

**KEFIR SUSU KAMBING SEBAGAI TERAPI  
PERIODONTITIS MENCIT ( *Mus musculus* )  
YANG DIINDUKSI *Porphyromonas gingivalis*  
TERHADAP PRODUKSI IL-4 DAN TGF- $\beta$**

**SKRIPSI**

**Oleh:  
LUTFI AZAM FAHRIZA  
125130101111001**



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2017**

## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang Penelitian

Rongga mulut merupakan sebuah bagian tubuh yang terdiri dari : lidah bagian oral (dua pertiga bagian anterior dari lidah), palatum durum (palatum keras), dasar dari mulut, trigonum retromolar, bibir, mukosa bukal, ‘*alveolar ridge*’, dan gingiva. Tulang mandibula dan maksila adalah bagian tulang yang membatasi rongga mulut. Rongga mulut yang disebut juga rongga bukal, dibentuk secara anatomis oleh pipi, palatum keras, palatum lunak, dan lidah. Pipi membentuk dinding bagian lateral masing-masing sisi dari rongga mulut. Pada bagian eksternal dari pipi, pipi dilapisi oleh kulit. Sedangkan pada bagian internalnya, pipi dilapisi oleh membran mukosa, yang terdiri dari epitel pipih berlapis yang tidak terkeratinasi. Otot-otot businator (otot yang menyusun dinding pipi) dan jaringan ikat tersusun di antara kulit dan membran mukosa dari pipi. Bagian anterior dari pipi berakhir pada bagian bibir (Pinaza, 2008).

Jaringan periodontal adalah jaringan yang mengelilingi gigi dan berfungsi sebagai penyangga gigi, terdiri dari gingiva, sementum, jaringan ikat periodontal dan tulang alveolar. Ada dua tipe penyakit periodontal yang biasa dijumpai yaitu gingivitis dan periodontitis. Gingivitis adalah bentuk penyakit periodontal yang ringan dengan tanda klinis gingiva berwarna merah, membengkak dan mudah berdarah tanpa ditemukan kerusakan tulang alveolar. Periodontitis adalah suatu penyakit peradangan jaringan pendukung gigi yang disebabkan oleh kelompok

mikroorganisme tertentu yang biasanya berasal dari plak gigi, yang dapat mengakibatkan penghancuran progresif jaringan ikat periodontal dan tulang alveolar, dengan pembentukan saku, resesi, atau keduanya. Infeksi periodontal dimulai oleh invasi oral patogen yang berkolonisasi pada biofilm plak gigi pada permukaan akar gigi (Nugroho, 2011).

Mikroorganisme yang berkoloni di dalam plak terdiri dari bakteri *streptococcus*, *lactobacillus* dan *porphyromonas* memiliki produk yang terdapat pada membran sel yaitu lipopolisakarida (LPS) yang dapat merusak jaringan periodontal. Diantara bakteri plak yang bersifat patogen paling banyak ditemukan pada periodontitis adalah bakteri proteolitik *P. gingivalis*. *Porphyromonas gingivalis* merupakan penyebab utama terjadinya periodontitis dan hampir 82% kasus periodontitis pada anjing dari semua tingkatan umur, ras dan jenis kelamin (Amin, 2014).

Keunggulan susu kambing dibandingkan dengan susu sapi adalah lemak susu kambing mempunyai sifat yang mudah dicerna dari pada susu sapi, karena diameter globula lemak susu kambing lebih banyak yang berdiameter kecil. Protein dari susu kambing memiliki keistimewaan yaitu lebih mudah dicerna dan lebih efisien penyerapannya terhadap asam-asam aminonya karena ukuran kasein pada susu kambing lebih kecil dari pada susu sapi. Susu kambing juga memiliki sifat antiseptik yang membantu menekan perkembangbiakan bakteri dalam tubuh. Hal ini disebabkan adanya florin yang kadarnya 10-100 kali lebih besar dibanding pada susu sapi. Florin merupakan antiseptik alami yang mengandung elemen

pengecahan tumbuhnya bakteri di dalam tubuh sehingga dapat mempertinggi kekebalan tubuh. (Atmiyati, 2001).

Komposisi susu terdiri atas air, lemak, dan bahan kering tanpa lemak. Bahan kering tanpa lemak terdiri atas protein, laktosa, mineral, asam, enzim, dan vitamin. Faktor lain yang mempengaruhi komposisi susu adalah geografis, musim, dan status nutrisi lemak. Komposisi susu sapi, antara lain 3,6% lemak, 3,2% protein, 4,7%, laktosa, 0,8% bahan mineral (Winarno, 2007). Sedangkan komposisi susu kambing mengandung 12,1% bahan kering yaitu 3,8% lemak, 3,4% protein, 4,1%, laktosa, 0,8% bahan mineral (Zakaria, 2011).

Kefir adalah minuman fermentasi yang memiliki kemampuan probiotik. Asam laktat sebagai penghambat bakteri patogen yang dihasilkan oleh kefir pada saat proses fermentasi adalah berasal dari laktosa yang terkandung dalam susu sebagai medium fermentasi. Susu sapi dan susu kambing memiliki kandungan yang berbeda sehingga kefir yang dihasilkan juga memiliki kemampuan yang berbeda. Selain itu, kefir juga mengandung CO<sub>2</sub>, diasetil, asetaldehida, hidrogen peroksida dan bakteriosin (Iqbal, 2014). Manfaat kesehatan dari susu kefir yaitu antimikroba, anti-inflamasi, kesembuhan bekas luka, mengontrol metabolisme kolesterol, sebagai probiotik, antitumor, antibakteri, dan antijamur (Chen, 2012).

Berdasarkan pustaka di atas dapat dilakukan penelitian tentang manfaat dari kefir susu kambing sebagai antibakteri yang bertujuan digunakan sebagai media terapi periodontitis yang disebabkan oleh *P. gingivalis*.

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah kefir susu kambing memberikan efek terapi periodontitis mencit (*Mus musculus*) yang diinduksi *P. gingivalis* terhadap penurunan IL-4?
2. Apakah kefir susu kambing memberikan efek terapi periodontitis mencit (*Mus musculus*) yang diinduksi *P. gingivalis* terhadap peningkatan TGF- $\beta$ ?

## 1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui efek terapi periodontitis mencit (*Mus musculus*) yang diinduksi *P. gingivalis* terhadap penurunan IL-4.
2. Untuk mengetahui efek terapi periodontitis mencit (*Mus musculus*) yang diinduksi *P. gingivalis* terhadap peningkatan TGF- $\beta$ .

## 1.4 Manfaat Penelitian

Sebagai dasar penelitian berikutnya tentang efek samping dari pemanfaatan kefir susu kambing sebagai terapi periodontitis.

## 1.5 Batasan Masalah

1. Mencit (*Mus musculus*) yang memiliki jenis kelamin betina digunakan sebagai hewan coba. Mencit yang digunakan berumur 8 minggu dan memiliki berat badan 30 gram (Molon *et al.*, 2014). Mencit didapatkan dari Pusat Veteriner Farma Surabaya dan telah memperoleh sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Muhammadiyah Malang dengan nomor E.5.a/81/KEPK-UMM/VI/2016.

2. Kefir Susu Kambing yang digunakan didapat dari UPT Pembibitan Ternak dan Hijauan Pakan Ternak Singosari. Menurut Sawitri (2012) jumlah konsentrasi Bakteri Asam Laktat pada kefir susu yaitu  $10^8$  CFU/ml.
3. *Porphyromonas gingivalis* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi FK Universitas Brawijaya.
4. Bakteri *P.gingivalis* diinfeksi pada gingiva mandibular incivus melalui sulkus gingiva sebanyak 0,02 ml dengan konsentrasi  $1-2 \times 10^8$  CFU/ml (Herrera *et al.*, 2014).
5. Kefir susu kambing diberikan dengan volume bertingkat yaitu sebanyak 0,2 ml/30gramBB, 0,4 ml/30gramBB, dan 0,6 ml/30gramBB diberikan pada gingiva mandibular incivus melalui sulkus gingiva berdasarkan kelompok perlakuan (Vinderola *et al.*, 2004).
6. Variabel parameter yang dilihat adalah perubahan yang terjadi pada gingiva setelah menjalani terapi kefir susu kambing berdasarkan IL-4 dan TGF- $\beta$  menggunakan metode flowsitometri (Endharti, 2007)

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Periodontitis

Gigi yang berada di cavum oral rentan terhadap bakteri, virus, dan jamur yang dapat menyebabkan penyakit periodontal. Penyakit periodontal adalah infeksi disebabkan oleh bakteri dalam biofilm (plak gigi) yang terbentuk pada permukaan oral. Penyakit periodontal terjadi pada semua mamalia dan merupakan umum dan kondisi yang berpotensi serius. Penyakit periodontal dapat memengaruhi kondisi gigi atau jaringan mulut lainnya (Utama, 2014).

Periodontitis umumnya disebabkan oleh plak yang terdiri dari lapisan tipis biofilm yang mengandung bakteri, produksi bakteri dan makanan. Lapisan ini melekat pada permukaan gigi dan berwarna putih atau putih kekuningan. Plak yang menyebabkan periodontitis adalah plak yang berada tepat di atas garis gusi. Bakteri dan produknya dapat menyebar ke bawah gusi sehingga terjadi proses peradangan dan terjadilah periodontitis. Periodontitis dapat juga melibatkan hilangnya progresif dari tulang alveolar di sekitar gigi, dan jika tidak diobati dapat menyebabkan pengenduran dan selanjutnya kehilangan gigi. Periodontitis sering didapatkan adanya peningkatan petanda-petanda inflamasi. Bakteri yang berasal dari poket periodontal dapat masuk ke dalam aliran darah selama terjadi aktivitas rongga mulut misalnya pada waktu mengunyah atau gosok gigi. Pada hewan dengan penyakit gusi berdarah harus lebih berhati-hati karena darah yang keluar dapat membawa bakteri patogen dalam gigi dan mulut kemudian ikut masuk ke aliran darah (Irlina, 2012).

### 2.1.1 Periodontitis Kronis

Periodontitis kronis merupakan penyakit peradangan pada jaringan periodontal yang disebabkan terutama oleh bakteri spesifik pada subgingiva, yang dapat menimbulkan respon inflamasi gingiva, dan berlanjut ke struktur jaringan penyangga gigi yaitu sementum, ligamentum periodontal dan tulang alveolar. Keadaan ini mengakibatkan hilangnya perlekatan gingiva dan terjadinya kerusakan tulang alveolar lebih dalam, pembentukan poket periodontal, migrasi patologis yang menimbulkan diastema, dan kegoyangan gigi yang dapat berakibat tanggalnya gigi (Suwandi, 2010).

Periodontitis kronis didefinisikan sebagai penyakit infeksi dikarenakan inflamasi pada jaringan lunak dari gigi, kehilangan jaringan ikat secara progresif dan kehilangan tulang, hilangnya jaringan ikat dan hilangnya tulang alveolar. Susunan poket periodontal biasanya diakibatkan oleh proses penyakit resesi gingiva sekaligus kehilangan jaringan ikat pada kasus kedalaman poket yang menyisakan kedangkalan. Meskipun pada keduanya mulai terjadi kehilangan jaringan ikat dan kehilangan tulang (Carranza, 2008)

### 2.1.2 Periodontitis Agresif

Periodontitis agresif dikenal juga sebagai *early-onset* periodontitis. Periodontitis agresif diklasifikasikan sebagai periodontitis agresif lokal dan periodontitis agresif generalis. Periodontitis agresif biasanya mempengaruhi hewan sehat yang berusia muda. Periodontitis agresif berbeda dari periodontitis kronis pada usia serangan, kecepatan progresi penyakit, sifat, dan komposisi

mikroflora subgingiva yang menyertai, perubahan dalam respon imun host, serta agregasi familial penderita (Lebukan, 2013).

Periodontitis Agresif adalah penyakit periodontal destruktif dan berkembang cepat, ditandai kerusakan yang cepat dari ligament periodontal dan tulang alveolar, kehilangan gigi, dan respons minim terhadap terapi periodontal. Pada penyakit ini, bakteri plak dan kalkulus tampak sedikit, tidak sebanding dengan kerusakan yang terjadi sangat cepat dan progresif. Kelainan ini ditandai dengan kehilangan perlekatan interproksimal menyeluruh, mengenai sedikitnya tiga gigi permanen lainnya selain molar pertama dan insisif. Gambaran klinis menunjukkan gingiva dengan peradangan akut dan parah, sering proliferasi, ulserasi, supurasi, dan berwarna merah terang. Perdarahan spontan atau dengan stimulasi ringan. Respons ini terjadi pada tahap destruktif atau aktif. Penyakit ini dapat berhenti secara spontan atau setelah terapi periodontal (Andrena, 2008).

### 2.1.3 Gejala Klinis

Ciri khas dari keadaan periodontitis pada mencit yaitu gingiva kehilangan perlekatannya dengan gigi dan membentuk suatu celah yang disebut *pocket* gingiva terinfeksi. Toksin dari bakteri-bakteri plak bercampur dengan respon alami pertahanan tubuh secara perlahan merusak tulang dan jaringan penyangga gigi sehingga gigi kehilangan jaringan pendukungnya. Gigi dapat menjadi goyah bahkan lepas dari *socket*nya apabila tidak ditangani dengan benar (Ayu, 2014).

