



PENGARUH PEMBERIAN NANOLIPOSOM EKSTRAK BIJI PEPAYA (*Carica papaya L.*) TERHADAP JUMLAH OSTEOKLAS MODEL DIABETIK PERIODONTITIS SECARA *IN VIVO*

SKRIPSI

UNTUK MEMENUHI PERSYARATAN MEMPEROLEH GELAR SARJANA

OLEH:

MARIA ELIZABETH INDRIYANI TOGU ITO

175160107111003

PROGRAM STUDI SARJANA KEDOKTERAN GIGI

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2020



HALAMAN PENGESAHAN**SKRIPSI****PENGARUH PEMBERIAN NANOLIPOSOM EKSTRAK BIJI PEPAYA (*Carica papaya L.*) TERHADAP JUMLAH OSTEOKLAS MODEL DIABETIK PERIODONTITIS SECARA *IN VIVO*****OLEH :****MARIA ELIZABETH INDRIYANI TOGU ITO****175160107111003**

Telah Diuji Di Depan Majelis Penguji Skripsi Pada 29 Desember 2020

Dan Dinyatakan Memenuhi Syarat Memperoleh Gelar Sarjana Dalam Bidang Kedokteran Gigi

Menyetujui,

PEMBIMBING

drg. Ratih Pusporini, M. Si
NIP. 2014058202172001

PENGUJI I

PENGUJI II

drg. Lukman Hakim Hidayat, Sp. PM

NIP/NIK : 2012038204161001

drg. Khusnul Munika Listari, Sp.Perio

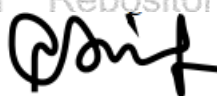
NIP. 198303302018032001

Malang, 29 Desember 2020

Mengetahui,

Ketua Progam Studi Sarjana Kedokteran Gigi

Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya

drg. Citra Insany Irgananda M. Med. Ed

NIP: 198606232015042001



PERNYATAAN ORISINILITAS SKRIPSI

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam naskah skripsi ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu perguruan tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar Pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah skripsi ini dibuktikan terdapat unsur-unsur plagiasi, saya bersedia skripsi ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh SARJANA dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku (UU No. 20 Tahun 2003, Pasal 25 ayat 2 dan Pasal 70).

Malang, 29 Desember 2020

Yang Membuat Pernyataan



Maria Elizabeth Indriyani Togu Ito

175160101111003

ABSTRAK

Maria Elizabeth Indriyani Togu Ito, NIM: 175160107111003, Program Studi Sarjana Kedokteran Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Brawijaya, Malang, 29 Desember 2020, “Pengaruh Pemberian Nanoliposom Ekstrak Biji Pepaya (*Carica papaya L.*) Terhadap Jumlah Osteoklas Model Diabetik Periodontitis Secara *In Vivo*”, Pembimbing: drg. Ratih Pusporini, M.Si.

Periodontitis adalah peradangan pada jaringan pendukung gigi yang disebabkan oleh mikroorganisme spesifik yang mengakibatkan kerusakan progresif jaringan ikat periodontal dan tulang alveolar. Periodontitis dan diabetes mellitus memiliki hubungan dua arah, diabetes mellitus merupakan faktor predisposisi dari periodontitis dan periodontitis dapat memperburuk kontrol metabolik diabetes mellitus. Ekstrak biji pepaya (*Carica papaya linn*) diketahui memiliki beberapa senyawa aktif yang berfungsi sebagai anti-inflamasi dan antioksidan. Namun, kelarutan yang rendah dalam air, toksisitas tinggi serta kurangnya kemampuan permeabilitas menembus barrier absorpsi dapat mempengaruhi bioavailabilitas suatu senyawa bahan alam di dalam tubuh sehingga perlu digunakan nanoliposom sebagai *drug delivery system*. Penggunaan nanoliposom terbukti dapat memperbaiki indeks terapeutik obat, melindungi dari degradasi enzimatik, memperbaiki profil farmakokinetika dan menurunkan toksisitas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian nanoliposom ekstrak biji pepaya terhadap jumlah osteoklas yang berkaitan dengan proses destruksi tulang alveolar tikus model diabetik periodontitis. Penelitian menggunakan sampel sebanyak 36 ekor tikus *Sprague dawley* yang dibagi menjadi 3 kelompok pada hari ke 3, 7 dan 14. Setiap kelompok yaitu kelompok K (tikus model diabetik periodontitis tanpa perlakuan), kelompok P1 (tikus model diabetik periodontitis yang diberikan sediaan ekstrak ethanol biji pepaya 96%) dan kelompok P2 (tikus model diabetik periodontitis yang diberikan sediaan nanoliposom ekstrak ethanol biji pepaya 96%). Kedua sediaan diberikan 0,5 ml per oral dan diteteskan sebanyak 0,03 ml pada sulkus gingiva satu kali sehari. Osteoklas dihitung dengan pewarnaan HE. Data yang diperoleh diuji menggunakan *One Way Anova* dan uji *Post Hoc Tukey*. Berdasarkan hasil uji *One way Anova* hari ke-14 menunjukkan perbedaan jumlah sel osteoklas yang bermakna ($p < 0,05$) antar kelompok. Uji *Post Hoc* hari ke-7 dan 14 menunjukkan tidak terdapat perbedaan signifikan antara kelompok P2 dan P1 ($p > 0,05$) dan

terdapat perbedaan signifikan antara kelompok K dengan P1 dan P2 ($p < 0,05$). Kesimpulan penelitian ini adalah nanoliposom ekstrak ethanol biji pepaya berpengaruh terhadap penurunan jumlah sel osteoklas pada tikus model diabetik periodontitis.

Kata kunci: Diabetes Melitus, Nanoliposom Ekstrak Biji Pepaya, Osteoklas, Periodontitis.



ABSTRACT

Maria Elizabeth Indriyani Togu Ito, NIM: 175160107111003, Bachelor of Dentistry Study Program, Faculty of Dentistry, Brawijaya University, Malang. 29 Desember 2020. **The Effect of Papaya Seed Extract Nanoliposomes (*Carica papaya L.*) On the Number of Osteoclasts in the In Vivo Diabetic Periodontitis Model.** Supervisor: drg. Ratih Pusporini, M.Si.

