

**PENGARUH VAKSIN DARI IMMUNOGLOBULIN Y (IgY) DALAM
KUNING TELUR AYAM (*Gallus gallus domesticus*) TERHADAP
KADAR IL-1 α PADA TIKUS PUTIH YANG TERPAPAR *Porphyromonas*
*Gingivalis***

SKRIPSI

Untuk Memenuhi Persyaratan Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Gigi



**Oleh :
Mochammad Yusuf
NIM. 145070400111006**

**PROGRAM STUDI SARJANA KEDOKTERAN GIGI
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

HALAMAN PERSETUJUAN

SKRIPSI

**PENGARUH VAKSIN DARI IMMUNOGLOBULIN Y (IgY) DALAM
KUNING TELUR AYAM (*Gallus gallus domesticus*) TERHADAP
KADAR IL-1 α PADA TIKUS PUTIH YANG TERPAPAR *Porphyromonas*
*gingivalis***

Oleh:

Mochammad Yusuf

NIM. 145070400111006

Menyetujui untuk diuji:

Pembimbing I

Pembimbing II

drg. Diah, Sp.Perio
NIK. 2010037203292001

drg. Diena Fuadiyah, M.Si
NIK. 2014058612292001

LEMBAR PENGESAHAN

SKRIPSI

PENGARUH VAKSIN DARI IMMUNOGLOBULIN Y (IgY) DALAM KUNING TELUR AYAM (*Gallus gallus domesticus*) TERHADAP KADAR IL-1 α PADA TIKUS PUTIH YANG TERPAPAR *Porphyromonas gingivalis*

Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Gigi

Telah diuji pada:

Hari: Selasa

Tanggal: 10 April 2018

Telah dinyatakan lulus oleh:

Penguji I

drg. Ega Lucida Chandra Kumala, Sp.Perio
NIK. 2013048701181001

Penguji II / Pembimbing 1

Penguji III / Pembimbing 2

drg. Diah, Sp.Perio
NIK. 2010037203292001

drg. Dena Fuadiyah, M.Si
NIK. 20140586122912001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya

drg. R. Setyohadi, MS
NIP. 195802121985031003

KATA PENGANTAR

Segala puji hanya bagi Allah SWT yang telah memberi petunjuk dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “Pengaruh Vaksin Dari Immunoglobulin Y (Ig Y) dalam Kuning Telur Ayam (*Gallus Gallus Domesticus*) Terhadap Kadar IL-1 α pada Tikus Putih yang Terpapar *Porphyromonas Gingivalis*” dapat diselesaikan tepat pada waktunya.

Dengan selesainya skripsi ini, penulis mengucapkan terimakasih yang tak terhingga kepada:

1. drg. Setyohadi, MS selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya Malang
2. drg. Kartika Andari Wulan, Sp.Pros selaku ketua program studi Sarjana Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya
3. drg. Ega Lucida Chandra Kumala, Sp.Perio sebagai penguji ujian skripsi yang memberikan masukan untuk menyempurnakan naskah skripsi.
4. drg. Diah, Sp.Perio selaku pembimbing pertama, yang telah memberikan arahan, masukan dan selalu bisa memotivasi anak didiknya untuk segera menyelesaikan skripsi.
5. drg. Diena Fuadiyah, M.Si selaku pembimbing kedua, yang telah memberikan arahan dan masukan sehingga pembuatan skripsi ini bisa berjalan dengan lancar.
6. Segenap anggota TIM Pengelola skripsi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya.
7. Ayah, Almh.Mama, kakak dan adik tercinta serta keluarga yang selalu memberikan kasih sayang, dukungan dan doa yang tak pernah putus.

8. Sahabat-sahabat yang selalu ada dalam situasi dan kondisi apapun Hilda, Faica, Pinti dan Firza. Terimakasih atas semangatnya ya temanku, Sukses selalu !
9. Teman-teman Pbl f 2014 (aza, amar, tika, momo, ratna, hanum, vica, gori) yang selalu mendukung dan memberi support
10. Teman-teman yang selalu ada dalam situasi dan kondisi apapun Wulan, Via dan Anike
11. Teman-teman lomba yang selalu memberi semangat dan saran Azimah dan Fatika
12. Teman-teman seperjuangan FKG angkatan 2014, sukses bersama yaa, jangan lupa bahagia.
13. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan skripsi ini yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa penulisan ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis membuka diri untuk segala saran dan kritik yang membangun. Semoga skripsi ini bisa memberikan manfaat baik bagi penulis sendiri maupun bagi dunia kedokteran gigi.

Malang, 2 Agustus 2017

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman Judul	i
Halaman Persetujuan	ii
Halaman Pengesahan	iii
Kata Pengantar	iv
Abstrak	vi
Abstract	vii
Daftar Isi	viii
Daftar Gambar	ix
Daftar Tabel	x
Daftar Singkatan	xi
Daftar Lampiran	xii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.3.1 Tujuan Umum	5
1.3.2 Tujuan Khusus	5
1.4 Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Vaksin	6
2.1.1 Prinsip Vaksin	7
2.2 Periodontitis Kronis	8
2.2.1 Definisi	8
2.2.2 Patogenesis Periodontitis	9
2.2.3 Respon Inflamasi pada Periodonsium	10
2.3 Respon Kekebalan Tubuh	11
2.4 Immunoglobulin Y (IgY)	13
2.5 Porphyromonas gingivalis	14
2.5.1 Klasifikasi <i>P. gingivalis</i>	15
2.5.2 Karakteristik <i>P. gingivalis</i>	15
2.5.3 Peran <i>P. gingivalis</i> dalam Patogenesis Periodontitis	15
2.6 Outer Membrane Protein	17
2.7 Kuning Telur	17
2.8 IL-1 α	18
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	
3.1 Kerangka Konsep	20
3.2 Hipotesis Penelitian	22
BAB IV METODE PENELITIAN	
4.1 Rancangan Penelitian	23
4.2 Populasi dan Sampel	23
4.2.1 Kriteria Inklusi	23
4.2.2 Kriteria Eksklusi	23
4.2.3 Metode Pengambilan Sampel	23
4.2.4 Estimasi Jumlah Sampel	24
4.3 Variabel Penelitian	25
4.3.1 Variabel Bebas	25
4.3.2 Variabel Terikat	25

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian	25
4.4.1 Lokasi	25
4.4.2 Waktu	25
4.5 Alat dan Bahan	26
4.5.1 Alat/Instrumen Penelitian	26
4.5.2 Bahan Penelitian	27
4.6 Definisi Operasional	27
4.7 Prosedur Penelitian	27
4.7.1 Pemberian Pakan Tikus	28
4.7.2 Pemilihan Tikus Galur Wistar	28
4.7.3 Pembuatan Suspensi <i>P. Gingivalis</i>	28
4.7.4 Pemilihan Ayam	28
4.7.5 Produksi Antibodi IgY <i>P. Gingivalis</i>	29
4.7.6 Uji SDS-PAGE	30
4.7.7 Uji Western Blot	30
4.7.8 Aplikasi Antibodi IgY	30
4.7.9 Membuat Tikus Model Periodontitis	31
4.7.10 Pengambilan Sampel	31
4.7.11 Pengukuran Kadar IL- 1 α	31
4.8 Alur Prosedur Penelitian	32
4.9 Analisis Data	33
BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA	
5.1 Hasil Penelitian	34
5.1.1 Hasil Uji SDS-PAGE	34
5.1.2 Hasil Uji Western-Blot	35
5.1.3 Kadar IL-1 α	35
5.2 Analisa Data	37
5.2.1 Uji Normalitas dan Homogenitas	37
5.2.2 Uji One Way ANOVA	37
5.2.3 Uji <i>Post Hoc Turkey Homogeneous Subset</i>	37
5.2.4 Uji Korelasi dan Regresi	38
BAB VI PEMBAHASAN	
6.1 SDS-PAGE	40
6.2 Western-Blot	40
6.3 Kadar IL-1 α Pada Tikus Percobaan	41
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN	
7.1 Kesimpulan	47
7.2 Saran	47
DAFTAR PUSTAKA	48
LAMPIRAN	53

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Imunitas Aktif dan Pasif	8
Gambar 2.2 Bakteri <i>P. gingivalis</i> dengan Pewarnaan Zhou	14
Gambar 2.3 Gambaran Mikroskopis <i>P.gingivalis</i>	15
Gambar 4.1 Diagram Alur Prosedur Penelitian	32
Gambar 5.1 Hasil SDS-PAGE Igy Menurut Teori & Hasil Penelitian	34
Gambar 5.2 Profil SDS-PAGE dari OMP <i>P.gingivalis</i> Menurut Literatur	35
Gambar 5.3 Hasil Uji <i>Western Blot</i> IgY dan OMP <i>P.gingivalis</i>	35
Gambar 5.4 Rata-rata Kadar IL-1 α Setelah Pemberian Vaksin IgY	36



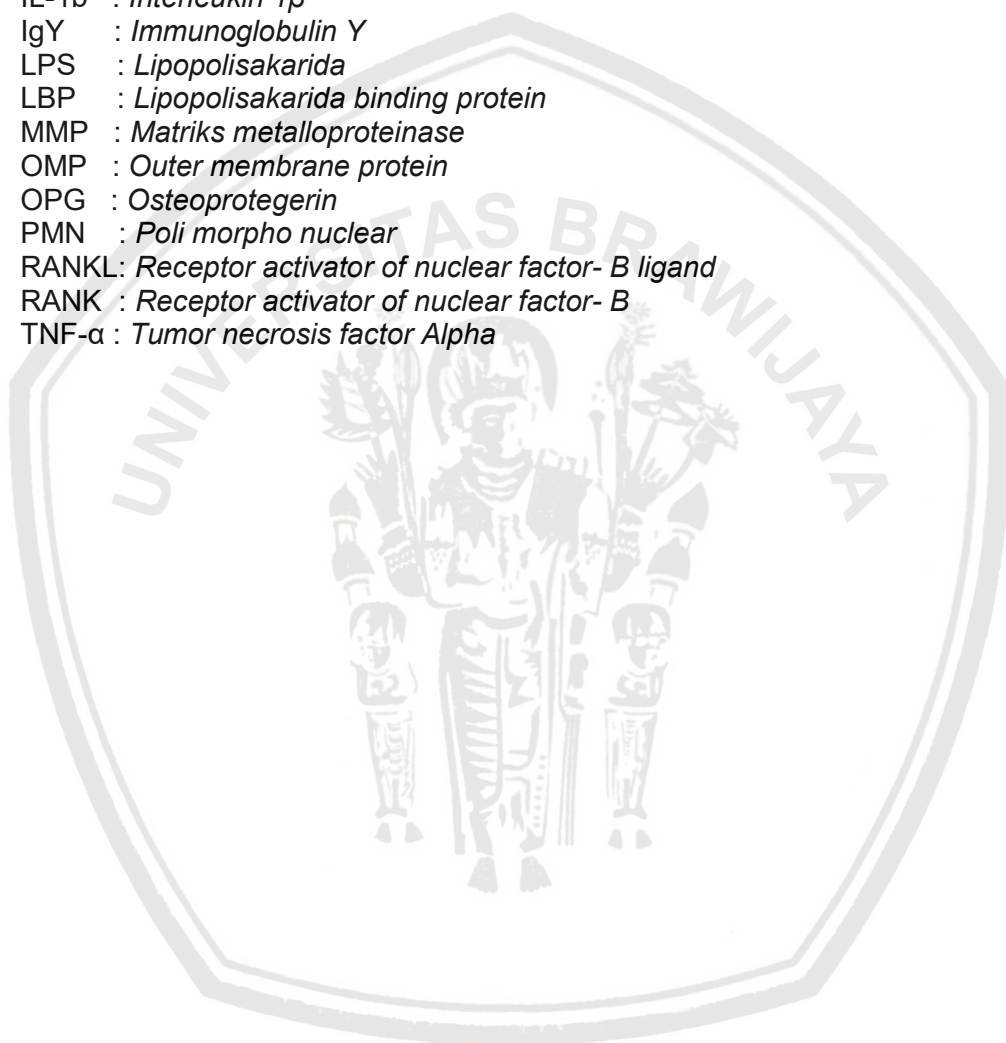
DAFTAR TABEL

Tabel 5.1 Rata-rata Kadar IL-1 α	36
Tabel 5.2 Hasil Uji <i>Post Hoc</i> Turkey HSD	38



DAFTAR SINGKATAN

CMI	: <i>Cell mediated immunity</i>
ELISA	: <i>Enzym linked immune assay</i>
HMI	: <i>Human mediated immunity</i>
IL-1	: <i>Interleukin 1</i>
IL-1 α	: <i>Interleukin 1α</i>
IL-1 β	: <i>Interleukin 1β</i>
IgY	: <i>Immunoglobulin Y</i>
LPS	: <i>Lipopolisakarida</i>
LBP	: <i>Lipopolisakarida binding protein</i>
MMP	: <i>Matriks metalloproteinase</i>
OMP	: <i>Outer membrane protein</i>
OPG	: <i>Osteoprotegerin</i>
PMN	: <i>Poli morpho nuclear</i>
RANKL	: <i>Receptor activator of nuclear factor- B ligand</i>
RANK	: <i>Receptor activator of nuclear factor- B</i>
TNF- α	: <i>Tumor necrosis factor Alpha</i>



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Hasil Uji Statistik	53
Lampiran 2 Dokumentasi Penelitian	57
Lampiran 3 Pernyataan Keaslian Tulisan	68
Lampiran 4 Keterangan Kelaikan Etik	69



ABSTRAK

Yusuf, Mochammad. 2018. *Pengaruh Vaksin Dari Immunoglobulin Y (IgY) Dalam Kuning Telur Ayam (Gallus gallus domesticus) Terhadap Kadar IL-1 α Pada Tikus Putih Yang Terpapar Porphyromonas Gingivalis*. Tugas Akhir, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1.) Diah, drg., Sp.Perio. (2.) Diena Fuadiyah, drg., M.Si.

Periodontitis memiliki tingkat prevalensi cukup tinggi di Indonesia terutama periodontitis kronis yang didominasi oleh bakteri *Porphyromonas gingivalis* (P. gingivalis). Proses inflamasi periodontitis diikuti oleh pelepasan sitokin seperti *Interleukin 1* (IL-1). Penanganan periodontitis saat ini berupa tindakan kuratif yang berlangsung dalam jangka waktu yang lama. Tindakan preventif untuk mencegah periodontitis seharusnya dilakukan. Salah satu metode perawatan preventif adalah dengan pendekatan vaksin. Kuning telur ayam mengandung antibodi IgY yang dapat mengikat suatu antigen serta dapat dimanfaatkan menjadi sebuah vaksin. Antibodi didapatkan melalui konsep *passive immunity* yang dilakukan pada ayam petelur. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh vaksin dari Immunoglobulin Y (IgY) dalam kuning telur ayam (*Gallus gallus domesticus*) terhadap kadar IL-1 α pada tikus putih yang terpapar P.Gingivalis. Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni secara in vivo dengan menggunakan tikus putih. Metode penelitian ini adalah dengan menginjeksi ayam dengan bakteri P. gingivalis, selanjutnya IgY diekstraksi dan dilakukan uji SDS-PAGE serta Western Blot. Setelah itu memberi perlakuan pada 30 ekor tikus dengan lima kelompok, yaitu kelompok (K-), (K+), dan kelompok perlakuan (P1, P2, P3) yang diberi vaksin dengan dosis sebesar 15 μ g/ml, 30 μ g/ml, dan 45 μ g/ml secara intrasulkus pada gigi insisivus tikus. Keesokan harinya dilakukan injeksi antigen pada hari 1,4,7,10,13 kemudian didekaputasi pada hari 14 dan diambil darahnya sebanyak 3cc. Pengukuran kadar IL-1 α dari serum darah tikus menggunakan ELISA kit IL-1 α Rat. Hasil statistik *one way ANOVA* didapatkan nilai $p = 0.094$ ($p > 0,05$). Kesimpulan dari penelitian ini yaitu tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada setiap kelompok perlakuan.

