

MAJALAH ILMU KEDOKTERAN GIGI

Volume 1, Nomor 1, APRIL 2017

- | | | |
|--------------------------|--|---------|
| <input type="checkbox"/> | PERBEDAAN KADAR OSTEOCALCIN ANTARA BCS DAN β-TCP PADA TERAPI POKET INFRABONI | 1 - 5 |
| | Yenny Yokung Yong, Kwartarini Murdiastuti, dan Dahlia Herawati | |
| <input type="checkbox"/> | PENGARUH LAMA AKTIVASI PLATELET RICH PLASMA DENGAN KOLAGEN TERHADAP KADAR FIBROBLAST GROWTH FACTOR-2 CAIRAN SULKUS GINGIVA | 6 - 11 |
| | Adisty Restu Poetri, Kwartarini Murdiastuti, dan Sudibyo | |
| <input type="checkbox"/> | PERBEDAAN KADAR OSTEOPONTIN CAIRAN SULKUS GINGIVA ANTARA PENAMBAHAN PLATELET RICH PLASMA-KOLAGEN DENGAN GEL PLATELET RICH PLASMA PADA TERAPI BEDAH FLAP | 12 - 16 |
| | Fransisca Kariyanto, Kwartarini Murdiastuti, dan Sri Pramestri Lastianny | |
| <input type="checkbox"/> | EKSPRESI RANKL DAN OPG PADA DAERAH TARIKAN PERGERAKAN GIGI ORTODONTI SETELAH PEMBERIAN BUBUK IKAN TERI (<i>stolephorus sp</i>) | 17 - 20 |
| | Tecky Indriana | |
| <input type="checkbox"/> | FAKTOR RISIKO COATED TONGUE PADA PASIEN LANJUT USIA DI PUSKESMAS UJUNG BERUNG BANDUNG (LAPORAN PENELITIAN) | 21 - 23 |
| | Nanan Nur'aeny, Indah Suasani Wahyuni, Wahyu Hidayat, dan Kartika Indah Sari | |
| <input type="checkbox"/> | DESKRIPSI LESI RONGGA MULUT PADA PENDERITA HIV/AIDS | 24 - 26 |
| | Wahyu Hidayat, Nanan Nur'aeny, Indah Suasani Wahyuni, dan Tenny Setiani Rudi Wisaksana | |
| <input type="checkbox"/> | PENGARUH GEL PROBIOTIK <i>Lactobacillus plantarum</i> KOMBINASI <i>Lactobacillus brevis</i> PADA SCALING ROOT PLANING PASIEN PERIODONTITIS KRONIS DENGAN DIABETES MELITUS TIPE 2 TIDAK TERKONTROL (Kajian Jumlah Koloni Bakteri Anaerob dan Kadar Tumor Necrosis Factor-α pada Cairan Sulkus Gingiva)(Penelitian) | 27 - 30 |
| | Laksmi Handayani Prammulat, Sri Pramestri Lastianny, dan Kwartarini Murdiastuti | |
| <input type="checkbox"/> | PENAKAIAN EKSTRAK BUAH BIT SEBAGAI BAHAN PEWARNA PLAK PADA PASIEN YANG DATANG KE KLINIK PERIODONSIA FKG UNPAD | 31 - 35 |
| | Aldilla Miranda, Nunung Rusminah, Amaliya, dan Prajna Metta | |
| <input type="checkbox"/> | EFEKTIVITAS IRIGASI HIDROGEN PEROKSIDA 1,5% SETELAH SCALING ROOT PLANING PADA PERIODONTITIS DIABETIKA. (Kajian pada Kadar TNF - α dan Jumlah Koloni Bakteri Anaerob Cairan Sulkus Gingiva) | 36 - 41 |
| | Isnaya Nosartika, Ahmad Syaify, dan Soetomo Nawawi | |
| <input type="checkbox"/> | PERBEDAAN KADAR TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA (TNF-α) CAIRAN SULKUS GINGIVA PADA PENDERITA GINGIVITIS PENGGUNA KONTRASEPSI (Kajian pada Akseptor KB Pil, Suntik dan Implan) | 42 - 47 |
| | Edi Karyadi, Ahmad Syaify, dan Soetomo Nawawi | |
| <input type="checkbox"/> | EKSPRESI TUMOR NECROSIS FACTOR-α DAN INTERLEUKIN-1 β SETELAH DI INDUKSI CRUDE PROTEIN BAKTERI <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> PADA MODEL AGGRESSIVE PERIODONTITIS | 48 - 54 |
| | Desi Sandra Sari, Peni Pujjastuti, Depi Praharani, Melok Aris, dan Fourier D.E. Latief | |
| <input type="checkbox"/> | PERAWATAN ANKYLOGLOSSIA DENGAN LASER DIODE | 55 - 58 |
| | Trijani Suwandi | |
| <input type="checkbox"/> | MANAJEMEN JARINGAN LUNAK DAN KERAS PADA CROWN LENGTHENING FUNGSIONAL | 59 - 63 |
| | Marie Louisa dan Trijani Suwandi | |
| <input type="checkbox"/> | CROWN LENGTHENING DENGAN GINGIVECTOMI SEBAGAI PENANGANAN GUMMY SMILE | 64 - 67 |
| | Suci Amalia Lubis dan Ina Hendiani | |
| <input type="checkbox"/> | KEPUCATAN MUKOSA ORAL SEBAGAI PENANDA ANEMIA | 68 - 72 |
| | Indah Suasani Wahyuni, Wahyu Hidayat, dan Nanan Nur'aeny | |
| <input type="checkbox"/> | DEPIGMENTASI GINGIVA DAN CROWN LENGTHENING SEBAGAI DUKUNGAN ESTETIK PADA REHABILITASI GIGI | 73 - 75 |
| | Lavinia Devin Irawan dan Kwartarini Murdiastuti | |
| <input type="checkbox"/> | PERAN BIOLOGIC WIDTH PADA CROWN LENGTHENING YANG MENGGUNAKAN PENGURANGAN TULANG ALVEOLAR | 76 - 79 |
| | Pandu Kridalaksana | |
| <input type="checkbox"/> | PERAWATAN KETERLIBATAN FURKASI KELAS III DENGAN PROSEDUR HEMISEKSI | 80 - 83 |
| | Dyah Nindita Carolina dan Ina Hendiani | |
| <input type="checkbox"/> | PERAWATAN ENLARGEMENT GINGIVA PADA PERIODONTITIS KRONIS DIPERBERAT OLEH MALPOSISI GIGI | 84 - 86 |
| | Eka Pramudita Ramadhany dan Dahlia Herawati | |
| <input type="checkbox"/> | PERAWATAN BEDAH GINGIVOBRASIF & FRENEKTOMI LABIAL UNTUK PERTIMBANGAN ESTETIK | 87 - 90 |
| | Octaviani FP, Hendiani I, dan Miranda A | |
| <input type="checkbox"/> | PENATALAKSANAAN EPULIS GRANULOMATOSA | 91 - 92 |
| | Erwin Wijaya dan Dahlia Herawati | |
| <input type="checkbox"/> | APEKSIFIKASI PADA GIGI PASCA TRAUMA MENGGUNAKAN MTA DAN SILER BERBAHAN DASAR KALSIMUM HIDROKSIDA | 93 - 97 |
| | Arafita Putri Fardani dan Ema Mulyawati | |





