

**EFEK PAPARAN ASAP ROKOK TERHADAP KADAR
OSTEOPROTEGERIN DI GINGIVAL CREVICULAR FLUID
PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI
BAKTERI *Aggregatibacter actinomycetemcomitans***

SKRIPSI

Untuk Memenuhi Syarat Mendapatkan Gelar Sarjana Kedokteran Gigi



Oleh:

Deniarsha Putri Puspita Cerry

NIM. 145070401111007

PROGRAM STUDI SARJANA KEDOKTERAN GIGI

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018

DAFTAR ISI

Halaman Judul.....	i
Halaman Persetujuan	ii
Halaman Pengesahan	iii
Kata Pengantar.....	iv
Abstrak	vi
Abstract	vii
Daftar Isi	viii
Daftar Gambar	xi
Daftar Tabel	xii
Daftar Singkatan	xiii
Daftar Lampiran	xiv
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan	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	
2.1 Jaringan Periodontal.....	6
2.1.1 Gingiva	6
2.1.2 Sementum.....	8
2.1.3 Ligamen Periodontal	8
2.1.4 Tulang Alveolar	8
2.2 <i>Gingival Crevicular Fluid (GCF)</i>	10
2.2.1 Komposisi GCF	10
2.2.2 Metode Pengumpulan GCF	11
2.3 Peridontitis Agresif.....	13
2.4 <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	15
2.5 Osteoimunologi.....	17
2.5.1 Tulang	18
2.5.2 Osteoblas	18
2.5.3 Osteoklas	19
2.5.4 RANK dan RANKL.....	20
2.5.5 OPG	21
2.5.6 Mekanisme Efek OPG/RANKL secara Patofisiologis	22
2.6 Rokok.....	24
2.6.1 Definisi Rokok	24
2.6.2 Efek Rokok terhadap Jaringan Periodontal	24
2.6.3 Kandungan Asap Rokok.....	26
2.7 <i>Rattus norvegicus</i>	27
2.8 Identifikasi Bakteri Aa	29

2.8.1	Pewarnaan Gram.....	29
2.8.2	Tes Katalase.....	30
2.8.3	Tes Oksidase.....	31
2.8.4	Uji Hemolisis.....	32
2.8.5	Uji Agar MacKonkey	32
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN		
3.1	Kerangka Konseptual	34
3.2	Penjelasan Kerangka Konsep.....	35
3.2	Hipotesis Penelitian	37
BAB IV METODE PENELITIAN		
4.1	Rancangan Penelitian.....	38
4.2	Populasi dan Sampel.....	38
4.3	Variabel Penelitian.....	40
4.3.1	Variabel Terikat	40
4.3.2	Variabel Bebas	40
4.4	Lokasi dan Waktu Penelitian.....	40
4.5	Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian.....	40
4.5.1	Identifikasi Bakteri Aa	40
4.5.2	Pembiakan Bakteri Aa	41
4.5.3	Penentuan Kadar dan Densitas Bakteri Aa	42
4.5.4	Induksi Bakteri Aa pada Tikus.....	42
4.5.5	Pengukuran Kedalaman Poket Gingiva Tikus	42
4.5.6	Swab Bakteri Aa pada Tikus	42
4.5.7	Perhitungan Koloni Bakteri Aa	42
4.5.8	Pemaparan Asap Rokok pada Tikus.....	43
4.5.9	Pengambilan GCF pada Tikus	43
4.5.10	Perhitungan Kadar OPG GCF Tikus	43
4.6	Definisi Operasional.....	43
4.7	Prosedur Penelitian	44
4.7.1	<i>Ethical Clearance</i>	44
4.7.2	Persiapan Hewan Coba	45
4.7.3	Prosedur Identifikasi Bakteri Aa	45
4.7.4	Pembiakan Bakteri Aa.....	47
4.7.5	Spektrofotometri.....	47
4.7.6	Prosedur Induksi Bakteri Aa pada Tikus	48
4.7.7	Prosedur Pengukuran Poket Gingiva Tikus.....	48
4.7.8	Prosedur Swab Bakteri Aa pada Tikus.....	48
4.7.9	Prosedur Perhitungan Koloni Bakteri Aa	49
4.7.10	Prosedur Pemaparan Asap Rokok pada Tikus.....	49
4.7.11	Prosedur Pengambilan GCF pada Tikus.....	50
4.7.12	Prosedur Perhitungan Kadar OPG GCF.....	51
4.8	Alur Penelitian	52
4.9	Analisis Data.....	53
BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA		
5.1	Hasil Penelitian.....	54
5.2	Analisis Data.....	56

5.2.1 Uji Normalitas Data	57
5.2.2 Uji Homogenitas Ragam	57
5.2.3 Uji One Way Anova.....	58
5.2.4 Uji Post-Hoc Multiple Comparison.....	58
BAB VI PEMBAHASAN	60
BAB VII PENUTUPAN	
7.1 Kesimpulan.....	64
7.2 Saran.....	64
DAFTAR PUSTAKA.....	65
LAMPIRAN	73



ABSTRAK

Cerry, Deniarsha Putri Puspita. 2018. Efek Paparan Asap Rokok terhadap Kadar *Osteoprotegerin* di *Gingival Crevicular Fluid* pada 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. Viranda Sutanti, M.Si

Periodontitis agresif merupakan penyakit periodontal yang ditandai dengan adanya kerusakan parah pada ligamen periodontal dan tulang alveolar. Kehilangan tulang alveolar berhubungan dengan adanya sistem imun dan metabolisme tulang yang melibatkan RANK, RANKL, dan OPG. Kehilangan tulang pada perokok memiliki risiko yang lebih besar dibandingkan dengan non-perokok. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui efek paparan asap rokok terhadap kadar *osteoprotegerin* (OPG) di *gingival crevicular fluid* (GCF) pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa). Metode penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik menggunakan *post tes only control group design* pada 30 ekor tikus yang dibagi menjadi 3 kelompok, masing-masing terdiri dari 9 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, uji homogenitas ragam, dan uji *one way ANOVA* dengan uji *Post Hoc Turkey Test*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa paparan asap rokok mampu menurunkan kadar OPG GCF pada tikus putih yang diinduksi bakteri Aa.

Kata kunci: Paparan asap rokok, kadar OPG GCF, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

ABSTRACT

Cerry, Deniarsha Putri Puspita. 2018. The Effect of Cigarette Smoke Exposure to *Osteoprotegerin* Levels in *Gingival Crevicular Fluid* 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. Viranda Sutanti, M.Si

Aggressive periodontitis is a periodontal disease with a massive destruction of periodontal ligament and alveolar bone. Alveolar bone loss is related to immune system and bone metabolism which involves RANK, RANKL, and OPG. The risk of alveolar bone loss in smokers is higher than non-smokers. The purpose of this research is to determine the effect of cigarette smoke exposure to *osteoprotegerin* (OPG) levels in *gingival crevicular fluid* (GCF) 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 9 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, homogeneity test, and Anova with advanced Post Hoc Turkey Test. The result of this research shows that cigarette smoke exposure can decrease the OPG levels in GCF on white rats induced by Aa.

Keywords : Cigarette Smoke Exposure, OPG GCF Levels, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Persentase penduduk di Indonesia yang memiliki masalah gigi dan mulut menurut Riskesdas tahun 2007 dan 2013 meningkat dari 23,2% menjadi 25,9% (Kemenkes RI, 2014). Kelainan jaringan periodontal merupakan salah satu penyakit yang memiliki prevalensi cukup tinggi di Indonesia. Notohartono dan Sihombing pada tahun 2015 telah melakukan penelitian pada penduduk berusia 15 tahun ke atas sejumlah 722.329 orang sesuai dengan data sekunder Riskesdas tahun 2013 di 33 provinsi dan 496 kabupaten/kota di Indonesia. Hasil penelitian menunjukkan sebanyak 4,79% masyarakat memiliki kondisi jaringan periodontal sehat, sedangkan 95,21% masyarakat memiliki jaringan periodontal yang kurang sehat dengan berbagai macam faktor risiko. 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).

Bakteri yang paling umum ditemukan pada kasus periodontitis adalah *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa). Bakteri Aa dominan pada kasus periodontitis agresif dengan frekuensi sekitar 90% dibanding pada periodontitis kronis yang hanya 21% dan pada individu sehat sekitar 17%. Periodontitis agresif merupakan penyakit periodontal yang ditandai dengan adanya kerusakan parah pada ligamen periodontal dan tulang alveolar (Armitage, 1999; Wiebe *and* Putnins, 2000). Pasien periodontitis agresif memiliki risiko kehilangan perlekatan dan resesi gingiva 4

kali lebih cepat dibandingkan pasien dengan periodontitis kronis (Newman *et al*, 2015).

Sriraman *et al.* pada tahun 2014 menjelaskan bahwa bakteri Aa termasuk dalam bakteri gram negatif, anaerob fakultatif, serta bakteri fermentatif yang dapat ditemukan pada mukosa rongga mulut, plak gigi, dan poket periodontal. Karakteristik paling umum dari bakteri Aa adalah kemampuannya untuk menghasilkan produk bakteri berupa lipopolisakarida (LPS), yang mampu mengaktivasi sel makrofag untuk memproduksi *Interleukin-1 α* (IL-1 α), *Interleukin-1 β* (IL-1 β), *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α), *messenger-Ribonucleic acid* (mRNA), dan protein yang berhubungan dengan inflamasi jaringan serta resorpsi tulang.

Bartold *et al.* pada tahun 2010 menyatakan bahwa kehilangan tulang alveolar berhubungan dengan adanya sistem imun dan metabolisme tulang yang melibatkan beberapa molekul, antara lain *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B* (RANK), *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand* (RANKL), dan *Osteoprotegerin* (OPG).

RANK merupakan reseptor berupa protein pada membran sel osteoklas dan sel-sel dendritik, dan berfungsi untuk mengontrol osteoklastogenesis serta metabolisme kalsium. RANKL berikatan dengan reseptor pada permukaan preosteoklas (RANK) dan menstimulasi adanya diferensiasi menjadi osteoklas aktif, yang mendorong aktivitas osteo-resorpsi pada kondisi fisiologis. Hal ini terjadi secara beriringan dengan aktivitas TNF- α yang mampu meningkatkan osteoklastogenesis setelah kemunculan efek RANKL. Osteoblas dan sel-sel stroma memproduksi OPG yang mampu mengikat

RANKL dan menghambat maturasi osteoklas, sehingga tidak terjadi osteoklastogenesis serta resorpsi tulang alveolar (Stejskal *et al.*, 2001).

Merokok merupakan salah satu faktor risiko terjadinya penyakit periodontal. Beberapa penelitian mengenai efek merokok terhadap jaringan periodontal telah dilakukan oleh para ahli. Sreedevi *et al.* pada tahun 2011 menyatakan bahwa perokok memiliki kedalaman poket dan kehilangan perlekatan yang lebih besar, adanya keterlibatan furkasi yang didapatkan dari pemeriksaan radiografis, serta kehilangan tulang alveolar yang lebih besar dibandingkan dengan non-perokok.

Kandungan nikotin di dalam rokok mampu mempengaruhi respon sel imun host. Nikotin dapat meningkatkan produksi *Interleukin-6* (IL-6), *Interleukin-8* (IL-8), TNF- α , *Prostaglandin-E₂* (PG-E₂), dan IL-1 β , sedangkan jumlah *Interleukin-4* (IL-4) dan IL-1 α menurun (Zhou, 2006). PG-E₂ mampu meningkatkan produksi RANKL oleh osteoblas dan menekan produksi OPG, sedangkan IL-1 β , IL-6, dan TNF- α dapat meningkatkan diferensiasi dan aktivasi osteoklas (Ayu, 2014).

Aktivitas RANKL dan OPG dapat dideteksi pada jaringan gingiva, *gingival clavicular fluid* (GCF), saliva, dan serum (Behfarnia *et al.*, 2016). GCF telah dijadikan media penelitian oleh beberapa ahli karena di dalamnya mengandung biomarker spesifik pada kondisi tertentu yang dapat dijadikan penilaian untuk mengetahui kondisi biologis dari jaringan periodontal (Waddington *and* Embery, 2001). Penelitian sebelumnya mengenai konsentrasi RANKL dan OPG serum, saliva, serta GCF antara pasien periodontitis kronis pada perokok dan non-perokok telah dilakukan. Hasil penelitian membuktikan bahwa rasio RANKL/OPG pada pasien non-perokok dengan

periodontitis kronis lebih tinggi dibandingkan pada pasien perokok (Behfarnia *et al*, 2016).

Penelitian mengenai efek paparan asap rokok terhadap kadar OPG pada GCF untuk kasus periodontitis agresif masih belum dilakukan, sehingga diperlukan suatu penelitian untuk mengetahui efek paparan asap rokok terhadap kadar OPG pada GCF di jaringan periodontal yang diinduksi oleh bakteri Aa.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana efek paparan asap rokok terhadap kadar OPG GCF pada jaringan periodontal yang diinduksi oleh bakteri Aa?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui efek paparan asap rokok terhadap kadar OPG GCF pada jaringan periodontal yang diinduksi oleh bakteri Aa.

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui kadar OPG GCF pada jaringan periodontal yang diinduksi oleh bakteri Aa tanpa paparan asap rokok.
2. Mengetahui kadar OPG GCF pada jaringan periodontal yang diinduksi oleh bakteri Aa selama 21 hari dengan paparan asap rokok selama 40 hari.

3. Mengetahui perbandingan kadar OPG GCF pada jaringan periodontal 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 diharapkan mampu menjelaskan efek paparan asap rokok terhadap kadar OPG GCF pada jaringan periodontal yang diinduksi oleh bakteri Aa.