Kata Kunci: IgY, IL-1 α , *Porphyromonas gingivalis*.

ABSTRACT

Yusuf, Mochammad. 2018. *The Effect of Vaccine from Immunoglobulin Y (IgY) In Chicken Egg Yolks (Gallus gallus domesticus) to IL-1 α Levels in White Rat Exposed with Porphyromonas gingivalis*. Skripsi, Faculty of Dentistry Brawijaya University. Supervisor: (1.) Diah, drg., Sp.Perio. (2.) Diena Fuadiyah, drg., M.Si.

Periodontitis has a fairly high prevalence in Indonesia, especially for chronic periodontitis which is dominated by *Porphyromonas gingivalis* (P.gingivalis) bacteria. Inflammation process of periodontitis is followed by the release of cytokines such as Interleukin 1 (IL-1). The curative treatment for periodontitis that is used nowadays needs a long amount of time. Preventive treatment to prevent periodontitis should have been done. One of the preventive treatment is vaccine approach. Chicken egg yolk contains IgY antibodies that can bind to an antigen and can be used as a vaccine. Antibodies are obtained through the concept of passive immunity performed on hens. The purpose of this study was to investigate the effect of vaccine from Immunoglobulin Y (IgY) in chicken egg yolks (*Gallus gallus domesticus*) to IL-1 α levels in white rat exposed with P.gingivalis. The method used in this research was the true experimental design in vivo using white rat. The method was by injecting chicken with P. gingivalis bacteria, then IgY was extracted and tested by SDS-PAGE and Western Blot. Then, the 30 treated rats were divided into five groups, ie groups (K-), (K +), and treatment groups (P1, P2, P3) that were given intrasulcular vaccine at doses of 15 μ g/ml, 30 μ g/ml, and 45 μ g/ml in rat incisors. Then an antigen injection was done on day 1,4,7,10, and 13. The rats were then decapitated on day 14 and 3cc of blood was taken. ELISA Kit IL-1 α Rat was used to measure IL-1 α levels of rat blood serum. One way ANOVA statistical result obtained value $p = 0.094$ ($p > 0,05$). The conclusion of this research showed no significant difference between every treatment groups.

Keywords: IgY, IL-1 α , *Porphyromonas gingivalis*.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit periodontal merupakan masalah kesehatan gigi dan mulut yang memiliki prevalensi cukup tinggi di masyarakat dengan prevalensi penyakit periodontal pada semua kelompok umur di Indonesia adalah 96,58% (Situmorang N, 2008). Keluhan atau gejala yang timbul dari penyakit periodontal yang bersifat kronis baru disadari oleh penderitanya apabila keadaan sudah berlanjut (Depkes RI, 1991). Profil kesehatan gigi dan mulut sendiri menggambarkan bahwa dari dua belas jenis penyakit gigi dan mulut yang diderita masyarakat yang berobat di rumah sakit milik Depkes RI dan pemerintah daerah, penyakit gusi dan periodontal menduduki urutan kedua, dengan presentase sebesar 28,32% (Depkes RI, 1994). Kelainan periodontal menduduki urutan pertama dari empat jenis penyakit gigi dan mulut yang diderita masyarakat berdasarkan data puskesmas yaitu 36,05% (Depkes RI, 2012).

Periodontitis adalah penyakit periodontal yang paling banyak. Periodontitis adalah proses inflamasi pada jaringan pendukung gigi yang disebabkan oleh kelompok mikroorganisme spesifik dan menghasilkan kerusakan ligamen periodontal serta tulang alveolar yang ditandai dengan pembentukan poket, resesi maupun keduanya. Gambaran klinis yang membedakan periodontitis dengan gingivitis adalah hilangnya perlekatan atau *attachment loss* (Newman et al., 2015).

Penumpukan bakteri plak pada permukaan gigi merupakan penyebab utama penyakit periodontal. Penyakit periodontal dimulai dari gingivitis yang bila tidak

terawat bisa berkembang menjadi periodontitis. Patomekanisme awalnya adalah terjadi kerusakan jaringan pendukung periodontal berupa kerusakan fiber, ligamen periodontal dan tulang alveolar.

Periodontitis ini diklasifikasikan menjadi tiga, yaitu periodontitis kronis, periodontitis agresif dan periodontitis sebagai manifestasi dari penyakit sistemik. Periodontitis yang memiliki prevalensi yang paling tinggi di masyarakat adalah periodontitis kronis. Keparahan periodontitis kronis sebanding dengan faktor lokal dan bakteri yang seringkali terlihat pada kasus periodontitis kronis yaitu bakteri *Porphyromonas gingivalis* (Newman et al., 2015).

Porphyromonas gingivalis merupakan bakteri yang menghasilkan melanin (melanogenic), tidak banyak memerlukan karbohidrat dalam aktivitas hidupnya (nonsakarolitik), dan bagian dari koloni bakteri *Black-pigmented Gram-negative anaerobes*. Bakteri *P. gingivalis* banyak ditemukan dalam plak gigi dan bakteri tersebut menyebabkan perubahan patologik jaringan periodontal dengan pengaktifan respons imun dan inflamatori inang, serta secara langsung mempengaruhi jaringan periodonsium. *P. gingivalis* dalam memproduksi berbagai faktor virulensi patogenik, seperti lipopolisakarida dan hidrogen sulfida, yang dapat menginduksi inang untuk melepaskan sitokin *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) dan *Interleukin 1* (IL-1) (Kim et al., 2006). Kerusakan jaringan parah pada kasus periodontitis berasal dari produksi secara terus menerus dan semakin meningkat dari berbagai macam mediator inflamasi dan enzim yang desktruktif sebagai respon terhadap kehadiran bakteri plak di subgingiva. Penting untuk diketahui tipe dari

mediator inflamasi yang mengatur respon dari *host* yang meliputi sitokin, prostanoide, dan matriks metalloproteinase (Newman et al., 2015).

Penanganan periodontitis saat ini adalah berupa tindakan kuratif yang meliputi pembersihan karang gigi (*scaling* dan *root planing*), kuretase jaringan, *splinting* jika ada gigi yang goyang, dan apabila periodontitis sudah parah maka memerlukan perawatan bedah *flap*. Tindakan kuratif periodontitis ini berlangsung dalam jangka waktu yang lama, bahkan harus melakukan kontrol ke dokter gigi seumur hidup. Dalam bidang kedokteran gigi, masih jarang terdapat perawatan preventif, yaitu perawatan pencegahan sebelum terjadinya suatu penyakit. Perawatan preventif dapat meminimalkan pengeluaran biaya untuk pengobatan dibandingkan dengan perawatan kuratif maupun rehabilitatif. Perawatan kuratif dan rehabilitatif membutuhkan waktu yang lama serta biaya yang mahal. Salah satu metode perawatan preventif yang penulis ketahui dan akan dikembangkan adalah dengan pendekatan vaksin (Newman et al., 2015).

Vaksin berasal dari bahasa latin *vacca* (sapi) dan *vaccinia* (cacar sapi). Vaksin adalah bahan antigenik yang digunakan untuk menghasilkan kekebalan aktif terhadap suatu penyakit sehingga dapat mencegah atau mengurangi pengaruh infeksi oleh organisme yang berasal dari dalam maupun luar tubuh. Vaksin dapat berupa galur virus atau bakteri yang telah dilemahkan sehingga tidak menimbulkan penyakit. Vaksin dapat juga berupa organisme mati atau hasil-hasil pemurniannya (protein, peptida, partikel serupa virus, dsb). Vaksin sendiri dapat diberikan dalam jalur imunitas aktif dan pasif. Jalur imunitas pasif adalah pemberian vaksin berupa

antibodi yang didapatkan diluar tubuh manusia, bisa berasal dari hewan ataupun tumbuhan

Antibodi adalah molekul protein yang dihasilkan oleh sel plasma sebagai akibat dari respon limfosit B yang peka antigen. Antibodi humoral utama pada ayam adalah imunoglobulin Y (IgY) yang ditemukan pertama kali oleh Klemperer pada tahun 1893 (Rawendra, 2005). Sejak ditemukannya antibodi imunoglobulin Y (IgY) pada kuning telur, berbagai macam penelitian telah dilakukan di bidang kedokteran untuk menggunakan IgY tersebut terutama untuk pencegahan penyakit pada hewan dan manusia.

Berdasarkan uraian data di atas, penulis mempunyai pemikiran untuk menggunakan manfaat dari IgY dalam kuning telur sebagai upaya pencegahan dan pengobatan periodontitis dalam bentuk vaksin. Penulis tertarik untuk melakukan penelitian mengenai pengaruh vaksin periodontitis yang dilakukan dengan menginduksi IgY pada kuning telur ayam yang spesifik terhadap bakteri *P. gingivalis*, karena upaya preventif untuk periodontitis masih belum ada yang bekerja efektif sampai saat ini. Sehingga, diharapkan melalui penelitian ini penulis mampu menciptakan dan mengukur seberapa efektif vaksin periodontitis ini terhadap bakteri *P. gingivalis* penyebab periodontitis.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana pengaruh vaksin dari Immunoglobulin Y (IgY) dalam kuning telur ayam (*Gallus gallus domesticus*) terhadap kadar IL-1 α pada tikus putih yang terpapar *Porphyromonas gingivalis*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui pengaruh vaksin dari Immunoglobulin Y (IgY) dalam kuning telur ayam (*Gallus gallus domesticus*) terhadap kadar IL-1 α pada tikus putih yang terpapar *Porphyromonas gingivalis*, sehingga dapat digunakan sebagai upaya pencegahan periodontitis.

1.3.2 Tujuan Khusus

2. Untuk mengetahui pengaruh antibodi IgY sebagai vaksin terhadap penurunan kadar IL-1 α pada tikus putih yang terpapar *Porphyromonas gingivalis*.
3. Untuk menganalisa pengaruh pemberian vaksin antibodi IgY dengan berbagai konsentrasi terhadap kadar IL-1 α pada tikus putih yang terpapar *Porphyromonas gingivalis*.

1.4 Manfaat Penelitian

- a. Memberikan informasi ilmiah tentang manfaat immunoglobulin Y (IgY) pada kuning telur ayam dalam bidang kedokteran gigi sebagai vaksin untuk periodontitis.
- b. Sebagai dasar pengembangan untuk vaksin periodontitis yang dilakukan dengan induksi immunoglobulin Y (Ig Y) dari kuning telur ayam.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Vaksin

Vaksin adalah sediaan yang mengandung zat antigenik yang mampu menimbulkan kekebalan aktif dan khas pada manusia. Vaksin dapat dibuat dari bakteri, riketsia atau virus dan dapat berupa suspensi organisme hidup atau inaktif atau fraksi atau toksoid (Farmakope Indonesia, 2014). Jenis vaksin (menurut FI V) adalah sebagai berikut:

a. Vaksin Bakteri

Dibuat dari biakan galur bakteri yang sesuai dalam media cair atau padat yang sesuai dan mengandung bakteri hidup atau inaktif atau komponen imunogeniknya.

b. Toksoid Bakteri

Diperoleh dari toksin yang telah dikurangi atau dihilangkan sifat toksisitasnya hingga mencapai tingkat tidak terdeteksi, tanpa mengurangi sifat imunogenisitas.

c. Vaksin Virus dan Riketsia

Adalah suspensi virus atau riketsia yang ditumbuhkan dalam telur berembrio, dalam biakan sel atau dalam jaringan yang sesuai. Mengandung virus atau riketsia hidup atau inaktif atau komponen imunogeniknya. Vaksin virus hidup umumnya dibuat dari virus galur khas yang virulensinya telah dilemahkan.

Vaksinasi adalah teknik memasukkan antigen yang telah dilemahkan virulensinya untuk mengenali invasi awal tanpa menimbulkan penyakit namun diharapkan dapat merangsang kekebalan tubuh. Mekanisme kerja vaksin adalah dengan mempengaruhi respon imun (kebal), yaitu sel-sel memori yang bersifat melindungi dan telat terbentuk pada waktu sebelumnya. Antibodi akan terbentuk

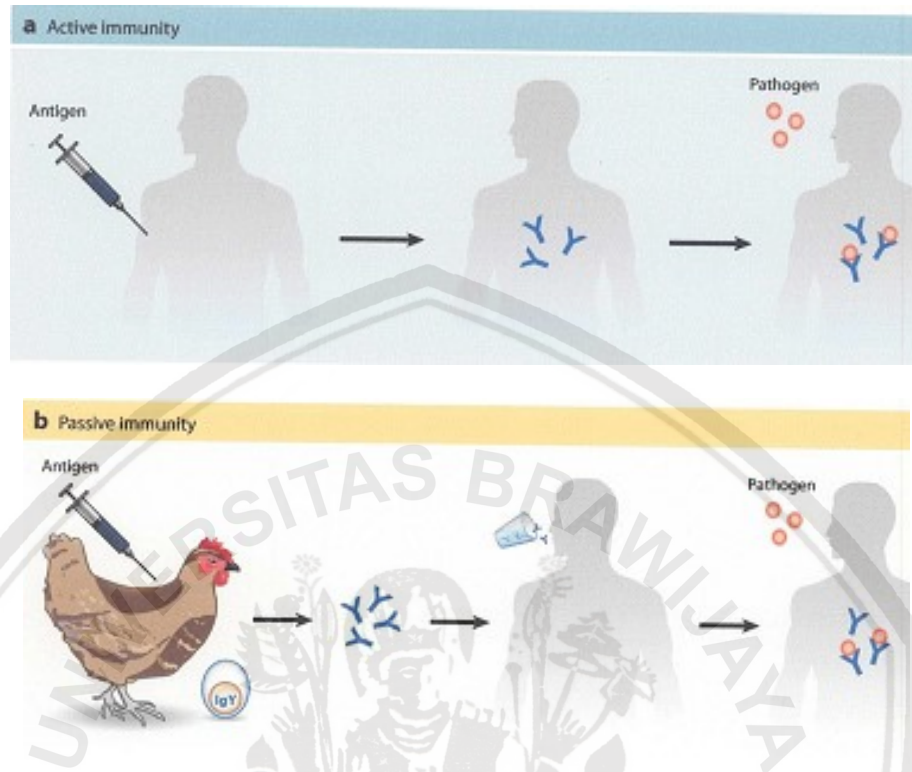
setelah dilakukan vaksinasi yang dapat melawan suatu penyakit. Antibodi juga akan terbentuk apabila sel penghasil antibodi, yaitu sel limfosit (sel-b* telah berfungsi dengan baik. Selanjutnya antibodi yang spesifik akan terbentuk jika ada rangsangan antigen spesifik (penginfeksi) yang masuk ke dalam tubuh yang berfungsi merangsang makrofag untuk memfagosit (memakan) pathogen tersebut (Setiawan, 2012).

Pada umumnya vaksin terdiri dari 2 tipe yaitu vaksin mati (inaktif) dan vaksin hidup (aktif). Vaksin mati diberikan dari pathogen yang diinaktivasi dengan cara pemanasan pada suhu 100° C (*heat killed*), dengan menggunakan formalin (*formaline killed*) dan diinaktivasi dengan sonikator (*sonicated killed*). Sedangkan vaksin yang hidup berupa organism pathogen yang dilemahkan virulensinya (Satari et al., 2016).

