



**EFEK INDUKSI LIPOPOLISAKARIDA (LPS) *Porphyromonas gingivalis*
TERHADAP JUMLAH SEL OSTEOKLAS DAN OSTEOLAS
TULANG ALVEOLAR TIKUS WISTAR (*Rattus norvegicus*)**

SKRIPSI

Oleh

**Desy Fitri Intan Gandini Abdi Nagari
131610101070**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2018**



**EFEK INDUKSI LIPOPOLISAKARIDA (LPS) *Porphyromonas gingivalis*
TERHADAP JUMLAH SEL OSTEOKLAS DAN OSTEOLAS
TULANG ALVEOLAR TIKUS WISTAR (*Rattus norvegicus*)**

SKRIPSI

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

Oleh

Desy Putri Intan Gandini Abdi Nagari
131610101070

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2018

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Keluarga besar Kateni/Dasri, khususnya Ibu dan Ayah saya yang selalu memberi saya limpahan kasih sayang, pendidikan, doa, semangat dan dukungan moral maupun materiil;
2. Adik saya yang telah menemani dan mewarnai hidup saya;
3. Dosen-dosen yang telah mendidik dan mengajarkan banyak ilmu untuk saya selama menjalani pendidikan di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
4. Pahlawan tanpa tanda jasa dari TK sampai SMA yang telah mengajarkan saya ilmu yang bermanfaat;
5. Almamater saya Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

MOTTO

“Sesungguhnya Allah tidak mengubah keadaan sesuatu kaum sehingga mereka
mengubah keadaan yang ada pada diri mereka sendiri”

(terjemahan Surat Ar-Ra’d ayat 11)^{*)}

“Sesungguhnya Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan
kesanggupannya”

(terjemahan Surat Al-Baqarah ayat 286)^{*)}

“I have to finish what I’ve been started”^{**)}

^{*)} Departemen Agama Republik Indonesia. 2005. *Al-Qur’an dan Terjemahannya*.

Bandung : PT. Syaamil Cipta Media.

^{**)} Susanto, A. 2012. *Skripshit*. Jakarta : Bukune.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Desy Fitri Intan Gandini Abdi Nagari

NIM : 131610101070

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Efek Induksi Lipopolisakarida (LPS) *Porphyromonas gingivalis* terhadap Jumlah Sel Osteoklas dan Osteoblas Tulang Alveolar Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*)” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 26 Januari 2018

Yang menyatakan,

Desy Fitri Intan Gandini Abdi Nagari

NIM 131610101070

SKRIPSI

**EFEK INDUKSI LIPOPOLISAKARIDA (LPS) *Porphyromonas gingivalis*
TERHADAP JUMLAH SEL OSTEOKLAS DAN OSTEOLAS
TULANG ALVEOLAR TIKUS WISTAR (*Rattus norvegicus*)**

Oleh

Desy Fitri Intan Gandini Abdi Nagari
131610101070

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : drg. Tantin Ermawati., M.Kes

Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Depi Praharani., M.Kes

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Efek Induksi Lipopolisakarida (LPS) *Porphyromonas gingivalis* terhadap Jumlah Sel Osteoklas dan Osteoblas Tulang Alveolar Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*)” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember pada:

hari, tanggal : Kamis, 4 Januari 2018

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Tim Penguji

Penguji Ketua,

Penguji Anggota,

drg. Peni Pujiastuti, M.Kes
NIP. 196705171996012001

drg. Melok Aris Wahyukundari, M.Kes, Sp.Perio
NIP. 197104092005012002

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,

drg. Tantin Ermawati, M.Kes
NIP. 198003222008122003

drg. Depi Praharani, M.Kes
NIP. 196801221997022001

Mengesahkan
Dekan Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Jember,

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

RINGKASAN

Efek Induksi Lipopolisakarida (LPS) *Porphyromonas gingivalis* terhadap Jumlah Sel Osteoklas dan Osteoblas Tulang Alveolar Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*); Desy Putri Intan Gandini Abdi Nagari; 131610101070; 2018; 75 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Periodontitis adalah penyakit inflamasi jaringan periodontal dengan kerusakan pada ligamen periodontal dan tulang alveolar. Salah satu penyebab penyakit ini adalah *Porphyromonas gingivalis*, yaitu bakteri rongga mulut yang memiliki lipopolisakarida (LPS) sebagai endotoksin yang berperan mengaktifkan respon inflamasi dan mengganggu *remodeling* tulang alveolar. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui efek induksi LPS *P. gingivalis* terhadap jumlah sel osteoklas dan osteoblas tulang alveolar tikus wistar (*Rattus norvegicus*).

Jenis penelitian ini eksperimental laboratoris *in-vivo* dengan *the post test only control group design*. Jumlah hewan coba sebanyak 20 ekor tikus wistar dan dibagi menjadi 4 kelompok; kelompok I dan II yaitu kelompok perlakuan injeksi LPS *P. gingivalis* dimana kelompok I didekapitasi hari ke-3 dan kelompok II didekapitasi hari ke-7, kelompok III dan IV yaitu kelompok kontrol (tidak diinjeksi LPS *P. gingivalis*), dimana kelompok III didekapitasi hari ke-3 dan kelompok IV didekapitasi hari ke-7. Injeksi LPS dilakukan pada sulkus gingiva proksimal gigi M1 dan M2 kanan rahang bawah tikus dengan volume 10 µl dan konsentrasi 0,5 mg/ml menggunakan jarum tuberkulin 30G sebanyak 3 kali seminggu selama 6 minggu. Pada hari ke-3 dan hari ke-7 setelah injeksi terakhir dilakukan dekapitasi dan dilanjutkan pemotongan tulang alveolar. Kemudian dibuat preparat jaringan yang diwarnai dengan *haematoxilin eosin*. Penghitungan sel osteoklas dan sel osteoblas dilakukan oleh 3 pengamat dengan 3 lapang pandang (sepertiga atas, sepertiga tengah dan sepertiga bawah tulang alveolar) menggunakan mikroskop binokuler (optilab) perbesaran 400x. Hasil dari ketiga pengamat pada tiap sampel dijumlahkan dan dirata-rata.

Data penghitungan jumlah sel osteoklas dan sel osteoblas diuji Shapiro-Wilk dan hasilnya berdistribusi normal. Selanjutnya diuji Levene dan hasilnya yaitu data sel osteoklas tidak homogen ($p < 0,05$) sehingga dilanjutkan dengan uji Kruskal-Wallis dan Mann-Whitney, sedangkan data sel osteoblas homogen ($p > 0,05$) sehingga dilanjutkan uji *oneway* ANOVA dan uji LSD. Hasil uji Kruskal-Wallis nilai $p < 0,05$ artinya terdapat perbedaan signifikan jumlah sel osteoklas pada masing-masing kelompok. Hasil uji Mann-Whitney yaitu ada perbedaan signifikan antar kelompok ($p < 0,05$), kecuali antara kelompok I dengan kelompok II, dan antara kelompok III dengan kelompok IV. Hasil uji *oneway* ANOVA nilai $p < 0,05$ artinya terdapat perbedaan signifikan jumlah sel osteoblas pada masing-masing kelompok. Hasil uji LSD yaitu ada perbedaan signifikan ($p < 0,05$) antara kelompok I dengan IV dan kelompok III dengan kelompok IV.

Kesimpulan hasil penelitian ini yaitu induksi LPS *P. gingivalis* pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) meningkatkan jumlah sel osteoklas dan menurunkan jumlah sel osteoblas.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT, atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efek Induksi Lipopolisakarida *Porphyromonas gingivalis* terhadap Jumlah Sel Osteoklas dan Osteoblas Tulang Alveolar Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*)”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata 1 (S1) pada Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

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

1. drg. R. Rahardiyani Parnaadji, M.Kes., Sp.Prost, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
2. drg. Desi Sandra Sari, M.DSc, selaku Dosen Peneliti Utama yang telah membantu memberikan ide dan mendanai sebagian proyek penelitian ini sehingga penelitian dapat terselesaikan;
3. drg. Tantin Ermawati, M.Kes, selaku Dosen Pembimbing Utama, dan drg. Depi Praharani, M.Kes, selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang telah memberikan ilmu, waktu, saran, motivasi, perhatian, dan kesabaran yang banyak dalam membimbing saya hingga skripsi ini selesai dengan baik;
4. drg. Peni Pujiastuti, M.Kes, selaku Dosen Penguji Ketua, dan drg. Melok Aris Wahyukundari, M.Kes, Sp.Perio, selaku Dosen Penguji Anggota yang telah memberikan banyak masukan demi kesempurnaan penulisan skripsi ini;
5. drg. Yenny Yustisia, M.Biotech, selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan, saran, dan motivasi;
6. Keluarga besar Kateni/Dasri, khususnya Ibu, Ayah dan adikku tercinta yang selalu menjadi sandaran dan sumber energi terbesar. Terima kasih atas segala doa, dukungan moril dan materiil serta dukungan lainnya;
7. Sahabatku di FKG UNEJ yaitu Lilis Putri Anjasnurani, Usnida Mubarakah, Safira Niza Ulfita, Printis Insana Camilia, Rada Kusnadi, dan Dea Lovinda Sari

Soleha yang banyak memberikan kasih sayang, perhatian, motivasi, hiburan, nasihat, dan dukungan lainnya;

8. Teman-teman Alumni SMAN 1 Ponorogo khususnya Ricky Roosdiana Dewi, Elmida Nismawandani, Gresya Cicin Carola, Agrery Ayu Nadia, Dendy Erwahyudha, Freddy Kurniawan, Nindya Tyas, dan Elga Nahrufani yang senantiasa mendengarkan keluh kesah saya selama ini dan berbagi suka duka;
9. Teman-teman KKN 80 Gelombang II yaitu Yuladzul Fitrotul Huda Firdaus, Aditya Juli, Choirul Umam, Kamila, Ulfa, Dimas Yofri, Vivi Yuni, Erlinda Hapsari, Vito Lazaro yang juga senantiasa mendengarkan keluh kesah saya selama ini dan berbagi suka maupun duka;
10. Teman-teman satu kosku yaitu Amirotu Sajidah, Adelia, Nia dan Nita yang selalu meramaikan suasana kos dan berbagi cerita baik suka maupun duka;
11. Teman-teman seperjuangan saya FKG 2013 yang sangat saya sayangi dan cintai, terima kasih atas kerjasamanya selama ini;
12. Seluruh staf Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember dan seluruh staf Laboratorium *Bioscience* Rumah Sakit Gigi dan Mulut (RSGM) Universitas Jember serta;
13. Semua pihak yang terlibat secara langsung maupun tak langsung yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu, terimakasih kalian semua.

Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini masih jauh dari sempurna, maka saran dan kritik yang membangun sangat penulis harapkan untuk membantu melengkapi skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak, khususnya bagi kita dalam bidang kedokteran gigi.

Jember, 26 Januari 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PEMBIMBING.....	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Penyakit Periodontal	4
2.1.1 Patogenesis Penyakit Periodontal	4
2.1.2 Etiologi Penyakit Periodontal	7
2.2 <i>Porphyromonas gingivalis</i>	8
2.2.1 Karakteristik <i>Porphyromonas gingivalis</i>	8
2.2.2 Faktor Virulensi <i>Porphyromonas gingivalis</i>	9
2.3 Lipopolisakarida	10
2.4 Tulang Alveolar.....	12

2.4.1 Anatomi Tulang Alveolar	15
2.4.2 Destruksi Tulang Alveolar	18
2.5 Pengaruh LPS terhadap Resorpsi Tulang Alveolar ...	19
2.6 Kerangka Konsep.....	23
2.7 Penjelasan Kerangka Konsep	24
2.8 Hipotesis.....	25
BAB 3. METODE PENELITIAN	26
3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	26
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	26
3.3 Sampel Penelitian.....	26
3.3.1 Besar Sampel	26
3.3.2 Kriteria Sampel	27
3.4 Variabel Penelitian.....	27
3.5 Definisi Operasional Penelitian	28
3.5.1 Lipopolisakarida	28
3.5.2 Sel Osteoklas.....	28
3.5.3 Sel Osteoblas.....	28
3.6 Alat dan Bahan.....	29
3.6.1 Alat Penelitian.....	29
3.6.2 Bahan Penelitian	29
3.7 Prosedur Penelitian.....	30
3.7.1 <i>Ethical Clearance</i>	30
3.7.2 Pembagian Kelompok Perlakuan.....	30
3.7.3 Persiapan Bahan Perlakuan.....	30
3.8 Prosedur Perlakuan	31
3.8.1 Perlakuan pada Hewan Coba	31
3.8.2 Proses Dekapitasi pada Hewan Coba.....	31
3.8.3 Pembedahan Tulang Alveolar	31
3.8.4 Tahap Pembuatan Preparat Jaringan.....	31

3.8.5 Penghitungan Jumlah Osteoklas dan Osteoblas.....	34
3.9 Analisis Data.....	35
3.10 Alur Penelitian	36
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	37
4.1 Hasil.....	37
4.1.1 Gambaran Histologi Osteoklas dan Osteoblas.....	37
4.1.2 Hasil Penghitungan Osteoklas dan Osteoblas.....	38
4.1.3 Hasil Analisis Data Statistik	39
4.2 Pembahasan.....	41
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	45
5.1 Kesimpulan.....	45
5.2 Saran	45
DAFTAR PUSTAKA	46
LAMPIRAN.....	53

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Komponen matriks tulang alveolar	13
Tabel 4.1 Rata-rata dan standar deviasi sel osteoklas dan osteoblas ...	38
Tabel 4.2 Uji Kruskal-Wallis pada sel osteoklas	40
Tabel 4.3 Uji Mann-Whitney pada sel osteoklas	40
Tabel 4.4 Uji <i>Oneway</i> ANOVA pada sel osteoblas	40
Tabel 4.5 Uji LSD (<i>Least Significant Different</i>) pada sel osteoblas....	41

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Perdarahan saat <i>probing</i>	5
2.2 Gingivitis kronis.....	7
2.3 Struktur lipopolisakarida.....	11
2.4 Gambaran sel osteoblas dan sel osteosit	14
2.5 Gambaran sel osteoklas.....	15
2.6 Gambaran struktur tulang alveolar.....	16
2.7 Gambaran radiologi tulang alveolar normal	17
2.8 Gambaran radiologi kerusakan tulang alveolar.....	19
2.9 Mekanisme LPS dalam resorpsi tulang alveolar.....	21
2.10 Hubungan OPG terhadap RANK dan RANKL	22
4.1 Gambaran histologi sel osteoklas dan sel osteoblas.....	37
4.2 Diagram batang rata-rata jumlah sel osteoklas dan sel osteoblas	39

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran A. Surat Ijin Penelitian.....	53
A.1 <i>Ethical Clearance</i>	53
A.2 Surat ijin penelitian Lab. Farmakologi	54
A.3 Surat ijin penelitian Lab. <i>Bioscience</i>	55
A.4 Surat ijin penelitian Lab. Histologi.....	56
Lampiran B. Alat dan Bahan Penelitian.....	57
B.1 Alat penelitian.....	57
B.2 Bahan penelitian	58
Lampiran C. Prosedur Penelitian.....	59
C.1 Aklimatisasi hewan coba	59
C.2 Persiapan bahan injeksi.....	59
C.3 Perlakuan injeksi.....	59
C.4 Dekapitasi dan pengambilan sampel.....	60
C.5 Fiksasi jaringan	60
C.6 Pembuatan blok parafin dan penyayatan	60
Lampiran D. Hasil Penelitian.....	61
D.1 Kelompok I.....	61
D.2 Kelompok II.....	62
D.3 Kelompok III	64
D.4 Kelompok IV	66
Lampiran E. Data Penghitungan Jumlah Sel.....	68
E.1 Rata-rata jumlah sel	68
E.2 Hasil uji statistik.....	69

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit pada jaringan periodontal merupakan salah satu penyakit yang memiliki prevalensi cukup besar di Indonesia yaitu sebesar 70% dari jumlah populasi penduduk (Amelia *et al.*, 2014). Data Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) tahun 2013 menunjukkan adanya peningkatan prevalensi masalah gigi dan mulut, termasuk penyakit periodontal yaitu dari 23,2% pada tahun 2007 menjadi 25,9% pada tahun 2013 (Kemenkes RI, 2013). Berdasarkan rencana program pelayanan kesehatan gigi dan mulut tahun 2012, diketahui bahwa penyakit periodontal merupakan penyakit gigi dan mulut terbanyak kedua yang diderita masyarakat di Indonesia (Kemenkes RI, 2012).

Penyakit periodontal yang sering terjadi pada manusia salah satunya adalah periodontitis (Nakagawa *et al.*, 2003). Periodontitis merupakan inflamasi pada jaringan periodontal atau jaringan penyangga gigi yang merusak perlekatan terhadap permukaan akar, sementum, dan tulang alveolar (Singrhao *et al.*, 2015). Pada pemeriksaan klinis periodontitis terdapat adanya kehilangan perlekatan. Kehilangan perlekatan ini sering disertai dengan pembentukan poket periodontal, resesi margin gingiva atau keduanya (Newman *et al.*, 2015). Pada pemeriksaan radiologi terdapat keadaan kontinuitas lamina dura yang terputus, adanya pelebaran ligamen periodontal dan juga kehilangan tulang alveolar (Klaus *et al.*, 2004).

Periodontitis umumnya dihubungkan dengan keberadaan dan atau meningkatnya jumlah bakteri patogen spesifik, diantaranya yaitu *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* dan *Bacteriodes forsythus* (Newman *et al.*, 2015). *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) merupakan bakteri dominan dari mikroba rongga mulut yang dapat berkelompok dengan baik di rongga mulut (Mysak *et al.*, 2014). *P. gingivalis* dapat mengekspresikan berbagai faktor virulensi antara lain: *fimbriae*, lipopolisakarida

(LPS), proteinase, metabolit organik seperti asam butirat serta berbagai enzim seperti arginin, gingipain, kolagenase, gelatinase dan hialuronidase (Imamura, 2003).

Berdasarkan beberapa faktor virulensi tersebut, LPS adalah endotoksin dari bakteri Gram negatif yang merupakan salah satu faktor patogenik dan diketahui sebagai penyebab sepsis terbanyak (Ridconi *et al.*, 2011). LPS berperan sebagai kunci penting dalam memicu dan mendukung respon inflamasi pada gingiva dan jaringan periodontal, sehingga LPS memiliki potensi kuat sebagai stimulator inflamasi apabila diinjeksikan pada hewan coba (Newman *et al.*, 2015). Menurut How *et al.* (2016), LPS *P. gingivalis* mampu mengaktifkan respon inflamasi *host* dan mengganggu *remodeling* tulang alveolar. Hal ini dikarenakan pengaruh dari LPS yang dapat merangsang makrofag menghasilkan sitokin proinflamasi yaitu interleukin-1 α (IL-1 α), *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) dan prostaglandin E₂ (PGE₂) yang dapat mempengaruhi terjadinya resorpsi tulang alveolar.

Resorpsi tulang alveolar merupakan suatu proses dinamis pada jaringan tulang karena ketidakseimbangan antara sel osteoklas sebagai sel yang membantu kerusakan tulang dan sel osteoblas sebagai sel yang membantu pembentukan tulang, dimana sel osteoklas jumlahnya lebih tinggi daripada sel osteoblas. Pengaruh LPS dalam mengganggu *remodeling* tulang alveolar dimulai dengan LPS mampu menembus ke dalam jaringan periradikuler, lalu menyebabkan peradangan pada periradikuler dan juga berlanjut pada kerusakan tulang, sehingga menyebabkan adanya resorpsi tulang alveolar (Yustina, 2012).