Periodontitis is a tissue inflammation on the supporting tooth generated by specific microorganism resulting a progressive damage to the periodontal connective tissue and alveolar bone. Periodontitis and diabetes mellitus are interrelated, diabetes mellitus is a predisposition factor of periodontitis which could aggravate the metabolic control of diabetes mellitus. Papaya seed extract is known to have several active compounds which serve as an anti-inflammation and antioxidant. However, the low solubility in water, high toxicity and the lack of permeability to penetrate the absorption barrier can affect the bioavailability of a natural compound in the body so it is necessary to use nanoliposomes as drug delivery system. Nanoliposome is proven could fix the therapeutic index of a medicine, protect itself from enzymatic degradation, repair pharmacokinetic profile and decrease toxicity. This research aims to find out the effect of giving nanoliposome of papaya seed extract towards the number of osteoclasts which related to the alveolar bone destruction process of model diabetic periodontitis. This research uses the sample of 36 Sprague dawley rats which divided into 3 groups which are group K (diabetic periodontitis rats without treatment) , group P1 (diabetic periodontitis rats given 96% of papaya seed ethanol extract) and group P2 (diabetic periodontitis rats given 96% ethanol extract nanoliposome preparation of papaya seed) on days 3, 7 and 14. Both preparations were given 0.5 ml orally and 0.03ml dropped on the gingival sulcus once a day. Osteoclast was calculated with HE coloring. The data was *One way Anova* and *Post Hoc Tukey* tested. Based on the result, *One way Anova* test on the fourteenth day, there was a significant difference in the number of osteoclasts ($p < 0.05$) between groups. Post Hoc test on days 7 and 14 showed no significant difference between groups P2 and P1 ($p > 0.05$) and there were significant differences between groups K and P1 and P2 ($p < 0.05$). The conclusion of this study is that the ethanol extract of papaya seed nanoliposomes had an effect on reducing the number of osteoclasts in diabetic periodontitis rats.

Keywords: Diabetes Mellitus, Nanoliposome of Papaya Seeds Extract, Osteoclast, Periodontitis.

DAFTAR ISI**HALAMAN SAMBUL**

i

HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI

ii

PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI

iii

ABSTRAK

iv

ABSTRACT

vi

KATA PENGANTAR

vii

DAFTAR ISI

ix

DAFTAR GAMBAR

xiii

DAFTAR TABEL

xiv

DAFTAR SINGKATAN

xv

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

1

1.2 Rumusan Masalah

2

1.3 Tujuan Penelitian

3

1.3.1 Tujuan Umum

3

1.3.2 Tujuan Khusus

3

1.4 Manfaat Penelitian

3

1.4.1 Manfaat Aplikatif

3

1.4.2 Manfaat bagi Akademik

3

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pepaya

4

2.1.1 Taksonomi

4

2.1.2 Morfologi

4

2.2 Ekstrak Biji Pepaya

5

2.2.1 Senyawa Aktif

5

2.2.2 Metode Ekstraksi

7

2.3 Nanoliposom

8

2.4 Diabetes Mellitus

9

2.4.1	Klasifikasi Diabetes Mellitus	9
2.4.2	Etiologi Diabetes Mellitus	10
2.4.3	Patogenesis Diabetes Mellitus Tipe 2	10
2.4.4	Gejala Diabetes Mellitus	11
2.5	Periodontitis	12
2.5.1	Etiologi Periodontitis	12
2.5.2	Patogenesis Periodontitis	13
2.5.3	Penatalaksanaan Periodontitis	13
2.6	Hubungan antara Diabetes Mellitus dan Periodontitis	14
2.7	Osteoklas	15
2.7.1	Morfologi	15
2.7.2	Osteoklastogenesis	16
2.7.3	Resorpsi Tulang	17
2.8	Tikus <i>Sprague Dawley</i>	18
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN		
3.1	Kerangka Konsep Penelitian	19
3.2	Keterangan Kerangka Konsep Penelitian	20
3.3	Hipotesis Penelitian	21
BAB IV METODE PENELITIAN		
4.1	Rancangan Penelitian	22
4.2	Sampel Penelitian	22
4.2.1	Kriteria Inklusi	22
4.2.2	Kriteria Eksklusi	22
4.2.3	Estimasi Jumlah Pengulangan	22
4.3	Variabel Penelitian	24
4.3.1	Variabel Bebas	24
4.3.2	Variabel Terikat	24
4.3.3	Variabel Kontrol	24
4.4	Lokasi dan Waktu Penelitian	24
4.5	Alat dan Bahan Penelitian	24
4.5.1	Alat dan Bahan Perawatan Hewan coba	24



4.5.2	Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Biji Pepaya	25
4.5.3	Alat dan Bahan Pembuatan Nanoliposom Ekstrak Biji Pepaya	25
4.5.4	Alat dan Bahan Induksi Model Diabetik Periodontitis	25
4.5.4.1	Alat dan Bahan Induksi Diabetes Meliitus Hewan Coba	25
4.5.4.2	Alat dan Bahan Induksi Periodontitis Hewan Coba	25
4.5.5	Alat dan Bahan Pembedahan Hewan Coba	25
4.5.6	Alat dan Bahan Pembuatan Preparat Jaringan	26
4.5.7	Alat dan Bahan Pewarnaan HE	26
4.5.8	Alat dan Bahan Perhitungan Osteoklas	26
4.6	Definisi Operasional	26
4.6.1	Ekstrak Biji Pepaya	26
4.6.2	Nanoliposom Ekstrak Biji Pepaya	26
4.6.3	Diabetes Mellitus	27
4.6.4	Periodontitis	27
4.6.5	Jumlah Osteoklas	27
4.7	Prosedur Penelitian	27
4.7.1	<i>Ethical Clearance</i>	27
4.7.2	Perawatan Hewan coba	27
4.7.3	Pembuatan Ekstrak Biji Pepaya	28
4.7.4	Pembuatan Nanoliposom Ekstrak Biji Pepaya	28
4.7.5	Pembuatan Model Diabetik Periodontitis	29
4.7.5.1	Induksi Diabetes Mellitus pada Hewan Coba	29
4.7.5.2	Pemeriksaan Hasil Induksi Diabetes Mellitus	29
4.7.5.3	Induksi Periodontitis pada Hewan Coba	29
4.7.5.4	Pemeriksaan Hasil Induksi Periodontitis	29
4.7.6	Pengobatan pada Kelompok Perlakuan	29
4.7.7	Pengorbanan dan Pembedahan Hewan Coba	30
4.7.8	Sanitasi Hewan Coba	30
4.7.9	Pembuatan Blok Parafin dan Preparat Jaringan	30
4.7.10	Pengecatan Preparat Jaringan dengan Pewarnaan HE	32
4.7.12	Pengamatan Jumlah Osteoklas	33