1.4.2 Manfaat Praktis

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

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



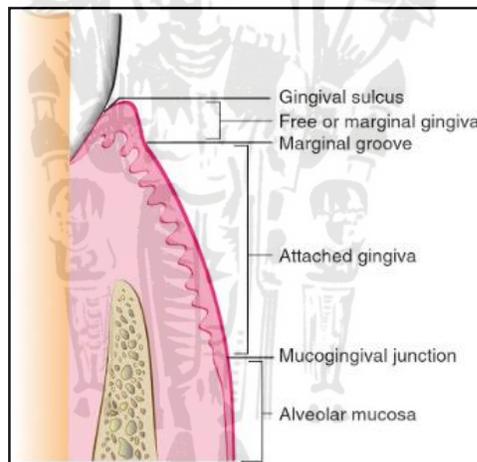
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Jaringan Periodontal

2.1.1 Gingiva

Gingiva merupakan jaringan yang melapisi tulang alveolar dan akar gigi, sehingga bagian gigi yang nampak hanya dari koronal hingga ke *cemento-enamel junction*. Gingiva dibagi menjadi 3 bagian antara lain *marginal* gingiva, *attached* gingiva, dan *interdental* gingiva yang masing-masing bervariasi, baik dari segi histologi, diferensiasi, serta ketebalannya. Namun struktur gingiva tersebut memiliki satu fungsi utama yang sama yaitu melindungi gigi dari kerusakan mekanis maupun biologis. (Newman *et al*, 2015).



Gambar 2. 1 Struktur anatomis jaringan periodontal sehat
Sumber: Newman *et al*. (2015)

1. *Marginal* gingiva

Marginal gingiva atau *unattached* gingiva merupakan tepi atau batas gingiva yang mengelilingi gigi dengan bentuk seperti kerah baju. *Marginal* gingiva dan *attached* gingiva dibatasi oleh sebuah lekukan dangkal yang disebut dengan *free gingival*

groove. *Marginal* gingiva memiliki lebar sebesar 1 mm, dan membentuk dinding jaringan lunak dari sulkus gingiva (Newman *et al*, 2015).

2. Sulkus Gingiva

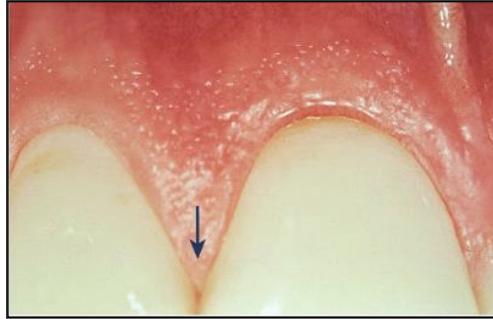
Sulkus gingiva merupakan alur di antara permukaan gigi dan epitelium yang melapisi bagian gusi yang bebas (Dorland, 2012). Kedalaman sulkus gingiva normal adalah 1-3 mm, sedangkan pada jaringan penyangga gigi yang memiliki kedalaman sulkus gingiva sebesar 4-6 mm menunjukkan tahap awal terjadinya penyakit periodontal yang akan semakin dalam ukurannya jika tidak segera ditangani (Hassanpour *et al*, 2015).

3. Attached Gingiva

Attached gingiva atau gingiva cekat merupakan bagian dari gingiva yang meluas dari dasar celah gingiva hingga *mucogingival junction*. Struktur gingiva cekat kuat, elastis, dan berikatan baik dengan periosteum. Lebar gingiva cekat pada regio anterior maksila adalah 3,5-4,5 mm, pada regio anterior mandibula sebesar 3,3-3,9 mm. 1,9 mm pada premolar maksila dan 1,8 mm pada premolar mandibula (Malathi *et al*, 2013).

4. Interdental Gingiva

Interdental gingiva berada pada celah interproksimal di bawah titik kontak gigi geligi yang berbentuk piramida. Ujung papilla interdental tidak hanya terdapat tepat di bawah titik kontak gigi geligi, namun dapat juga berbentuk seperti lekukan yang menghubungkan antara papilla pada sisi fasial dan lingual. Permukaan fasial dan lingual meruncing ke arah kontak interproksimal, sedangkan permukaan mesial dan distal berbentuk cekung (Newman *et al*, 2015).



Gambar 2. 2 Interdental gingiva

Sumber: Newman *et al.* (2015)

1.1.2 Sementum

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

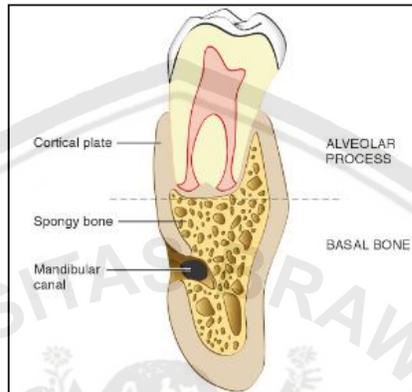
2.1.3 Ligamen Periodontal

Ligamen periodontal merupakan jaringan lunak yang menghubungkan antara dinding dalam soket alveolar dengan permukaan akar gigi. Ligamen periodontal tersusun atas ikatan sel-sel kolagen (terutama kolagen tipe I) yang menghubungkan sementum gigi ke gingiva dan tulang alveolar. Kandungan sel terbesar dalam ligamen periodontal adalah fibroblas, yang mempertahankan serta memperbaiki tulang alveolar dan sementum. Ligamen periodontal mampu mendeteksi adanya tekanan yang dialami oleh gigi geligi (Mortazavi *and* Baharvand, 2016).

1.1.4 Tulang Alveolar

Tulang terdiri dari 2/3 bahan anorganik dan 1/3 matriks organik. Bahan anorganik tersusun dari kalsium, fosfat, hidroksil, karbonat, sitrat, dan beberapa ion lain seperti

sodium, magnesium, dan fluor. Garam mineral berbentuk kristal hidroksiapatit dan menyusun 2/3 struktur tulang. Matriks organik terdiri dari kolagen tipe I (90%), dengan sejumlah kecil protein non-kolagen seperti osteokalsin, osteonektin, protein morfogenetik, fosfoprotein, dan proteoglikan (Newman *et al*, 2015).



Gambar 2. 3 Penampang tulang rahang manusia

Sumber: Newman *et al*. (2015)

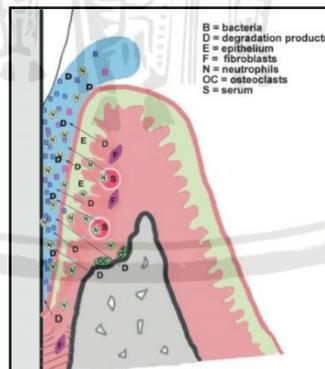
Remodelling merupakan proses perubahan bentuk tulang, ketahanan tulang terhadap adanya tekanan, perbaikan luka, serta homeostasis kalsium dan fosfat dalam tubuh. *Remodelling* melibatkan dua macam sel, yaitu osteoblas dan osteoklas. Osteoblas memproduksi matriks tulang berupa osteoid yang akan mengalami mineralisasi setelah melalui proses pengendapan. Osteoklas berasal dari jaringan hematopoietik, dan mensekresikan enzim hidrolitik ketika berada dalam bentuk aktif. Enzim tersebut akan merusak bahan organik dari tulang. Aktivitas resorpsi tulang bisa juga terjadi melalui mekanisme perubahan lingkungan permukaan tulang menjadi asam, yang dapat melarutkan komponen mineral pada tulang. *Ten Cate* mendeskripsikan urutan pada proses resorpsi tulang, antara lain:

1. Perlekatan osteoklas pada permukaan tulang yang telah mengalami mineralisasi.

2. Menciptakan lingkungan asam melalui aktivitas pelepasan proton yang dapat menyebabkan tulang mengalami demineralisasi.
3. Degradasi matriks organik menjadi asam amino akibat adanya pelepasan enzim berupa asam fosfatase dan cathepsin.
4. Memindahkan ion-ion mineral dan asam amino ke dalam osteoklas (Newman *et al*, 2015).

1.2 *Gingival Crevicular Fluid (GCF)*

GCF merupakan cairan fisiologis yang dapat dijadikan sebagai medium atau penanda untuk mendeteksi adanya aktivitas penyakit periodontal (Koregol *et al*, 2013). Pada kondisi normal, dimana tidak terjadi inflamasi jaringan periodontal maupun akumulasi bakteri plak, pembentukan GCF dimediasi oleh adanya difusi pasif dari cairan ekstraseluler melalui tekanan osmotik. Ketika terjadi inflamasi yang disebabkan oleh peningkatan aktivitas bakteri, permeabilitas dari sel-sel epitel serta vaskularisasi jaringan meningkat, sehingga konsentrasi protein pada GCF pun meningkat (Aguilar *et al.*, 2017).



Gambar 2. 4 *Gingival Crevicular Fluid*

Sumber: Utto (2003)

2.2.1 Komposisi GCF

Komposisi GCF terdiri dari 4 komponen utama (Che, 2015) antara lain:

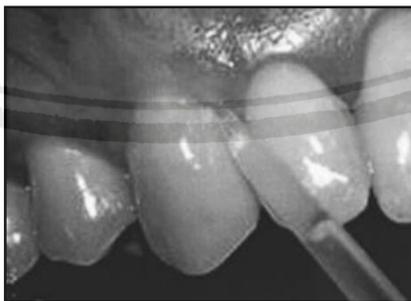
1. Komponen seluler yang terdiri dari bakteri supragingiva dan subgingiva, sel-sel epitel yang terkelupas, limfosit, neutrofil, monosit, dan sebagainya.
2. Komponen elektrolit yang terdiri dari Na^+ dan K^+ .
3. Komponen organik yang terdiri dari substansi imun (IgG, IgA, IgM, C3, C4), protein plasma, glukosa, dan sebagainya.
4. Enzim berupa kolagenase, cathepsin, alkalin fosfatase, leukotriene, prostaglandin, osteonektin, *aspartate aminotransferase*, dan sebagainya.

1.2.2 Metode Pengumpulan GCF

Terdapat 3 metode utama pengumpulan GCF (Che, 2015) antara lain:

1. *Gingival Washing Method*

Metode ini digunakan untuk mengambil sel-sel GCF dan beberapa substansi yang mudah larut dalam suatu cairan. Prosedur pengambilan GCF dengan metode ini yaitu, sejumlah cairan isotonik dengan volume yang telah ditentukan sebelumnya, diinjeksikan ke dalam celah gingiva dan dikeluarkan kembali menggunakan *micro syringe*. Metode injeksi dan pengeluaran cairan dalam GCF dilakukan kurang lebih sebanyak 12 kali.



Gambar 2. 5 *Gingival Washing Method*

Sumber: Che (2015)

2. *Capillary Tubing atau Micropipettes Method*

Keuntungan dari metode ini dibandingkan dengan *gingival washing method* adalah keakuratan komposisi dan volume GCF. Metode ini menggunakan tabung kapiler yang disisipkan ke dalam celah gingiva, dan mendorong GCF mengalir ke dalam tabung kapiler.

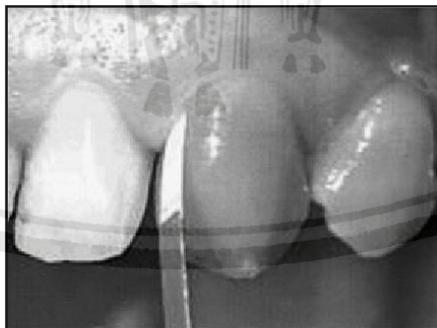


Gambar 2. 6 *Capillary Tubing Method*

Sumber: Che (2015)

3. *Absorbent Filter Paper Strips Method*

Metode ini dapat digunakan untuk mengambil beberapa jenis substansi antara lain sitokin inflamatorik, enzim, dan sel-sel lain dengan waktu yang cukup singkat. Kertas saring yang halus digunakan dalam metode ini, sehingga tidak menimbulkan trauma jika dibandingkan dengan metode pengambilan GCF yang lain.



Gambar 2. 7 *Absorbent Filter Paper Strip Method*

Sumber: Che (2015)

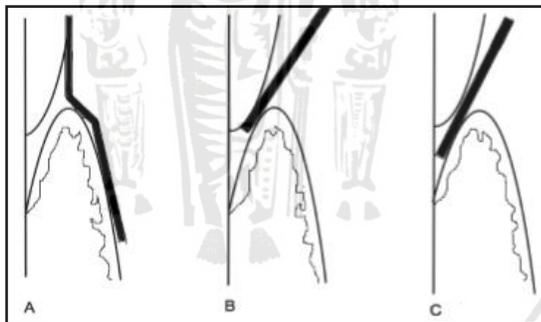
Metode *Absorbent Filter Paper Strips* dibagi menjadi dua (Che, 2015) antara lain:

1) Metode Intrakrevikular

Kertas saring disisipkan ke dalam celah gingiva dan GCF akan terhisap ke dalamnya. Metode ini selanjutnya dibagi lagi menjadi dua teknik, yang pertama, kertas saring disisipkan ke dalam celah gingiva atau poket periodontal namun tidak sampai menyentuh dasar poket (Metode Intrakrevikular Superfisial). Teknik yang kedua, kertas saring disisipkan sampai ke dasar poket gingiva sehingga dapat menyebabkan perdarahan yang ditandai dengan munculnya warna merah pada kertas saring (Metode Intrakrevikular Dalam).

2) Metode Ekstrakrevikular

Kertas saring diletakkan pada permukaan gigi dan gingiva, sehingga GCF dapat terserap ke dalam kertas saring secara perlahan. Metode ini mencegah adanya trauma pada dinding dalam celah gingiva, namun dapat menyebabkan GCF terkontaminasi dengan saliva.



Gambar 2. 8 A. Metode Ekstrakrevikular; B. Metode Intrakrevikular Superfisial; C. Metode Intrakrevikular Dalam

Sumber: Che (2015)

2.3 Periodontitis Agresif

Periodontitis merupakan suatu penyakit infeksi jaringan periodontal yang disebabkan oleh adanya akumulasi plak pada daerah subgingiva, sehingga mendorong terjadinya kerusakan ligamen periodontal, tulang alveolar, pembentukan poket, resesi atau keduanya (Newman *et al*, 2015). Menurut Martinez dan Ruiz pada tahun 2005, bakteri yang paling banyak ditemukan pada kasus periodontitis adalah *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella intermedia* (Pi), dan *Tannerella forsythensis* (Tf). Bakteri Aa dapat dideteksi pada 90% kasus periodontitis agresif lokal (Raja *et al*, 2014).