2.1.1 Prinsip Vaksin

Memahami fungsi dasar dari sistem imun sangat membantu untuk mengetahui bagaimana vaksin bekerja dan dasar rekomendasi pemakaian vaksin. Terdapat 2 mekanisme dasar untuk memperoleh imunitas, yakni secara aktif dan pasif. Imunitas aktif adalah perlindungan yang dihasilkan dari sistem imun tubuh sendiri (Plotkin S, 2008). Tipe imunitas ini biasanya bertahan sampai beberapa tahun, yakni selama hidup. Imunitas pasif adalah perlindungan yang dihasilkan oleh hewan atau manusia dan ditransferkan ke manusia lainn, biasanya menggunakan injeksi. Imunitas pasif dapat menghasilkan perlindungan yang efektif, tapi perlindungan ini tidak berlangsung lama yakni sekitar beberapa minggu atau bulan (Plotkin S, 2003).

Berikut ini gambar skema perbedaan imunitas aktif dan pasif:



Gambar 2.1 (a) Imunitas aktif meliputi imunisasi, atau vaksinasi individu dengan antigen untuk menghasilkan respon imun adaptif yang menargetkan ketertarikan patogen. (b) Pada imunitas pasif, antibodi di isolasi dari sumber lain (misalnya kuning telur ayam yang telah diimunisasi) lalu diaplikasikan pada tubuh untuk menghasilkan imunitas spesifik patogen. (Kovacs et al., 2012)

2.2 Periodontitis Kronis

2.2.1. Definisi

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 (Newman et al., 2015).

Bakteri yang paling banyak ditemukan pada penderita periodontitis kronis meliputi *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. intermedia*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *C. rectus*, *Eikenella corrodens*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* (sering *sterotype b*, *P. micra*, *E. nodatum*, *Leptotrichia buccalis*, *T. denticola*, *Selenomonas spp.* (*S. noxia*), and *Enterobacter spp.* (Newman et al. 2015). Terdapat dua bentuk dari periodontitis kronis yaitu, periodontitis kronis lokalisata yang melibatkan kurang dari 30% jaringan periodontal dan periodontitis kronis generalisata (menyeluruh) yang melibatkan lebih dari 30% jaringan periodontal di rongga mulut (Newman et al., 2015).

2.2.2. Patogenesis Periodontitis

Dalam beberapa dekade terakhir, konsep terjadinya periodontitis telah dipertimbangkan sebagai interaksi kompleks antara faktor mikroba dan respon host, yang mengubah jaringan ikat dan metabolisme tulang serta menyebabkan kerusakan jaringan periodontal seperti kehilangan perlekatan junctional epithelium (Lindberg et al, 2013).

Patogenesis periodontitis terdiri dari interaksi kompleks antara faktor mikroba dan respon host yang menghasilkan perubahan metabolisme tulang. Komponen bakterial dari biofilm, seperti LPS, antigen, dan toksin menginisiasi imun host dan respon inflamasi yang mengaktifasi sel pertahanan tubuh termasuk PMN serta memicu respon antibodi langsung untuk menurunkan besarnya serangan mikroba. Aktivasi dari sel pertahanan tubuh menghasilkan produksi dari mediator inflamasi seperti sitokin, kemokin, prostaglandin, dan enzim proteolitik seperti MMP yang mengubah jaringan ikat dan metabolisme tulang. Jika imun host dan respon inflamasi tidak cukup untuk menghilangkan atau membersihkan serangan mikroba, maka respon inflamasi kronis berkembang menuju ke inflamasi

periodontal dengan gambaran secara klinis yaitu terdapat kemerahan, pembengkakan, serta perdarahan dan kerusakan periodontal (kehilangan perlekatan klinis) (Lindberg *et al*, 2013).

Proses utama yang menyebabkan hilangnya perlekatan dan pembentukan poket (Winn, 2006):

- 1) Plak subgingiva yang meluas ke arah apical yang menyebabkan *junctional epithelium* terpisah dari permukaan gigi.
- 2) Respon jaringan inflamasi epithelium poket berakibat pada destruksi dari jaringan ikat gingival, membran periodontal dan tulang alveolar
- 3) Proliferasi di apical dari *junctional epithelium* menyebabkan migrasi dari perlekatan epithelium.
- 4) Tingkat kerusakan jaringan tidak bersifat konstan, tetapi episodik, sejumlah tipe penyakit dapat terjadi, mulai dari kerusakan *slowly progressive* hingga aktivitas episodik yang berkembang cepat.

2.2.3. Respon Inflamasi pada Periodonsium

Proses inflamasi dan imun yang berkembang pada jaringan periodontal pada respon jangka panjang dari biofilm subgingival memiliki maksud baik, namun juga memiliki efek merusak jaringan. Jadi, kerusakan jaringan parah pada kasus periodontitis berasal dari produksi secara terus menerus dan semakin meningkat dari berbagai macam mediator inflamasi dan enzim yang desktruktif sebagai respon terhadap adanya bakteri plak di subgingiva. Penting untuk diketahui tipe dari mediator infamasi yang mengatur respon dari *host*. Mediator tersebut meliputi sitokin, prostanoid, dan matriks metalloproteinase (Newman *et al.*, 2015).

Sitokin sendiri dihasilkan oleh banyak tipe sel, meliputi sel infiltrasi inflamasi seperti neutrofil, makrofag, limfosit begitu juga sel seperti fibroblas dan

sel epitel. Sinyal sitokin akan memperkuat respon imun dan mereka secara mendasar penting untuk mengatur respon imun-inflamasi dan untuk melawan infeksi. Namun, mereka juga memiliki efek biologis yang mendalam dan mengarah pada kerusakan jaringan dengan peradangan kronis. Produksi yang berkepanjangan dan berlebihan dari sitokin dan mediator inflamasi lainnya di periodonsium menyebabkan kerusakan jaringan yang menggambarkan tanda klinis dari penyakit ini. Misalnya, sitokin memediasi kerusakan jaringan ikat dan tulang alveolar melalui induksi fibroblas dan osteoklas untuk menghasilkan enzim proteolitik contohnya MMP yang memecah komponen struktural dari jaringan ikat tersebut. Ada tumpang tindih yang signifikan dan redundansi antara fungsi sitokin individu (Newman *et al.*, 2015).

Sitokin tidak beraksi dalam isolasi, tapi mereka berfungsi dalam jaringan yang fleksibel dan kompleks yang melibatkan pro-inflamasi dan efek anti-inflamasi dan menyatukan aspek respon imun *innate* dan *acquired*. Sitokin memiliki peran penting pada semua tahap respon imun pada penyakit periodontal. Sitokin dalam patogenensis adalah sitokin pro-inflamasi IL-1 dan TNF- α . Kedua sitokin ini memiliki peran kunci dalam inisiasi, regulasi, dan perkembangan respon imun bawaan dalam periodonsium, sehingga menghasilkan perubahan pembuluh darah dan migrasi sel efektor seperti neutrofil ke periodonsium sebagai bagian dari respon imun normal terhadap kehadiran bakteri subgingiva (Newman *et al.*, 2015).

2.3 Respon Kekebalan Tubuh

Respon kekebalan tubuh terdiri dari 2 yakni respon kekebalan non-spesifik dan respon kekebalan spesifik.

Respon kekebalan non-spesifik (alamiah) terdiri dari faktor-faktor yang sudah ada sejak lahir atau sebelum tubuh terinfeksi mikroorganisme. Respon

kekebalan ini bersifat cepat dan paling awal dalam pertahanan terhadap infeksi mikroorganisme. Sistem kekebalan non-spesifik terdiri dari beberapa komponen yaitu *barrier* fisik dan kimia (bulu, kulit, mukosa); sel fagosit (makrofag, NK, neutrofil, heterofil) (Ferdous et al. 2008); protein komplemen dan mediator peradangan dan sitokin (Scott & Owens 2008).

Sistem kekebalan spesifik terdiri dari kekebalan humoral atau *humoral mediated immunity* (HMI) dan kekebalan yang diperantarai sel atau *cell mediated immunity* (CMI). Sistem ini merespon antigen secara spesifik melalui reaksi antigen dan antibodi, membentuk sel T dan sel B memori terhadap antigen pemaparnya. Sel-sel sistem imun yang bereaksi spesifik dengan antigen adalah sel B yang memproduksi antibodi dan sel T yang mengatur sintesis antibodi (Mazengia et al. 2009) maupun sel T yang mempunyai fungsi efektor atau sitotoksik langsung.

Antibodi yang disekresikan oleh sel plasma merupakan salah satu bagian yang berfungsi dalam respon kekebalan spesifik humoral. Sel plasma yang mengandung imunoglobulin ditemukan dalam jumlah besar pada permukaan jaringan limfoid, MALT (Khan et al. 2008) dan *Harderian gland* ayam (Nasrin et al. 2013). Antibodi bersifat efektif mengeliminasi pathogen ekstraseluler. Imunoglobulin (Ig) adalah glikloprotein yang mempunyai antibodi aktif serta ditemukan dalam darah, limpa dan jaringan vaskuler.

Kekebalan yang diperantarai sel *Cell mediated immunity* (CMI) efektif melawan infeksi yang terjadi di dalam sel (intra sel). Kekebalan CMI bekerja dengan cara menghancurkan sel yang terinfeksi virus atau masuk ke dalam sel untuk menghilangkan antigen virus. Sel T adalah antigen spesifik dalam respon CMI dan mampu melawan infeksi pathogen secara luas. (Moon et al. 2007).

2.4 Immunoglobulin Y

Immunoglobulin Y (IgY) adalah antibodi utama pada burung, reptil dan lungfish (Munhoz et al., 2014). IgY pada burung dapat ditemukan terutama di darah dan di cairan pecahan dari telur yang memberikan perlindungan untuk anak ayam yang baru menetas (Schade et al., 2005). Penelitian mengenai IgY di Indonesia sendiri telah dilakukan beberapa kali diantaranya IgY sebagai anti tetanus (Suartha, 2006), sebagai anti adhesi pada pembentukan biofilm (Chrismirina, 2006). IgY memainkan peranan biologis yang sama sebagai IgG pada mamalia, yang dianggap sebagai immunoglobulin utama yang memberikan pertahanan terhadap agen infeksi. Selain itu, ayam yang menetas memperoleh kekebalan humoral yang efektif terhadap patogen umum pada burung ketika menyerap IgY dari kuning telur, sampai maturasi selesai dari sistem kekebalan tubuh (Schade et al., 2005).

Seperti IgG, IgY terdiri dari dua rantai polipeptida berat dan dua rantai polipeptida ringan, berbentuk karakteristik Y dan memberikan dua tempat ikatan untuk antigen. IgY dan IgG dielusi dari diethylaminoethyl selulosa dengan buffer kekuatan ionik rendah (Munhoz et al., 2014). IgY juga mampu memediasi reaksi anafilaksis, fungsinya dikaitkan dengan IgE pada mamalia (Carlender, 2002). Faktanya, kesamaan lain antara IgY dan IgE, termasuk rantai intra ikatan disulfida yang serupa di domain ekstra pada rantai berat mereka, hal ini menunjukkan bahwa IgY adalah molekul turunan bagi kedua IgG dan IgE, dan studi genetik molekuler telah mengkonfirmasi penemuan ini (Munhoz et al., 2014).

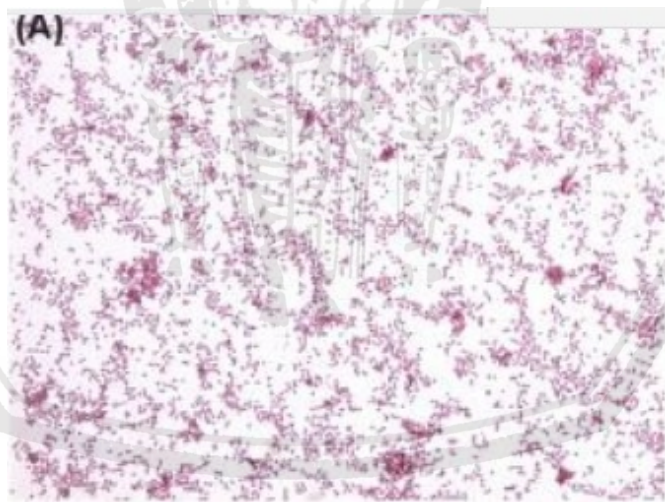
Karakter penting yang dimiliki oleh IgY yang tidak dimiliki oleh antibodi mamalia yaitu IgY lebih resisten terhadap pengaruh suhu dan pH, IgY tidak berikatan dengan protein A dan G, tidak berikatan dengan factor rheumatoid dala

darah, tidak mengaktifkan faktro komplemen mamalia sehingga tidak merangsang timbulnya efek samping, tidak berikatan dengan reseptor Fc pada permukaan sel, dan kemampuan mengikat antibodi sekunder 3 hingga 5 kali lebih kuat (Poetri et al., 2006).

Imunoglobulin Y, utuh dan telah terpotong dapat ditemukan pada individu yang sama seperti di sebagian bebek dan angsa, atau hanya satu bentuk, seperti di *Gallus domesticus* dimana hanya terdapat seluruh IgY (Kitaguchi et al ., 2008).

2.5 *Porphyromonas gingivalis*

Etiologi utama dari proses perkembangan penyakit periodontal adalah *dental plaque* atau *oral biofilm* yang berkaitan dengan bakteri anaerob. Pada penderita periodontitis, komposisi bakteri plak gigi akan semakin kompleks, dan didominasi oleh gram negatif anaerob mutlak. *P. gingivalis* muncul sebagai salah satu patogen utama dalam perkembangan penyakit periodontal (Mysak, 2013).



Gambar 2.2 Bakteri *P.gingivalis* pada pewarnaan gram dengan perbesaran 1000x (Zhou, 2005).

2.5.1. Klasifikasi

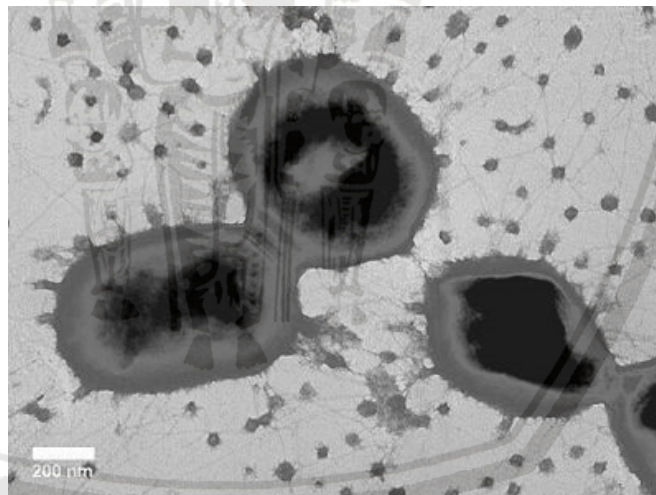
Secara taksonomi, *P.gingivalis* diklasifikasikan sebagai berikut

(Radiananda, 2008) :

Kingdom	: <i>Bacteria</i>
Superphylum	: <i>Bactroidetes/Chlorobi group</i>
Phylum	: <i>Bacteroidetes</i>
Class	: <i>Bacteroides</i>
Ordo	: <i>Bacteroidales</i>
Family	: <i>Porphyromonadaceae</i>
Genus	: <i>Porphyromoonas</i>
Species	: <i>Porphyromonas gingivalis</i>

2.5.2. Karakteristik

Karakter *P. gingivalis* adalah memiliki bercak hitam, *pleomorphic* terutama berbentuk batang pendek, non-motil, gram negative, non-fermentasi, tidak membentuk spora, obligat anaerob, *asaccharolytic*, dapat tumbuh optimum pada suhu 36,8-30 0C dengan pH antara 7.5-8.0 (Iriano, 2008).