Penanggung jawab
Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada

Wakil Penanggung jawab
**Wakil Dekan Bidang Akademik dan Kemahasiswaan
Ketua Departemen Periodonsia**

Pemimpin Umum/Pemimpin Redaksi
Dahlia Herawati

Staf Redaksi
**Hendrawati
Kwartarini Murdiastuti
Sri Pramestri Hastianny
Vincensia Maria Karina**

Mitra Bestari
**Sudibyo
Al Sri Koes Soesilowati**

Sekretaris
Lavinia Devin Irawan

Puji Syukur kepada Yang Maha Esa, atas kekuatan untuk tetap menerbitkan majalah MIKGI. Pada kesempatan acara Periodontik Terkini V, bulan April 2017, terkumpul banyak hasil penelitian dan laporan kasus yang perlu dipublikasikan agar berguna untuk semuanya, karena itu tidak lupa terimakasih pada pendukung majalah ini, sekaligus memberitahukan bahwa majalah MIKGI direncanakan akan terbit setiap bulan April dan Oktober. Kami tunggu naskah ilmiah Anda.

Yogya, April 2017
Pemimpin Redaksi

Diterbitkan oleh :

Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta
setiap April dan Oktober

Alamat redaksi: Departemen Periodonsia FKG UGM, Tlp. & Fax. (0274)547130

EKSPRESI TUMOR NECROSIS FACTOR- α DAN INTERLEUKIN-1 β SETELAH DI INDUKSI CRUDE PROTEIN BAKTERI *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* PADA MODEL AGGRESSIVE PERIODONTITIS

Desi Sandra Sari*, Peni Pujiastuti*, Depi Praharani*, Melok Aris*, dan Fourier D.E. Latief**

*Departement of Periodontology, Faculty of Dentistry, University of Jember

**Departement of Physics, Faculty of Mathematics and Science, Institute Technology Bandung, Bandung, Indonesia

ABSTRAK

Latar belakang : Lipopolisakarida merupakan substansi dari patogen periodontal *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*). Lipopolisakarida ini mampu mempengaruhi ekspresi sel-sel inflamasi untuk memproduksi sitokin IL-1 β dan TNF- α . Lama pemberian protein sampai saat ini masih belum diketahui dalam meningkatkan ekspresi TNF alpha dan IL-1 beta pada sel makrofag jaringan akar gigi. **Metode.** *Crude protein A. actinomycetemcomitans* sebanyak 20 ug/mL diinjeksikan ke dalam sulcus molar satu dan kedua kanan bukal mandibula tikus wistar. Pemberian *crude protein A. actinomycetemcomitans* diberikan secara injeksi seminggu 3x selama 6 minggu. Tikus didekaputasi pada hari ke 3 dan 7 setelah induksi terakhir minggu ke-6. Ekspresi IL-1 β dan TNF- α pada sel makrofag diamati dengan teknik immunohistokimia. Gambaran resorpsi tulang menggunakan *micro-computed tomography* (μ -CT). Hasil dianalisis dengan uji ANOVA. **Hasil.** *Crude protein A. actinomycetemcomitans* mampu meningkatkan baik ekspresi IL-1 β dan TNF- α pada hari ke-7 setelah injeksi pada sel makrofag. Ekspresi IL-1 β dan TNF- α meningkat secara signifikan pada saat hari ke-7 setelah injeksi *crude protein* dibandingkan dengan kontrol. Hasil μ -CT menunjukkan ada perbedaan pada tulang alveolar yang diinjeksi *crude protein A. actinomycetemcomitans* dibanding kontrol. **Kesimpulan.** *Crude protein A. actinomycetemcomitans* mampu meningkatkan faktor inflamasi melalui peningkatan sitokin IL-1 β dan TNF- α pada sel sel makrofag.

