



**EFEK PAPARAN ASAP ROKOK TERHADAP
JUMLAH SEL FIBROBLAS PADA LIGAMEN
PERIODONTAL TIKUS PUTIH (*Rattus
Norvegicus*) YANG DIINDUKSI BAKTERI
*Aggregatibacter actinomycetemcomitans***

SKRIPSI

**UNTUK MEMENUHI PERSYARATAN
MEMPEROLEH GELAR SARJANA**

Oleh:

**DINDA SANZA RISKI AMALIA
145070407111028**

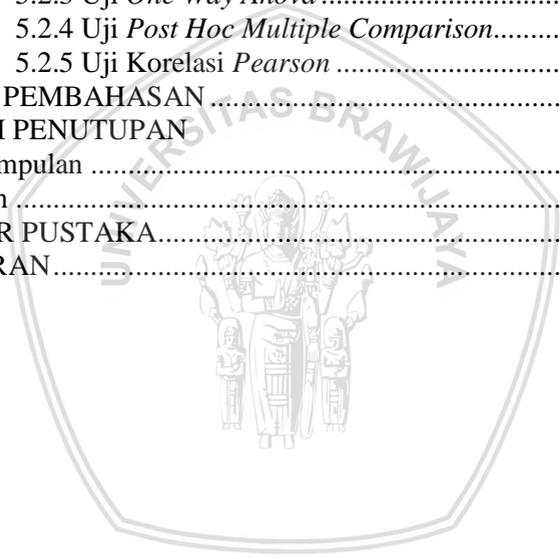
**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

DAFTAR ISI

Halaman Judul.....	i
Halaman Pengesahan.....	ii
Kata Pengantar	iii
Abstrak	v
Abstract	vii
Daftar Isi	ix
Daftar Gambar.....	xii
Daftar Tabel	xiii
Daftar Singkatan.....	xiv
Daftar Lampiran	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan Umum	4
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian	5
1.4.1 Manfaat Akademis	5
1.4.2 Manfaat Praktis	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Jaringan Periodontal	6
2.1.1 Gingiva	7
2.1.2 Sementum.....	8
2.1.3 Tulang Alveolar.....	8
2.1.4 Ligamen Periodontal.....	8
2.2 Periodontitis	14
2.2.1 Periodontitis Aggresif.....	14
2.2.2 Periodontitis Kronis	16
2.3 <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	17
2.4 Rokok.....	19
2.4.1 Definisi Rokok	19
2.4.2 Kandungan Asap Rokok.....	20
2.4.3 Dampak Rokok Bagi Kesehatan	22
2.4.3.1 Dampak Rokok Terhadap Jaringan Periodontal Gigi.....	22
2.5 <i>Rattus norvegicus</i>	25

2.6 Identifikasi Bakteri Aa	28
2.6.1 Pewarnaan Gram	28
2.6.2 Tes Katalase	29
2.6.3 Tes Oksidase	29
2.6.4 Uji Hemolisis.....	29
2.6.5 Uji Agar MacKonkey	30
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1 Kerangka Konseptual	31
3.2 Penjelasan Kerangka Konsep	32
3.3 Hipotesis Penelitian.....	33
BAB IV METODE PENELITIAN	
4.1 Rancangan Penelitian	34
4.2 Populasi dan Sampel	34
4.2.1 Populasi	34
4.2.2 Sampel	34
4.3 Variabel Penelitian	36
4.3.1 Variabel Terikat	36
4.3.2 Variabel Bebas.....	36
4.3.3 Variabel Kontrol	36
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian	36
4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian	37
4.5.1 Identifikasi Bakteri Aa.....	37
4.5.2 Penentuan Kadar dan Densitas Bakteri Aa.....	38
4.5.3 Induksi Bakteri Aa pada Tikus.....	38
4.5.4 Pemaparan Asap Rokok pada Tikus	38
4.5.5 Pengambilan Sel Fibroblas pada Tikus	39
4.5.6 Perhitungan Kadar Sel Fibroblas pada Tikus	39
4.6 Definisi Operasional	39
4.7 Prosedur Penelitian.....	40
4.7.1 Persiapan dan Perawatan Hewan Coba	40
4.7.2 Prosedur Identifikasi Bakteri Aa.....	40
4.7.3 Prosedur Induksi Bakteri Aa pada Tikus.....	43
4.7.4 Pengukuran Poket Gingiva Tikus.....	44
4.7.5 Swab Bakteri Aa pada Tikus.....	44
4.7.6 Prosedur Pemaparan Asap Rokok pada Tikus.....	44
4.7.7 Prosedur Pengambilan Jaringan Penelitian	45

4.7.8 Pembuatan Preparat Jaringan Periodontal	45
4.7.9 Prosedur Pengamatan Jumlah Sel Fibroblas	48
4.8 Analisis Data	49
4.9 Kerangka Konsep Penelitian	50
BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	
5.1 Hasil Penelitian	52
5.1.1 Hasil Uji Identifikasi Bakteri Aa.....	52
5.1.2 Hasil Perhitungan Jumlah Sel Fibroblas	54
5.2 Analisis Data	56
5.2.1 Uji Normalitas	57
5.2.2 Uji Homogenitas Ragam.....	58
5.2.3 Uji <i>One Way Anova</i>	58
5.2.4 Uji <i>Post Hoc Multiple Comparison</i>	59
5.2.5 Uji Korelasi <i>Pearson</i>	61
BAB VI PEMBAHASAN	62
BAB VII PENUTUPAN	
7.1 Kesimpulan	67
7.2 Saran	68
DAFTAR PUSTAKA	69
LAMPIRAN	77



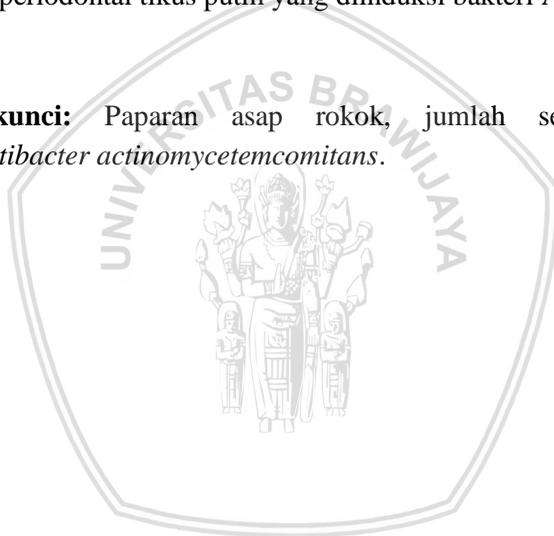
ABSTRAK

Amalia, Dinda Sanza Riski. 2018. Efek Paparan Asap Rokok terhadap Jumlah Sel Fibroblas pada Ligamen Periodontal Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Skripsi. Program Studi Sarjana Kedokteran Gigi. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya, Malang. Pembimbing : (1) drg. Diena Fuadiyah, M.Si. (2) drg. Diah Sp. Perio

Periodontitis agresif merupakan kelainan jaringan periodontal yang progresif. Kelainan ditandai dengan hilangnya perlekatan jaringan ikat dan kerusakan tulang alveolar secara cepat. Hilangnya perlekatan jaringan berhubungan dengan sel terbesar dalam ligamen periodontal yaitu sel fibroblas yang tugasnya mempertahankan serta memperbaiki tulang alveolar dan sementum. Kehilangan perlekatan pada perokok memiliki risiko yang lebih besar dibandingkan dengan non-perokok. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui efek paparan asap rokok terhadap jumlah sel fibroblas pada ligament periodontal tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa). Metode penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik menggunakan *post test only control group design* pada 30 ekor tikus yang dibagi menjadi 3 kelompok, setiap kelompok terdiri dari 10 ekor tikus. Kelompok 1 (kelompok normal), kelompok 2 (kelompok yang diinduksi bakteri Aa selama 21 hari tanpa paparan asap rokok), dan kelompok 3 (kelompok yang diinduksi bakteri Aa selama 21 hari dan diberi paparan asap rokok selama 40 hari). Analisis yang digunakan adalah uji normalitas didapatkan hasil $0,174 > 0,05$ sehingga dapat disimpulkan data berdistribusi normal. Uji homogenitas ragam menunjukkan nilai $0,057 > 0,05$ sehingga Uji Anova valid untuk menguji hubungan ini. Uji *One Way Anova*

didapatkan nilai signifikansi $0,000 < 0,05$ yang berarti paparan asap rokok dapat menurunkan jumlah sel fibroblas. Uji *Post Hoc Turkey Test* didapatkan hasil yang menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan Antara kelompok K(-) dengan P2 dan kelompok P1 dengan kelompok P2. Uji Korelasi *Pearson* didapatkan nilai $-0,975$, tanda negative menandakan bahwa korelasi yang terjadi adalah hubungan yang berbanding lurus yaitu ketika semakin lama dipapar asap rokok maka semakin kecil jumlah sel fibroblas. Dari keseluruhan dapat disimpulkan penelitian menunjukkan bahwa paparan asap rokok mampu menurunkan jumlah sel fibroblas pada ligamen periodontal tikus putih yang diinduksi bakteri Aa.

Kata kunci: Paparan asap rokok, jumlah sel fibroblas, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.



ABSTRACT

Amalia, Dinda Sanza Riski. 2018. The Effect of Cigarette Smoke Exposure to Amount of Fibroblast Cell in Periodontal Ligaments on White Rats (*Rattus norvegicus*) Induced by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Final Assignment. Dental Education Scholar. Dentistry of Brawijaya University, Malang. Supervisor : (1) drg. Diena Fuadiyah, M.Si. (2) drg. Diah Sp. Perio

Aggressive periodontitis is a progressive periodontal disease. Abnormalities are characterized by loss of connective tissue attachment and rapid destruction of alveolar bone. The loss of tissue attachment is related to the largest cell in the periodontal ligament, namely fibroblast cells whose job is to maintain and repair the alveolar bone and cementum. Loss of attachment in smokers has a greater risk compared to non-smokers. The purpose of this research is to determine the effect of cigarette smoke exposure to amount of fibroblast cell in periodontal ligaments on white rats (*Rattus norvegicus*) induced by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa). The method is a laboratories experimental with *post test only control group design* in 30 rats divided into 3 groups consists of 10 rats. Group 1 (normal group), group 2 (induced by Aa for 21 days without cigarette smoke exposure), and group 3 (induced by Aa for 21 days with cigarette smoke exposure for 40 days). The analysis of this research are normality test results obtained $0.174 > 0.05$ so that the data can be concluded that the normal distribution. The homogeneity test of variance shows a value of $0.057 > 0.05$ so that the Anova Test is valid to test this relationship. One Way Anova test obtained a significance value of $0.000 < 0.05$ which means exposure to cigarette smoke can reduce the number of fibroblast cells. Post Hoc Test Turkey Test shows that there are significant differences

between K (-) group and P2 and P1 groups with P2 group. Pearson Correlation Test obtained a value of -0.975, a negative sign indicates that the correlation that occurs is a relationship that is directly proportional, namely when the longer exposed to cigarette smoke, the smaller the number of fibroblast cells. From the whole it can be concluded that research shows that cigarette smoke exposure can decrease the fibroblast cells in periodontal ligaments on white rats induced by Aa.

Keywords : Cigarette Smoke Exposure, Amount of Fibroblast Cell, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Merokok merupakan kebiasaan yang dapat merusak kesehatan. Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) menyatakan, merokok adalah penyebab berbagai penyakit. Hubungan antara merokok dengan berbagai macam penyakit salah satunya dapat menyebabkan timbulnya kondisi patologis di rongga mulut. Rongga mulut adalah bagian yang sangat mudah terpapar efek rokok, karena merupakan tempat terjadinya penyerapan zat hasil pembakaran rokok. Masyarakat yang memiliki kebiasaan merokok tidak dapat begitu mudah untuk menghilangkan kebiasaan tersebut (Andina, 2011).

Gigi dan jaringan lunak rongga mulut, merupakan bagian yang dapat mengalami kerusakan akibat rokok. Penelitian terdahulu membuktikan bahwa merokok dapat memberikan pengaruh langsung terhadap jaringan periodontal. Perokok memiliki peluang tiga kali lebih tinggi menderita penyakit periodontal, dibandingkan dengan yang bukan perokok (Andina, 2011).

Kerusakan jaringan periodontal akibat merokok, diawali dengan terjadinya akumulasi plak pada gigi dan gingiva. Tar yaitu salah satu kandungan yang ada pada rokok mengendap pada gigi, selain menimbulkan masalah estetik, juga menyebabkan permukaan gigi menjadi kasar, sehingga plak mudah menempel. Akumulasi plak diperparah dengan kondisi kebersihan mulut yang kurang baik (Kasim, 2001).

Penelitian terbaru, menduga bahwa nikotin dalam rokok merusak sistem respons imun dan menyebabkan penyempitan pembuluh darah, termasuk pembuluh darah di dalam jaringan sekitar gigi. Hal ini menyebabkan penurunan oksigen di dalam jaringan dan merusak sistem respons imun, dengan demikian terbentuk lingkungan yang

menguntungkan bagi pertumbuhan bakteri penyebab penyakit periodontal (Andina, 2011).

Periodontitis merupakan penyakit infeksi pada jaringan penyangga gigi yang disebabkan oleh bakteri sehingga menyebabkan kerusakan ligamen periodontal, tulang alveolar, terbentuknya poket, resesi atau keduanya (Newman *et al*, 2015). Periodontitis ada berbagai macam salah satunya periodontitis agresif yang dapat menyerang dewasa muda sehat dengan sangat cepat. Periodontitis agresif ini merupakan kelainan jaringan periodontal yang ditandai dengan hilangnya perlekatan jaringan ikat dan kerusakan tulang alveolar secara cepat (Hafadah dan Robert, 2008).

Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) berperan penting sebagai faktor etiologi periodontitis agresif. Sriraman *et al.* pada tahun 2014 menjelaskan bahwa bakteri Aa termasuk dalam bakteri negatif, anaerob fakultatif, serta bakteri fermentatif yang dapat ditemukan pada mukosa rongga mulut, plak gigi, dan poket periodontal (Hafadah dan Robert, 2008).