Gambar 2.3 Gambaran mikroskopis *P. gingivalis* dapat dilihat pada gambar

Porphyromonas gingivalis (Radiananda,2008)

2.5.3. Peran *P. gingivalis* dalam patogenesis Periodontitis

Periodontitis adalah suatu penyakit peradangan pada jaringan penyangga gigi yang disebabkan oleh mikroorganisme tertentu sehingga mengakibatkan

kerusakan yang progresif pada ligamen periodontal dan tulang alveolar ditandai dengan terbentuknya poket, resesi, atau kedua-duanya. Kerusakan ini dapat disebabkan oleh toksin yang diproduksi oleh bakteri maupun oleh aktifitas sel-sel dan mediator *proinflamatori* yang berlebihan. Komponen struktur bakteri dapat merangsang perkembangan reaksi kekebalan host yang tidak hanya mampu melindungi inang terhadap infeksi tetapi juga menyebabkan kerusakan jaringan periodontal parah. Salah satu penyebab dari terjadinya periodontitis kronis adalah *P. gingivalis* (Newman et al ., 2015).

Komponen dinding sel dari *P.gingivalis*, seperti lipopolisakarida (LPS), dapat merangsang pelepasan sitokin pro-inflamasi (IL-1b, IL-6, CXCL8 atau IL-8, TNF-a), prostaglandin, oksida nitrat, dan radikal bebas. Zat-zat kimia tersebut adalah mediator peradangan dan kebanyakan dari mereka dapat merangsang resorpsi tulang. LPS dan mediator inflamasi juga memiliki efek langsung terhadap aktifitas osteoblas, yaitu menyebabkan penurunan jumlah sel osteoblas fungsional. Hasil dari aktifitas ini adalah terjadinya kehilangan perlekatan, termasuk tulang dan jaringan ikat periodontal (Siquera dan Rocas, 2007).

P. gingivalis memproduksi banyak faktor virulensi, termasuk di dalamnya outer membrane vesicles, adhesions, LPS, hemolysins, proteinases, Arg- dan Lys-gingipain cysteine. Gingipain berperan dalam destruksi jaringan secara langsung dengan degrading host tissue proteins dan secara tidak langsung dengan mengaktifkan latent *matriks metalloproteinase* dan menonaktifkan inhibitor dari metalloproteinases. Sedangkan LPS sebagai salah satu dari faktor virulen bakteri ini terbukti terlibat dalam respon inflamasi (Grenier, 2010).

2.6 Outer Membrane Protein

Bakteri Gram-negatif adalah penyebab utama penyakit, sebagian karena mereka memiliki *Outer Membrane Protein* (OMP) yang kuat sehingga dapat melindungi bakteri dari sistem kekebalan tubuh dan antibiotik tertentu (Vijayaraghavan et al., 2008). OMP melindungi bakteri dari banyak antibiotik termasuk penicillin. Selain itu, selaput luar dari membran ini terdiri dari lipopolisakarida kompleks (LPS) yang komponen lipid A-nya dapat menyebabkan reaksi beracun ketika bakteri ini dilisis oleh sel-sel kekebalan (Koebnik et al, 2000).

OMP pada bakteri *P.gingivalis* dapat berperan sebagai faktor virulensi. LPS serta proteinase sistein Arg dan Lys-gingipain ditemukan dalam jumlah besar pada permukaan membran, mereka berperan pada proses patogenesis periodontitis dengan mengganggu mekanisme pertahanan host dan meningkatkan kerusakan jaringan (Duncan et al, 2004).

2.7 Kuning Telur

Telur ayam ras memiliki fisik terdiri dari 10% kerabang (kulit telur, cangkang), 60% putih telur dan 30% kuning telur. Kuning telur adalah salah satu komponen yang mengandung nutrisi terbanyak dalam telur (Sarwono, 1995). Kandungan dari zat makanan kuning telur yaitu protein 17,5%, lemak 32,55%. Kuning telur juga mengandung vitamin, mineral, pigmen dan kolestrol (Ricke, 2016).

Kuning telur merupakan bagian paling penting bagi isi telur, sebab pada bagian inilah terdapat dan tempat tumbuh embrio hewan, khususnya pada telur yang telah dibuahi. Bagian kuning telur ini terbungkus semacam selaput tipis yang sangat kuat dan elastis yang disebut membrane vetelina, kuning telur memiliki

komposisi gizi yang lebih lengkap daripada putih telur dan terdiri dari air lemak, karbohidrat, mineral & vitamin.

Kuning telur ayam mengandung vitamin, B6, B12, A, D, E, K, dan asam folat. Beberapa vitamin seperti vitamin D, E, K tidak terdapat pada putih telur ayam, tapi hanya terdapat pada kuning telur ayam. Kandungan mineral pada kuning telur ayam juga lebih banyak daripada putih telur ayam, seperti kandungan kalsium 90% dan zat besi sebesar 93%.

Dalam kuning telur ayam selain merupakan sumber nutrisi juga terdapat antibodi dalam jumlah banyak, antibodi tersebut adalah immunoglobulin Y (IgY). Immunoglobulin Y (IgY) adalah ekuivalen fungsional dari immunoglobulin G (IgG) pada mamalia dan ditransfer ke kuning telur untuk secara pasif melindungi perkembangan dari ayam. Terdapat 3 kelas antibodi yang terdapat pada ayam yakni IgY, IgA, dan IgM.

2.8 IL-1 α

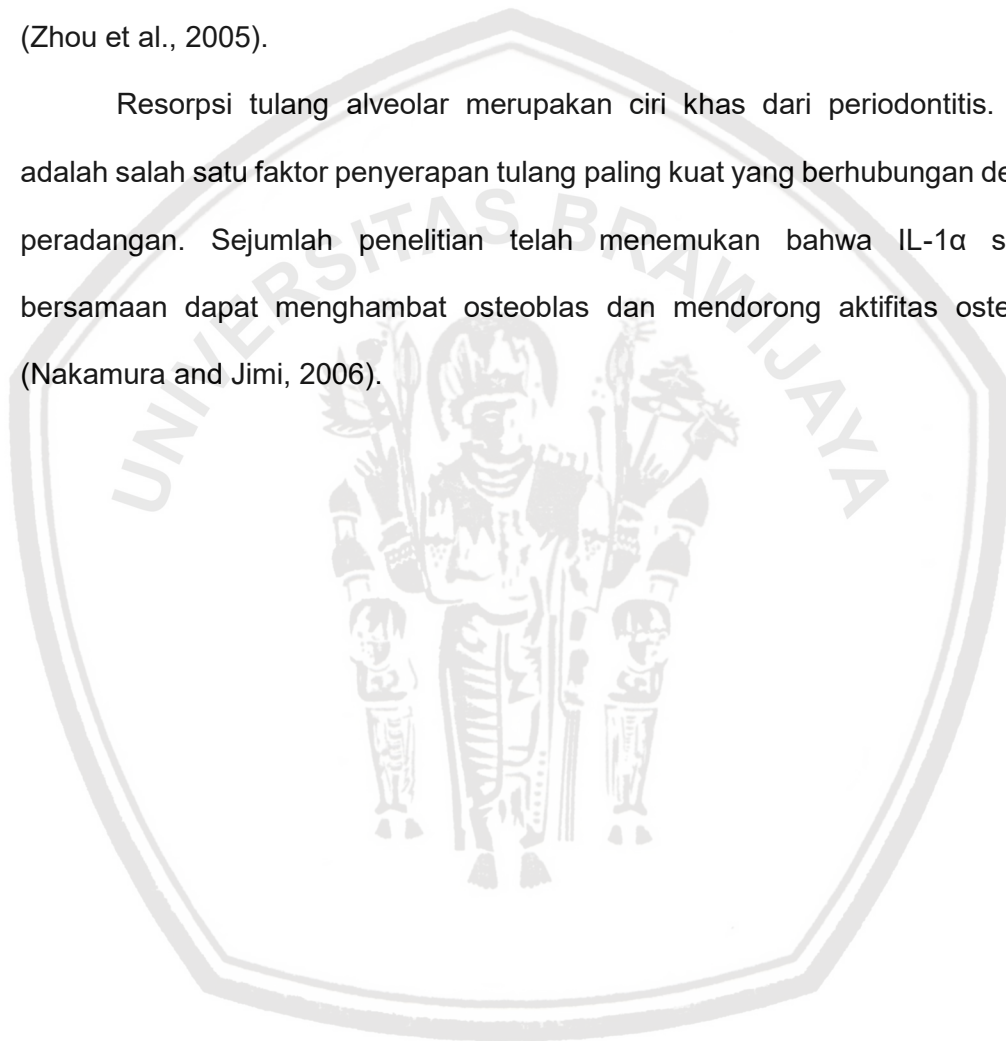
Interleukin-1 (IL-1) adalah polipeptida dengan berbagai macam aktifitas dan peran dalam homeostasis jaringan, peradangan, kekebalan, dan kerusakan jaringan. Setelah aktivasi, *Interleukin-1* disintesis oleh berbagai jenis sel, termasuk monosit, makrofag, T-limfosit, fibroblast, sel pembuluh darah, sel otak, dan sel kulit. Ada dua subtipe dari IL-1, ditunjuk *Interleukin-1 α* (IL-1 α), dan *Interleukin-1 β* (IL-1 β), diproduksi terutama oleh monosit dan makrofag tetapi juga oleh jenis sel (Champagne et al., 2003).

Interleukin-1 α dideskripsikan sebagai "pro-inflamasi" karena merangsang aktivitas gen yang terlibat dalam peradangan dan imunitas. Protein ini berperan penting dalam melindungi tubuh dari penyusup asing seperti bakteri dan virus. Ia

juga terlibat dalam resorpsi tulang, kerusakan dan pelepasan jaringan tulang yang tidak lagi diperlukan (Champagne et al., 2003).

IL-1 α diproduksi sebagai respon terhadap patogen periodontal terutama oleh monosit dalam jaringan periodontal tetapi juga diproduksi oleh sel-sel lain termasuk keratinosit gingiva, fibroblas gingiva, leukosit polimorfonuklear manusia (Zhou et al., 2005).

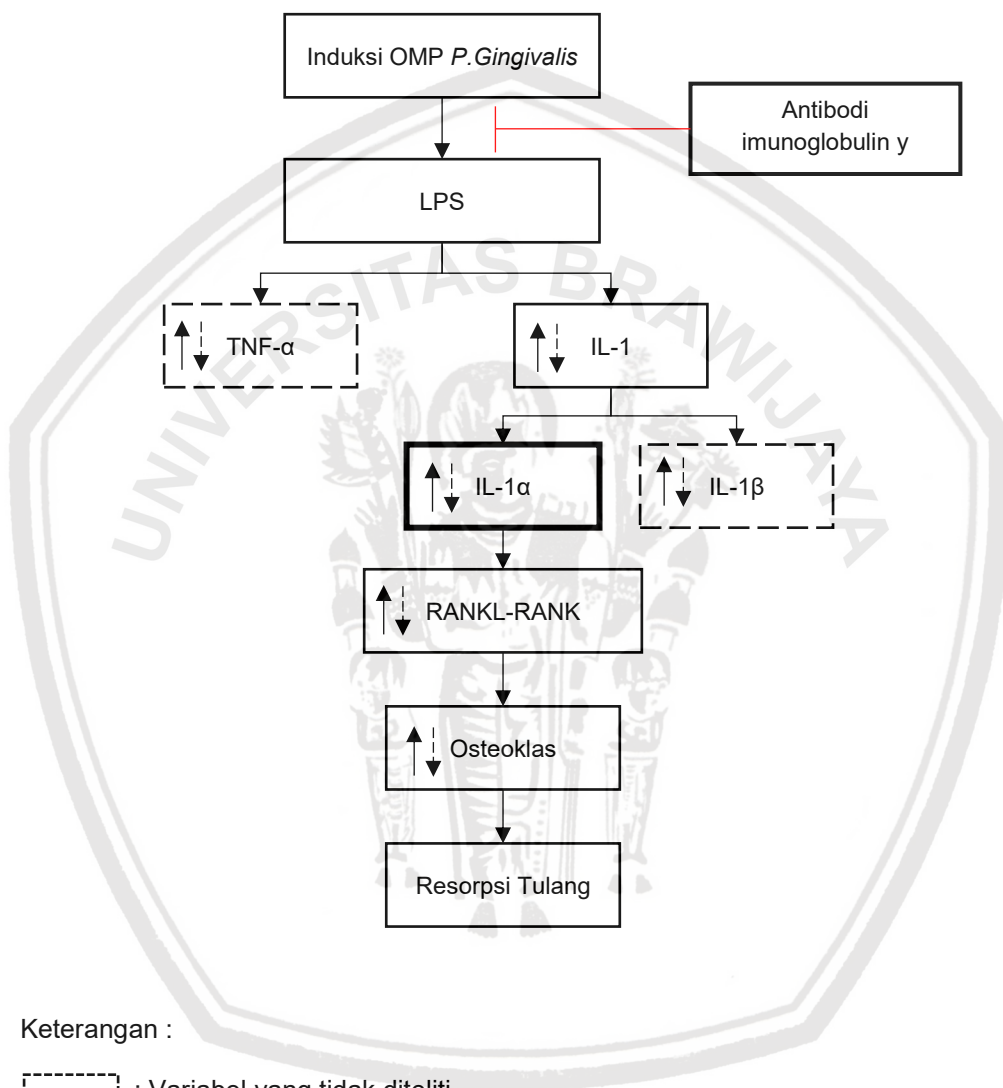
Resorpsi tulang alveolar merupakan ciri khas dari periodontitis. IL-1 α adalah salah satu faktor penyerapan tulang paling kuat yang berhubungan dengan peradangan. Sejumlah penelitian telah menemukan bahwa IL-1 α secara bersamaan dapat menghambat osteoblas dan mendorong aktifitas osteoklas (Nakamura and Jimi, 2006).



BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Bakteri *P. gingivalis* merupakan bakteri penyebab periodontitis. Dimana bakteri ini menghasilkan produk bakteri yang berupa antigen *Lipoolisakarida* (LPS). LPS adalah molekul besar yang terdiri dari molekul lipid (lipid A) dan komponen polisakarida. LPS ditemukan di *outer membran* dari bakteri gram negatif, mereka berperan sebagai endotoxin (Newman *et al.*, 2015).

LPS yang dilepaskan berikatan dengan *lipopolisakarida binding protein* (LBP) dan membentuk suatu kompleks molekul. Kompleks molekul ini akan dikenali oleh CD14 yang berada di permukaan sel target, kemudian dikenali oleh makrofag melalui reseptor TLR4. Reseptor inilah yang akan mengaktifkan makrofag sebagai respons imun adaptif dengan membentuk sitokin *proinflamatori* yakni IL-1 yg terdiri dari IL-1 α dan IL-1 β dan TNF- α . Sitokin yang dihasilkan oleh makrofag dapat menyebabkan proses kerusakan tulang (Yustina *et al.*, 2012).

Pada kondisi patologis, sitokin pro-inflamasi dapat meningkatkan osteoklastogenesis. IL-1 α akan meningkatkan regulasi *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand* (RANKL) di osteoblast dan menekan produksi Osteoprotegerin (OPG). Sehingga RANKL akan berikatan dengan *receptor activator of nuclear factor- κ B* (RANK) yang menyebabkan produksi dan aktivasi osteoklas meningkat dan menyebabkan resorpsi tulang.

Antibodi IgY dapat menghambat adhesi OMP *P. gingivalis* ke permukaan sel dan menekan kolonisasi bakteri sehingga antigen tersebut mati. Respon inflamasi yang terjadi rendah dan tubuh tidak memproduksi mediator inflamasi sehingga kerusakan tulang alveolar yang merupakan tanda klinis periodontitis tidak terjadi.