Beberapa penelitian tentang resorpsi tulang alveolar, banyak dilakukan menggunakan hewan coba tikus karena memiliki genom yang hampir mirip atau homolog dengan manusia. Pada anatomi periodontal regio molar tikus mirip dengan anatomi periodontal regio molar manusia sehingga hewan ini digunakan sebagai hewan model untuk penyakit periodontal (Oz dan Puleo, 2011; Dumitrescu *et al.*, 2004).

Berdasarkan uraian di atas maka penulis ingin mengetahui lebih lanjut tentang efek induksi LPS *P. gingivalis* terhadap jumlah sel osteoklas dan osteoblas tulang alveolar pada hewan coba tikus wistar (*Rattus norvegicus*).

1.2 Rumusan Masalah

Masalah yang dapat dirumuskan berdasarkan latar belakang di atas adalah bagaimana efek induksi LPS *P. gingivalis* terhadap jumlah sel osteoklas dan osteoblas tulang alveolar tikus wistar (*Rattus norvegicus*)?

1.3 Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek induksi LPS *P. gingivalis* terhadap jumlah sel osteoklas dan osteoblas tulang alveolar tikus wistar (*Rattus norvegicus*).

1.4 Manfaat

Berdasarkan hasil penelitian ini diharapkan dapat :

1. Mengetahui efek induksi LPS *P. gingivalis* terhadap resorpsi tulang alveolar tikus wistar (*Rattus norvegicus*).
2. Memberikan informasi mengenai efek induksi LPS *P. gingivalis* terhadap jumlah sel osteoklas dan osteoblas tulang alveolar tikus wistar (*Rattus norvegicus*).
3. Hasil penelitian ini dapat dijadikan sebagai acuan bagi penelitian yang berhubungan dengan penyakit periodontal.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Penyakit Periodontal

Penyakit periodontal adalah penyakit inflamasi pada jaringan penyangga gigi yaitu jaringan periodontal (Singrhao *et al.*, 2015). Jaringan periodontal terdiri dari gingiva, ligamen periodontal, sementum, dan tulang alveolar. Penyakit periodontal ini merupakan penyakit inflamasi yang umumnya disebabkan oleh plak. Plak yang terakumulasi secara terus menerus mengakibatkan inflamasi pada gingiva dan dapat berlanjut mengenai ligamen periodontal maupun tulang alveolar (Newman *et al.*, 2015).

Penyakit periodontal diklasifikasikan menjadi dua yaitu gingivitis dan periodontitis. Gingivitis adalah penyakit inflamasi pada gingiva dengan karakteristik tidak adanya kehilangan perlekatan. Periodontitis adalah penyakit inflamasi pada jaringan periodontal dengan adanya kerusakan pada ligamen periodontal dan tulang alveolar yang ditandai dengan pembentukan poket, terjadinya resesi atau keduanya, bersifat *irreversible* dan apabila tidak dirawat dapat menyebabkan kehilangan gigi (Newman *et al.*, 2015).

2.1.1 Patogenesis Penyakit Periodontal

Perubahan patologis yang terjadi pada jaringan periodontal normal merupakan akibat dari aktivitas bakteri plak. Akumulasi plak yang dibiarkan secara terus menerus dapat mempengaruhi kondisi mikroskopis serta fisiologis jaringan periodontal normal. Bakteri plak mensintesis enzim kolagenase, hialuronidase, protease, dan endotoksin yang dapat merusak sel epitel dan jaringan gingiva. Secara histopatologi perubahan yang terjadi pada jaringan gingiva terdiri dari *initial lesion*, *early lesion*, *established lesion*, dan *advanced lesion* (Newman *et al.*, 2015).

Perkembangan 2 sampai 4 hari dari akumulasi plak akan membentuk *initial lesion*. Pada *initial lesion* terdapat adanya dilatasi pembuluh darah, meningkatnya permeabilitas pembuluh darah serta bermigrasinya sel neutrofil dan monosit. Meningkatnya proses perlekatan molekul-molekul seperti *intercellular adhesion molecul-1* (ICAM-1) dan *E-selectin* pada pembuluh darah gingiva akan

memfasilitasi bermigrasinya neutrofil dari kapiler darah ke jaringan ikat gingiva. Peningkatan kebocoran cairan dari pembuluh darah meningkatkan tekanan hidrostatik di daerah mikrosirkulasi, sehingga menyebabkan peningkatan aliran cairan gingiva (Newman *et al.*, 2015).

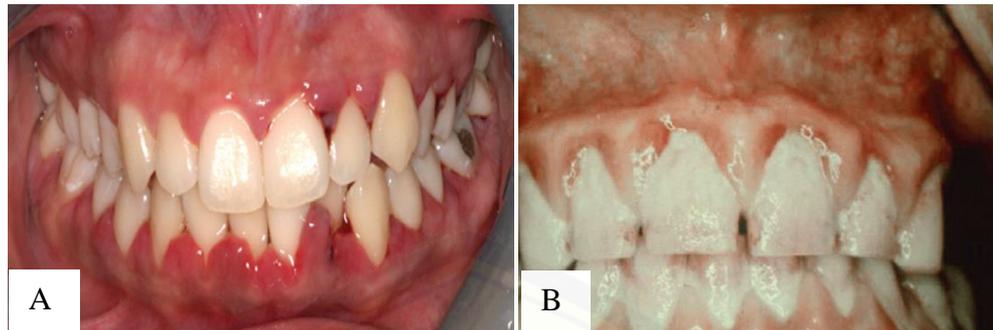
Tahap selanjutnya adalah *early lesion* yang berkembang dalam waktu satu minggu setelah plak terakumulasi. Tanda klinis pada gingiva mengalami eritema (tampak kemerahan) sebagai hasil adanya proliferasi pembuluh darah kapiler, pelebaran mikrovaskular dan vasodilatasi yang tetap berlanjut. Peningkatan permeabilitas vaskular dapat memicu peningkatan produksi laju cairan sulkus gingiva dan peningkatan transmigrasi sel neutrofil secara signifikan (Newman *et al.*, 2015). Perdarahan saat dilakukan *probing* pada gingiva kemungkinan akan jelas terjadi (Gambar 2.1) (Newman *et al.*, 2012). Selain itu, fibroblas mengalami degenerasi melalui apoptosis yang dapat meningkatkan tersedianya tempat untuk leukosit berinfiltrasi. Kolagen juga mengalami kerusakan, menyebabkan kolagen menipis pada daerah apikal dan lateral dari *junctional epithelium*. Sel basal pada struktur epitel berproliferasi ke tempat menipisnya kolagen dari jaringan ikat tersebut. *Biofilm* atau kumpulan plak bakteri yang terdapat pada subgingiva memanfaatkan tempat tersebut untuk berproliferasi ke arah apikal, sehingga lesi dapat berkembang lebih jauh (Newman *et al.*, 2015).



Gambar 2.1 A. *Probing* dilakukan pada gingiva yang tampak kemerahan. B. Perdarahan terjadi beberapa detik setelah dilakukan *probing* (Newman *et al.*, 2012).

Tahap selanjutnya adalah *established lesion* yaitu tahapan yang berlangsung selama paling cepat dua minggu setelah akumulasi plak (Newman *et al.*, 2012). Pada lesi ini terjadi peningkatan infiltrasi sel inflamasi, sehingga inflamasi menjadi kronis atau disebut juga sebagai gingivitis kronis. Sel inflamasi

dapat ditemukan pada daerah dekat lateral *junctional epithelium* di sekitar pembuluh darah, dan di antara serat-serat kolagen (Newman *et al.*, 2015). Sel neutrofil akan berakumulasi pada jaringan ikat dan melepaskan enzim lisosom, sehingga dapat menyebabkan kerusakan jaringan ikat yang lebih dalam. Proses hilangnya kolagen menjadi semakin meluas menyebabkan *junctional epithelium* membentuk epitelium poket yang tidak melekat lagi pada permukaan gigi (poket gingiva) yang disertai dengan jumlah sel neutrofil yang besar pada daerah tersebut. Pembuluh darah mengalami pelebaran dan memadat, sehingga aliran darah menjadi lambat (Newman *et al.*, 2015). Tanda klinis akibat perubahan ini adalah warna gingiva yang terinflamasi menjadi merah kebiruan atau yang biasa disebut sebagai *localized gingival anoxemia*. Selain itu tanda klinis tekstur permukaan gingiva yang normalnya *stippling* berubah menjadi halus disertai adanya pembengkakan (edema) pada margin dan interdental gingiva (Gambar 2.2). Permukaan gingiva *stippling* ini secara signifikansi biologis masih belum diketahui, tetapi beberapa peneliti menyimpulkan hilangnya tekstur permukaan gingiva yang normalnya *stippling* merupakan tanda klinis dari inflamasi kronis. Inflamasi kronis pada gingiva bersifat eksudatif (edematous) dan perubahan reparatif (fibrotik). Apabila dilihat secara mikroskopis terdapat perubahan bersifat eksudatif dan fibrotik yang dihubungkan dengan terjadinya perubahan gingiva menjadi halus, antara lain yaitu adanya infiltrasi cairan eksudat dan sel inflamasi, adanya degenerasi jaringan ikat dan epitel oleh karena inflamasi dan cairan eksudat yang mengakibatkan perubahan hubungan antara jaringan ikat dan epitel yang ditandai dengan menipisnya epitel, dan degenerasi tersebut dihubungkan dengan terjadinya edema dan invasi dari sel leukosit, serta terdapat juga proliferasi epitel dan fibrosis yang berhubungan dengan lama terjadinya inflamasi kronis (Newman *et al.*, 2012).



Gambar 2.2 Gingivitis kronis: A. Adanya perubahan warna gingiva menjadi merah kebiruan, B. Margin dan interdental gingiva mengalami pembengkakan (edema) dan memiliki permukaan halus (Newman *et al.*, 2012).

Tahap selanjutnya adalah *advanced lesion*. Pada lesi ini *junctional epithelium* bermigrasi ke daerah apikal sepanjang permukaan akar menuju ke daerah penipisan kolagen, berlanjut ke bagian bawahnya melawan epitel barrier yang masih utuh, dan setelah itu sel osteoklas memulai terjadinya resorpsi tulang. Epitelium poket yang sudah terbentuk merupakan tempat perlindungan bakteri sehingga apabila bakteri berproliferasi ke arah apikal mengakibatkan semakin dalam poket yang terbentuk dan membuat kerusakan serat-serat kolagen ligamen periodontal. Kerusakan pada ligamen periodontal yang terus menerus terjadi dapat merusak jaringan periodontal bahkan kerusakan tulang (Newman *et al.*, 2015).

2.1.2 Etiologi Penyakit Periodontal

Etiologi utama penyakit periodontal adalah bakteri plak. Plak merupakan deposit lunak yang membentuk *biofilm* dan melekat kuat pada permukaan gigi atau permukaan keras dalam rongga mulut seperti restorasi tetap atau lepasan. Berdasarkan letak plak di permukaan gigi ke arah margin gingiva, maka plak dapat dibedakan menjadi dua yaitu supragingiva dan subgingiva. Plak supragingiva adalah plak yang letaknya tepat atau di atas margin gingiva, sedangkan plak subgingiva adalah plak yang terletak di bawah margin gingiva, antara gigi dan *junctional epithelium* (Newman *et al.*, 2015).

Plak subgingiva adalah plak yang lebih berperan dalam menyebabkan penyakit periodontal. Hal ini disebabkan plak subgingiva dapat menyebabkan inflamasi, serta dapat berpenetrasi langsung ke dalam *junctional epithelium* yang menyebabkan kerusakan jaringan periodontal (Seymour *et al.*, 1992). Bakteri pada

plak subgingiva yang paling banyak berperan terhadap penyakit periodontal adalah bakteri Gram negatif, diantaranya *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* dan *Bacteroides forsythus* (Newman *et al.*, 2015). Menurut Carvalho-Filho *et al.* (2016), dari beberapa bakteri penyebab penyakit periodontal, *P. gingivalis* adalah bakteri yang paling kompeten karena dapat berkelompok dengan baik pada rongga mulut dan dalam jumlah sedikit dapat menyebabkan ketidakseimbangan komposisi mikroba oral, sehingga disebut juga sebagai *keystone*.

2.2 *Porphyromonas gingivalis*

Bakteri *P. gingivalis* secara taksonomi dapat diklasifikasikan sebagai berikut (Olsen *et al.*, 1999).

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

P. gingivalis merupakan bakteri patogen utama penyakit periodontal yang habitat utamanya berada pada plak subgingiva, yaitu di dalam sulkus gingiva atau poket periodontal. *P. gingivalis* adalah salah satu anggota dari sekitar 500 spesies bakteri yang hidup di rongga mulut dan bisa menjadi destruktif apabila berproliferasi pada lesi periodontal. Bakteri ini, bersama dengan *Treponema denticola* dan *Tannerella forsythia*, merupakan *red complex*, yaitu kesatuan *prototype* polibakterial yang patogen dalam periodontitis (Mysak *et al.*, 2014).

2.2.1 Karakteristik *Porphyromonas gingivalis*

P. gingivalis merupakan bakteri anaerob Gram negatif yang tidak berspora (*non-spore forming*), *asaccharolytic*, tidak memiliki alat gerak (*non motile*) dan membentuk koloni *black pigmented* pada *blood agar plate*. Bakteri ini sebelumnya bernama *Bacteroides gingivalis* kemudian mengalami reklasifikasi sebagai genus baru yaitu *Porphyromonas*, dimana nama *Porphyromonas* berasal dari *Porphyreos*, kata sifat Yunani yang artinya berarti ungu dan *Monas* kata

benda Yunani yang artinya satuan. Oleh karena itu, kata *Porphyromonas* berarti sel porfirin sebagai koloni pada *blood agar plate* yang berubah menjadi hitam setelah 6 sampai 10 hari (Mysak *et al.*, 2014). Pada media tersebut, koloni bakteri terlihat tampak lembut, berkilauan, bentuknya cembung, dan letak koloninya berada 1-2 mm di dalam garis tengah. Bakteri ini berbentuk *coccobacilli* dengan panjang sekitar 0,5-2 μm (Leslie *et al.*, 1998).

2.2.2 Faktor Virulensi *Porphyromonas gingivalis*

Menurut Imamura (2003), *P. gingivalis* dapat merusak jaringan dengan interaksi langsung antara bakteri dan *host* dengan cara menyerang sistem pertahanan *host*, sehingga dapat menyebabkan kerusakan pada jaringan periodontal. Hal ini disebabkan *P. gingivalis* memiliki faktor virulensi, dimana didefinisikan sebagai metabolit dari suatu organisme yang penting dalam berbagai tahap siklus dan menyebabkan kerusakan *host*, kapasitas suatu organisme menyerang dan menghindari mekanisme pertahanan antibakteri *host*, serta kemampuan untuk menghasilkan zat yang bisa memulai kerusakan jaringan (How *et al.*, 2016). Faktor virulensi yang dimiliki *P. gingivalis* diantaranya yaitu *fimbriae*, lipopolisakarida (LPS), proteinase, metabolit organik seperti asam butirrat serta berbagai enzim seperti arginin, gingipain, kolagenase, gelatinase dan hialuronidase (Imamura, 2003).

Fimbriae merupakan suatu protein dan juga filamen yang menonjol keluar dari permukaan sel bakteri yang merangsang perlekatan bakteri pada sel epitel atau jaringan *host*. *Fimbriae* memiliki kemampuan yang kuat dalam berinteraksi dengan protein *host* seperti protein saliva, protein ekstraselular matriks dan fibroblas (Imamura, 2003). Newman *et al.* (2015) juga menjelaskan bahwa *fimbriae* merupakan faktor virulensi bakteri yang berperan penting dalam memodifikasi dan menstimulasi respon imun pada jaringan periodontal.

Lipopolisakarida (LPS) merupakan komponen dari membran luar bakteri yang berperan sebagai agen sitotoksin yang dapat memicu respon inflamasi sel dan berbagai sinyal kemotoksin dari *host*. Rangsangan oleh LPS ini dapat mengakibatkan peristiwa inflamasi dan respon imun *host* (Imamura, 2003). Menurut How *et al.* (2016) menunjukkan bahwa LPS merangsang makrofag

menghasilkan sitokin proinflamasi yaitu interleukin-1 α (IL-1 α), *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) dan prostaglandin E₂ (PGE₂) yang dapat mempengaruhi terjadinya resorpsi tulang alveolar apabila diinjeksikan pada hewan model.

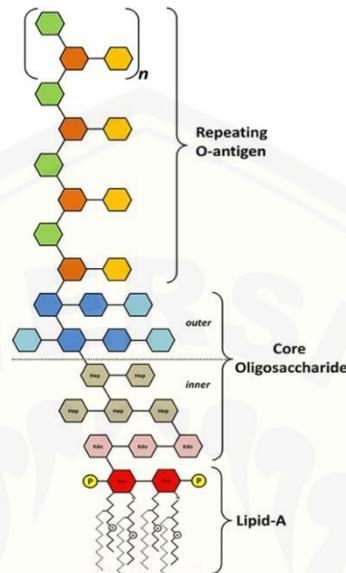
Proteinase merupakan faktor virulensi yang berperan penting terhadap pertumbuhan dari *P. gingivalis*. Proteinase menyediakan asam amino, peptida dan hemin yang berguna untuk memungkinkan bakteri dapat hidup dan berkembang dengan baik di dalam rongga mulut. Hal ini dikarenakan proteinase berperan membantu pengolahan komponen permukaan sel serta membantu penyediaan substrat untuk perlekatan sel bakteri. Proteinase ini terlibat langsung dalam invasi dan perusakan jaringan, serta memodulasi respon imun *host* (Imamura, 2003).

Enzim dan metabolit organik dari suatu bakteri merupakan faktor virulensi bakteri yang berkontribusi untuk merusak jaringan periodontal. Enzim seperti gingipain dan kolagenase yang dihasilkan *P. gingivalis* dapat berperan secara langsung dan tidak langsung dalam merusak jaringan, memodulasi respon imun *host*, mengganggu sistem imun *host* dan potensial mengawali terjadinya kerusakan jaringan. Metabolit organik seperti amonia, propionat dan butirat, juga menunjukkan kemampuannya untuk mengganggu sistem imun *host*, serta menunjukkan toksisitasnya terhadap epitel gingiva (Imamura, 2003). Menurut How *et al.* (2016), enzim dan metabolit organik terlibat langsung dalam kolonisasi bakteri pada poket periodontal yang mengarah ke kerusakan jaringan periodontal seperti dengan membantu aktivasi *matrix metalloproteinase* (MMP) pada *host* dan mendegradasi protein matriks ekstraseluler seperti kolagen.

2.3 Lipopolisakarida

Lipopolisakarida (LPS) merupakan struktur utama bakteri Gram negatif yang berfungsi membangun integritas struktural bakteri, dan melindungi bakteri dari pertahanan imunitas *host* (Murray dan Wilton, 2003). LPS adalah molekul berukuran besar yang mengandung lipid dan karbohidrat yang dapat dideteksi pada plak gigi atau sekitar permukaan akar gigi (Kusumawardani, 2006). LPS terdiri atas lipid A, antigen O dan oligosakarida yang terikat bersama (Gambar 2.3). Lipid A dapat memicu respon inflamasi karena inti polisakarida yang

melekat pada lipid A merupakan bagian yang bertanggung jawab terhadap toksisitas bakteri Gram negatif (Ayu, 2015).