Periodontitis salah satunya menyerang jaringan ligamen periodontal, yang jika ligamen rusak dapat menyebabkan kegoyangan gigi bahkan gigi tanggal. Akar gigi berhubungan dengan soket pada tulang alveolar melalui struktur jaringan ikat yang dapat dianggap sebagai ligamen. Fungsi ligamen tidak hanya menghubungkan gigi ke tulang rahang tetapi juga menopang gigi pada soketnya dan menyerap beban yang mengenai gigi. Beban selama mastikasi, menelan dan berbicara sangat besar variasinya, juga frekuensi, durasi dan arahnya (Hafadah dan Robert, 2008).

Ligamen periodontal memiliki berbagai macam sel, salah satunya adalah sel fibroblas. Fibroblas merupakan sel utama dari ligamen periodontal. Sel tersebut mempunyai peranan penting dalam proses pembentukan, penghilangan dan penggantian komponen ligamen periodontal. Fibroblas terletak parallel dengan sabut-sabut kolagen, oleh karena itu adanya gangguan pada sel

fibroblas dapat menyebabkan terlepasnya gigi (Kasim, 2001).

Penelitian efek paparan asap rokok terhadap jumlah sel fibroblas pada ligamen periodontal untuk kasus periodontitis agresif masih belum dilakukan, sehingga diperlukan suatu penelitian untuk mengetahui efek paparan asap rokok terhadap jumlah sel fibroblas pada ligamen periodontal yang diinduksi oleh bakteri Aa.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana efek paparan asap rokok terhadap jumlah sel fibroblas pada ligamen periodontal tikus putih yang diinduksi oleh bakteri Aa?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui efek paparan asap rokok terhadap jumlah sel fibroblas pada ligamen periodontal tikus putih yang diinduksi bakteri Aa.

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui jumlah sel fibroblas pada ligamen periodontal tikus putih yang diinduksi oleh bakteri Aa tanpa paparan asap rokok.
2. Mengetahui jumlah sel fibroblas pada ligamen periodontal tikus putih yang diinduksi oleh bakteri Aa dengan paparan asap rokok 4 batang per hari selama 40 hari.
3. Mengetahui jumlah sel fibroblas pada ligamen periodontal tikus putih yang diinduksi oleh bakteri Aa dengan paparan asap rokok 4 batang per hari selama 60 hari.
4. Mengetahui perbandingan jumlah sel fibroblas pada ligamen periodontal tikus putih yang diinduksi oleh

bakteri Aa tanpa paparan asap rokok dengan yang diberi paparan asap rokok.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

Penelitian ini diharap mampu menjelaskan efek paparan asap rokok terhadap jumlah sel fibroblas pada ligamen periodontal tikus putih yang diinduksi oleh bakteri Aa.

1.4.2 Manfaat Praktis

Penelitian ini diharapkan mampu menambah wawasan kepada masyarakat akan dampak negatif dari rokok terhadap rongga mulut.

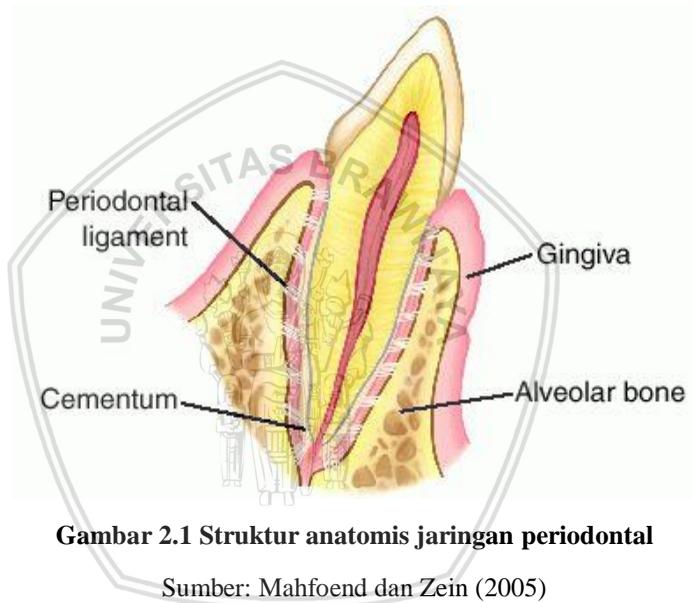


BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Jaringan Periodontal

Jaringan periodontal adalah jaringan pendukung gigi yang terdiri dari ligamen periodontal, processus alveolaris, cementum, dan gingiva (Mahfoed dan Zein, 2005)



Gambar 2.1 Struktur anatomis jaringan periodontal

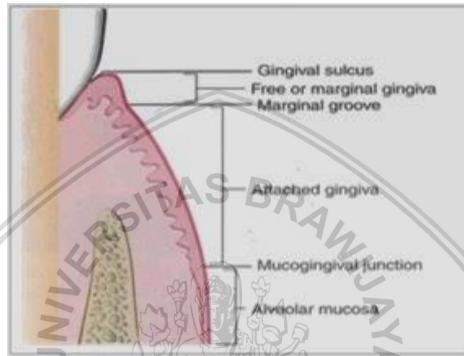
Sumber: Mahfoend dan Zein (2005)

2.1.1 Gingiva

Gingiva merupakan bagian dari jaringan periodontal yang melekat pada prosesus alveolaris dan gigi. Fungsi gingiva adalah melindungi akar gigi, selaput periodontal dan tulang alveolar terhadap rangsangan dari luar, khususnya dari bakteri dalam mulut

(Itjiningsih, 1995). Gingiva merupakan bagian dari jaringan periodontal yang paling luar (Herijulianti, 2009).

Gingiva yang normal dan sehat berwarna merah muda, namun terdapat beberapa variasi pada setiap individu yang berbeda. Hal tersebut dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain kandungan pigmen melanin pada epitel, vaskularisasi, kandungan hemoglobin dalam darah, derajat keratinisasi epitel, dan ada tidaknya inflamasi (Fitri,2014).



Gambar 2.2 Struktur anatomis gingiva sehat

Sumber: Newman *et al* (2015)

2.1.2 Sementum

Sementum adalah jaringan avascular termineralisasi yang melapisi seluruh permukaan akar gigi. Fungsi utama untuk merekatkan serabut kolagen dari ligament periodontal ke permukaan gigi, memiliki fungsi adaptif dan reparative, mempertahankan hubungan oklusal, serta melindungi keutuhan dari permukaan akar gigi (Goncalves *et al*, 2004).

2.1.3 Tulang Alveolar

Tulang alveolar adalah bagian dari tulang maksila dan mandibular yang membentuk dan mendukung soket gigi. Tulang ini terbentuk sewaktu gigi erupsi yang berfungsi untuk memberikan tempat perlekatan bagi ligament periodontal yang akan terbentuk (Fitri, 2014).

2.1.4 Ligamen Periodontal

Ligamen periodontal adalah jaringan ikat yang meliputi akar gigi dan menghubungkan sementum pada akar gigi tersebut dengan tulang alveolar. Ada beberapa fungsi dari ligamen periodontal, yaitu: (Berkovitz *et al*, 2009)

a. *Physical function*

- Perlekatan gigi ke tulang
- Menjaga hubungan gigi dengan gingiva
- Transmisi tekanan oklusal ke tulang alveolar
- *Shock absorbtion*
- Menjaga saraf dan pembuluh darah terhadap perlukaan akibat trauma mekanis

b. *Formative function*

- Pada ligamen periodontal terdapat sel yang berperan dalam pembentukan maupun resorpsi jaringan ligamentum periodontal, sementum dan tulang alveolar. Sel ektomesenkim yang tidak mengalami diferensiasi yang terletak di sekitar pembuluh darah dapat berdiferensiasi menjadi sel pembentuk tulang (osteoblas), sementum (sementoblas) dan serabut jaringan ikat (fibroblas). Adapun sel yang berperan dalam resorpsi tulang dan gigi berasal dari sel makrofag.

c. *Nutritional dan sensori function*

- Ligamen periodontal kaya akan suplai yang berasal dari arteri dental yang masuk melalui foramen apikal dan dari pembuluh darah dari tulang yang berdekatan. Hal ini memungkinkan suplai nutrisi ke sementum, tulang alveolar dan gingiva.
- Inervasi ligament periodontal memungkinkan peka terhadap sentuhan.

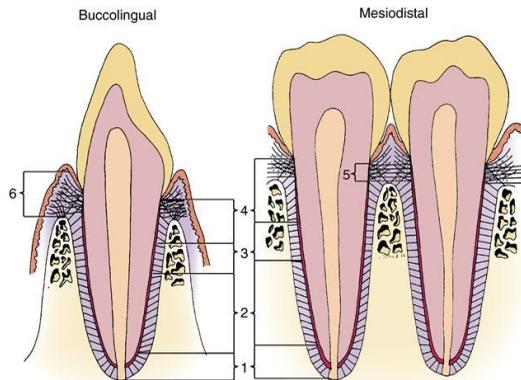
Lebar ligamen periodontal dipengaruhi oleh umur, lokasi dan beban yang diterima. Ligamen periodontal lebih lebar pada gigi yang berfungsi aktif dibandingkan gigi yang tidak berfungsi.

Sel yang terdapat pada ligamen periodontal: (Berkovitz *et al*, 2009)

- a. Fibroblas
Fibroblas adalah sel-sel berbentuk kumparan dengan nuklei oval dan prosesus sitoplasmik yang panjang. Biasanya sejajar dengan serabut kolagen, dengan prosesusnya terbungkus di sekitar bundel serabut. Fibroblas mensintesis kolagen dan matriks dan terlibat dalam degradasi kolagen untuk perubahan bentuknya. Hasilnya Universitas Gadjah Mada 7 adalah suatu perubahan bentuk serabut utama yang konstan dan pemeliharaan suatu ligamen periodontal yang sehat.
- b. Sementoblas
Sementoblas terletak di garis pinggir ligamen periodontal berhadapan dengan sementum. Sementoblas terlihat kuboidal bila pada suatu lapisan tunggal, atau skuamous bila lebih dari satu lapisan.
- c. Sementoklas
Sel ini tidak ditemukan pada ligamen periodontal normal, karena pada umumnya sementum tidak mengubah bentuk dan hanya ditemukan pada pasien dengan kondisi patologik tertentu.
- d. Osteoblas
Osteoblas ditemukan di pinggir ligamen periodontal melapisi soket tulang. Biasanya terlihat dalam berbagai tingkat diferensiasi. Fungsi osteoblas adalah deposisi kolagen dan matriks yang ditumpuk pada permukaan tulang dimana terikat serabut *Sharpey*. Kalsifikasi osteoid menjangkar serabut *Sharpey*. Perubahan bentuk tulang yang konstan memberikan pembaharuan ikatan ligamen periodontal pada tulang secara terus-menerus.
- e. Osteoklas
Sel ini ditemukan di pinggir tulang pada masa perubahan bentuk tulang.
- f. Sisa sel epitel Malassez
Sisa sel epitel Malassez adalah sisa selubung akar epitelial Hertwig. Sel ini berlokasi pada sisi sementum ligamen periodontal. Fungsinya tidak diketahui, tetapi dapat berkembang biak untuk membentuk kista pada stimulasi oksius.

- g. Sel mast
Sel mast ditemukan dekat pembuluh darah, adalah sel besar, bulat/oval dengan nuklei bulat yang terletak di tengah. Sitoplasmanya mempunyai banyak granula merah yang dapat mengaburkan nuklei. Granula ini mengandung heparin, koagulan darah dan histamin, yang dapat meningkatkan permeabilitas kapiler. Histamin, yang dilepaskan melalui degranulasi sel mast yang disebabkan oleh reaksi inflamasi akut, mengerutkan sel endotelial pada dinding pembuluh yang menghasilkan ruang interselular dan permeabilitas vaskular.
- h. Sel makrofag
Sel ini dijumpai di dekat pembuluh darah. Fungsi makrofag adalah memfagositosis debris selular dan benda asing.
- i. Sel endothelial

Bagian terpenting dari ligamen periodontal yang berfungsi untuk menahan gaya kunyah adalah serat (*fiber*). Serat utama ligamen periodontal dibentuk oleh kolagen (terutama kolagen tipe D), tersusun dalam bundel, dan pada potongan longitudinal terlihat merentang seperti gelombang. Bagian ujung dari serat utama yang tertanam dalam sementum dan tulang alveolar, dinamakan serat *Sharpey* (*Sharpey's fibers*). Serat periodontal terdiri dari beberapa kelompok yaitu transeptal, *alveolar crest*, horizontal/*oblique* (miring) dan serat apikal. Group serat periodontal yang paling besar adalah yang berjalan miring. Serat-serat ini berjalan miring dari bagian lamina dura ke arah semen pada gigi. Fungsi utama serat ini adalah untuk menahan gaya kunyah yang mengenai gigi dan mengubahnya menjadi tarikan/tegangan sehingga terjadi peregangannya pada serat periodontal yang berjalan miring (Ardan, 2011).

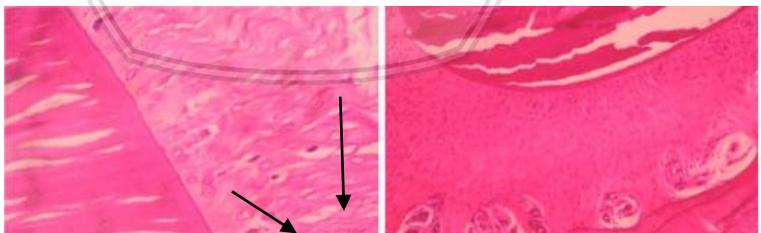


1. Apical
2. Oblique
3. Horizontal
4. Alveolar crest
5. Transseptal
6. Gingival group

Gambar 2.3 Serat Ligamen Periodontal

Sumber: Ardan (2011)

Kandungan sel terbesar dalam ligamen periodontal adalah fibroblast, yang mempertahankan serta memperbaiki tulang alveolar dan sementum. Ligamen periodontal mampu mendeteksi adanya tekanan yang dialami oleh gigi geligi (Mortazavi and Baharvand, 2016).



Gambar 2.4 Sel Fibroblas pada Ligamen Periodontal

Sumber: Pradnyani (2017)

2.2 Periodontitis

Periodontitis adalah inflamasi dan infeksi yang terjadi pada jaringan periodontal dan tulang alveolar penyangga gigi. Periodontitis merupakan penyebab utama tenggelangnya gigi (Fotek, 2012). Periodontitis merupakan penyakit periodontal berupa inflamasi kronis pada jaringan penyangga gigi yang disebabkan oleh bakteri. Proses kerusakan jaringan periodontal pada periodontitis diawali akumulasi plak yang mengandung bakteri dan toksik yang bersifat patogenik. Interaksi antara bakteri plak dan produknya serta respon tubuh memicu respon inflamasi yang dapat menyebabkan ulserasi pada gingiva, kerusakan jaringan ikat, kehilangan tulang alveolar hingga kehilangan gigi (Wijaksana, 2016).