3.2 Hipotesis Penelitian

Vaksin dari immunoglobulin Y (IgY) dalam kuning telur ayam (*Gallus gallus domesticus*) berpengaruh terhadap kadar IL-1 α pada tikus putih yang diinduksi *Porphyromonas gingivalis*.



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik menggunakan desain *randomize post test only control group desain*, yaitu dalam rancangan ini perlakuan atau intervensi telah dilakukan kemudian dilakukan pengukuran (observasi) atau post test. Penelitian ini menggunakan tikus putih jenis *Rattus Norvegicus* strain wistar (Notoatmodjo, 2010).

4.2 Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini adalah tikus putih jenis *Rattus Novergicus* strain wistar. Sampel yang diambil adalah tikus putih jenis *Rattus Novergicus* strain wistar yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

4.2.1 Kriteria Inklusi

- a. Jenis kelamin jantan usia 8-12 minggu
- b. Berat badan 150-200 gram
- c. Dalam kondisi sehat dan tidak cacat
- d. Jaringan periodontal sehat atau tidak ada kelainan
- e. Tidak mengalami pengobatan atau paparan sebelumnya

4.2.2 Kriteria Eksklusi

- a. Tikus sakit pada masa penelitian
- b. Tikus mati pada masa penelitian

4.2.3 Metode Pengambilan Sampel

Penentuan konsentrasi IgY diambil berdasarkan penelitian pendahuluan dimana didapatkan dosis IgY optimal 20 µg/ml. (Jiwintarum et al., 2014)

Dalam penelitian ini terdapat 5 perlakuan termasuk kontrol yang diberikan kepada subject penelitian, yaitu:

1. Kontrol negatif (K-) : diet normal
2. Kontrol positif (K+) : diet normal, dan diinduksi *P. gingivalis* selama 2 minggu
3. Perlakuan 1 (P1) : diet normal, pemberian antibodi IgY konsentrasi 15 $\mu\text{g/ml}$ dan diinduksi *P. gingivalis* selama 2 minggu
4. Perlakuan 2 (P2) : diet normal, pemberian antibodi IgY konsentrasi 30 $\mu\text{g/ml}$ dan diinduksi *P. gingivalis* selama 2 minggu
5. Perlakuan 3 (P3) : diet normal, pemberian antibodi IgY konsentrasi 45 $\mu\text{g/ml}$ dan diinduksi *P. gingivalis* selama 2 minggu

4.2.4 Estimasi Jumlah Sampel

Menurut Solimun (2001), rumus perhitungan sampel adalah sebagai berikut

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

Dengan:

p = jumlah perlakuan

n = jumlah sampel

15 = nilai deviasi

Berdasarkan rumus tersebut, maka perhitungan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

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

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Berdasarkan hasil perhitungan diatas diperoleh bahwa pengulangan untuk setiap perlakuan dilakukan sebanyak 6 kali. Jadi total hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah $6 \times 5 = 30$ hewan coba.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas (*Independent*)

Variabel bebas (*Independent*) pada penelitian ini adalah antibodi imunoglobulin y (IgY) dengan berbagai konsentrasi

4.3.2 Variabel terikat (*dependent*)

Variabel terikat (*dependent*) pada penelitian ini adalah kadar IL-1 α tikus putih *Rattus Norvegicus* strain wistar.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.4.1 Lokasi

Penelitian dilakukan pada tempat sebagai berikut:

1. Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang sebagai tempat kultur dan pemeliharaan bakteri *P. gingivalis*
2. Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang sebagai tempat ekstraksi antibodi IgY
3. Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang sebagai tempat uji ELISA
4. Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang sebagai tempat pemeliharaan tikus dan pemberian perlakuan

4.4.2 Waktu

Penelitian ini berlangsung selama 1 bulan, yaitu pada bulan Maret sampai dengan bulan April 2017.

4.5 Alat dan Bahan

4.5.1 Alat/Instrumen penelitian

1. Alat Pemeliharaan Hewan coba
 - a. Kandang dari bak plastik
 - b. Tutup kandang yang terbuat dari anyaman kawat
 - c. Botol air untuk minum
 - d. Timbangan
 - e. Tempat pakan
 - f. Form pemantauan sisa pakan tikus dan form pemantauan berat badan tikus
2. Alat Pembuatan Makanan Tikus
 - a. Baskom plastik
 - b. Timbangan
 - c. Pengaduk
 - d. Handscoon
 - e. Gelas ukur
 - f. Sonde
3. Alat ekstraksi antibodi IgY
 - a. Sendok
 - b. Lancet
 - c. Tube 50 ml
 - d. Gelas ukur
 - e. Pengaduk
 - f. Vortexer
 - g. Rolling mixer

- h. Sentrifugasi
- 4. Alat Injeksi Antibodi IgY dan *P. Gingivalis*
 - a. Syringe 1 cc dengan jarum untuk injeksi insulin (13 mm x 0.45 mm)
diameter 30 gauge
- 5. Alat pemeriksaan kadar IL-1 α
 - a. ELISA

4.5.2 Bahan Penelitian

1. Diet Normal (PARS, tepung terigu, air)
2. Bakteri *P. gingivalis*
3. Telur ayam
4. *Polyethylene Glycol* (PEG) 6000

4.6 Definisi Operasional

1. Immunoglobulin Y (IgY) antibody utama pada burung, reptile dan lungfish.
IgY merupakan kelas protein yang dibentuk oleh sistem kekebalan tubuh sebagai reaksi terhadap zat asing tertentu, dan secara khusus mengenali mereka.
2. Bakteri *Porphyromonas gingivalis* merupakan bakteri melanogenik, nonsakarolitik, dan bagian dari koloni bakteri Black-pigmented Gram-negative anaerobes.
3. IL-1 α adalah suatu enzim proteolitik yang mempengaruhi degradasi dari makromolekul matriks ekstraseluler, yaitu kolagen interstitial dan kolagen membrane basalis, fibronektin, lamini dan proteoglikan. IL-1 α dalam proses proteinasinya yang diperlihatkan melalui pathogen periodontal yang terinfeksi akan mengaktifkan IL-1 α inaktif sehingga terlibat dalam degradasi makromolekul matriks ekstraseluler, termasuk juga terlibat

dalam degradasi ligamentum periodontal dapat diukur ekspresinya dengan melihat kadarnya menggunakan alat ELISA kit.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pemberian Pakan Tikus

Kebutuhan pakan tikus perhari adalah 40 gram perhari. Seluruh tikus dalam seluruh kelompok mendapatkan diet makanan normal 40 gram per hari.

4.7.2 Pemilihan Tikus Galur Wistar

- a. 30 ekor tikus putih (*Rattus Novergicus* strain wistar) dipilih yang memenuhi syarat sampel, kemudian dibagi dalam 5 kelompok kontrol. Cara pemilihan tikus yaitu dengan memberi nomor urut pada tiap tikus, kemudian nomor undian ditulis pada kertas kecil lalu dilipat dan dimasukkan dalam kotak undian. Pemilihan secara acak agar setiap tikus mempunyai peluang yang sama untuk mendapat perlakuan.
- b. Tikus didekaputasi untuk pengambilan sampel darah dari jantung dan kemudian diukur kadar IL-1 α .

4.7.3 Pembuatan Suspensi *P. gingivalis*

Cara membuat suspensi *P.gingivalis* adalah dengan mencampur 2 ml larutan BHI-B steril dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 ose *P.gingivalis* dan dihomogenkan diatas sentrifuge. Setelah dilakukan pengenceran dan penambahan aquades steril diukur absorbansinya dengan standar Mc Farland 0,5 dengan absorbansi 0,05 dan panjang gelombang 560 nm menggunakan spektrofotometer (Ermawati , 2013).

4.7.4 Pemilihan Ayam

Penelitian ini digunakan 4 ekor ayam petelur *Single Comb Lenghorn* berusia 24 minggu betina yang siap bertelur. Ayam dipelihara secara terpisah dalam

kandang berukuran (128 x 65 x 80 cm) untuk dua ekor ayam dan diberi pakan komersil ayam petelur dan air minum *ad libitum*. Dalam penggunaan ayam sebagai keperluan penelitian, tempat pemeliharaan ayam penting untuk lebih diperhatikan, lebih baik ayam dipelihara di dalam ruangan serta terdapat pembatasan peneliti yang dapat masuk (Schade, 2005).

4.7.5 Produksi Antibodi IgY *P. Gingivalis*

Menggunakan 4 ekor ayam petelur *Single Comb Lenghorn* 24 minggu betina yang siap bertelur (Carlender, 2002), kemudian pada bawah sayap ayam yang sudah bertelur tersebut disuntikkan 30 µg antigen hasil elektroluensi melalui subkutan. Suntikan yang pertama dicampur dengan complete *Freud's adjuvan*. Suntikan kedua dan selanjutnya dicampur dengan incomplete *Freud's adjuvan* dengan selang waktu 1 minggu. Telur dipanen pada hari ke 5 sampai hari ke 17 setelah pemberian suntikan *booster* ke 2 (Susilo et al., 2004).

Kuning telur dipisahkan dari bagian putih telur, kemudian diletakan diatas kertas saring untuk menghilangkan putih telur yang melekat. Membran kuning telur di lubangi dengan cara diangkat dengan pinset, cairan kuning telur ditampung pada gelas beker dan dilarutkan secara perlahan dalam mili-Q pH 4 dengan perbandingan 1:4. Setelah homogen ditambahkan lagi mili-Q pH 2 hingga suspensi 5,0 sampai 5,2 dan disimpan pada suhu 4 °C selama 20 menit dan supernatan diambil dan diperoleh *Water Soluble Fractination* (WSF). Selanjutnya WSF dibuat hingga pH 7.5. Ekstraksi dilanjutkan dengan PEG 6000 dan amonium sulfat. PEG digunakan untuk memisahkan lemak, mempresipitasi serta mengendapkan IgY (Pauly , 2011). Amonium sulfat sering digunakan untuk memisahkan protein dalam larutan.

4.7.6 Uji SDS-Page

Uji SDS-Page ini digunakan untuk dapat mengetahui keberadaan IgY berdasarkan berat molekulnya. Proses elektroforesis (SDS-PAGE) ekspresi IgY menggunakan metode standar (Görg et al., 2004).

4.7.7 Uji Western Blot

Metode ini bertujuan untuk menguji apakah antibodi yang kita dapatkan dari telur ayam merupakan antibodi terhadap OMP dari *Porphyromonas gingivalis*. Dalam uji ini direaksikan antara antigen yaitu OMP *P.gingivalis* dengan antibodi primer yaitu IgY. Prosedur uji ini Gel elektroforesis tanpa pewarnaan direndam dalam transfer buffer selama 40 menit. Membran nitroselulosa direndam dalam transfer buffer selama 40 menit. Filter tebal (2 buah) ditambah Kasa biasa (2 buah) direndam dalam transfer buffer selama 5 menit. Susun Sandwich terdiri dari filter tebal 2 buah, kertas saring 2 buah, Nitrocellulose membrane, gel, kertas saring 2 buah dan filter tebal 2 buah. Transfer pada 0,3 A, 20 Volt selama 2 jam. Cuci membrane nitroselulosa dengan aquadest untuk menghilangkan gel yang melekat. Rendam dengan Ponceau 2 % selama 3 menit. Cuci dengan aquadest sampai warna hilang. Blocking dengan TBS pH 7,4 dan BSA 3 % selama 2 jam menggunakan shaker pada suhu ruangan. Tambahkan antibodi primer perbandingan 1: 100 overnight pada suhu 4°C. Inkubasikan pada suhu ruangan pada shaker selama 2 jam. Cuci dengan TBS 3 kali 5 menit. Tambahkan substrat alkaline phosphatase selama 30 menit dan siap direkam.

4.7.8 Aplikasi Antibodi IgY

Antibodi IgY diberikan kepada hewan coba yakni dengan cara menginjeksikannya pada sulkus gingiva gigi anterior rahang bawah tikus dengan

dosis 15 µg/ml, 30 µg/ml, dan 45 µg/ml. IgY diinjeksikan hanya pada hari pertama sebelum dilakukan injeksi *P.gingivalis*.

4.7.9 Membuat Tikus Model Periodontitis

Dilakukan injeksi *P.gingivalis* dengan konsentrasi 5µg/0,05mL sebanyak 0,2 mL pada sulkus gingiva gigi anterior rahang bawah tikus dan diberikan seminggu tiga kali selama dua minggu yakni pada hari ke 1,4,7,10,dan 13. Pada hari ke-14, seluruh sampel dilakukan dekaputasi.

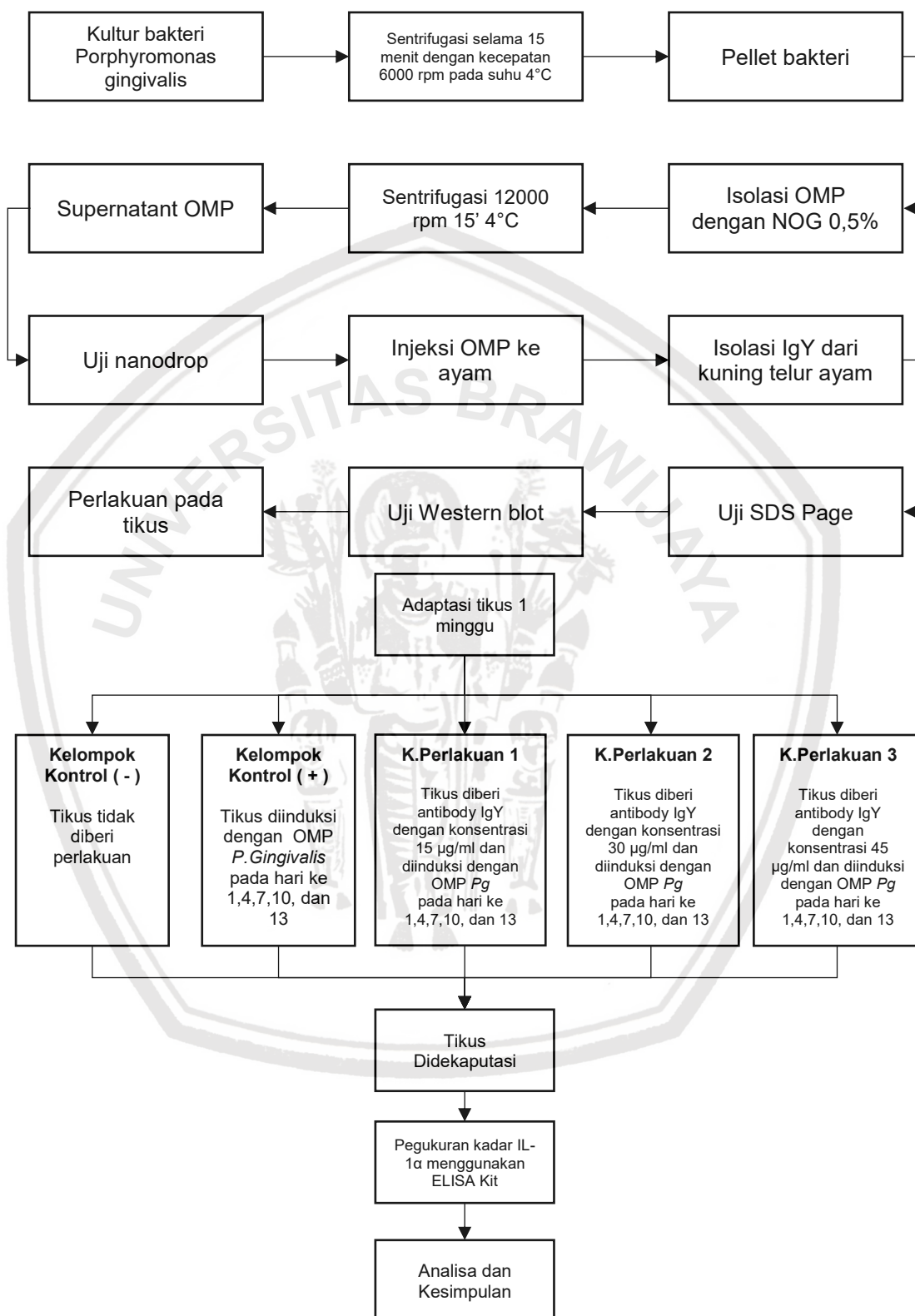
4.7.10 Pengambilan Sampel

Enam ekor tikus wistar pada setiap kelompok I, II, III, IV dan V dilakukan dekaputasi pada hari ke-14 setelah pemberian antibodi IgY pada hari 1 dan 2 minggu pemaparan *P.gingivalis*. Dekaputasi dilakukan dengan cara menganastesi terlebih dahulu tikus secara intra muskular menggunakan ketamin. Selanjutnya dilakukan pembedahan jantung tikus, dan pengambilan sampel darah sebanyak 3 cc. Kemudian darah disentrifuse untuk diambil serumnya, kemudian serum disimpan dalam freezer -20°C, sampai jumlah sampel mencukupi.