Kata kunci: *Crude protein Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, makrofag, inflamasi, μ -CT

PENDAHULUAN

Aggressive periodontitis merupakan penyakit periodontal yang ditandai terbentuknya poket yang dalam dan resorpsi tulang alveolar yang sangat cepat. Bakteri patogen yang dominan ditemukan sekitar 50% pada poket periodontal adalah *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) (Kebschull dan Dommisch, 2015). *A. actinomycetemcomitans* merupakan bagian dari flora normal rongga mulut di banyak individu yang sehat, tetapi juga merupakan agen etiologi utama dalam beberapa bentuk dari penyakit periodontitis.

A. actinomycetemcomitans memiliki 3 faktor virulensi yaitu: 1) faktor virulensi kolonisasi dan persistensi, 2) interferensi dengan daya tahan inang dan 3) faktor virulensi yang merusak jaringan inang (Malik *et al.*, 2015). *A. actinomycetemcomitans*, patogen tidak hanya di periodontal tetapi juga di beberapa infeksi non oral, memiliki beberapa protein virulensi yang berkontribusi terhadap kemampuannya untuk terjadinya inflamasi, bertahan dalam poket periodontal, menolak dan menghindari pertahanan inang sehingga menyebabkan kerusakan jaringan

gigi lunak dan keras, serta mengganggu perbaikan jaringan inang setelah infeksi (Henderson *et al.*, 2010).

Protein adalah komponen utama dari organisme hidup dan untuk melakukan berbagai fungsi penting dalam sel. *Crude protein* bakteri *A. actinomycetemcomitans* merupakan kandungan protein dalam sel bakteri baik yang endotoksin maupun yang eksotoksin (Francis *et al.*, 2014). *A. actinomycetemcomitans* memproduksi dua eksotoksin yaitu *leukotoxin* (LtxA) dan *Cytoheal distending toxin* (Cdt). Efek yang ditimbulkan oleh toksin yang dikeluarkan oleh *A. actinomycetemcomitans* pada sel inang antara lain kematian sel, pertumbuhan yang tertahan dan induksi pada respon mediator inflamasi termasuk resorpsi tulang. Induksi dari *leukotoxin* menyebabkan kematian sel target. Reseptor sel target yang terlibat dalam induksi *leukotoxin* akan mengalami lisis sel yang merupakan fungsi limfosit terkait reseptor 1 (LFA-1) (Raja *et al.*, 2014).

Salah satu faktor virulensi endotoksin yang terpenting dalam mempengaruhi pro inflamasi inang adalah lipopolisakarida (LPS) yang berasal dari membran sel bakteri. LPS meningkatkan ekspresi pro-IL-1 β di sel makrofag. *A. actinomycetemcomitans*

endotoksin memiliki potensi untuk memodulasi respon inang dan berkontribusi terhadap kerusakan jaringan dan kehilangan tulang alveolar. Kemampuan LPS *A. actinomycetemcomitans* merangsang makrofag untuk melepaskan *interleukin-1 β* (IL-1 β), dan *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) (Park *et al.*, 2015)

IL-1 β dihasilkan oleh makrofag, sel endotel, sel fibroblas yang memiliki kemampuan menginduksi sitokin lain dan melawan infeksi. TNF- α juga memiliki sifat menstimulasi resorpsi tulang dengan menginduksi proliferasi dan diferensiasi progenitor osteoklas dan mengaktifkan formasi osteoklas secara tidak langsung. (Hienz *et al.*; 2015).

Penelitian ini bertujuan melihat ekspresi sitokin proinflamatori IL-1 β dan TNF- α setelah injeksi *crude protein A. actinomycetemcomitans* pada mandibula tikus wistar.

METODE PENELITIAN

Jenis penelitian yang digunakan adalah *eksperimental* di laboratorium dengan rancangan penelitian *randomized control group posttest only design*. Tempat penelitian di Laboratorium Mikrobiologi dan Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Laboratorium *Bioscience* RSGM Universitas Jember dan Bagian Biomedik Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, serta di Fakultas Fisika FMIPA ITB

Hewan Coba

Unit eksperimen penelitian menggunakan tikus putih jantan *Rattus norvegicus strain Wistar* dan sehat dengan kriteria inklusi tikus putih *Rattus norvegicus strain Wistar* yang: berusia 12-14 minggu, jenis kelamin jantan, berat badan 200-250 gr. Kriteria eksklusi: tikus yang berpenyakit, atau infeksi, tikus yang cacat fisik, tikus yang berperilaku agresif. Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 30 ekor tikus dibagi dalam 6 kelompok. Adapun besar sampel didapat dari perhitungan rumus (Lemeshow *et al.*, 1997). Penelitian ini sudah mendapatkan persetujuan Unit Etika dan Advokasi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada (No.00748/KKEP/FGK-UGM/EC/2016).

Kultur Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Bakteri *A. actinomycetemcomitans* dengan strain Y4 serotype b ditumbuhkan pada media *brain heart infusion* dengan ditambahkan 1% *yeast extract* pada suhu 37°C dengan kadar 10% CO₂ menggunakan *GasPack CO₂ generating sachet* selama 7-10 hari (Izawa *et al.* 2014).