2.2.1 Periodontitis Agresif

Periodontitis agresif merupakan kelainan jaringan periodontal yang progresif pada orang dewasa muda sehat. Kelainan ditandai dengan hilangnya perlekatan jaringan ikat dan kerusakan tulang alveolar secara cepat, lebih dari satu gigi permanen. Ada dua bentuk periodontitis agresif, yaitu periodontitis agresif lokal yang hanya mengenai gigi molar pertama dan insisif, dan periodontitis agresif generalisata yang mengenai lebih banyak gigi permanen. Gambaran klinis periodontitis agresif dini sering terlihat sebagai gejala peradangan ringan. Gejala klasik lain berupa migrasi gigi insisif rahang atas ke arah distolabial. Etiologi periodontitis agresif hingga kini masih diperdebatkan. Mikroorganisme paling dominan yang ditemukan pada plak subgingival penderita periodontitis agresif adalah Aa (Hafadah dan Robert, 2008).

American Academy of Periodontology (AAP) menjelaskan bahwa periodontitis agresif local bermanifestasi pada individu dengan rentang usia pubertas dan sekitar 25 hingga 30 tahun (Roshna dan Nandakumar, 2011).

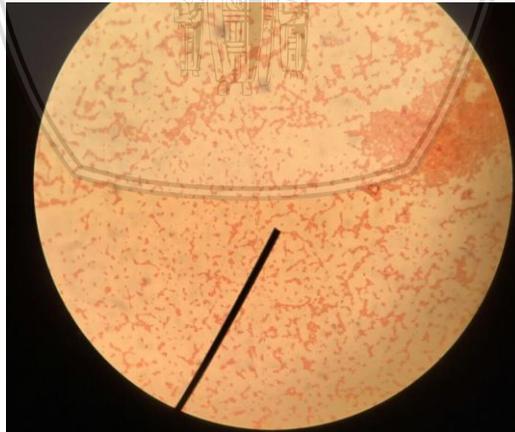
Pada pasien periodontitis agresif generalisata tidak menampakkan gejala apapun saat fase awal terjadinya penyakit. Gingiva tampak berwarna merah muda dan sehat, namun terbentuk poket periodontal yang dalam dari pemeriksaan *probing*. Kerusakan tulang alveolar dan hilangnya perlekatan akan muncul dalam beberapa minggu, bulan, bahkan tahun. Gingiva akan menampakkan

gejala inflamasi sedang hingga berat (Roshna dan Nandakumar, 2011).

2.2.2 Periodontitis Kronis

Periodontitis kronis adalah peradangan pada jaringan periodontal yang disebabkan oleh infeksi bakteri, dimana terjadi kehilangan perlekatan dan kerusakan tulang, serta kegoyangan gigi. Periodontitis kronis merupakan bentuk kelainan periodontal yang paling banyak dijumpai di masyarakat. Penyakit ini sering ditemukan pada pasien berusia diatas 30 tahun dan memiliki gejala klinis berupa peradangan gingiva, perdarahan saat melakukan probing poket periodontal, berkurangnya resistensi jaringan terhadap probing, kerusakan jaringan ikat, tulang alveolar, ligament periodontal, dan sementum akar. Hal ini mengakibatkan hilangnya perlekatan epitel dan terbentuknya poket periodontal, resesi gingiva, dan resorpsi tulang alveolar yang *irreversible*, yang jika tidak segera diatasi menyebabkan kegoyangan gigi, sampai tanggalnya gigi (Yulianti dkk, 2015).

2.3 *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*



Gambar 2.5 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* menggunakan mikroskop elektrik CX10 dengan pembesaran 100x

Kingdom: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Class: Gammaproteobacteria

Order: Pasteurellales

Family: Pasteurellaceae

Genus: Aggregatibacter

Species: Actinomycetemcomitans

Bakteri Aa merupakan bakteri gram negatif. Bakteri tersebut dapat tumbuh soliter atau berkoloni, tidak bergerak, bersifat *anaerob fakultatif* dan *kapnofilik* (Amalina, 2011). Bakteri Aa bisa berbentuk bulat, oval atau batang, tetapi yang paling sering adalah bentuk kokobasil. Aa bisa tumbuh pada agar darah dan coklat yang kemudian membentuk koloni setelah inkubasi selama 48-72 jam. Bakteri tersebut tumbuh pada temperature 37⁰C, tetapi juga bisa tumbuh pada temperature 24-42⁰C (Kesic *et al*, 2009). Bakteri ini bersifat patogen oportunistik dan merupakan bagian flora normal yang berkolonisasi di mukosa, rongga mulut, gigi dan orofaring (Amalina, 2011).

Bakteri Aa mampu berkembang dengan baik pada lingkungan yang mengandung kadar karbondioksida sebanyak 5-10%. Bakteri Aa memiliki kemampuan untuk memproduksi asam dari glukosa, fruktosa, dan maltosa serta mampu memproduksi alkalin fosfatase (Raja *et al*, 2014)

Bakteri Aa memiliki beberapa struktur yang mampu mendukung kemampuannya untuk menyebabkan infeksi, antara lain (Raja *et al*, 2014) :

1. Fimbriae, merupakan filamen-filamen kecil pada permukaan sel dan berfungsi dalam proses adhesi serta invasi.
2. Vesikel, merupakan unit lipopolisakarida (LPS). Vesikel ini berisi endotoksin yang mampu mendorong aktivitas resorpsi tulang dan bakteriosin berupa *actinobacillin*.
3. Material amorf ekstraseluler, merupakan struktur pengikat sel-sel yang saling berdekatan di dalam matriks. Aktivitas adhesi mikroba meningkat dengan adanya material ini.

Bakteri Aa mampu memproduksi produk bakteri berupa LPS, yang dapat mengaktifkan sel B, monosit, makrofag, dan sel-sel polimorfonuklear (PMN). LPS bakteri Aa mengandung 30% karbohidrat, 30% lemak A, 10-12% heksosamin, dan 3-10% fosfat. LPS bakteri Aa mampu menghambat kolagen dan sintesis DNA serta menstimulasi aktivitas resorpsi tulang. Hal ini penting dalam proses perkembangan penyakit periodontal (Sriraman *et al*, 2014)

Uji identifikasi Aa ada banyak seperti uji pewarnaan gram pada uji pewarnaan gram bakteri Aa menghasilkan warna merah yang artinya bakteri gram negatif. Lalu uji katalase pada bakteri Aa menghasilkan gelembung menandakan kemampuan bakteri untuk menghasilkan enzim katalase semakin tinggi. Pada uji oksidase menghasilkan perubahan warna pada isolate bakteri menjadi ungu (Amalina, 2011).

2.4 Rokok

2.4.1 Definisi Rokok

Rokok adalah hasil olahan tembakau yang terbungkus, dihasilkan dari tanaman *Nicotiana Tabacum*, *Nicotiana Rustica*, dan spesies lainnya atau sintetisnya yang mengandung nikotin dan tar dengan atau tanpa bahan tambahan (Heryani, 2014).

Terdapat beberapa jenis rokok yang telah dikenal oleh masyarakat. Rokok kretek merupakan salah satu jenis rokok khas Indonesia yang bahan bakunya mengandung daun tembakau dan cengkeh. Tembakau di dalam rokok kretek mengandung kadar nikotin mencapai 40mg dan tar sebanyak 60mg, lebih banyak jika dibandingkan dengan kandungan nikotin dan tar pada rokok biasa (Widodo *et al*, 2007).

2.4.2 Kandungan Asap Rokok

Asap rokok berbahan utama tembakau mengandung gas yang terdiri dari karbon monoksida, nitrogen, oksigen, dan karbondioksida serta fase padat yang mengandung nikotin, air, dan hidrokarbon aromatic polisiklik (Singh *et al*, 2013). Racun rokok yang paling utama adalah sebagai berikut: (Muhibah, 2011)

1. Nikotin

Nikotin dapat meningkatkan adrenalin yang membuat jantung berdebar lebih cepat dan bekerja lebih keras, frekuensi jantung meningkat dan kontraksi jantung meningkat sehingga menimbulkan tekanan darah meningkat (Tawbariah *et al*, 2014). Nikotin merupakan zat atau bahan senyawa *pirrolidin* yang terdapat dalam *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana rustica*, dan spesies lainnya atau sintesisnya yang bersifat adiktif dapat menyebabkan ketergantungan. Zat yang dapat menimbulkan ketergantungan dalam nikotin berbentuk metabolit inaktif berupa kotinin dan nikotin-N oksida (McGuire *et al*, 1989). Efek adiktif pada nikotin berkaitan erat dengan kemampuannya untuk memproduksi dopamine, senyawa kimia yang ada di dalam otak dan berhubungan dengan perasaan senang. Terdapat hubungan yang berkesinambungan antara level serum kotinin dengan tingkat keparahan hilangnya perlekatan periodontal pada perokok (Benowitz *et al*, 1982).

Penelitian sebelumnya telah menjelaskan bahwa nikotin meningkatkan progresivitas penyakit periodontal melalui beberapa mekanisme. Nikotin mempengaruhi aliran darah dengan adanya vasokonstriksi sehingga menyebabkan supresi hemoragik serta mengganggu proses penyembuhan (Zhou, 2006).

2. Tar

Tar adalah substansi hidrokarbon yang bersifat lengket dan menempel pada paru, mengandung bahan-bahan karsinogen (Mardjun, 2012). PP Ri Nomor 109 Tahun 2012 Pasal I Nomor 5 menjelaskan bahwa tar adalah kondensat asap yang merupakan total residu dihasilkan saat rokok dibakar setelah dikurangkan nikotin dan air, yang bersifat karsinogenik. Tar merupakan senyawa yang berwarna coklat, lengket, dan dapat mengubah warna permukaan gigi menjadi kuning kecoklatan (Singh *et al*, 2013).

3. Karbon monoksida (CO)

Merupakan gas berbahaya yang terkandung dalam asap pembuangan kendaraan. CO menggantikan 15% oksigen yang seharusnya dibawa oleh sel darah merah. CO juga dapat merusak lapisan dalam pembuluh darah dan meninggikan endapan lemak pada dinding pembuluh darah, menyebabkan pembuluh darah tersumbat (Singh *et al*, 2013).

2.4.3 Dampak Rokok Bagi Kesehatan

Center of Disease Control (CDC) mengatakan merokok membahayakan setiap organ di dalam tubuh (Octafrida, 2011). Merokok menyebabkan penyakit dan memperburuk kesehatan seperti salah satunya terhadap gigi. Hubungan antara merokok dengan penurunan fungsi saliva yang berperan dalam proteksi gigi. Resiko terjadinya kehilangan gigi pada perokok, tiga kali lebih tinggi dibanding bukan perokok (Andina, 2012).

2.4.3.1 Dampak Rokok Terhadap Jaringan Periodontal Gigi

Perilaku merokok merupakan hal yang biasa bagi kebanyakan masyarakat. WHO memperkirakan terdapat 1,1 milyar perokok di dunia saat ini. Rongga mulut merupakan gerbang utama masuknya zat racun dari rokok sehingga akan menimbulkan dampak yang serius. Salah satu dampak merokok bagi rongga mulut adalah timbulnya penyakit periodontal. Berdasarkan Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) Departemen Kesehatan 2008, prevalensi penyakit periodontal mencapai 46% pada masyarakat di Indonesia. Data WHO juga menunjukkan bahwa penyakit periodontal telah menyebabkan 15-20% kehilangan gigi pada masyarakat. Kehilangan gigi dini akan berdampak kepada gangguan mastikasi, defisiensi nutrisi, penurunan kualitas hidup dan meningkatkan angka kematian dini (Surya dkk, 2015).

Prevalensi terjadinya periodontitis pada perokok meningkat sampai empat kali dibanding bukan perokok. Penyebabnya adalah ketidakseimbangan antara jumlah bakteri plak dengan respon imun perokok. Perokok mengalami akumulasi plak cenderung meningkat karena kandungan tar dalam rokok yang memudahkan perlekatan plak. Zat yang terkandung dalam rokok terutama nikotin akan mengganggu respon imun. Nikotin yang berada di dalam darah dapat mengakibatkan terjadinya penyempitan pembuluh darah pada jaringan periodonsium. Hal ini menyebabkan suatu penurunan oksigen di dalam jaringan dan menurunkan fungsi netrofil, Ig G, limfosit T dan limfosit B yang sangat berperan dalam menyerang bakteri plak, dengan demikian membentuk suatu lingkungan yang menguntungkan bagi pertumbuhan bakteri penyebab penyakit periodontal (Kasim, 2001).

Derajat keparahan penyakit periodontal berhubungan dengan jumlah konsumsi rokok perhari dan lamanya merokok. Kehilangan perlekatan gingiva meningkat 0,5% dengan merokok 1 batang perhari. Sedangkan merokok 10-20 batang perhari kehilangannya menjadi 5-10% (Surya, 2015).

Rokok menimbulkan efek immunosupresif pada sel inang, mempengaruhi interaksi antara sel inang dengan bakteri, dan menciptakan lingkungan yang kondusif bagi perkembangan bakteri patogen di dalam plak. Rokok mempengaruhi jaringan periodontal melalui jalur vaskularisasi dan respon imun tubuh (Sreedevi *et al*, 2011).

Tanda dan gejala inflamasi pada perokok lebih rendah dibandingkan dengan non-perokok karena rokok dapat menyebabkan vasokonstriksi pembuluh darah perifer pada jaringan gingiva, sehingga mampu menekan gejala inflamasi berupa perdarahan gingiva, kemerahan, dan eksudasi (Sreedevi *et al*, 2011).