4.8 Skema Penelitian

4.9 Analisis Data

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Penelitian

5.2 Analisa Data

5.2.1 Uji Normalitas

5.2.2 Uji Homogenitas

5.2.3 Uji One Way Anova

5.2.4 Uji Post-hoc Tukey

5.3 Pembahasan

BAB VI PENUTUP

6.1 Kesimpulan

6.2 Saran

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN

Lampiran 1. Pernyataan Keaslian Tulisan

Lampiran 2. *Ethical Clearance*

Lampiran 3. Foto Penelitian

Lampiran 4. Kadar Gula Darah

Lampiran 5. Hasil penghitungan Osteoklas

Lampiran 6. Hasil Analisis Data Jumlah Osteoklas

34

34

36

39

39

40

41

42

44

48

48

49

59

59

60

61

65

66

67

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tanaman <i>Carica papaya</i> .	5
Gambar 2.2 Buah pepaya matang.	5
Gambar 2.3 Perbandingan Histologis tulang alveolar tikus dengan pewarnaan Hematoksin-Eosin menggunakan mikroskop elektrik dengan perbesaran 400x	16
Gambar 5.1 Diagram hasil perhitungan rata-rata jumlah sel osteoklas pada kelompok kontrol (K), perlakuan 1 (P1), dan perlakuan 2 (P2) pada hari ke 3, 7 dan 14	37
Gambar 5.2 Gambaran sel osteoklas dengan pewarnaan <i>Hematoxylin-Eosin (HE)</i> perbesaran 400x pada hari ke-3	39
Gambar 5.3 Gambaran sel osteoklas dengan pewarnaan <i>Hematoxylin-Eosin (HE)</i> perbesaran 400x pada hari ke-7 : (A) Kelompok Kontrol (K), (B) Kelompok Perlakuan 1 (P1), (C) Kelompok Perlakuan 2 (P2)	41
Gambar 5.4 Gambaran sel osteoklas dengan pewarnaan <i>Hematoxylin-Eosin (HE)</i> perbesaran 400x pada hari ke-14 : (A) Kelompok Kontrol (K), (B) Kelompok Perlakuan 1 (P1), (C) Kelompok Perlakuan 2 (P2)	43

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1 Kerangka Konsep Penelitian.	20
Tabel 5.1 Uji Normalitas data Jumlah Sel Osteoklas	44
Tabel 5.2 Uji Homogenitas data Jumlah Sel Osteoklas	45
Tabel 5.3 Uji <i>One-Way Anova</i> Jumlah Sel Osteoklas hari ke-3	45
Tabel 5.4 Uji <i>One-Way Anova</i> Jumlah Sel Osteoklas hari ke-7	46
Tabel 5.5 Uji <i>One-Way Anova</i> Jumlah Sel Osteoklas hari ke-14	46
Tabel 5.6 Uji <i>Post-hoc Tukey</i> perbandingan kelompok K, P1 dan P2 pada hari ke-7	47
Tabel 5.7 Uji <i>Post-hoc Tukey</i> perbandingan kelompok K, P1 dan P2 pada hari ke-14	48

DAFTAR SINGKATAN

AGEs	: <i>Advanced Glycation End Product</i>
ATP	: <i>Adenosine triphosphate</i>
DM	: <i>Diabetes Melitus</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EDTA	: <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
GDP	: <i>Gula Darah Puasa</i>
HCL	: <i>Hydrochloric Acid</i>
HE	: <i>Hematoxylin and Eosin</i>
IL-	: <i>Interleukin</i>
LC-MS	: <i>Liquid chromatography-mass spectrometry</i>
LPS	: <i>Lipopolisakarida</i>
MMPs	: <i>Sitokin Matrix Metalloproteinases</i>
M-CSE	: <i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
NA	: <i>Nicotinamide</i>
NO	: <i>Nitric oxide</i>
NFATC1	: <i>Nuclear Factor Of Activated T Cells I</i>
OPG	: <i>Osteoprotegerin</i>
OS	: <i>Oxidative stress</i>
OSCAR	: <i>Osteoclast-Associated Receptor</i>
PG	: <i>Porphyromonas gingivalis</i>
PGE2	: <i>Prostaglandin E2</i>
PMNs	: <i>Polimorfonuklear</i>
PSA	: <i>Particles Sized Analyzer</i>





RA : *Rheumatoid Arthritis*

RANK : *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B*

RANKL : *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand*

ROS : *Reactive Oxygen Species*

SD : *Sprague Dawley*

SRP : *Scaling and root planning*

STZ : *Streptozotocin*

TNF- : *Tumor Necrosis Factor*

TRAP : *Tartrate-resistant acid phosphatase*

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Periodontitis adalah penyakit inflamasi kompleks yang ditandai dengan kerusakan progresif sekitar jaringan ikat dan pendukung tulang alveolar gigi. Di Indonesia, penyakit periodontal menduduki urutan kedua setelah karies dan masih merupakan masalah di masyarakat (Wijaya dan Masulili, 2016). Menurut data RISKESDAS 2018, persentase kasus periodontitis di Indonesia mencapai 74,1% (KEMENKES, 2018). Faktor resiko terbesar penyakit periodontitis adalah penyakit sistemik diabetes mellitus yang terbukti meningkatkan proses inflamasi pada jaringan periodontal dan menyebabkan destruksi tulang alveolar (Llambés *et al*, 2015). Periodontitis dan diabetes mellitus memiliki hubungan dua arah, diabetes mellitus merupakan faktor predisposisi dari periodontitis dan periodontitis dapat memperburuk kontrol metabolik kondisi diabetes mellitus (Khumaedi *et al*, 2019).

Resorpsi tulang alveolar merupakan suatu proses dinamis pada jaringan tulang karena ketidakseimbangan antara sel osteoklas sebagai sel yang membantu kerusakan tulang dan sel osteoblas sebagai sel yang membantu pembentukan tulang, dimana jumlah sel osteoklas lebih tinggi daripada sel osteoblas (Yustina, 2012). Keberadaan osteoklas pada permukaan periodontal dari tulang alveolar mengindikasikan terjadinya resorpsi aktif dan berada pada daerah itu sampai jaringan sekitar mengalami kerusakan (Andriena *et al*, 2012).

Gold standard penatalaksanaan penyakit periodontal adalah *scaling root planning* (SRP) sebagai *initial therapy* (Fitri *et al*, 2019). Selain itu, dapat dilakukan terapi bedah jaringan periodontal seperti *periodontal flap*, eliminasi poket periodontal dan terapi regeneratif seperti pemberian *bone graft* (Shantipriya, 2011). Pemberian obat antibiotika dan obat anti-inflamasi golongan non steroid seperti ibuprofen merupakan terapi penunjang penyakit periodontal. Namun, penggunaan ibuprofen dalam jangka panjang diketahui memiliki efek samping seperti *stomach ulcer*

dan *hemorrhage*. Efek samping yang dapat ditimbulkan memerlukan alternatif bahan lain yang lebih aman (Tamara *et al*, 2019). Maka dari itu, dilakukan upaya pengembangan terapi periodontitis dengan memanfaatkan bahan alam seperti buah pepaya (*Carica papaya L.*). Penggunaan ekstrak biji pepaya (*Carica papaya L.*) didasarkan oleh hasil penelitian sebelumnya, diketahui kandungan senyawa fenol dan flavonoid pada biji pepaya berperan sebagai senyawa anti-inflamasi yang menghambat produksi dan ekspresi sitokin (Amazu *et al*, 2010). Komponen bioaktif seperti asam klorogenat terbukti dapat menghambat produksi osteoklas melalui diferensiasi sel dan juga quercetin dapat meningkatkan produksi osteoblas (Pusporini *et al*, 2019).