4.7.11 Pengukuran Kadar IL-1α

Pengukuran kadar IL-1α menggunakan ELISA kit. Dimana prosedur awal dimulai dengan coating antigen serum darah pada microplate lalu dilanjutkan dengan blocking buffer, penambahan antibodi primer, penambahan antibodi sekunder, dan penambahan *streptavidin-horseradish peroxidase* (SAHRP) sebagai enzim. Setelah itu, dilakukan penambahan stop solution untuk menghentikan reaksi dengan HCl yang dilanjutkan dengan inkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Tahap akhir adalah dilakukan pengukuran absorbansinya menggunakan ELISA reader dengan panjang gelombang ($\lambda=450$ nm).

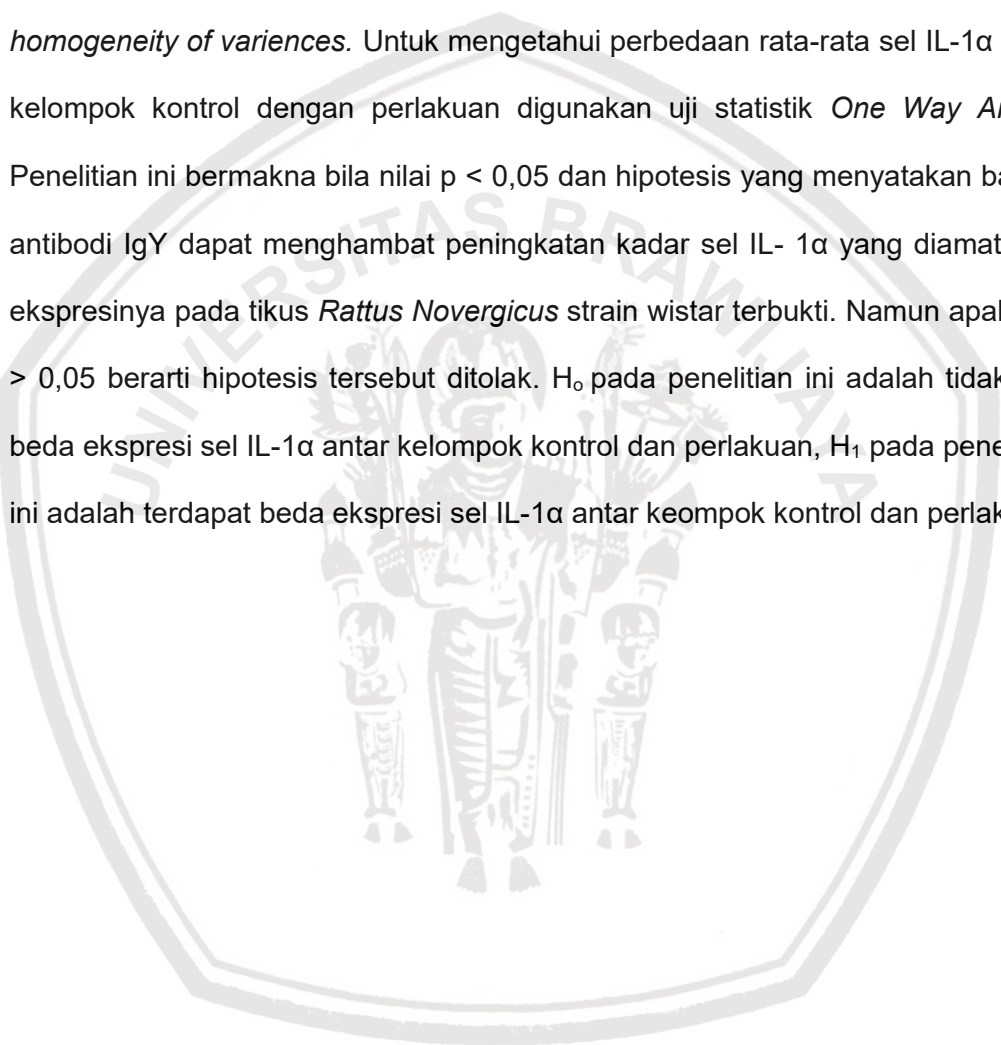
4.8 Alur Prosedur Penelitian



Gambar 4.1 Diagram Alur Prosedur Penelitian

4.9 Analisis Data

Pengambilan data dan analisis data dilakukan setelah 2 bulan penelitian. Analisis ditentukan terhadap pengamatan ekspresi sel IL-1 α pada tikus putih jenis *Rattus Novergicus* strain wistar. Proses analisis data yang terlebih dahulu dilakukan adalah uji normalitas (*Shapiro-Wilk*) dan uji homogenitas/*test of homogeneity of variances*. Untuk mengetahui perbedaan rata-rata sel IL-1 α antar kelompok kontrol dengan perlakuan digunakan uji statistik *One Way Anova*. Penelitian ini bermakna bila nilai $p < 0,05$ dan hipotesis yang menyatakan bahwa antibodi IgY dapat menghambat peningkatan kadar sel IL- 1 α yang diamati dari ekspresinya pada tikus *Rattus Novergicus* strain wistar terbukti. Namun apabila $p > 0,05$ berarti hipotesis tersebut ditolak. H_0 pada penelitian ini adalah tidak ada beda ekspresi sel IL-1 α antar kelompok kontrol dan perlakuan, H_1 pada penelitian ini adalah terdapat beda ekspresi sel IL-1 α antar keompok kontrol dan perlakuan.



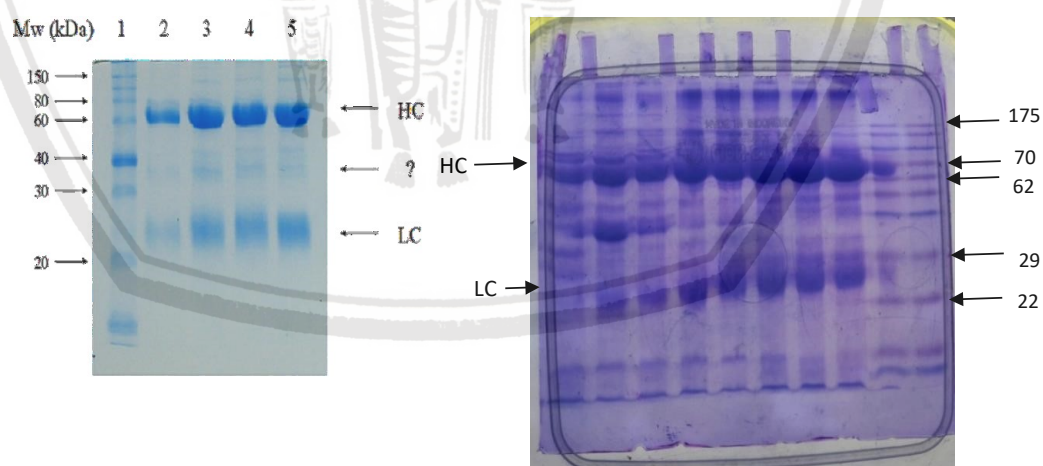
BAB V

HASIL PENELITIAN & ANALISA DATA

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektifitas vaksin dari *immunoglobulin Y* (Ig Y) dalam kuning telur ayam (*Gallus gallus domesticus*) terhadap ekspresi IL-1 α pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang telah terpapar *P.gingivalis*. Sampel yang digunakan sebanyak 30 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar yang dibagi menjadi 5 kelompok kontrol, yakni : kelompok kontrol negatif (K-), kelompok kontrol positif (K+) atau OMP, dan tiga kelompok perlakuan (P1, P2, P3) dengan dosis masing- masing sebesar 15 μ g/ml, 30 μ g/ml, 45 μ g/ml . Kemudian dihitung titer IL-1 α dengan menggunakan ELISA Kit IL-1 α Rat.

5.1 Hasil Penelitian

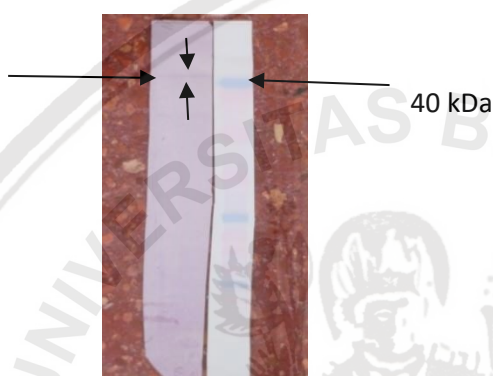
5.1.1 Hasil Uji SDS-PAGE



Gambar 5.1 Hasil SDS-PAGE IgY (Pauly, D; Chacana P.A) & Hasil SDS-PAGE IgY menurut teori hasil penelitian

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Paully D, IgY memiliki dua rantai protein yakni HC (heavy chain) dan LC (light chain). HC terdapat pada kisaran angka 60-80 kDa serta LC terdapat pada kisaran angka 20-30 kDa. Pada hasil purifikasi IgY, HC terdapat pada kisaran angka 62-70 kDa serta LC pada kisaran 22-29 kDa.

5.1.2 Hasil Uji Western-Blot



Gambar 5.2 Hasil Uji Western Blotting IgY dan OMP *P. Gingivalis*



Gambar 5.3 Profil SDS PAGE dari OMP *P.gingivalis* menurut literatur

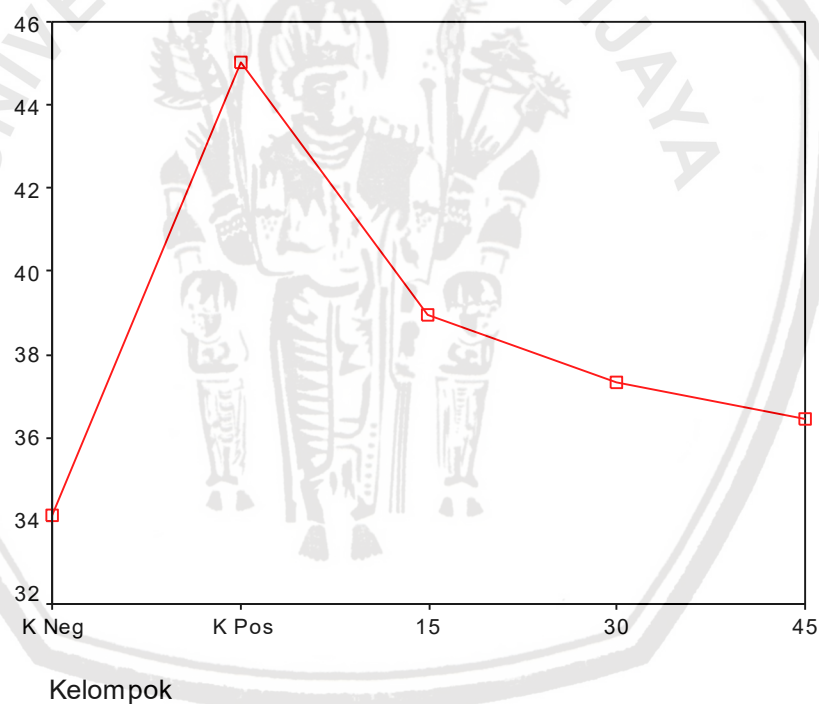
Hasil pengujian Western Blotting (Gambar 5.2) menunjukkan adanya pita protein yang muncul dengan berat molekul sekitar 40 kDa pada membran. Pita protein ini menunjukkan adanya ikatan antigen Outer Membran Protein *P.gingivalis* dengan antibodi IgY pada membran NC.

5.1.3 Kadar IL-1 α

Kadar IL-1 α didapatkan dari pemeriksaan serum darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar yang telah diinjeksi *P.gingivalis* dengan menggunakan ELISA kit IL-1 α Rat pada kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan. Rata-rata kadar IL-1 α ditampilkan dalam tabel 5.1 dan gambar 5.4 berikut ini.

Kelompok	K (-)	K (+)	P1	P2	P3
1	38.39	51.63	48.75	27.02	30.55
2	25.05	54.8	37.77	40.17	38.16
3	32.27	38.64	44.37	40.02	35.88
4	33.36	39.87	34.32	35.74	34.29
5	40.21	48.98	35.14	37.9	51.4
6	35.59	36.15	33.27	43.1	28.57
Mean $\pm$ SD	34.1450	45.0117	38.9348	37.3232	36.4733
	± 5.36117	± 7.75749	± 6.24388	± 5.61719	± 8.10366

Tabel 5.1 Rata-rata Kadar IL-1 α



Gambar 5.4 Rata-rata Kadar IL-1 α setelah pemberian vaksin immunoglobulin Y

Rata-rata peningkatan kadar IL-1 α tertinggi terdapat pada kelompok K(+) atau yang diinjeksi OMP, dan rerata kadar IL-1 α terendah pada kelompok K(-) atau yang tidak diberi OMP maupun vaksin dari Immunoglobulin Y.

5.2 Analisa Data

5.2.1 Uji Normalitas dan Homogenitas

Uji One Way Anova merupakan uji parametrik yang dilakukan untuk menganalisis data, tetapi sebelum melakukan uji One Way Anova ada beberapa asumsi yang harus dipenuhi, yaitu lebih dari 2 kelompok yang tidak berpasangan, berdistribusi normal dan varian data harus sama.

Uji statistik yang pertama dilakukan adalah uji normalitas dengan menggunakan One-Sample Saphiro-Wilk, didapatkan hasil bahwa data kelompok menyebar secara normal ($p > 0,05$; $p = 0,218$). Langkah selanjutnya adalah menentukan apakah data memiliki varian yang sama ($p > 0,05$; $p = 0,623$), dengan demikian telah memenuhi syarat untuk melakukan uji One Way ANNOVA.

5.2.2 Uji One Way ANOVA

Penelitian ini menggunakan variabel numerik untuk mengetahui adanya pengaruh yang signifikan antara pemberian vaksin dari immunoglobulin Y terhadap ekspresi IL-1 α pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang telah terpapar *P. Gingivalis*.

Hasil uji statistik One Way Anova didapatkan nilai ($p < 0,05$; $p = 0,094$), hal ini menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara 5 kelompok perlakuan yang berbeda.

5.2.3 Uji Pos Hoc Tukey Homogeneous Subset

Uji Pos Hoc Tukey HSD Homogeneous Subsets digunakan untuk mengetahui kelompok mana yang tidak signifikan. Nilai kelompok pada kelompok subset menunjukkan bahwa kelompok-kelompok tersebut tidak memiliki

perbedaan yang signifikan, sedangkan kelompok lainnya yang berada pada kolom subset yang berbeda maka kelompok tersebut memiliki perbedaan yang signifikan.