Gambar 2.3 Struktur umum pada LPS; terdiri atas lipid A, antigen O dan oligosakarida yang terikat bersama (Serrato, 2014).

LPS *P. gingivalis* mampu mengaktifkan respon inflamasi *host* dan mengganggu remodeling tulang. LPS berperan mengganggu pengawasan imunitas bawaan *host* dengan distribusi leukosit pada sekitar kolonisasi bakteri, merangsang sitokin proinflamasi yang diantaranya berupa IL-1 α , TNF- α dan PGE₂, serta menghambat diferensiasi osteoblas dan mineralisasi sel induk ligamen periodontal dalam regenerasi jaringan periodontal (How *et al.*, 2016). Menurut Cekici *et al.* (2014) juga menjelaskan bahwa LPS berperan pada sel osteoblas yang terdapat pada jaringan gingiva dengan mengeluarkan mediator inflamasi yang digunakan sebagai faktor pembentukan dan aktivitas osteoklas. Sinyal inflamasi yang kompleks dari sitokin tersebut diantaranya *receptor activated nuclear kappa- β ligand* (RANKL), IL-1 α , TNF- α , dan PGE₂.

IL-1 α dan TNF- α merupakan sitokin proinflamasi yang berperan mengaktifkan makrofag dan fibroblas jaringan gingiva untuk memproduksi enzim *matrix metalloproteinase* (MMP). MMP ini berperan mengawali terjadinya degradasi protein matriks ekstraseluler seperti kolagen pada jaringan gingiva (Klaus *et al.*, 2004). Selain itu, IL-1 α dan TNF- α secara langsung dapat

menstimulasi terjadinya apoptosis osteoblas ataupun sel prekursor osteoblas. Proliferasi atau tingginya apoptosis osteoblas ataupun sel prekursornya oleh adanya inflamasi tersebut dapat meningkatkan penurunan jumlah sel osteoblas (Indahyani, 2013).

RANKL merupakan regulator dari *remodeling* tulang yang terlibat langsung dalam diferensiasi, aktivasi, dan kemampuan hidup osteoklas dan prekursor osteoklas. RANKL diekspresikan oleh osteoblas, sel stroma, kondrosit dan sel mesenkim lainnya. LPS dapat mengatur RANKL yang memicu pembentukan osteoklas baru (osteoklastogenesis), sehingga mengakibatkan peningkatan jumlah sel osteoklas. Dengan adanya peningkatan osteoklas dan penurunan jumlah osteoblas, maka proses *remodeling* tulang dapat terganggu (How *et al.*, 2016).

2.4 Tulang Alveolar

Tulang alveolar adalah bagian dari maksila dan mandibula yang terbentuk dan mendukung soket gigi (alveoli). Soket gigi ini terbentuk saat gigi erupsi, dan akan menghilang secara berangsur-angsur saat gigi lepas atau hilang (Newman *et al.*, 2015). Struktur tulang alveolar merupakan jaringan ikat yang termineralisasi yang terdiri atas matriks tulang dan sel tulang (Chatarjee, 2006).

Matriks tulang alveolar terdiri dari komponen organik, non-organik dan air seperti pada tabel 2.1. Pada komponen non-organik terdiri dari kalsium, fosfor, bikarbonat, sitrat, magnesium, potasium, dan sodium. Kalsium dan fosfor merupakan komponen yang jumlahnya lebih banyak. Sedangkan pada komponen organik terdiri dari 90% komponen material organik seperti kolagen tipe 1 dan juga beberapa substansi dasar yang mengandung proteoglikan dan sejumlah kecil protein lain seperti osteoklasin, osteonektin, dan osteopontin. Bentuk mineral tulang yaitu hidroksiapatit $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, dimana berbentuk seperti jarum kristalit atau lempengan tipis yang tebalnya 8 nm dan panjangnya bervariasi (Chatarjee, 2006).

Tabel 2.1 Komponen matriks tulang alveolar

	Berat	Volume
Komponen non-organik	60 %	36 %
Komponen organik	25 %	36 %
Air	15 %	28 %

(Chatarjee, 2006).

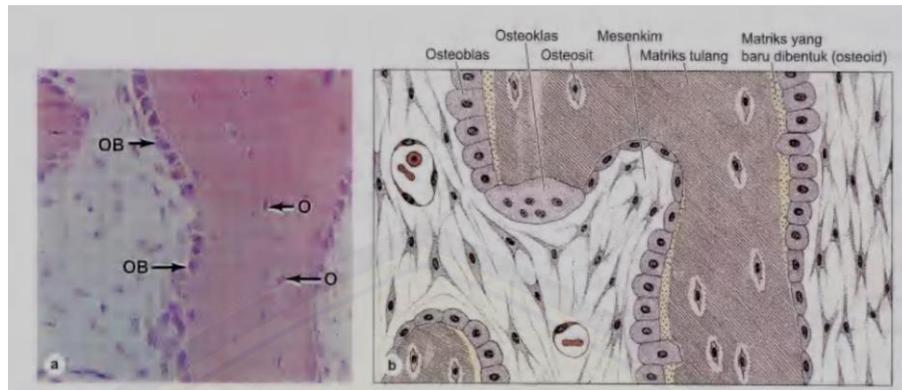
Pada tulang alveolar juga terdapat tiga jenis sel yaitu osteosit yang terdapat dalam rongga (*lacuna*) di dalam matriks; osteoblas, yang membentuk komponen organik dari matriks; dan osteoklas yang berperan pada resorpsi dan pembentukan kembali jaringan tulang (Mescher, 2011).

1. Osteoblas

Osteoblas adalah sel-sel pembentuk tulang yang berasal dari sel prekursor sel stroma di sumsum tulang yang bertanggung jawab atas pembentukan matriks tulang, oleh karena itu banyak ditemukan pada tulang yang sedang tumbuh (Ganong, 2002). Osteoblas terletak pada permukaan jaringan tulang, berdampingan seperti pada epitel selapis tipis. Selnya berbentuk kubus atau trapesium dengan tonjolan-tonjolan kecil, inti sel berjumlah satu dan terdapat pada bagian puncak sel dengan mengandung kompleks golgi di bagian basal (Bajpai, 1990).

Sel osteoblas yang aktif, kaya akan retikulum endoplasmik serta ribosom-ribosom sitoplasmanya berbentuk basofilik. Sitoplasma tampak basofilik karena banyak mengandung ribonukleoprotein yang menandakan aktif mensintesis protein (Bajpai, 1990). Saat osteoblas terlibat secara aktif dalam pembuatan matriks, maka osteoblas akan berbentuk kuboid hingga silindris (Gambar 2.4). Jika aktivitas mensintesis telah berkurang, maka osteoblas akan menjadi gepeng dan basofil pada sitoplasmanya akan berkurang (Mescher, 2011).

Peran utama osteoblas adalah membuat dan mengeluarkan unsur organik makromolekular matriks tulang. Matriks ini tidak hanya terletak pada sekitar badan sel, tetapi juga sekitar cabang-cabang sitoplasma yang menghasilkan kanalikuli. Selain itu, osteoblas juga ikut serta dalam nukleasi mineral tulang (Omega, 2011).



Gambar 2.4 Gambaran osteoblas dan osteosit: Fotomikrograf tulang sedang terbentuk memperlihatkan perbedaan lokasi dan morfologi antara osteoblas (OB) dan osteosit (O). (a) Osteoblas berasal dari sel mesenkim yang berdekatan dan tampak sebaris dengan sel yang berdekatan dengan selapis tipis matriks, osteosit berbentuk gepeng dan berada dalam *lacuna*. (b) Gambar skematis memperlihatkan hubungan osteoblas dengan osteosit dan matriks tulang (Mescher, 2011).

2. Osteosit

Sel osteosit adalah sel tulang matang yang berada pada matriks tulang dan berperan mengarahkan kalsium dari matriks untuk transport jaringan (Hienz *et al.*, 2015). Sekitar 90-95% dari total sel tulang, sel osteosit merupakan sel yang memiliki hidup panjang yaitu sampai 25 tahun. Bentuk sel tergantung dari tipe tulang, osteosit pada tulang trabekular lebih bulat dibandingkan osteosit pada tulang kortikal (Nakamura, 2007).

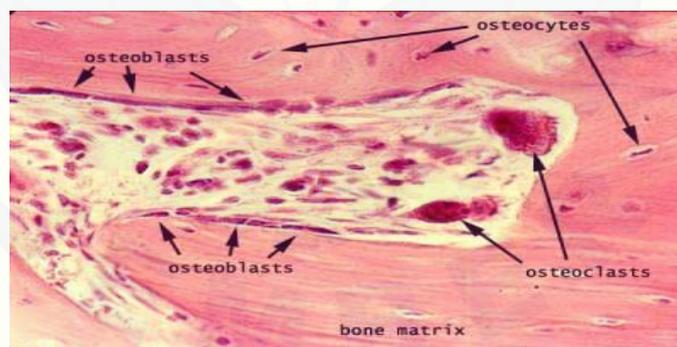
Osteosit berasal dari osteoblas. Pada akhir siklus pembentukan tulang, sebagian osteoblas berubah menjadi osteosit dan berada pada matriks tulang. Proses ini diikuti dengan perubahan morfologi dan struktur dari sel yaitu reduksi ukuran sel osteoblas. Sejumlah organel yaitu retikulum endoplasma dan nukleus mengalami peningkatan rasio, pengurangan sintesis dan sekresi protein (Nakamura, 2007). Apabila dibandingkan dengan osteoblas, osteosit yang gepeng dan berbentuk kenari memiliki sedikit retikulum endoplasma kasar dan kompleks golgi serta kromatin inti yang lebih padat (Gambar 2.4) (Mescher, 2011).

3. Osteoklas

Osteoklas adalah sel raksasa yang berinti banyak (multinukleus) yang dibentuk oleh penggabungan monosit darah di tulang yang terlibat dalam proses

resorpsi tulang. Sel osteoklas sering terletak pada cekungan dangkal pada permukaan tulang (Gambar 2.5). Cekungan ini disebut *Howship's lacunae*. Sel ini berasal dari sel bakal (*stem cell*) *hematopoietic* (Ganong, 2002). Osteoklas banyak mengandung mitokondria, retikulum endoplasma, dan badan golgi (Nakamura, 2007). Osteoklas berperan dalam mensekresikan kolagenase dan enzim proteolitik lain yang menyerang matriks tulang dengan cara melepaskan zat dasar yang terkalsifikasi (Maryana, 2004).

Membran plasma dari osteoklas terbagi menjadi tiga region yaitu zona bersih (*clear zone*), *ruffled border*, dan basolateral plasma. Zona bersih atau *clear zone* adalah area perlekatan osteoklas terhadap matriks tulang. Keberadaan osteoklas secara khas terlihat dengan adanya mikrofilli halus yang membentuk batas yang berkerut-kerut yaitu *ruffled border*. *Ruffled border* ini dapat mensekresikan beberapa asam organik yang dapat melarutkan komponen mineral pada enzim proteolitik lisosom untuk kemudian bertugas menghancurkan matriks organik. Basolateral plasma adalah area yang menunjukkan kemampuan untuk menerima stimulasi kalsitonin (hormon yang membantu aktivasi osteoklas) dan sitokin serta berperan penting dalam interaksi antarsel (Nakamura, 2007).



Gambar 2.5 Gambaran mikroskopik yang memperlihatkan dua osteoklas yang merupakan sel raksasa yang berinti banyak (multinukleus) yang terletak pada cekungan dangkal pada permukaan tulang (Geneser, 1994).

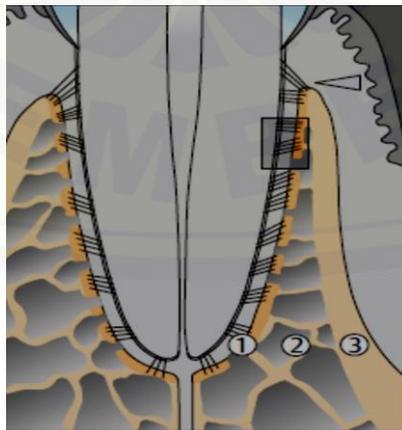
2.4.1 Anatomi Tulang Alveolar

Tulang alveolar terbagi menjadi dua yaitu *alveolar proper bone* dan *alveolar supporting bone* (Gambar 2.6). *Alveolar proper bone* adalah tulang

yang membatasi alveoli atau soket tulang yang berisi akar gigi. *Alveolar supporting bone* adalah tulang yang mengelilingi *alveolar proper bone* dan merupakan penyokong dari soket gigi (Grossman *et al.*, 1998).

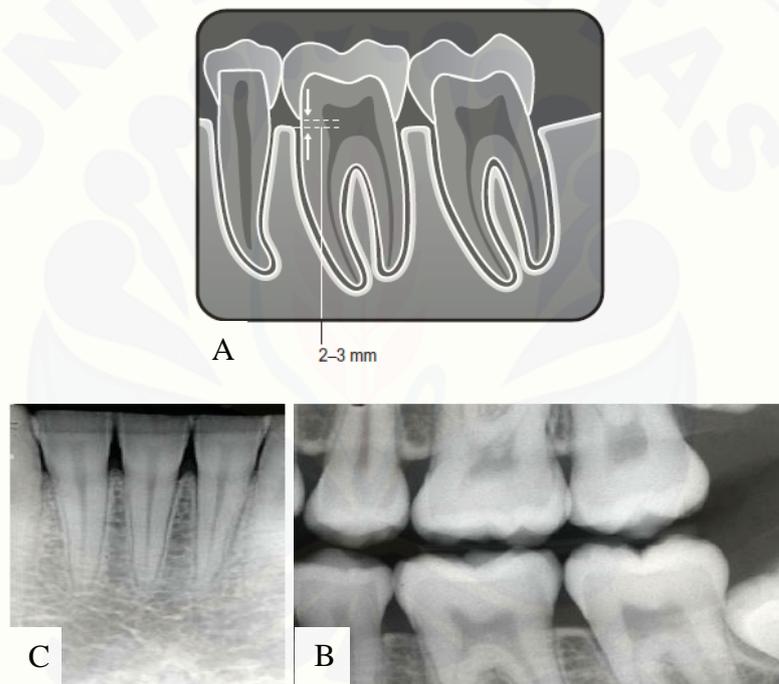
Alveolar proper bone merupakan bagian dari jaringan periradikular yang terdiri dari bundel tulang di tepi alveoli dan tulang yang berlamela ke arah pusat prosesus alveolar. Tulang ini disebut sebagai lempeng kribiform karena banyaknya foramina yang melubangi tulang. Foramina ini berisi pembuluh darah dan saraf yang mensuplai gigi geligi, ligamen periodontal dan tulang (Grossman *et al.*, 1998). Secara radiologi, tulang ini juga disebut sebagai lamina dura (Klaus *et al.*, 2004).

Alveolar supporting bone terdiri atas 2 bagian yaitu keping kortikal eksternal dan tulang trabekular atau tulang spons (Gambar 2.6). Keping kortikal eksternal adalah tulang yang dibentuk oleh tulang havers dan lamela tulang kompak yang terdapat di dalam dan di luar lempeng prosesus alveolar. Keping kortikal eksternal berjalan miring ke arah koronal untuk bergabung dengan tulang *Alveolar proper bone* dan membentuk dinding alveolar dengan ketebalan sekitar 0,1–0,4 mm. Tulang trabekular atau tulang spons merupakan tulang yang mengisi ruang antara tulang kompak dan *alveolar proper bone*. Septum interdental terdiri dari tulang spons yang mendukung tulang dan menutupi bagian dalam dari tulang kompak (Grossman *et al.*, 1998).



Gambar 2.6 Gambaran struktur tulang alveolar: (1) *alveolar proper bone*, (2) tulang trabekular, (3) keping kortikal eksternal, dimana dibentuk dari tulang kompak (Klaus *et al.*, 2004).

Tulang alveolar normal apabila dilakukan pemeriksaan secara radiologi biasanya dihubungkan dengan melihat jarak antara margin puncak tulang alveolar dengan *cemento-enamel junction* (CEJ) yang memiliki batas normal sekitar 2-3 mm. Gambaran radiografi pada gigi posterior tampak puncak alveolar diantara masing-masing gigi sejajar dengan garis penghubung CEJ yang berdekatan. Pada gigi anterior puncak alveolar diantara masing-masing gigi biasanya berbentuk runcing (Gambar 2.7). Puncak interdental tampak berhubungan langsung atau berlanjut dengan lamina dura dari gigi yang berdekatan sehingga membentuk bentuk sudut yang tajam (Whaites dan Drage, 2013).



Gambar 2.7 Gambaran radiografi tulang alveolar normal: A. Jarak antara margin puncak tulang alveolar dengan *cemento-enamel junction* (CEJ) dalam batas normal sekitar 2-3 mm, B. Pada gigi posterior puncak alveolar diantara masing-masing gigi sejajar dengan garis penghubung CEJ yang berdekatan, C. Pada gigi anterior puncak alveolar diantara masing-masing gigi biasanya berbentuk runcing (Whaites dan Drage, 2013).

2.4.2 Destruksi Tulang Alveolar

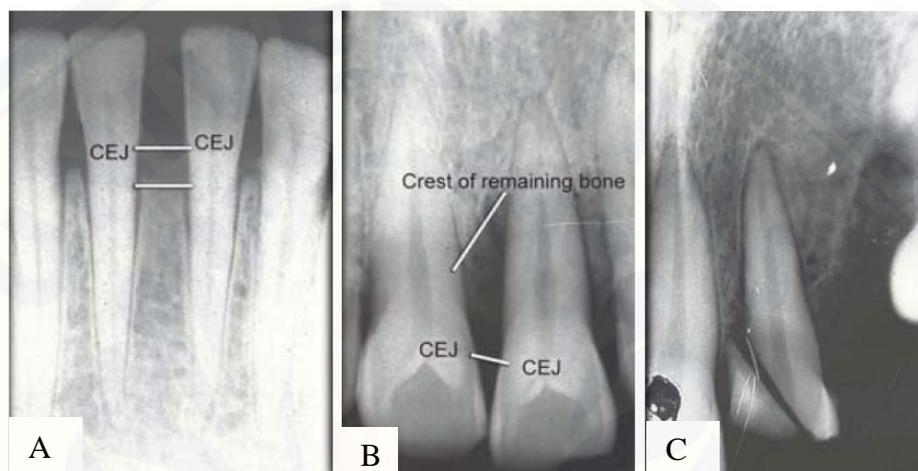
Tinggi dan kepadatan tulang alveolar pada keadaan normal memiliki keseimbangan antara besarnya pembentukan dan resorpsi yang diatur oleh faktor sistemik dan faktor lokal dalam proses *remodeling*. Saat nilai resorpsi lebih besar dari nilai pembentukan tulang, tinggi dan kepadatan tulang alveolar dapat menurun. Hal ini dikarenakan resorpsi merupakan proses morfologi kompleks yang berhubungan dengan kerusakan pada permukaan tulang alveolar (Newman *et al.*, 2015).