Namun diperkirakan 40% atau lebih dari senyawa bahan alam memiliki kelarutan yang rendah di dalam air atau bahkan memberikan toksisitas yang tinggi. Kelarutan yang rendah di dalam air serta kurangnya kemampuan permeabilitas menembus barrier absorpsi dapat mempengaruhi bioavailabilitas suatu senyawa bahan alam di dalam tubuh (Ramadon dan Mun'im, 2017) sehingga diperlukan suatu sistem penghantaran obat, salah satunya yaitu nanoliposom yang dapat memperbaiki indeks terapeutik dari obat, baik untuk melindungi dari degradasi enzimatik, memperbaiki profil farmakokinetika, menurunkan toksisitas, atau mendapatkan pelepasan zat aktif terkendali (Ajazuddin, 2010). Sintesis nanopartikel dengan sonikasi pada liposom dapat meningkatkan efisiensi penetrasi liposom sehingga dapat menembus berbagai membran lipid dengan baik termasuk membran sel bakteri dan sebagai perlindungan terhadap obat atau suatu material tertentu dari degradasi biologis atau menambah stabilitas dari obat tersebut sebelum sampai pada tempat yang diharapkan (Martien *et al*, 2012).

Hingga saat ini belum ada penelitian mengenai kemanfaatan nanoliposom ekstrak biji pepaya terhadap model diabetik periodontitis. Oleh sebab itu, penelitian ini akan dilakukan dengan mengamati efek nanoliposom ekstrak biji pepaya terhadap jumlah osteoklas yang berkaitan erat dengan proses destruksi tulang alveolar (Wu *et al*, 2016).



Berdasarkan uraian di atas, maka akan dilakukan penelitian berkaitan dengan pengembangan alternatif terapi periodontitis dengan menguji pengaruh pemberian nanoliposom ekstrak biji pepaya terhadap jumlah osteoklas model diabetik periodontitis secara *in vivo*.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh antara pemberian nanoliposom ekstrak biji pepaya dengan jumlah osteoklas tikus model diabetik periodontitis?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan umum

Mengetahui pengaruh pemberian nanoliposom ekstrak biji pepaya terhadap jumlah osteoklas yang berkaitan dengan proses destruksi tulang alveolar tikus model diabetik periodontitis.

1.3.2. Tujuan khusus

1.3.2.1 Mengetahui jumlah osteoklas pada:

- a. Kelompok tikus yang diinduksi diabetik periodontitis dan tidak diberikan perlakuan pada hari ke 3, 7 dan 14
- b. Kelompok tikus yang diinduksi diabetik periodontitis dan diberi sediaan ekstrak biji pepaya pada hari ke 3, 7, dan 14
- c. Kelompok tikus yang diinduksi diabetik periodontitis dan diberi sediaan nanoliposom ekstrak biji pepaya pada hari ke 3, 7, dan 14

1.3.2.2 Membandingkan dan menganalisa jumlah osteoklas pada semua kelompok perlakuan.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat aplikatif

Penelitian ini diharapkan dapat dimanfaatkan sebagai dasar penelitian berikutnya dalam upaya pengembangan alternatif terapi diabetik periodontitis.

1.4.2. Manfaat bagi akademik

Menambah wawasan untuk dokter gigi dan masyarakat umum mengenai manfaat nanoliposom ekstrak biji pepaya sebagai alternatif terapi periodontitis.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Pepaya

2.1.1. Taksonomi

Menurut *Integrated Taxonomic Information System (ITIS)*, taksonomi tanaman pepaya diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom : *Plantae* (tumbuh-tumbuhan)

Subkingdom : *Vridiplantae*

Infrakingdom : *Streptophyta*

Superdivision : *Embryophyta*

Divisi : *Tracheophyta*

Subdivisio : *Spermatophytina*

Class : *Magnoliopsida*

Superorder : *Rosanae*

Order : *Brassicales*

Family : *Caricaceae*

Genus : *Carica L.*

Species : *Carica papaya L.*

2.1.2 Morfologi

Tanaman pepaya merupakan salah satu sumber protein nabati. Pepaya (*Carica papaya L.*) merupakan tanaman yang berasal dari Amerika tropis yang cukup banyak dibudidayakan di Indonesia. Merupakan herba menahun dan tingginya mencapai 8 m, memiliki batang tak berkayu, bulat, berongga, bergetah dan terdapat bekas pangkal daun.

Tumbuhan pepaya dapat hidup pada ketinggian tempat 1-1.000 m dari permukaan laut dan pada suhu udara 22°C-26°C. Pada umumnya, semua bagian dari tanaman baik akar, batang, daun, biji dan buah dapat dimanfaatkan (Pangesti *et al*, 2013).

Tanaman pepaya berkembang sangat cepat, diperlukan waktu 3-8 bulan dari proses perkecambahan biji untuk berbunga (fase remaja) dan 9-15 bulan untuk panen. Tanaman pepaya dapat hidup hingga 20 tahun, namun dikarenakan tinggi tanaman yang berlebihan dan kendala patologis, maka masa komersial kebun pepaya biasanya hanya 2-3 tahun (Jiménez *et al*, 2014).

Tanaman pepaya memiliki tangkai daun yang panjang terkumpul di ujung batang dan daun tunggal berbentuk menjari. Buah pepaya berbentuk bulat memanjang dan menggantung pada batang, berwarna hijau saat masih muda yang akan berubah menjadi kuning kemerahan jika sudah matang (Oktofani *et al*, 2019). Daging buah pepaya berwarna kuning-oranye jika sudah matang dan mengelilingi rongga biji yang besar terletak di pusat buah. Buah pepaya matang dalam waktu sekitar 5-9 bulan tergantung pada pembudidaya dan suhu (Yogiraj *et al*, 2014). Biji buah pepaya berwarna hitam (*fertile*) dan putih (*non fertile*). Biji pepaya yang berwarna hitam memiliki rasa yang sangat pedas sehingga jarang menjadi pilihan untuk dikonsumsi, namun biji buah pepaya memiliki nilai obat yang lebih kuat bila dibandingkan dengan buah pepaya (Peter *et al*, 2014).



Gambar 2.1. Tanaman *Carica papaya* L. (Yogiraj, 2014)



Gambar 2. 2. Buah pepaya matang (Yogiraj, 2014)

2.2. Ekstrak Biji Pepaya

2.2.1. Senyawa aktif



Buah pepaya (*Carica papaya L.*) telah dikenal luas sebagai tanaman terapi karena mengandung banyak konsentrasi vitamin, senyawa bioaktif dan komposisi lipid yang dapat mengurangi tanda reaksi inflamasi dan agregasi trombosit (Santana *et al.*, 2019). Berdasarkan hasil analisa fitokimia ekstrak *ethanol* biji pepaya menunjukkan bahwa secara kualitatif terdapat kandungan senyawa flavonoid, fenol, alkaloid dan saponin (Pusporini *et al.*, 2020).

Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang tersebar luas di alam. Berdasarkan struktur kimia, senyawa flavonoid terdiri dari flavonol, flavon, flavanone, katekin, antosianidin dan kalkon (Taufiq *et al.* 2015). Flavonoid berfungsi melindungi struktur sel, meningkatkan efektivitas vitamin C, sebagai anti-inflamasi dan antibakteri (Noer *et al.*, 2018). Struktur dinding sel dan sitoplasma bakteri mengandung protein dan lemak, senyawa antibakteri seperti flavonoid mampu mendenaturasikan protein dan merusak membran sel (Salim *et al.*, 2018).

Kandungan alkaloid memiliki mekanisme kerja menghambat dan mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan pertumbuhan sel bakteri terganggu. Selain itu, di dalam senyawa alkaloid terdapat gugus basa yang mengandung nitrogen akan bereaksi dengan senyawa asam amino yang menyusun dinding sel bakteri dan DNA bakteri. Reaksi ini mengakibatkan terjadinya perubahan struktur dan susunan asam amino, sehingga menimbulkan perubahan keseimbangan genetik pada rantai DNA sehingga kerusakan akan mendorong terjadinya lisis sel bakteri yang akan menyebabkan kematian pada sel bakteri (Sugito dan Suwandi, 2017).

Saponin adalah metabolit sekunder yang banyak didapatkan pada tanaman dan telah diketahui sebagai antimikroba (Devi *et al.*, 2017). Senyawa saponin dapat bersifat antibakteri dengan cara bereaksi dengan porin pada membran luar dinding sel bakteri sehingga membentuk ikatan polimer yang kuat dan mengakibatkan rusaknya porin sehingga sel bakteri akan kekurangan nutrisi dan pertumbuhannya terhambat atau mati (Sugito dan Suwandi, 2017), Saponin diketahui memiliki efek imunologis yang kuat, dapat merangsang imunitas yang dimediasi sel dan respon imun humoral dengan meningkatkan produksi antibodi (Ojiako *et al.*, 2019).

Komponen fenolik ditandai dengan memiliki satu atau lebih cincin aromatik dengan gugus hidroksil. Komponen fenolik dapat diklasifikasikan sebagai asam



fenolik, flavonoid, stilbena, kumarin dan tanin. Komponen fenolik memiliki beberapa fungsi yaitu mengurangi resiko beberapa penyakit kronis, sebagai perlindungan terhadap proliferasi sel kanker, mengurangi vaskularisasi, menstimulasi vasodilatasi dan meningkatkan sekresi insulin (Calvache *et al*, 2016).

Hasil pengujian kuantitatif menggunakan LC-MS (*Liquid chromatography-mass spectrometry*) menunjukkan adanya kandungan asam klorogenat dalam jumlah yang lebih besar dibandingkan dengan kandungan *quercetin* dalam ekstrak *ethanol* biji pepaya (Pusporini *et al*, 2020). Asam klorogenat merupakan bagian dari komponen fenolik yang teridentifikasi sebagai antioksidan penting (Yazid *et al*, 2019) dan sebagai antikanker (Kumar dan Sreeja, 2017). Asam klorogenat juga diketahui dapat menurunkan jumlah osteoklas dan resorpsi tulang dengan menghambat diferensiasi sel (Zunjar *et al*, 2015) (Pusporini *et al*, 2020). Asam klorogenat mencegah osteoklastogenesis melalui penurunan regulasi aktivasi NF- κ B, JNK, ERK, dan p38 MAPK yang mengarah ke penurunan ekspresi molekul osteoklastogenik seperti OSCAR, TRAP dan NFATc1 (Kwak *et al*, 2013).

Quercetin dikategorikan sebagai flavonol, salah satu *subclass* senyawa flavonoid (D'Andrea *et al*, 2015). *Quercetin* dapat berperan sebagai anti-inflamasi dan antioksidan, terbukti melalui peningkatan jumlah osteoblas pada tikus yang diinduksi periodontitis (Pusporini *et al*, 2020). Mekanisme kerja *quercetin* berkaitan dengan penghambatan produksi sitokin pro-inflamatori (IL- 1β dan TNF- α), berkurangnya ekspresi molekul inflamasi, penghambatan jalur pensinyalan intraseluler seperti *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) dan NF κ B sehingga terjadi pengurangan inflamasi dan stress oksidatif (Napimoga *et al*, 2013).

2.2.2. Metode ekstraksi

Ekstraksi adalah proses penarikan komponen/zat aktif dari suatu campuran padatan dan/atau cairan dengan menggunakan pelarut tertentu. Proses ini merupakan langkah awal yang penting dalam penelitian tanaman obat untuk mengisolasi senyawa metabolit sekunder dari suatu tanaman (Febrina *et al*, 2015). Ekstraksi adalah langkah yang terpenting untuk *recovery* dan pemurnian senyawa aktif dari bahan alam (Fauziah dan Wakidah, 2019).

Pemilihan metode ekstraksi bergantung pada sifat bahan dan senyawa yang akan diisolasi (Mukhriani, 2014). Berdasarkan fase yang terlibat, terdapat dua jenis ekstraksi, yaitu ekstraksi cair-cair dan ekstraksi padat-cair. Ekstraksi padat-cair secara umum terdiri dari maserasi, refluktasi, sokletasi, dan perkolasi. Metode



yang digunakan tergantung dengan jenis senyawa yang diinginkan, jika senyawa yang diinginkan rentan terhadap pemanasan maka metode yang dapat dipilih adalah maserasi dan perkolasi (Febrina et al, 2015).

Maserasi merupakan metode sederhana yang sangat baik dan sering digunakan dalam skala kecil maupun skala industri. Metode ini dilakukan dengan memasukkan serbuk tanaman dan pelarut yang sesuai kedalam wadah yang tertutup rapat pada suhu ruangan (Mukhriani, 2014). Maserasi membutuhkan pelarut dengan perbandingan sekurang-kurangnya 1:7, waktu dari 1-6 hari, serta membutuhkan tahap remaserasi (Atun, 2014).

2.3. Nanoliposom

Liposom merupakan sistem penghantaran obat yang sering dikembangkan dengan berbagai kelebihan dalam meningkatkan efektivitas, stabilitas, dan kelarutan suatu obat (Putri *et al*, 2017). Permeabilitas liposom memiliki peranan penting untuk meningkatkan efisiensi enkapsulasi obat hidrofilik (Eloy *et al*, 2014). Liposom memiliki beberapa kelebihan, diantaranya dapat meningkatkan efikasi dan indeks terapi serta meningkatkan stabilitas obat dengan sistem enkapsulasi (Akbarzadeh *et al*, 2013).

Ukuran partikel merupakan parameter sifat fisik yang perlu diperhatikan dalam pembuatan liposom. Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk memperkecil ukuran partikel adalah dengan sonikasi (Akbarzadeh *et al*, 2013). Ukuran diameter liposom yang dihasilkan dengan cara sonikasi dipengaruhi oleh suhu dan durasi proses sonikasi (Dua *et al*, 2012). Lama sonikasi juga dapat berpengaruh pada ukuran partikel yang dihasilkan (Dua *et al*, 2012).