### 2.1.4 Histopatologi

Perubahan histopatologi pada periodontitis pada hewan model telah dipelajari secara intensif. Tanda awal yaitu lesi. Ciri khas pada jaringan ikat periodontal adalah kepadatan bahkan kolagen seluruh periodontal dan tidak adanya kelompok sel inflamasi. Di lesi awal, terdapat dalam waktu dua sampai empat hari setelah adanya plak yang menumpuk, peningkatan volume epitel junctional (JE) ditempati oleh polimorfonuklear leukosit (PMN), pembuluh darah yg terletak di bawah menjadi melebar dan menunjukkan peningkatan permeabilitas, infiltrat selular kecil PMN dan mononuklear sel telah terbentuk, dan kandungan kolagen di daerah menyusup telah menurun tajam (Pinaza, 2008).

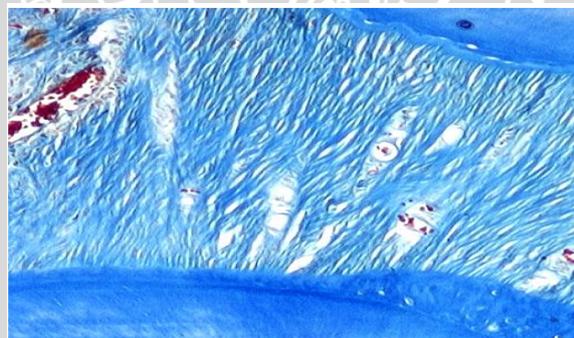
Dalam waktu sekitar empat sampai tujuh hari dari akumulasi plak, gingivitis pada manusia berkembang menjadi awal luka. Tanda untuk membedakan yaitu akumulasi sejumlah besar limfosit sebagai penyusup diperbesar dalam jaringan ikat periodontal. Asosiasi antara limfosit dan cytopathically diubah fibroblast yang datang. Perubahan awal yang secara kuantitatif meningkat. Dengan dua sampai tiga minggu, lesi terbentuk ditandai dengan dominan sel plasma dalam lesi inflamasi diperluas. Namun, lesi yang terbentuk dapat bertahan untuk bervariasi panjang periode waktu sebelum menjadi "agresif" dan maju ke lesi selanjutnya (periodontitis) (Pinaza, 2008).

Periodontitis dapat diperiksa dengan pemeriksaan patologi anatomi, dimana akan terlihat jaringan periodontal yang mengalami ekstrasvasasi, ditandai dengan adanya infiltrasi sel-sel ke ruang-ruang trabekula, daerah-

daerah reasorpsi tulang dan bertambah besarnya ruang trabekula terlihat pada gambar 1.2. Sedangkan pada gambar 1.1 menunjukkan gambaran normal dari jaringan periodontal yang ditandai dengan tidak adanya trabekula dan sel epitel yang rusak. Pengecatan pada jaringan periodontal dengan *Mallory* digunakan untuk memperlihatkan kondisi serat kolagen (Praptiwi, dkk., 2009).



**Gambar 1.1** Jaringan periodontal normal terlihat jaringan ephitel normal dan tidak terdapat trabekula (Praptiwi, dkk., 2009)



**Gambar 1.2** Jaringan periodontal periodontitis terlihat jaringan ephitelyang sudah rusak dan terbentuk trabekula (Praptiwi, dkk., 2009)

Transformasi penyakit periodontitis, yang ditandai dengan proliferasi pembuluh darah dan vasodilatasi membuat pembuluh penuh dengan darah. Sel plasma dan limfosit B masuk ke dalam jaringan ikat. Epitel pocket yang sangat tipis sering terjadi ulserasi serta permeabel untuk mediator dan sel-sel pertahanan. Jaringan ikat menunjukkan tanda-tanda degenerasi nekrosis. Serat dari apikal ligamen periodontal pada epitel junctional dihancurkan oleh

kolagenase. Epitel junctional berkembang biak dalam arah apikal lalu terkena sementum yang menyerap bakteri, produk dan menjadi lembut dan nekrosis. Osteoklas resorpsi tulang, didorong oleh plak dan host berasal mediator seperti endotoksin, prostaglandin, interleukin dan *tumor necrosis factor* (TNF) (Arief, 2007).

### 2.1.5 Pengobatan dan Pencegahan Periodontitis

Pengobatan periodontitis pada hewan khususnya *pet animal* saat ini menggunakan pemberian antibiotik, enzim dengan kandungan antibakterial untuk mengurangi timbunan plak diikuti *periodontal treatment* berupa pembersihan plak di sekitar gigi (Bellows, 2000). Pencegahan dilakukan dengan menjaga kebersihan gigi dan mulut pet dengan rutin menyikat gigi, pemberian makanan bertekstur kasar serta melakukan *regular check up* untuk mulut dan gigi.

## 2.2 Susu Kambing

Susu kambing merupakan susu yang dihasilkan oleh kambing peranakan Etawah. Susu kambing memiliki protein terbaik setelah telur dan hampir setara dengan ASI (Air Susu Ibu). Susu merupakan salah satu bahan makanan yang mudah dicerna dan bernilai gizi tinggi dan sangat dibutuhkan oleh manusia dari berbagai umur. Susu juga mempunyai sifat yang mudah rusak sehingga sangat cepat mengalami perubahan rasa, bau, dan warna. Dalam keadaan normal, susu hanya bertahan maksimal 2 jam setelah pemerahan tanpa mengalami kerusakan maupun penurunan kualitas. Agar kesegaran susu dapat dipertahankan maka harus dilakukan penanganan pasca panen. Salah satu proses penanganan yang dapat

dilakukan yaitu melalui sterilisasi susu. Susu sterilisasi dibuat dari susu cair segar yang diolah menggunakan pemanasan dengan suhu tinggi dan dalam waktu yang sangat singkat untuk membunuh seluruh mikroba, sehingga memiliki kualitas yang baik. Kelebihan proses ini tidak menghilangkan kandungan nutrisi mikro seperti vitamin dan mineral (Zakaria, 2011).

**Tabel 2.2** Nilai gizi dari susu kambing, susu sapi dan air susu ibu (ASI), per 100 gram (Atmiyati, 2001).

Bahan Kimia	Susu kambing	Susu sapi	ASI
Protein (g)	3,3	3,6	1,0
Lemak (g)	3,3	4,2	4,4
Karbohidrat (g)	4,7	4,5	6,9
Kalori	61	69	70
Posfor, P(g)	93	111	14
Kalsium Ca(g)	19	134	32
Magnesium Mg(mg)	13	14	3
Besi, Fe (mg)	0,05	0,05	0,03
Natrium Na (mg)	49	50	17
Kalium, K (mg)	152	204	51
Vitamin A (IU)	126	185	241
Thiamin (mg)	0,04	0,05	0,014
Riboflavin (mg)	0,16	0,14	0,04
Niacin (mg)	0,08	0,28	0,18
Vitamin B-6 (mg)	0,04	0,05	0,01

### 2.3 Kefir

Kefir merupakan jenis susu fermentasi asal pegunungan Kaukasus yang memiliki rasa asam beralkohol, konsistensi seperti krim dan sedikit berbuih. Produk ini telah banyak dikonsumsi di beberapa negara Asia dan Scandinavia. Kefir mudah dicerna oleh individu lactose intolerant karena laktosa telah dicerna menjadi glukosa dan galaktosa oleh laktase dari mikroba starter. Susu fermentasi sebagai bahan pangan asal susu dikelompokkan menjadi dua golongan utama yaitu : (1) melalui fermentasi asam laktat, seperti yoghurt dan susu fermentasi

menggunakan starter bakteri asam laktat, dan (2) melalui fermentasi asam laktat dan alkohol, seperti kefir dan koumiss. Kefir memiliki kadar asam laktat 0,8-1,1%, alkohol 0,5- 2,5%, CO<sub>2</sub>, kelompok vitamin B dan rasio diasetilasetaldehid

3.1. Komposisi dan kadar nutrisi kefir adalah air 89,5%, lemak 1,5%, protein 3,5%, abu 0,6%, laktosa 4,5%, dan pH 4,6. Komponen dan komposisi kimia kefir bervariasi, di antaranya dipengaruhi oleh jenis mikroba starter, suhu dan lama fermentasi, serta bahan baku yang digunakan. Kefir diperoleh melalui proses fermentasi terhadap susu sapi, kambing atau domba untuk menghasilkan asam dan alkohol oleh bakteri asam laktat dan khamir yang hidup bersimbiosis dan tumbuh dalam granula kefir. Granula kefir berbentuk seperti kembang kol berwarna putih atau kekuningkuningan, diameter tiap granula antara 2-15 mm dengan berat beberapa gram. Setelah fermentasi selesai, granula kefir didapatkan kembali melalui penyaringan. Dari metabolisme pentosa selama fermentasi, bakteri kelompok homofermentatif menghasilkan asam laktat hampir 90% dan sedikit asam asetat, sedangkan dari metabolisme heksosa bakteri heterofermentatif memproduksi asam laktat, CO<sub>2</sub> dan etanol, dan menghasilkan komponen flavor susu fermentasi diasetil dan asetaldehid. Di Indonesia sampai saat ini, granula kefir masih relatif sulit didapatkan karena jumlahnya terbatas dan belum dipasarkan secara komersial, padahal ditinjau dari segi kesehatan kefir memiliki potensi untuk dikembangkan seperti halnya yoghurt yang telah lebih dulu dikenal dan disukai oleh masyarakat. Kesulitan ini perlu diatasi dengan menyediakan starter alternatif diantaranya yang dipersiapkan seperti starter dalam pembuatan yoghurt (Usmiati, 2004).

Kefir merupakan salah satu contoh bentuk pangan fermentasi yang mempunyai banyak manfaat. Berdasarkan penelitian kefir dalam dunia kesehatan yang dilakukan sebelumnya, kefir dapat menghambat pertumbuhan tumor lebih efektif daripada yoghurt, mampu menjaga pencernaan dari serangan bakteri patogen, menjaga metabolisme dan fungsi imun manusia, serta menjaga kadar kolesterol dalam darah. Kefir selama ini biasanya dibuat dari susu. Namun, adanya kekhawatiran akan *lactose intolerant* (ketidakmampuan tubuh untuk mencerna dan menyerap laktosa karena berkurangnya atau tidak adanya enzim lactase) juga semakin meningkatnya golongan vegetarian, memicu peningkatan ketersediaan minuman probiotik non-susu. Oleh karena itu, bahan baku dari buah atau sayuran lebih disarankan sebagai medium pertumbuhan probiotik (Zubaidah, 2016).

Kefir adalah susu yang difermentasi oleh sejumlah mikroba, yaitu bakteri penghasil asam laktat (BAL), bakteri penghasil asam asetat, dan khamir. Kefir dibuat melalui proses fermentasi menggunakan mikroba bakteri dan *yeast*. Kefir mempunyai efek yang baik untuk kesehatan, seperti mengontrol metabolisme kolesterol, sebagai probiotik, antitumor bagi hewan, antibakteri, antijamur, dan lain-lain. Kefir mengandung 0,65-1,33 g/l CO<sub>2</sub>, 3,16-3,18% protein, 3,07-3,17% lemak, 1,8- 3,8% laktosa 0,5 - 1,5% etanol dan 0,7-1,0% asam laktat (Al-Baarri, 2013).



