	1,33	1,67	2,00
5	2,33	2,33	1,67	1,67
6	0,67	2,67	3,00	2,67
7	1,33	2,67	2,33	4,33
8	1,00	2,33	2,00	2,33
Rerata (X)	1,42	1,88	2,04	2,71
Std. Deviasi (SD)	0,49	0,73	0,72	0,8

Jember, 8 September 2011

Mengetahui,

Pemeriksa

Penanggung jawab
Kepala bagian Lab. Histologi

Sri Wahyuningsih, A. Md
NIP. 197601211999032009

drg. Happy Harmono, M. Kes
NIP. 196709011997021001

Lampiran D. Analisis Data

D.1 Uji Normalitas Kolmogorov-Smirnov

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		I	II	III	IV
N		8	8	8	8
Normal Parameters(a,b)	Mean	1,4163	1,8750	2,0425	2,7088
	Std. Deviation	,49515	,73350	,72101	,80409
Most Extreme Differences	Absolute	,194	,232	,178	,234
	Positive	,194	,146	,097	,234
	Negative	-,181	-,232	-,178	-,106
Kolmogorov-Smirnov Z		,549	,658	,503	,661
Asymp. Sig. (2-tailed)		,924	,780	,962	,775

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

D.2 Uji Homogenitas Levene

Descriptives

data

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					1	8		
2	8	1,8750	,73350	,25933	1,2618	2,4882	,67	2,67
3	8	2,0425	,72101	,25491	1,4397	2,6453	,67	3,00
4	8	2,7088	,80409	,28429	2,0365	3,3810	1,67	4,33
Total	32	2,0106	,81375	,14385	1,7172	2,3040	,67	4,33

Test of Homogeneity of Variances

data

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,621	3	28	,608

D.3 Uji *One way* ANOVA

ANOVA

data

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6,881	3	2,294	4,706	,009
Within Groups	13,647	28	,487		
Total	20,528	31			

Multiple Comparisons

D.4 Uji Beda Tukey HSD

Dependent Variable: data

Tukey HSD

(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-,45875	,34907	,562	-1,4118	,4943
	3	-,62625	,34907	,297	-1,5793	,3268
	4	-	,34907	,005	-2,2456	-,3394
2	1	,45875	,34907	,562	-,4943	1,4118
	3	-,16750	,34907	,963	-1,1206	,7856
	4	-,83375	,34907	,103	-1,7868	,1193
3	1	,62625	,34907	,297	-,3268	1,5793
	2	,16750	,34907	,963	-,7856	1,1206
	4	-,66625	,34907	,247	-1,6193	,2868
4	1	1,29250(*)	,34907	,005	,3394	2,2456
	2	,83375	,34907	,103	-,1193	1,7868
	3	,66625	,34907	,247	-,2868	1,6193

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

Homogeneous Subsets

data

Tukey HSD

kelompok	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
1	8	1,4163	
2	8	1,8750	1,8750
3	8	2,0425	2,0425
4	8		2,7088
Sig.		,297	,103

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 8,000

Lampiran E. Foto Alat Penelitian

(A). Neraca; (B). *Blade, scalpel*; (C). Pinset anatomis; (D). Gunting bedah; (E). *Syringe* ; (F). *Syringe* insulin 30G; (G). Pinset cirurgis; (H). Sarung tangan; (I). Petridish bersekat; (J). Masker; (K). Baki