Kerusakan tulang pada penyakit periodontal disebabkan utamanya karena kelanjutan inflamasi dari margin gingiva ke jaringan periodontal. Inflamasi ini diawali dari inflamasi gingiva yang menjalar sepanjang bundel serat kolagen mengikuti lintasan pembuluh darah melalui jaringan yang tersusun longgar di sekitar pembuluh darah menuju ke tulang alveolar. Pada sisi interproksimal, inflamasi menjalar melalui jaringan ikat longgar di sekitar pembuluh darah kemudian masuk ke tulang alveolar melalui kanal pembuluh yang menembus krista septum interdental. Inflamasi dapat menjalar ke puncak tulang alveolar apabila ditandai dengan adanya infiltrasi sel mediator ke ruang trabekula, sehingga membuat daerah resorpsi tulang dapat bertambah (Newman *et al.*, 2012).

Pada inflamasi yang sudah mencapai tulang, inflamasi menyebar ke dalam ruang sumsum disertai dengan adanya leukosit, pembuluh darah baru, proliferasi sel fibroblas serta jumlah fagosit osteoklas yang mengalami peningkatan. Inflamasi tersebut apabila terus berlanjut akan menyebabkan penipisan pada tulang trabekula, diikuti oleh kerusakan tulang, dan berkurangnya tinggi tulang. Kerusakan tulang ini bukanlah proses tulang yang mengalami nekrosis, melainkan melibatkan aktivitas sel-sel hidup yang berada dalam tulang tersebut (Newman *et al.*, 2012).

Aktivitas kerusakan tulang alveolar pada penyakit periodontal dapat dievaluasi menggunakan pemeriksaan radiologi. Ketika interdental septum puncak tulang alveolar mengalami perubahan menjadi bentuk *irregular* (tidak sesuai normal), maka menandakan bahwa adanya aktivitas destruksi tulang. Selain itu, identifikasi pada foto rontgen didapatkan adanya pelebaran ruang ligamen

periodontal, kehilangan lamina dura, serta adanya kehilangan tulang baik secara horizontal atau vertikal (Gambar 2.8) (Vijay dan Raghavan, 2013). Kehilangan tulang secara horizontal adalah apabila puncak tulang alveolar pada bagian proksimal tulang sejajar dengan garis khayal yang terdapat diantara CEJ yang berbatasan dengan gigi, sedangkan kehilangan tulang secara vertikal apabila puncak tulang alveolar pada bagian proksimal tulang tidak sejajar dengan garis khayal yang terdapat diantara CEJ (Klaus *et al.*, 2004).



Gambar 2.8 Gambaran radiografi tulang alveolar yang mengalami kerusakan: A. kerusakan tulang alveolar secara horizontal, B. kerusakan tulang alveolar secara vertikal, C. pelebaran ruang ligamen periodontal (Vijay dan Raghavan, 2013).

2.5 Pengaruh Lipopolisakarida terhadap Resorpsi Tulang Alveolar

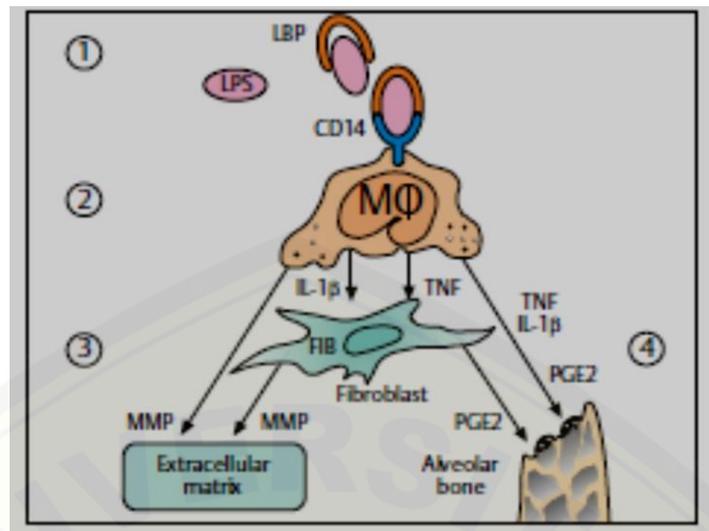
Penyakit periodontal dapat menyebabkan perubahan morfologi tulang alveolar dengan adanya kerusakan pada tulang. Penyebab utama dari kerusakan tulang biasanya karena terganggunya keseimbangan antara aktivitas sel osteoblas dan sel osteoklas, yang ditimbulkan karena produk bakteri dan sitokin inflamasi. Bakteri secara langsung dapat menginduksi terjadinya inflamasi jaringan periodontal melalui mekanisme perlawanan sistem imun terhadap bakteri, sehingga respon imun *host* memainkan peran penting dalam terjadinya periodontitis (Zekonis *et al.*, 2014).

Respon imun *host* dapat dibagi menjadi respon imun bawaan dan respon imun adaptif. Kedua respon ini dapat beroperasi bersama-sama dan tidak

dipisahkan, saling melengkapi untuk menjaga kesehatan dan mencegah penyakit. Pada respon imun bawaan, bakteri dapat dikenali oleh reseptor non-klonal, atau dikenal sebagai reseptor pengenalan pola. Reseptor ini akan mengenali pola molekul terkait patogen seperti LPS dari bakteri Gram negatif dan *lipoteichoic acids* (LTA) dari bakteri Gram positif. Peristiwa tersebut dimediasi oleh *toll-like receptor-4* (TLR4), dimana TLR4 merupakan protein pada permukaan sel yang dapat mengenali produk bakteri. Apabila TLR4 sudah mengenali pola molekul terkait patogen, mereka memulai mengaktifasi beberapa faktor transkripsi seperti aktivator protein dan RANKL yang pada akhirnya mengaktifkan jalur imunitas alami yang berbeda, termasuk produksi sitokin dan kemotoksin yang membawa leukosit ke jaringan periodontal (Zekonis *et al.*, 2014; Hasan dan Palmer, 2014).

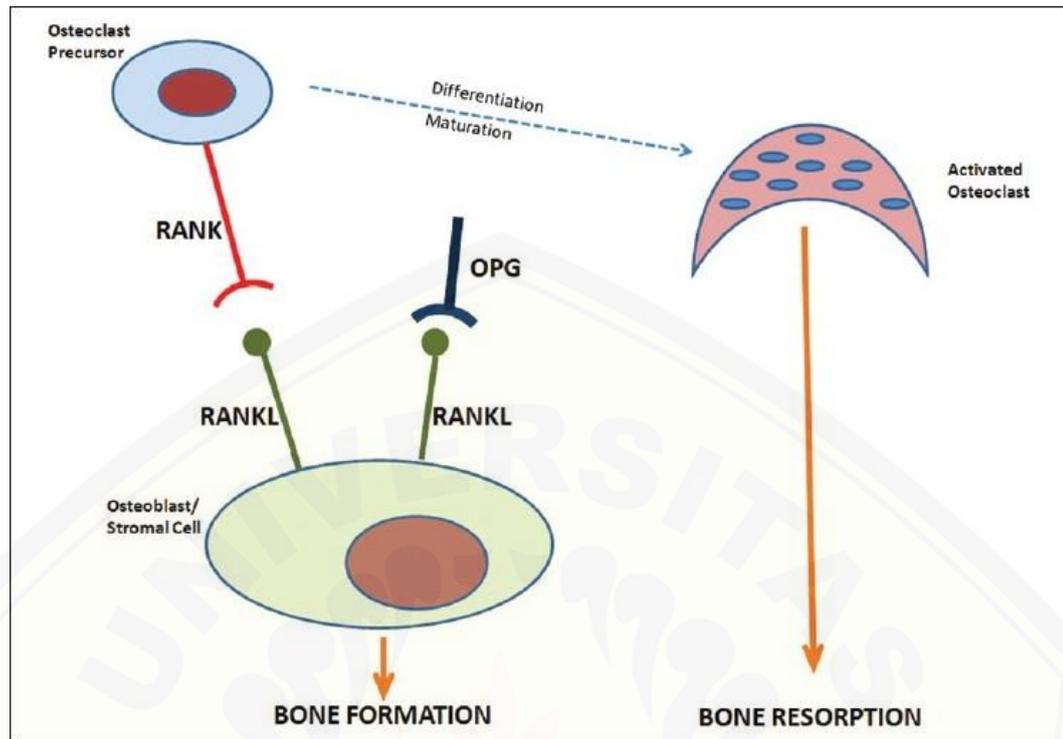
Pada respon imun adaptif apabila suatu mikroba dikenali oleh reseptor yang sesuai pada makrofag ($M\phi$), maka sitokin yang dilepaskan akan mengaktifkan sel T dan sel B sehingga menarik respon imun humoral. Monosit, makrofag, dan fibroblas yang teraktivasi menghasilkan sitokin proinflamasi yaitu TNF- α , IL-1 α , dan PGE₂. Sitokin ini menghasilkan produksi enzim serta mediator inflamasi, termasuk MMP dan *tissue inhibitor of metalloproteinases* (TIMP) sehingga terjadi destruksi matriks ekstraseluler gingiva seperti kolagen yang mengakibatkan kerusakan jaringan keras dan lunak yang *irreversible* (Zekonis *et al.*, 2014; Hasan dan Palmer, 2014).

Mekanisme lipopolisakarida terhadap resorpsi tulang alveolar (Gambar 2.9) yaitu dimulai saat LPS berikatan dengan *lipopolysaccharide binding protein* (LBP). LBP adalah reaktan pada fase akut yang berfungsi mengkatalase LPS, sehingga LPS dapat terikat pada membran *cluster of differentiation-14* (CD14). CD14 adalah reseptor permukaan sel pada monosit atau makrofag ($M\phi$) yang mampu mengaktifasi sistem imun bawaan dengan menstimulasi TLR4. Aktivasi reseptor CD14 dapat mengaktifasi monosit dan sel endotel melalui jalur TLR4 menghasilkan molekul atau sitokin pro-inflamasi seperti IL-1 α , TNF- α dan PGE₂. Sitokin proinflamasi tersebut menyebabkan proliferasi sel osteoklas meningkat, sehingga aktivitas resorpsi tulang alveolar juga mengalami peningkatan (Ayu, 2015).



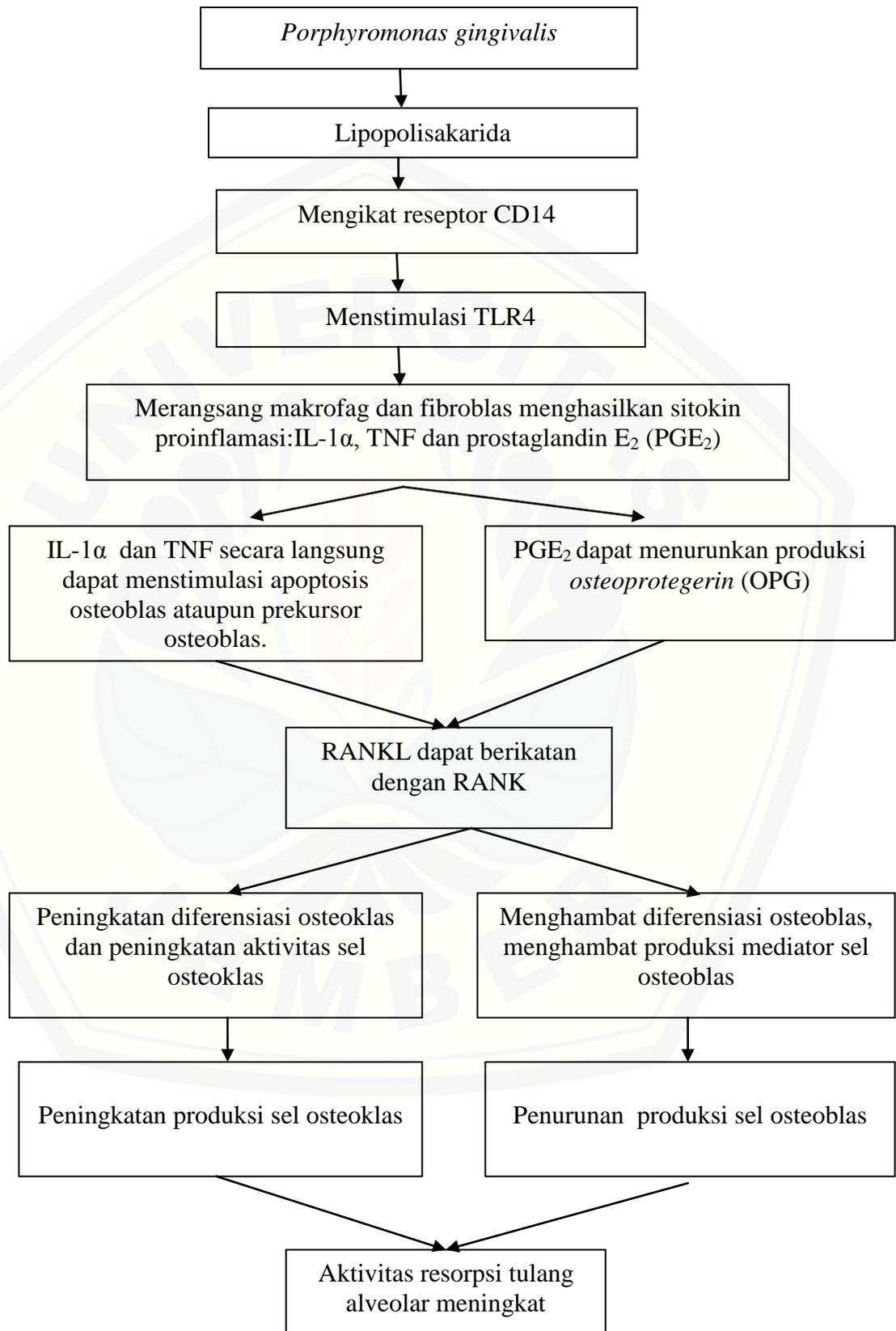
Gambar 2.9 Mekanisme LPS dalam resorpsi tulang alveolar (Klaus *et al.*, 2004).

PGE₂ dapat menurunkan produksi *osteoprotegerin* (OPG), dimana OPG adalah sitokin yang dihasilkan oleh osteoblas dan sel stromal *bone marrow*, yang berfungsi sebagai reseptor penyeimbang dan berkompetisi dengan *receptor activated nuclear kappa- β* (RANK) pada sel osteoklas, agar RANK tidak berikatan dengan RANKL. Penurunan OPG yang disebabkan oleh pengaruh PGE₂, menyebabkan RANKL dapat berikatan dengan RANK pada permukaan sel prekursor osteoklas, akibatnya menimbulkan peningkatan diferensiasi dan pematangan sel osteoklas, sehingga menghasilkan terjadinya peningkatan osteoklastogenesis. Peningkatan osteoklastogenesis ini akan meningkatkan jumlah sel osteoklas. Dengan adanya peningkatan jumlah sel osteoklas dan penurunan jumlah sel osteoblas sehingga meningkatkan aktivitas resorpsi tulang (Gambar 2.10) (Ayu, 2015; Kohlie dan Kohlie, 2011).



Gambar 2.10 Hubungan *osteoprotegerin* (OPG) terhadap *receptor activated nuclear kappa- β* (RANK) dan *receptor activated nuclear kappa- β ligand* (RANKL) (Kohlie dan Kohlie, 2011).

2.6 Kerangka Konsep



2.7 Penjelasan Kerangka Konsep

LPS merupakan struktur utama dinding sel bakteri Gram negatif (*Porphyromonas gingivalis*) yang berfungsi untuk integritas struktur bakteri dari sistem pertahanan imun host yang terdiri atas lipid A, antigen O dan oligosakarida yang terikat bersama. Pada awal inflamasi lipopolisakarida berikatan dengan *lipopolysaccharide binding protein* (LBP). LBP adalah reaktan pada fase akut yang berfungsi mengkatalase LPS, sehingga LPS dapat terikat pada membran *cluster of differentiation-14* (CD14). CD14 adalah reseptor permukaan sel pada monosit atau makrofag (M ϕ) yang mampu mengaktifasi sistem imun bawaan dengan menstimulasi *toll-like receptor-4* (TLR4), dimana TLR4 merupakan protein pada permukaan sel yang dapat mengenali produk bakteri (Yustina, 2012).

Aktivas reseptor CD14 yang mengaktifasi monosit dan sel endotel melalui jalur TLR4 menghasilkan molekul atau sitokin proinflamasi seperti interleukin-1 α (IL-1 α), *tumor necrosis factor* (TNF) dan prostaglandin E₂ (PGE₂). Sitokin proinflamasi seperti IL-1 α dan TNF- α secara langsung menstimulasi apoptosis osteoblas ataupun prekursor osteoblas. PGE₂ dapat menurunkan produksi *osteoprotegerin* (OPG), dimana OPG adalah inhibitor alami untuk menghambat ikatan *receptor activated nuclear kappa- β ligand* (RANKL) pada osteoblas dengan *receptor activated nuclear kappa- β* (RANK) pada osteoklas. Penurunan OPG tersebut mengakibatkan RANKL dapat berikatan dengan RANK yang memicu peningkatan diferensiasi dan aktivitas sel osteoklas, serta terhambatnya diferensiasi dan produksi mediator sel osteoblas. Peningkatan diferensiasi dan aktivitas sel osteoklas mengakibatkan terjadinya osteoklastogenesis yang ditandai dengan peningkatan jumlah sel osteoklas. Sedangkan terhambatnya diferensiasi dan produksi mediator sel osteoblas mengakibatkan penurunan jumlah sel osteoblas. Dengan adanya peningkatan jumlah sel osteoklas dan penurunan jumlah sel osteoblas yang terjadi, mengakibatkan peningkatan aktivitas proses resorpsi tulang alveolar (Ayu, 2015).

2.8 Hipotesis

Induksi LPS *P. gingivalis* pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) meningkatkan jumlah sel osteoklas dan menurunkan jumlah sel osteoblas.



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratoris secara *in-vivo* dengan *the post test only control group design*, yaitu melakukan pengamatan setelah perlakuan sesuai waktu yang telah ditentukan dan hasilnya dibandingkan dengan kelompok kontrol (Notoatmodjo, 2002).

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Pelaksanaan penelitian di tempat sebagai berikut :

1. Pemeliharaan dan perlakuan hewan coba dilakukan di Laboratorium Farmakologi Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
2. Pembuatan stok LPS *P. gingivalis* dilakukan di Laboratorium *Bioscience* Rumah Sakit Gigi dan Mulut (RSGM) Universitas Jember.
3. Pembuatan preparat jaringan, pengecatan jaringan dengan *haematoxilin eosin* serta penghitungan jumlah sel osteoklas dan sel osteoblas dilakukan di Laboratorium Histologi Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Waktu penelitian ini dilaksanakan pada bulan April 2016 - Mei 2017.

3.3 Sampel Penelitian

3.3.1 Besar Sampel

Berdasarkan rumus dari Daniel (1991), besar sampel minimal pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

$$n = \frac{Z^2 \sigma^2}{d^2}$$
$$n = \frac{(1,96)^2 (1,74)^2}{(1,5)^2} = 5,14 \approx 5$$

Keterangan :

n : besar sampel tiap kelompok

Z : harga standar normal yang didapat pada table Z yaitu nilai Z pada kesalahan tertentu α (taraf signifikansi), jika $\alpha = 0,05$, maka $Z = 1,96$

d : penyimpangan yang masih dapat ditolerir

σ : standar deviasi

Berdasarkan rumus di atas maka jumlah sampel minimal yang harus digunakan adalah 5 ekor tikus untuk masing-masing kelompok. Penelitian ini terbagi dalam 4 kelompok sehingga jumlah keseluruhan sampel yang digunakan sebanyak 20 ekor tikus.