Periodontitis agresif memiliki beberapa istilah antara lain *early onset periodontitis*, *prepubertal periodontitis*, dan *juvenile periodontitis*. Istilah-istilah tersebut dikaitkan dengan angka kejadian periodontitis agresif yang sering muncul pada individu dengan rentang usia kurang dari 30 tahun, namun bisa juga terjadi pada individu yang lebih tua. Periodontitis agresif diklasifikasikan menjadi 2, yaitu lokal dan generalisata (Roshna *and* Nandakumar, 2011).

Periodontitis agresif lokal ditandai dengan adanya onset penyakit yang relatif cepat dan resorpsi tulang alveolar $\geq 4\text{mm}$ khususnya pada regio molar pertama dan insisif permanen, disertai dengan hilangnya perlekatan interproksimal sebesar $\geq 4\text{mm}$ minimal pada dua gigi permanen (Ferreira *et al*, 2014). *American Academy of Periodontology* (AAP) menjelaskan bahwa periodontitis agresif lokal bermanifestasi pada individu dengan rentang usia pubertas dan sekitar 25 hingga 30 tahun. Gambaran radiografis dari penyakit ini menunjukkan adanya radiolusensi berbentuk

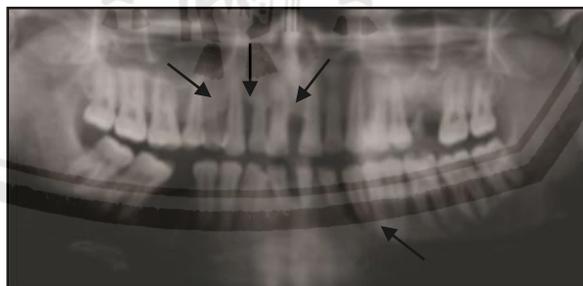
lengkung pada regio molar pertama, dimulai dari sisi distal premolar kedua meluas hingga sisi mesial molar kedua permanen (Roshna *and* Nandakumar, 2011).



Gambar 2. 9 Gambaran radiografis periodontitis agresif lokal

Sumber: Roshna *and* Nandakumar (2011)

Periodontitis agresif generalisata didefinisikan sebagai adanya kehilangan perlekatan interproksimal minimal pada tiga gigi permanen selain molar pertama dan insisif. Pasien tidak menampakkan gejala apapun pada 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. Gambaran radiografis dari penyakit ini tampak berupa kerusakan tulang alveolar yang luas, baik berbentuk defek vertikal maupun horizontal (Roshna *and* Nandakumar, 2011).



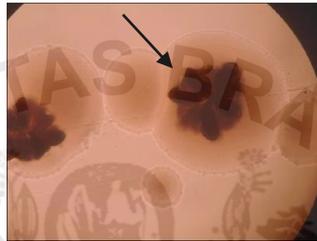
Gambar 2. 10 Gambaran radiografis periodontitis agresif generalisata dengan defek tulang vertikal

Sumber: Roshna *and* Nandakumar (2011).

2.4 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Klasifikasi ilmiah bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* adalah sebagai berikut:

Kingdom: Bacteria
Phylum: Proteobacteria
Class: Gammaproteobacteria
Order: Pasteurellales
Family: Pasteurellaceae
Genus: Aggregatibacter
Species: Actinomycetemcomitans



Gambar 2.11 Gambaran Mikroskopik Koloni Bakteri Aa dengan Perbesaran 10X
Sumber: Nanaiah *et al.* (2013)

Raja *et al* pada tahun 2014 telah menjelaskan tentang morfologi, sifat biokimia, dan karakteristik pertumbuhan dari bakteri Aa. Bakteri Aa merupakan bakteri gram negatif berbentuk kokobasilus dengan ukuran $0.4 \times 0.4 \mu\text{m}$. Bakteri tersebut 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 alkaline fosfatase.

Bakteri Aa memiliki beberapa struktur yang mampu mendukung kemampuannya untuk menyebabkan infeksi, antara lain:

1. Fimbriae, yang merupakan filamen-filamen kecil pada permukaan sel dengan diameter sebesar $2 \mu\text{m}$ dan berfungsi dalam proses adhesi serta invasi (Raja *et al*, 2014). Patogenesis dari penyakit periodontitis diawali dengan adanya interaksi

antara sel inang dan bakteri yang didominasi oleh Aa. Kontak langsung antara agen infeksius dan sel inang dimulai dengan adanya proses adhesi, yang merupakan salah satu sifat virulensi dari bakteri patogen dan berperan penting dalam proses kolonisasi bakteri, invasi, serta onset penyakit (Doig *et al*, 1988).

2. Vesikel, yang merupakan unit lipopolisakarida (LPS). Vesikel ini berisi endotoksin yang mampu mendorong aktivitas resorpsi tulang dan bakteriosin berupa *actinobacillin*. Vesikel bakteri Aa mampu menunjukkan sifat adhesif dan fungsinya sebagai pembawa material toksin (Raja *et al*, 2014).
3. Material amorf ekstraseluler, merupakan struktur pengikat sel-sel yang saling berdekatan di dalam matriks. Aktivitas adhesi mikroba meningkat dengan adanya material ini (Sriraman *et al*, 2014).

Bakteri Aa mampu menghasilkan 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 berperan penting dalam proses perkembangan penyakit periodontal (Sriraman *et al*, 2014).

LPS ini bersifat toksik terhadap fibroblas, sehingga memiliki potensi untuk menghambat proliferasi dari sel-sel fibroblas. PG-E₂ berpengaruh dalam proses pembentukan *osteoclast-like cells* yang memiliki kemampuan untuk membentuk osteoklas dan mendorong resorpsi tulang pada perkembangan penyakit periodontal (Sriraman *et al*, 2014).

2.5 Osteoimunologi

Osteoimunologi merupakan cabang ilmu pengetahuan yang menggabungkan antara osteologi dan imunologi. Observasi mengenai osteoimunologi dimulai ketika angka kejadian resorpsi tulang akibat penyakit inflamasi semakin meningkat (Rauner *et al*, 2007). Resorpsi tulang berkaitan erat dengan aktivitas metabolisme yang melibatkan beberapa molekul di antaranya *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B* (RANK), *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand* (RANKL), dan *Osteoprotegerin* (OPG).

1.5.1 Tulang

Tulang merupakan organ padat yang berfungsi sebagai pelindung organ dalam, penyokong struktur tubuh, tempat perlekatan otot serta pembentukan sel-sel darah (Rauner *et al*, 2007). Kepadatan tulang secara fisiologis bergantung pada keseimbangan antara pembentukan tulang oleh osteoblas dan resorpsi tulang oleh osteoklas (Soysa *et al*, 2012).

Tulang mengalami proses *remodeling* secara terus-menerus sepanjang hidup. Proses tersebut terdiri dari 4 tahap, yaitu aktivasi, resorpsi, transisi, dan pembentukan tulang baru. Tahap pertama merupakan inisiasi *bone lining cells* (BLCs) yang melapisi permukaan tulang. Sel-sel prekursor osteoklas bergerak menuju permukaan tulang yang menjadi target, kemudian teraktivasi dan berdiferensiasi menjadi osteoklas matang, sehingga mendorong terjadinya resorpsi tulang. Terdapat dua mekanisme resorpsi tulang oleh osteoklas pada proses *remodeling* yaitu perubahan lingkungan menjadi asam dan pelepasan enzim hidrolitik, yang dapat melarutkan serta mendegradasi matriks organik tulang. Sel-sel mononuklear akan muncul untuk

mempersiapkan pembentukan tulang baru, sedangkan osteoklas menghilang setelah proses resorpsi tulang berhenti. Osteoblas memulai sintesis dan deposisi matriks tulang hingga terbentuk tulang baru (Rauner *et al*, 2007).

2.5.2 Osteoblas

Rauner *et al.* pada tahun 2007 mengemukakan bahwa osteoblas berasal dari sel-sel mesenkimal yang berperan penting dalam aktivitas sintesis dan mineralisasi matriks organik. Tulang tersusun dari 70% komponen inorganik, 20% komponen organik, dan 10% air. 90% dari komponen organik tulang merupakan kolagen tipe I. Osteoblas mampu memproduksi kolagen dan protein non-kolagen (osteokalsin, sialoprotein, osteopontin, dan osteonektin) serta beberapa sitokin seperti *insulin-like growth factor I, II, transforming growth factor β* (TGF- β), dan *bone morphogenetic proteins* (BMPs) yang berperan dalam proses diferensiasi osteoblas. Osteoblas berbentuk bulat dan terdapat pada permukaan tulang. Osteoblas mampu berdiferensiasi menjadi osteosit yang tertanam di dalam matriks tulang dan BLCs yang melapisi permukaan tulang. BLCs berperan penting dalam proses *remodeling*, sedangkan osteosit berperan dalam regulasi metabolisme tulang dengan cara menerima dan mengirim sinyal berupa tekanan mekanis. Osteosit terdapat pada lakuna, terhubung satu sama lain melalui kanalikuli yang dapat menyuplai nutrisi dan oksigen dari pembuluh darah kapiler (Nakamura, 2007).

2.5.3 Osteoklas

Osteoklas berasal dari *hematopoietic stem cells* (HSC) yang mengalami beberapa fase diferensiasi dan menghasilkan sel multinukleat dengan kemampuan osteo-resorpsi. Osteoklas dihasilkan oleh sel-sel progenitor turunan dari

monosit/makrofag yang disebut dengan *granulocyte macrophage progenitors* (GMP). GMP mampu berdiferensiasi menjadi granulosit dan makrofag matang/osteoklas/ sel-sel dendritik. Mobilisasi sel-sel prekursor osteoklas melibatkan adanya pelepasan sel menuju sirkulasi darah dari sum-sum tulang. Sel tersebut terus berjalan menuju ke jaringan perifer tempat sel prekursor osteoklas imatur berdiferensiasi menjadi osteoklas matang. Diferensiasi osteoklas terdiri dari 3 fase, antara lain proliferasi HSC pada turunan dari sel makrofag, berkembang menuju fase osteoklas awal, dan diakhiri dengan fase fusi atau penyatuan (Soysa *et al*, 2012).

Ultrastuktur dari osteoklas menampilkan sejumlah mitokondria, retikulum endoplasma, apparatus golgi yang mengelilingi nukleus, vesikel, lisosom, dan vakuola. Struktur tersebut mengindikasikan bahwa osteoklas memiliki kemampuan untuk memproduksi energi (terutama enzim lisozim) dan melakukan aktivitas sintesis protein. Aktivasi dan diferensiasi dari osteoklas diatur oleh adanya keseimbangan antara RANKL dan OPG pada sel-sel osteoblas (Nakamura, 2007).

2.5.4 RANK dan RANKL

RANK termasuk dalam superfamili *tumor necrosis factor reseptor* (TNFR) yang banyak ditemukan pada permukaan sel-sel osteoklas dan sel-sel dendritik (Rauner *et al*, 2007). RANK memiliki efek osteo-resorpsi dan berfungsi untuk meningkatkan penggandaan osteoklas pada tulang (Stejskal *et al*, 2001).

RANKL, famili dari *tumor necrosis factor* (TNF) merupakan protein pengikat RANK yang diekspresikan oleh sel-sel stroma sum-sum tulang, osteoblas, osteosit, serta sel T aktif, dan mendorong adanya aktivitas osteoklastogenesis atau pembentukan osteoklas (Nakamura, 2007; Soysa *et al*, 2012). Rauner *et al* pada

tahun 2007 mengemukakan bahwa RANKL memiliki beberapa istilah lain, yaitu *TNF-related activation-induced cytokine* (TRANCE); *osteoclast differentiating factor* (ODF); *osteoprotegerin ligand* (OPGL); dan *TNF superfamily member 11* (TNFSF11). Organ-organ yang menjadi tempat produksi dari RANKL antara lain nodus limfa, *thymus*, paru-paru, limpa, dan sum-sum tulang (Boyce and Xing, 2007).

Produksi RANKL diregulasi oleh PG-E₂, *parathyroid hormone* (PTH), glukokortikoid, dan beberapa sitokin seperti IL-1, IL-6, IL-11, serta TNF- α (Schoppet *et al*, 2002; Nakamura, 2007).

2.5.5 OPG

OPG, salah satu jenis protein dalam superfamili TNFR, diproduksi oleh sel-sel osteoblas dan berperan sebagai reseptor RANKL yang mampu menghambat aktivitas osteoklastogenesis (Nakamura, 2007; Soysa *et al*, 2012). OPG diproduksi oleh beberapa jaringan yang ada di dalam tubuh, antara lain jaringan pada sistem kardiovaskular (jantung, arteri, dan vena), paru-paru, ginjal, usus, tulang, sel-sel imun dan hematopoietik. Produksi OPG diregulasi oleh beberapa sitokin seperti TNF- α , IL-1 α , IL-18, *transforming growth factor- β* (TGF- β), *bone morphogenetic proteins* (BMP), dan hormon steroid seperti 17 β -estradiol. Glukokortikoid, siklosporin A, PTH, PG-E₂, *fibroblast growth factor* (FGF) mampu menekan produksi OPG (Schoppet *et al*, 2002).

Efek anti-resorpsi dari OPG pada manusia telah diteliti oleh Whyte *et al* pada tahun 2002. Penelitian tersebut dilakukan dengan cara menghilangkan 100 kilobase OPG pada 2 pasien yang menderita *Paget's disease*, sebuah kelainan autosom resesiv yang ditandai dengan adanya peningkatan aktivitas remodeling tulang, osteopenia, dan fraktur. OPG juga memiliki kemampuan untuk mencegah kalsifikasi

pada pembuluh darah besar. Eliminasi OPG pada tikus dapat menyebabkan kalsifikasi pada aorta dan arteri renalis (Schoppet *et al*, 2002). Penelitian yang dilakukan oleh Bennett *et al* pada tahun 2006 membuktikan bahwa tikus dengan kadar OPG yang rendah dapat mempercepat terjadinya kalsifikasi pada kasus atheroskelrosis (Rauner *et al*, 2007).