Bukti nyata juga dapat dilihat dari hasil pengobatan pada perokok. Pada pasien perokok angka keberhasilannya hanya 50% sedangkan pada pasien bukan perokok 85%. Sejalan dengan ini banyak peneliti lain juga melaporkan bahwa pasien *refractory periodontitis* lebih banyak dijumpai pada perokok yaitu sekitar 86% - 90%. Setelah suatu kemajuan awal diperoleh pada terapi periodontal, pada perokok menunjukkan rekurensi periodontitis pada tingkat bermakna, misalnya adanya pendalaman *pocket periodontal*, hilangnya *gingival attachment*, dan perkembangan penyakit lebih buruk ke arah horizontal yaitu pada tempat furkasi akar. Pada *follow-up* selama 7 tahun, kondisi jaringan periodontal pasien bukan perokok tetap stabil dibanding pasien bukan perokok. Terdapat efek negative yang bersifat *dose dependent* artinya jumlah rokok yang dikonsumsi berpengaruh besar pada hilangnya/ tanggalnya gigi geligi. Hal ini dapat dilihat pada perokok berat (>20 batang rokok/hari) yang telah merokok lebih dari 10 tahun, ternyata pada masa program terapi periodontal tampak prevalensi *tooth loss* dan jumlah gigi yang hilang lebih tinggi. Selain itu prognosis gigi secara individual setelah dilakukan terapi periodontal juga sangat dipengaruhi oleh status perokok dan bukan perokok, ternyata setelah 5 tahun terapi periodontal suatu gigi pada perokok menunjukkan

prognosisnya bertambah buruk sebesar 2 kali disbanding bukan perokok (Kasim, 2001).

2.5 *Rattus Norvegicus*

Hewan coba adalah hewan yang sengaja dipelihara untuk digunakan sebagai hewan model guna mempelajari dan mengembangkan berbagai macam bidang ilmu dalam skala penelitian atau pengamatan laboratorik (Larasaty, 2013). Anggota *Rodentia* seperti tikus (*Rattus Norvegicus*) sering dijadikan sebagai hewan coba karena memiliki system fisiologi yang mirip dengan manusia (Smith and Mangkoewidjojo, 1998; Johnson, 2012). *R. norvegicus* memiliki beberapa sifat yang menguntungkan sebagai hewan coba penelitian di antaranya perkembangbiakan cepat, dan mudah dipelihara dalam jumlah yang banyak (Akbar, 2010).

Klasifikasi *R. norvegicus* yang digunakan dalam penelitian ini menurut Krinke pada tahun 2000 adalah sebagai berikut:

Kingdom: Animalia

Phylum: Chordata

Subphylum: Vertebrata

Class: Mammalia

Order: Rodentia

Family: Muridae

Genus: Rattus

Species: norvegicus



Gambar 2.6 *Rattus norvegicus*

Sumber: Koolhas J.M (2010)

R. norvegicus memiliki beberapa karakteristik yaitu berambut kasar dan agak panjang, hidung tumpul, badan besar, pendek, dan silindris agak membesar ke belakang, warna badan bagian atas coklat hitam kelabu sedangkan bagian bawah coklat kelabu, warna ekor bagian atas gelap sedangkan bagian bawah gelap agak pucat, berat badan 150-600 gram, panjang kepala dan badan masing-masing 150-200mm, panjang ekor 160-210mm, panjang dari ujung hidung sampai ujung ekor 310-460mm, lebar telinga 18-24mm, panjang telapak kaki belakang 40-47mm (Solichah, 2007).

Terdapat tiga galur tikus putih yang memiliki kekhususan untuk dimanfaatkan sebagai hewan percobaan antara lain *Wistar*, *Long Evans*, dan *Sprague Dawley* (Malole dan Pramono, 1989). Tikus *wistar* memiliki karakteristik mudah dikendalikan dan perilaku agresif pada *wistar* jantan cenderung berkembang dengan lambat. *Sprague Dawley* berasal dari perkawinan silang Antara Antara tikus *wistar* betina dengan tikus jantan yang tidak diketahui asalnya. Tikus jenis ini termasuk jinak dan mampu berkembang hingga ukuran yang cukup besar. *Long Evans* berasal dari perkawinan tikus *wistar* betina dengan tikus jantan liar. Kepala dan anggota gerakanya berwarna

hitam sedangkan tubuhnya berwarna putih, mudah dikendalikan namun cenderung menunjukkan perilaku yang agresif (Koolhas, 2010).

2.6 Identifikasi Bakteri Aa

2.6.1 Pewarnaan Gram

Melihat dan mengamati bakteri dalam keadaan hidup sangat sulit, karena selain bakteri itu tidak berwarna juga transparan dan sangat kecil. Untuk mengatasi hal tersebut maka dikembangkan suatu teknik pewarnaan sel bakteri ini merupakan salah satu cara yang paling utama dalam penelitian-penelitian mikrobiologi (Dwidjoseputro, 1998).

Prinsip pewarnaan gram adalah sebagai berikut:

1. Kristal violet mampu mewarnai semua bakteri menjadi ungu tua
2. Larutan iodine menahan zat warna violet menjadi lebih kuat atau lemah, tergantung pada jenis bakterinya.
3. Etanol 95% mampu memudarkan warna bakteri ketika Kristal violet tidak terikat kuat oleh larutan iodine dan sebaliknya, tidak berpengaruh pada warna bakteri ketika Kristal violet terikat kuat oleh larutan iodine.
4. Larutan fuksin karbol, merah netral, atau safranin (berwarna merah muda) mampu mewarnai ulang bakteri yang dilarutkan oleh etanol, dan tidak berpengaruh terhadap bakteri yang tetap berwarna ungu tua (Chairlan *and* Lestari, 2003).

Tujuannya adalah untuk membedakan antara bakteri gram positif dan gram negatif. Bakteri gram positif menghasilkan warna ungu kecoklatan, sedangkan bakteri gram negatif menghasilkan warna merah (Garrels *and* Oatis, 2011).

2.6.2 Tes Katalase

Tes katalase untuk mengetahui kemampuan produksi enzim katalase dari suatu bakteri, isolat bakteri dicampurkan dengan larutan H_2O_2 3% kemudian diamati ada atau tidaknya gelembung yang muncul pada preparat isolat. Bakteri yang positif menghasilkan

gelembung menandakan kemampuan bakteri untuk menghasilkan enzim katalase semakin tinggi (Acharya, 2013).

2.6.3 Tes Oksidase

Tes ini digunakan untuk mengidentifikasi bakteri yang memproduksi enzim *cytochrome, c-oxidase*, berupa reagen yang disebut dengan *tetramethyl-p-phenylenediamine* dan menghasilkan perubahan warna pada isolat bakteri menjadi ungu. Bakteri yang tidak mengandung enzim ini akan menghasilkan preparat tidak berwarna. (Acharya, 2013).

2.6.4 Uji Hemolisis

Hemolisis adalah proses rusaknya sel-sel darah merah, disebabkan oleh substansi yang disebut hemolisin. Ada 3 istilah yang mendeskripsikan mengenai reaksi hemolysis bakteri pada pengamatan dalam *blood agar plates* (BAP), yaitu:

1. *Beta-hemolysis* (β -*hemolysis*) yang menggambarkan lisis sel darah merah total yang mengelilingi koloni bakteri. *B-hemolysis* disebabkan oleh 2 hemolisin, O dan S.
2. *Alpha-hemolysis* (α -*hemolysis*) yang menggambarkan lisis sel darah merah sebagian disertai dengan penurunan kadar hemoglobin. α -*hemolysis* disebabkan oleh adanya hydrogen peroksida dari bakteri yang mampu mengoksidasi hemoglobin menjadi *methemoglobin*.
3. *Gamma-hemolysis* (γ -*hemolysis*) atau *non-hemolytic* yang menunjukkan bahwa koloni bakteri tidak mengarah pada *alpha* maupun *beta hemolysis* (Aryal, 2015).

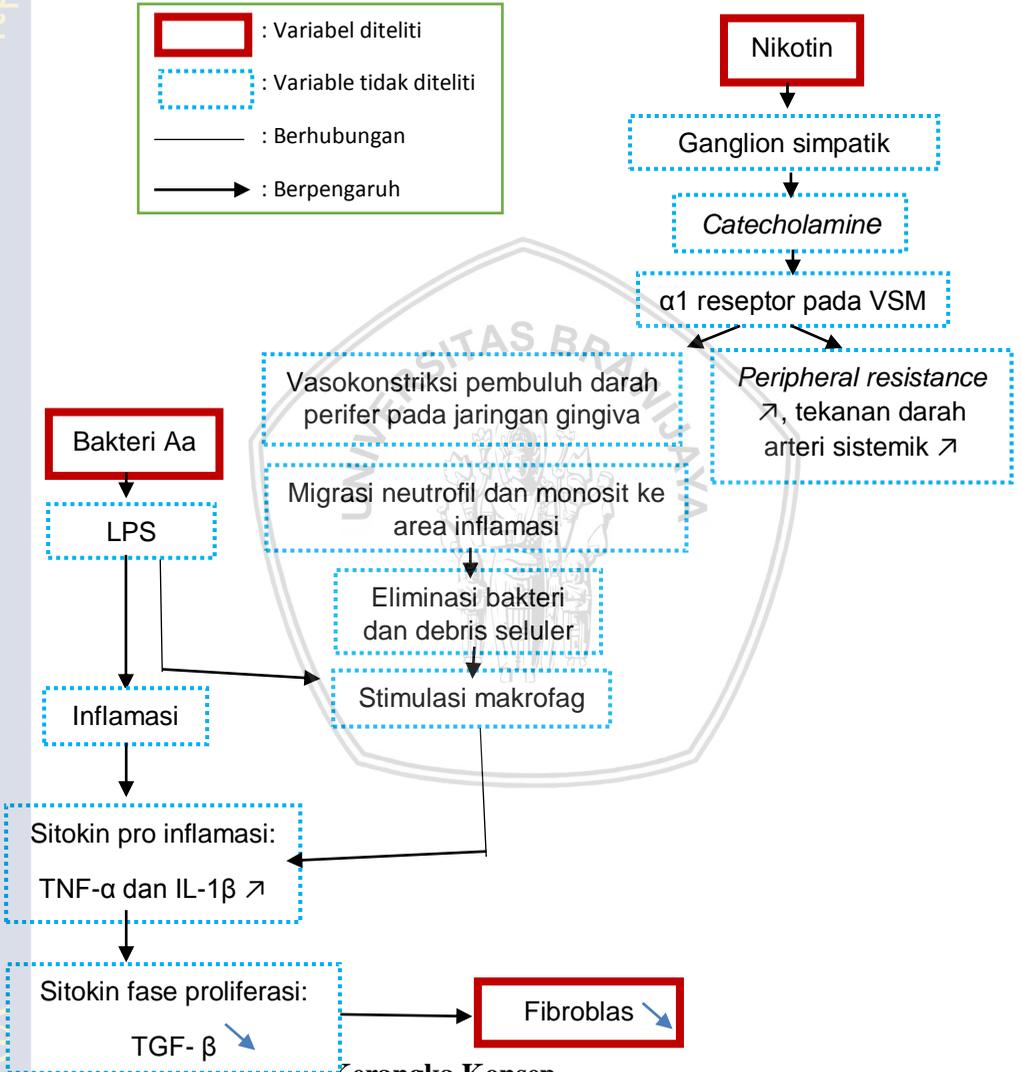
2.6.5 Uji Agar MacConkey

Metode ini digunakan untuk mengisolasi dan membedakan bakteri gram negatif dengan cara mengamati perubahan warna pada indikator pH hasil fermentasi laktosa bakteri. Fermentasi laktosa bakteri mampu menurunkan pH menjadi merah atau merah muda. Bakteri yang tidak memfermentasikan laktosa tumbuh dengan koloni tidak berwarna dan transparan (Batt *et al*, 2014).

BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



3.2 Penjelasan Kerangka Konsep

Aa merupakan bakteri patogen yang menjadi penyebab periodontitis agresif, suatu penyakit infeksi pada jaringan periodontal yang ditandai dengan adanya kerusakan masif pada ligamen



periodontal dan tulang alveolar. Bakteri Aa termasuk dalam golongan bakteri anaerob fakultatif, yang mampu memproduksi LPS. Produk bakteri tersebut mampu menginduksi pelepasan beberapa mediator proinflamasi oleh sel-sel makrofag, beberapa di antaranya adalah IL-1 β dan TNF- α . LPS bakteri Aa juga mampu menyebabkan adanya inflamasi. Periodontitis agresif tidak hanya disebabkan oleh akumulasi bakteri Aa pada area subgingiva. Faktor lokal dan sistemik di dalam tubuh sangat berpotensi untuk mempengaruhi perkembangan periodontitis agresif.

Merokok merupakan salah satu faktor risiko terjadinya penyakit periodontal, termasuk periodontitis agresif. Kandungan yang ada di dalam rokok dapat mempengaruhi respon tubuh dalam melawan suatu infeksi, baik melalui perubahan vaskularisasi maupun reaksi molekuler. Salah satu dari sekian banyak kandungan di dalam rokok yang dapat mempengaruhi jaringan periodontal adalah nikotin.

Jaringan periodontal yang terpapar oleh niktotin mampu mestimulasi ganglion simpatik untuk memproduksi *catecholamines*, suatu neurotransmitter yang dapat mempengaruhi $\alpha 1$ reseptor pada *vascular smooth muscles* (VSM). Aktivasi $\alpha 1$ reseptor menyebabkan vasokonstriksi pembuluh darah perifer di jaringan gingiva dan meningkatkan *peripheral resistance* (hambatan aliran darah dalam pembuluh) serta tekanan darah arteri sistemik. Terjadi respon seluler berupa stimulasi neutrofil dan monosit pada daerah inflamasi yang berfungsi untuk mengeliminasi bakteri serta debris seluler. Proses yang terjadi selanjutnya adalah stimulasi makrofag untuk memproduksi beberapa mediator pro-inflamasi di antaranya adalah IL-1 β dan TNF- α .

Jaringan periodontal yang terpapar nikotin terus-menerus dan infeksi makin parah membuat respon tubuh sitokin TGF- β yang harusnya meningkat tetapi pada fase ini TGF- β menurun sehingga menyebabkan menurunnya jumlah sel fibroblas. Sehingga perlekatan gigi dengan jaringan periodontal semakin hilang.

Penelitian ini dengan pemberian paparan asap rokok sebagai upaya penurunan jumlah sel fibroblas pada gingiva tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa).

3.3 Hipotesis Penelitian

Asap rokok dapat menurunkan jumlah sel fibroblas pada ligamen periodontal yang diinduksi oleh bakteri Aa.