Nanopartikel adalah suatu partikel yang berukuran di bawah 1000 nm atau 1 mikron, namun ukuran di bawah 500 nm memiliki karakteristik yang lebih baik (Ningsih dkk, 2017). Nanoliposom adalah jenis nanovesikel berukuran nano yang terbuat dari membran fosfolipid berlapis. Nanoliposom telah terbukti dapat menghantarkan obat yang dienkapsulasi secara perlahan (Cheragi *et al*, 2016).

Maka penggunaan nanoliposom dapat memperbaiki indeks terapeutik dari obat, baik untuk melindungi dari degradasi enzimatik, memperbaiki profil farmakokinetika, menurunkan toksisitas, atau mendapatkan pelepasan zat aktif terkendali (Ajazuddin, 2010).

2.4. Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus (DM) adalah penyakit kronis kompleks yang ditandai dengan kadar glukosa darah tinggi atau hiperglikemia akibat insufisiensi fungsi insulin (Chaudhury *et al.*, 2017). Diabetes mellitus merupakan penyakit yang tersembunyi sebelum muncul gejala yang tampak seperti mudah lapar, haus dan sering buang air kecil. Gejala tersebut seringkali disadari ketika pasien sudah merasakan keluhan, sehingga diabetes mellitus disebut sebagai *the silent killer* (Isnaini dan Rahmawati, 2018). Angka kejadian DM di dunia dari tahun ke tahun selalu mengalami peningkatan. Data terakhir dari *World Health Organization* (WHO) menunjukkan pada tahun 2000 sebanyak 150 juta penduduk dunia menderita DM dan angka ini akan menjadi dua kali lipat sampai pada tahun 2025 (WHO, 2014). Selain itu, *International Diabetes Federation* (IDF) pada tahun 2017 melaporkan bahwa jumlah pasien DM di dunia pada tahun 2017 mencapai 425 juta orang dewasa berusia antara 20–79 tahun.

Pasien dapat dikatakan menderita diabetes mellitus apabila pada pemeriksaan darah dari pembuluh darah halus (kapiler) glukosa darah lebih dari 120 mg/dL pada keadaan puasa dan/atau lebih dari 200 mg/dL untuk 2 jam setelah makan. Apabila pemeriksaan darah diambil dari pembuluh balik (vena) maka kadar glukosa puasa lebih dari 140 mg/dL dan/atau 200 mg/dL untuk 2 jam setelah makan. Kadar glukosa darah yang kurang dari 120 atau 140 mg/dL pada keadaan puasa namun antara 140–200 mg/dL pada 2 jam setelah makan disebut sebagai Toleransi Glukosa Terganggu (TGT) yang tidak memerlukan pengobatan namun tetap memerlukan pemantauan secara berkala (Yosmar *et al.*, 2018).

2.4.1. Klasifikasi Diabetes Mellitus

Berdasarkan *American Diabetes Association* (ADA) 2017, diabetes mellitus dapat diklasifikasikan menjadi:

1. Diabetes tipe 1 (*Insulin Dependent Diabetes Mellitus/IDDM*)
Disebabkan oleh kerusakan sel *beta autoimmune*, biasanya menyebabkan defisiensi insulin absolut.
2. Diabetes tipe 2 (*Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus/NIDDM*)
Disebabkan oleh kerusakan progresif sekresi insulin sel beta yang menyebabkan resistensi insulin.
3. Diabetes mellitus gestasional (*Gestational Diabetes Mellitus/GDM*)
Diabetes mellitus yang terdiagnosis pada trimester kedua atau ketiga masa kehamilan.

4. Jenis diabetes mellitus spesifik karena penyebab lain, seperti sindrom diabetes monogenik, penyakit pada eksokrin pankreas dan obat-diabetes yang diinduksi bahan kimia atau obat dan diabetes yang terjadi setelah transplantasi organ.

2.4.2. Etiologi Diabetes Mellitus

Insufisiensi insulin dapat disebabkan oleh gangguan atau defisiensi produksi insulin oleh sel-sel beta langerhans kelenjar pankreas, atau disebabkan oleh kurang responsifnya sel tubuh terhadap insulin (Yosmar *et al*, 2018).

Diabetes mellitus tipe 1 (T1DM) merupakan *insulin-dependent* yang ditandai oleh defisiensi absolut pada insulin karena kerusakan sel pankreas *beta autoimmune* yang menyebabkan gangguan metabolisme. Sedangkan, diabetes mellitus tipe 2 (T2DM) atau *non-insulin dependent* diabetes mellitus disebabkan oleh resistensi insulin dimana sel sasaran insulin gagal atau tidak mampu merespon insulin secara normal. Defisiensi fungsi insulin pada T2DM hanya bersifat relatif dan tidak absolut (Zaccardi *et al*, 2015).

Pada *gestational diabetes mellitus* (GDM) terjadi perubahan anabolik dengan peningkatan progresif jaringan adiposa ibu. Pada akhir masa kehamilan terjadi perubahan katabolik dengan peningkatan lipolisis dan peningkatan glikemia, *insulinemia*, kadar asam lemak *post-prandial*, dan penurunan cadangan lemak ibu. Perubahan ini diinduksi oleh hormon dan mediator lain yang dikeluarkan oleh plasenta, yang memfasilitasi terjadinya kondisi fisiologis resistensi insulin perifer (Chiefari *et al*, 2017).

2.4.3. Patogenesis Diabetes Mellitus Tipe 2

Berdasarkan PERKENI 2015, secara garis besar patogenesis DM tipe-2 disebabkan oleh resistensi insulin pada beberapa organ tubuh antara lain otot, liver, serta kegagalan sel beta pankreas. Faktor yang diduga terlibat dalam patogenesis resistensi insulin antara lain, perubahan pada protein kinase B, mutasi protein *Insulin Receptor Substrate* (IRS), peningkatan fosforilasi serin dari protein IRS, Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3 Kinase), protein kinase C, dan mekanisme molekuler dari inhibisi transkripsi gen IR (*Insulin Receptor*) (Eva, 2019).

Resistensi insulin dapat menyebabkan berkurangnya pengambilan glukosa oleh jaringan yang mengakibatkan hipoglikemia pada intraseluler dan hiperglikemia pada ekstraseluler. Hipoglikemia pada intraseluler menyebabkan glukogenesis dan gluconeogenesis sehingga terjadi pemecahan lemak, penurunan



sintesis protein dan *gamma globulin* yang menyebabkan *cachexia*, polifagia dan gangguan penyembuhan luka. Kondisi hiperglikemia pada ekstraseluler menyebabkan *hyperglycemic coma* dan *osmotic dieresis* (Ozougwu *et al*, 2013). Resistensi insulin dapat ditoleransi dengan peningkatan sekresi insulin, namun apabila terjadi terus menerus akan menyebabkan kelelahan pada sel beta pankreas yang mengakibatkan destruksi sel beta (Campos, 2012).