Kraj *et al* pada tahun 2005 telah menjelaskan hubungan antara konsentrasi OPG serum di dalam sum-sum tulang pada pasien dengan *multiple myeloma* (MM). MM menstimulasi adanya aktivitas osteoklastogenesis dengan cara merusak keseimbangan antara RANKL dan OPG. Hasil penelitian Kraj *et al* menunjukkan adanya peningkatan konsentrasi OPG serum pada 20% kasus MM, sebagai kompensasi dari adanya kerusakan tulang yang parah. Kolarz *et al* pada tahun 2003 menjelaskan tentang fungsi OPG yang berperan aktif dalam menekan efek osteoresorpsi dari RANKL melalui hasil penelitiannya, yaitu terdapat peningkatan konsentrasi OPG serum pada pasien dengan *Rheumatoid Arthritis* (RA). Penelitian mengenai OPG dalam bidang kedokteran gigi telah dilakukan oleh Tyrovola *et al* pada tahun 2010. Penelitian tersebut menjelaskan mengenai hubungan antara produksi RANKL dan OPG dalam darah serta GCF terhadap derajat resorpsi akar setelah adanya pergerakan gigi secara ortodontik. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi OPG serum dalam darah menurun akibat adanya resorpsi akar yang cukup besar setelah dilakukan perawatan ortodontik.

Bahan kimia dalam rokok mampu menurunkan konsentrasi OPG serum dan menimbulkan efek resorpsi tulang (Behfarnia *et al*, 2016). Mevastatin, obat penurun kolesterol yang memiliki beberapa fungsi antara lain untuk mencegah tumor,

mengurangi risiko fraktur, meningkatkan aktivitas pembentukan tulang, dan mencegah *atherosclerosis*, mampu meningkatkan sekresi dari OPG (Smith, 2012).

2.5.6 Mekanisme Efek OPG/RANKL secara Patofisiologis

RANKL berikatan dengan reseptor pada permukaan preosteoklas (RANK) dan menstimulasi adanya diferensiasi menjadi osteoklas aktif, sehingga mendorong terjadinya aktivitas osteo-resorpsi. Hal ini terjadi bersamaan dengan aktivitas TNF- α yang mendorong osteoklastogenesis semakin meningkat setelah ikatan antara RANK dan RANKL terjadi. OPG menghambat aktivitas osteoklastogenesis dengan cara berikatan pada RANKL, sehingga proses maturasi osteoklas menjadi terganggu (Stejskal *et al.*, 2001).

Peningkatan aktivitas regulasi RANKL berhubungan dengan adanya penurunan aktivitas regulasi dari OPG. Rasio OPG/RANKL merupakan penentu dari kepadatan massa tulang (Boyce *and* Xing, 2007). Jika rasionya meningkat, maka aktivitas resorpsi tulang akan meningkat, dan menyebabkan kehilangan struktur tulang (Smith, 2012). Produksi berlebihan dari OPG dapat menghambat osteoklas dan memicu osteopetrosis, sedangkan kurangnya produksi OPG dapat memicu osteoporosis (Rauner *et al.*, 2007).

Stejskal *et al.* pada tahun 2001 menyebutkan bahwa terdapat beberapa hormon dan sitokin yang mengatur konsentrasi RANKL dan OPG di dalam tubuh. Agen yang dapat menurunkan rasio OPG/RANKL antara lain glukokortikoid dengan cara menghambat produksi OPG; beberapa sitokin inflamatorik (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-11, IL-17, dan TNF- α) dengan cara menginduksi ekspresi ligan OPG; FGF-2 dengan cara menghambat produksi OPG dan meningkatkan produksi RANKL; hormon paratiroid

dengan cara menghambat produksi OPG dan meningkatkan produksi RANKL; serta PG-E₂ dengan meningkatkan produksi RANKL dan menekan produksi OPG. Agen yang dapat meningkatkan rasio OPG/RANKL antara lain esterogen dengan cara meningkatkan sekresi OPG dan menghambat produksi RANKL; serta TGF- β dengan cara menginduksi sekresi OPG.

2.6 Rokok

2.6.1 Definisi Rokok

Peraturan Pemerintah Republik Indonesia (PP RI) Nomor 109 Tahun 2012 tentang Pengamanan Bahan yang Mengandung Zat Adiktif berupa Produk Tembakau bagi Kesehatan pasal 1 ayat 3 menjelaskan bahwa rokok merupakan salah satu produk tembakau yang dimaksudkan untuk dibakar dan dihisap dan/atau dihirup asapnya, yang dihasilkan dari tanaman *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana rustica*, dan spesies lainnya atau sintetisnya. Asap rokok mengandung nikotin dan tar, dengan atau tanpa bahan tambahan.

Terdapat beberapa jenis rokok yang telah dikenal oleh masyarakat saat ini. 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).

2.6.2 Efek Rokok terhadap Jaringan Periodontal

Rokok berpotensi menimbulkan beberapa penyakit kronis serta meningkatkan risiko kematian. Asia dan Australia merupakan dua kawasan dengan konsumsi

tembakau terbanyak di dunia yaitu sebanyak 57%, disusul dengan Eropa Timur dan Uni Soviet sebanyak 14%, Amerika 12%, Eropa Barat 9%, serta 8% pada penduduk Timur Tengah dan Afrika. ASEAN merupakan kawasan dengan 10% dari seluruh pengguna rokok di dunia dan 20% penyebab kematian global akibat tembakau (Shavey *et al*, 2009).

Merokok memiliki risiko 3 kali lebih besar terserang periodontitis dibandingkan dengan non-perokok (Hiremath, 2007). 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). Mekanisme vasokonstriksi telah dijelaskan oleh Trauth *et al*. pada tahun 2001. Kandungan nikotin di dalam tembakau menstimulasi ganglion simpatik untuk memproduksi *neurotransmitter* berupa *catecholamines* yang mempengaruhi α 1-reseptor pada pembuluh darah, tepatnya pada *vascular smooth muscles* (VSM). Hal tersebut menyebabkan terjadinya vasokonstriksi pembuluh darah perifer pada jaringan gingiva dan peningkatan *peripheral resistance* (hambatan aliran darah dalam pembuluh) serta tekanan darah arteri sistemik. Vasokonstriksi yang terjadi menstimulasi neutrofil dan monosit pada daerah inflamasi untuk mengeliminasi bakteri serta debris seluler (Polimeni *et al*,

2006). Proses yang terjadi selanjutnya adalah stimulasi makrofag (Broughton *et al*, 2006).

Merokok juga dapat menimbulkan efek destruktif terhadap fungsi kemotaksis dan fagositosis leukosit *polymorphonuclear* (PMN) di dalam rongga mulut. Adanya supresi pembuluh darah pada reaksi inflamasi di bawah pengaruh rokok mengindikasikan kerusakan mekanisme pertahanan sel inang dalam merespon iritasi, sehingga mengakibatkan penurunan jumlah mediator inflamasi. (Sreedevi *et al*, 2011).

2.6.3 Kandungan Asap Rokok

Asap rokok berbahan utama tembakau mengandung fase gas yang terdiri dari karbon monoksida, nitrogen, oksigen, dan karbondioksida serta fase padat yang mengandung nikotin, air, dan hidrokarbon aromatik polisiklik (Singh *et al*, 2013). Berikut ini merupakan beberapa kandungan kimia utama beserta efek yang dapat ditimbulkan oleh tembakau.

1. Nikotin

PP RI Nomor 109 Tahun 2012 pasal I Nomor 4 menjelaskan tentang definisi nikotin. 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 dopamin, 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. Kotinin dapat diidentifikasi melalui saliva dan *gingival crevicular fluid* (GCF) (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. Nikotin dapat menyebabkan defek fungsi neutrofil, yaitu fungsi kemotaksis dan kemampuan fagositosisnya. Nikotin mempengaruhi sitokin jaringan dan mengganggu respon inflamasi dari sel inang. Nikotin 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).

2. Tar

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 dikurangi 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

Jumlah kadar oksigen yang dibawa oleh darah ditekan akibat efek karbon monoksida. Kadar oksigen dapat berkurang hingga 15% (Singh *et al*, 2013).

1.7 *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). Penelitian secara *in vivo* banyak memanfaatkan hewan coba (Hewitt *et al*, 1989; Iheidioha *et al*, 2012). Anggota *Rodentia* seperti tikus (*Rattus norvegicus*) dan mencit (*Mus musculus*) sering dijadikan sebagai hewan coba karena memiliki sistem fisiologi yang mirip dengan manusia (Smith *and* Mangkoewidjojo, 1988; Johnson, 2012). *R. norvegicus* memiliki beberapa sifat yang menguntungkan sebagai hewan coba penelitian di antaranya perkembangbiakan cepat, mempunyai ukuran yang lebih besar dari mencit, 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. 12 *Rattus norvegicus*

Sumber: Koolhas (2010)

R. norvegicus memiliki beberapa karakteristik yaitu berambut kasar dan agak panjang, hidung berbentuk 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 150-250 mm, panjang ekor 160-210 mm, panjang dari ujung hidung sampai ujung ekor 310-460 mm, lebar telinga 18-24 mm, panjang telapak kaki belakang 40-47 mm (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 Promono, 1989). Tikus *wistar* memiliki karakteristik mudah dikendalikan dan perilaku agreaif pada *wistar* jantan cenderung berkembang dengan lambat. *Sprague Dawley* berasal dari perkawinan silang 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).

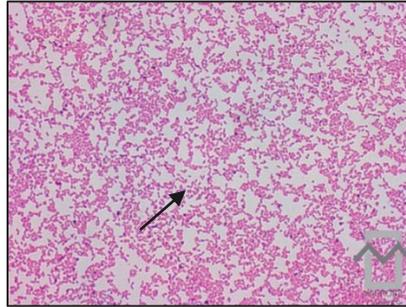
1.8 Identifikasi Bakteri Aa

1.8.1 Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram mempermudah pemeriksaan mikroskopik apusan untuk mendeteksi bakteri, pus, basil *Vincent*, dan *Candida albicans*. Prinsip pewarnaan gram adalah sebagai berikut:

1. Kristal violet mampu mewarnai semua bakteri menjadi ungu tua.
2. Larutan iodine menahan zaat warna violet menjadi lebih kuat atau lemah, tergantung pada jenis bakterinya.
3. Etanol 95% mampu memudahkan 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).

Tujuan pewarnaan gram adalah untuk membedakan antara bakteri gram positif dan gram negatif. Bakteri gram positif menghasilkan warna ungu kecoklatan pada pemeriksaan preparat di bawah mikroskop cahaya, sedangkan bakteri gram negatif menghasilkan warna merah. Mekanisme pewarnaan gram pada bakteri mengarah pada sifat dinding sel bakteri yang mampu menyerap warna Kristal violet. Bakteri gram positif memiliki kandungan peptidoglikan yang lebih tinggi dan lipid yang lebih rendah dibandingkan dengan bakteri gram negatif (Garrels *and* Oatis, 2011).



Gambar 2.13 Pewarnaan Gram Bakteri Aa

Sumber: Versalovic, *et al* (2011)

1.8.2 Tes Katalase

Katalase merupakan sebuah enzim, diproduksi oleh mikroorganisme yang hidup dalam lingkungan kaya oksigen untuk menetralkan adanya toksik serta efek bakterisidal dari aktivitas metabolisme H_2O_2 . Katalase mampu memecah H_2O_2 menjadi oksigen dan air. 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, antara lain bakteri aerob serta anaerob fakultatif (Acharya, 2013).

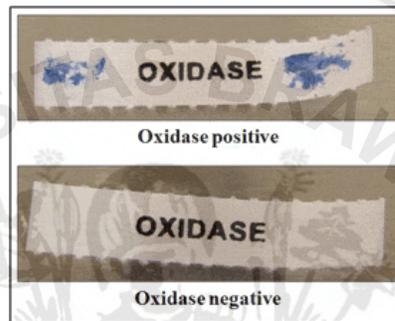


Gambar 2.14 Tes Katalase

Sumber: Tankeshwar (2013)

1.8.3 Tes Oksidase

Tes oksidase 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. Hasil tes oksidase dapat teridentifikasi dalam waktu 10 detik (Acharya, 2013).



Gambar 2. 15 Hasil Tes Oksidase
Sumber: Acharya (2013)

1.8.4 Uji Hemolisis

Hemolisis merupakan proses rusaknya sel-sel darah merah, disebabkan oleh substansi yang disebut hemolisin. Terdapat 3 istilah yang mendeskripsikan mengenai reaksi hemolisis 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. **β -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 hidrogen 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).

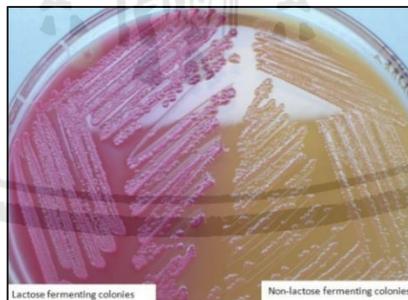


Gambar 2.16 Hasil Uji Hemolisis

Sumber : Aryal (2015)

1.8.5 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 di sekitar koloni dan menimbulkan perubahan warna pada indikator pH menjadi merah atau merah muda. Bakteri yang tidak memfermentasikan laktosa tumbuh dengan koloni tidak berwarna dan transparan (Batt *et al.*, 2014).