Persiapan Pembuatan *Crude Protein Bakteri Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Bakteri *A. actinomycetemcomitans* isolat lokal/ serotipe b yang telah diisolasi dan dilakukan dengan cara menurut Westphal and Jann. Adapun cara isolasi *crude protein* adalah menggunakan metode penol. Suspensi bakteri sebanyak 500 ml disentrifugasi dengan putaran 15000 g (6000 rpm) selama 1 jam. Pelet yang diperoleh, dilakukan resuspensi dalam 10 ml *deionized water* (yang sudah dipanaskan pada suhu 72-75°C). Kemudian suspensi tersebut divorteks selama 20 detik dan diletakkan dalam *water bath* pada suhu 72-75°C dengan mulut tabung terbuka. Ditambahkan 10 ml larutan fenol 88% (sebelumnya dipanaskan pada suhu 72-75°C) kemudian tabung divorteks dan diinkubasikan selama 15 menit dalam *waterbath* (Westerman *et al.* 1997).

Pembuatan Model *Aggressive Periodontitis*

Hewan coba sebelum diberi diinduksi *crude protein* bakteri *A. actinomycetemcomitans*, dilakukan anestesi dengan menggunakan kombinasi ketamine dan xylazine. Dosis yang diberikan adalah ketamine 40-75 mg/kg dan xylazine 5-10 mg/kg perbandingan 1: 1 secara intra muskular pada paha posterior sebelah kanan dengan durasi efek anestesi sekitar 20-30 menit. Pembuatan model *aggressive periodontitis* dilakukan dengan induksi *crude protein* bakteri *A. actinomycetemcomitans* disuntikan pada interproksimal gingiva antara gigi molar pertama dan kedua kanan bukal mandibula. Setiap hewan coba diberi *crude protein* bakteri *A. actinomycetemcomitans* dengan volume 20 μ l dan konsentrasi 0,5 mg/ml dengan *syringe tuberculin* 1 cc/ml (terumo) dengan *needle* 30 G (BD), diberikan 3 kali seminggu selama 6 minggu. Setelah injeksi pada interproksimal gingiva antara gigi molar pertama dan kedua kanan bukal mandibula (Rogers *et al.* 2007; Jin *et al.* 2014).

Micro-Computed Tomography (μ -CT)

Aggressive periodontitis akan terlihat dengan adanya penurunan tulang alveolar yang dilihat dengan *micro-computed tomography* (μ -CT). Kedua sampel dipindai menggunakan perangkat Bruker SkyScan 1173. Perangkat tersebut merupakan pemindai sinar-X energi tinggi yang merupakan bagian dari fasilitas *Advanced Laboratory* FMIPA ITB. Sampel perlakuan dipindai dengan tegangan sumber sinar-X 60 kV, arus sumber 50 μ A dan waktu paparan 125 ms dan menggunakan penapis Al 1.0mm. Detektor panel datar yang digunakan diatur pada mode *bin* 4x4 yang menghasilkan citra proyeksi berukuran 560x560 piksel dengan resolusi sebesar

24 μm /piksel. Dudukan sampel berrotasi dengan langkah rotasi $0,2^\circ$ dengan rotasi total sebesar 180° . Selama proses pemindaian, opsi perata-rataan citra diatur pada nilai 10 untuk mengurangi *noise*, dan pemilihan *random movement* sebesar 10 dipilih untuk mengurangi *ring artefact*. Setelah proses pemindaian, citra proyeksi direkonstruksi pada resolusi 24 μm /piksel.

Citra keluaran dari proses rekonstruksi adalah citra skala keabuan (*grayscale image*) dengan format 8-bit bitmap. Dengan menggunakan citra skala keabuan ini, kedua sampel dihitung penurunan tulangnya.

Pengelompokan Sampel

Hewan coba dibagi menjadi 6 kelompok: kelompok I ($n=5$) kelompok kontrol 3 hari, kelompok II ($n=5$) kelompok kontrol 7 hari, kelompok III ($n=5$) dibuat model *aggressive periodontitis* didekaputasi pada hari ke 3 *post* injeksi dan dilihat ekspresi IL-1 β , kelompok IV ($n=5$) dibuat model *aggressive periodontitis* didekaputasi pada hari ke 7 *post* injeksi dan dilihat ekspresi IL-1 β , kelompok V ($n=5$) dibuat model *aggressive periodontitis* didekaputasi pada hari ke 3 *post* injeksi dan dilihat ekspresi TNF- α , kelompok ($n=5$) dibuat model *aggressive periodontitis* didekaputasi pada hari ke 7 *post* injeksi dan dilihat ekspresi TNF- α .

Dekaputasi dan Pengambilan Spesimen Penelitian

Hewan coba dikorbankan pada hari ke-3, dan hari ke-7 *post* injeksi dengan cara dimasukkan dalam kotak/toples tertutup yang telah dibasahi eter dengan dosis 5 ml yang diteteskan pada kapas/tisu utuk 2-3 ekor tikus. Kemudian tikus dimasukkan satu persatu ke dalam kotak/toples tertutup dan dibiarkan kurang lebih 5 menit. Kemudian setelah hewan coba mati diambil tulang mandibula sebelah kanan gigi molar 1 dan 2. Tulang mandibula, direndam dalam larutan fiksasi buffered formalin 10% minimal 8 jam sebelum dekalsifikasi. Spesimen direndam dalam larutan EDTA dan diamati untuk memastikan tidak ada gelembung udara. Setelah proses dekalsifikasi selesai dilanjutkan pemeriksaan specimen untuk pemeriksaan imunohistokimia. Tikus yang sudah diambil spesimennya dibakar dengan alat incinerator.