Kelompok	K (-)	K (+)	P1	P2	P3
K (-)	-	0.066	0.731	0.922	0.974
K (+)	0.066	-	0.530	0.302	0.211
P1	0.731	0.530	-	0.933	0.968
P2	0.922	0.302	0.993	-	0.999
P3	0.974	0.211	0.968	0.999	-

Tabel 5.2 Hasil Uji Post Hoc Turkey HSD

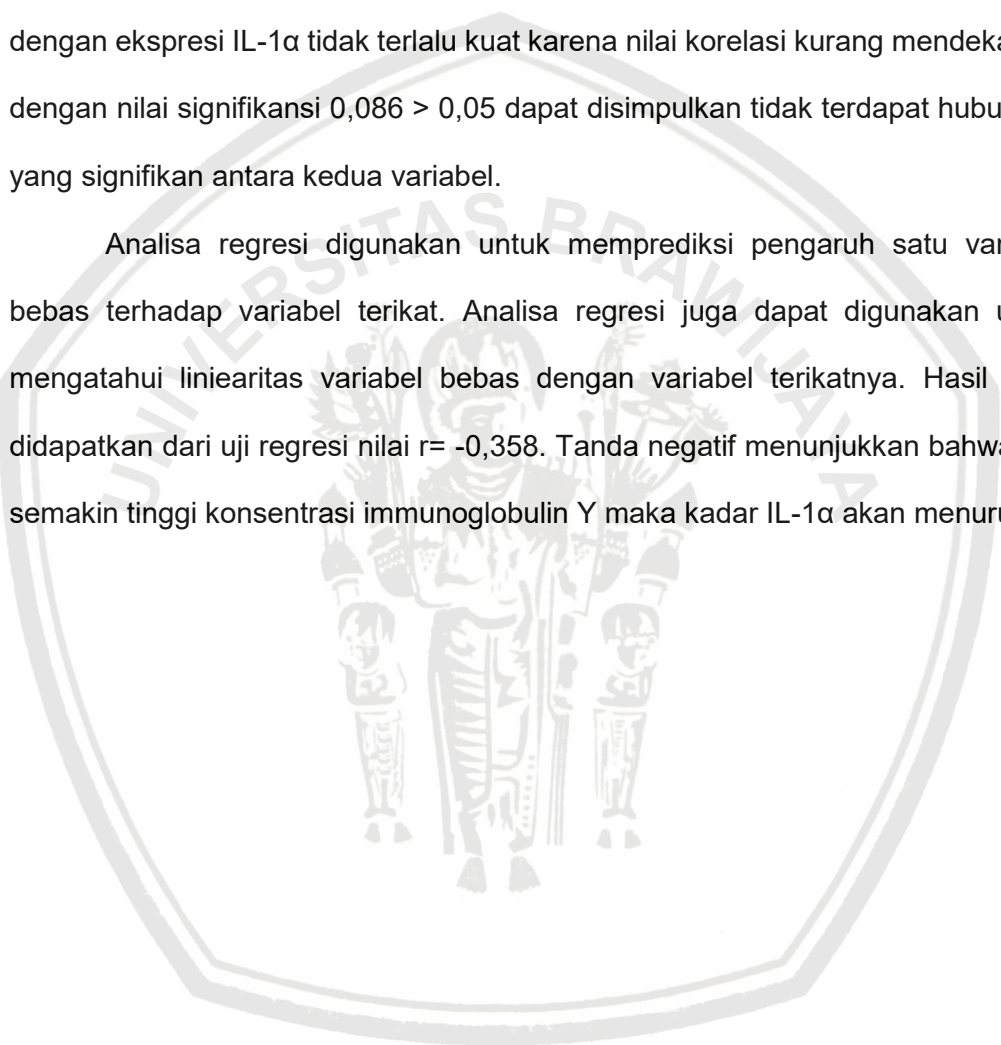
Dari hasil analisa statistik dengan tingkat signifikansi 5% dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada kadar IL-1 α kelompok P1 yang diberi diet normal disertai pemberian vaksin immunoglobulin Y dengan dosis 15 μ g/ml jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (K+), tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada kadar IL-1 α kelompok P2 yang diberi diet normal disertai pemberian vaksin immunoglobulin Y dengan dosis 30 μ g/ml jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (K+), serta tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada kadar IL-1 α kelompok P3 yang diberi diet normal disertai pemberian vaksin immunoglobulin Y dengan dosis 45 μ g/ml apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (K+)

5.2.4 Uji Korelasi dan Regresi

Uji korelasi pearson dilakukan untuk mengetahui seberapa besar pengaruh pemberian vaksin immunoglobulin Y terhadap ekspresi IL-1 α . Hasil yang

didapatkan dari uji korelasi yakni korelasi pearson 0,358 artinya terdapat hubungan antara konsentrasi vaksin dari immunoglobulin Y dengan ekspresi IL-1 α pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang telah terpapar *P.Gingivalis*. Hal ini menunjukkan bahwa immunoglobulin Y dapat menurunkan kadar IL-1 α sebesar 35,80%. Hubungan korelasi antara konsentrasi vaksin dari immunoglobulin Y dengan ekspresi IL-1 α tidak terlalu kuat karena nilai korelasi kurang mendekati +1 dengan nilai signifikansi $0,086 > 0,05$ dapat disimpulkan tidak terdapat hubungan yang signifikan antara kedua variabel.

Analisa regresi digunakan untuk memprediksi pengaruh satu variabel bebas terhadap variabel terikat. Analisa regresi juga dapat digunakan untuk mengetahui linieritas variabel bebas dengan variabel terikatnya. Hasil yang didapatkan dari uji regresi nilai $r = -0,358$. Tanda negatif menunjukkan bahwa jika semakin tinggi konsentrasi immunoglobulin Y maka kadar IL-1 α akan menurun.



BAB VI

PEMBAHASAN

6.1 SDS-PAGE

Immunoglobulin Y (IgY) dari kuning telur ayam dapat dipurifikasi melalui metode *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Protein antibody IgY dipisahkan melalui tahapan pengendapan dengan amonium sulfat, dialysis, pengendapan dengan *polyethylinglycol* (PEG), dan akhirnya dilakukan ke dalam kolom FPLC. IgY yang dihasilkan melalui metode HPLC menunjukkan hasil yang lebih murni dibandingkan dengan metode lainnya.

Hasil purifikasi IgY kemudian dianalisis apakah benar-benar terdapat IgY dari hasil purifikasinya dengan menggunakan uji SDS-PAGE, yaitu dilihat dari berat molekulnya. Hasil visualisasi berat molekul IgY melalui SDS-PAGE disajikan pada Gambar 5.1. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Pauly D, IgY memiliki berat molekul sebesar 180 kDa dan memiliki 2 rantai protein yakni HC dan LC. HC terdapat pada kisaran angka 60-80 kDa serta LC terdapat pada kisaran angka 20-30 kDa. Pada hasil purifikasi IgY, HC terdapat pada kisaran angka 62-70 kDa serta LC pada kisaran 22-29 kDa, Apabila dibandingkan kedua hasil SDS-PAGE ini menunjukkan kemiripan, sehingga dapat dikatakan hasil uji SDS-PAGE pada IgY penelitian ini berhasil dan memiliki hasil mendekati teori. Sehingga dapat disimpulkan terdapat IgY pada protein kuning telur yang telah diisolasi.

6.2 Western-Blot

Western-Blot dilakukan untuk menguji apakah antibody IgY yang didapatkan dari hasil purifikasi kuning telur ayam merupakan antibody yang spesifik terhadap OMP *P.gingivalis*.

Hasil SDS-PAGE pada literature (Franca M,2007), menunjukkan bahwa profil pita protein OMP mempunyai berat molekul sekitar 40 kDa. Hasil Pengujian Western Blotting pada Gambar 5.2 menunjukkan adanya pita protein yang muncul dengan berat molekul sekitar 40 kDa pada membrane. Pita protein ini menunjukkan adanya ikatan antigen OMP *P.gingivalis* dengan antibody IgY pada membrane NC. Adanya kemiripan berat molekul yang ditunjukkan melalui Teknik Western Blotting dan SDS-PAGE menunjukkan bahwa pita protein yang dimaksud sama yaitu protein yang diyakini sebagai OMP *P.gingivalis*. Hal ini dibuktikan dengan munculnya satu pita protein pada sampel perlakuan dengan berat molekul sekitar 40 kDa sebagai konfirmasi bahwa isolat protein hasil isolasi OMP PG merupakan antigen yang mampu dikenali secara spesifik oleh antibodi IgY. Pernyataan tersebut telah sesuai dengan pernyataan Sasaki et, al tahun 2009, yang menyatakan bahwa OMP PG merupakan protein dengan berat molekul sekitar 40 kDa.

6.3 Kadar IL-1 α Pada Tikus Percobaan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektifitas vaksin dari *immunoglobulin Y (Ig Y)* dalam kuning telur ayam (*Gallus gallus domesticus*) terhadap ekspresi IL-1 α pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang telah terpapar *P.gingivalis*. Sampel yang digunakan sebanyak 30 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar yang dibagi menjadi 5 kelompok kontrol, yakni kelompok kontrol negatif (K-), kelompok kontrol positif (K+) atau OMP, dan tiga kelompok perlakuan (P1, P2, P3) dengan dosis masing- masing sebesar 15 μ g/ml, 30 μ g/ml, 45 μ g/ml . Kemudian dihitung titer IL-1 α dengan menggunakan ELISA Kit IL-1 α Rat.

Pemberian vaksin pada tikus menggunakan syringe dengan jarum berukuran 30 gauge. Pada saat akan dilakukan injeksi, gigi yang dimiliki tikus dan serupa dengan gigi manusia adalah gigi insisivus. Oleh karena itu IgY diinjeksikan pada sulkus gingiva gigi insisivus rahang bawah tikus. Vaksin diberikan selama satu kali, yakni pada hari pertama dan pada hari berikutnya langsung diinjeksi dengan antigen yaitu OMP *P.gingivalis* sebanyak 0.2 ml selama 3 hari sekali dalam 2 minggu (Ermawati T, 2013). Pada akhir penelitian sampel 30 ekor tikus tetap hidup dan tidak ada sampel yang mati, tikus didekaputasi dan diambil serum darah dari jantungnya sebanyak 3 cc untuk kemudian dilakukan pengukuran kadar IL-1 α dalam serum darah tikus.

Waktu penyimpanan vaksin dan serum darah tikus juga dapat mempengaruhi keakuratan hasil penelitian. Penyimpanan vaksin *immunoglobulin* Y di dalam *ice box* pada saat perjalanan dari laboratorium kurang lebih selama 1 jam sebelum diinjeksikan ke tikus memungkinkan dapat mempengaruhi kandungan maupun efektivitas dari vaksin terhadap bakteri *P.gingivalis*, sehingga menyebabkan efektivitas konsentrasi pada beberapa perlakuan memiliki hasil yang kurang optimal. Pemantauan suhu penyimpanan vaksin sangat penting untuk menentukan apakah vaksin masih layak digunakan atau tidak, atau rentan dan mudah rusak. Suhu yang baik untuk mengelola vaksin adalah 2° - 8°C dan faktor lain yang dapat mempengaruhi rusaknya vaksin yakni belum melampaui masa kadaluarsa, kualitas pengelola vaksin dan cara membawa vaksin dari satu tempat ke tempat lain. Rantai dingin (*cool chain*) adalah suatu prosedur yang digunakan untuk menjaga vaksin pada suhu tertentu sampai disuntikkan atau diteteskan pada sasaran (Pracoyo et al, 2013). Aktivitas IgY dapat dipertahankan cukup lama pada suhu 37 °C. Aktivitas IgY masih baik sampai jangka waktu 6 bulan dan

bahkan dapat dipertahankan selama 10 tahun pada penyimpanan suhu 4 °C (Michael et al. 2010). Selain itu kualitas serum darah tikus sebagai sampel penelitian juga harus diperhatikan, serum darah tikus dapat disimpan selama 1 bulan dalam suhu 4°C, dan dapat disimpan selama 1 tahun jika disimpan dalam 20-50% gliserol, dan jika selama beberapa tahun dapat disimpan dalam suhu -20°C hingga -80°C.

Pengukuran kadar IL-1 α pada penelitian ini dihitung dengan menggunakan ELISA Kit IL-1 α Rat. Beberapa prosedur membutuhkan ketelitian yang tinggi. Selain itu sejumlah prosedur pengkondisian serum agar terbaca oleh ELISA reader membutuhkan ketepatan pembuatan standart, ukuran pengambilan serum darah dan jumlah waktu.

Tabel 5.1 menunjukkan bahwa rata-rata kadar IL-1 α pada kelompok kontrol negatif (K-) dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (K+) menunjukkan data yang tidak signifikan. Tetapi pada kelompok control positif (K+) dengan pemberian OMP bakteri *P.gingivalis* saja tanpa pemberian vaksin IgY menunjukkan kadar yang paling tinggi dibandingkan dengan kelompok perlakuan lain. Dimana hal ini diduga bahwa *P.gingivalis* mengeluarkan produk virulensi di daerah yang diinjeksikan bakteri tanpa pemberian IgY sebagai vaksin dan imunoterapi, sehingga pada saat diakhir penelitian dengan melihat kadar dari IL-1 α menggunakan ELISA- Kit tampak peningkatan yang sangat tinggi dibandingkan kelompok perlakuan dan kontrol lainnya.

Kelompok Perlakuan (P1, P2, P3) dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (K-) menunjukkan data yang tidak signifikan. Artinya data tersebut tidak berbeda. Hasil analisis dihitung menggunakan uji statistik menunjukkan bahwa kadar IL-1 α pada kelompok perlakuan mendapatkan hasil yang tidak signifikan jika

dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif K(-). Namun pada gambar 5.4 menunjukkan bahwa Ig Y mampu menurunkan kadar IL-1 α yaitu ditandai dengan menurunnya kurva kadar IL-1 α pada kelompok perlakuan (P1, P2, P3). Pemberian dosis ditentukan dengan acuan pada penelitian sebelumnya mengenai potensi IgY pada *vibrio cholera* yang efektif pada dosis 20 μ g/ml (Jiwintarum dkk, 2014). Hasil penelitian menunjukkan bahwa IgY yang diberikan dengan dosis 15 μ g/ml dapat digunakan sebagai vaksin dan imunoterapi yg efektif terhadap bakteri *P.gingivalis* jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif K(+), namun kadar IL-1 α masih berada diatas kelompok kontrol negatif K(-). Artinya, dosis 15 μ g/ml belum efektif untuk menurunkan kadar IL-1 α untuk membuat tikus menjadi sehat seperti semula.

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian vaksin dari Immunoglobulin Y dapat menurunkan kadar IL-1 α pada hewan coba. Serta didapatkan hasil dari ketiga kelompok perlakuan tersebut, vaksin dengan dosis 45 μ g/ml paling efektif untuk mencegah inflamasi jaringan periodontal yang ditandai dengan kadar IL-1 α yang lebih rendah dari kelompok perlakuan lain. Hal ini dikarenakan IgY bekerja dengan mengikat zat antigenic bakteri (LPS, OMP *P.gingivalis*, atau flagella) kemudian menghambat adhesi mikroba ke permukaan sel, menekan kolonisasi mikroba dengan mencegah penyebaran sel ke sel, menggumpalkan bakteri dengan membuat mikroba tidak bergerak dan mati atau mudah untuk dikeluarkan melalui usus, mengambat aktivitas enzim, netralisasi aktivitas toksin (Rahman et al, 2013) sehingga kadar IL-1 α sebagai mediator proinflamasi berkurang.