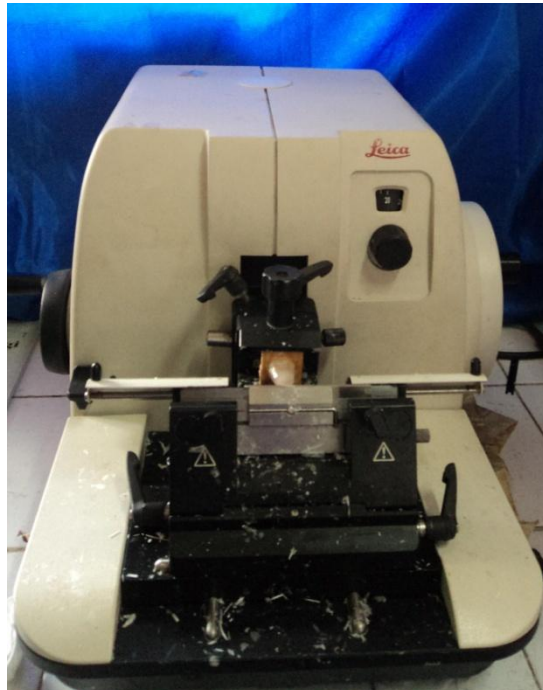
Gambar E.1 Alat Penelitian



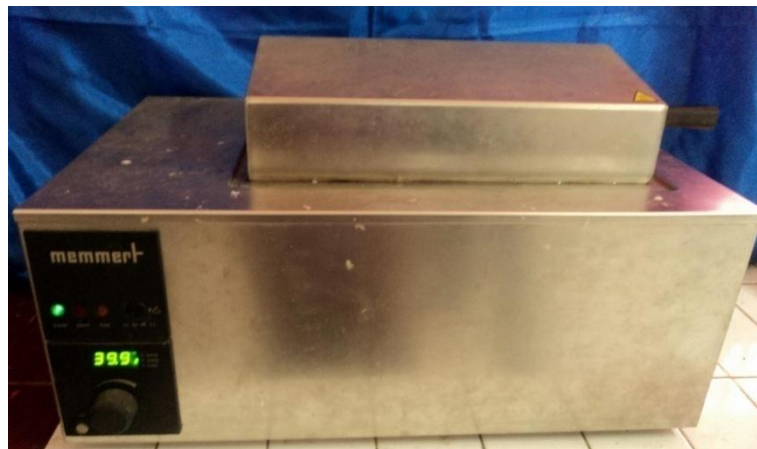
Gambar E.2 Inkubator (Mettler, Jepang)



Gambar E.3 Filing Cabinet (Sakura, Jepang)



Gambar E.4 Mikrotom putar (Leica RM 2135, Jepang)



Gambar E.5 *Waterbath* (Memmert, Jepang)



Gambar E.6 Slide Warmer (Sakura, Jepang)



Gambar E.7 Automatic Staining (Sakura, Jepang)



Gambar E.8 Mikroskop binokuler (Olympus CX21LED, Jepang)

Lampiran F. Foto Bahan Penelitian



Gambar F.1 Tikus wistar jantan dan kandang tikus



(A). Makanan standar tikus wistar; (B). Formalin 10%; (C). Minuman tikus; (D). Lipopolisakarida *E. coli*; (E). Ketamin; (F). Aquades steril