Gambar 2.17 Uji Agar MacConkey

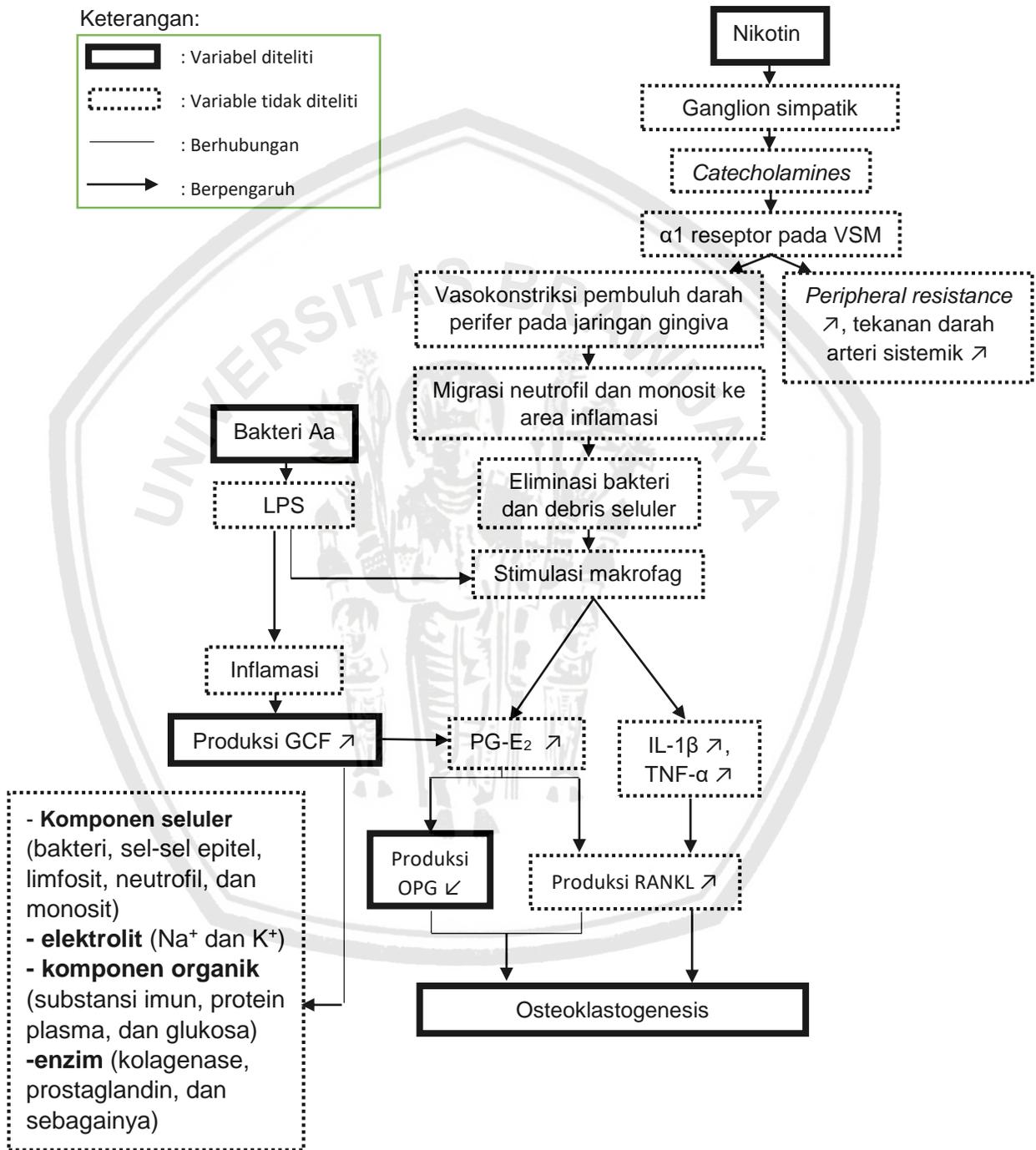
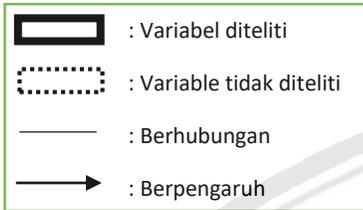
Sumber: Tankeshwar (2013)

BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual

Keterangan:



3.2 Penjelasan Kerangka Konsep

Aggregatibacter actinomycetemcomitans (Aa) merupakan bakteri patogen yang paling umum menjadi penyebab periodontitis agresif, suatu penyakit infeksi pada jaringan periodonsium yang ditandai dengan adanya kerusakan masif pada ligamen periodontal dan tulang alveolar. Bakteri Aa termasuk dalam golongan bakteri anaerob fakultatif, yang mampu memproduksi lipopolisakarida (LPS). Produk bakteri tersebut mampu menginduksi pelepasan beberapa mediator proinflamasi oleh sel-sel makrofag, beberapa di antaranya adalah IL-1 β , TNF- α , dan PG-E₂. LPS bakteri Aa juga mampu menyebabkan adanya inflamasi yang berakibat pada peningkatan produksi GCF. Kandungan di dalam GCF terdiri dari beberapa komponen seluler (bakteri, sel-sel epitel, limfosit, neutrofil, dan monosit), elektrolit (Na⁺ dan K⁺), komponen organik (substansi imun, protein plasma, dan glukosa), serta enzim (kolagenase, prostaglandin, dan sebagainya). 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 nikotin dari asap rokok mampu memstimulasi ganglion simpatik untuk memproduksi *catecholamines*, suatu neurotransmitter yang dapat mempengaruhi α_1 reseptor pada *vascular smooth muscles* (VSM). Aktivasi α_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 , TNF- α , dan PG-E₂.

Mediator proinflamasi yang diproduksi oleh LPS bakteri Aa maupun nikotin berperan penting dalam proses resorpsi tulang alveolar. Beberapa molekul yang terlibat dalam proses patologis tersebut antara lain RANK, RANKL, serta OPG. Aktivitas ketiga molekul tersebut dapat dideteksi melalui GCF. RANK berikatan dengan RANKL pada kondisi fisiologis dan menstimulasi diferensiasi pre-osteoklas menjadi osteoklas aktif (osteoklastogenesis), yang memiliki efek osteo-resorpsi. Ikatan RANK-RANKL dihambat oleh OPG yang diproduksi oleh sel-sel osteoblas, sehingga mencegah pembentukan osteoklas baru yang dapat menstimulasi aktivitas resorpsi.

IL-1 β dan TNF- α merupakan sitokin yang dapat menurunkan rasio OPG/RANKL dengan meningkatkan produksi RANKL. PG-E₂ mampu meningkatkan produksi RANKL dan menekan produksi OPG. Kedua mekanisme tersebut mendorong terjadinya osteoklastogenesis dan menyebabkan resorpsi tulang alveolar.

3.3 Hipotesis Penelitian

Asap rokok dapat menurunkan kadar OPG GCF pada jaringan periodontal yang diinduksi oleh bakteri Aa.



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode *laboratories true experimental post test only control group design*.

4.2 Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*), yang dibagi menjadi 3 kelompok. Sampel yang digunakan pada penelitian ini memenuhi kriteria inklusi sebagai berikut:

1. Usia 3-4 bulan.
2. Memiliki berat badan 150-200 gram.
3. Memiliki kondisi jaringan periodontal normal serta fisik yang sehat.
4. Aktif bergerak dan memiliki nafsu makan yang baik.

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.
4. Hewan coba mati selama proses penelitian berlangsung.

Estimasi besar sampel yang digunakan pada penelitian ini dihitung berdasarkan Rumus Frederer (Frederer, 1963) 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

Masing-masing dari kelompok sampel ditambahkan 1 ekor tikus untuk cadangan, namun tidak akan mempengaruhi perhitungan statistik dari hasil penelitian.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian adalah kadar OPG GCF.

4.3.2 Variabel Bebas

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

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Institut Biosains Universitas Brawijaya, Laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Penelitian berlangsung dari bulan November 2017 hingga April 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, alkohol 96%, safranin), *nutrient broth*, ose, 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 isolat bakteri Aa, kertas filter, dan reagen oksidase *tetrametil p-fenilendiamin dihidroklorida* 1% atau *Kovac* (Reynolds, 2012).

4) Uji Hemolisis

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

5) Uji Agar MacConkey

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

4.5.2 Pemiakan Bakteri Aa

Bahan yang digunakan dalam prosedur ini antara lain isolat bakteri Aa yang telah dibiakkan secara murni pada media MHA (*Muller Hinton Agar*), larutan NaCl 0.9%, dan *nutrient broth*, sedangkan alat yang digunakan adalah spektrofotometer, ose steril, *bunsen brander*, korek api, *Vortex*, dan inkubator (Soraya *et al*, 2016).

4.5.3 Penentuan Kadar dan Densitas Bakteri Aa

Prosedur yang dilakukan sebelum menginduksi bakteri Aa pada tikus adalah penentuan kadar dan densitas isolat 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 isolat bakteri Aa (Belton, 2009).

4.5.4 Induksi Bakteri Aa pada Tikus

Prosedur induksi bakteri Aa pada tikus memerlukan isolat bakteri Aa yang telah teridentifikasi dan dibiakkan sebelumnya. Alat yang digunakan adalah spuit insulin (Andayani *et al*, 2016).

4.5.5 Swab Bakteri Aa pada Tikus

Alat yang digunakan untuk swab bakteri pada tikus adalah *syringe* 1cc untuk anestesi, sedangkan bahan yang digunakan antara lain larutan Ketamin 10%, *cotton tip swab*, larutan PBS, dan *Trypticase soy agar* (Kang *et al*, 2012).

4.5.6 Perhitungan Koloni Bakteri Aa

Prosedur perhitungan koloni bakteri Aa membutuhkan isolat bakteri Aa yang telah dibiakkan sebelumnya, *colony counter*, dan pena atau spidol (Rostavia *et al*, 2016).

4.5.7 Pemaparan Asap Rokok pada Tikus

Prosedur pemaparan asap rokok pada tikus menggunakan bahan berupa rokok kretek, korek api, dan alat yang disebut dengan *closed smoking device* (Radwan *et al*, 2016).

4.5.8 Pengambilan GCF pada Tikus

Prosedur pengambilan GCF pada tikus menggunakan beberapa bahan, antara lain *perio-paper strip* dan larutan *phosphate buffered saline* (PBS) sebanyak 175 μ L per tabung. Alat yang digunakan adalah tabung *polypropylene*, lemari pendingin penyimpan sampel, *sentrifuge thermos scientific* dengan kecepatan 4000 g, dan *stopwatch* (Behfarnia *et al.*, 2016).

4.5.9 Perhitungan Kadar OPG GCF Tikus

Perhitungan kadar OPG GCF pada tikus menggunakan *Rat OPG Instant ELISA kit*, *microplate reader* pengukur absorbansi 450 nm, pipet/mikro pipet, tabung 100ml dan 1L, kertas saring, air suling, software ELISA, dan tabung sampel (RayBiotech, 2016).

4.6 Definisi Istilah/Operasional

1. Nikotin merupakan kandungan kimia di dalam asap rokok yang didapatkan dari proses pembakaran 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. Kadar osteoprotegerin dalam *gingival crevicular fluid* adalah kadar sitokin yang berperan sebagai inhibitor osteoklastogenesis serta mampu menghambat proses resorpsi tulang alveolar pada tikus. Kadar osteoprotegerin didapatkan dari pengambilan *gingival crevicular fluid* kelompok sampel 1, 2, dan 3 pada sisi mesial gigi insisif pertama rahang bawah tikus, setelah prosedur induksi bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dan pemaparan asap rokok kretek. *Gingival crevicular fluid* pada tikus diambil menggunakan *perio-paper strip* dengan metode *absorbant filter paper strip* intrakrevikular superfisial. Kadar osteoprotegerin dalam *gingival crevicular fluid* kemudian diukur menggunakan alat berupa *Rat Osteoprotegerin Instant ELISA kit*. Hasil pengukuran menunjukkan skala rasio dalam satuan pg/ml.
3. Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* merupakan bakteri patogen penyebab utama periodontitis agresif berupa isolat bakteri yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Surabaya. Bakteri tersebut diidentifikasi terlebih dahulu sebelum dipaparkan pada kelompok sampel 2 dan 3. Konsentrasi bakteri yang diinduksikan pada masing-masing sampel adalah sebesar 0.1 ml (10^8 CFU per tikus) selama 3 minggu, diukur dengan spektrofotometer yang menghasilkan skala ordinal dalam satuan ml.

4.7 Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data

4.7.1 Ethical Clearance

Penelitian diawali dengan pengurusan *ethical clearance* di Komisi Etik Penelitian Kesehatan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.7.2 Persiapan Hewan Coba

Tikus putih ditimbang menggunakan neraca analitik. Hewan coba kemudian diaklimatisasi selama satu minggu. Tikus dipelihara dalam kandang yang terbuat dari bak plastik bersih berukuran 40x30x20 cm dan dilengkapi dengan tutup kandangnya. Hewan coba dipelihara dengan suhu ruangan 18°C - 27°C, ventilasi kandang terjaga dengan baik. Satu kandang berisi 1 ekor tikus. Setiap hari dilakukan pemberian minum dengan air matang secara *ad libitum* dan pemberian pakan dengan pellet (10%-15% dari berat badannya/hari). Sekam diganti setiap 3 hari sekali.

4.7.3 Prosedur Identifikasi Bakteri Aa

1. Pewarnaan Gram

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

- 1) Membuat suspensi aquades 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).

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).

4.7.4 Pembiakan Bakteri Aa

Koloni bakteri Aa yang telah dikultur pada media MHA diambil dengan menggunakan jarum ose yang telah disterilkan sebanyak 1-2 ose, kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang berisi *nutrient broth* (NB) sebanyak 5ml lalu dihomogenkan dengan *vortex*. Suspensi diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C dengan suasana anaerob. Prosedur selanjutnya adalah penentuan densitas suspensi bakteri sehingga setara dengan 1×10^8 CFU/ml (Soraya *et al.*, 2016).

4.7.5 Spektrofotometri

- 1) Menyalakan tombol *on/off* pada spektrofotometer.
- 2) Memasukkan medium blanko sebanyak 3ml pada kuvet blanko untuk membuat angka spektrofotometer menjadi nol (0) menggunakan mikro pipet.
- 3) Membersihkan permukaan kuvet menggunakan tissue. Memegang permukaan kuvet pada area yang buram. Area transparan nantinya akan dilewati oleh sinar pada spektrofotometer.

- 4) Kuvet berisi blanko diletakkan di dalam spektrofotometer.
- 5) Menentukan panjang gelombang.
- 6) Sebelum alat digunakan untuk menghitung sampel, pastikan spektrofotometer menunjukkan angka nol (0).
- 7) Memasukkan sampel ke dalam kuvet sebanyak 3ml menggunakan mikro pipet.
- 8) Membersihkan permukaan kuvet menggunakan tissue.
- 9) Kuvet berisi sampel diletakkan di dalam spektrofotometer. Catat nilai absorbansi.
- 10) Menghitung panjang gelombang (Belton, 2009).