Imunohistokimia

Analisis ekspresi TNF- α dievaluasi dengan metode imunohistologi. Ekspresi TNF- α dideteksi pada jaringan mandibula gigi tikus menggunakan anti rat TNF- α *monoclonal antibody* (LS Bio, USA). Metode pengecatan ekspresi TNF- α mengikuti UltraTek HRP Anti-Polyvalent (DAB) Staining System (Scytek, USA). Ekspresi IL- β dideteksi pada jaringan mandibula gigi tikus menggunakan anti-rat TNF- α *monoclonal antibody* (LS Bio, USA). Metode pengecatan ekspresi

IL1 β mengikuti UltraTek HRP Anti-Polyvalent (DAB) Staining System (Scytek, USA). Ekspresi TNF- α dan IL1 β diamati pada mikroskop cahaya Olympus CX-31 dengan pembesaran 400x.

Analisis Data

Untuk melihat adanya pengaruh *crude protein* bakteri *A. actinomycetemcomitans* terhadap ekspresi IL1- β dan TNF- α digunakan uji statistik *analysis of variance* (ANOVA) *one way* dan diteruskan dengan uji LSD dengan tingkat signifikansi 95%.

HASIL PENELITIAN

Tikus yang diinduksi *crude protein* bakteri *A. actinomycetemcomitans* selama 6 minggu dilakukan foto rontgenologis didapat hasil adanya resorpsi tulang alveolar dengan gambaran *radioluscent* disekitar akar gigi molar pertama sampai molar ketiga. Adanya penurunan margin gingiva ke arah apikal pada daerah molar gigi tikus dibanding kontrol (Gambar 1)

Analisis dengan μ -CT

Gambar 2A menunjukkan penampang 3D dari gigi tikus yang tidak mendapat perlakuan (kontrol) selama 6 minggu. Gambar dibuat dengan menggunakan *3D volume rendering mode* yang menghasilkan tampilan 3D dengan menampilkan sisi bukal. Tanda panah menunjukkan jarak terpendek antara CEJ dengan puncak tulang. Gambar 2B menunjukkan penampang irisan dari sampel gigi tikus yang diinduksi *crude protein A. actinomycetemcomitans* selama 6 minggu. Gambar tersebut dihasilkan dari teknik proyeksi dengan *maximum intensity projection*. Berbeda dengan Gambar 2A, dikarenakan sampel mengalami deformasi yang signifikan, penggunaan *3D volume rendering mode* sulit dilakukan terutama untuk mengukur resorpsi yang terjadi.

Tabel 1. Hasil pengukuran resorpsi tulang alveolar tikus wistar. Urutan titik pengukuran ditandai dari kiri ke kanan.

Titik pengukuran	1	2	3	4	5	6	7
Jarak untuk sampel kontrol (μm)	420	576	370	525	447	343	293
Jarak untuk sampel perlakuan (μm)	2400	2472	2160	2040	2088	1440	1560

Pada Tabel 1 terlihat bahwa induksi *crude protein A. actinomycetemcomitans* selama 6 minggu menyebabkan peningkatan resorpsi yang signifikan, hingga orde antara 4 sampai 6 kali lipat. Perubahan struktur tulang yang signifikan akibat induksi *crude protein A. actinomycetemcomitans* selama 6 minggu tersebut dapat dilihat pada Gambar 3. Terlihat pengeroposan yang terjadi pada sampel perlakuan (Gambar 3B, 3D) sangatlah signifikan dimana seba-

gian besar massa tulang pada bagian akar gigi telah berkurang. Pengurangan tersebut lebih jelas teramati pada sisi bukal.

Analisis Ekspresi TNF- α dengan Menggunakan Metode Immunohistokimia

Pada Gambar 4 menunjukkan bahwa ekspresi TNF- α pada jaringan dengan pemberian *crude protein A. actinomycetemcomitans* tidak mempengaruhi ekspresi TNF- α pada kelompok kontrol baik hari ke-3 maupun hari ke-7. Akan tetapi pada kelompok pemberian hari ke-7 injeksi *crude protein A. actinomycetemcomitans* dapat meningkatkan ekspresi TNF- α dibandingkan dengan hari ke-3. Hasil analisis statistik telah diketahui bahwa peningkatan ekspresi TNF- α meningkat secara signifikan pada hari ke-7 setelah injeksi *crude protein A. actinomycetemcomitans* dibandingkan hari ke-3 sedangkan kelompok kontrol tidak ada perbedaan secara nyata.

Analisis IL-1 β dengan menggunakan metode immunohistokimia

Perbedaan ekspresi IL-1 β sel makrofag dapat ditunjukkan pada Gambar 6. Hasil visualisasi menunjukkan bahwa ekspresi IL-1 β meningkat pada hari ke-7 *post* injeksi *crude protein A. actinomycetemcomitans* dibandingkan dengan hari ke-3 dan kontrol *post* injeksi.

PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini telah membuktikan bahwa pemberian *crude protein A. actinomycetemcomitans* dapat meningkatkan ekspresi TNF- α dan IL-1 β setelah hari ke-7 *post* injeksi. Hasil dari foto rontgen dan analisis μ -CT menunjukkan adanya resorpsi tulang alveolar setelah diinduksi *crude protein A. actinomycetemcomitans* selama 6 minggu pada gigi molar mandibula tikus wistar.

Penelitian dengan mice C57/BL6 yang diinjeksi dengan *whole* bakteri *A. actinomycetemcomitans* meningkatkan ekspresi sitokin proinflamasi terutama T helper 1, TNF- α , yang secara signifikan meningkat pada hari perama sampai 30 hari *post* injeksi tetapi menurun setelah hari ke 30. Penelitian yang lain juga menyebutkan bahwa tingginya ekspresi sitokin inflamasi selama periode 60 hari (Roger *et al.*, 2007). Injeksi LPS bakteri *Salmonella typhimurium* secara signifikan menyebabkan inflamasi pada gingiva dan jaringan periodontal dengan adanya infiltrasi dari sel inflamasi, adanya migrasi apikal dari *junctional epithelium*, kehilangan tulang interdental dan meningkatnya aktivitas osteoklas pada daerah injeksi hari ke 7 dan hari ke 10 *post* injeksi (Dumitrescu *et al.*, 2004).

Penelitian dengan injeksi LPS bakteri *P.gingivalis* yang berulang menyebabkan infiltrasi sel

inflamasi pada daerah gingiva yang diinjeksi setelah 5 hari injeksi, tetapi injeksi LPS bakteri *P.gingivalis* hanya sekali atau *single injection* tidak menyebabkan infiltrasi sel inflamatori pada daerah gingiva yang diinjeksi (Taguchi *et al.*, 2015)

Virulensi bakteri *A. actinomycetemcomitans* mampu menginfeksi saku periodontal dengan melekat ke sel epitel atau permukaan gigi. Permukaan ultrastruktur dari bakteri *A. actinomycetemcomitans*: fimbriae yang berfungsi dengan kolonisasi bakteri dari jaringan inang. Vesikel – blebs ini adalah unit lipopolisakarida terletak pada *outer* membran protein. Dua eksotoksin yaitu *leukotoxin* (LtxA) dan *cytolethal distending toxin* (Cdt) menyebabkan kematian sel dan induksi pada respon mediator inflamasi (Sriraman *et al.*, 2014).

Eksotoksin *cytolethal distending toxin* (Cdt) dan *leukotoxin* (LtxA), merupakan toksin yang unik dari bakteri *A. actinomycetemcomitans* dimana spesies ini dapat berkolonisasi membentuk *biofilm*. Cdt dikeluarkan oleh bakteri Gram negatif yang menyebabkan kematian sel inang dan menghambat proliferasi serta meningkatkan ekspresi RANKL yang merupakan faktor terjadinya osteoklastogenesis. *Leukotoxin* (LtxA) akan menginduksi sel makrofag dan mengaktifkan caspase-1 untuk merangsang ekspresi IL-1 β dan TNF- α . (Heoglund *et al.*, 2015). Sitokin IL-1 β dan TNF- α dapat menstimulasi matriks metalloproteinase (MMPs, seperti kolagenase MMP-1,3, dan 13), yang dapat menghancurkan jaringan ikat melalui degradasi komponen matrik ekstraseluler. Selain itu, IL-1 β dan TNF- α menginduksi resorpsi tulang secara tidak langsung dan merangsang IL-6 atau secara langsung dengan merangsang osteoklastogenesis, seperti aktivator reseptor nuklear faktor kappa B (RANKL). LPS *A. actinomycetemcomitans* itu sendiri dapat menyebabkan peningkatan ekspresi osteoblastik prostaglandin E2, RANKL, IL-1, dan TNF- α .

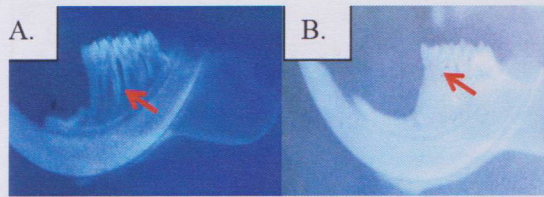
Selama fase resorpsi osteoklas melepaskan mineral dan komponen organik dari matriks tulang. Fase resorpsi berlangsung sekitar 8-10 hari, diasumsikan sesuai dengan masa hidup osteoklas. Setelah sebagian besar mineral dan matriks organik telah hilang, ada fase resorpsi yang berlangsung 7-14 hari, menandai transisi dari resorpsi menuju perbaikan. Setelah selesai resorpsi satu lacuna, osteoklas bergerak sepanjang permukaan tulang dan bekerja melakukan resorpsi kembali atau mengalami apoptosis (Hienz *et al.*, 2015).

KESIMPULAN

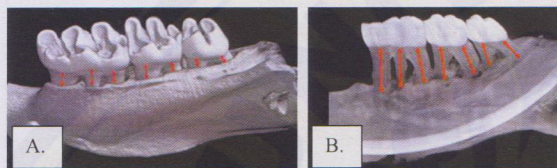
Injeksi dengan *crude protein A. actinomycetemcomitans* menyebabkan tingginya sitokin pro inflamatori dan adanya resorpsi tulang alveolar pada model *aggressive periodontitis*.