Uji kolerasi pearson menunjukkan hasil nilai $r=0,358$, hal ini menunjukkan bahwa vaksin immunoglobulin Y dapat menurunkan kadar IL-1 α sebesar 35,80%. Sisanya dapat disebabkan karena faktor lain seperti faktor fisiologis, psikologis,

dan pola makan yang dapat mempengaruhi kondisi saat dilakukannya penelitian. Uji korelasi ini menunjukkan hubungan antara dua variabel atau lebih dan merupakan angka yang menunjukkan arah dan juga kuatnya hubungan antar dua variabel atau lebih. Hubungan 2 variabel atau lebih yang menunjukkan angka negatif, maka berarti bahwa bila dosis yang digunakan dinaikkan, maka kadar dari variabel yang diteliti menurun. Penelitian ini menunjukkan bahwa dengan peningkatan dosis vaksin IgY diikuti dengan kadar IL-1 α yang menurun.

Kelemahan dari hasil penelitian ini adalah belum diketahui secara pasti pengaruhnya bila digunakan pada manusia dan belum mengetahui secara pasti apakah tikus mengalami kondisi benar-benar periodontitis, gingivitis ataupun trauma. Kelemahan lainnya yakni mengenai waktu saat injeksi OMP *P.gingivalis* yang terlalu singkat, karena pada awal penelitian diharapkan tikus mengalami periodontitis. Progresifitas dari penyakit periodontal sendiri dibagi menjadi 4 stages. Stage 1 yakni *gingivitis* dimana ditandai dengan kedalaman pocket sekitar 2-4 mm, Stage 2 yakni *slight periodontitis* dimana ditandai dengan kedalaman pocket sekitar 4-5 mm, stage 3 yakni *moderate periodontitis* dimana ditandai dengan kedalaman pocket sekitar 6-7 mm, dan stage 4 *advanced periodontitis* dimana ditandai dengan kedalaman pocket lebih dari 7 mm. Proses awalnya dimulai dari 2 minggu. Pada tikus perkembangan penyakit periodontal menjadi kronis membutuhkan waktu 4 hingga 5 minggu (Oz et al, 2011), namun beberapa sumber menyebutkan bahwa kondisi periodontitis akan berlangsung dalam hitungan bulan.

Penelitian selanjutnya diharapkan penelitian ini dikembangkan dengan menemukan vaksin maupun ekstrak lainnya untuk mencegah peningkatan kadar IL-1 α . Penggunaan alat-alat yang berteknologi tinggi dapat dilakukan untuk

meminimalisir kesalahan yang dapat terjadi dan dilakukan pemeriksaan klinis untuk melihat secara klinis bahwa kondisi tikus telah mengalami periodontitis dengan probing menggunakan probe, pemeriksaan kerusakan tulang dan resesi gingiva.



BAB VII

KESIMPULAN & SARAN

7.1 Kesimpulan

1. Vaksin dari Immunoglobulin Y (IgY) dalam kuning telur ayam (*Gallus gallus domesticus*) tidak berpengaruh terhadap kadar IL-1 α pada tikus putih yang terpapar *Porphyromonas gingivalis*.

7.2 Saran

1. Hewan coba yang digunakan untuk penelitian imunogenik sebaiknya menggunakan mice karena dapat menghasilkan respon yang lebih cepat daripada menggunakan tikus wistar.
2. Untuk menghasilkan IgY yang lebih baik sebaiknya menggunakan ayam *Specific Pathogen Free* (SPF).
3. Perlu dilakukan pemeriksaan kedalaman pocket pada tikus untuk mengetahui apakah tikus benar-benar sudah mengalami periodontitis.
4. Karena vaksin IgY yang diberikan tidak dipengaruhi oleh asam lambung, maka pada penelitian selanjutnya vaksin lebih baik diberikan secara sistemik.
5. Memeriksa kadar IgY pada tubuh tikus untuk memastikan apakah IgY sudah terdistribusi secara sistemik.
6. Pada penelitian selanjutnya perlu dilakukan pengujian vaksin IgY pada konsentrasi 10 μ g/ml, 20 μ g/ml, dan 40 μ g/ml.

DAFTAR PUSTAKA

- Carlender D. 2002. *Avian Immunoglobulin Y Antibody In Vitro and In Vivo*. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine 1119. Acta Universitatis Upsaliensis.
- Champagne CM, Buchanan W, Reddy MS, Preisser JS, Beck JD, Offenbacher S. Potential for gingival crevice fluid measures as predictors of risk for periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 2003;31:167–80.
- Chismirina S. 2006. Efek Immunoglobulin Y (IgY) sebagai Anti Adhesin pada Pembentukan Biofilm oleh *Streptococcus mutans*. Tesis. Program Pasca Sarjana Departemen Biologi Oral. FKG-UI. Jakarta
- Damanik S., Joesevina Silalahi. Kebutuhan Perawatan Penyakit Periodontal Dan Perilaku Pemeliharaan Gigi Pada Masyarakat Di Kecamatan Pangururan Samosir. *Dentika Dental Jurnal*. 2011; 16: 154-155.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2011. Hasil Survey Kesehatan Rumah Tangga.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2014. Farmakope Indonesia Edisi V
- Duncan, L., Yoshioka, M., Chandad, F., & Grenier, D. (2004). Loss of lipopolysaccharide receptor CD14 from the surface of human macrophage-like cells mediated by *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles. *Microbial Pathogenesis*, 36(6), 319–325.
- Ermawati T. 2013. *Potensi Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta (Coffea Robusta) terhadap Ekspresi Tnf-A Pada Tikus Periodontitis yang Diinduksi Porphyromonas Gingivalis*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Ferdous F, Maurice D, Scott T. 2008. *Broiler chick thrombocyte response to lipopolysaccharide*. *Poult Sci*. 87:61-63.
- Franca M, Moura-Costa L, Meyer R J, Trindade S C, Freire. Humoral Immune Response to Antigens of *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 in Chronic Periodontitis. *J Appl Oral Sci*. 200; 15(3) :213-9.
- Görg, A., Weiss, W. and Dunn, M.J., 2004. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 4(12), pp.3665-3685.

- Grenier D., Tanabe S. 2010. *Porphyromonas gingivalis* Gingipains Trigger a Proinflammatory Response in Human Monocyte-derived Macrophages Through the p38 α Mitogen-activated Protein Kinase Signal Transduction Pathway. *Toxins*, Vol. 2; p: 341-352.
- Iriano, A. 2008. Efek Antibakteri Aloe Vera Terhadap *Porphyromonas gingivalis* In Vitro (Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi dan Infundasi). Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jakarta: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia.
- Jiwintarum Y, Zulkifli, Maruni W.D. 2014. *Titer Immunoglobulin Y (Ig Y) Pada Kuning Telur Ayam Ras Strain Leghorn Tervaksinasi Antigen Vibrio Choleraedan Uji Potensinya Dalam Pengobatan Diare (Uji Coba Pada Mencit)*. Media Bina Ilmiah, Vol 8 No.4
- Khan MZI, Akter SH, Islam MN, Karim MR, Islam MR, Kon Y. 2008. *The effect of selenium and vitamin E on the lymphocytes and immunoglobulin-containing plasma cells in the lymphoid organ and mucosa-associated lymphatic tissues of broiler chickens*. Anat Histol Embryol. 37:52-59.
- Kim, J. and Amar, S., 2006. Periodontal disease and systemic conditions: a bidirectional relationship. *Odontology*, 94(1), pp.10-21.
- Kitaguchi, K. et al. Exclusion of polymeric immunoglobulins and selective immunoglobulin Y transport that recognizes its Fc region in avian ovarian follicles. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.121, p.290-299, 2008.
- Koebnik, R., Locher, K. P., & Van Gelder, P. (2000). Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Molecular Microbiology*, 37(2), 239–253.
- Kovacs, Jennifer et al. Egg Yolk Antibodies for Passive Immunity. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2012.3:163-182
- Lindberg Tulay-Yucel, and Bage Tove. 2013. Inflammatory Mediators in the Pathogenesis of Periodontitis. Available from: <http://www.expertreviews.org/>. (30 Februari 2017)
- Mazengia H, Gelaye E, Nega M. 2009. *Evaluation of newcastle disease antibody level after different vaccination regimes in three districts of Amhara Region, Northwestern Ethiopia*. J Infect Dis Immun. 1:16-19.
- Michael, A ., Meenatchisundaram, S ., Parameswari, G., Subbraj, T ., Selvakumaran,R., Ramalingam, S. 2010. Chicken Egg Yolk Antibodies (Igy) As An Alternative To Mammalian Antibodies. *Indian Journal of Science and Technology*, vol 3, No 4.

- Moon JJ, Chu HH, Pepper M, McSorley SJ, Jameson SC, Kedl RM, Jenkins MK. 2007. *Naive CD4+ T cell frequency varies for different epitopes and predicts repertoire diversity and response magnitude*. *Immunity*. 27:203-213.
- Munhoz, L. S., Vargas, G. D., Fischer, G., Lima, M. de, Esteves, P. A., & Hübner, S. de O. (2014). Avian IgY antibodies: characteristics and applications in immunodiagnostic. *Ciência Rural*, 44(1), 153–160. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782014000100025>
- Mysak J., Podzimek S., Sommerova P., et al. 2013. Review Article *Porphyromonas gingivalis*: Major Periodontopathic Pathogen Overview. *Journal of Immunology Research*. Volume 2014, Article ID 476068, 8 pages.
- Nakamura, 1. and Jimi, E. (2006). Regulation of osteoclast differentiation and function by interleukin-1. *Vitam Horm* 74,357-70.
- Nasrin M, Khan MZI, Siddiqi MNH, Masum MA. 2013. *Mobilization of immunoglobulin (Ig)-containing plasma cells in harderian gland, cecal tonsil and trachea of broilers vaccinated with Newcastle disease vaccine*. *Tissue Cell*. 45:191-197.
- Newman M., Carranza, F. Takei H., dan Klokkevold, P. 2015. *Clinical Periodontology*. 12th edition. Philadelphia: WB Saunders.
- Notoatmodjo, S. 2010. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta: Rineka Cipta.
- Oz, H. S., & Puleo, D. A. (2011). Animal models for periodontal disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011.
- Pauly, D., Chacana, P.A., Calzado, E.G., Brembs, B., Schade, R. IgY Technology: Extraction of Chicken Antibodies from Egg Yolk by Polyethylene Glycol (PEG) Precipitation. *J. Vis. Exp.* (51), e3084, doi:10.3791/3084 (2011).
- Plotkin S. Vaccines, vaccination, and vaccinology. *J. Infect Dis*2003; 187:1347–59.
- Plotkin S. Correlates of vaccine-induced immunity. *Clin Infect Dis*2008; 47:401–9.
- Poetri, O. N., Soejoedono, R. D. (2006). Produksi antibodi kuning telur (IgY) anti *Streptococcus Mutans* sebagai anti karies gigi. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 11(3), 6-10.
- Pracoyo, N.E., Jekti, R.P., Puspandari, N., Bagus, D.W. 2013. Relationship Between Knowledge And Attitudes Of Managers With Vaccine Management Assessment Scores In The Areas With Diphteria Cases In East Java. *Media Litbangkes* ,Vol 23 No. 3.

- Putri, Anna R. 2009. Inflamasi dan Kehilangan Tulang pada Penyakit Periodontal. Skripsi. Universitas Sumatera Utara.
- Radiananda, Gita. 2008. *Efek Antibakteri Infusum Kulit Aloe Vera terhadap Porphyromonas Gingivalis In Vitro (Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi dan Infundasi)*. Universitas Indonesia.
- Rahman S, Nguyen SV, Icatlo FC, Umeda K, and Kodama Y. 2013. Oral passive IgYbased immunotherapeutics. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3899138/>. (10 Maret 2017)
- Rawendra R. 2005. *Prospek Pengembangan Immunoglobulin Y (IgY) Kering Beku sebagai Nutraceutical Food Anti Enteropathogenic Eschericia coli (EPEC)*. Disertasi. Program Pasca Sarjana. FKH-IPB Bogor.
- Ricke, S.C., 2016. Microbial ecology of eggs: a focus on Salmonella and microbial contamination in post-harvest table shell egg production. Quantitative Microbiology in Food Processing: Modeling the Microbial Ecology, pp.416-441.
- Sarwono, B. 1995. Pengawetan dan Pemanfaatan Telur. Penerbar Swadaya, Jakarta.
- Sasaki, Y., Hajime Hatta, Yoshimitsu Abiko. 2009. Production of IgY Against a Porphyromonas gingivalis 40-kDa Outer Membrane Protein That Inhibits Its Hemagglutinating Activity. Int J Oral-Med Sci 8(1):12-18.
- Satari, H.I., Hadinegoro, S.R., Tumbelaka, A.R., Abdoerrachman, H., Han, H.H. and Bock, H., 2016. Immunogenitas dan Keamanan Vaksin Varisela pada Anak Sehat. Sari Pediatri, 3(4), pp.202-5.
- Schade, R. et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. Alternatives to Laboratory Animals, v.33, p.129-154, 2005.
- Scott T, Owens MD. 2008. Thrombocytes respond to lipopolysaccharide through Toll-like receptor-4 and MAP kinase and NF- κ B pathways leading to expression of interleukin-6 and cyclooxygenase-2 with production of prostaglandin E2. Mol Immunol. 45:1001-1008.
- Setiawan RB., Iriana D., Rosidah. 2012. Efektivitas Vaksin dari Bakteri *Mycobacterium fortuitum* yang Diinaktivasi dengan Pemanasan untuk Pencegahan Penyakit Mycobacteriosis pada Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy*). Jurnal Perikanan dan Kelautan Vol. 3. No. 1, Maret 2012: 25-40.

- Situmorang N. Status Perilaku dan Pemeliharaan Kesehatan Gigi dan Mulut Murid Sekolah Di 8 Kecamatan di Kota Medan. *Dentika Dental Journal*. 2008; 13 : 15.
- Siquera JF Jr and Rocas IN. 2007. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. *Braz Dent J*; 18(4):267-80.
- Soejoedono, R. 2005. *Flu Burung*. Depok: Penebar Swadaya.
- Solimun. 2001. *Kaidah dan Metode Analisis Data*. Surabaya: UPN
- Suartha IN. 2006. Karakteristik Immunoglobulin Y Antitetanus di Isolasi dari Telur Ayam sebagai Pengganti Antitetanus Serum Kuda. Disertasi. Program Pasca Sarjana. FKH-IPB Bogor
- Susilo J, Teguh R, Sartono, dan Sumarno. 2004. Deteksi Bakteri *Klebsiella pneumonia* pada Sputum dengan Metode Immunohistokimia Menggunakan Anti Outer Membran Protein Berat Molekul 40 Kda *Klebsiella pneumonia* Sebagai Antibodi. *Jurnal Kedokteran Brawijaya* Vol. XX. No. 1, April 2004.
- Vijayaraghavan, K. and Yun, Y.S., 2008. Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology advances*, 26(3), pp.266-291.
- Winn. 2006. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology 6th ed. USA: Lippincott Williams and Wilkins; p: 87-8.
- Yustina, A. R., Suardita, K., & Agustin, D. (2012). Peningkatan Jumlah Osteoklas pada Keradangan Periapikal Akibat Induksi Lipopolisakarida *Porphyromonas Gingivalis* (Suatu Penelitian Laboratories menggunakan Tikus) (Osteoclast Increasing Number in Periapical Inflammation Due to Lipopolisaccharide Porphy. *Jurnal Bina Praja (JBP)*, 14(3), 140–144.
- Zhou, Q., Desta, T., Fenton, M., Graves, D. T. and Amar, S. (2005). Cytokine profiling of macrophages exposed to *Porphyromonas gingivalis*, its lipopolysaccharideo, r its FimA protein. *Infect Immun* 73,935-43.