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan eksperimental *post test only control group design* dengan menguji hubungan sebab-akibat.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*).

4.2.2 Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini memenuhi kriteria inklusi sebagai berikut:

1. Memiliki berat badan 150-200 gram.
 2. Usia 3-4 bulan.
 3. Aktif bergerak dan memiliki nafsu makan yang baik.
 4. Memiliki kondisi jaringan periodontal serta fisik yang sehat.
- Adapun kriteria eksklusi dari sampel yang akan digunakan dalam penelitian ini diantaranya adalah :
1. Tidak tampak gejala periodontitis agresif setelah tikus diinduksi bakteri Aa selama 21 hari.
 2. Terdapat kelainan lain di dalam rongga mulut.
 3. Terdapat kelainan sistemik lain di luar rongga mulut.

Estimasi besar sampel yang digunakan pada penelitian ini dihitung berdasarkan Rumus Frederer sebagai berikut:

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

$$(3-1) (n-1) \geq 15$$

$$2 (n-1) \geq 15$$

$$2n-2 \geq 15$$

$$2n \geq 17$$

$$n \geq 8,5 \text{ (dibulatkan menjadi 9)}$$

Keterangan:

t = perlakuan (3 jenis perlakuan pada tikus)

n = jumlah sampel

15 = nilai konstanta

Sampel dibagi menjadi 3 kelompok (1, 2 dan 3) dengan masing kelompok berjumlah 9 ekor tikus. Kelompok 1 merupakan kelompok kontrol yang tidak diinduksi bakteri Aa dan tidak diberikan paparan asap rokok. Kelompok 2 berisi sampel yang diinduksi bakteri Aa tanpa diberikan paparan asap rokok. Kelompok 3 berisi sampel yang diinduksi bakteri Aa dan diberikan paparan asap rokok selama 40 hari.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian adalah jumlah sel fibroblas pada ligamen periodontal.

4.3.2 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah lamanya pemaparan asap rokok pada tikus.

4.3.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol pada penelitian ini adalah induksi Aa.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di Institut Biosains Universitas Brawijaya, Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Penelitian berlangsung dari bulan November 2017 hingga Maret 2018.

4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

4.5.1 Identifikasi Bakteri Aa

1) Pewarnaan Gram

Bahan yang digunakan pada pewarnaan gram antara lain isolat bakteri Aa, bahan pewarnaan Gram (Kristal, violet, lugol, alcohol 96%, safranin), *nutrient broth*, ose, kapas, kertas penghisap, dan minyak emersi. Alat yang digunakan pada prosedur pewarnaan Gram Antara lain *anaerobic jar*, mikroskop, *object glass*, tabung reaksi, dan Bunsen brander (Chaskes *et al*, 2015).

2) Tes Katalase

Prosedur tes katalase bakteri menggunakan bahan berupa isolat bakteri Aa dan larutan H₂O₂ 3%, sedangkan alat yang digunakan adalah *object glass*, pipet, serta *anaerobic jar* (Reiner, 2013).

3) Tes Oksidase

Bahan yang digunakan pada prosedur tes oksidase Antara lain isolate bakteri Aa, kertas filter, dan reagen *tetrametil p-fenilendiamin dihidroklorida* 1% atau *Kovac* (Reynolds, 2012).

4) Uji Hemolisis

Aryal (2015) menyebutkan alat-alat yang digunakan untuk uji hemolisis antara lain incubator, sedangkan bahan yang digunakan adalah isolate bakteri Aa dan *blood agar plate* (BAP).

5) Uji Agar MacConkey

Alat yang digunakan pada prosedur ini adalah *anaerobic jar* dan incubator, sedangkan bahan yang dibutuhkan antara lain isolat bakteri Aa dan medium *MacConkey* agar (Batt *et al*, 2014).

4.5.2 Penentuan Kadar dan Densitas Bakteri Aa

Prosedur yang dilakukan sebelum menginduksi bakteri Aa pada tikus adalah penentuan kadar dan densitas isolate bakteri Aa dengan metode spektrofotometri ultraviolet-visibel (UV-Vis). Metode tersebut menggunakan alat berupa spektrofotometer, mikro

pipet, dan wadah sampel atau kuvet, sedangkan bahan yang diperlukan adalah isolate bakteri Aa (Belton, 2009).

4.5.3 Induksi Bakteri Aa pada Tikus

Prosedur induksi bakteri Aa pada tikus menggunakan alat spuit insulin ukuran 1cc pada sisi mesial insisif pertama rahang bawah tikus.

4.5.4 Pemaparan Asap Rokok pada Tikus

Prosedur pemaparan asap rokok pada tikus menggunakan bahan berupa rokok kretek dan alat yang disebut dengan *closed smoking device* (Kusumawardani *et al*, 2013).

4.5.5 Pengambilan Sel Fibroblas pada Tikus

Prosedur pengambilan sel fibroblas dilakukan dengan melakukan pemotongan mandibular arah sagittal pada interdental insisif rahang bawah dari hewan coba. Bahan yang digunakan adalah obat anestesi total yaitu ketamine 80 mg/KgBB dan alat yang digunakan adalah *syringe, knable tang, scalpel, blade scalpel, handscoon*, masker, pinset bedah.

4.5.6 Perhitungan Kadar Sel Fibroblas pada Tikus

Prosedur perhitungan kadar sel fibroblas pada hewan coba menggunakan alat diantaranya adalah preparat yang telah terdapat sayatan ligamen periodontal hewan coba dan mikroskop elektrik dengan perbesaran 400x dan Olympus DP12 *Digital Camera* untuk penghitungan sel fibroblas.

4.6 Definisi Istilah/Operasional

1. Nikotin merupakan kandungan kimia di dalam asap rokok yang didapatkan dari proses pembakaran batang rokok kretek pada pagi dan sore hari. Asap rokok kretek yang mengandung nikotin dipaparkan pada kelompok sampel 3 selama 40 hari melalui alat yang disebut dengan *closed smoking device*.

2. Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* merupakan bakteri patogen penyebab utama periodontitis agresif berupa isolat bakteri yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. Bakteri tersebut diidentifikasi terlebih dahulu sebelum dipaparkan pada kelompok sampel 2 dan 3.

4.7 Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data

4.7.1 Persiapan dan Perawatan Hewan Coba

Tikus putih ditimbang menggunakan neraca analitik. Hewan coba kemudian di aklimatisasi selama satu minggu. Tikus dipelihara dalam kandang yang terbuat dari bak plastik bersih berukuran 40x30x20 cm dengan tutup kandang dibuat dari anyaman kawat. Hewan coba dipelihara dengan suhu ruangan 18°C – 27°C , ventilasi kandang terjaga dengan baik. Satu kandang berisi 1 ekor tikus. Setiap hari dilakukan penggantian sekam, pemberian minum dengan air matang (15-30 ml/hari), dan pemberian makan dengan pellet (10%-15% dari berat badannya/hari).

4.7.2 Prosedur Identifikasi Bakteri Aa

1. Pewarnaan Gram

Chaskes *et al.* (2015) telah melakukan penelitian mengenai pewarnaan Gram dengan prosedur sebagai berikut

- 1) Membuat suspensi air suling dan koloni bakteri pada object glass dan dikeringkan di udara.
- 2) Fiksasi sediaan yang telah mengering di atas api bunsen brander.
- 3) Sediaan diberi larutan Kristal violet selama 1 menit, kemudian dibilas dengan air yang mengalir.
- 4) Sediaan diberi larutan lugol selama 1 menit, kemudian dibilas dengan air yang mengalir.
- 5) Sediaan diberi larutan safranin dan didiamkan selama 30 detik, kemudian dibilas dengan air yang mengalir.
- 6) Sediaan dikeringkan dengan kertas saring, ditetesi minyak emersi.

- 7) Mengamati sediaan di bawah mikroskop dengan pembesaran 100x.
- 8) Hasil pewarnaan Gram tidak menampakkan noda kristal violet (ungu tua), namun menampakkan warna merah pada preparat (Chairlan and Lestari, 2003). 45

2. Tes Katalase

Uji katalase berfungsi untuk mendeteksi kandungan enzim katalase yang ada dalam bakteri. Enzim katalase mampu menetralkan efek bakterisidal dari hidrogen peroksida (H_2O_2). Prosedur uji katalase pada bakteri adalah sebagai berikut:

- 1) Sediakan perbenihan bakteri pada object glass.
- 2) Tetesi sediaan dengan larutan H_2O_2 3%.
- 3) Amati gelembung-gelembung udara yang muncul pada object glass.
- 4) Hasil uji katalase pada bakteri Aa menunjukkan hasil positif (Reiner, 2013).

3. Tes Oksidase

Uji oksidasi berfungsi untuk mendeteksi kandungan enzim *cytochrome oxide* pada bakteri. Bakteri yang terbukti positif mengandung enzim tersebut, mampu mengoksidasi reagen sehingga menimbulkan adanya perubahan warna pada kertas reagen. Uji oksidase dilakukan dengan mengambil koloni bakteri dari media padat, kemudian digoreskan pada kertas saring yang telah diberi reagen oksidase berupa tetrametil p-fenilendiamin dihidroklorida 1%. Bakteri Aa menunjukkan hasil positif dengan adanya perubahan warna pada kertas reagen oksidase menjadi ungu dalam waktu kurang dari 10 detik (Reynolds, 2012).

4. Uji Hemolisis

Uji hemolisis dilakukan dengan metode streaking pada media blood agar plate (BAP). Bakteri yang telah di streaking pada media BAP diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C selama 18-24 jam. Bakteri Aa menunjukkan non-hemodialisis atau γ - hemolisis yaitu tidak tampak adanya perubahan warna pada BAP (Aryal, 2015).

5. Kultur pada Agar MacConkey

Inokulasi bakteri Aa dilakukan dengan metode streaking pada medium agar, kemudian diinkubasi selama 18-24 jam dengan suhu 37°C. Bakteri Aa menunjukkan hasil negatif (Batt *et al.*, 2014).

6. Perhitungan Koloni Bakteri Aa

Menggunakan alat *colony counter* lalu meletakkan plate berisi koloni bakteri pada meja yang telah dilengkapi skala dan kaca pembesar. Lalu dihitung menggunakan bolpoin dan ditekan.

7. Pemiakkan bakteri Aa

- Koloni bakteri Aa dikultur dengan medium BHIA
- Diambil 1-2 ose steril
- Dimasukkan ke dalam tabung berisi 5ml NB
- Homogenkan dengan vortex
- Inkubasi 48 jam pada suhu 37°C dalam suasana anaerob

4.7.3 Prosedur Induksi Bakteri Aa pada Tikus

Jumlah tikus yang akan diinduksi oleh bakteri Aa berjumlah 9 ekor (berasal dari kelompok sampel 2). Masing-masing tikus akan dipaparkan dengan isolat bakteri Aa yang sudah teridentifikasi dan dibiakkan sebelumnya. Alat yang digunakan adalah spuit insulin ukuran 1cc. Induksi bakteri Aa dilakukan pada sisi mesial insisif pertama rahang bawah tikus dengan cara ditetaskan perlahan ke dalam sulkus gingiva tikus.

4.7.4 Pengukuran Poket Gingiva Tikus

Dilakukan pada semua kelompok sebanyak 2 kali (setelah induksi bakteri Aa dan setelah pemaparan asap rokok dengan menggunakan probe periodontal dimasukkan sesuai sumbu gigi).

4.7.5 Swab Bakteri Aa pada Tikus

Mikroflora rongga mulut tikus diambil dengan cotton tip swab untuk memastikan bahwa bakteri Aa masih hidup didalam rongga mulut.

4.7.6 Prosedur Pemaparan Asap Rokok pada Tikus

Dasar penentuan durasi pemaparan asap rokok berasal dari penelitian sebelumnya yang telah dilakukan. Penelitian sebelumnya membuktikan bahwa pemaparan asap rokok pada pagi dan sore hari selama minimal 40 hari dapat mempengaruhi perubahan morfologis dari permukaan 1/3 posterior lidah tikus. Masing-masing tikus pada kelompok sampel 3 dipaparkan asap rokok kretek selama 5 menit. Sebelum melakukan pemaparan untuk kelompok tikus selanjutnya, closed smoking device dibersihkan dahulu dari sisa asap rokok perlakuan sebelumnya (Ridwan *et al*, 2016).

4.7.7 Prosedur Pengambilan Jaringan Penelitian

Prosedur pengambilan sel fibroblas pada gingiva adalah sebagai berikut:

- a. Hewan coba dieuthanasia dengan cara dibius dengan anestesi total ketamine (80 mg/kg BB)
- b. Pemotongan pada mandibular hewan coba menggunakan menggunakan *knable tang* dan *scalpel* pada bagian anterior rahang bawah.
- c. Setelah dilakukan perlakuan, tubuh hewan coba yang tersisa dibersihkan dan dilakukan aseptik dengan alcohol 70% dan dikubur dengan kedalaman 1 meter.
- d. Potongan mandibular kemudian dilakukan pengawetan menggunakan formalin 10% dan EDTA 10% untuk mendekalsifikasi tulang.

4.7.8 Pembuatan Preparat Jaringan Periodontal

- a. Jaringan yang sudah terambil dilakukan fiksasi menggunakan larutan Bufferd Neutral Formalin (BNF) 10% (Muntiha, 2001). Fiksasi jaringan dilakukan selama minimal 24 jam (Santoso, 2006)
- b. Dilakukan proses dekalsifikasi dengan tujuan menghilangkan sisa garam kalsium dan jaringan menjadi lebih lunak sehingga memudahkan proses pemotongan. Dekalsifikasi menggunakan EDTA 14% dilakukan perendaman selama 4 minggu dan larutan dekalsifikasi diganti apabila sudah mulai mengeruh (Santoso, 2006).