Kondisi hiperglikemia dapat menyebabkan autooksidasi glukosa, glikasi protein dan aktivasi jalur metabolisme poliol yang selanjutnya akan mempercepat pembentukan ROS (reactive oxygen species). Pembentukan ROS dapat meningkatkan modifikasi lipid, DNA, dan protein pada berbagai jaringan. Modifikasi molekuler di berbagai jaringan mengakibatkan ketidakseimbangan antara antioksidan protektif (pertahanan antioksidan) dan peningkatan produksi radikal bebas. Hal ini merupakan awal kerusakan oksidatif yang dikenal sebagai stress oksidatif (Setiawan dan Suhartono, 2005). Stress oksidatif berperan penting dalam pathogenesis diabetes mellitus yang dapat menyebabkan kerusakan pada enzim, sistem seluler dan peningkatan resistensi insulin (Asmat *et al*, 2015). Meningkatnya ROS pada kondisi hiperglikemia akan menyebabkan berbagai kerusakan termasuk pada sel beta pankreas sehingga dapat menurunkan produksi insulin (Campos, 2012).

2.4.4. Gejala Diabetes Mellitus

Gejala diabetes mellitus dibedakan menjadi akut dan kronik. Gejala akut DM yaitu: *polyphagia* dimana pasien akan merasa cepat lapar dan lemas; *polyuria* yaitu keadaan volume air kemih dalam 24 jam meningkat melebihi batas normal yang lebih sering terjadi di malam hari dan urin yang dikeluarkan mengandung glukosa; *polydipsia* atau rasa haus yang berlebihan; dan penyusutan berat badan dengan cepat walaupun nafsu makan pasien bertambah.

Gejala kronik DM meliputi kesemutan, kulit terasa panas atau seperti tertusuk tusuk jarum, rasa kebas di kulit, kram, kelelahan, mudah mengantuk, pandangan mulai kabur, gigi mudah goyah dan mudah lepas, kemampuan seksual menurun bahkan pada pria bisa terjadi impotensi, pada ibu hamil sering terjadi keguguran atau kematian janin dalam kandungan atau dengan bayi berat lahir lebih dari 4kg (Subekti, 2009) (Fatimah, 2015).

2.5. Periodontitis

Periodontitis adalah peradangan pada jaringan pendukung gigi yang disebabkan oleh mikroorganisme spesifik atau kelompok mikroorganisme spesifik yang mengakibatkan kerusakan progresif jaringan ikat periodontal dan tulang alveolar, dengan pembentukan saku, resesi, atau keduanya (Carranza, 2012).

Berdasarkan *Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions 2017*, klasifikasi periodontitis terbagi menjadi *necrotizing periodontal disease*, periodontitis, dan periodontitis sebagai manifestasi penyakit sistemik (Papapanou *et al*, 2018).

Periodontitis merupakan penyebab utama kehilangan gigi dan dianggap sebagai salah satu dari dua ancaman terbesar kesehatan mulut (Nazir, 2017). Dalam pemeriksaan klinis, tanda dan gejala periodontitis adalah adanya eritema, edema, pendarahan, pendalaman sulkus gingiva dan pembentukan poket periodontal. Pemeriksaan kondisi jaringan periodontal yang dilakukan untuk menentukan derajat keparahan suatu penyakit periodontal antara lain pengukuran kedalaman poket (*probing depth*), *clinical attachment level*, dan *bleeding on probing* (Carranza, 2012).

2.5.1. Etiologi Periodontitis

Plak bakteri/biofilm gigi, produk mikroba, respon imun *host*, dan genetika merupakan faktor penyebab penyakit periodontal. Plak bakteri merupakan lapisan tipis *biofilm* yang berisi kumpulan mikroorganisme patogen seperti *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* serta *Fusobacterium nucleatum* yang merupakan deposit lunak (Andriani *et al*, 2019). Faktor kerentanan pejamu sangat berperan dalam proses terjadinya periodontitis. Kerentanan pejamu dapat dipengaruhi oleh genetik, pengaruh lingkungan dan tingkah laku seperti merokok, stres dan diabetes. Respon pejamu yang tidak adekuat dalam menghancurkan bakteri dapat menyebabkan destruksi jaringan periodontal (Quamilla, 2016).

Terdapat beberapa faktor resiko yang meningkatkan signifikansi klinis penyakit periodontal yaitu *modifiable risk factor* dan *non-modifiable risk factor*. Faktor resiko yang dapat dimodifikasi adalah kebiasaan merokok, *oral hygiene* buruk, perubahan hormon pada perempuan, *diabetes mellitus*, *stress*, dan penggunaan obat-obatan. Faktor resiko yang tidak dapat dimodifikasi adalah usia dan riwayat keluarga. *Periodontitis* biasa disertai oleh beberapa kondisi sistemik seperti penyakit kardiovaskular, penyakit metabolik, gangguan persalinan,



rheumatoid arthritis (RA), penyakit saluran pernapasan, penyakit ginjal kronis, kanker, dan gangguan fungsi kognitif (Nazir, 2017).

2.5.2. Patogenesis Periodontitis

Tahap awal perkembangan periodontitis adalah inflamasi pada *gingiva* sebagai respon terhadap serangan bakteri patogen. (Carranza, 2015) Tindakan metabolik dari koloni bakteri di celah *gingiva* mengubah lingkungan rongga mulut dan memfasilitasi terjadinya kolonisasi bakteri. Kesesuaian dari berbagai faktor virulensi bakteri, aktivitas dan komposisi bakteri komensal, dan faktor imun *host*, diperlukan untuk inisiasi proses terjadinya periodontitis. (Tamara *et al*, 2019) Tahap destruksi jaringan merupakan tahap transisi dari gingivitis ke periodontitis. Destruksi jaringan periodontal terjadi ketika terdapat gangguan pada keseimbangan jumlah bakteri dengan respon pejamu. (Quamila, 2016)

Lipopolisakarida bakteri mengaktifasi fibroblas yang menyebabkan peningkatan produksi mediator inflamasi. Perubahan aktivitas fibroblas menyebabkan ketidakseimbangan antara sintesis dan resorpsi jaringan. Aktivitas destruksi yang lebih besar menyebabkan terjadinya migrasi apikal *junctional epithelium* yang menyebabkan pembentukan *true pocket periodontal*. (Rusyanti, 2014)

Paparan produk bakteri dan lipopolisakarida menimbulkan aktivasi monosit atau makrofag yang menstimulus sekresi sitokin dan mediator inflamasi seperti *interleukin-1* (IL-1), *interleukin-6* (IL-6), *tumor nekrosis factor* (TNF), enzim *matrix metalloproteinases* (MMPs) dan *prostaglandin E2* (PGE2) serta kemokin (IL-8) (Yucel *et al*, 2013) (Rusyanti, 2014). Sitokin MMPs dalam konsentrasi tinggi di jaringan akan memediasi destruksi matriks seluler *gingiva*, perlekatan serat kolagen pada apikal epitel penyatu dan ligamen periodontal. Sitokin PGE2 memediasi destruksi tulang dan menstimulasi osteoklas dalam jumlah besar untuk meresorpsi puncak tulang alveolar. (Quamila, 2016) TNF- α dan IL-1 β menghambat aktivitas osteoblas. Sehingga terjadi ketidakseimbangan antara aktivitas osteoblas dan osteoklas yang menyebabkan destruksi tulang alveolar. (Rusyanti, 2014)