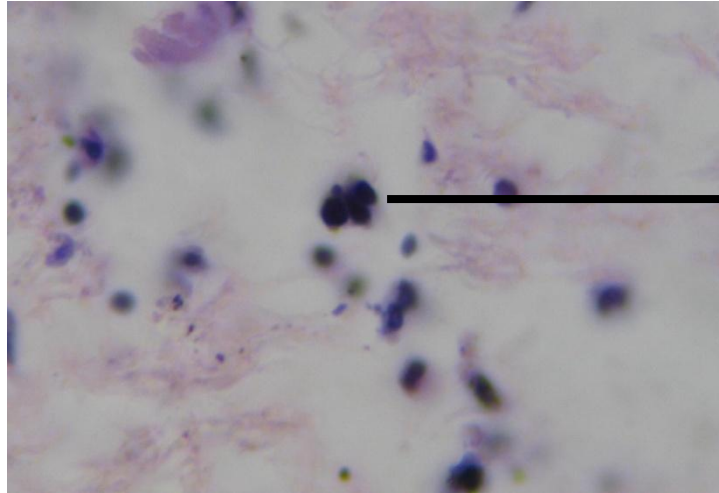
Gambar F.2 Bahan Perlakuan



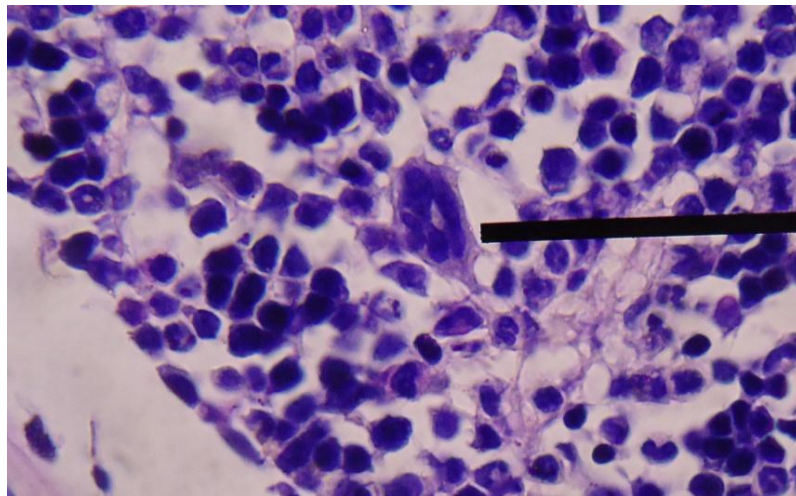
(1). Alkohol 100%; (2). Xilol; (3). Parafin; (4). Formic acid; (5). Alkohol 95%; (6). Alkohol 80%; (7). Alkohol 70%; (8). Kristal Eosin; (9). Entellen; (10). Kristal Hemaktosilin; (11). *Object glass*; (12). *Deck glass*; (13). Minyak Emersi

Gambar F.3 Bahan Pemrosesan dan Pewarnaan Histologi

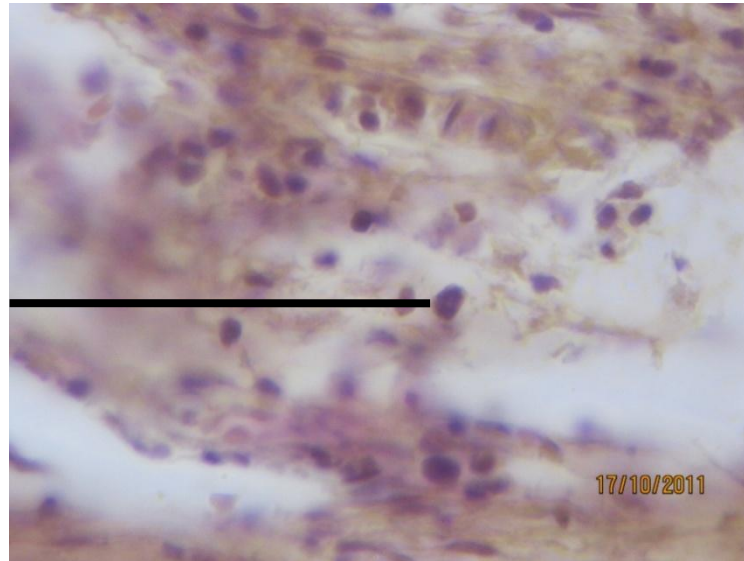
Lampiran G. Gambaran Histologi Sel Makrofag



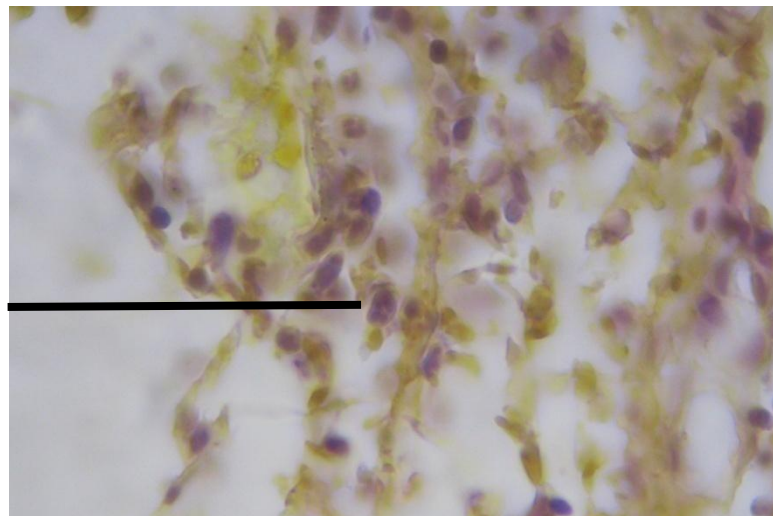
Gambar G.1 Gambaran sel makrofag pada kelompok kontrol dengan pembesaran 1000x



Gambar G.2 Gambaran histologi sel makrofag pada kelompok II yakni induksi LPS dengan pembesaran 1000x



Gambar G.3 Gambaran sel makrofag pada kelompok III (induksi LPS dan probiotik selama 5 hari) dengan pembesaran 1000x



Gambar G.4 Gambaran sel makrofag pada kelompok IV yang diinduksi LPS selama 5 hari dilanjutkan Probiotik 5 hari berikutnya) dengan pembesaran 1000x