4.7.6 Prosedur Induksi Bakteri Aa pada Tikus

Jumlah tikus yang akan diinduksi oleh bakteri Aa berjumlah 20 ekor (berasal dari kelompok sampel 2 dan 3). Masing-masing tikus akan dipaparkan bakteri Aa sebanyak 0.1 ml dengan densitas sebesar 10^8 CFU per tikus selama 21 hari berturut-turut (Jia *et al.*, 2015). Induksi bakteri Aa dilakukan pada sisi mesial insisif pertama rahang bawah tikus.

4.7.7 Prosedur Swab Bakteri Aa pada Tikus

Swab bakteri pada tikus dilakukan sebanyak 2 kali, yaitu setelah inokulasi bakteri Aa dan pada saat hewan dikorbankan. Tikus diberi injeksi anestesi 40-60mg/kgBB, selanjutnya mikroflora rongga mulut tikus diambil dengan menggunakan *cotton tip swab* selama 30 detik (Schreiner *et al.*, 2003). Sampel yang telah diambil kemudian dimasukkan ke dalam tabung berisi 1ml larutan PBS. Prosedur berikutnya adalah melarutkan sampel hingga 10 kali pelarutan dan ditanam pada *plate* yang berisi medium *Trypticase soy agar*, kemudian diinkubasi dalam suasana anaerob pada suhu 37°C selama 7 hari (Kang *et al.*, 2012).

4.7.8 Prosedur Perhitungan Koloni Bakteri Aa

Menghubungkan stop kontak dengan sumber tenaga, kemudian menekan tombol *on/off* pada posisi *ON* untuk mengaktifkan alat. Apabila angka pada *colony counter* masih belum menunjukkan angka 0, maka tekan tombol *reset*. Meletakkan *plate* yang berisi koloni bakteri yang akan dihitung di atas meja yang dilengkapi dengan skala, kemudian menandai koloni dengan mengarahkan pulpen ke arah meja skala. Terdapat lampu yang berfungsi untuk memberikan penerangan sehingga letak koloni bakteri mudah terdeteksi. Adapun kaca pembesar yang berfungsi untuk membantu operator melihat koloni bakteri (Rostavia *et al*, 2016).

4.7.9 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 (Radwan *et al*, 2016). Masing-masing tikus pada kelompok sampel 3 dipaparkan asap rokok kretek selama 5 menit (Ajiro *et al*, 2010). Sebelum melakukan pemaparan untuk kelompok tikus selanjutnya, *closed smoking device* dibersihkan dahulu dari sisa asap rokok perlakuan sebelumnya.

4.7.11 Prosedur Pengambilan GCF pada Tikus

Prosedur pengambilan GCF pada tikus telah dilakukan oleh Behfarnia *et al*. pada tahun 2016 dalam penelitiannya mengenai konsentrasi RANKL dan OPG dalam serum, saliva, dan GCF pada pasien perokok maupun non-perokok yang mengalami periodontitis kronis.

Pengambilan GCF dilakukan pada sisi mesial insisif pertama rahang bawah dengan teknik *intraalveolar superficial*. Berikut penjelasan prosedur pengambilan GCF pada tikus:

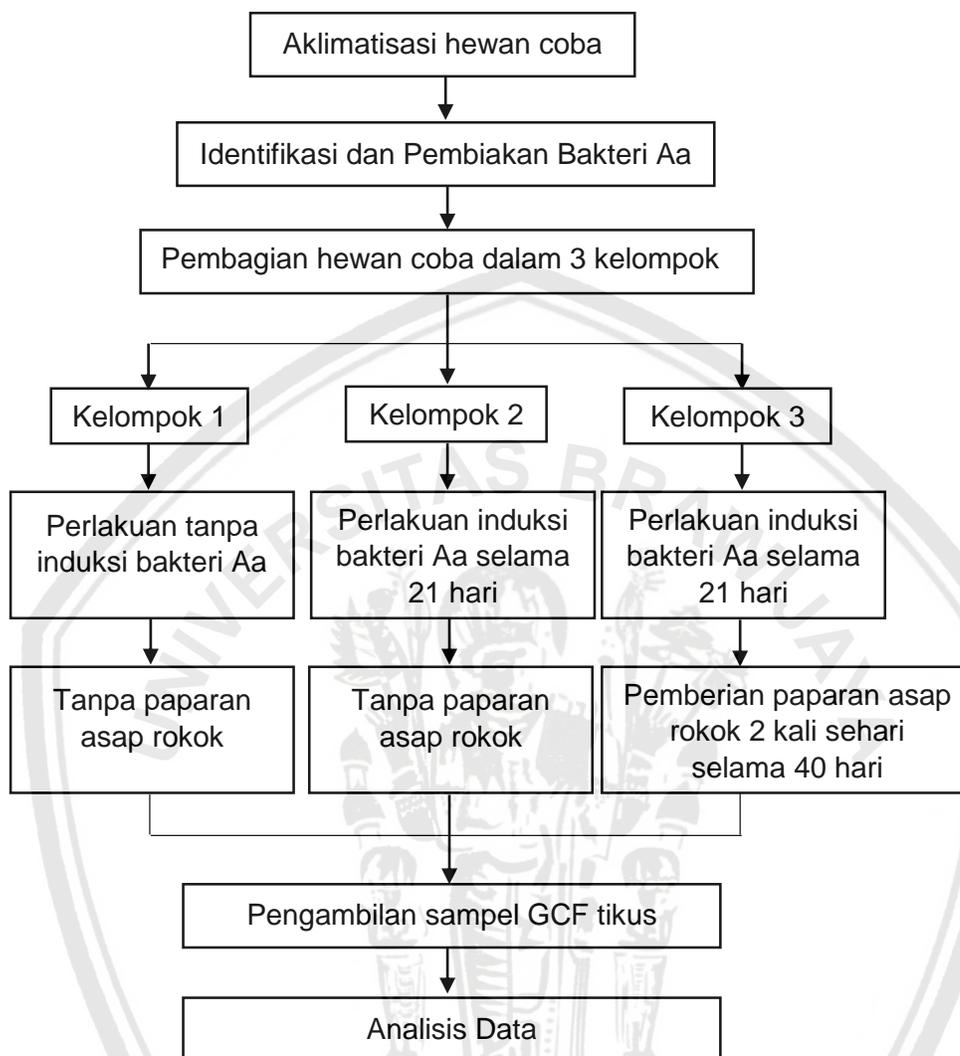
1. Area di sekitar bagian yang akan dilakukan pengambilan sampel harus dalam keadaan kering, agar tidak terjadi kontaminasi cairan rongga mulut.
2. *Perio-paper strip* diinsersikan dengan lembut ke dalam sulkus gingiva sisi mesial gigi insisif pertama rahang bawah tikus sampai sedalam 1mm. Penelitian ini menggunakan *paper point* dengan ukuran 20 sebagai pengganti dari *perio-paper strip*.
3. Dibiarkan selama 30 detik, waktu diatur menggunakan *stopwatch*.
4. Kemudian *perio-paper strip* diambil dan dimasukkan ke tabung *polypropylene* yang telah berisi larutan buffer PBS sebanyak 175 μ L.
5. Sampel disimpan pada suhu -70⁰ C di dalam lemari pendingin sampai jumlah sampel mencukupi.
6. Sampel disentrifus dengan kecepatan 2000-3000 RPM selama 20 menit.
7. Ambil substansi jernih yang berada pada lapisan paling atas dengan hati-hati menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam tabung mikro.

4.7.12 Prosedur Perhitungan Kadar OPG GCF

1. Mempersiapkan semua reagen, sampel dan standard sesuai petunjuk. Seluruh reagen dibiarkan terlebih dahulu dalam suhu ruangan sebelum memulai perhitungan.
2. Menentukan jumlah strip yang dibutuhkan untuk perhitungan.
3. Tambahkan 50 μ l larutan standard ke dalam tabung standart.

4. Tambahkan 40µl sampel ke dalam tabung sampel dan tambahkan 10µl antibodi anti-OPG pada tabung sampel, kemudian tambahkan 50µl streptavidin-HRP ke dalam tabung sampel dan tabung standard. Campurkan larutan-larutan tersebut pada masing-masing tabungnya. Lapsi *plate* dengan menggunakan *sealer*. Inkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C.
5. Melepas *sealer* dan mencuci *plate* sebanyak 5 kali menggunakan cairan *buffer*. Kemudian merendam *plate* dengan 0.35ml larutan *buffer* selama 30 detik hingga 1 menit. Kemudian cairan rendaman dibuang dan *plate* dikeringkan dengan menggunakan kertas saring.
6. Menambahkan 50µl *substrate solution* A pada setiap tabung kemudian tambahkan 50µl *substrate solution* B pada setiap tabung. Menginkubasi *plate* selama 10 menit pada suhu 37°C di ruang gelap.
7. Menambahkan 50µl *stop solution* pada setiap tabung, warna biru akan berubah menjadi kuning dalam sekejap.
8. Menghitung OD *value* dari setiap tabung menggunakan *microplate reader* dengan panjang gelombang 450 nm maksimal 30 menit setelah menambahkan *stop solution* (*Bioassay Technology Laboratory, 2018*).

2.8 Alur Penelitian



2.9 Analisis Data

Data hasil pengukuran hewan coba dianalisa secara statistik dengan menggunakan program SPSS 17,0 for Windows 7 dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p=0,05$) dan taraf kepercayaan 0,95% ($\alpha=0,05$). Data hasil penelitian terlebih dahulu diuji dengan menggunakan uji normalitas dan homogenitas varian. Uji normalitas yang digunakan adalah uji *one sample* Shapiro-Wilk. Uji ini bertujuan untuk mengetahui sebaran data yang ada karena jumlah data 27 (kurang dari 50).

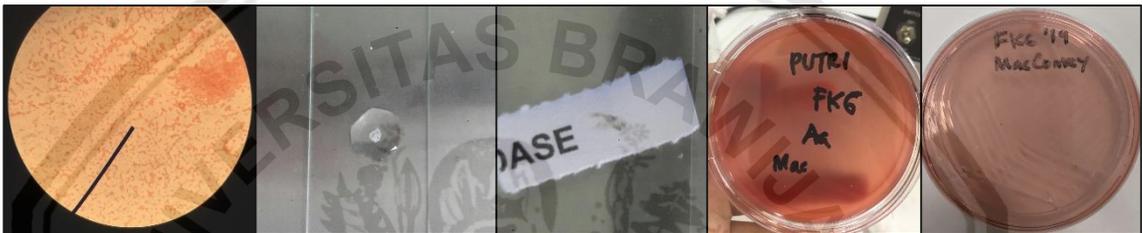
Data hasil penelitian berdistribusi normal selanjutnya dilakukan uji homogenitas ragam dengan menggunakan uji *Levene*. Uji ANOVA (F) digunakan untuk mengevaluasi perbedaan nilai kadar osteoprotegerin setiap kelompok. Uji ini harus berdistribusi normal, variasi homogen dan diambil dari sampel yang acak. Pengujian selanjutnya untuk melihat kelompok mana yang paling berbeda di antara ketiga kelompok tersebut, digunakan uji *Turkey HSD* pada menu *Post Hoc Test*.

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

Prosedur pertama pada penelitian ini adalah identifikasi bakteri Aa yang terdiri dari pewarnaan Gram, tes katalase, tes oksidase, uji hemolisis, serta uji agar MacKonkey.



Gambar 5.1 Hasil Identifikasi Bakteri Aa
(dari kiri) Pewarnaan Gram, Tes Katalase, Tes Oksidase, Uji Hemolisis, dan Uji Agar MacKonkey

Hasil perwarnaan Gram menunjukkan gambaran mikroskopik bakteri Aa berwarna merah (yang menandakan bahwa bakteri Aa merupakan bakteri gram negatif) dengan bentuk kokobasilus. Pada tes katalase muncul gelembung-gelembung udara di atas *object glass* ketika isolat bakteri Aa ditetesi larutan H_2O_2 3%. Bakteri Aa mampu mengubah warna kertas reagen menjadi ungu dalam waktu kurang dari 10 detik pada tes oksidase. Uji hemolisis menunjukkan hasil negatif, karena isolat bakteri Aa tidak menampakkan adanya perubahan warna dalam *blood agar plate* (BAP) setelah diinkubasi selama 18-24 jam. Uji agar MacKonkey juga menunjukkan hasil negatif, yaitu isolat bakteri Aa tidak dapat tumbuh dalam medium agar setelah diinkubasi selama 18-24 jam.

Perhitungan kadar dan densitas bakteri Aa dilakukan dengan menggunakan metode spektrofotometri dengan hasil sebagai berikut:

$$\Lambda = 625$$

$$N1 = 0,708$$

$$N2 = 0,1$$

$$V2 = 10\text{ml}$$

$$V1 \times N1 = V2 \times N2$$

$$V1 \times 0,708 = 10 \times 0,1$$

$$V1 = 1,41 \text{ ml}$$

Keterangan:

Λ = panjang gelombang

N1 = konsentrasi bakteri Aa

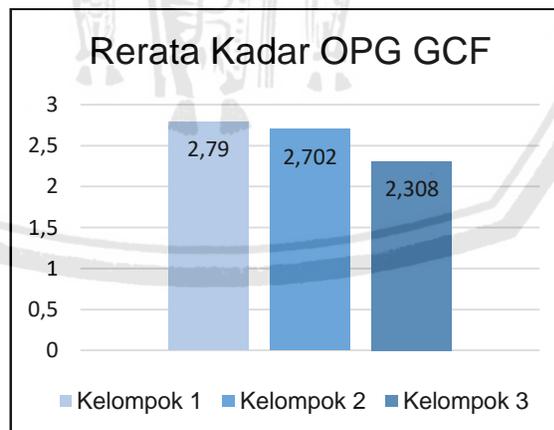
N2 = konsentrasi campuran NaCl fisiologis + bakteri Aa

V1 = volume bakteri Aa yang akan dicampurkan dengan NaCl fisiologis

V2 = volume campuran NaCl fisiologis + bakteri Aa

Volume awal NaCl fisiologis yang ada berjumlah 10ml, dikurangi 1,41 ml terlebih dahulu sehingga menjadi 8,59 ml. Selanjutnya 1,41 ml bakteri Aa yang telah dibiakkan dalam NB dimasukkan ke dalam tabung berisi 8,59 ml NaCl fisiologis, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰ C sebelum diinduksikan pada tikus.