Setelah proses dekalsifikasi selesai jaringan dibersihkan dengan menggosokkan air mengalir (Muntaha, 2001).

c. Proses pembuatan preparat histologi dengan pewarnaan HE dilakukan dengan beberapa tahapan, antara lain :

a) Dehidrasi

Merupakan penarikan air dari dalam jaringan menggunakan alkohol konsentrasi rendah ke tinggi/bertingkat (Syafriadi, 2008). Tahapan dehidrasi dilakukan dengan memasukkan jaringan ke dalam alkohol 70% selama 2 jam, alkohol 80% selama 2 jam, alkohol 95% selama 2 jam.

b) Clearing

Clearing merupakan proses penjernihan jaringan menggunakan bahan clearing yaitu xylol (Syafriadi, 2008). Tahapan ini dilakukan dengan memasukkan jaringan ke dalam larutan xylol yang berisi dalam 3 wadah masing masing 1 jam, 1jam, dan 2 jam.

c) Impregnasi

Impregnasi adalah proses infiltrasi bahan embedding ke dalam jaringan (Syafriadi,2008). Dengan cara jaringan dibungkus dengan kertas saring yang sudah diberi label untuk menghindari kekeliruan identitas sampel. Kemudian dimasukkan ke dalam embedding yaitu paraffin solid 600 C selama 2 jam dan dilakukan pengulangan sebanyak.

d) Embedding

Embedding dilakukan dengan cara menyiapkan base mould dan kaset pada suhu 600 C, tekan kran paraffin dispenser pada base mould sampai volumenya cukup, masukkan specimen jaringan ke dasar base mould dengan menggunakan pinset, letakkan kaset diatas base mould yang sudah terisi specimen jaringan, letakkan base mould yang sudah terisi pada cold plate, tunggu 2-4 menit dan base mould akan berbunyi “klik” kemudian letakkan kaset dengan base mould dan blok paraffin siap untuk dilakukan penyayatan.

e) Penyayatan

Blok paraffin yang sudah mengandung specimen jaringan kemudian dipotong dengan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 5 μm . Potongan tersebut diletakkan dengan hati-hati di atas permukaan air dalam waterbath bersuhu 46⁰C, dalam tahap ini bentuk irisan dirapikan kemudian diletakkan di atas objek glass yang telah diolesi meyer egg albumin. Objek glass disusun di dalam rak dan dimasukkan ke dalam incubator bersuhu 60⁰C sampai siap untuk diwarnai.

f) Pengecatan Haematoksilin Eosin (HE)

Preparat yang akan diwarnai diletakkan pada arak dan dicelupkan ke dalam 2 wadah berisi xylol masing-masing selama 3 menit untuk menghilangkan paraffin dari jaringan (deparafinasi). Setelah itu preparat dimasukkan ke dalam alkohol absolute masing-masing selama 3 menit selama 2 kali berturut-turut, alkohol 90% selama 3 menit, alkohol 80% selama 3 menit, bilas dengan air mengalir selama 1 menit. Selanjutnya dimasukkan ke dalam larutan Haematoksilin selama 6-7 menit, bilas dengan air mengalir 1 menit, kemudian dimasukkan ke dalam larutan Eosin selama 1-5 menit, bilas dengan air mengalir 1 menit kemudian masukkan preparat ke dalam alkohol 80% sebanyak 10 celupan, alkohol 90% sebanyak 10 celupan, alkohol absolute 10 celupan ditambah 1 menit. Preparat jaringan kemudian dimasukkan ke dalam 3 wadah berisi xylol masing-masing selama 3 menit. Preparat diangkat dalam keadaan basah lalu ditetesi satu tetes entellan (Canada balsam), tahap terakhir ditutup dengan kaca penutup/deck glass.

4.7.9 Prosedur Pengamatan Jumlah Sel Fibroblas

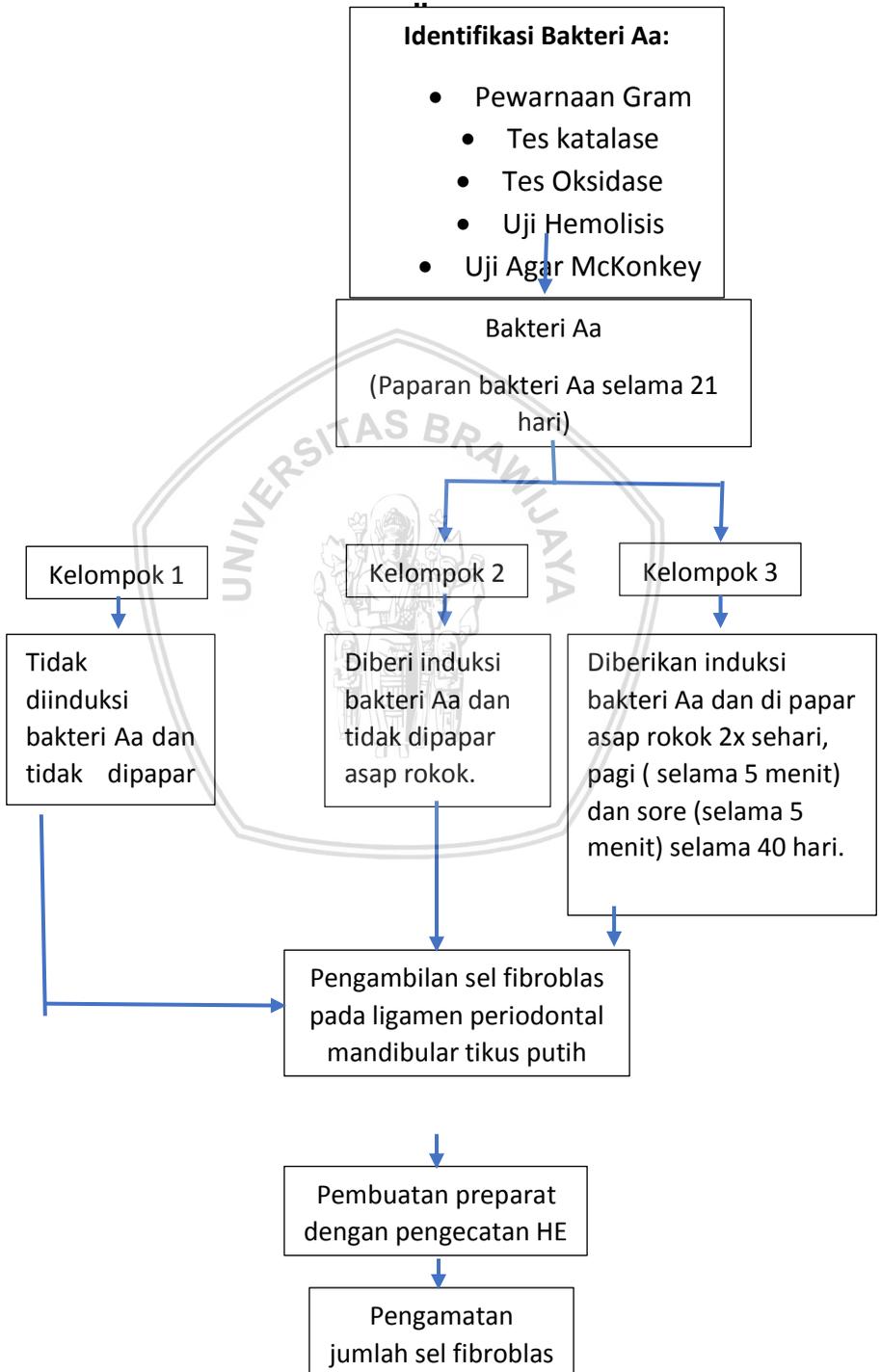
Pengamatan dilakukan dengan lima lapang pandang menggunakan mikroskop elektrik dengan pembesaran 400X dan Olympus DP12 *Digital Camera*. Banyaknya fibroblas dinilai dengan menghitung fibroblas yang aktif (memiliki sitoplasma yang besar, kromatin halus, nucleus ovoid dan tampak nyata). Lalu hitung jumlah fibroblas pada tiap lapang pandang, kemudian dijumlahkan dan diambil rata-ratanya.

4.8 Analisis Data

Data hasil percobaan hewan coba maupun perlakuan dianalisis secara statistic menggunakan program SPSS dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p=0,05$) dan taraf kepercayaan 0,95% ($\alpha=0,05$) Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah uji normalitas data, uji homogenitas varian, uji One-Way ANOVA, dan uji korelasi Pearson lalu hasil analisis data dibuat dalam bentuk tabel dan grafik.



4.9 Kerangka Konsep Penelitian





BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

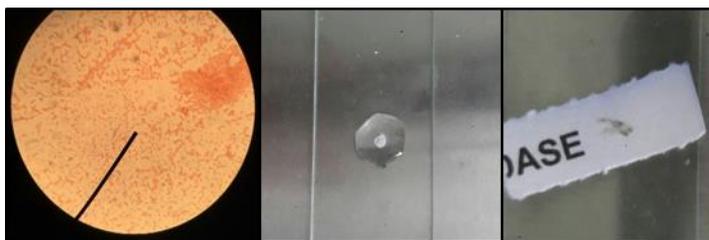
5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Hasil Uji Identifikasi Bakteri Aa

Prosedur pertama pada penelitian ini adalah identifikasi bakteri Aa yaitu pewarnaan gram, tes katalase, tes oksidase, uji hemolisis, dan uji agar Mac Konkey. Pengujian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pengujian ini dilakukan untuk memastikan bahwa bakteri tersebut benar bakteri Aa.

Pada uji identifikasi pewarnaan gram menunjukkan gambaran mikroskopik, koloni bakteri Aa berwarna merah (yang berarti bakteri Aa merupakan bakteri gram negatif) dengan bentuk kokobasilus. Pada uji katalase didapatkan hasil munculnya gelembung udara pada *object glass* setelah ditetaskan H₂O₂ 3% yang menandakan bakteri tersebut memiliki enzim katalase, dimana enzim tersebut berfungsi untuk menetralkan efek bakterisidal H₂O₂. Pada uji oksidase bakteri Aa mampu mengubah warna kertas reagen menjadi ungu dalam waktu kurang dari 10 detik. Pada uji hemolisis didapatkan hasil negatif, karena isolate bakteri Aa tidak menampakkan adanya perubahan warna dalam *blood agar plate* (BAP) setelah diinkubasi selama 18-24 jam. Pada uji agar MacKonkey juga menunjukkan hasil yang negative, yaitu isolate bakteri Aa tidak dapat tumbuh dalam medium agar setelah diinkubasi selama 18-24 jam. Hasil dari seluruh uji tersebut menyatakan bahwa bakteri tersebut merupakan bakteri Aa.

Uji identifikasi bakteri Aa ini juga dilakukan pada akhir induksi bakteri dan pada akhir penelitian dengan cara swab menggunakan papper point yang dioleskan pada sulkus gingiva gigi anterior rahang bawah bagian mesiolabial lalu ditanam pada media *blood agar plate* (BAP) yang kemudian akan diuji kembali seperti uji identifikasi bakteri diatas. Hal ini dilakukan untuk memastikan bahwa bakteri Aa tetap hidup pada sulkus gingiva hingga penelitian selesai.



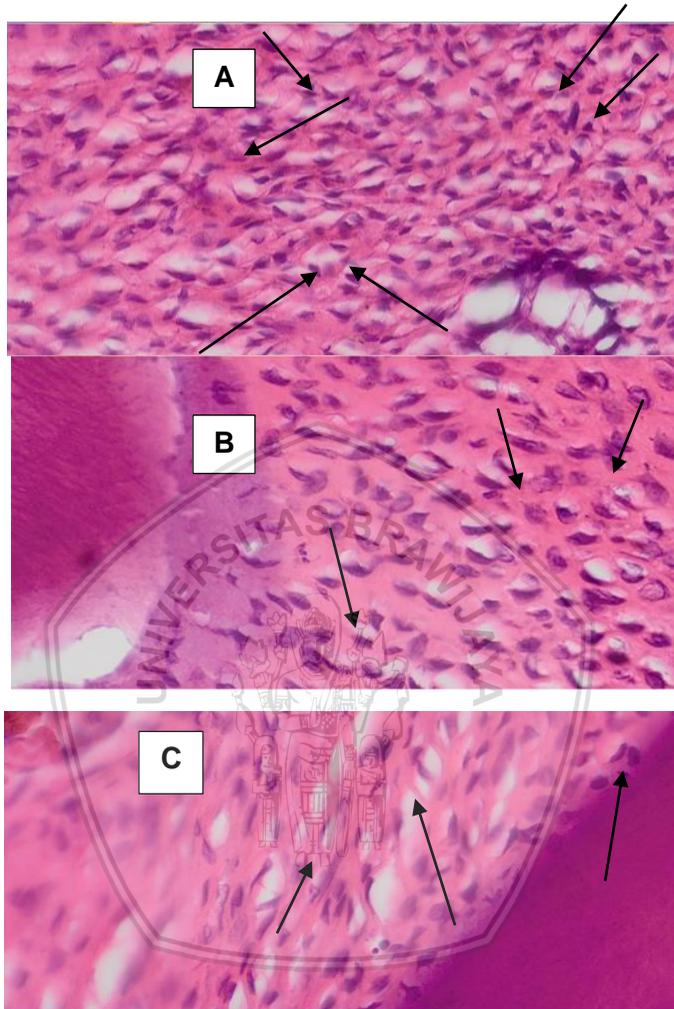
Gambar 5.1 (A) Hasil Uji Pewarnaan Gram menggunakan mikroskop elektrik Olympus CX10 dengan perbesaran 100x, (B) Hasil Uji Katalase, (C) Hasil Uji Oksidase.