## 2.4 Mencit (*Mus musculus*)

Menurut Andri (2007), sistematika mencit (*Mus musculus*) berdasarkan taksonomi adalah sebagai berikut ;

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Famili	: Muridae
Genus	: Mus
Spesies	: <i>Mus musculus</i>

Nenek moyang mencit berasal dari mencit liar yang mempunyai warna bulu agouti (abu-abu), sedangkan pada mencit laboratorium lainnya berwarna putih. Mencit hidup dalam daerah yang cukup luas penyebarannya, mulai dari iklim dingin, sedang, maupun panas dan dapat hidup terus menerus dalam kandang atau secara bebas sebagai hewan liar. Hewan percobaan adalah hewan yang digunakan dalam penelitian biologis maupun biomedis dan dipelihara secara intensif di laboratorium. Salah satu hewan laboratorium yang sering digunakan adalah mencit (*Mus musculus*). Mencit laboratorium digunakan untuk penelitian dalam bidang obat-obatan, genetik, *diabetes mellitus*, dan obesitas. Mencit laboratorium mempunyai berat badan yang hampir sama dengan mencit liar. Saat ini terdapat berbagai warna bulu, galur, dan berat badan yang berbeda-beda setelah ditenakkan secara selektif selama 80 tahun yang lalu. Mencit sebagai hewan percobaan sangat praktis untuk penelitian kuantitatif, karena sifatnya yang

mudah berkembangbiak, selain itu mencit juga dapat digunakan sebagai hewan model untuk mempelajari seleksi terhadap sifat-sifat kuantitatif (Andri, 2007)

Kandang *Mus musculus* berupa kotak kecil berukuran 40cm x 30cm yang terbuat dari bahan plastik (prolipropilen atau polikarbonat), aluminium atau baja tahan karat. Syarat kandang mudah dibersihkan, tahan lama, tahan gigitan dan aman. *Mus musculus* jantan dan betina muda sukar untuk dibedakan. *Mus musculus* betina dapat dikenali karena jarak yang berdekatan antara lubang anus dan lubang genitalnya. Testis pada *Mus musculus* jantan pada saat matang seksual terlihat sangat jelas, berukuran relatif besar dan biasanya tidak tertutup oleh rambut. Testis dapat ditarik masuk ke dalam tubuh. *Mus musculus* betina memiliki lima pasang kelenjar susu dan puting susu sedang pada *Mus musculus* jantan tidak dijumpai. *Mus musculus* akan lebih aktif pada senja atau malam hari, mereka tidak menyukai terang. *Mus musculus* adalah hewan terrestrial dan satu jantan yang dominan biasanya hidup dengan beberapa betina dan *Mus musculus* muda. *Mus musculus* yang baru lahir buta dan tidak berambut. Rambut mulai tumbuh tiga hari setelah kelahiran dan mata akan terbuka 1-2 minggu setelah kelahiran. *Mus musculus* betina mencapai matang seksual sekitar 6 minggu dan *Mus musculus* jantan sekitar 8 minggu, tetapi keduanya dapat dikawinkan minimal setelah berusia 35 hari. Lama hidup mencit satu sampai tiga tahun, dengan masa kebuntingan yang pendek (18-21 hari) dan masa aktifitas reproduksi yang lama (2-14 bulan) sepanjang hidupnya. Mencit mencapai dewasa pada umur 35 hari dan dikawinkan pada umur delapan minggu (jantan dan betina). Siklus reproduksi mencit bersifat poliestrus dimana siklus estrus (berahi) berlangsung sampai lima

hari dan lamanya estrus 12-14 jam. Mencit jantan dewasa memiliki berat 20-40 gram sedangkan mencit betina dewasa 18-35 gram. Hewan ini dapat hidup pada temperatur 30°C (Muliani, 2011)

## 2.5 Bakteri *Porphyromonas gingivalis*.

### Taksonomi

Kingdom : Eubacteria

Phylum : Bacteroidetes

Class : Bacteroides

Genus : Porphyromonas

Species : *Porphyromonas gingivalis*

*Porphyromonas gingivalis* merupakan bakteri anaerob gram negatif yang tidak berspora (non-spore forming) dan tak punya alat gerak (non motile). Bakteri ini berbentuk coccobacilli dengan panjang 0,5 – 2 µm. Koloni bakteri ini bila terdapat pada agar darah tampak lembut, berkilauan dan terlihat cembung serta 1-2 mm di dalam garis tengah dan menggelap dari tepi koloni ke pusat diantara 4-8 hari. Terkadang warna koloni berubah menjadi hitam akibat produksi yang berlebih dari protohaem. Temperatur maksimal untuk pertumbuhan adalah 37°C. pertumbuhan yang signifikan dapat dipengaruhi oleh adanya karbohidrat. Substrat nitrogenous seperti proteose peptone, trypticase dan ekstrak yeast dengan nyata dapat meningkatkan pertumbuhan *P. gingivalis*. *P. gingivalis* merusak jaringan dengan interaksi langsung antara bakteri dan sel inang. Ketika kontak langsung dengan epitel di sulkus periodontal, *P. gingivalis* mampu menyerang berbagai jaringan host termasuk tulang alveolar. Faktor-faktor virulensi yang

terlibat dalam kolonisasi jaringan akan dapat mengubah pertahanan jaringan host. *P. gingivalis* adalah stimulator poten dari mediator inflamasi seperti Interleukin-1 (IL-1) dan Prostaglandin E2 yang akhirnya dapat menyebabkan resorpsi tulang. *P. gingivalis* dapat memetabolisme asam amino dan menghasilkan sejumlah metabolit atau produk akhir, di mana metabolit tersebut bersifat toksik terhadap jaringan gingival pada manusia. Selain itu berpengaruh terhadap perkembangan suatu penyakit periodontal (Fitriyana, 2012).

Lipopolisakarida adalah sebuah molekul besar berupa kompleks antara senyawa lipid dan polisakarida dengan ikatan kovalen dan susunan dari endotoksin yang terdapat di membrane luar bakteri gram negatif. LPS terdiri dari lipid A, polisakarida inti, dan rantai polisakarida spesifik-O. Lipid A adalah glikolipid yang terdiri dari disakarida glukosamin yang tersubstitusi ikatan beta (1,6)-nya. Lipid A bertanggungjawab terhadap efek beracun dengan cara menstimulasi pembentukan dan sekresi sitokina yang menimbulkan gejala keracunan.

### 2.5.1 Faktor Virulensi

Bakteri *P. gingivalis* memiliki faktor virulensi fimbria, lipopolisakarida (LPS), proteinase, kapsul, hemaglutinin, vesikel membran dan metabolit organik seperti asam butirik serta berbagai enzim seperti *arginine*, *lysine gingipain*, kolagenase, gelatinase, dan hyaluronidase, yang dapat berkontribusi dalam menginduksi periodontitis kronis. Fimbria berperan dalam pembentukan koloni *P. gingivalis* pada sulkus gingiva. Fimbria merupakan protein, filamen yang menonjol keluar dari permukaan sel bakteri yang merangsang perlekatan dengan

dengan sel epitel atau jaringan penjamu. Selanjutnya faktor virulensi LPS berperan sebagai agen sitotoksin dari bakteri yang memicu respon inflamasi sel dan berbagai sinyal kemokin dari pejamu. Rangsangan dari LPS ini dapat menyebabkan rentetan peristiwa inflamasi dan respon imunitas. Faktor virulensi proteinase menyediakan asam amino, peptida, dan hemin yang berfungsi sebagai nutrisi bagi *P. gingivalis* untuk tumbuh (Ohara, 2010).

*Porphyromonas gingivalis* merupakan patogen utama yang dapat menyebabkan inisiasi dan progresi periodontitis kronis. *P. gingivalis* merupakan bakteri gram negative anaerob yang berkoloni di dalam jaringan mulut dan tumbuh serta berkembang pada biofilm subgingiva. *P. gingivalis* menghasilkan beberapa faktor virulensi seperti gingipain, lipopolisakarida (LPS), kapsul, dan fimbriae. Gingipain dapat menyebabkan kerusakan pada jaringan periodontal karena berperan sebagai pembawa antigen dan enzim protease aktif. LPS dapat memicu respon inflamasi. Fimbriae berfungsi sebagai perantara adhesi. Kapsul sebagai pertahanan untuk melawan fagositosis (Berti, 2015)

### **2.5.2 Mekanisme Terjadinya Periodontitis**

Ada berbagai metabolit bakteri dan produk toksik yang dapat merusak jaringan dan merangsang terjadinya inflamasi. Mereka termasuk ammonia, amin toksin, indole, asam organik, hidrogen sulfida, metimerkaptan, dan dimetil disulfida. Salah satunya adalah lipopolisakarida endotoksin (LPS) yang dikandung dinding sel bakteri gram-negatif dan dikeluarkan ketika bakteri mati. Ekstrak dari bakteri gram-negatif yang diisolasi dari poket periodontal dapat menyebabkan aktivasi sel B-poliklonal, yang ikut berperan pada patologi periodontal dengan

cara merangsang limfosit untuk membentuk antibodi yang tidak berhubungan dengan agen pengaktif. Pada semua tahap periodontitis bakteri dapat ditemukan pada permukaan akar dan terdapat bebas di dalam poket. Dari daerah ini bakteri akan masuk ke jaringan melalui epitelium poket yang mengalami ulserasi. Produk-produk bakteri seperti LPS dapat mengkontaminasi sementum. Meskipun demikian, masuknya dari produk-produk ini ke dalam sementum umumnya superfisial. Banyak bakteri gram-negatif yang mempunyai kemampuan untuk melekat pada bakteri gram-positif dan sel apitel. Kemampuan ini merupakan faktor penting pada pembentukan kolonisasi subgingiva dan juga memungkinkan bakteri berkoloni pada sel permukaan epitelium (Hatta, 2011).

## 2.6 Imunitas

Sistem imun (*immune system*) atau sistem kekebalan tubuh adalah kemampuan tubuh untuk melawan infeksi, meniadakan kerja toksin dan faktor virulen lainnya yang bersifat antigenik dan imunogenik. Antigen sendiri adalah suatu bahan atau senyawa yang dapat merangsang pembentukan antibodi. Antigen dapat berupa protein, lemak, polisakarida, asam nukleat, lipopolisakarida, lipoprotein dan lain-lain. Sementara itu antigenik adalah sifat suatu senyawa yang mampu merangsang pembentukan antibodi spesifik terhadap senyawa tersebut. Berbicara daya tahan tubuh, kita sering mendengar imunogen yaitu senyawa yang dapat merangsang pembentukan kekebalan/imunitas, dan imunogenik adalah sifat senyawa yang dapat merangsang pembentukan antibodi spesifik yang bersifat protektif dan peningkatan kekebalan seluler (Siswanto, 2013)

Respon imun terhadap benda asing secara garis besar dibagi dalam dua sistem utama, yaitu *innate* / non spesifik/bawaan dan adaptif/*acquired* atau imunitas spesifik. Imunitas adaptif akan bekerja apabila imunitas bawaan (*innate*) tidak dapat meniadakan infeksi dalam waktu dekat/pendek. Selanjutnya, pada saat serangan kedua benda asing ke dalam tubuh, sel B dan T memori akan membantu sistem imun beraksi lebih cepat. Imunitas bawaan (*innate*)/non spesifik terdiri dari garis pertahanan epitel, komponen seluler (makrofag, leukosit polimorfonuklear, *natural killer* (NK) dan *dendritic cell* (DCs) dan komponen non-seluler dengan molekul marker/pendeteksi (*CRP/C-reactive protein*, serum amiloid protein, *complement*). Dalam bekerja, baik imunitas bawaan maupun imunitas adaptif tidak dapat dipisah-pisahkan, namun saling melengkapi (Baratawidjaja, 2006).

Sistem imun non spesifik merupakan pertahanan tubuh terdepan dalam menghadapi serangan berbagai mikroorganisme yang telah ada dan siap berfungsi sejak lahir. Sistem imun alamiah terdiri dari sel dendritik, makrofag, sel NK (*natural killer cells*). Komponen sistem imun non spesifik tidak mempunyai kemampuan untuk bereplikasi secara cepat, akan tetapi selalu siap untuk melawan dan mencerna bahan-bahan asing dalam waktu yang singkat. Sel-sel dalam sistem imun non spesifik meliputi granulosit yang berfungsi memfagosit atau mencerna, *natural killer cells* khusus untuk sel kanker, makrofag dan komplemen yang kesemuanya berfungsi sebagai pertahanan pertama terhadap adanya infeksi (Michel, 2003).

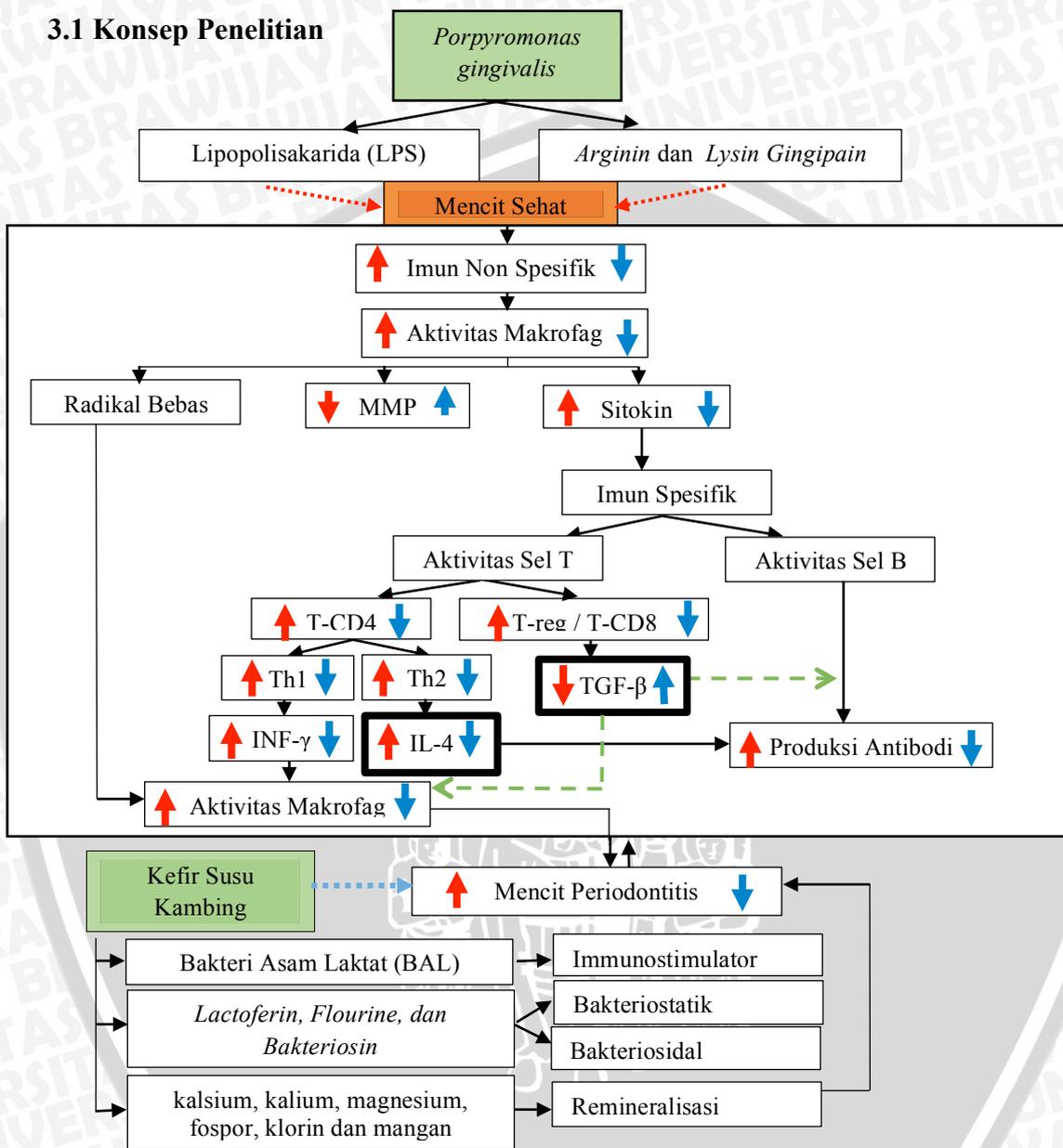
Sistem imun spesifik di-perankan oleh sel limfosit T dan limfosit B. Ketika suatu antigen merangsang respon imun spesifik, antigen tersebut mula-mula

selalu mengaktifasi sel limfo-sit T. Sekali sel limfosit T teraktifasi, sel tersebut akan melawan antigen dan merangsang aktivasi sel limfosit B. Sel limfosit-B yang teraktifasi akan merangsang pembentukan antibodi yang akan melawan antigen tersebut (Martini, 2001).