3.3.2 Kriteria Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus wistar (*Rattus norvegicus*). Adapun kriterianya sebagai berikut :

- Kondisi fisik tikus sehat dengan tingkah laku normal dan tidak mengalami kelainan fisik maupun kelainan pada rongga mulut
- Berat badan 200-250 gram
- Umur 3-4 bulan
- Pakan yang sesuai dan seragam
- Jenis kelamin jantan

3.4 Variabel Penelitian

- Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian adalah LPS *P. gingivalis*.

- Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian adalah jumlah sel osteoklas dan osteoblas tulang alveolar tikus wistar (*Rattus norvegicus*).

3. Variabel terkontrol

Variabel terkontrol pada penelitian adalah sebagai berikut :

- a. Kriteria sampel
- b. Konsentrasi LPS *P. gingivalis* 0,5 mg/ml
- c. Aklimatisasi hewan coba selama 1 minggu

3.5 Definisi Operasional Penelitian

3.5.1 Lipopolisakarida

Lipopolisakarida (LPS) adalah endotoksin yang berasal dari *P. gingivalis* yang diinjeksikan pada sulkus gingiva di daerah proksimal gigi M1 dan M2 kanan rahang bawah tikus wistar dengan volume 10 µl dan konsentrasi 0,5 mg/ml menggunakan jarum tuberkulin 30G untuk setiap injeksi. Injeksi dilakukan sebanyak 3 kali seminggu selama 6 minggu untuk mendapatkan resorpsi tulang alveolar yang lebih terlihat (Ossola *et al.*, 2012).

3.5.2 Sel Osteoklas

Sel osteoklas adalah sel raksasa yang berinti banyak (multinukleus) yang terlibat dalam proses resorpsi tulang dan sering terletak pada cekungan dangkal pada permukaan tulang yaitu *Howship's lacunae*. Jumlah sel osteoklas dihitung menggunakan preparat atau sediaan mikroskopis yang diamati di bawah mikroskop binokuler (optilab) dengan perbesaran 400x.

3.5.3 Sel Osteoblas

Sel osteoblas adalah sel yang berhubungan dengan pembentukan tulang dan biasanya terletak secara berdampingan pada permukaan jaringan tulang. Sel ini berbentuk kubus atau trapesium dengan jumlah inti sel satu, dan memiliki sitoplasma yang tampak basofilik. Jumlah sel osteoblas dihitung menggunakan preparat atau sediaan mikroskopis yang diamati di bawah mikroskop binokuler (optilab) perbesaran 400x.

3.6 Alat dan Bahan

3.6.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini sebagai berikut :

- a. Pada perlakuan hewan coba diperlukan beberapa alat yaitu kandang plastik (Lion Star, Indonesia), tempat makan dan minum tikus, *rat dental chair*, pinset, gunting, *blade* dan *scalpel*, dan pot obat.
- b. Pada pembuatan stok LPS *P. gingivalis* diperlukan beberapa alat yaitu mikropipet (Hummapete, Jerman), *blue tip* dan *yellow tip*, *ependorf* (ukuran 1,5 ml), *vibrator* (Vortex), *laminar flow*, dan *medical refrigerator*.
- c. Pada pembuatan preparat jaringan, pengecatan jaringan serta penghitungan jumlah sel osteoklas dan osteoblas diperlukan beberapa alat yaitu alat cetak parafin, *waterbath*, mikrotom, mikroskop binokuler (optilab).

3.6.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini sebagai berikut :

- a. Bahan untuk perlakuan hewan coba yaitu tikus wistar jantan, air (PDAM), pakan tikus (Turbo Feed, Indonesia), sekam, sarung tangan (Maxter, Malaysia), jarum tuberkulin 30G (Terumo, Jepang), masker (One Med, Indonesia), eter 50 ml dan formalin 10%.
- b. Bahan untuk pembuatan stok LPS adalah LPS *P. gingivalis* (LPS-PG Ultrapure, Invivo Gen-Sandiego USA) dan *phosphate buffer saline* (PBS) sebagai bahan pelarut.
- c. Bahan untuk pembuatan preparat jaringan dan pengecatan jaringan *haematoxilin eosin* (HE) yaitu *object glass* (Citoplus), *deck glass*, EDTA, Alkohol (80%, 95%, 97% (absolut)), xylol, gliserin, air aquades, parafin, *entellan*, *haemotoxilin* dan *eosin*.

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 *Ethical Clearance*

Rancangan penelitian telah memenuhi syarat atau laik etik (*ethical clearance*) dari Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gajah Mada Yogyakarta (Lampiran A.1).

3.7.2 Pembagian Kelompok Perlakuan

Hewan coba yang sudah diaklimatisasi selama 1 minggu, dibagi menjadi 4 kelompok yaitu :

- a. Kelompok I (5 ekor) merupakan kelompok perlakuan yang diinjeksi dengan LPS *P. gingivalis* selama 6 minggu dan didekapitasi hari ke-3.
- b. Kelompok II (5 ekor) merupakan kelompok perlakuan yang diinjeksi dengan LPS *P. gingivalis* selama 6 minggu dan didekapitasi hari ke-7.
- c. Kelompok III (5 ekor) merupakan kelompok kontrol yang tidak diberi perlakuan selama 6 minggu dan didekapitasi hari ke-3.
- d. Kelompok IV (5 ekor) merupakan kelompok kontrol yang tidak diberi perlakuan selama 6 minggu dan didekapitasi hari ke-7.

3.7.3 Persiapan Bahan Perlakuan

Pembuatan stok LPS *P. gingivalis* :

- a. Pembuatan stok LPS *P. gingivalis* dengan cara mengencerkan 1 mg LPS (LPS-PG Ultrapure, Invivo Gen-Sandiego USA) dengan 2 ml PBS sampai didapatkan konsentrasi 0,5 mg/ml. Injeksi dilakukan sebanyak 3 kali seminggu selama 6 minggu untuk mendapatkan resorpsi tulang alveolar yang lebih terlihat (Ossola *et al.*, 2012).
- b. Stok LPS *P. gingivalis* dikemas dalam wadah tertutup (*eppendorf*), lalu dibungkus aluminium foil agar tidak terkena oleh paparan cahaya dan disimpan dalam suhu ruang (25⁰C).

3.8 Prosedur Perlakuan

3.8.1 Perlakuan pada Hewan Coba

Injeksi LPS *P. gingivalis* pada sulkus gingiva di daerah proksimal gigi M1 dan M2 kanan rahang bawah tikus wistar dengan volume 10 µl dan konsentrasi 0,5 mg/ml menggunakan jarum tuberkulin 30G untuk setiap injeksi. Injeksi dilakukan sebanyak 3 kali seminggu selama 6 minggu untuk mendapatkan resorpsi tulang alveolar yang lebih terlihat (Ossola *et al.*, 2012).

3.8.2 Dekapitasi pada Hewan Coba

Setelah 6 minggu perlakuan injeksi, pada hari ke-3 dan hari ke-7 setelah injeksi terakhir, hewan coba baik dari kelompok perlakuan maupun kontrol didekapitasi. Proses dekapitasi dimulai dengan pemberian eter sebanyak 50 ml pada kapas yang diletakkan di dalam kotak plastik tertutup. Selanjutnya melakukan anestesi inhalasi dengan memasukkan hewan coba ke dalam kotak tersebut hingga tidak sadar. Hewan coba yang tidak sadar tersebut kemudian didekapitasi untuk diambil bagian rahang kanan bawah.

3.8.3 Pemotongan Tulang Alveolar

Rahang kanan bawah yang sudah diambil selanjutnya dilakukan pemotongan secara transversal (bukal lingual) pada tulang alveolar yang melibatkan gigi M1 dan M2 tikus wistar. Hasil potongan tersebut dilakukan fiksasi dengan menggunakan formalin 10% selama minimal 12-18 jam untuk mencegah terjadinya autolisis, mempertahankan morfologi dan mencegah pertumbuhan jamur dan bakteri.

3.8.4 Tahap Pembuatan Preparat Jaringan

Tahap pembuatan preparat jaringan menurut Syafriadi *et al.* (2008) adalah sebagai berikut:

a. Proses pencucian jaringan fiksasi.

Setelah pengambilan sampel dan difiksasi dengan menggunakan formalin 10% selama minimal 12-18 jam, kemudian jaringan dicuci dengan air mengalir selama 1,5 jam, tujuannya agar menghilangkan sisa bahan fiksasi.

b. Proses dekalsifikasi

Dekalsifikasi bertujuan untuk melepaskan bahan anorganik dalam tulang tanpa merusak protein yang ada. Dekalsifikasi dilakukan dengan memakai larutan EDTA selama 30 hari.

c. Pemrosesan jaringan

Tahapan pemrosesan jaringan adalah sebagai berikut :

- 1) Dehidrasi merupakan penarikan air dari dalam jaringan dengan menggunakan alkohol dengan konsentrasi rendah ke tinggi. Dehidrasi dimulai dengan alkohol 80% selama 1 jam, alkohol 95% selama 2 jam, dan alkohol 97% (absolut) selama 3 jam.
- 2) *Clearing* merupakan proses penjernihan jaringan menggunakan bahan xylol, dilakukan sebanyak 2 kali secara bertahap dengan waktu sekali pemberian yaitu 1-2 jam agar menghilangkan kandungan alkohol yang diberikan sebelumnya .
- 3) Impegnasi merupakan proses infiltrasi bahan *embedding* ke dalam jaringan dengan suhu 56° - 60° C. Caranya jaringan dibungkus dengan kertas saring kemudian dimasukkan ke dalam bahan *embedding* yaitu parafin 56° - 60° C selama 2x3 jam.
- 4) Pembuatan blok parafin (*embedding*)
Embedding merupakan proses penanaman jaringan ke dalam suatu bahan *embedding* yaitu parafin. Tahapannya antara lain :
 - a) Mempersiapkan alat cetak blok parafin (*base mould*), letakkan alat diatas permukaan yang rata. Alat dan alas diolesi gliserin untuk mempermudah pemisahan alat cetak dan kaca dengan blok parafin yang sudah beku.
 - b) Menuangkan parafin cair ke dalam alat cetak blok, kemudian masukkan jaringan yang telah diimpregnasi pada posisi yang sesuai sehingga nantinya didapatkan potongan dengan penampang bukal dan lingual. Ditunggu beberapa menit sampai parafin beku.
 - c) Parafin blok siap dipotong setelah dilepas dari alat cetakan.

d. Penyayatan

Penyayatan blok parafin dengan menggunakan mikrotom. Sebelum penyayatan jaringan, alat yang perlu dipersiapkan antara lain *object glass* yang diolesi dengan *egg albumin*.

Tahapan penyayatan jaringan antara lain :

- 1) Membersihkan pisau mikrotom dengan kasa atau kertas saring yang dibasahi dengan xylol.
- 2) Mengatur ketebalan sayatan mikrotom antara 4-6 mikron atau sesuai kebutuhan.
- 3) Melakukan penyayatan dengan potongan jaringan secara bukal dan lingual.
- 4) Setelah dilakukan penyayatan, kemudian mengambil masing-masing hasil sayatan dengan kuas, lalu diletakkan di atas permukaan air *waterbath* dengan temperatur 56° - 68° C hingga sayatan mekar.
- 5) Apabila sayatan sudah mekar, kemudian mengambil sayatan tersebut dengan *object glass* yang diolesi dengan *egg albumin*, dan dikeringkan dengan suhu 30° - 35° C minimal selama 12 jam.

e. Tahapan pengecatan jaringan dengan pewarnaan *haematoxilin eosin*.

Pengecatan preparat jaringan dilakukan dengan tahapan sebagai berikut :

- 1) Deparafinisasi dengan menggunakan *xylol*, preparat dimasukkan ke dalam *xylol* selama 2-3 menit lalu diulangi dengan memasukkan kembali ke dalam wadah yang berbeda selama 2-3 menit.
- 2) Dehidrasi dengan larutan alkohol 95% dan 97% (absolut) selama 3 menit.
- 3) Preparat dibilas dengan air mengalir selama 10-15 menit, mula-mula dengan aliran lambat kemudian lebih kuat untuk menghilangkan semua kelebihan alkohol.
- 4) Preparat diwarnai dengan warna *hematoxyllin* selama 15 menit.
- 5) Bilas ulang dengan air mengalir selama 20 menit.
- 6) Preparat direndam *eosin* selama 15 detik sampai 2 menit.

- 7) Dehidrasi kembali dengan konsentrasi meningkat 95% dan 97% (absolut) masing-masing 2-3 menit sebanyak 2 kali dalam wadah yang berbeda.
- 8) Setelah itu, preparat dimasukkan ke dalam *xylol* tiga kali masing-masing 3 menit dengan wadah yang berbeda.
- 9) *Mounting* menggunakan cairan *entellan* lalu ditutup dengan *deck glass*.

3.8.5 Penghitungan Jumlah Osteoklas dan Osteoblas

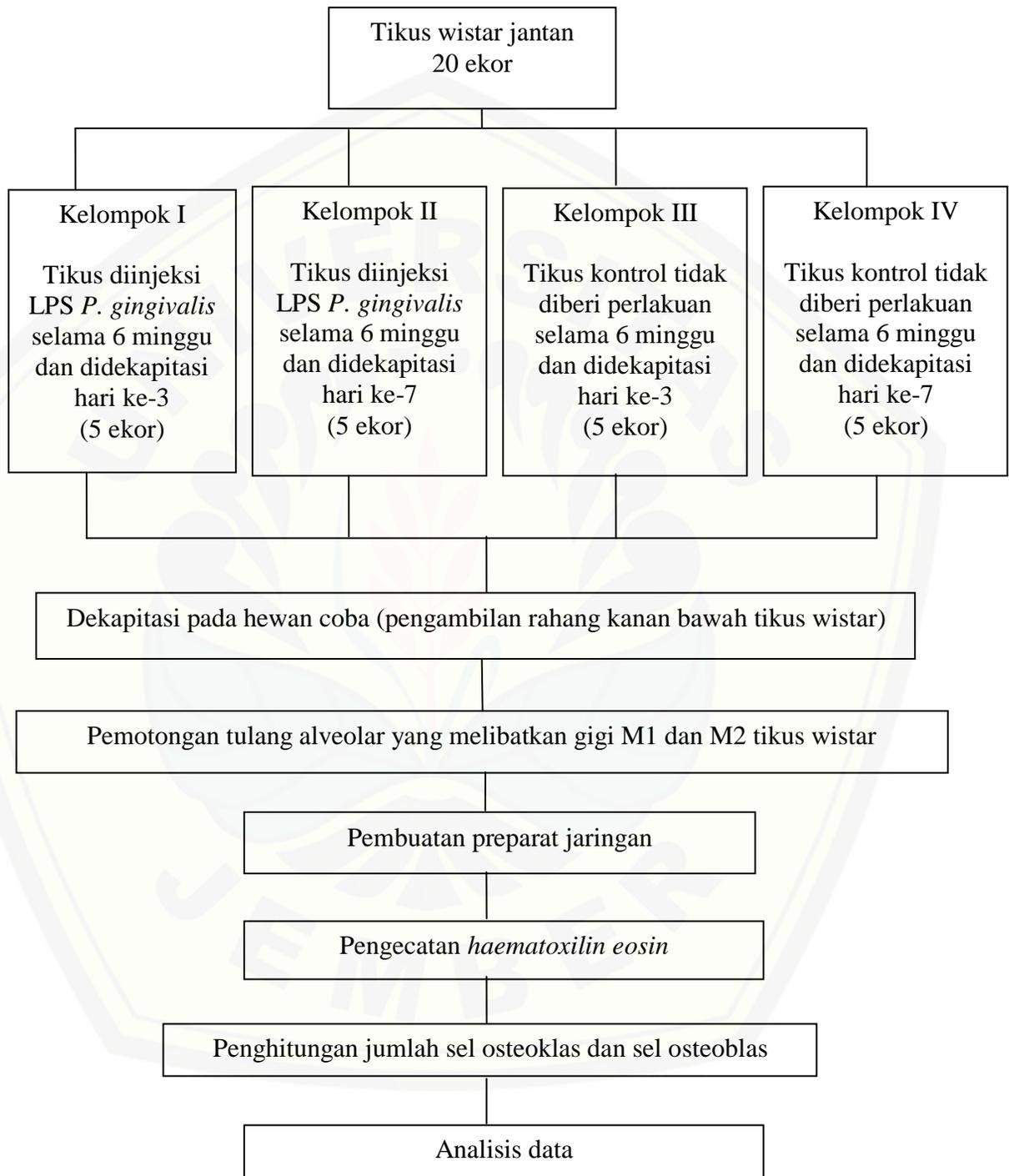
- a. Untuk menghitung jumlah sel osteoklas, preparat atau sediaan mikroskopis yang sudah dilakukan pengecatan *haematoxilin eosin* diamati menggunakan mikroskop binokuler (optilab) dengan perbesaran 400x. Penghitungan jumlah sel osteoklas pada tulang alveolar dengan cara pada tiap preparat dibaca dengan 3 lapang pandang yaitu sepertiga atas, sepertiga tengah dan sepertiga bawah dari tulang alveolar (Amvitasari, 2016). Pengamatan dilakukan oleh 3 pengamat yang sebelumnya telah dilakukan kalibrasi atau penyesuaian kemampuan dari suatu hasil ukur secara individu dengan tujuan mencapai ketertelusuran pengukuran dan agar mendapatkan hasil yang akurat (Murti, 2011). Penghitungan jumlah sel osteoklas dari ketiga pengamat pada tiap sampel dijumlahkan dan dirata-rata, sehingga didapatkan data jumlah sel osteoklas yang valid.
- b. Untuk menghitung jumlah sel osteoblas, preparat atau sediaan mikroskopis yang sudah dilakukan pengecatan *haematoxilin eosin* diamati menggunakan mikroskop binokuler (optilab) dengan perbesaran 400x. Pada tiap preparat dibaca dengan 3 lapang pandang yaitu sepertiga atas, sepertiga tengah dan sepertiga bawah dari tulang alveolar (Pusparani, 2016). Pengamatan dilakukan oleh 3 pengamat yang sebelumnya telah dilakukan kalibrasi atau penyesuaian kemampuan dari suatu hasil ukur secara individu dengan tujuan mencapai ketertelusuran pengukuran dan agar mendapatkan hasil yang akurat (Murti, 2011). Penghitungan jumlah sel osteoblas dari ketiga pengamat pada tiap sampel dijumlahkan dan dirata-rata, sehingga didapatkan data jumlah sel osteoblas yang valid.

3.9 Analisis Data

Data penghitungan jumlah sel osteoklas dan sel osteoblas dilakukan uji normalitas menggunakan uji Shapiro-Wilk dikarenakan jumlah sampel kurang dari 50. Kemudian dilanjutkan dengan uji homogenitas menggunakan uji Levene. Data yang berdistribusi normal dan homogen kemudian dianalisis menggunakan uji *oneway* ANOVA dan uji LSD (*Least Significant Difference*) untuk mengetahui letak perbedaan antara keempat kelompok sampel.