DAFTAR PUSTAKA

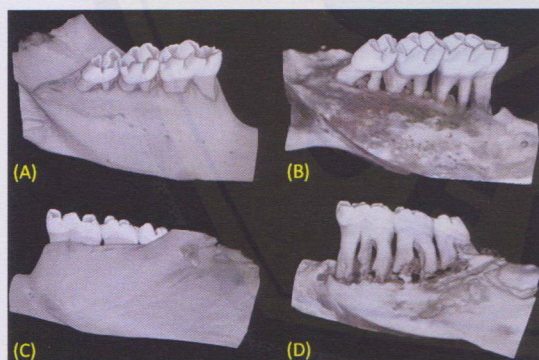
1. Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiol Immunol*. 2006;21:12–20.
2. Henderson B, Ward JM, Ready D. *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*: A triple AFNx01 periodontopathogen. *Periodontol* 2000 2010;54:78-105.
3. Norkov-Lauritsen, Kilian M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor - dependant and V - factor independent isolates. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006;56:2135-46.
4. Malik R, Changela R, Krishan P, Gugnani S, Bali D. Virulence factors of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* - A status update. *J Int Clin Dent Res Organ* 2015;7:137-45.
5. Wolf HF, Rateitschak EM, Rateitschak KH, Hassell TM. *Periodontology*. Rateitschak KH, Wolf HF, Eds. *Color Atlas of Dental Medicine*. 3rd ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 2005.
6. Hayashi C, Gudino CV, Gibson FC, 3rd, Genco CA. Review : Pathogen-induced inflammation at sites distant from oral infection: bacterial persistence and induction of cell-specific innate immune inflammatory pathways. *Mol Oral Microbiol* 2010;305-316.
7. Westerman, R, Yongsheng, Keen J, Littledike L, Kwang J. 1997, Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Specific for the Lipopolysaccharide of *Escherichia coli* O157, *Journal Of Clinical Microbiology*, Vol. 35, No. 3, pp. 679–684.
8. Rogers, J, Li, F, Coatney, D, Rossa, C, Bronson, P, Krieder, J, Giannobile, W & Kirkwood, K, 2007 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Lipopolysaccharide-mediated Experimental Bone Loss Model for Aggressive Periodontitis, *J Periodontol*, pp. 550-558.
9. Jin J, Zhang X, Lu Z, Lopes-Virella, Yu H, Haycraft & Li Q, 2014 Simvastatin inhibits lipopolysaccharide-induced osteoclastogenesis and reduces alveolar bone loss in experimental periodontal, *J Periodont Res*, vol. 49, no.4, pp. 518–526.
10. Izawa, Ishihara, Mizutani, Kobayashi, Goto, Okabe, Takeda, Ozawa, Kamiya, Sugita, Kikuchi, Mitani, Hayashi, Nishihara, Maeda & Noguchia, 2014. Inflammatory Bone Loss in Experimental Periodontitis Induced by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in Interleukin-1 Receptor Antagonist Knockout Mice, *Infection and Immunity*, vo.82, no.5, pp. 1904–1913.
11. Keschull, M & Dommisch, H, 2015. Aggressive Periodontitis, in Carranza (ed.), *Carranza's Clinical Periodontology*, 12th edn, Elsevier, St. Louis, Missouri.
12. Sriraman, P, Mohanraj, R, Neelakantan, P. 2014 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* In Periodontal Disease, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 5(2) pp. 406-419.
13. Raja, M, Ummer, F, Dhivakar, C.P, 2014, *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* A Tooth Killer? *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, Vo 8 (8):pp 13-16.
14. Francis, P.M, Manickam, R, Venkataesan, B.P, 2014, Crude protein extract of Actinobacteria exhibits antibacterial activity against *Salmonella typhi* *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 3(7) 319-326.
15. Heoglund, A, Kelk P, Johansson, A, 2015, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: Virulence of its leukotoxin and association with aggressive periodontitis, *Virulence* 6:3, 188–195.
16. Park Ok-Jin, Cho Min-Kyung, Yun Cheol-Heui Han Seung Hyun, 2015 Lipopolysaccharide of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* induces the expression of chemokines MCP-1, MIP-1 α and IP-10 via similar but distinct signaling pathways in murine macrophages *Immunobiology* pp:1-8.
17. Hienz SA, Paliwal S, Ivanovski S, 2015. Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis, *Journal of Immunology Research*, pp. 1-11.
18. Dumitrescu, AL; El-Aleem, A; Morales-Aza; Donaldson, L.F, A Model of Periodontitis in the Rat: Effect of Lipopolysaccharide on Bone Resorption, osteoclast activity, and local peptidergic innervation, *J Clin Periodontol* 31, pp: 596-603.
19. Taguchi H, Aono, Y, Kawato, T, Asano, M, Shimizu, N, Saigusa, T, 2015, Intragingival injection of *Porphyromonas gingivalis*-derived lipopolysaccharide induces a transient increase in gingival tumor necrosis factor- α , but not interleukin-6, in anaesthetised rats, *Int J of Oral Science*, 7, pp: 155-160



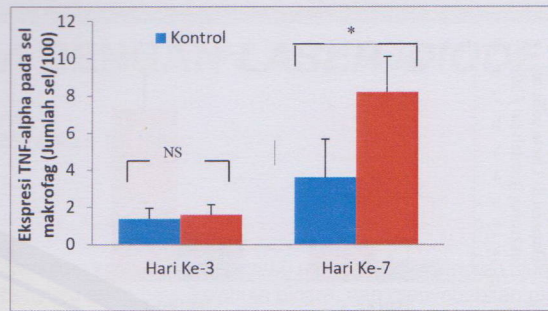
Gambar 1. Foto rontgenologis gigi molar tikus setelah diinduksi *crude protein A. actinomycetemcomitans* (A) Adanya resorpsi tulang alveolar ditandai dengan gambaran *radioluscent* di sekitar gigi molar tikus (tanda panah merah) (B) Tidak ada resorpsi tulang alveolar pada kelompok kontrol. Gambaran *radioluscent* masih berada di batas CEJ (tanda panah merah).