*Innate Immunity* merupakan mekanisme pertahanan tubuh non spesifik yang mencegah masuknya dan menyebarnya mikroorganisme dalam tubuh serta mencegah terjadinya kerusakan jaringan. Ada beberapa komponen *innate immunity* yaitu pemusnahan bakteri intraselular oleh sel polimorfonuklear (PMN) dan makrofag. Aktivasi komplemen melalui jalur alternatif. Degranulasi sel mast yang melepaskan mediator inflamasi. Protein fase akut: *C-reactive protein* (CRP) yang mengikat mikroorganisme, selanjutnya terjadi aktivasi komplemen melalui jalur klasik yang menyebabkan lisis mikroorganisme. Produksi interferon alfa (IFN a) oleh leukosit dan interferon beta (IFN b) oleh fibroblast yang mempunyai efek antivirus. Pemusnahan mikroorganisme ekstraselular oleh sel *natural killer* (sel NK) melalui pelepasan granula yang mengandung *perforin*. Pelepasan mediator eosinofil seperti *major basic protein* (MBP) dan protein kationik yang dapat merusak membran parasit. Sedangkan pada imunitas spesifik didapat bila mikroorganisme dapat melewati pertahanan nonspesifik/*innate immunity*, maka tubuh akan membentuk mekanisme pertahanan yang lebih kompleks dan spesifik. Mekanisme imunitas ini memerlukan pengenalan terhadap antigen lebih dulu. Mekanisme imunitas spesifik ini terdiri dari imunitas humoral yaitu produksi antibodi spesifik oleh sel limfosit B (*T dependent* dan non *T dependent*) dan *Cell mediated immunity* (CMI) (Munasir, 2001).

### BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

#### 3.1 Konsep Penelitian



Keterangan :

- .....➔ : Pemberian Terapi
- .....➔ : Induksi Bakter
- ⬇️ : Efek Terapi
- ⬆️ : Efek Induksi Bakteri
- ➔ : Menghambat
- ➔ : Proses

Gambar 3.1 Kerangka konsep penelitian

*Porphyromonas gingivalis* adalah bakteri penyebab periodontitis, diinduksi pada sulkus gingiva menciit sehingga lipopolisakarida (LPS) dan enzim *arginin* dan *lysin gingipain* dari *P. gingivalis* akan merusak jaringan periodontal. LPS dari *P. gingivalis* menimbulkan efek inflamasi dan kerusakan pada jaringan alveolar. Sedangkan enzim *arginin* dan *lysin gingipain* berperan sebagai penyedia nutrisi untuk pertumbuhan *P. gingivalis*.

Setelah proses induksi bakteri *P. gingivalis* akan timbul respon imun, yaitu respon imun non spesifik. Respon imun non spesifik berperan sebagai garis pertahanan pertama dan penghambat masuknya patogen potensial sebelum menjadi infeksi yang tampak. Respon imun non spesifik ditandai dengan makrofag melepaskan sitokin yang memicu peradangan berupa perbesaran pembuluh darah sehingga terjadi peningkatan aliran air dan peningkatan aktivitas makrofag. Selain melepaskan sitokin, aktivitas makrofag juga melepaskan radikal bebas dan MMP (*Matrix metalloproteinases*). Radikal bebas akan meningkatkan aktivitas makrofag sehingga menyebabkan menciit mengalami periodontitis. Adanya kerja dari makrofag menyebabkan sel dendritik yaitu *antigen presenting cell* (APC) untuk merangsang sel T naif sebagai respon imun spesifik. Respon imun spesifik melibatkan sel limfosit T dan sel limfosit B. Sel limfosit B berguna untuk memproduksi anti bodi ketika ada antigen masuk, dan sebagai sel memori untuk mengingat antigen yang telah masuk. Sel Limfosit T berperan sebagai pengantar sel imun berupa sel T-CD4 dan sel T-reg / T-CD8. Sel T-CD4 atau *T-helper* dibagi menjadi dua yaitu Th1 sebagai pemacu peningkatan produksi IFN- $\gamma$  yang menimbulkan aktivitas makrofag yang tinggi, dan Th2 memproduksi sitokin

salah satunya yaitu IL-4 sebagai pemacu produksi antibodi terhadap sel B dan juga yang bersifat regulasi terhadap IFN- $\gamma$  yang berfungsi menekan aktivitas makrofag. Sel T-reg / T-CD8 sebagai pengatur kapan harus berhenti memproduksi sitokin, jika sitokin harus dihentikan maka sel T-reg akan melepaskan TGF- $\beta$  sebagai penghambat aktivitas makrofag dan menekan produksi antibodi.

Kefir susu kambing mengandung *lactoferin*, *florine* dan *bakteriosin* yang bersifat sebagai bakteriosidal dan bakteriostatik. Selain itu kefir susu kambing juga mengandung bakteri asam laktat hasil fermentasi dari butir biji kefir. Bakteri asam laktat berperan sebagai immunostimulator untuk meningkatkan sistem kekebalan tubuh. Kefir mengandung mineral yaitu kalsium, kalium, magnesium, fospor, klorin dan mangan. Terdapat proses mineralisasi pada mencit yang diterapi kefir susu kambing.

*Transforming Growth Factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) dapat bekerja sama untuk menghentikan produksi sitokin yang berlebihan dan menekan aktivitas makrofag setelah antigen sudah hilang dari tubuh. Mencit periodontitis yang diinduksi oleh *P. gingivalis* digunakan sebagai hewan coba untuk melihat keberhasilan terapi kefir susu kambing yang dilihat berdasarkan produksi IL-4 dan TGF- $\beta$ .

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Kefir susu kambing dapat digunakan sebagai terapi periodontitis tahap awal pada mencit (*Mus musculus*) yang diinduksi *P. gingivalis* berdasarkan penurunan produksi IL-4 dan peningkatan produksi TGF- $\beta$ .

## BAB 4

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Maret 2016 sampai dengan Mei 2016.

Penelitian ini dibagi menjadi dua tahapan, antara lain tahapan perlakuan dan tahapan penelitian. Tahapan perlakuan dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Imunologi FKH UB. Laboratorium Anatomi FKH UB, Laboratorium Mikrobiologi FK UB. Tahapan pengamatan dilaksanakan di Laboratorium Biomolekuler FMIPA UB.

#### 4.2 Alat dan Bahan

##### 4.2.1 Alat

Alat yang digunakan untuk perawatan hewan coba antara lain kandang yang dilengkapi dengan tempat minum, alas sekam dan penutup berupa kawat yang berbentuk seperti atap kandang. Untuk memanaskan kefir susu kambing menggunakan kompor dalam wadah, saringan plastik, dan inkubator. Alat yang digunakan untuk kultur bakteri *P. gingivalis* antara lain cawan petri, inkubator, ose, bunsen, glove, dan masker. Alat yang digunakan untuk pengambilan sampel glandula saliva antara lain disceting set, tabung koleksi, serta kertas label. Alat yang digunakan untuk flositometri antara lain *yellow tip*, *blue tip*, mortar, sentrifuge tube, alat uji flositometri dan *software* pembaca hasil flositometri.

#### 4.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam pembuatan kefir susu kambing yaitu susu kambing segar dan butir biji kefir. Bahan yang digunakan untuk induksi *P. gingivalis* yaitu media *Brain Heart Infusion Agar*, standar Mc Farland, larutan pengencer dan bakteri *P. gingivalis*. Bahan yang digunakan untuk pengambilan sampel glandula saliva yaitu PBS. Bahan yang digunakan untuk uji flositometri antara lain sampel uji, mouse anti-IgG, dan PBS.

#### 4.3 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dibagi menjadi beberapa tahap, yaitu:

1. Perawatan Hewan Coba
2. Pembuatan Media dan Kultur Bakteri *Porphyromonas gingivalis*
3. Induksi *Porphyromonas gingivalis* Pada Hewan Coba
4. Pemberian Terapi Terhadap Hewan Coba
5. Pembuatan Kefir Susu Kambing
6. Pengambilan Sampel Glandula Saliva
7. Uji Flositometri

#### 4.4 Prosedur Kerja

##### 4.4.1 Perawatan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit dengan jenis kelamin betina dengan usia 8 minggu, berat badan rata-rata 30 gram dengan jumlah 20 ekor yang telah mendapatkan sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Muhammadiyah Malang dengan nomor E.5.a/81/KEPK-UMM/VI/2016. Hewan coba yang akan digunakan dalam

penelitian menurut *Institute of Laboratory Animal Research* (2011), perlu dilakukan adaptasi terhadap lingkungan minimal lima hari. Dalam penelitian ini adaptasi yang dilakukan hewan coba selama tujuh hari dengan pemberian pakan Charoen Pokphand (CP-511) dan air minum *ad libitum* setiap hari. Mencit ditempatkan dalam kandang perawatan, yaitu kandang berbentuk kotak berbahan plastic dengan ukuran 30x50x12 cm yang disertai tutup berbahan kawat. Kandang dilengkapi dengan tempat pakan dan minum, serta alas sekam. Kandang dibuat sebanyak lima buah, untuk membagi hewan coba dalam lima kelompok perlakuan dengan masing-masing 4 sampel setelah dilakukan adaptasi (Aldelina dll., 2013).

#### **4.4.2 Pembuatan Kefir Susu Kambing**

Bahan baku kefir susu kambing adalah susu kambing. Susu kambing dipanaskan secara pasteurisasi pada suhu 85 °C selama 30 menit atau 95 °C selama 5 menit untuk membunuh mikroba yang tidak diinginkan kemudian didinginkan (22-23°C) dan ditambahkan biji kefir, diinkubasi pada suhu 22-23°C selama 20-24 jam. Biji kefir kemudian dipisahkan dengan teknik penyaringan menggunakan penyaring plastik (Suhartanti dan Iqbal, 2014). Kefir disimpan didalam lemari pendingin dengan suhu rendah 4°C untuk mencegah berlangsungnya aktivitas BAL. Untuk mempertahankan kualitas maksimal kefir, kefir dibuat setiap 3 hari dengan PH 4 kemudian dibagi berdasarkan jumlah pemberian penggunaan untuk mencegah adanya kontaminasi.

Penelitian oleh Sawitri (2012) dalam pembuatan kefir dari susu rendah lemak menggunakan kefir grain dengan konsentrasi 1%, 2% dan 3% serta dalam penelitian tersebut penggunaan konsentrasi starter 1% dan lama fermentasi 21 hari merupakan perlakuan yang terbaik. Pada penelitian pendahuluan dilakukan dengan penambahan gula pasir sebesar 5%, 10%, 15% (b/v) dengan starter 15% dan 20% (v/v) menghasilkan total BAL  $10^8$  CFU/ml sehingga dipilih perlakuan konsentrasi starter yaitu 1% dan 10% yang lebih rendah agar lebih efisien tetapi tetap memenuhi standar CODEX.

#### 4.4.3 Pembuatan Media dan Kultur *Porphyromonas gingivalis*

Kultur bakteri *P. gingivalis* dimulai dengan pembuatan media *Brain Heart Infusion Agar* (BHI-A). BHI-A menggunakan 3,7 g BHI-A dicampur dengan 100 ml aquades stereril dalam tabung erlenmeyer, dan dipanaskan sampai homogen. Setelah itu ditutup dengan kapas dan disterilkan dengan autoclave pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit lalu ditambahkan 50  $\mu\text{l}$  hemin, 10  $\mu\text{l}$  vitamin K dan 500  $\mu\text{l}$  *yeast extract* lalu dihomogenkan. Media dituangkan *petridish* sebanyak 25 ml dan ditunggu sampai memadat lalu ditanam *P. gingivalis* kemudian dimasukkan kedalam *decycator* selama 2x24 jam, dan koloni *P. gingivalis* siap digunakan. *P. gingivalis* yang telah dikultur kemudian dibuat suspensi dengan komposisi *Brain Heart Infusion Broth* (BHI-B) 0,37 g, 10 cc aquades dan dihomogenkan lalu ditutup dengan kapas dan disterilkan pada *autoclave* pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit. BHI-B steril ditambahkan 5  $\mu\text{l}$  hemin, 1  $\mu\text{l}$  vitamin K, dan 50  $\mu\text{l}$  *yeast extract* dan dihomogenkan (Aldelina dkk., 2013).