Pada hari ke-41 setelah pemaparan asap rokok dilakukan pengambilan GCF dari seluruh kelompok sampel. Sampel GCF selanjutnya dianalisis dengan *Rat OPG Instant ELISA Kit* untuk mengetahui kadar OPG GCF seluruh sampel.



Gambar 5.2 Diagram rerata kadar OPG GCF

Gambar 5.2 menunjukkan bahwa kelompok 1 memiliki kadar OPG GCF lebih tinggi yaitu 2,79 ng/mL jika dibandingkan dengan kelompok 2 yang berjumlah 2,702 ng/mL maupun kelompok 3 yang berjumlah 2,308 ng/mL.

Prosedur swab bakteri Aa pada tikus dilakukan di tengah proses penelitian berlangsung, kemudian dilanjutkan dengan prosedur identifikasi bakteri serta perhitungan jumlah koloni bakteri Aa.

Tabel 5.1 Rerata Hasil Perhitungan Jumlah Koloni Bakteri

Kelompok	Hari ke-20		Hari ke-41	
	2	3	2	3
Jumlah Koloni	42,25 CFU	57,5 CFU	99 CFU	173,5 CFU

Hasil pengukuran rerata jumlah koloni bakteri menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kelompok sampel 2 dan 3. Rerata jumlah koloni bakteri kelompok sampel 2 pada hari ke-20 adalah 42,25 CFU, sedangkan pada hari ke-41 reratanya meningkat menjadi 99 CFU. Rerata jumlah koloni bakteri kelompok sampel 3 pada hari ke-20 adalah 57,5 CFU, sedangkan pada hari ke-41 reratanya meningkat menjadi 173,5 CFU.

5.2 Analisis Data

Data hasil penelitian berupa perhitungan kadar OPG GCF terlebih dahulu diuji dengan menggunakan uji normalitas *Shapiro-Wilk* karena jumlah data kurang dari 50, kemudian dilakukan uji homogenitas ragam menggunakan uji *Levene*, keduanya menggunakan tingkat kesalahan (α) 0,05. Data hasil penelitian kemudian dianalisis dengan menggunakan metode *One Way Anova*.

Hipotesis pada uji *One Way Anova* ditentukan melalui suatu rumusan yaitu hipotesis diterima jika nilai signifikansi yang diperoleh $<0,05$. Hipotesis penelitian adalah terdapat perbedaan rerata antara kadar OPG GCF antar kelompok.

5.2.1 Uji Normalitas Data

Pengujian normalitas dilakukan dengan menggunakan uji *one sample Shapiro Wilk* yang bertujuan untuk mengetahui apakah sebaran data yang ada berdistribusi normal atau tidak. Keluaran hasil uji adalah dengan melihat besarnya nilai signifikansi. Jika nilai signifikansi $>0,05$ ($\alpha=5\%$), maka data berdistribusi normal.

Tabel 5.2 Uji Normalitas Data dengan Shapiro-Wilk

Jumlah Sampel	Nilai Signifikansi
27	0,766*

Hasil uji normalitas data menunjukkan bahwa nilai signifikasni rerata kadar OPG GCF pada semua kelompok adalah 0,766 lebih besar dari 0,05 ($p>0,05$), ini berarti data penelitian 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 5.3 Uji Homogenitas Ragam

Nilai statistik	Nilai Signifikansi
1,678	0,208*

Hasil uji homogenitas menunjukkan bahwa nilai probabilitas pada perhitungan rerata kadar OPG GCF adalah 0,208 ($p>0,05$), maka dapat disimpulkan bahwa data penelitian tersebut bersifat homogen.

5.2.3 Uji One Way Anova

Uji anova (F) digunakan untuk mengevaluasi perbedaan nilai kadar OPG GCF setiap kelompok. Uji ini harus berdistribusi normal, variasi homogen, dan diambil dari sampel yang acak.

Tabel 5.4 Uji One Way Anova

Nilai Uji Anova (F)	Nilai Signifikansi
8,114	0,002*

Berdasarkan tabel di atas, didapatkan nilai signifikansi 0,002 lebih kecil dari 0,05, maka disimpulkan bahwa paparan asap rokok dapat menurunkan kadar OPG GCF 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 5.5 Uji Post-Hoc Multiple Comparison

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Rerata Perbedaan (I-J)	Nilai Signifikansi
1	2	0,17	0,847
	3	1,13*	0,003*
2	1	-0,17	0,847
	3	0,96*	0,011*
3	1	-1,13*	0,003*
	2	-0,96*	0,011*

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 kadar OPG GCF tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi bakteri Aa.



BAB VI

PEMBAHASAN

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

Berdasarkan hasil uji *One Way ANOVA* didapatkan perbedaan kadar OPG GCF antara kelompok 1, 2, dan 3. Kelompok 2 dan 3 menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa paparan asap rokok selama 40 hari sebanyak 2 kali sehari (pagi dan sore) mampu menurunkan kadar OPG di GCF tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi oleh bakteri Aa selama 21 hari dengan dosis 0.1ml densitas 10^8 CFU. Hal ini sesuai dengan penelitian Gautam *et al.* pada tahun 2011 yang menyatakan bahwa rokok mampu menekan produksi OPG dan mengubah rasio RANKL/OPG. RANKL dan OPG termasuk dalam famili TNF. RANKL mampu mendorong diferensiasi osteoklas dan mengaktifasi adanya resorpsi tulang. Sedangkan OPG menghambat osteoklastogenesis dan menekan resorpsi tulang dengan mengikat RANKL.

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).

Pada penelitian ini, rerata kadar OPG kelompok sampel 2 lebih rendah dibandingkan dengan kelompok sampel 1, namun secara statistik menunjukkan perbedaan yang kurang signifikan. Hal tersebut menunjukkan bahwa induksi bakteri Aa selama 21 hari dapat menurunkan kadar OPG GCF tikus putih (*Rattus norvegicus*). Bakteri Aa secara tidak langsung meregulasi pembentukan sel-sel osteoklas dengan menginduksi ekspresi RANKL sehingga menstimulasi RANK pada sel-sel progenitor osteoklas untuk membentuk osteoklas matang. RANKL kemudian berikatan dengan RANK sampai terjadi osteoklastogenesis (Kim *et al*, 2005). Mekanisme tersebut dihalangi oleh OPG yang mampu berikatan dengan RANK. Terdapat ketidakseimbangan rasio RANKL/OPG pada saat inflamasi, yang mampu menstimulasi adanya resorpsi tulang akibat peningkatan jumlah RANKL dengan OPG yang menurun atau jumlahnya normal secara fisiologis (Boyce *et al*, 2008).

Galret *et al.* pada tahun 2006 menjelaskan bahwa inokulasi bakteri Aa ke dalam rongga mulut menyebabkan adanya migrasi leukosit ke jaringan gingiva, selain adanya proses resorpsi tulang. Ekspresi MMPs (MMP-1, 2, dan 9) dan RANKL berhubungan erat dengan ekspresi IL-1 β , TNF- α , dan IFN- γ , yang ditandai dengan adanya peningkatan reaksi inflamasi dan resorpsi tulang alveolar. Lain halnya dengan IL-4 dan IL-10 yang berhubungan erat dengan peningkatan ekspresi TIMPs (TIMP 1, 2, dan 3) serta OPG, penurunan ekspresi MMPs dan RANKL, serta menurunnya infiltrasi sel pada jaringan periodontal dan resorpsi tulang alveolar.

Kandungan kimia di dalam asap rokok khususnya nikotin mampu merusak jaringan kolagen dengan meningkatkan produksi kolagenase, yang mendorong terjadinya kehilangan perlekatan dan resorpsi tulang alveolar pada kasus periodontitis (Ruslan G., 1996). Penelitian oleh Bouclin *et al.* pada tahun 1997 menunjukkan bahwa perokok memiliki kedalaman poket yang lebih dalam karena terdapat sejumlah besar jaringan kolagen pada jaringan ikat gingiva dibandingkan dengan non-perokok.

Asap rokok yang mengandung nikotin umumnya mempengaruhi jaringan periodontal dengan mengganggu mekanisme respon tubuh, bukan dengan cara memberikan efek kerusakan lokal pada jaringan periodontal. Selain terdeteksi pada GCF, nikotin juga dapat ditemukan pada permukaan akar gigi penderita periodontitis yang terpapar oleh asap rokok. Nikotin mempengaruhi sel-sel fibroblas dengan cara meningkatkan produksi kolagen, namun bukan meningkatkan sekeresnya. Nikotin mampu mengubah struktur sel fibroblas sehingga meningkatkan risiko kerusakan jaringan (Shah *et al.*, 2016).

Jumlah koloni bakteri pada jaringan periodontal yang terpapar asap rokok menunjukkan tingkat fluktuasi yang lebih besar jika dibandingkan dengan jaringan periodontal yang sehat. Jaringan periodontal yang terakumulasi oleh zat-zat kimia dalam rokok mampu menciptakan lingkungan yang mendukung kolonisasi dan pertumbuhan bakteri di dalamnya (Kumar *et al*, 2011). Hal ini didukung oleh penelitian oleh Antoline pada tahun 2006 yang menyebutkan bahwa pada perokok maupun pasien dengan kebiasaan mengunyah tembakau memiliki tingkat pertumbuhan bakteri yang lebih tinggi dibandingkan dengan non-perokok.



BAB VII

PENUTUPAN

7.1 KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan dapat disimpulkan bahwa:

1. Paparan asap rokok mampu menurunkan kadar OPG GCF pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi bakteri Aa.
2. Kadar OPG GCF pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi bakteri Aa tanpa paparan asap rokok adalah 2,702 ng/mL.
3. Kadar OPG GCF pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi bakteri Aa dan diberi paparan asap rokok adalah 2,308 ng/mL.
4. Kadar OPG GCF 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 kadar OPG GCF 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 27 April 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 27 April 2017.
- Aguiar M.C.S., Perinetti G., and Capelli J. 2017. The Gingival Crevicular Fluid As A Source of Biomarkers to Enhance Efficiency of Orthodontic and Functional Treatment of Growing Patients. *Hindawi Biomed International Research*.
- Ajiro Y., Tokuhashi Y., Matsuzaki H., Nakajima S., Ogawa T. 2010. Impact of Passive Smoking on the Bones of Rats. *Article in Orthopedics*, Vol 33(2).
- Akbar, Budhi. 2010. *Tumbuhan dengan Kandungan Senyawa Aktif yang Berpotensi sebagai Senyawa Infertilitas*. Jakarta: Adabia Press.
- Andayani R., Imron A., Rahimi A. 2016. Kemampuan Air Rebusan Daun Salam (*Eugenia polyantha wight*) terhadap Jumlah Makrofag pada Gambaran Histologi Periodontitis Agresif (Penelitian pada Tikus Model). *Cakradonya Dental Journal*, Vol. 8(2): 79-87.
- Antoline K. 2006. Comparison of Bacterial Growth In The Oral Cavity Between Tobacco Consumers and Non-Tobacco Users. *Saint Martin's University Biology Journal*, Vol. 1.
- Ardila C.M., Alzate J., and Guzman I.C. 2012. Relationship between Gram Negative Enteric Rods, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, and Clinical Parameters In Periodontal Disease. *Journal of Indian Society of Periodontology*, Vol. 16(1).
- Armitage, G.C. 1999. Development of A Classification System for Periodontal Disease and Condition. *Ann Periodontol*, Vol. 4(1): 2-3.
- 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 14 April 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 27 April 2017.
- Ayu K.V. 2014. *Pemberian Minyak Biji Rami (Linum Usitatissimum) Per Oral Meningkatkan Jumlah Osteoblas dan Kepadatan Tulang pada Tikus Putih Jantan (Rattus Norvegicus) Galur Sprague Dawley dengan Periodontitis*. Tesis. Tidak diterbitkan, Program Pascasarjana Universitas Udayana, Bali.
- Bartold P.M., Cantley M.D., and Haynes D.R. 2010. Mechanism and Control of Pathologic Bone Loss in Periodontitis. *Periodontology 2000*, Vol. 53: 55-69.

- Batt C. 2014. *Encyclopedia of Food Microbiology 2nd Edition*. USA: CRC Press Taylor and Francis Group.
- Behfarnia P., Saied Z., Haghjooy J., and Naseri R. 2016. Serum, Saliva, and GCF Concentration of RANKL and Osteoprotegerin in Smokers versus Nonsmokers with Chronic Periodontitis. *Advanced Biomedical Research*, Vol. 5(80): 1-7.
- Belton C. 2009. *UV-VIS Spectrophotometer*. London: Imperial College.
- Bennett B.J., et al. 2006. Osteoprotegerin Inactivation Accelerates Advanced Atherosclerotic Lesion Progression and Calcification in Older ApoE^{-/-} Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006, Vol. 26: 2117-2124.
- Benowitz N.L., Jacob P., Jones R.T., and Rosenberg J. 1982. Interindividual Variability in the Metabolism and Cardiovascular Effects of Nicotine in Man. *Journal of Pharmacol Exp Ther*, Vol. 221: 368-372.
- Bioassay Technology Laboratory. 2018. *Rat Osteoprotegerin ELISA Kit*. Shanghai: Junjiang International Bldg.
- Bouclrin R., Landry R.G., and Noreau G. 1997. The Effects of Smoking on Periodontal Structures: A Literature Review. *J Can Dent Assoc*, Vol. 63(3): 356, 360.
- Boyce B.F. and Xing L. 2007. Biology of RANK, RANKL, and Osteoprotegerin. *Arthritis Research and Therapy* 2007, Vol. 9(1): 1-7.
- Boyce B.F. and Xing L. 2008. Functions of RANKL/RANK/OPG in Bone Modelling and Remodelling. *Arch Biochem Biophys*, Vol. 473: 139-146.
- 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.
- Broughton G., Janis J.E., and Attinger C.E. 2006. The Basic Science of Wound Healing *Plast Reconstr Surg* 117, Vol. 7: 12-34.
- Cairlan M. and Lestari E. 2003. *Pedoman Teknik Dasar Untuk Laboratorium Kesehatan*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Chaskes S. and Austin R. 2015. *Practical Handbook of Microbiology 3rd Edition*. USA: CRC Press Taylor and Francis Group.
- Che Shuanjiang. 2015. *Analysis of Gingival Crevicular Fluids of Patients with Severe Periodontitis*. Tesis. Tidak diterbitkan, Faculty of Dentistry, University of Hong Kong.
- Doig P., Todd T., Sastry P.A., Lee K.K., Hodges R.S., Paranchych W. and Irvin R.T. 1988. Role of Pili in Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to Human Respiratory Epithelial Cell. *Infect Immun*, Vol. 128(9).