3.10 Alur Penelitian



BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat ditarik kesimpulan bahwa induksi LPS *P. gingivalis* pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) dapat meningkatkan jumlah sel osteoklas dan menurunkan jumlah sel osteoblas.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini, penulis dapat memberikan saran sebagai berikut :

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang efek induksi LPS *P. gingivalis* terhadap jumlah sel osteoklas dan sel osteoblas dengan menambahkan variasi waktu dekapitasi yang lebih lama atau setelah hari ke-7.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang efek induksi LPS *P. gingivalis* terhadap jumlah sel osteoklas dan sel osteoblas dengan menyertakan perbandingan besarnya resorpsi tulang alveolar yang terjadi.

DAFTAR PUSTAKA

- Amelia, F., Pustaka, T., dan Irsyadi, F. 2014. O'Mark: Inovasi Pemanfaatan Prostaglandin E2 dalam Saliva Sebagai Evaluasi Tingkat Keparahan Periodontitis. *Prosiding Elektronik Pekan Ilmiah Mahasiswa Nasional Program Kreativitas*. 25-29 Agustus 2014
- Amvitasari, R. 2016. Efek Pemberian Kafein terhadap Jumlah Sel Osteoklas pada Tulang Alveolar Gigi Marmut (*Cavia cobaya*) yang Diinduksi Gaya Mekanis Ortodonti. *Skripsi*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
- Ayu, K. 2015. Penurunan Jumlah Osteoblas pada Resorpsi Tulang Alveolar Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*) Galur Sprague Dawley yang Diinduksi LPS. *Interdental Jurnal Kedokteran Gigi*. 11(1): 5-10
- Bajpai, R. 1990. *Human Osteology*. First Edition. Philadelphia: Elsevier. Terjemahan oleh Ridwan Harianto. 1991. *Osteologi Tubuh Manusia*. Edisi 1. Jakarta: Binarupa Aksara. 59-61
- Carvalho-Filho, P., Gomes-Filho, I., Meyer, R., Olezak, T., Xavier, M., dan Trindade, S. 2016. Role of *Porphyromonas gingivalis* HmuY in Immunopathogenesis of Chronic Periodontitis. *Journal Mediators of Inflammation*. <http://www.hindawi.com/journals/mi/2016/7465852> [Diakses pada 25 Mei 2016]
- Chatarjee, K. 2006. *Essentials of Oral Histology*. First Edition. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publication. 114-115
- Cekici, A., Kantarci, A., dan Hasturk, H. 2014. Article: Inflammatory and Immune Pathway in Pathogenesis of Periodontal Disease. *Journal Periodontology* 2000. 64(1): 57-80

- Daniel, W. 1991. *Biostatistic: A Foundation for Analysis in the Health Sciences*. First Edition. Georgia: Wiley.
- Djuwita, I., Pratiwi, I., Winarto, A., dan Sabri, M. 2012. Proliferasi dan Diferensiasi Sel Tulang Tikus dalam Medium Kultur *In-Vitro* yang Mengandung Ekstrak Batang *Cissus quadrangular* Salisb. (Sipatah-patah). *Jurnal Kedokteran Hewan*. 6(2): 75-80
- Dumitrescu, A., El-Aleem, S., dan Morales-Aza, B. 2004. A Model of Periodontitis in the Rat Effect of Lipopolysaccharide on Bone Resorption, Osteoclast Activity, and Local Peptidergic Innervation. *Journal of Clinical Periodontology*. 31(8): 596-603
- Ganong, W. 2002. *Review of Medical Physiology*. Twentieth Edition. New York: Mc Graw-Hill. Terjemahan oleh Tjauhari Widjajakusumah. 2003. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Edisi 20. Jakarta: EGC. 386-387
- Geneser, F. 1994. *Textbook of Histology*. First Edition. Philadelphia: Elsevier. Terjemahan oleh Arifin Gunawijaya. 1995. *Buku Teks Histologi*. Edisi 1. Jakarta: Binarupa Aksara. 135-136
- Grenier, D. dan Tanabe. 2010. *Porphyromonas gingivalis* Gingipains Trigger a Proinflammatory Response in Human Monocyte-derived Macrophages Through the p38 α Mitogen-activated Protein Kinase Signal Transduction Pathway. *Toxins 2010*. 2(3): 341-352
- Grossman, L., Oliet, S., dan Rio, C. 1998. *Endodontic Practice*. Eleventh Edition. Philadelphia: Lea and Feager. Terjemahan oleh Rafiah Abiyono. 1995. *Ilmu Endodontik Dalam Praktek*. Edisi 11. Jakarta: EGC. 62-63

- Hasan, A. dan Palmer, R. 2014. A Clinical Guide to Periodontology: Pathology of Periodontal Disease. *British Dental Journal*. 216(8): 457-461
- Hienz, S., Paliwal, S., dan Ivanovski, S. 2015. Review Article: Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. *Journal of Immunology Research*. <http://www.hindawi.com/journals/jir/2015/615486/> [Diakses pada 13 Desember 2014]
- How, K., Song, P., dan Chan, G. 2016. *Porphyromonas gingivalis*: An Overview of Periodontopathic Pathogen Below the Gum Line. *Journal Frontiers in Microbiology*. 7(53): 1-14
- Imamura, T. 2003. The Role of Gingipain in the Pathogenesis of Periodontal Disease. *Journal of Periodontology*. 74(1): 111-118
- Indahyani, D. 2013. Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella longicep*) Menurunkan Apoptosis Osteoblas pada Tulang Alveolaris Tikus Wistar. *Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi)*. 46(4): 185-189
- Kemenkes RI. 2013. *Riset Kesehatan Dasar; RISKESDAS 2013*. Jakarta: Balitbang Kemenkes RI. 112-113
- Kemenkes RI. 2012. *Rencana Program Pelayanan Kesehatan Gigi dan Mulut*. Jakarta: Kemenkes RI. 5-6
- Klaus, H., Wolf, H., Edith, M., dan Hassel, T. 2004. *Color Atlas of Dental Medicine Periodontology*. Third Edition. New York: Theme Medical Publisher.
- Kusumastuti, E., Handajani, J., dan Susilowati, H. 2014. Ekspresi COX-2 dan Jumlah Neutrofil Fase Inflamasi pada Proses Penyembuhan Luka Setelah Pemberian Sistemik Ekstrak Etanolik Rosela (*Hibiscus sabdariffa*) (Studi *In Vivo* pada Tikus Wistar). *Majalah Kedokteran Gigi*. 21(1): 13-19

- Kusumawardani, B. 2006. Hubungan Viabilitas Sel, Ekspresi Protein P53 dan Ki-67 pada Kultur Fibroblas Gingiva Manusia yang Dipajan Lipopolisakarida Bakteri Gram-Negatif. *Jurnal ILMU DASAR*. 7(2): 126-132
- Kohlie, S. dan Kohlie V. 2011. Role of RANKL-RANK/Osteoprotegerin Molecular Complex in Bone Remodelling Immunopathologic Implications. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 15(3): 175-181
- Leslie, C., Albert, B., dan Max, S. 1998. *Topley Wilson's Microbiology and microbial infection: Systematic bacteriology*. First Edition. New York: Oxford University Press Inc. 1317-1318
- Maryana, T. 2004. Pengaruh Pemberian Gel Lidah Buaya (*Aloe vera*) Peroral terhadap Jumlah Sel Osteoblas pada Tikus Galur Wistar Jantan Pasca Pencabutan Gigi. *Skripsi*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
- Mescher, A. 2011. *Junquiera's Basic Histology*. Twelfth Edition. Terjemahan oleh Frans Deny. 2010. *Histologi Dasar Junquiera: Teks & Atlas*. Edisi 12. Jakarta : EGC. 118-120
- Murray, D. dan Wilton, J. 2003. Lipopolysaccharide from the Periodontal Pathogen *Porphyromonas gingivalis* Prevents Apoptosis of HL60-Derived Neutrophils In Vitro. *Journal of Infection and Immunity*. 71(12): 7232-7235
- Murti, B. 2011. *Validitas dan Reabilitas Pengukuran*. Matrikulasi Program Studi Doktorat. Surakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret
- Mysak, J., Podzimek, S., Sommerova, P., dan Lyuya-Mi, Y. 2014. Review Article: *Porphyromonas gingivalis*: Major Periodontopathic Pathogen Overview. *Journal of Immunology Research*. <http://www.hindawi.com/journals/jir/2014/476068/> [Diakses pada 25 Maret 2014]

- Nakagawa, T., Saito, A., Hosaka, Y., dan Ishihara, K. 2003. Gingipains as Candidate Antigens for *Porphyromonas gingivalis* Vaccine. *The Keio Journal of Medicine*. 52(3): 158-162
- Nakamura, H. 2007. Morphology, Function and Differentiation of Bone Cells. *Journal of Hard Tissue Biology*. 16(1): 15-22
- Newman, M., Takei, H., Klokkevold, P., dan Carranza, F. 2012. *Carranza's Clinical Periodontology*. Eleventh Edition. St Louis: Elsevier
- Newman, M., Takei, H., Klokkevold, P., dan Carranza, F. 2015. *Carranza's Clinical Periodontology*. Twelfth Edition. St Louis: Elsevier
- Notoadmodjo, S. 2005. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta: Rineka Pustaka
- Ocarino, N. dan Serakides, R. 2006. Effect of the Physical Activity on Normal Bone and on the Osteoporosis Prevention and Treatment. *The Revista Brasileira Medicina do Esporte (Brazilian Journal of Sporting Medicine)*. 21(3): 149-152
- Olsen, I., Shah, H., dan Gharbia, S. 1999. Taxonomy and Biochemical Characteristics of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Periodontology* 2000. 20(1): 14-52
- Omega, K. 2011. Pengaruh Pemberian Ekstrak Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa*) terhadap Jumlah Sel Osteoklas dan Osteoblas pada Periodontal Eksperimental (Teknik Ligasi) Tikus Wistar Jantan. *Skripsi*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
- Ossola, A., Surkin, P., dan Pugnaloni, A. 2012. Long Term Treatment with Methanandamide Attenuates LPS-Induced Periodontitis in Rats. *Journal of Inflammation Research*. 61(9): 941-948

- Oz, H. dan Puleo, D. 2011. Review Article: Animal Models for Periodontal Disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2011/754857/> [Diakses pada 12 Januari 2011]
- Pusparani, T. 2016. Efek Kafein terhadap Jumlah Sel Osteoblas pada Tulang Alveolar Daerah Tarikan Gigi Marmut (*Cavia cobaya*) yang Diinduksi Gaya Mekanis Ortodonti. *Skripsi*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
- Ridconi, A., Satoto, H., dan Budiono, U. 2011. Midazolam Intravena Dosis Rendah Tidak Mempengaruhi Nitric Oxide Intraperitoneal Mencit Balb/C yang Terpapar Lipopolisakarida. *Jurnal Anestesiologi Indonesia*. 3(2): 84-94
- Serrato, R. 2014. Lipopolysaccharides in Diazotrophic Bacteria. *Journal Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 4(119): 1-6
- Seymour, R., Macgregor, D., dan Heasman, P. 1992. *Drugs, Diseases and the Periodontium*. First Edition. New York: Oxford University Press. 11-13
- Singh, S., Harding, A., dan Poole, S. 2015. Review Article: *Porphyromonas gingivalis* Periodontal Infection and Its Putative Links with Alzheimer's Disease. *Journal Mediators of Inflammation*. <http://www.hindawi.com/journals/mi/2015/137357/> [Diakses pada 1 April 2015]
- Syafridi, M., Subiyantoro, S., Setyorini, D., dan Joelijanto, R. 2008. *Patologi Anatomi Degenerasi dan Radang*. Tidak diterbitkan. Petunjuk Praktikum. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
- Vijay, G. dan Raghavan, V. 2013. Radiology in Periodontics. *Journal of Indian Academy Oral Medicine and Radiology*. 25(1): 24-29

Whaites, E. dan Drage N. 2013. *Essential of Dental Radiography and Radiology*. Fifth Edition. Churchill Livingstone: Elsevier. 282-283

Yustina, A. 2012. Peningkatan Jumlah Sel Osteoklas pada Keradangan Periapikal Akibat Induksi Lipopolisakarida *Porphyromonas gingivalis* (Suatu Penelitian Laboratories Menggunakan Tikus). *Jurnal Bioscience Pascasarjana*. 14(3): 140-144

Zekonis, G., Barzdiukaite, I., dan Zekonis, J. 2014. Local and Systemic Immune Responses in Gingivitis and Periodontitis. *Central European Journal of Medicine*. 9(5): 694-703

LAMPIRAN A. Surat Ijin Penelitian**A.1 Surat *Ethical Clearance***

 <p>UNIT ETIKA DAN ADVOKASI FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS GADJAH MADA Sekretariat: Fakultas Kedokteran Gigi UGM Jl. Denta Sekip Utara Yogyakarta Telp. 081239447900</p>
<p>KETERANGAN KELAIKAN ETIK PENELITIAN (“<i>ETHICAL CLEARANCE</i>”)</p> <p>No.00748/KKEP/FGK-UGM/EC/2016</p> <p>Setelah Tim Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada mempelajari dengan seksama rancangan penelitian yang diusulkan:</p> <p>Judul : EKSPRESI IL-1 DAN TNF-α SERTA AKTIVITAS OSTEOKLAS DAN OSTEOLAS PADA MODEL PERIODONTITIS PASCA INDUKSI LPS P. <i>Gingivalis</i> DAN CRUDE PROTEIN A. <i>Actinomycetemcomitans</i></p> <p>Peneliti Utama : drg. Desi Sandra Sari, M.DSc</p> <p>Anggota Penelitian : 1. Desy Fitri Intan 2. Rada Kusnadi</p> <p>Penanggung Jawab Medis : drg. Desi Sandra Sari, M.DSc</p> <p>Unit/Lembaga : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember</p> <p>Lokasi Penelitian : 1. Laboratorium Biomedik FKG Universitas Jember 2. Laboratorium Bioscience RSGM Universitas Jember</p> <p>Waktu Penelitian : Agustus – November 2016</p> <p>Maka dengan ini menyatakan bahwa penelitian tersebut telah memenuhi syarat atau laik etik.</p> <p style="text-align: right;">Yogyakarta, 18 Agustus 2016</p> <p>Wakil Dekan Bidang Akademik dan Kemahasiswaan Ketua Komisi Etik Penelitian FKG UGM</p> <p style="text-align: center;">   </p> <p style="text-align: center;"> drg. Diatri Nari Ratih, M.Kes., Sp. KG, Ph.D. drg. Suryono, S.H, Ph.D </p>

A.2 Surat ijin penelitian Laboratorium Farmakologi Bagian Biomedik



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

Nomor : *309* /UN25.8.11./2016
Perihal : Ijin Penelitian

Kepada Yth.
Kabag. BIOMEDIK FKG Universitas Jember
di
Jember

Dalam rangka pengumpulan data penelitian maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan ijin penelitian bagi dosen di bawah ini :

1. Nama : drg. Desi Sandra Sari, MDSc
2. NIP : 197512152003122005
3. Tahun Akademik : 2015/2016
4. Fakultas : Kedokteran Gigi Universitas Jember
5. Alamat : Perum. Sumbarsari Permai II/BD-1 Jember
6. Judul Penelitian : Ekpresi IL-1, TNF-alfa Dan Aktivitas Osteoklas, Osteoblas Pada Model Periodontitis Pasca Induksi LPS-p, Gingivalis
7. Lokasi Penelitian : Lab. Farmakologi FKG Universitas Jember
8. Data/alat yang dipinjam : Kandang, dll
9. Waktu : April 2016 s/d Selesai
10. Tujuan Penelitian : Untuk Melihat Ekpresi IL-1, TNF-alfa Dan Aktivitas Osteoklas, Osteoblas Pada Model Periodontitis

Demikian atas perkenan dan kerjasama yang baik disampaikan terima kasih.

11 APRIL 2016

Jember,
an. Dekan
Pembantu Dekan I

[Signature]
Dr. drg. IDA Susilawati, M.Kes
NIP. 196109031986022001

A.3 Surat ijin penelitian Laboratorium *Bioscience* Rumah Sakit Gigi dan Mulut (RSGM) Universitas Jember



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

Nomor : 1205/UN25.8.TL/2016
Perihal : Ijin Penelitian

Kepada Yth.
Direktur RSGM Universitas Jember
di
Jember

Dalam rangka pengumpulan data penelitian maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan ijin penelitian bagi dosen di bawah ini :

- | | |
|----------------------------|--|
| 1. Nama | : drg. Desi Sandra Sari, MDSc |
| 2. NIP | : 197512152003122005 |
| 3. Tahun Akademik | : 2015/2016 |
| 4. Fakultas | : Kedokteran Gigi Universitas Jember |
| 5. Alamat | : Perum. Sumbersari Permai II/BD-I Jember |
| 6. Judul Penelitian | : Ekpresi IL-1, TNF-alfa Dan Aktivitas Osteoklas, Osteoblas Pada Model Periodontitis Pasca Induksi LPS-p, Gingivalis |
| 7. Lokasi Penelitian | : Lab. Bioscience RSGM Universitas Jember |
| 8. Data/alat yang dipinjam | : Eppendorf, tip yellow, sterilisasi, dll |
| 9. Waktu | : April 2016 s/d Selesai |
| 10. Tujuan Penelitian | : Untuk Melihat Ekpresi IL-1, TNF-alfa Dan Aktivitas Osteoklas, Osteoblas Pada Model Periodontitis |

Demikian atas perkenan dan kerjasama yang baik disampaikan terima kasih.