Pembuatan suspensi *P.gingivalis* dilakukan dengan cara 2 ml larutan BHI-B dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 ose *P.gingivalis*. Kemudian disentrifus. Tabung reaksi dimasukkan kedalam *desicator* lalu diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Setelah itu dilakukan pengenceran dengan penambahan aquades steril dan dihomogenkan. Suspensi disesuaikan kekeruhannya dengan menggunakan *microplate reader* dengan *Optical Density* (OD) 0,08-0,10 di panjang gelombang 620 nm yang setara dengan  $1-2 \times 10^8$  CFU/ml (Herrera *et al.*, 2014).

#### 4.4.4 Perlakuan

Perlakuan hewan coba dilakukan dengan membagi 20 ekor mencit menjadi lima kelompok yang diinduksi bakteri *P. gingivalis* pada sulkus gingiva, perlakuan ini dilakukan selama tiga minggu, dalam satu minggu perlakuan dilakukan sebanyak tiga kali dan pemberian terapi kefir susu kambing selama enam hari. Rincian perlakuan dijelaskan pada Tabel 4.1

**Tabel 4.1** Kelompok Perlakuan Hewan Coba Penelitian

Kelompok	Perlakuan
Kontrol Negatif	Pemeliharaan dilakukan selama 5 minggu, pakan CP 511 dan air minum. Kelompok kontrol tanpa pemberian perlakuan khusus.
Kontrol Positif	Pemeliharaan dilakukan selama 5 minggu, pakan CP 511 dan air minum, induksi <i>Porphyromonas gingivalis</i> 0,02 ml dengan konsentrasi $1-2 \times 10^8$ CFU/ml selama 3 x seminggu, dilakukan pada minggu ke-2 hingga minggu ke-4.

Perlakuan 1	Pemeliharaan dilakukan selama 5 minggu, pakan CP 511 dan air minum, induksi <i>Porphyromonas gingivalis</i> 0,02 ml dengan konsentrasi $1-2 \times 10^8$ CFU/ml selama 3 x seminggu, dilakukan pada minggu ke-2 hingga minggu ke-4 dan diterapi kefir susu kambing sebanyak 0,2 ml/30grBB selama 6 hari pada minggu ke-5.
Perlakuan 2	Pemeliharaan dilakukan selama 5 minggu, pakan CP 511 dan air minum, induksi <i>Porphyromonas gingivalis</i> 0,02 ml dengan konsentrasi $1-2 \times 10^8$ CFU/ml selama 3 x seminggu dilakukan pada minggu ke-2 hingga minggu ke-4 dan diterapi kefir susu kambing sebanyak 0,4 ml/30grBB selama 6 hari pada minggu ke-5.
Perlakuan 3	Pemeliharaan dilakukan selama 5 minggu, pakan CP 511 dan air minum, induksi <i>Porphyromonas gingivalis</i> 0,02 ml dengan konsentrasi $1-2 \times 10^8$ CFU/ml selama 3 x seminggu dilakukan pada minggu ke-2 hingga minggu ke-4 dan diterapi kefir susu kambing sebanyak 0,6 ml/30grBB selama 6 hari pada minggu ke-5.

#### 4.4.5 Pengambilan Sampel

Hewan model yang telah diberikan induksi *P.gingivalis* selama 3 minggu dan menunjukkan tanda-tanda mengalami periodontitis fase periodontitis awal yaitu terjadi inflamasi pada gingiva serta terjadi pendarahan apabila dilakukan penekanan pada gingiva, dilakukan eutanasi dengan melakukan dislokasi pada leher (Lampiran 4). Setelah dilakukan eutanasi dilakukan pengambilan sampel glandula parotis yang terdapat pada rongga mulut mencit pada semua kontrol perlakuan. Untuk mendapatkan glandula parotis dilakukan pembedahan di

sepanjang leher sampai rongga mulut (Lampiran 4). Sampel glandula parotis yang telah didapat dimasukkan ke dalam tabung steril yang berisi larutan PBS dan disimpan ke dalam lemari pendingin sampai akan digunakan. Tahap selanjutnya yaitu perhitungan produksi IL-4 dan TGF- $\beta$  dengan *flowcytometry*.

#### 4.4.6 Flowcytometri

Metode flowcytometri adalah pemeriksaan di mana sel-sel dari sampel masuk dalam suatu flow chamber, dibungkus oleh cairan pembungkus, kemudian dialirkan melewati suatu celah atau lubang dengan ukuran kecil yang memungkinkan sel lewat satu demi satu, kemudian dilakukan pengukuran. Sel yang keluar dari aliran tersebut kemudian melewati medan listrik dan dipisahkan menjadi tetesan-tetesan sesuai dengan muatannya, kemudian ditampung ke dalam beberapa saluran pengumpul yang terpisah. Ini disebut *cell sorting*. Produksi IL-4 dan TGF- $\beta$  dilihat menggunakan metode flowcytometri. Sampel yang digunakan yaitu glandula saliva. Glandula saliva yang telah dikoleksi digerus dan disaring menggunakan *filter mpore*, dimasukkan ke dalam tabung propilen lalu disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit pada suhu 4° C sampai didapat bentukan padat.

Flowcytometri dimulai dengan menambahkan antibodi Mouse anti-IgG dikonjugasi dengan label FACS untuk IL-4 dan DTAF untuk TGF- $\beta$  pada pellet, kemudian diberi penambahan 1 ml PBS dan ditempatkan pada kuvet flowcytometer lalu di *running*. Jumlah sel total dan jumlah sel yang terdeteksi oleh label antibodi nantinya akan dihitung oleh flowcytometer. Penggunaan flositometri dapat memberikan informasi yang penting pada klinis untuk

membantu untuk menegakkan diagnosa suatu penyakit, ataupun untuk memonitor keadaan dari suatu penyakit (Susanto, 2012).

#### 4.5 Variabel Penelitian

##### 4.5.1 Variabel Bebas

Kefir susu kambing dan *Porphyromonas gingivalis*.

##### 4.5.2 Variabel Tidak Bebas

Variabel tidak bebas dalam penelitian ini adalah penurunan dari sel IL-4 dan sel TGF- $\beta$ .

##### 4.5.3 Variabel Kendali

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah homogenitas mencit berjenis kelamin betina, berumur 8 minggu dengan berat badan 30 gram

#### 4.6 Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan bersifat eksperimental dengan *Post Test Only Control Design* dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Kriteria hewan model yang digunakan dalam penelitian ini yaitu mencit betina berumur 8 minggu dengan berat badan 30 gram. Banyaknya pengulangan yang diperlukan dalam penelitian dihitung dengan menggunakan rumus  $p(n-1) \geq 15$  (Kustriningrum, 2008).

$$5(n-1) \geq 15$$

Keterangan :

$$5n-5 \geq 15$$

p = jumlah perlakuan

$$5n \geq 20$$

n = jumlah minimal perlakuan yang diperlukan

$$n \geq 4$$

Dari hasil perhitungan tersebut untuk melakukan 5 perlakuan membutuhkan jumlah ulangan minimal 4 kali dalam setiap perlakuan. Pada penelitian ini menggunakan 4 kali ulangan dalam setiap perlakuan sehingga mencit yang dibutuhkan yaitu 20 ekor. Hewan model yang termasuk kriteria inklusi yaitu hewan model yang dalam keadaan sehat, dilihat dari keadaan tubuh, mata bersintar, rambut mengkilat, aktivitas lincah, nafsu makan baik, dan hewan sebelumnya belum pernah digunakan dalam penelitian yang lain. Hewan model yang termasuk kriteria eksklusi yaitu hewan sakit atau mati selama penelitian.

#### 4.7 Analisa Data

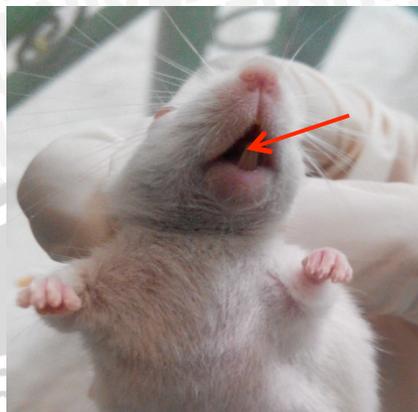
Analisa data dari produksi IL-4 dan TGF- $\beta$  melalui uji statistic *One-Way ANOVA* yang menunjukkan hasil signifikan dan dilanjutkan uji *post hoc test* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan dengan tingkat kepercayaan ( $\alpha$ ) = 0,05

## BAB 5

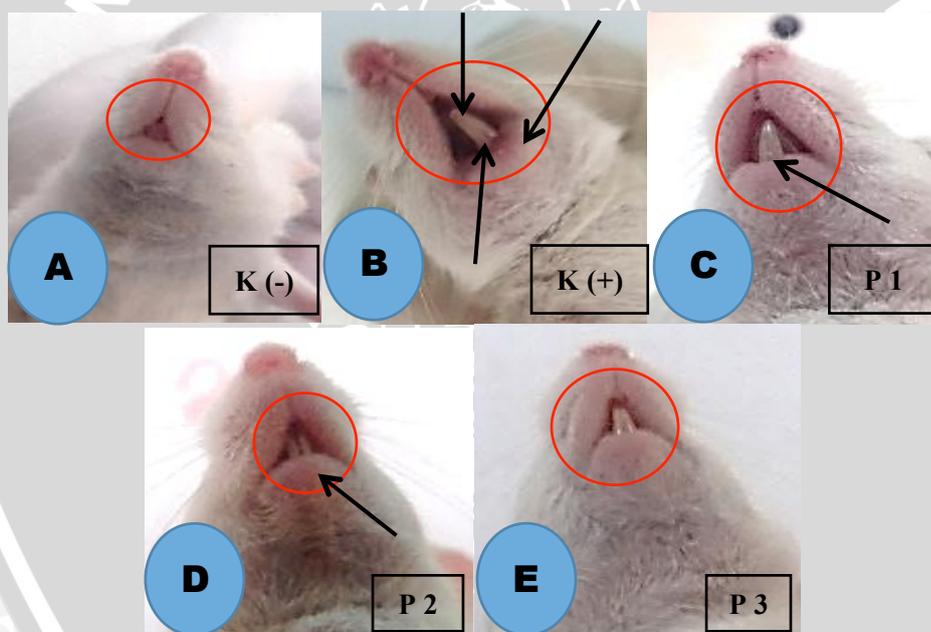
### HASIL DAN PEMBAHASAN

*Porphyromonas gingivalis* yang diinduksikan pada sulkus gingiva mencit mampu menyebabkan perubahan pada daerah gingiva. Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, terdapat perbedaan antar kelompok perlakuan dilihat dari peradangan yang terjadi ditandai dengan adanya pembengkakan dan perubahan warna gingiva yang menjadi kemerahan (**Gambar 5.1**). P1 merupakan kelompok kontrol negatif, terlihat pada daerah gingiva tidak terdapat pembengkakan dan tidak terlihat warna kemerahan, selain itu pada saat ditekan daerah gingiva tidak diikuti dengan perdarahan. Namun berbeda dengan control positif, perlakuan satu, perlakuan dua dan perlakuan tiga yang diinduksi dengan *P. Gingivalis*, terlihat daerah gingiva mengalami pembengkakan, warna gingiva menjadi lebih merah serta terdapat perdarahan apabila daerah gingiva ditekan dan terbentuk poket. Perbedaan gejala klinis tersebut sejalan dengan hasil ekspresi dari sel IL-4 dan TGF- $\beta$ . Dari ciri-ciri tersebut dapat disimpulkan bahwa mencit telah mengalami periodontitis tahap awal.

Periodontitis tahap awal merupakan kelanjutan dari gingivitis yang tidak dikakukan pengobatan. Fase ini merupakan kelanjutan dari proses inflamasi menuju periodonsium pendukung (ligamen periodontal, sementum, dan tulang alveolar). Pada fase ini gingiva masih dalam topografi yang normal, namun akan timbul rasa sakit apabila disentuh, terdapat peradangan ringan pada ligamen periodontal (Pieri *et al.*, 2012).



**Gambar 5.1** Mencit (*Mus musculus*) yang mengalami periodontitis terlihat adanya inflamasi ditandai dengan pembengkakan pada gingiva dan terdapat poket diantara gigi dan gingiva.