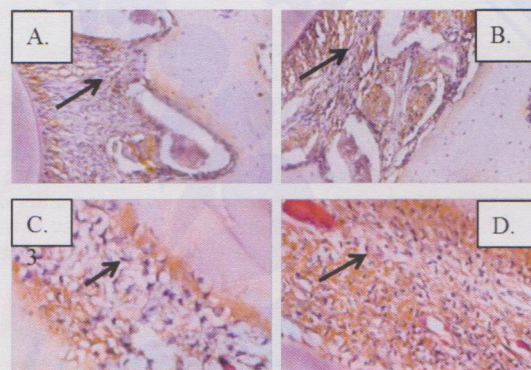
Gambar 2. (A) Gambaran μ -C T tikus yang tidak diberi perlakuan selama 6 minggu. Tanda panah menunjukkan jarak antara CEJ dengan puncak tulang terpendek. (B) Gambaran μ -CT tikus yang diinduksi *crude protein A. actinomycetemcomitans* selama 6 minggu. Tanda panah menunjukkan jarak antara CEJ dengan puncak tulang terpendek. Gambar dibuat dengan menggunakan citra *maximum intensity projection* (MIP).



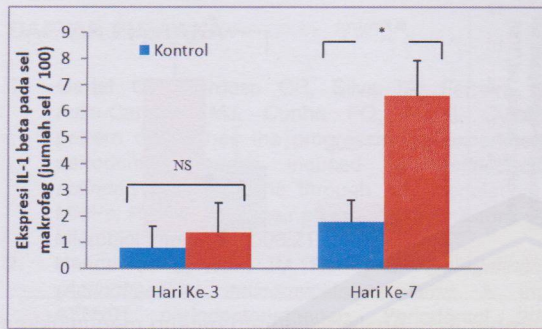
Gambar 3. Penggambaran 3D sampel kontrol (A dan C) dan sampel perlakuan (B dan D) menggunakan perangkat lunak 3D *volume rendering*. Sampel (A) menunjukkan sisi lingual dari sampel kontrol dan (B) sisi lingual dari sampel perlakuan. Sampel (C) menunjukkan sisi bukal dari sampel kontrol dan (D) sisi bukal dari sampel perlakuan.



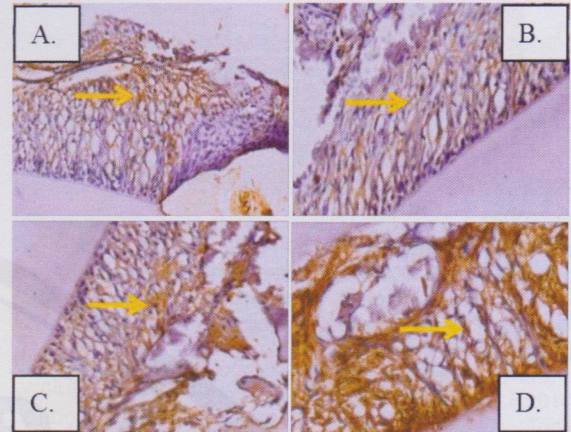
Gambar 4. Analisis diagram batang menunjukkan setelah diinduksi *crude protein A. actinomycetemcomitans* selama 6 minggu adanya peningkatan yang signifikan ekspresi TNF-a pada hari ke 7 dibanding hari ke 3 dan kontrol *post* injeksi ($p \leq 0,05$). (* : signifikan, NS: non signifikan)



Gambar 5. Ekspresi TNF-a pada makrofag di jaringan ligamen periodontal menggunakan metode imunohistokimia pada kelompok kontrol dan kelompok induksi *crude protein A. actinomycetemcomitans* (A) kontrol hari ke-3 *post* injeksi (B) kontrol hari ke-7 *post* injeksi (C) injeksi *crude protein A. actinomycetemcomitans* hari ke-3 *post* injeksi (D) injeksi *crude protein A. actinomycetemcomitans* hari ke-7 *post* injeksi (perbesaran 400x).



Gambar 6. Analisis diagram batang menunjukkan setelah diinduksi crude protein A. *actinomycetemcomitans*. selama 6 minggu adanya peningkatan yang signifikan ekspresi IL-1 β pada hari ke 7 dibanding hari ke 3 dan kontrol post injeksi ($p \leq 0,05$). (* : signifikan, NS: non signifikan)



Gambar 7. Ekspresi IL-1 β pada makrofag di jaringan ligamen periodontal menggunakan metode imunohistokimia pada kelompok kontrol dan kelompok induksi crude protein A. *actinomycetemcomitans* (A) kontrol hari ke-3 post injeksi (B) kontrol hari ke-7 post injeksi (C) injeksi crude protein A. *actinomycetemcomitans* hari ke-3 post injeksi (D) injeksi crude protein A. *actinomycetemcomitans* hari ke-7 post injeksi (perbesaran 400x).