Jember, 11 April 2016



Dekan I
Bantu Dekan I
Dr. drg. ADA Susilawati, M.Kes
NIP. 196109031986022001

A.4 Surat ijin penelitian Laboratorium Histologi Bagian Biomedik



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

Nomor : 1543/UN25.8/TL/2017
Perihal : Ijin Penelitian

04 APR 2017

Kepada Yth
Kabag Laboratorium Biomedik
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 kami dibawah ini :

- | | | |
|----|-------------------------|--|
| 1 | Nama | : Desy Fitri Intan G |
| 2 | NIM | : 131610101070 |
| 3 | Semester/Tahun | : 2016/2017 |
| 4 | Fakultas | : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember |
| 5 | Alamat | : Jl. Mastrip No. 45 Jember |
| 6 | Judul Penelitian | : Efek Pemaparan Lipopolisakarida Porphyromonas Gingivalis Terhadap Jumlah Sel Osteoklas Dan Osteoblas Tulang Alveolar Tikus Wistar (Rattus Norvegicus) |
| 7 | Lokasi Penelitian | : Lab Histologi FKG Universitas Jember |
| 8 | Data/alat yang dipinjam | : Mikrotom, mikroskop, dll |
| 9 | Waktu | : April 2017 s/d Selesai |
| 10 | Tujuan Penelitian | : Untuk Mengetahui Efek Pemaparan Lipopolisakarida Porphyromonas Gingivalis Terhadap Jumlah Sel Osteoklas Dan Osteoblas Tulang Alveolar Tikus Wistar (Rattus Norvegicus) |
| | Dosen Pembimbing | : 1. drg. Tantini Ermawati, M.Kes
2. drg. Depi Praharani, M.Kes |

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih

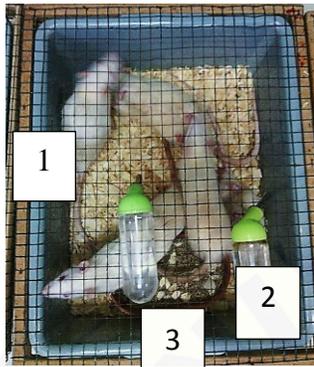


an. Dekan
bantu Dekan I,

Dr. drg. IDA Susilawati, M.Kes
196109031986022001

LAMPIRAN B. Alat dan Bahan Penelitian

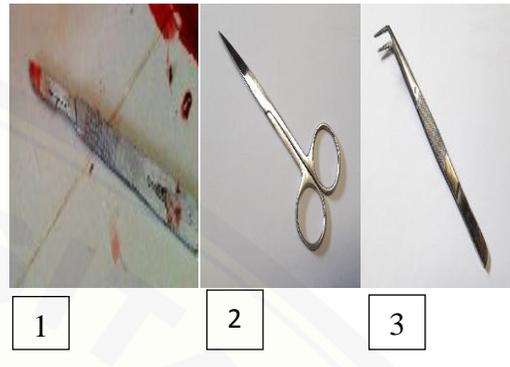
B.1 Alat penelitian



(1) Kandang, (2) tempat minum, (3) tempat makan



Rat dental chair



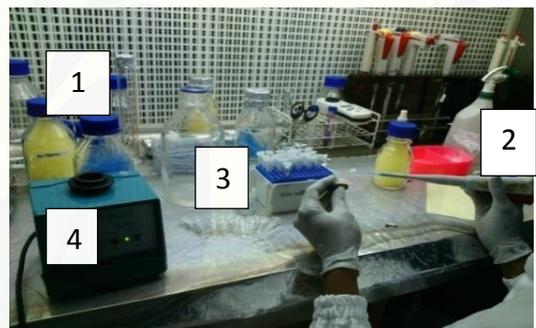
(1) *Blade* dan *scalpel*, (2) gunting, (3) pinset



Pot obat



Medical refrigerator



(1) *Blue tip* dan *yellow tip*, (2) mikropipet, (3) *eppendorf*, (4) vibrator



Alat cetak parafin



Mikrotom

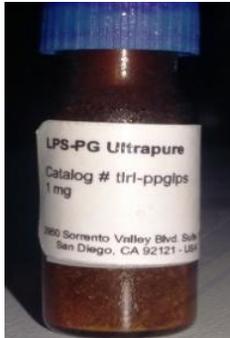


Waterbath



Mikroskop binokuler

B.2 Bahan penelitian



LPS *P. gingivalis*



Tikus



PBS (*Phosphate Buffer Salin*)



Jarum tuberkulin 30G



(1) Parafin, (2) *entellan*, (3) alkohol absolut, (4) alkohol 80%, (5) EDTA, (6) xylol, (7) *haematoxylin*, (8) *eosin*, (9) *object glass*, (10) *deck glass*



(1) Sarung tangan dan (2) masker



LAMPIRAN C. Prosedur Penelitian

C.1 Aklimatisasi hewan coba selama 1 minggu



C.2 Persiapan bahan injeksi (stok LPS *P. gingivalis*)