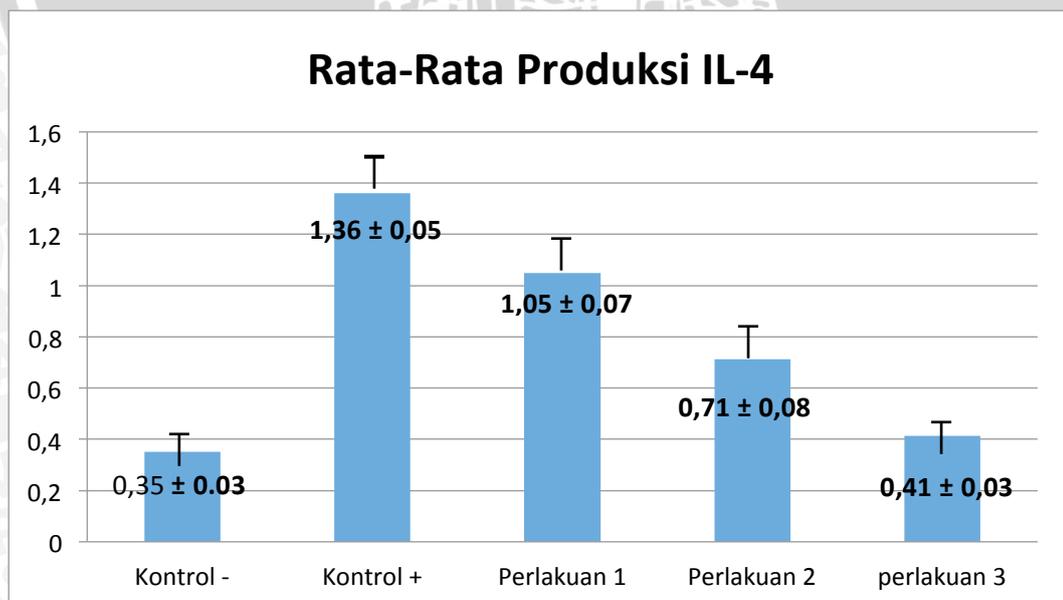
**Gambar 5.2** (A) Kontrol Negatif. (B) Kontrol Positif. (C) Perlakuan 1. (D) Perlakuan 2. (E) Perlakuan 3. (Dokumentasi Pribadi, 2016)

Keterangan : (K -) Kontrol negatif, tidak terjadi inflamasi pada gingiva mencit.  
 (K +) Kontrol positif, terjadi inflamasi pada gingiva hingga mulut, warna gigi kekuningan, mulai terbentuk poket.  
 (P 1) Perlakuan 1 (0,2ml/30gr BB), masih terjadi inflamasi pada mulut dan poket berkurang.  
 (P 2) Perlakuan 2 (0,4ml/30gr BB), inflamasi berkurang dan tidak terdapat poket.  
 (P 3) Perlakuan 3 (0,6ml/30gr BB), sudah tidak terjadi inflamasi.

Hasil terapi dari kefir susu kambing terhadap mencit (*Mus musculus*) periodontitis perlakuan tiga dengan jumlah pemberian kefir 0,6 ml/ 30gr menunjukkan hasil yang optimal. Pada **gambar 5.2** terlihat mencit perlakuan tiga memiliki kemiripan dengan mencit kontrol negatif yaitu inflamasi pada mulut berkurang dibandingkan dengan mencit kontrol positif yaitu inflamasi pada mulut berkurang dibandingkan dengan perlakuan satu dan dua. Pada kontrol positif terlihat gingiva mencit mengalami inflamasi serta warna gingiva berubah menjadi lebih merah dari sebelumnya. Perbedaan gejala klinis tersebut sejalan dengan hasil ekspresi dari sel IL-4 dan TGF-  $\beta$ .

### 5.1 Pengaruh Terapi Kefir Susu Kambing terhadap Produksi IL-4

Produksi IL-4 mengalami penurunan yang signifikan pada perlakuan tiga jika dibandingkan dengan kontrol positif dan perlakuan satu. Jumlah penurunan produksi IL-4 yang terbaik berada pada dosis pemberian tertinggi yaitu 0,6 ml/30gr berat badan. Grafik penurunan produksi IL-4 dapat dilihat pada **gambar 5.3**.



**Gambar 5.3** Rata-rata Produksi IL-4 hasil uji *one way ANOVA* menunjukkan perbedaan nilai diagram antar perlakuan

Keterangan :

Kontrol Negatif : hanya pemberian pakan dan air minum

Kontrol Positif : induksi P. gingivalis

Perlakuan satu : induksi P. gingivalis 0,02 + terapi kefir susu kambing  
sebanyak 0,2 ml

Perlakuan dua : induksi P. gingivalis 0,02 + terapi kefir susu kambing  
sebanyak 0,4 ml

Perlakuan tiga : induksi P. gingivalis 0,02 + terapi kefir susu kambing  
sebanyak 0,6 ml

Hasil uji *one way ANOVA* menunjukkan bahwa kefir susu kambing mempengaruhi penurunan produksi IL-4 secara signifikan. Hasil uji *post hoc* menggunakan uji tukey yang terlihat pada notasi **tabel 5.1**, terlihat perbedaan nyata antara kelompok perlakuan dua dan perlakuan tiga jika dibandingkan dengan kontrol positif. Sehingga jumlah pemberian 0,4ml/30 gr BB sudah memberikan efek penurunan produksi IL-4. Menurut Robati (2011) mekanisme pertahanan awal tubuh berlangsung pada sel-sel epitelium, melalui saliva dan cairan sulkus gingiva, dan yang paling penting adalah aksi neutrofil yang terus-menerus bermigrasi melalui *junctional epithelium* ke dalam sulkus atau poket, untuk mempertahankan lingkungan agar tetap normal, tidak teriritasi terhadap flora bakteri tubuh. Sel-sel epitelium merupakan sel-sel pertama yang diserang oleh bakteri di dalam sulkus atau poket. Interaksi ini memicu tahap awal respon inflamasi dan memicu pengaktifan sel di dalam jaringan ikat. Ketika sel-sel epitel berinteraksi dengan lipopolisakarida (LPS) yang merupakan produk-produk



bakteri, sel-sel epitel mensekresi sitokin salah satunya IL-4. Rangkaian proses berikutnya terjadi peningkatan kadar IL-4 yang memberikan gambaran inflamasi termasuk, pelebaran pembuluh darah dan nyeri.

**Tabel 5.1** Hasil Uji Tukey Produksi IL-4

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Kadar IL-4 ± SD
Kontrol Negatif	0,35 ± 0,02944 <sup>a</sup>
Kontrol Positif	1,36 ± 0,05598 <sup>d</sup>
Perlakuan 1	1,05 ± 0,07118 <sup>c</sup>
Perlakuan 2	0,71 ± 0,08221 <sup>b</sup>
Perlakuan 3	0,41 ± 0,39646 <sup>a</sup>

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ).

Data yang diperoleh dari hasil uji statistik ANOVA didapatkan p-value sebesar 0,000 ( $p < 0,05$ ) dengan tingkat kepercayaan 95% yang menunjukkan adanya perbedaan yang nyata. Perbedaan antar perlakuan diketahui dengan uji lanjutan yaitu uji Tukey yang dinyatakan dengan notasi huruf. Tabel 5.1 memperlihatkan jumlah sel IL-4 pada periodontitis mencit (*Mus musculus*) akibat induksi *P. gingivalis* yang diterapi kefir susu kambing, yaitu rata-rata 0,41% dengan rata-rata paling rendah pada kelompok perlakuan tiga. Ekspresi sel IL-4 tertinggi ditunjukkan pada kelompok kontrol positif.

Perbedaan notasi pada tiap perlakuan menunjukkan bahwa perlakuan berpengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap ekspresi sel IL-4 mencit. Kondisi tersebut mengindikasikan bahwa ekspresi sel IL-4 signifikan dipengaruhi oleh terapi kefir susu kambing pada periodontitis mencit (*Mus musculus*) yang diinduksi *P. gingivalis*. Melalui uji lanjut (*posthoc test*) Tukey diketahui bahwa kelompok

kontrol positif menghasilkan ekspresi IL-4 tertinggi yaitu 1,36% dibandingkan dengan perlakuan lain dari mulai kelompok kontrol negatif dengan jumlah relatif 0,35%, kelompok perlakuan satu dengan jumlah relatif 1,05%, kelompok perlakuan dua dengan jumlah relatif 0,71%, dan kelompok P3 dengan jumlah relatif 0,41%. Perlakuan kontrol negatif juga berbeda nyata ( $P < 0,05$ ) dengan perlakuan lain, kecuali dengan perlakuan tiga tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ).

Interleukin-4 diproduksi oleh sel T. IL-4 merupakan sitokin yang menstimulasi respon imun humoral untuk melawan patogen ekstraseluler, sehingga jika terjadi inflamasi IL-4 akan meningkat. Sumber utama IL-4 adalah sel T CD4+, khususnya Th2, bahkan produksi IL-4 dianggap sebagai kriteria untuk mengklasifikasikan sel T dalam golongan sel Th2, dan IL-4 berfungsi sebagai faktor pertumbuhan autokrin bagi sel Th2. IL-4 merangsang sel B meningkatkan produksi antibodi. LPS mampu pula secara langsung mengaktifkan sel limfosit B untuk memproduksi antibodi. Hasil akhir dari fase ini ialah semakin banyaknya infiltrasi sel makrofag dan limfosit disertai semakin tinggi tingkat kerusakan matriks ekstraseluler seperti kolagen. Akibatnya, semakin banyak akumulasi plak gigi, semakin tinggi respon imun dan semakin besar kerusakan jaringan. Hal ini dapat dilihat secara klinis dengan semakin dalamnya poket gingiva dan perdarahan spontan. Sehingga diperlukan kefir susu kambing yang memiliki kandungan laktoferin dan bakteri asam laktat untuk menurunkan produksi IL-4 yang akan memperbaiki keadaan destruksi jaringan gingiva, ligamen periodontal dan tulang alveolar (Wahyu, 2010).

Kefir susu kambing mengandung laktoferin dan bakteri asam laktat (BAL). Laktoferin adalah suatu protein yang mengikat zat besi, laktoferin memiliki pengaruh bakteristatik terhadap pertumbuhan *P. Gingivalis*, laktoferin mampu menghambat aktifitas bakteri uji, dan menyebabkan bakteri kehilangan kemampuannya untuk membentuk koloni (Cece, 2006). Bakteri asam laktat merupakan mikroorganisme yang menghasilkan senyawa antimikroba antara lain asam organik, diasetil dan bakteriosin. Senyawa antimikroba yang dihasilkan oleh BAL dapat menghambat pertumbuhan bakteri pembusuk makanan dan bakteri patogen. (Ardiyati, 2014).

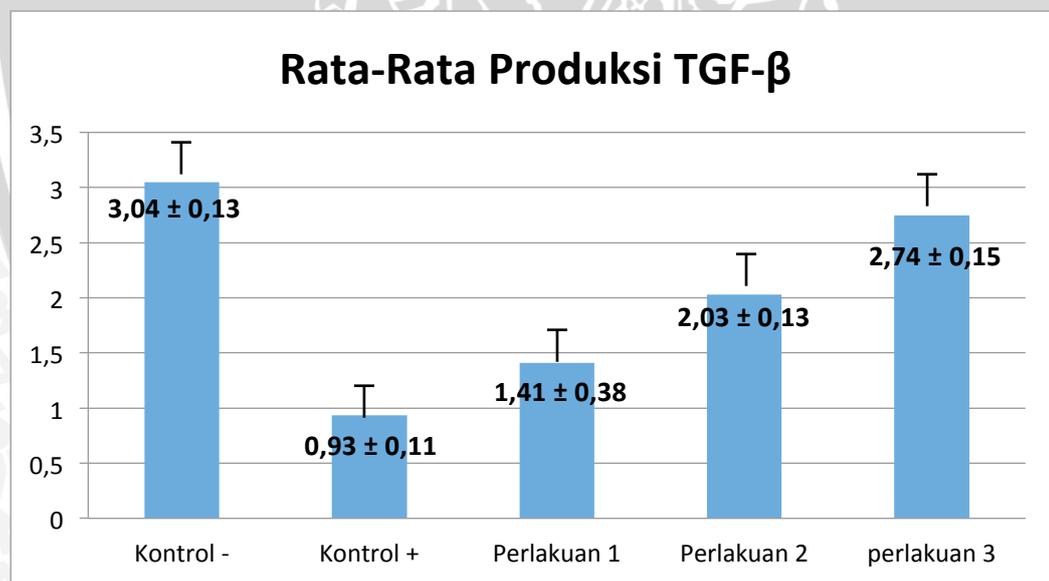
Penggunaan kefir susu kambing dengan jumlah pemberian berbeda selama 6 hari sebagai terapi terhadap periodontitis mencit (*Mus musculus*) yang diinduksi *P. gingivalis* berbeda nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap jumlah relatif sel T CD4. Dengan demikian dapat dinyatakan bahwa penggunaan kefir susu kambing dengan jumlah pemberian berbeda selama 6 hari sebagai terapi terhadap periodontitis mencit (*Mus musculus*) yang diinduksi *P. gingivalis* berbeda nyata ( $P < 0,05$ ) satu sama lain terhadap jumlah relatif sel IL-4. Peningkatan jumlah pemberian kefir susu kambing dalam terapi periodontitis mencit (*Mus musculus*) yang diinduksi *P. gingivalis* menyebabkan penurunan jumlah relatif sel IL-4.