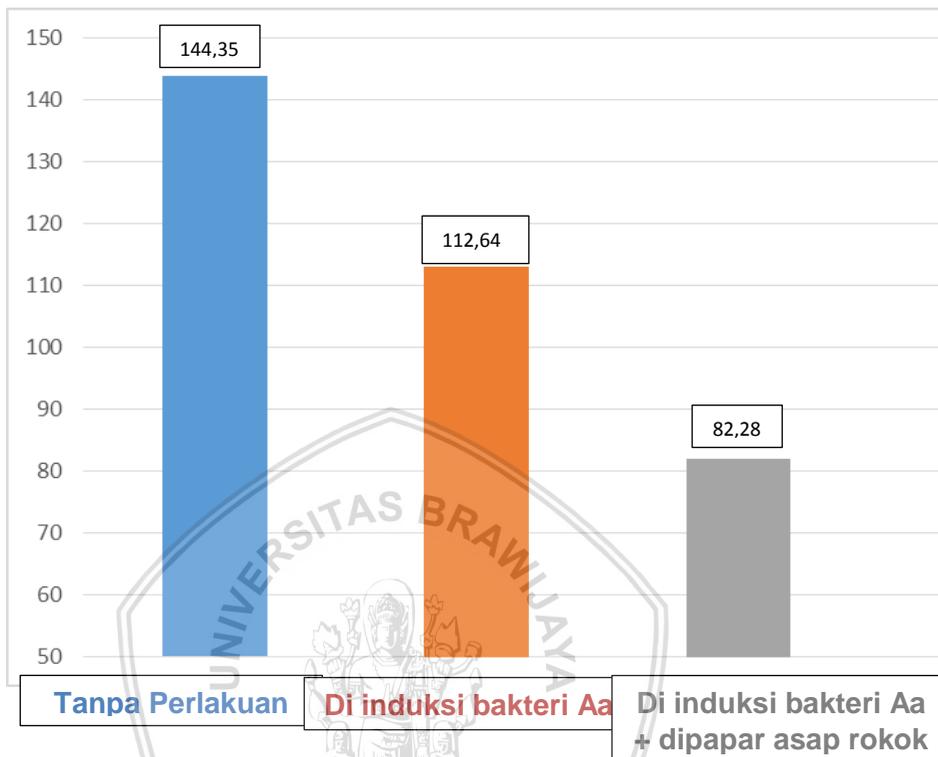
Gambar 5.2 Hasil Uji Hemolisis

5.1.2 Hasil Perhitungan Jumlah Sel Fibroblas

Analisis jumlah sel fibroblas dilakukan menggunakan mikroskop elektrik CX10 di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan perbesaran 400x pada lima lapang pandang. Sel fibroblas memiliki ciri berbentuk kumparan dengan nuklei oval dan prosesus sitoplasmik yang panjang. Biasanya sejajar dengan serabut kolagen, dengan prosesusnya terbungkus disekitar bundle serabut.



Gambar 5.3 Perbandingan histologis ligament periodontal tikus dengan pewarnaan Hematoksine-Eosin menggunakan mikroskop elektrik Olympus CX10 dengan perbesaran 400x: (A) Kelompok K- , (B) Kelompok K+ , (C) Kelompok Perlakuan.



Gambar 5.4 Diagram rata-rata jumlah sel fibroblas

5.2 Analisis Data

Data hasil penghitungan jumlah sel fibroblas dianalisis menggunakan metode *One Way Anova*. Data hasil penelitian sebelumnya diuji terlebih dahulu menggunakan uji normalitas data dan homogenitas ragam. Untuk uji normalitas data yang digunakan adalah uji *Shapiro-Wilk* karena sampel data kurang dari 50 dan uji homogenitas ragam yang digunakan adalah uji *Levene*, kedua uji ini menggunakan tingkat kesalahan (α) 0,05.

Pada uji *One Way Anova* hipotesis ditentukan dengan rumusan yaitu H_0 dan rumusan tersebut dapat diterima jika nilai signifikansi yang diperoleh $>0,05$ atau H_a , dan ditolak jika nilai signifikansi yang diperoleh $<0,05$ atau H_0 yang berarti memiliki perbedaan rata-rata antara jumlah osteoklas antar kelompok.

5.2.1 Uji Normalitas

Pengujian normalitas data menggunakan uji *one sample Shapiro-Wilk* karena jumlah data 27 ($n < 50$). Uji normalitas data dilakukan dengan tujuan untuk menguji apakah sebaran data yang ada dalam distribusi normal atau tidak dengan melihat besaran hasil signifikansi. Jika nilai signifikansi $> 0,05$ ($\alpha = 5\%$) maka distribusi data normal.

Tabel 5.1 Uji Normalitas Data

Jumlah Sampel	Nilai Signifikansi
27	0,174*

Hasil uji normalitas data menunjukkan bahwa nilai signifikansi rata-rata jumlah sel fibroblas pada kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, dan kelompok perlakuan memiliki nilai yang lebih besar dari 0,05, sehingga dapat disimpulkan data yang diperoleh berdistribusi normal.

5.2.2 Uji Homogenitas Ragam

Data hasil penelitian berdistribusi normal selanjutnya dilakukan pengujian homogenitas ragam menggunakan uji *Levene*. Uji homogenitas ragam dikatakan terpenuhi jika nilai signifikansi hasil perhitungan lebih besar daripada 0,05 ($p > 0,05$).

Tabel 5.2 Uji Homogenitas Ragam

Nilai statistik	Nilai Signifikansi
3,247	0,057*

Hasil uji homogenitas menunjukkan bahwa nilai probabilitas pada perhitungan rerata jumlah fibroblas adalah 0,057 ($p > 0,05$), sehingga uji Anova valid untuk menguji hubungan ini.

5.2.3 Uji *One way Anova*

Uji Anova (F) dilakukan dengan tujuan mengevaluasi perbedaan nilai jumlah sel fibroblas masing-masing kelompok. Uji ini harus berdistribusi normal, ragam yang homogen, dan diambil dari sampe acak.

Tabel 5.3 Uji One Way Anova

Nilai Uji Anova (F)	Nilai Signifikansi
233,735	0,000*

Berdasarkan tabel di atas, didapatkan nilai signifikansi 0,000 lebih kecil dari 0,05, maka disimpulkan bahwa paparan asap rokok dapat menurunkan jumlah sel fibroblas pada ligamen periodontal tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi bakteri Aa.

5.2.4 Uji Post Hoc Multiple Comparison

Pengujian selanjutnya untuk melihat kelompok mana yang paling berbeda di antara ketiga kelompok tersebut, digunakan uji *Turkey HSD* pada menu *Post-Hoc Test*. Pada uji ini, suatu data dikatakan berbeda secara bermakna apabila nilai signifikansi $p < 0,05$.

Tabel 5.4 Uji *Post Hoc Multiple Comparison*

(I)Kelompok Kelompok	(J)	Rerata Perbedaan (I-J)	Nilai Signifikansi
1	2	31,71111*	0,000
	3	62,06667*	0,000
2	1	-31,71111*	0,000
	3	30,35556*	0,000
3	1	-62,06667*	0,000
	2	-30,35556*	0,000

Hasil uji *Turkey HSD* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok K(-) dengan P2 dan kelompok P1 dengan kelompok P2. Perbedaan yang tidak signifikan ditunjukkan oleh kelompok K(-) dengan kelompok P1, karena nilai $p > 0,05$. Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa paparan asap rokok dapat menurunkan jumlah sel fibroblas pada ligament periodontal tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi bakteri Aa.

5.2.5 Uji Korelasi *Pearson*

Tabel 5.5 Uji Korelasi *Pearson*

		Kelompok	Sel Fibroblas
Kelompok	Pearson Correlation	1	-0,975**
	Sig. (2-tailed)		0.000
	N	27	27
Sel Fibroblas	Pearson Correlation	-0,975**	1
	Sig. (2-tailed)	0.000	
	N	27	27

Uji korelasi *pearson* digunakan karena pada data penelitian ini memiliki distribusi yang normal, jika tidak memiliki distribusi normal dapat menggunakan uji *Spearman*. Dari hasil menandakan bahwa terdapat hubungan yang kuat antara kelompok sampel dengan jumlah sel fibroblas. Nilai signifikansi yang sama dengan $0,00 < 0,05$ menandakan bahwa terdapat hubungan yang signifikan. Tanda negatif juga menandakan bahwa korelasi yang terjadi adalah hubungan yang berbanding lurus, yaitu ketika semakin lama kelompok sampel dipaparkan asap rokok maka semakin sedikit jumlah sel fibroblas.

BAB VI

PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Institut Biosains Universitas Brawijaya dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan November 2017 hingga April 2018 bertujuan untuk mengetahui efek paparan asap rokok terhadap jumlah sel fibroblas pada ligamen periodontal tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi bakteri *Aa*.

Penelitian ini dilakukan dengan membagi hewan coba menjadi 3 kelompok. Kelompok pertama adalah kelompok kontrol yang tidak di induksi bakteri *Aa* dan tidak dipapar asap rokok, kelompok kedua adalah kelompok hewan coba yang diberikan perlakuan induksi bakteri *Aa* selama 21 hari berturut-turut, dan kelompok ketiga adalah kelompok hewan coba yang diberikan perlakuan induksi bakteri *Aa* selama 21 hari dan dilanjutkan dengan paparan asap rokok selama 40 hari.

Pada penelitian diinduksikan bakteri *Aa* pada sulkus gingiva antara gigi insisif rahang bawah pada kelompok kontrol positif selama 21 hari. Hal ini berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Jia R *et al*, 2015 sebelumnya, bahwa induksi bakteri *Aa* selama 21 hari berturut-turut dapat menyebabkan adanya kerusakan tulang alveolar yang dibuktikan secara gambaran klinis dengan adanya oedema dan kemerahan pada gingiva tikus serta gambaran radiografi yang ditunjukkan dengan penurunan densitas tulang alveolar. Terjadinya penurunan tulang alveolar pada penelitian ini dibuktikan dengan WHO *dental probe* untuk mengukur kedalaman poket gingiva hewan coba. WHO *Dental probe* digunakan karena memiliki tekstur yang rigid, dapat masuk ke dalam sulkus gingiva dan telah memiliki indikator pengukuran.

Rokok yang digunakan untuk memapar tikus adalah jenis rokok kretek dikarenakan rokok kretek memiliki kandungan nikotin yang lebih banyak dan tidak memiliki filter sehingga asap yang dihasilkan juga lebih banyak dibandingkan dengan rokok filter (Alamsyah,2009). Asap rokok dipaparkan menggunakan bantuan *syringe* 5cc yang dimasukkan ke dalam *closed smoking device*. Dan

dipaparkan ke kelompok perlakuan selama 40 hari berturut-turut dan dilakukan dalam durasi 5 menit 2 kali sehari.

Hasil penelitian berdasarkan uji oneway ANOVA menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan. Hal tersebut menunjukkan bahwa terjadi penurunan jumlah sel fibroblas pada ligamen periodontal tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi bakteri Aa selama 21 hari dan dipaparkan asap rokok selama 40 hari. Hal ini sesuai dengan penelitian Sumerti, 2016 sebelumnya, bahwa merokok dapat menunda penyembuhan jaringan rongga mulut karena rokok menyebabkan terjadinya penyempitan pembuluh darah (*vasokonstriksi*) dan sekresi kelenjar liur. Jika pembuluh darah menyempit maka *supply* oksigen dan nutrisi ke jaringan menjadi terhambat, termasuk penyembuhan luka. Penyempitan pembuluh darah juga menyebabkan rusaknya sistem imun seperti menurunnya fungsi netrofil, Ig G, limfosit T dan limfosit B yang sangat berperan dalam menyerang bakteri plak sehingga membentuk lingkungan yang menguntungkan bagi pertumbuhan bakteri penyebab penyakit periodontal. Asap rokok juga menurunkan kadar vitamin C. Vitamin C sangat penting dalam sintesis kolagen, tanpa adanya vitamin C maka kolagen muda yang diekskresikan ke daerah luka oleh fibroblas berjumlah sedikit.

Walaupun bakteri merupakan etiologi utama terjadinya penyakit periodontal, respon imun pasien merupakan salah satu faktor risiko yang mempengaruhi tingkat keparahan penyakit tersebut. Beberapa studi *in vitro* telah menjelaskan terkait mekanisme gangguan metabolisme tulang akibat merokok. Nikotin mampu meningkatkan sekresi IL-6 dan TNF- α pada osteoblas, produksi dari PG-E₂ serta MMP, sehingga mengganggu keseimbangan antara resorpsi dan pembentukan matriks tulang (Rosa *et al*, 2008).

Penelitian Kubota *et al*. pada tahun 2016 menjelaskan bahwa nikotin mampu mempercepat efek kehilangan tulang alveolar pada tikus yang diinduksi periodontitis dibandingkan dengan tikus yang memiliki jaringan periodontal sehat. Nikotin mampu meningkatkan kerentanan terhadap kerusakan jaringan periodontal dengan cara menghambat respon imun tubuh melalui reseptor *nicotinic acetylcholine* (Breivik *et al*, 2009).

Hasil uji Post Hoc juga menunjukkan terjadinya penurunan jumlah sel fibroblas yang signifikan antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol negatif. Kelompok perlakuan merupakan kelompok tikus yang diinduksi bakteri Aa selama 21 hari dan diberikan paparan asap rokok selama 40 hari. Hal ini disebabkan karena dua hal, yaitu faktor bakteri Aa yang dapat menurunkan jumlah sel fibroblas dan faktor nikotin yang terkandung di dalam asap rokok yang dipaparkan ke hewan coba. Nikotin merupakan salah satu kandungan berbahaya dalam asap rokok. Zat ini memiliki sifat toksik dan dapat berperan dalam menghambat perlekatan dan pertumbuhan sel fibroblas pada jaringan periodontal, menurunkan isi protein fibroblas, dan dapat merusak sel membran (Zhou, 2006). Nikotin yang menumpuk dalam jumlah besar akan berdampak besar pula pada organ tubuh termasuk jaringan periodontal. Nikotin akan menghasilkan zat metabolit berupa kotinin yang merupakan penghancur dari jaringan periodontal. Rerata kandungan nikotin dalam 1 batang rokok adalah 1-3 mg. Semakin banyak jumlah batang rokok yang dihisap, akumulasi nikotin akan semakin banyak sehingga akan menimbulkan efek yang signifikan terhadap terbentuknya poket dan hilangnya perlekatan (Surya, 2015). Nikotin juga mempengaruhi produksi sitokin jaringan dan mengganggu respon inflamasi dari sel inang dengan meningkatkan *Interleukin -6* (IL-6), *Interleukin-8* (IL-8), dan TNF- α , serta menurunkan *Interleukin-4* (IL-4) dan IL-1 α . Nikotin juga memiliki efek resorpsi tulang dengan meningkatkan *prostaglandin-E₂* (PG-E₂) dan IL-1 β (Zhou, 2006).

Pada uji korelasi Pearson didapatkan angka signifikansi yaitu -0,975. Hasil tersebut merupakan hasil yang kuat karena memiliki hasil yang telah mendekati angka 1. Serta dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa arah korelasi negatif yang menandakan bahwa semakin lama induksi bakteri dan paparan asap rokok dilakukan maka jumlah sel fibroblas juga akan semakin menurun.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemaparan asap rokok mampu menurunkan jumlah sel fibroblas pada ligamen periodontal tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi oleh bakteri *Agregatibacter actinomycetemcomitans* secara signifikan. Hal tersebut dapat dilihat dari hasil penghitungan manual dan hasil statistik jumlah sel fibroblas.