- Dorland W.A.N. 2012. *Kamus Saku Kedokteran Dorland Edisi 28*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Eren G., Turkoglu H.O., Atmaca H., and Atilla F.G. 2014. Evaluation of GCF MMP-1, MMP-8, TGF- β 1, PDGF-AB, and VEGF Levels in Periodontally Healthy Smokers. *Turkish Journal of Medical Sciences*, Vol. 45: 850-854.
- Ferreira D.C.A., Aguiar S.M.F., Nelson P., Mussolino A., and Rossi A.D. 2014. Localized Aggressive Periodontitis—Clinical, Radiographic, Microbiological and Immunological Findings. *RSBO*, Vol. 11(4): 393-397.
- Frederer, W. 1963. *Experimental Design Theory And Application*. Oxford: Oxford and Lbh Publish Hincó.
- Galret G.P., et al. 2006. Cytokine Pattern Determines the Progression of Experimental Periodontal Disease Induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the Modulation of MMPs, RANKL, and Their Physiological Inhibitors. *Oral Microbial Immunol*, Vol. 21(1): 12-20.
- Garrels M. and Oatis C.S. 2011. *Laboratory Testing for Ambulatory Settings: A Guidance for Health Care Professionals*. China: Elsevier.
- Goncalves P.F., Sallum E.A., Sallum A.W., Casati M.Z., Toledo S., and Junior F.H.N. 2004. Dental Cementum Reviewed: Development, Structure, Composition, Regeneration, and Potential Functions. *Braz Journal Oral Science*, Vol. 4(12): 651-658.
- Hassanpour M., Tamam S., and Shigapov T. 2015. A Histological and Clinical Evaluation of Shallow Deep Probing Depths. *International Dental Journal of Student's Research*, Vol. 3(2): 55-58.
- Hewitt C.D., Innes D.J., Savory J., and Willis M.R. 1989. Normal Biochemical and Hematological Values in New Zealand White Rabbits. *Clinical Chemistry*, Vol. 35(8): 1777-1779.
- Hosadurga R.R., et al. 2015. Evaluation of The Efficacy of 2% *Ocimum sanctum* Gel in the Treatment of Experimental Periodontitis. *International Journal of Pharmaceutical Invertigation*, Vol. 5(1).
- Ihedioha J.I., Ugwuja J.I., Noel-Uneke O.A., Udeani I.J., and Daniel-Igwe G. 2012. Reference Values for the Haematology Profile of Conventional Grade Outbred Albino Mice (*Mus musculus*) in Nsukka, Eastern Nigeria. *ARI*, Vol. 9(2):1601-1612.
- Jia R, et al. 2015. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Induces Th17 Cells In Atherosclerotic Lesions. *FEMS Patogens and Diseases Journals*, Vol. 73.
- Kang J, et al. 2012. *Aggregatobacter actinomycetemcomitans* Infection Enhances Apoptosis In Vivo through a Caspase-3-Dependent Mechanism in Experimental Periodontitis. *IAI Journals*, Vol. 80(6).

- Kementerian Kesehatan RI. 2014. *InfoDATIN-Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI, Situasi Kesehatan Gigi dan Mulut*, Kemenkes RI, Jakarta Selatan, hal 1.
- Kementerian Kesehatan RI. 2015. *InfoDATIN-Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI, Perilaku Merokok Masyarakat Indonesia*, Kemenkes RI, Jakarta Selatan, hal 1.
- Kim Y., Sato K., Asagiri M., Morita I., Soma K., and Takayanagi H. 2005. Contribution of Nuclear Factor of α Activated T Cells C1 to The Transcriptional Control of Immunoreceptor Osteoclast-Associated Receptor but Not Triggering Receptor Expressed by Myeloid Cells-2 During Osteoclastogenesis. *J Biol Chem*, Vol. 280: 32905–32913.
- Kolarz G., Schodl C., Skoumal M., Woloszczuk W., and Wottawa A. 2003. Osteoprotegerin Serum Levels in Rheumatoid Arthritis. *Journal Miner Stoffwechs*, Vol. 10(3): 10-12.
- 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.
- Koregol A.C., More S.P., Nainegali S., Kalburgi N., and Verma S. 2013. Analysis of Inorganic Ions In Gingival Crevicular Fluid As Indicators of Periodontal Disease Activity: A Clinico-Biochemical Study. *Contemporary Clincial Dentistry*, Vol. 2(4).
- Kraj M., Owczarska K., Sokolowska U., Centkowski P., Poglod R., and Kruk B. 2005. Corellation of Osteoprotegerin and sRANKL Concentration in Serum and Bone Marrow of Multiple Myeloma Patients. *Arch Immunol Ther Exp*, Vol. 53: 454-464.
- Krinke G.J. 2000. *The Laboratory Rat*. San Diego: Academic Press.
- Kumar P.S., Matthews C.R., Joshi V., Jager M., and Aspiras M. 2011. Tobacco Smoking Effects Bacterial Acquisition and Colonization In Oral Biofilms. *Infection and Immunity Journal*, Vol. 79(11): 4370-4378.
- Kubota M., et al. 2016. The Effects of Cigarette Smoke Condensate and Nicotine on Periodontal Tissue in a Periodontitis Model Mouse. *PLoS ONE*, Vol. 11:(5).
- Kusumawardani A., et al. 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.

- Malathi K., Arjun S., Blaisie R.M.P., and Dhanesh S. 2013. Attached Gingiva: A Review. *International Journal of Scientific Research and Review*, Vol. 3(2): 188-198.
- 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.
- Martinez B.A. and Ruiz F.E. 2005. Periodontal Disease As Bacterial Infection. *Av Periodon Implantol*, Vol. 17(3): 111-118.
- Mathiazhagan S. and Anand, Parthiban. 2013. Alpha Adrenergic Receptors: A Brief Perspective. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*, Vol. 7(4): 16.
- Mortazavi H. and Baharvand M. 2016. Review of Common Condition of Associated with Periodontal Ligament Widening. *Imaging Science In Dentistry*, Vol. 46: 229-237.
- Nakamura Hiroaki. 2007. Morphology, Function, and Differentiation of Bone Cells. *Journal of Hard Tissue Biology*, Vol. 16(1): 15-20.
- Nanaiah K.P., Nagarathna D.V., and Manjunath N. 2013. Prevalence of Periodontitis Among The Adolescents Aged 15-18 Years In Mangalore City: An Epidemiological and Microbiological Study. *J Indian Soc Periodontol (2013)*.
- Nasution A.S. 2014. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Buah Naga Super Merah (Hylocereus Costaricensis) terhadap Malondialdehid dan Gambaran Histopatologi Tikus Wistar yang Dipapar Asap Rokok*. Tesis. Tidak diterbitkan, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Newman M.G., Takei H., Klokkevold P.R., and Carranza, F.A., 2015. *Carranza's Clinical Periodontology 12th Edition*. Elsevier Saunders, Singapore.
- Notohartoyo I.T. and Sihombing M. 2015. Faktor Risiko pada Penyakit Jaringan Periodontal Gigi di Indonesia (Riskesda 2013). *Buletin Penelitian Sitem Kesehatan*, Vol. 18(1): 87-94.
- Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 109 Tahun 2012 tentang Pengamanan Bahan yang Mengandung Zat Adiktif berupa Produk Tembakau bagi Kesehatan*. 2012. Admin Perpu, Jakarta.
- Polimeni G., Xiropaidis A.V., and Wikesjo U.M.E. 2006. Biology and Principles of Periodontal Wound Healing/Regeneration. *Periodontology 2000*, Vol. 41: 30-47.
- Radwan L.R.S., Grawish M.E., Elmadawy S.H., and El-Hawary Y.M. 2016. Ultrasurface Morphological Changes in the Rat Tongue Posterior One-Third Exposed to Passive Smoke. *EC Dental Science Research Article*, Vol. 4(4): 846-847.

- Raja M., Ummer F., and Dhivakar C.P. 2014. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-A Tooth Killer?. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, Vol. 8(8): 13-14.
- Rauner M., Sipos W., and Pietschmann P. 2007. Osteoimmunology. *International Archives of Allergy and Immunology*, Vol. 143: 31-41.
- 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, R.D. The Role of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Fimbrial Adhesin on MMP-8 Activity in Aggressive Periodontitis Pathogenesis. 2012. *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*.
- Rostavia I., Ariswati H.G., and Nugraha P.C. 2016. Colony Counter Multipen. *Seminar Tugas Akhir*.
- Ruslan, G. 1996. Efek Merokok terhadap Rongga Mulut. *Cermin Dunia Kedokteran*, Vol. 41(3): 113.
- Schoppet M., Preissner K.T., and Hofbauer L.C. 2002. RANK Ligand and Osteoprotegerin- Paracrine Regulators of Bone Metabolism and Vascular Function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Vol. 22: 549-553.
- Schreiner H.C, et al. 2003. Tight-adherence Genes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are Required for Virulence In A Rat Model. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, Vol. 100(12): 7295-7300.
- Seyedmajidi S.A., et al. 2014. Effect of Zinc-Deficient Diet on Oral Tissues and Periodontal Indices Rats. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, Vol. 3(2): 81-87.
- Shah A.F., Batra M., Baba I.A., Saima S., and Yousuf A. 2016. Periodontal Disease and Smoking: A Review. *Clinical Cancer Investigation Journal*, Vol. 5(2): 99-102.
- Shavey O., Michael E., Ross H., and Mackay J. 2009. *The Tobacco Atlas Third Edition*. American Cancer Society, Atlanta.
- Singh G.H., Amit B., and Yaswin S. 2013. Smoking and Periodontal Disease. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*, Vol. 2(2): 7-11.

- Smith H. 2012. Osteoprotegerin Secretion by Mevastatin via p38MAPK and NF-kB. *Open Journal of Rheumatology and Autoimmune Disease*, Vol. 2: 26-31.
- 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.
- Soraya C. and Sunnati, Maulina V. 2016. Efek Anti Bakteri Ekstrak Batang Serai (*Cymbopogon citratus*) terhadap Pertumbuhan *Enterococcus faecalis*. *Cakradonya Dental Journal*, Vol. 8(2): 69-78.
- Soysa N.S., Alles N., Aoki K., and Ohya K. 2012. Osteoclast Formation and Differentiation: An Overview. *Journal of Medical and Dental Sciences*, Vol. 59: 65-72.
- Sreedevi M., Ramesh A., and Dwarakanath C. 2011. Periodontal Status in Smokers and Nonsmokers: A Clinical, Microbiological, and Histopathological Study. *International Journal of Dentistry*.
- Sriraman P., Mohanraj R., and Neelakantan P. 2014. Aggregatibacter actinomycetemcomitans In Periodontal Disease. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, Vol. 5(2): 407-412.
- Stejskal D., Bartekb J., Pastorkováa, Ruzickáa V., Orala I., and Horalika, D. 2001. Osteoprotegerin, RANK, RANKL. *Biomed Papers*, Vol. 145(2): 61-62.
- Tankeshwar. 2013. *Catalase Test: Principle, Uses, Procedure and Results*. Accessed from <https://microbeonline.com/catalase-test-principle-uses-procedure-results/>. Diakses pada 1 Mei 2018.
- Tankeshwar. 2013. *MacConkey Agar (MAC): Composition, Preparation, Uses and Colony Characteristics*. Accessed from <https://microbeonline.com/macconkey-agar-mac-composition-preparation-uses-and-colony-characteristics/>. Diakses pada 1 Mei 2018.
- Trauth J.A., Seidler F.J., Ali S.F., and Slotkin T.A. 2001. Adolescent Nicotine Exposure Produces Immediate and Long-Term Changes in CNS Noradrenergic and Dopaminergic Function. *Brain Research*. Vol. 892(2): 269–80.
- Tyrovola J.B., Perrea D., Halazonetis D.J., Dontas I., Vlachos I.S., and Makou M. 2010. Relation of Soluble RANKL and Osteoprotegerin Levels in Blood and Gingival Crevicular Fluid to the Degree of Root Resorption after Orthodontic Tooth Movement. *Journal of Oral Science*, Vol. 52(2): 299-311.
- Uitto Jukka. 2003. Gingival Crevice Fluid-An Introduction. *Periodontology 2000*. Vol. 31: 9-11.

- Versalovic, J., et al. 2011. *Manual of Clinical Microbiology 10th Edition*. Washington DC: ASM Press.
- Waddington R.J., Embery G. 2001. Proteoglycans and Orthodontic Movement. *J Orthod*, Vol. 28(4): 281-290.
- Whyte M.P., Obrecht S.E., Finnegan P.M., Jones J.L., Podgornik M.N., McAlister W.H., and Mumm S. Osteoprotegerin Deficiency and Juvenile Paget's Disease. *N Engl J Med* 2002, Vol. 347: 175-184.
- Widodo E., Priosoeryanto B.P., Estuningsih S., Agungpriyono D.R., and Utji R. 2007. Effect of Clove Cigarette Exposure on White Rat: Special Emphasis on the Histopathology of Respiratory Tract. *Medical Journal Indonesia*, Vol. 16: 212-218.
- 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.
- Witari A.S. and Nurika I. 2016. Penentuan Isolat Bakteri Asidogenik yang Mampu Menghasilkan Total Asam Tertinggi dari Limbah Cair Tahu. *Jurnal Industria*, Vol. 5(1): 13-24.
- Yulvizar C. 2013. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Probiotik pada *Rastrelliger sp.* *Biospecies*, Vol. 6(2): 1-7.
- Zhou J. 2006. *Porphyromonas Gingivalis* Affects Host Collagen Degradation by Affecting Expression, Activation, and Inhibition of Matrix Metalloproteinases. *Journal of Periodontal Research*, Vol. 41(1): 47-54.