Hasil penelitian ini menunjukkan perlakuan tiga dipilih sebagai jumlah pemberian kefir yang paling baik karena memiliki rataan jumlah relatif sel IL-4 terendah yaitu 0,41% yang berarti terapi kefir susu kambing pada mencit (*Mus musculus*) efektif menurunkan jumlah sel IL-4 akibat infeksi *P. gingivalis*. Penurunan grafiknya dapat dilihat pada **gambar 5.3**.

**Gambar 5.3** memperlihatkan adanya variasi jumlah relatif sel IL-4 sebagai respon terhadap terapi kefir susu kambing pada periodontitis mencit yang diinduksi *P. gingivalis*. Semakin tinggi jumlah pemberian kefir susu kambing yang digunakan sebagai terapi pada periodontitis mencit semakin rendah jumlah relatif sel IL-4. Hal ini dapat dinyatakan bahwa kefir susu kambing efektif jika digunakan dalam pengobatan periodontitis mencit.

### 5.2 Efek Terapi Kefir Susu Kambing terhadap Produksi TGF- $\beta$

Produksi TGF- $\beta$  mengalami kenaikan yang signifikan pada perlakuan tiga jika dibandingkan dengan kontrol positif. Jumlah kenaikan produksi TGF- $\beta$  yang terbaik berada pada jumlah pemberian tertinggi yaitu 0,6 ml/30 gr berat badan. Grafik kenaikan produksi TGF- $\beta$  dapat dilihat pada **gambar 5.4**.



**Gambar 5.4** Rata-rata Produksi TGF- $\beta$  hasil uji *one way ANOVA* menunjukkan perbedaan nilai diagram antar perlakuan

Keterangan :

- Kontrol Negatif : hanya pemberian pakan dan air minum  
Kontrol Positif : induksi P. gingivalis  
Perlakuan satu : induksi P. gingivalis 0,02 + terapi kefir susu kambing sebanyak 0,2 ml  
Perlakuan dua : induksi P. gingivalis 0,02 + terapi kefir susu kambing sebanyak 0,4 ml  
Perlakuan tiga : induksi P. gingivalis 0,02 + terapi kefir susu kambing sebanyak 0,6 ml

Hasil uji *one way ANOVA* menunjukkan bahwa kefir susu kambing mempengaruhi kenaikan produksi TGF- $\beta$  secara signifikan. Hasil uji *post hoc* menggunakan uji tukey yang terlihat pada notasi **tabel 5.4**, terlihat perbedaan nyata antara kelompok perlakuan satu, perlakuan dua dan perlakuan tiga jika dibandingkan dengan kontrol positif. Sehingga jumlah pemberian 0,2ml/30 gr BB sudah memberikan efek kenaikan produksi TGF- $\beta$ . Menurut Brown (2003) periodontitis pada fase awal inflamasi terjadi, sel mononuklear seperti makrofag dan sel limfosit mulai infiltrasi (hilangnya perlekatan lapisan epitel pada permukaan gigi dan adanya aktivitas sel mononuklear). Sel limfosit T akan mengeluarkan produk mediator seperti IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, TNF-alpha, TGF-beta (*Transforming growth factor beta*), khemokin, MCP, dan MIP. LPS mampu secara langsung mengaktifkan sel limfosit B untuk memproduksi antibodi dan merangsang sel makrofag mengeluarkan mediator seperti TGF-beta, IL-1, IL-12, dan IL-10 maupun matriks metalloproteinase. Hasil akhir dari fase ini ialah semakin banyaknya infiltrasi sel makrofag dan limfosit disertai semakin tinggi tingkat kerusakan matriks ekstraselular seperti kolagen. Akibatnya, semakin banyak akumulasi plak gigi, semakin tinggi respon imun dan

semakin besar kerusakan jaringan. Hal ini dapat dilihat secara klinis dengan semakin dalamnya poket gingiva dan perdarahan spontan.

**Tabel 5.2** Hasil Uji Tukey Produksi TGF- $\beta$

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Kadar TGF- $\beta$ $\pm$ SD
Kontrol Negatif	3,04 $\pm$ 0,13961 <sup>d</sup>
Kontrol Positif	0,93 $\pm$ 0,11387 <sup>a</sup>
Perlakuan 1	1,41 $\pm$ 0,38445 <sup>b</sup>
Perlakuan 2	2,03 $\pm$ 0,13736 <sup>c</sup>
Perlakuan 3	2,74 $\pm$ 0,15861 <sup>d</sup>

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ).

Tabel 5.2 memperlihatkan rata-rata jumlah sel TGF- $\beta$  sebagai terapi kefir susu kambing pada periodontitis mencit yang diinduksi *P. gingivalis* yaitu berkisar 13,12%-18,57%, dengan rata-rata 15,75%. Sebagaimana ekspresi sel TGF- $\beta$ , penurunan jumlah relatif sel TGF- $\beta$ . Berdasarkan hasil uji statistik diketahui bahwa perlakuan berpengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap ekspresi sel TGF- $\beta$  mencit. Hal ini menunjukkan bahwa ekspresi sel TGF- $\beta$  dipengaruhi secara signifikan oleh terapi kefir susu kambing pada periodontitis mencit yang diinduksi *P. gingivalis*.

Perbedaan notasi pada tiap perlakuan menunjukkan bahwa perlakuan berpengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap ekspresi sel TGF- $\beta$  mencit. Kondisi tersebut mengindikasikan bahwa ekspresi sel TGF- $\beta$  signifikan dipengaruhi oleh terapi kefir susu kambing pada periodontitis mencit (*Mus musculus*) yang diinduksi *P. gingivalis*. Hasil uji Tukey diketahui bahwa kelompok kontrol positif menghasilkan ekspresi sel TGF- $\beta$  dengan jumlah 0,93% yang nyata lebih rendah

( $P < 0,05$ ) dibandingkan dengan perlakuan kontrol negatif dengan jumlah relatif 3,04% dan kelompok perlakuan tiga dengan jumlah relatif 2,74%, tetapi ( $P > 0,05$ ) dengan kelompok perlakuan satu dengan jumlah relatif 1,41% dan kelompok perlakuan dua dengan jumlah relatif sel TGF- $\beta$  sebesar 2,03% tidak berbeda nyata.

Siklus sel TGF- $\beta$  memainkan peran penting dalam regulasi siklus sel. TGF- $\beta$  adalah sitokin regulator, sehingga jika terdapat inflamasi TGF- $\beta$  akan menurun. TGF- $\beta$  menekan aktivitas makrofag dan produksi antibodi ketika inflamasi telah selesai. Sistem kekebalan TGF- $\beta$  diyakini penting dalam regulasi, sistem kekebalan Regulatory sel T CD8+. TGF- $\beta$  muncul untuk memblokir aktivasi limfosit dan monosit yang diturunkan phagocytes (Rifa'i, 2009). Jika produksi TGF- $\beta$  naik maka osteoklas akan menurun sehingga tidak terjadi destruksi jaringan gingiva, ligamen periodontal dan tulang alveolar. Menurut Suriasih, dkk (2015) kefir susu kambing dapat digunakan sebagai imunostimulator, namun dalam penelitian ini kefir belum berfungsi sebagai imunostimulator diduga karena sifat imunostimulator akan muncul dihari ke-28.

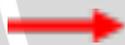
Berdasarkan hasil analisa data, dalam penelitian ini dipilih perlakuan tiga sebagai sebagai jumlah pemberian kefir yang paling baik karena memiliki rataan jumlah relatif sel TGF- $\beta$  tertinggi yaitu 2,74% yang berarti terapi kefir susu kambing pada mencit (*Mus musculus*) efektif menaikkan jumlah sel TGF- $\beta$  akibat infeksi *P. gingivalis* sejalan dengan hasil yang ditunjukkan pada analisa ekspresi sel TGF- $\beta$ .

### 5.3 Efek Terapi Kefir Susu Kambing Terhadap Ekspresi IL-4 dan TGF- $\beta$



**Gambar 5.5** Perbedaan Gingiva Mencit Periodontitis Setelah Terapi Kefir Susu Kambing

Keterangan :



:Daerah gingiva mencit P1/Kontrol Negatif: hanya pemberian pakan dan air minum standar

Kontrol Positif : Induksi P. gingivalis

Kontrol Negatif : hanya pemberian pakan dan air minum standar

Perlakuan satu : induksi P. gingivalis 0,02 + terapi kefir susu kambing sebanyak 0,2ml

Perlakuan dua : induksi P. gingivalis 0,02 + terapi kefir susu kambing sebanyak 0,4 ml

Perlakuan tiga : induksi P. gingivalis 0,02 + terapi kefir susu kambing sebanyak 0,6 ml

Pemberian terapi kefir susu kambing dapat dilihat pula pada perubahan secara makroskopis (Gambar 5.5). Pada gambar 5.5 terlihat perbedaan pada daerah gingiva pada tiap kelompok perlakuan. Kelompok kontrol negatif tidak terdapat perbedaan dengan sebelumnya sebab kelompok kontrol negatif hanya

pemberian pakan dan air minum standar tanpa perlakuan khusus. Kelompok Kontrol positif masih terlihat adanya pembengkakan juga warna kemerahan dan masih disertai dengan perdarahan saat ditekan. Perubahan terjadi pada kelompok perlakuan satu, perlakuan dua, dan perlakuan tiga yang merupakan kelompok terapi. Perbedaan terlihat pada daerah gingiva berupa berkurangnya pembengkakan, diikuti dengan berkurangnya kemerahan yang terjadi pada daerah gingiva dan tidak terjadi perdarahan. Perbedaan paling terlihat antara kelompok kontrol positif dan perlakuan tiga, kelompok perlakuan tiga merupakan kelompok dengan perbaikan gingiva paling baik apabila dilihat secara makroskopis.

Mekanisme pertahanan awal tubuh berlangsung pada sel-sel epitelium, melalui saliva dan cairan sulkus gingiva, dan yang paling penting adalah aksi neutrofil yang terus - menerus bermigrasi melalui *junctional epithelium* ke dalam sulkus atau poket, untuk mempertahankan lingkungan agar tetap normal, tidak teriritasi terhadap flora bakteri tubuh. Sel-sel epitelium merupakan sel-sel pertama yang diserang oleh bakteri di dalam sulkus atau poket. Interaksi ini memicu tahap awal respon inflamasi dan memicu pengaktifan sel di dalam jaringan ikat. Ketika sel-sel epitel berinteraksi dengan lipopolisakarida (LPS) yang merupakan produk-produk bakteri, sel-sel epitel mensekresi sitokin salah satunya IL-4. Rangkaian proses berikutnya terjadi peningkatan kadar IL-4 yang memberikan gambaran inflamasi termasuk, pelebaran pembuluh darah dan nyeri (Robati,2011).

Untuk memperbaiki destruksi jaringan gingiva, ligamen periodontal dan tulang alveolar karena peningkatan polimorfonuklear yang sekaligus akan meningkatkan pengeluaran radikal bebas maka diperlukan pencegahan yang akan

merusak sel. Pencegahan ini dapat dilakukan dengan menggunakan laktoferin (Thomas,2004). Laktoferin adalah suatu protein yang mengikat zat besi, laktoferin memiliki pengaruh bakteriostatik terhadap pertumbuhan *P. Gingivalis*, laktoferin mampu menghambat aktifitas bakteri uji, dan menyebabkan bakteri kehilangan kemampuannya untuk membentuk koloni dengan cepat, yang diduga berupa bagian struktural yang merupakan salah satu sifat utama bakteri, selanjutnya laktoferin sapi merupakan protein yang mengikat Fe dan dapat ditemukan dalam sekresi kelenjar ambing. Pemberian laktoferin melalui air minum pada mencit dapat meningkatkan respon imunitas baik secara seluler maupun humoral (Cece, 2006).

Senyawa antimikroba bakteriosin adalah protein atau kompleks protein yang disintesis pada ribosom, berupa komponen ekstraselular dengan aktivitas antibakteri terhadap spesies dengan kekerabatan yang dekat dimana bakteri produsen memiliki memiliki kekebalan spesifik terhadap bakteriosinnya sendiri. Sebagai senyawa antimikroba, bakteriosin mampu menghambat bakteri Gram positif dan Gram negatif. Bakteriosin merupakan senyawa protein yang tidak membahayakan mikroflora usus, mudah dicerna oleh enzim-enzim dalam saluran pencernaan. Bakteriosin dihasilkan oleh beberapa galur bakteri asam laktat (BAL) (John, 2000).

Mekanisme utama bakteriosin yaitu dengan pembentukan pori dalam membran sitoplasma atau penghambatan biosintesis dinding sel yang dapat mengganggu potensial membran berupa destabilisasi depolarisasi membran sitoplasma atau merusak permeabilitas membran sel mikrobial dan aktivitas enzim

akan mengalami kebocoran. Terjadinya kebocoran akan menyebabkan terganggunya kestabilan membran sel sehingga pertumbuhan sel mikrobial terhambat dan akhirnya mengalami kematian dalam sel target. Penggunaan bakteriosin sebagai alternatif antibiotik bagi kesehatan ternak dan keamanan bahan pangan asal ternak (Chotiah, 2013).