BAB VII

PENUTUPAN

7.1 KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan mengenai pengaruh paparan asap rokok terhadap jumlah sel fibroblas pada ligamen periodontal tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Paparan asap rokok mampu menurunkan jumlah sel fibroblas pada ligamen periodontal tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi bakteri Aa.
2. Rerata jumlah sel fibroblas ligamen periodontal pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi bakteri Aa tanpa paparan asap rokok adalah 112,64 sel per 5 lapang pandang.
3. Rerata jumlah sel fibroblas ligamen periodontal pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi bakteri Aa dan diberi paparan asap rokok adalah 82,28 sel per 5 lapang pandang.
4. Jumlah sel fibroblas ligamen periodontal pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi bakteri Aa tanpa paparan asap rokok lebih tinggi dibandingkan dengan yang diberi paparan asap rokok.

7.2 SARAN

1. Perlu penelitian lebih lanjut mengenai efek paparan asap rokok terhadap jaringan lain pada rongga mulut tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi bakteri Aa.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek paparan asap rokok terhadap jumlah sel fibroblas ligamen periodontal pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan durasi pemaparan asap rokok yang lebih lama dan jumlah batang rokok yang lebih banyak.

DAFTAR PUSTAKA

- Acharya T. 2013. *Catalase Test: Principle, Uses, Procedure, and Result*. Accessed from <https://microbeonline.com/catalase-test-principle-uses-procedure-results/>. Diakses pada 15 Agustus 2017.
- Acharya T. 2013. *Oxidase Test: Principle Procedure and Oxidase Positive Organism*. Accessed from <http://microbeonline.com/oxidase-test-principle-procedure-and-oxidase-positive-organisms/>. Diakses pada 15 Agustus 2017.
- Akbar, Budhi. 2010. Tumbuhan dengan Kandungan Senyawa Aktif yang Berpotensi sebagai Senyawa Infertilitas. Jakarta: Adabia Press.
- Alamsyah, R. 2009. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Kebiasaan Merokok dan Hubungannya dengan Status Penyakit Periodontal Remaja di Kota Medan Tahun 2007. (*Thesis*). Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Andina. 2011. Pengaruh Merokok terhadap Kesehatan Gigi dan Rongga Mulut. Accessed from <http://jurnal.unissula.ac.id/index.php/majalah%20ilmiah/sultanag/article/viewFile/39/33>. Diakses pada 16 Agustus 2017.
- Ardan. 2011. Ligamen Periodontal sebagai Pendukung Gaya Kunyah. Accessed from <https://jdmfs.org/index.php/jdmfs/article/viewFile/254/254>. Diakses pada 16 Agustus 2017.
- Aryal S. 2015. *Blood Agar-Composition, Preparation, Uses and Pictures*. Accessed from <http://www.microbiologyinfo.com/blood-agar-composition-preparation-uses-and-pictures/>. Diakses pada 08 Agustus 2017.
- Aryal S. 2015. *Haemolysis of Streptococci and Its Types with Examples*. Accessed from <http://www.microbiologyinfo.com/haemolysis-of-streptococci-and-its-types-with-examples/>. Diakses pada 15 Agustus 2017.
- Batt C. 2014. *Encyclopedia of Food Microbiology 2nd Edition*. USA: CRC Press Taylor and Francis Group.

- Belton C. 2009. *UV-VIS Spectrophotometer*. London: Imperial College.
- Benowitz N.L., Jacob P., Jones R.T., Rosenberg J. 1982. Interindividual Variability in the Metabolism and Cardiovascular Effects of Nicotine in Man. *Journal of Pharmacol Exp Ther*, Vol. 221: 368-372.
- Berkovitz, B.K.B., Holland, G.R., Moxham, B.J. 2009. *Oral Anatomy, Histology, and Embriology*. Missouri: Mosby Elsevier. 4th ed. Pp. 189-191
- Breivik T., Gundersen Y., Gjermo P., Von H.S, and Opstad P.K. 2009. Nicotinic Acetylcholine Receptor Activation Mediates Nicotine-Induced Enhancement of Experimental Periodontitis. *J Periodontal Res*, Vol. 44(3): 297–304.zccccc
- Cairlan M. and Lestari E. 2003. Pedoman Teknik Dasar Untuk Laboratorium Kesehatan. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Chaskes S., Austin R. 2015. *Practical Handbook of Microbiology 3rd Edition*. USA: CRC Press Taylor and Francis Group.
- Dorland W.A.N. 2012. Kamus Saku Kedokteran Dorland Edisi 28. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Dwidjoseputro, D. 1998. Dasar – Dasar Mikrobiologi. Malang : Djambatan.
- Fitri, A.N.I. 2014. Persiapan Jaringan Periodontal untuk Perawatan Gigi Tiruan Sebagian dan Gigi Tiruan Penuh. Skripsi. tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Gigi Fakultas Hasanuddin, Makassar.
- Fotek, P. 2012. *Periodontitis : a review*. Med Line Lib. National Library of Medicine. USA
- Garrels M. and Oatis C.S. 2011. *Laboratory Testing for Ambulatory Settings: A Guidance for Health Care Professionals*. China: Elsevier.

- Goncalves PF *et al.* 2004. *Dental Cementum Reviewed : Development, Structure, Composition, Regeneration and Potential Functions*. Braz J Oral Sci. 4(12):651-654.
- Hafadah and Robert. 2008. Periodontitis Agresif; Karakteristik dan perawatannya. Accessed from staff.ui.ac.id. Diakses pada 6 Agustus 2017.
- Herijulianti. 2009. Ilmu Pencegahan Penyakit Jaringan Keras dan Jaringan Pendukung Gigi. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC
- Heryani, R. 2014. Kumpulan Undang – Undang dan Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Khusus Kesehatan. Jakarta : CV. Trans Info Media.
- Hewitt C.D., Innes D.J., Savory J., Willis M.R. 1989. Normal Biochemical and Hematological Values in New Zealand White Rabbits. *Clinical Chemistry*, Vol. 35(8): 1777-1779.
- Jia R, *et al.* 2015. Aggregatibacter actinomycetemcomitans Induces Th17 Cells In Atherosclerotic Lesions. *FEMS Patogens and Diseases Journals*, Vol. 73.
- Kasim, Eddy. 2001. Merokok sebagai Faktor Resiko Terjadinya Penyakit Periodontal. Accessed from http://www.univmed.org/wp-content/uploads/2011/02/Vol.20_no.1_2.pdf . Diakses pada 7 Agustus 2017.
- Koolhaas, J.M. 2010. *The Laboratory Rat - The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals, Eighth Edition*. Netherlands: University of Groningen.
- Kusumawardani A., Sarwendah K., Rahmad L., dkk. 2013. Sitotoksik Asap Rokok pada Kornea Tikus Putih Wistar yang Diberi (*Curcuma Domestica Val.*). *Jurnal Sain Veteriner*, Vol. 31(1): 89-99.
- Larasaty, Widya. 2013. Uji Antifertiltas Ekstrak Etil Asetat Biji Jarak Pagar (*Jatropha Curcas L.*) pada Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*) Galur Sprague Dawley secara *In Vivo*. Skripsi. Tidak diterbitkan, Program Studi Farmasi Fakultas

Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah, Jakarta.

- Mahfoed dan Zein. 2005. *Menjaga Kesehatan Gigi dan Mulut Anak-anak dan Ibu Hamil*. Yogyakarta:Tramaya
- Malole, M. B. M. and C. S. Pramono. 1989. *Penggunaan Hewan-hewan Percobaan Laboratorium*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Manson J.D., Eley B.M. 2004. *Periodontics*, Fifth Edition, Edinburgh London New York etc: Wright
- McGuire *et al.* 1989. *Comprehensive Community Health Nursing: Family, Aggregate & Community Practice*. St. Louis Missouri. Mosby Inc.
- Mortazavi H. and Baharvand M. 2016. Review of Common Condition of Assosiated with Periodontal Ligament Widening. *Imanging Science In Dentistry*, Vol. 46: 229-237.
- Muhibah, F.A.B. 2011. *Tingkat Pengetahuan Pelajar Sekolah Menengah Sains Hulu Selangor Mengenai Efek Rokok Terhadap Kesehatan. (KTI)*. Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Muntiha, M. 2001. *Teknik Pembuatan Histopatologi dari Jaringan Hewan dengan Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin (HE)*. *Temu Teknik Fungsional Non Peneliti*.
- Newman M.G., Takei H., Klokkevold P.R., Carranza, F.A., 2015. *Carranza's Clinical Periodontology 12th Edition*. Elsevier Saunders, Singapore.
- Notohartojo I.T. and Sihombing M. 2015. Faktor Risiko pada Penyakit Jaringan Periodontal Gigi di Indonesia (Risesda 2013). *Buletin Penelitian Sitem Kesehatan*, Vol. 18(1): 87-94.
- Pradnyani, Sri. 2017. *Tetrasiklin HCL gel 0,7% Meningkatkan Jumlah Sel Fibroblas dan Mempertebal Ligamen Periodontal pada Sulkus Gingiva Tikus yang Mengalami Periodontitis*. Accessed From

<https://isainsmedis.id/index.php/ism/article/viewFile/3/123>.
Diakses pada 16 Februari 2018.

- Raja M., Ummer F., Dhivakar C.P. 2014. Aggregatibacter actinomycetemcomitans-A Tooth Killer?. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, Vol. 8(8): 13-14.
- Reiner K. 2013. *Catalase Test Protocol*. Accessed From <http://www.microbelibrary.org/library/laboratory+test/3226-catalase-test-protocol>. Diakses pada 14 April 2017.
- Reynolds J. 2012. *Oxidase Test*. Richland College; Biol 2421.
- Ridwan *et al.* 2016. Hubungan Tingkat Adiksi Merokok dengan Derajat Keparahan Aterosklerosis pada Pasien Penyakit Jantung Koroner. Accessed from <https://media.neliti.com/media/publications/107043-ID-hubungan-tingkat-adiksi-merokok-dengan-d.pdf>. Diakses tanggal 20 Agustus 2018.
- Ridwan, R.D. 2012. The Role of Actinobacillus actinomycetemcomitans Fimbrial Adhesin on MMP-8 Activity in Aggressive Periodontitis Pathogenesis. *Dental Journal*, Vol. 45(4): 182.
- Rosa M.R., Luca G.Q., and Lucas O.N. 2008. Cigarette Smoking and Alveolar Bone In Young Adults: A Study Using Digitized Radiographic. *Journal Periodontal*, Vol. 79: 232-244.
- Roshna T. and Nandakumar K. 2011. Generalized Aggressive Periodontitis and Its Treatment Options: Case Reports and Review of the Literature. *Case Reports in Medicine*.
- Santoso, H.B. 2006. Struktur Mikroskopis Kartilago Epifisialis Tibia Fetus Mencit (*Mus musculus L.*) dari Induk dengan Perlakuan Kafein. *Bek. Penel. Hayati*, 12: 69-74.
- Singh G.H., Amit B., Yaswin S. 2013. Smoking and Periodontal Disease. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*, Vol. 2(2): 7-11.
- Smith J.B. and Mangkoewidjojo S. 1988. Tikus Laboratorium (*Rattus norvegicus*). Dalam: Pemeliharaan, Pembiakan, dan

- Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia (UI-Press).
- Solichah, Zumrotus. 2007. Mengenal Jenis Tikus. *BALABA*, Edisi 005(2): 18-19.
- Sreedevi M., Ramesh A., Dwarakanath C. 2011. Periodontal Status in Smokers and Nonsmokers: A Clinical, Microbiological, and Histopathological Study. *International Journal of Dentistry*.
- Sriraman P., Mohanraj R., Neelakantan P. 2014. Aggregatibacter actinomycetemcomitans In Periodontal Disease. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, Vol. 5(2): 407-412.
- Sumerti. 2016. Merokok dan Efeknya terhadap Kesehatan Gigi dan Rongga Mulut. Accessed From digilib.unila.ac.id. Diakses tanggal 20 Agustus 2018.
- Surya. 2015. Hubungan Kebiasaan Merokok dengan Status Kesehatan Jaringan Peridental. Accessed from <https://jurnal.unej.ac.id/index.php/STOMA/article/download/3171/2531>. Diakses tanggal 20 Agustus 2018.
- Syafriadi, M. 2008. Petunjuk Praktikum Patologi Anatomi, Degenerasi dan Radang. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Tawbariah *et al.* 2014. Hubungan Konsumsi Rokok dengan Perubahan Tekanan Darah pada Masyarakat di Pulau Pasaran Kelurahan Kota Karang Kecamatan Teluk Betung Timur Bandar Lampung. *Medical Journal of Lampung University*, 3(6):291-293.
- WHO. Oral Health. World Health Organization. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/en/>. Diakses tanggal 20 Juli 2017.
- Widodo *et al.* 2007. *Effect of Clove Cigarette Exposure on White Rat : Special Emphasis on The Histopathology of Respiratory Tract. Respiratory Tract Changes Due to Clove Cigarette*. Vol 16, No 4, October-December 2007.

- Wiebe C.B. and Putnins E.E. 2000. The Periodontal Disease Classification System of the American Academy of Periodontology –An Update. *J Can Dent Assoc* 2000, Vol. 66(11): 594-597.
- Wijaksana. 2016. *Infectobesity* dan Periondontitis: Hubungan Dua Arah Obesitas dan Penyakit Periodontal. Accessed from jurnal.unissula.ac.id/index.php/odj/article/view/773. Diakses tanggal 16 Agustus 2017.
- Witari *et al.* 2016. Penentuan Isolat Bakteri Asidogenik yang Mampu Menghasilkan Total Asam Tertinggi dari Limbah Cair Tahu. Accessed from industria.ub.ac.id/index.php/industry/article/download/189/256. Diakses tanggal 12 Februari 2018.
- Yulianti K ., Yuniarti S ., Mora O. Efek Klinis Setelah Scalling dan Penghalusan Akar Kasus Periodontitis Kronis Poket 4-6 mm. Accessed From jurnal.usu.ac.id. Diakses tanggal 16 Februari 2018.
- Yulvizar C. 2013. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Probiotik pada *Rastrelliger sp.* *Biospecies*, Vol. 6(2): 1-7.
- Zhou J. 2006. *Posphyromonas Gingivalis* Affects Host Collagen Degradation by Affecting Expression, Activation, and Inhibition of Matrix Metelalloproteinases. *Journal of Periodontal Research*, Vol. 41(1): 47-54.