C.3 Perlakuan injeksi selama 6 minggu



Pengambilan bahan injeksi dengan jarum tuberkulin



Hewan coba ditempatkan pada *rat dental chair*



Perlakuan injeksi hewan coba

C.4 Dekapitasi hewan coba dan pengambilan rahang

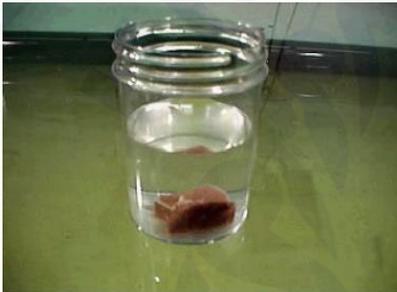


Dekapitasi hewan coba



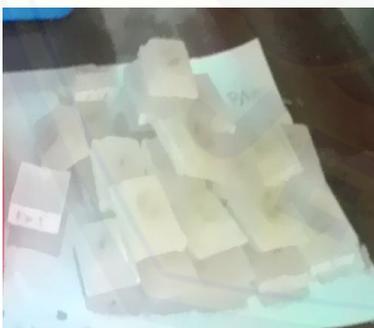
Rahang kanan bawah tikus

C.5 Fiksasi jaringan

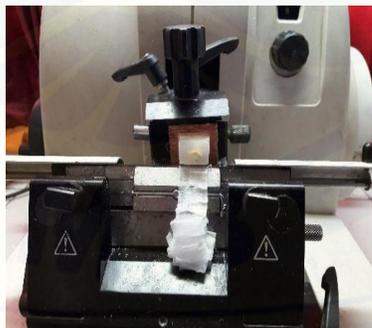


Fiksasi jaringan menggunakan formalin 10%

C.6 Pembuatan blok parafin dan penyayatan dengan mikrotom



Blok parafin yang sudah jadi



Penyayatan menggunakan mikrotom

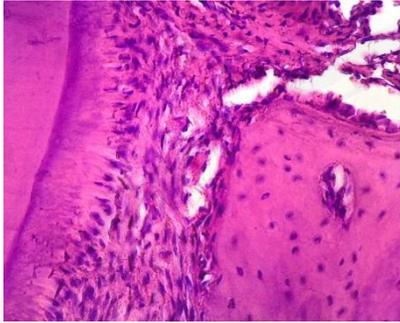


Sayatan yang sudah jadi

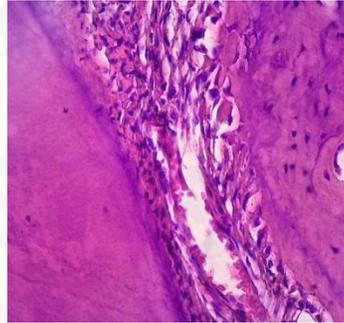
LAMPIRAN D. Hasil Penelitian

D.1 Kelompok I

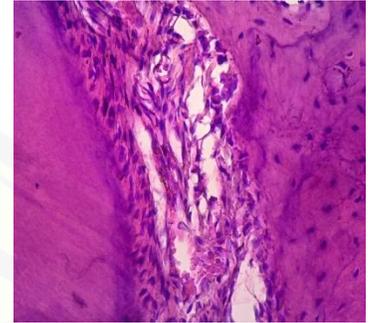
a. Hewan coba Pg1



Lapang pandang 1

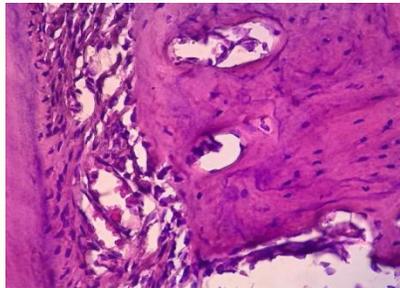


Lapang pandang 2

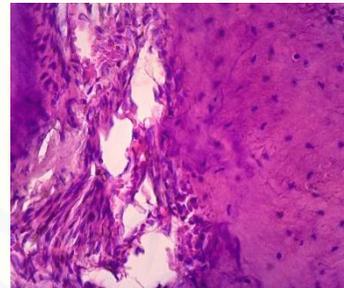


Lapang pandang 3

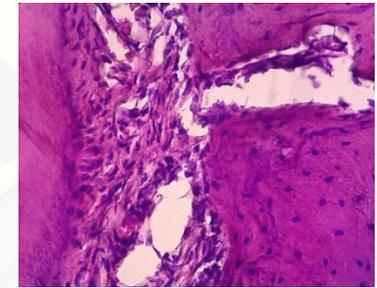
b. Hewan coba Pg2



Lapang pandang 1

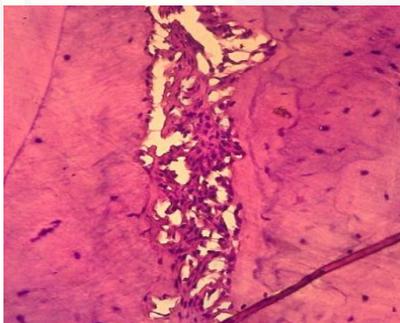


Lapang pandang 2

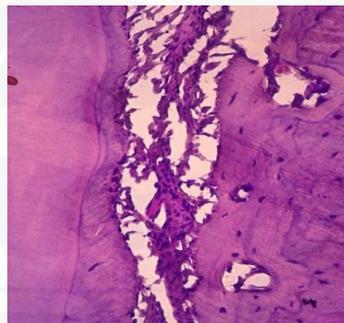


Lapang pandang 3

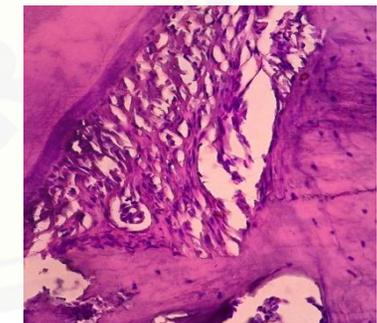
c. Hewan coba Pg3



Lapang pandang 1

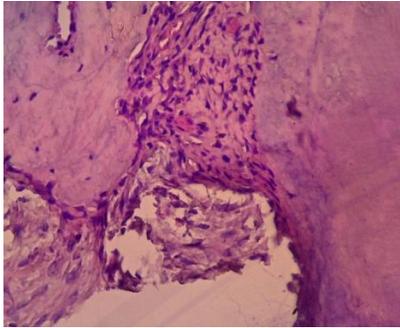


Lapang pandang 2

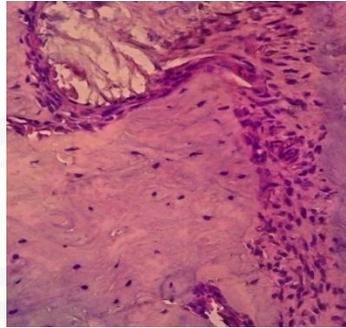


Lapang pandang 3

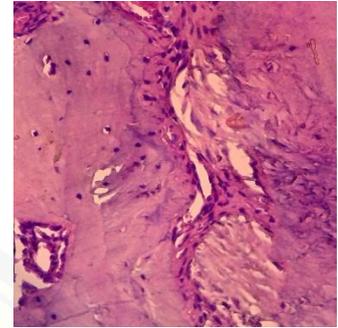
d. Hewan coba Pg4



Lapang pandang 1

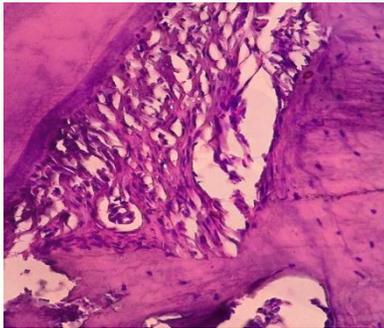


Lapang pandang 2

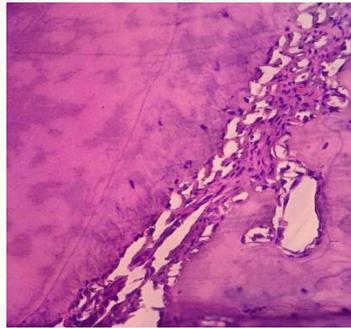


Lapang pandang 3

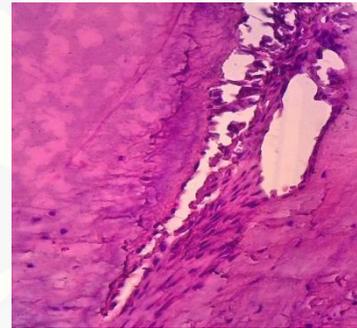
e. Hewan coba Pg5



Lapang pandang 1



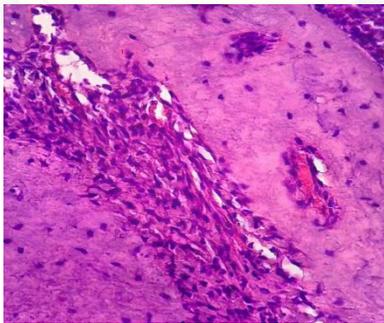
Lapang pandang 2



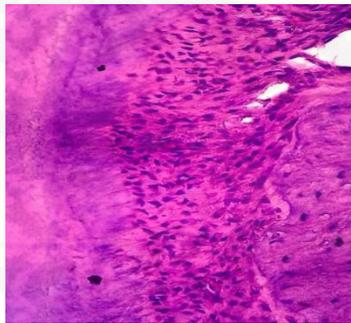
Lapang pandang 3

D.2 Kelompok II

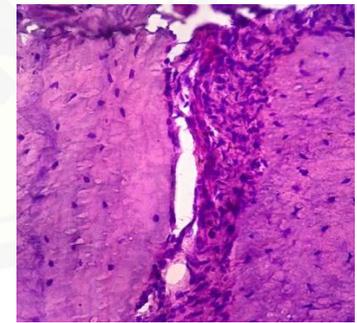
a. Hewan coba Pg1



Lapang pandang 1

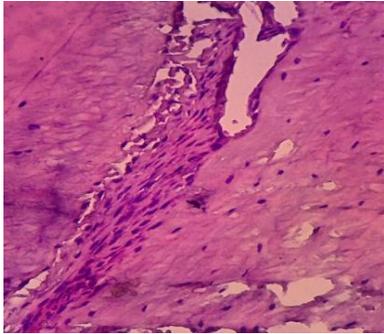


Lapang pandang 2

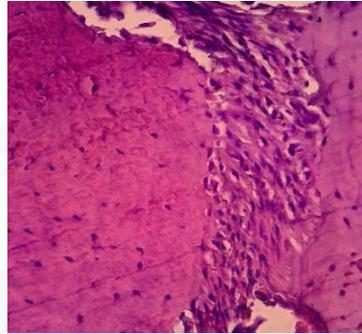


Lapang pandang 3

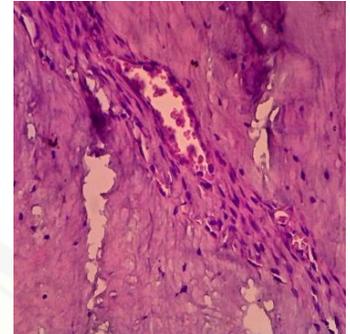
b. Hewan coba Pg2



Lapang pandang 1

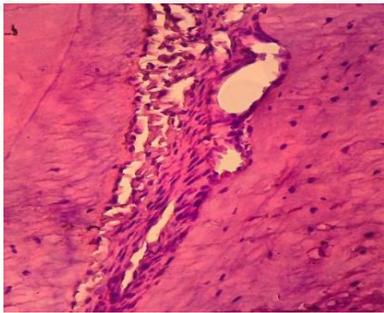


Lapang pandang 2

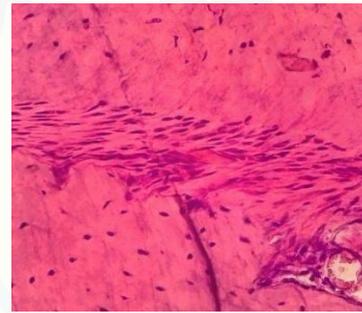


Lapang pandang 3

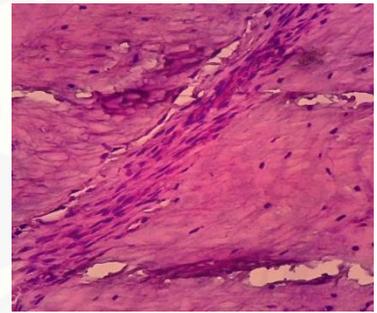
c. Hewan coba Pg3



Lapang pandang 1

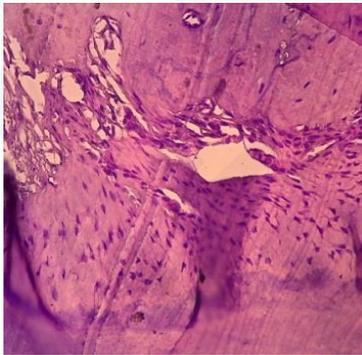


Lapang pandang 2

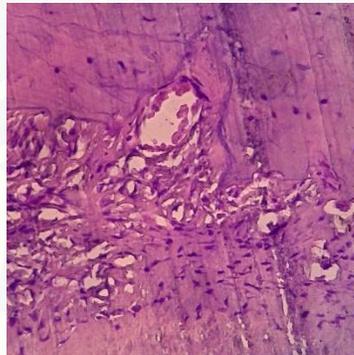


Lapang pandang 3

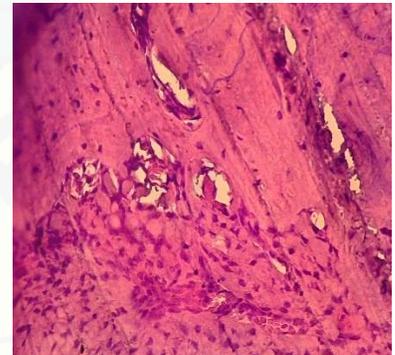
d. Hewan coba Pg4



Lapang pandang 1

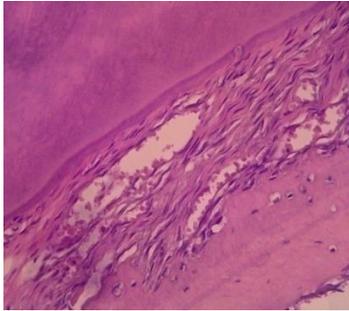


Lapang pandang 2

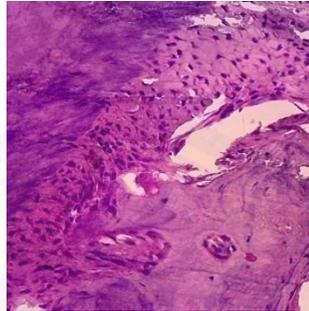


Lapang pandang 3

e. Hewan coba Pg5



Lapang pandang 1



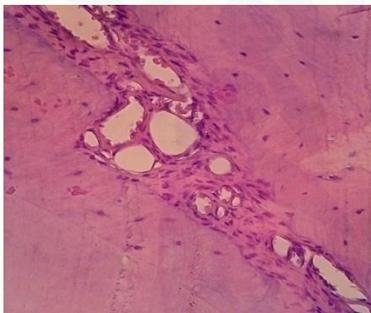
Lapang pandang 2



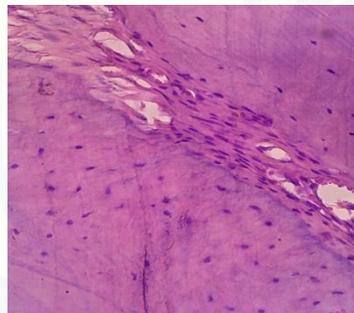
Lapang pandang 3

D.3 Kelompok III

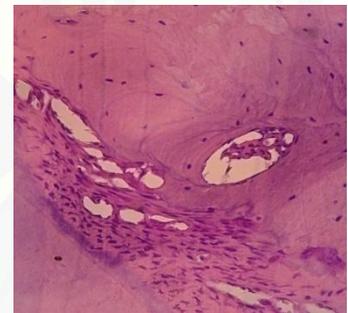
a. Hewan coba K1



Lapang pandang 1

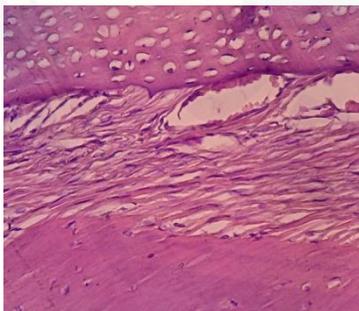


Lapang pandang 2

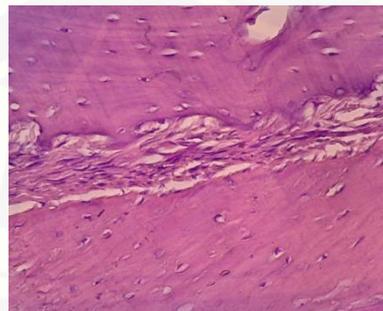


Lapang pandang 3

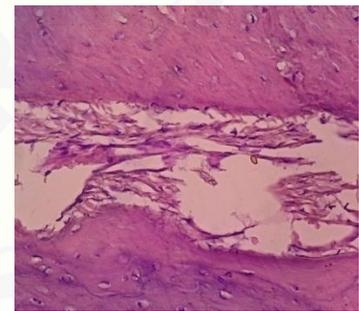
b. Hewan coba K2



Lapang pandang 1

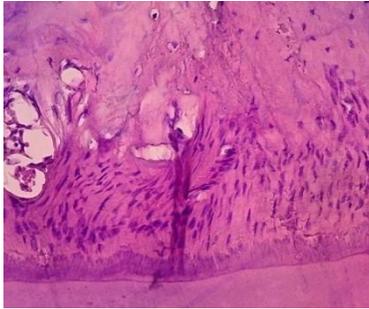


Lapang pandang 2

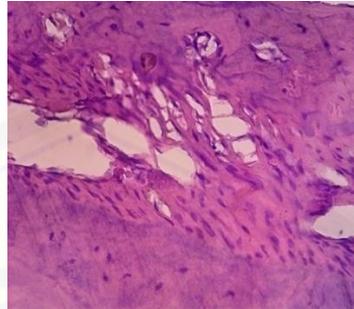


Lapang pandang 3

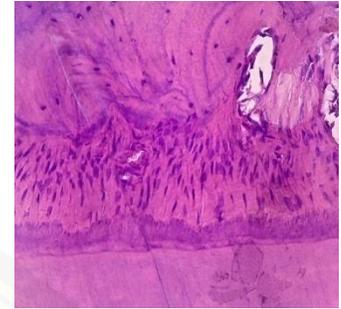
c. Hewan coba K3



Lapang pandang 1

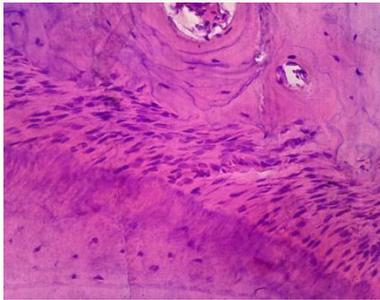


Lapang pandang 2

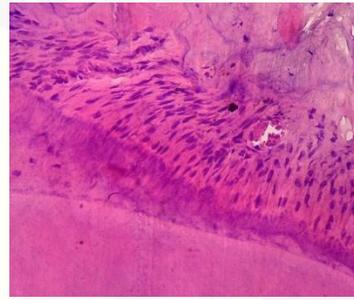


Lapang pandang 3

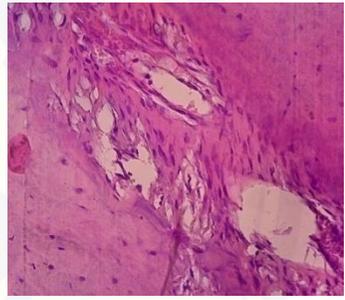
d. Hewan coba K4



Lapang pandang 1

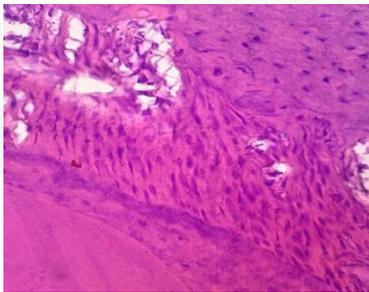


Lapang pandang 2

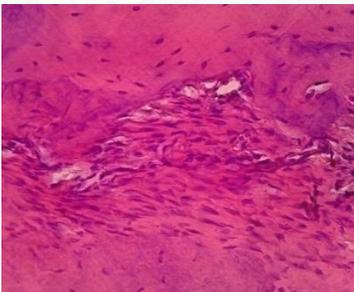


Lapang pandang 3

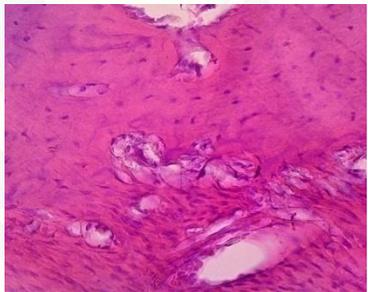
e. Hewan coba K5



Lapang pandang 1



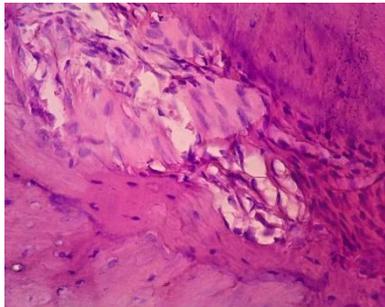
Lapang pandang 2



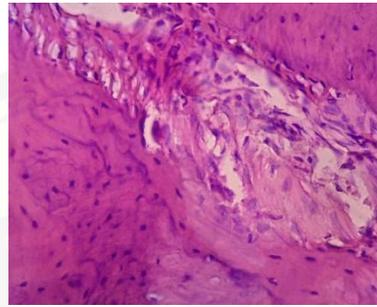
Lapang pandang 3

D.4 Kelompok IV

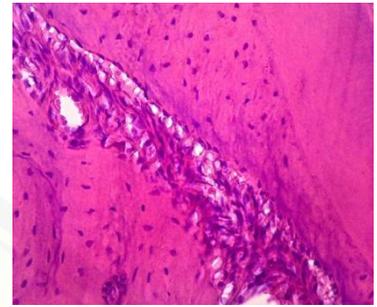
a. Hewan coba K1



Lapang pandang 1

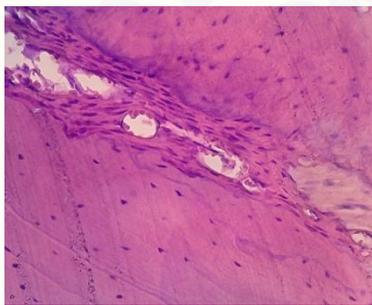


Lapang pandang 2

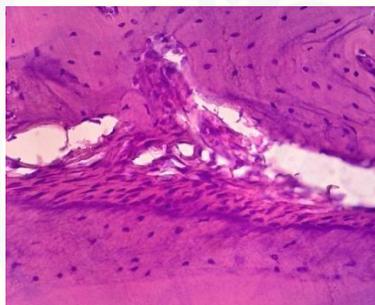


Lapang pandang 3

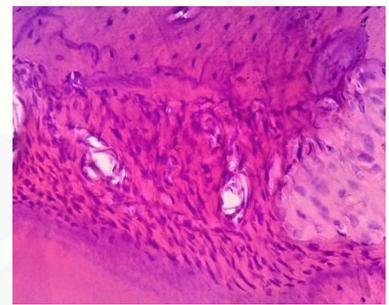
b. Hewan coba K2



Lapang pandang 1

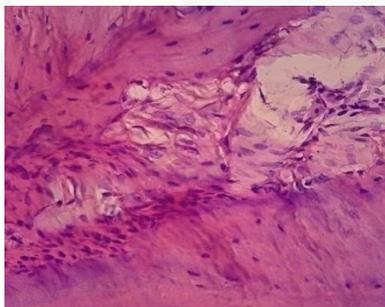


Lapang pandang 2

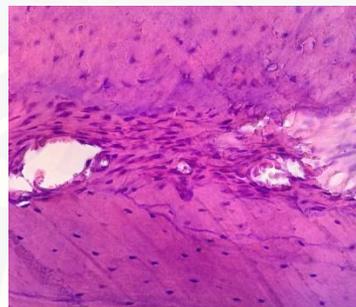


Lapang pandang 3

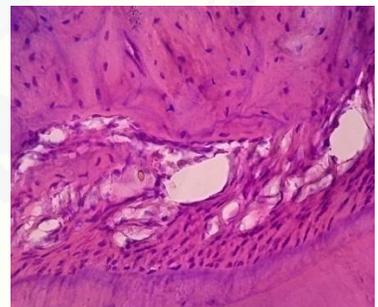
c. Hewan coba K3



Lapang pandang 1

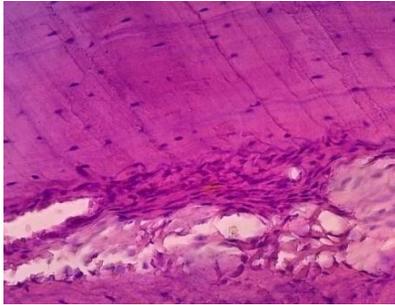


Lapang pandang 2

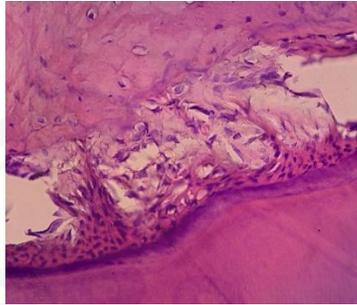


Lapang pandang 3

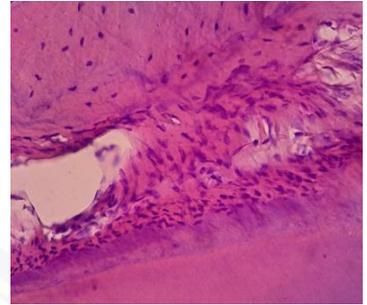
d. Hewan coba K4



Lapang pandang 1

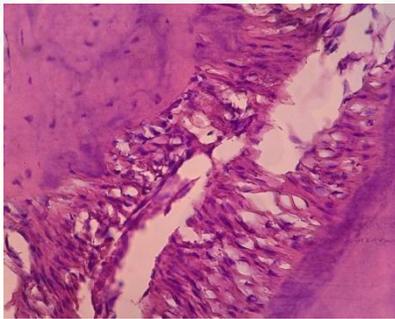


Lapang pandang 2

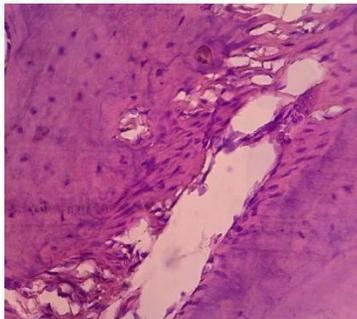


Lapang pandang 3

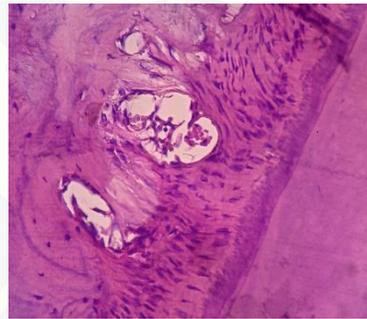
e. Hewan coba K5



Lapang pandang 1



Lapang pandang 2



Lapang pandang 3

LAMPIRAN E. Data Penghitungan Jumlah Sel Osteoklas dan Sel Osteoblas**E.1 Rata-rata jumlah sel osteoklas dan sel osteoblas**

Kelompok	Nama hewan coba	Osteoklas			Jumlah	Rata-rata	Osteoblas			Jumlah	Rata-rata
		Observer 1	Observer 2	Observer 3			Observer 1	Observer 2	Observer 3		
I	Pg 1	23	21	24	68	22.67	55	13	45	113	37.67
	Pg 2	25	11	19	55	18.33	23	19	81	123	41.00
	Pg 3	10	7	8	25	8.33	31	20	101	152	50.67
	Pg 4	19	11	18	48	16.00	89	18	104	211	70.33
	Pg 5	12	10	8	30	10.00	92	17	141	250	83.33
II	Pg 1	26	12	17	55	18.33	56	20	76	152	50.67
	Pg 2	21	11	18	50	16.67	99	36	129	264	88.00
	Pg 3	14	19	18	51	17.00	71	36	92	199	66.33
	Pg 4	21	15	22	58	19.33	103	18	116	237	79.00
	Pg 5	15	10	15	40	13.33	64	12	90	166	55.33
III	K1	11	0	2	13	4.33	44	25	83	152	50.67
	K2	4	1	1	6	2.00	79	10	59	148	49.33
	K3	9	6	6	21	7.00	65	48	123	236	78.67
	K4	6	0	5	11	3.67	69	40	124	233	77.67
	K5	8	2	2	12	4.00	53	15	106	174	58.00
IV	K1	14	6	14	34	11.33	121	41	161	323	107.67
	K2	10	4	9	23	7.67	86	45	190	321	107.00
	K3	6	3	1	10	3.33	38	20	109	167	55.67
	K4	2	1	5	8	2.67	98	70	197	365	121.67
	K5	7	3	12	22	7.33	39	19	139	197	65.67

Keterangan :

Kelompok I : kelompok yang diberi perlakuan injeksi dan didekapitasi hari ke-3

Kelompok II : kelompok yang diberi perlakuan injeksi dan didekapitasi hari ke-7

Kelompok III : kelompok yang tidak diberi perlakuan injeksi (kontrol) dan didekapitasi hari ke-3

Kelompok IV : kelompok yang tidak diberi perlakuan injeksi (kontrol) dan didekapitasi hari ke-7

E.2 Hasil uji statistik

1. Uji normalitas sel osteoklas dan sel osteoblas

Tests of Normality

	kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
osteoklas	Kelompok I	.204	5	.200*	.949	5	.729
	Kelompok II	.254	5	.200*	.928	5	.583
	Kelompok III	.271	5	.200*	.932	5	.608
	Kelompok IV	.212	5	.200*	.924	5	.555
osteoblas	Kelompok I	.307	5	.138	.844	5	.177
	Kelompok II	.230	5	.200*	.890	5	.359
	Kelompok III	.249	5	.200*	.821	5	.119
	Kelompok IV	.239	5	.200*	.917	5	.509

Kelompok	p		Keterangan
	Osteoklas	Osteoblas	
Kelompok I	0,729*	0,177*	Normal
Kelompok II	0,583*	0,359*	Normal
Kelompok III	0,608*	0,119*	Normal
Kelompok IV	0,555*	0,509*	Normal

p : Nilai signifikansi

* : Hasil yang signifikan ($p > 0,05$)

2. Uji homogenitas sel osteoklas dan sel osteoblas

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
osteoblas	2.348	3	16	.111
osteoklas	3.681	3	16	.034

Jumlah sel	p	Keterangan
Osteoklas	0,034	Tidak homogen
Osteoblas	0,111*	Homogen

p : Nilai signifikansi

* : Hasil yang signifikan ($p > 0,05$)

3. Uji oneway ANOVA dan LSD (*Least Significant Different*) pada sel osteoblas

ANOVA

osteoblas

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3679.536	3	1226.512	3.268	.049
Within Groups	6005.042	16	375.315		
Total	9684.578	19			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: osteoblas

LSD

(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
	Kelompok II	-13.18200	12.25259	.298	-39.1563	12.7923
Kelompok I	Kelompok III	-9.78400	12.25259	.436	-35.7583	16.1903
	Kelompok IV	-36.91800*	12.25259	.008	-62.8923	-10.9437
Kelompok II	Kelompok I	13.18200	12.25259	.298	-12.7923	39.1563
	Kelompok III	3.39800	12.25259	.785	-22.5763	29.3723
Kelompok III	Kelompok IV	-23.73600	12.25259	.071	-49.7103	2.2383
	Kelompok I	9.78400	12.25259	.436	-16.1903	35.7583
Kelompok IV	Kelompok II	-3.39800	12.25259	.785	-29.3723	22.5763
	Kelompok III	-27.13400*	12.25259	.042	-53.1083	-1.1597
Kelompok I	Kelompok II	36.91800*	12.25259	.008	10.9437	62.8923
	Kelompok III	23.73600	12.25259	.071	-2.2383	49.7103
Kelompok II	Kelompok III	27.13400*	12.25259	.042	1.1597	53.1083

4. Uji Kruskal-Wallis dan Mann-Whitney pada sel osteoklas

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank
osteoklas	Kelompok I	5	14.50
	Kelompok II	5	16.10
	Kelompok III	5	4.60
	Kelompok IV	5	6.80
	Total	20	

Test Statistics

	osteoklas
Chi-Square	13.705
Df	3
Asymp. Sig.	.003

Kruskal Wallis Test

a.

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
osteoklas	Kelompok I	5	4.90	24.50
	Kelompok II	5	6.10	30.50
	Total	10		

Test Statistics^a

	osteoklas
Mann-Whitney U	9.500
Wilcoxon W	24.500
Z	-.629
Asymp. Sig. (2-tailed)	.530
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.548 ^b

b.

Ranks				
	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Kelompok I	5	8.00	40.00
osteoklas	Kelompok III	5	3.00	15.00
	Total	10		

Test Statistics ^a	osteoklas
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.611
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

c.

Ranks				
	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Kelompok I	5	7.60	38.00
osteoklas	Kelompok IV	5	3.40	17.00
	Total	10		

Test Statistics ^a	osteoklas
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	17.000
Z	-2.193
Asymp. Sig. (2-tailed)	.028
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.032 ^b

d.

Ranks				
	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
osteoklas	Kelompok II	5	8.00	40.00
	Kelompok III	5	3.00	15.00
	Total	10		

Test Statistics ^a	
	osteoklas
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.611
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

e.

Ranks				
	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
osteoklas	Kelompok II	5	8.00	40.00
	Kelompok IV	5	3.00	15.00
	Total	10		

Test Statistics ^a	
	osteoklas
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.611
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

f.

Ranks				
	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
osteoklas	Kelompok III	5	4.60	23.00
	Kelompok IV	5	6.40	32.00
	Total	10		

Test Statistics ^a	
	osteoklas
Mann-Whitney U	8.000
Wilcoxon W	23.000
Z	-.940
Asymp. Sig. (2-tailed)	.347
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.421 ^b

5. Rata-rata dan standar deviasi pada jumlah sel osteoklas dan sel osteoblas, serta uji *Paired Samples* untuk melihat perbedaan jumlah sel osteoklas dengan sel osteoblas pada tiap kelompok

rata-rata dan standar deviasi sel osteoklas dan sel osteoblas

	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
kelompok Ok1	15.0660	5	5.92421	2.64939
1 Ob1	53.0840	5	18.05806	8.07581
Kelompok Ok2	16.9320	5	2.27774	1.01864
2 Ob2	66.2660	5	13.35677	5.97333
Kelompok Ok3	4.2000	5	1.80401	.80678
3 Ob3	62.8680	5	14.35765	6.42094
Kelompok Ok4	6.4660	5	3.53902	1.58270
4 Ob4	90.0020	5	28.11800	12.57475

Paired Samples Test	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Kelompok 1 Ok1 - Ob1	-38.0180	22.54226	10.08121	-66.00791	10.02809	-3.771	4	.020
Kelompok 2 Ok2 - Ob2	-49.3340	12.70142	5.68025	-65.10490	33.56310	-8.685	4	.001
kelompok 3 Ok3 - Ob3	-58.6680	13.28949	5.94324	-75.16908	42.16692	-9.871	4	.001
kelompok 4 Ok4 - Ob4	-83.5360	28.02469	12.53302	-118.33325	48.73875	-6.665	4	.003