Bakteri asam laktat pada kefir susu kambing berperan sebagai imunomodulator. Bakteri asam laktat dapat meningkatkan aktivitas fagositosis oleh monosit dan granulosit. Imunomodulator adalah substansi atau agen yang dapat membantu memperbaiki fungsi sistem imun terganggu. Agen imunomodulator berpengaruh terhadap perkembangan dan aktivasi sel T. Imunomodulator dapat mengembalikan dan memperbaiki sistem imun yang fungsinya terganggu atau untuk menekan yang fungsinya berlebihan. Imunomodulator ini terdiri atas imunostimulator, imunorestorasi, dan imunosupresi. Imunorestorasi bekerja untuk mengembalikan fungsi sistem imun yang terganggu dengan memberikan berbagai komponen sistem imun seperti imunoglobulin. Imunostimulator yang disebut juga imunopotensiasi akan memperbaiki fungsi sistem imun dengan menggunakan bahan yang merangsang sistem tersebut, bahan yang dapat merubah respon imun biasanya akan ditingkatkan. Imunosupresi bekerja untuk menekan respon imun pada berbagai penyakit inflamasi yang menimbulkan kerusakan (Ardyati, 2014)

## BAB 6

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat ditarik kesimpulan bahwa kefir susu kambing dapat memberikan efek terapi sebagai periodontitis tahap awal pada mencit (*Mus musculus*) yang diinfeksi bakteri *P. gingivalis* yang berpengaruh nyata terhadap penurunan produksi IL-4 dan kenaikan produksi TGF- $\beta$  dengan volume 0,6 ml/30grBB pada perlakuan 3.

#### 6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai kefir susu kambing sebagai terapi periodontitis untuk mendapatkan volume pemberian dan waktu terapi yang efisien untuk melihat efek imunostimulator dari kefir susu kambing.

## DAFTAR PUSTAKA

- Al-Baarri, A.N., L.A. Amanda, and M.L. Anang. 2013. Total Asam, Total Yeast, dan Profil Protein Kefir Susu Kambing Dengan Penambahan Jenis dan Konsentrasi Gula yang Berbeda. *Jurnal Pangan dan Gizi* 4 (7) : 39-48.
- Aldelina, N.L., S.S. Desi, and M. Nurul. 2013. Efek Pemberian Ekstrak Daun Pepaya Muda (*Carica papaya*) Terhadap Jumlah Sel Makrofag pada Gingiva Tikus Wistar yang Diinduksi *Porphyromonas gingivalis* [Skripsi]. Universitas Jember.
- Amin, M.N., D.B.S. Utama, and Y.M.D. Arina. 2014. Pengaruh Ekstrak Daun Pepaya Terhadap Jumlah Sel Limfosit Pada Gingiva Tikus Wistar Jantan Yang Mengalami Periodontitis. *E-Jurnal Pustaka Kesehatan*, 2 (1) : 50-57.
- Andrena., Y. Soeroso, and E.W. Bachtiar. 2008. Evaluasi Pemberian Bahan *Allograft* Dan *Alloplast* Pada Penderita Periodontitis Agresif Menyeluruh Dengan Genotipe Positif Alel 2 (+3954) Interleukin-1 Beta. *Indonesian Journal of Dentistry* 15 (2) : 135-140.
- Andri, W.Y. 2007. Produksi Mencit Putih (*Mus Musculus*) Dengan Substitusi Bawang Putih (*Allium Sativum*) Dalam Ransum [Skripsi]. Program Studi Ilmu Produksi Dan Teknologi Peternakan Fakultas Peternakan. Institut Pertanian Bogor.
- Ardyati, T., dan I.N. Fitria. 2014. Skrining Bakteri Asam Laktat asal Susu Kambing Peranakan Etawa sebagai Penghasil Bakteriosin. *Jurnal Biotropika* 2 (3) : 37-45.
- Arief, E.M. 2007. *Pathogenesis of Periodontal Disease*. USM School of Dentistry. Hal : 1-65.
- Ayu, K.V. 2014. Pemberian Minyak Biji Rami (*Linum Usitatissimum*) Per Oral Meningkatkan Jumlah Osteoblas dan Kepadatan Tulang Pada Mencit Jantan (*Mus Musculus*) Galur Sprague Dawley Dengan Periodontitis. [Tesis]. Program Pascasarjana Universitas Udayana.
- Banun, K., P. Pujiastuti, and D.S. Sari. 2010. Uji Biokimiawi Sistem API 20 A Mendeteksi *Porphyromonas gingivalis* Isolat Klinik dari Plak Subgingiva Pasien Periodontitis Kronis. *Jurnal PDGI* 59 (3) : 110-114.
- Baratawidjaja. 2006. *Immunologi Dasar*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Bellows, J. 2000. All Pet Dental and Periodontal Disease. <[http://www.dentalvet.com/vets/periodontics/periodontal\\_disease.htm](http://www.dentalvet.com/vets/periodontics/periodontal_disease.htm)> [diakses 30 November 2015]
- Berti, P.L. 2015. Daya Antibakteri Air Perasan Buah Lemon (*Citrus Limon* (L.) Burm.F.) Terhadap *Porphyromonas Gingivalis* Dominan Periodontitis. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Gigi. Universitas Muhammadiyah. Surakarta
- Brown, L.R., S. Dreizen dan G.P. Bodey. 2003. Effect of immunosuppression on the oral flora *Comparative Immunology of the Oral Cavity*. U.S. Department of Health Education, and Welfare Bethesda. Hal. 204-208.
- Carranza, E. 2008. *Glickman's Clinical Periodontology*. 10<sup>th</sup> ed. Philadelphia : WB. Saunders co. 4 : 495-9

- Cece, S. 2006. Gen Pengontrol Produksi Susu berkadar Laktoferin Tinggi pada Sapi Perah Fh. *Wartazoa* Vol. XVI No.2.
- Chen, M., H. Hsieh, S.Y. Wang, T.L. Chen, and Y.L. Huang. 2012. Effects of Cow's and Goat's Milk as Fermentation Media on The Microbial Ecology of Sugary Kefir Grains. *International Journal of Food Microbiology* 157 : 73–81
- Chotiah, S. 2013. Potensi Bakteriosin untuk Kesehatan Hewan Dan Keamanan Bahan Pangan. *Wartazoa* 23 : 2-9
- Fitriyana, N. 2012. Pengaruh Pemaparan Bakteri *Porphyromonas gingivalis* Terhadap Produksi Superoksid Nitrofil. Bagian Periodonsia [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
- Hatta, M. 2011. Penyakit Periodontal dan Hubungannya Dengan Aterosklerosis. Fakultas Kedokteran Gigi. Universitas Hasanuddin. Makassar
- Herrera, A. H., L. F. Ospina, L. Fang, A. D. Caballero. 2014. Susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus mutans* to Antibacterial Effect from Mammæ americana. *Advanced in Pharmacological Science*. Volume 2014, Article ID 384815, 6 Pages.
- Iqbal, M., and D. Suhartanti. 2014. Perbandingan Aktivitas Antibakteri Kefir Susu Sapi Dan Kefir Susu Kambing Terhadap Bakteri *Staphylococcus Aureus*. *Jurnal EKOSAINS* 6 (1) : 1-7
- Irlina, L. 2012. Hubungan Periodontitis dengan Penderita Stroke di Rsup Dr. Kariadi Semarang. [Skripsi]. Program Pendidikan Sarjana Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro
- John, L., and M. Zaraxaga. 2000. Bacteriocin Production by Lactic Acid Bacteria Isolated From Rioja Red Wines. *Journal of Applied Microbiology*. 88 : 44-51.
- Lebukan, B. J. 2013. Faktor- Faktor Penyebab Penyakit Periodontal (Studi Kasus Masyarakat Pesisir Pantai Kecamatan Bacukiki Barat Kota Pare – Pare). [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Gigi. Universitas Hasanuddin. Makassar
- Martini, F. 2001. *Fundamentals of Anatomy & Physiology*, 5 th Ed. Prentice Hall. New Jersey.
- Michel, A. 2003. Pengaruh Aging Terhadap Sistem Imun. *JKM* 3 : 53-58
- Molon, R., D. Erica, V. Andreas, A. Joao, J.A. Mario, R. Cleverton, and A.C. Joni. 2014. Evaluation of The Host Response in Various Models of Induced Periodontal Disease in Mice. University Estadual Paulista. Brazil. *J. Periodontal* 85 : 465-477
- Muliani, H. 2011. Pertumbuhan Mencit (*Mus Musculus L.*) Setelah Pemberian Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas L.*). *Buletin Anatomi dan Fisiologi* 19 (1) : 44-54
- Munasir, Z. 2001. Respons Imun Terhadap Infeksi Bakteri. *Sari Pediatri* 2 (4) : 193-197.
- Nugroho, P. 2011. Penyakit Periodontal Sebagai Penyebab Penyakit Jantung Koroner di RSUP dr. Kariadi Semarang [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Diponegoro.

- Ohara, M., and A.L Dumitrescu. 2010. *Periodontal microbiology*. In: Dumitrescu AL. Etiology and pathogenesis of periodontal disease. Berlin : Springer 47-50
- Pieri, F, A., Daibert, A, P, F., Bourguignon, E., and Moreira, M, A, S. 2012. *Periodontal Disease in Dogs*. A Bird's-Eye View of Veterinary Medicine. Federal University of Viçosa. Brazil
- Pinaza, D. 2008. Microbes, Inflammation, Scaling and Root Planning, and the Periodontal Condition. *Journal of dental hygiene: JDH/American Dental Hygienists' Association* 3 : 4-9.
- Praptiwi., E. Sulistyowati, dan Kustiyono. 2009. Pola Makan dan Pertumbuhan Bobot Tikus yang Diinokulasi *Porphyromonas gingivalis* Sebelum dan Sesudah Terjadinya Periodontitis. *Media Medika Indonesiana*, 43 (5) : 229-233.
- Praptiwi., S.F. Muis, Hadisaputro, and S. Suryono. 2011. Sumbangan All-Trans Asam Retionat (ATRA) Bagi Penyembuhan Periodontitis. *Media Medika indonesia* 45 (3) : 169-173.
- Rifa'i, M. 2009. Signal Transduksi dan Sistem Pertahanan Tubuh. Buku Ajar Fisiologi Mab4232. FMIPA Universitas Brawijaya.
- Sawitri, M. 2012. Kajian Konsentrasi Kefir Grain Dan Lama Simpan Dalam Refrigerator Terhadap Kualitas Kimiawi Kefir Rendah Lemak. *JIIIPB* 21 : 23-28.
- Siswanto. 2013. Peran Beberapa Zat Gizi Mikro Dalam Sistem Imunitas. *Jurnal Gizi Indon* 36( 1) : 57-64.
- Suhartanti, D., dan M. Iqbal. 2014. Perbandingan Aktivitas Antibakteri Kefir Susu Sapi dan Kefir Susu Kambing Terhadap Bakteri *Stapylococcus Aureus*. *Jurnal EkoSains* Vol. VI No. 1 Maret 2014. Universitas Ahmad Dahlan.
- Susanto, K. 2012. Validasi dan Cut-Off Bakteri Urine Berdasarkan Metode Flositometri Untuk Mendiagnosis Infeksi Bakteri Saluran Kemih. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Suriasih, K., N. Sucipta., dan M. Hartawan. 2015. Potensi dan Karakteristik Bakteri Asam Laktat (BAL) Isolat Kefir dan Biji Kefir Sebagai Imunomodulator pada Hewan Coba. [Skripsi]. Udayana University Press.
- Suwandi, T. 2010. Perawatan awal penutupan diastema gigi goyang pada penderita periodontitis kronis dewasa. *Jurnal PDGI* 59 (3): 105-109.
- Thomas, J. 2004 . Increase Of Lactoferrin Concentration In Mastitic Goat Milk. *Journal VetMed . Science .* 66 (4) : 345-350.
- Usmiati, S. dan A. Sudono. 2004. Pengaruh Starter Kombinasi Bakteri dan Khamir Terhadap Sifat Fisikokimia dan Sensori Kefir. *J. Pascapanen* 1 (1): 12-21.
- Utama, I.H., N. Kusumawati, dan S.K. Widyastuti. 2014. Karakteristik Karang Gigi pada Anjing di Denpasar Bali. *Indonesia Medicus Veterinus* 3 (3) : 223-229.
- Vinderola, C. G., Duarte, J., Thangavel, D., Perdigon, G., Famworth, E., and Matar, C. 2004. *Immunomodulating Capacity of Kefir*. Journal of Dairy Research. United Kingdom

- Wahyu, T. 2010. Peran Ekspresi Interleukin IL-4 dalam Apoptosis Epitel Bronkiolus Mencit Asma. *Jurnal Kedokteran Brawijaya* 26 (2) : 43-51.
- Zakaria, Y., M.Y. Helmy, dan Y. Safara. 2011. Analisa Kualitas Susu Kambing Peranakan Etawah yang Disterilkan pada Suhu dan Waktu yang Berbeda. *Agripet* (11) 1 : 56-62.
- Zubaidah, E., dan M.F. Mubin. 2016. Studi Pembuatan Kefir Nira Siwalan (*Borassus Flabellifer L.*) (Pengaruh Pengenceran Nira Siwalan Dan Metode Inkubasi). *Jurnal Pangan dan Agroindustri* 4 (1) : 291-301.