2.5.3. Penatalaksanaan Periodontitis

Tujuan perawatan gingivitis dan periodontitis adalah mengontrol bakteri sebagai faktor lokal dan meminimalkan pengaruh sistemik melalui perawatan



periodontal non bedah. Perawatan periodontal non bedah meliputi pemeliharaan kebersihan mulut, *scaling and root planing* (SRP) dan pemberian antibiotik. Tujuan utama SRP adalah mengembalikan kondisi gingiva menjadi sehat kembali dengan mengeluarkan faktor-faktor yang menyebabkan inflamasi gingiva seperti plak, kalkulus, endotoksin. Pemakaian antibiotik diperlukan bagi pasien yang tidak berhasil dengan perawatan SRP, serta pada pasien dengan penyakit periodontal akibat penyakit sistemik sebagai profilaksis pada tindakan periodontal non bedah. (Kodir *et al*, 2014)

2.6. Hubungan antara Diabetes Mellitus dan Periodontitis

Diabetes mellitus yang tidak terkontrol memiliki hubungan signifikan dengan tingkat keparahan jaringan periodontal. Penyakit periodontal pada pasien diabetes dikaitkan dengan adanya komplikasi diabetes mellitus kronis. Tingkat kerusakan periodontal pada pasien diabetes mellitus dipengaruhi oleh kontrol glikemik dan kapasitas imunitas individu (Rikawaraswati *et al*, 2015).

Kerusakan sistem kekebalan tubuh akan mengubah fungsi sel polimorfonuklear (PMN) sebagai pertahanan lini pertama melawan bakteri. Pada pasien diabetes mellitus, terjadi gangguan sistem kekebalan tubuh dalam proses inflamasi yang meliputi kemotaksis, gangguan adhesi dan reaktivitas monosit yang berlebih dan apoptosis dini sel PMN. Gangguan ini akan merusak kemampuan eradikasi bakteri oleh sel PMN dan meningkatkan aktivasi sitokin *pro-inflammatory* yaitu *interleukins* 1 β dan 6 (IL-1 β dan 6) dan TNF- α yang akan merusak jaringan periodontal (Klokkevoold and Mealey, 2012).

Kondisi hiperglikemia pada pasien diabetes mellitus mendorong pembentukan AGEs (*advanced glycation end products*) yang apabila berikatan dengan reseptor RAGE akan meningkatkan inflamasi dan *oxidative stress* (OS) sehingga merusak perbaikan jaringan (Polak and Shapira, 2018). *Oxidative stress* (OS) merupakan salah satu mekanisme patofisiologis diabetik periodontitis yang ditandai dengan produksi *reactive oxygen species* (ROS) yang berlebih akibat terganggunya keseimbangan pro-oksidan dan antioksidan (Bullon *et al*, 2014) (Xiaoyu *et al*, 2017). Tingkat *oxidative stress* (OS) yang tinggi menyebabkan terjadinya deplesi *adenosine triphosphate* (ATP) dan apoptosis yang tidak terkontrol sehingga terjadi kerusakan jaringan (Kumawat *et al*, 2013). Stress oksidatif akan mengakibatkan terjadinya gangguan dari pembuluh darah pada jaringan periodontal. Apabila terjadi gangguan dari pembuluh darah maka akan

terjadi gangguan distribusi nutrisi dan oksigen sehingga bakteri negatif anaerob akan menjadi lebih patogen, Gangguan pembuluh darah juga akan mempengaruhi pada pembuangan sisa metabolisme dalam jaringan periodontal, sehingga toksisitas jaringan periodontal dan gingiva tinggi (Ermawati, 2012).

Sitokin pro-inflamatori yang menyebabkan kerusakan jaringan periodontal dan tulang alveolar juga mempengaruhi resistensi insulin (Khumaedi *et al*, 2019).

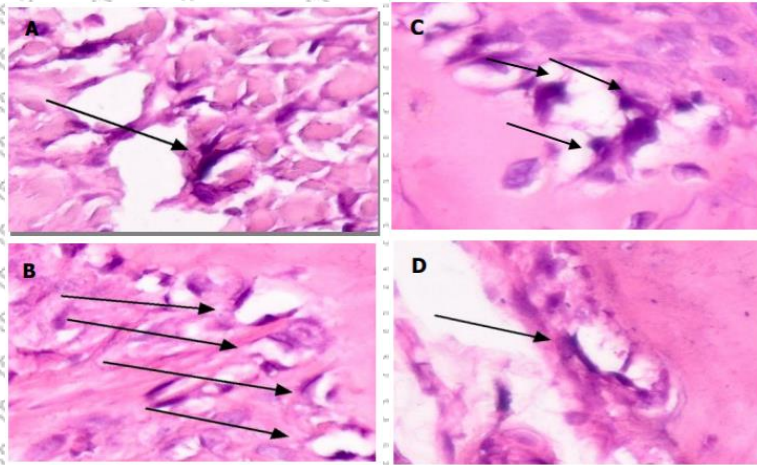
Peningkatan sitokin pro-Inflamatori dapat menjadi pemicu utama protein fase akut termasuk *C-Reactive Protein* (CRP) yang telah terbukti merusak pensinyalan insulin intraseluler dan resistensi insulin (Preshaw *et al*, 2012). Perubahan resistensi insulin terjadi melalui beberapa mekanisme, yaitu modifikasi substrat reseptor insulin, peningkatan produksi asam lemak bebas dan berkurangnya *nitric oxide* (NO). Proses ini mengganggu fungsi sel beta pankreas melalui oksidasi asam lemak bebas baik secara langsung dan tidak langsung (Khumaedi *et al*, 2019).

Berdasarkan uraian di atas, dapat disimpulkan bahwa periodontitis dan diabetes memiliki hubungan dua arah. Diabetes merupakan faktor predisposisi dari periodontitis dan periodontitis dapat memperburuk kontrol metabolik kondisi diabetes (Khumaedi *et al*, 2019).

2.7. Osteoklas

2.7.1. Morfologi

Osteoklas merupakan *giant cell* berinti banyak yang berperan dalam mensekresikan kolagenase dan enzim proteolitik lain yang menyerang matriks tulang dengan cara melepaskan zat dasar yang terkalsifikasi (Maryana, 2004). Osteoklas terletak pada permukaan endosteal dalam sistem *Haversian* dan pada permukaan *periosteal* di bawah *periosteum* (Kular *et al*, 2012). Keberadaan osteoklas secara khas terlihat dengan adanya mikrofilia halus yang membentuk batas berkerut-kerut yaitu *ruffled border* (Nakamura, 2007). Sel osteoklas yang diamati secara mikroskopis akan berupa sel raksasa multinukleus berbentuk bulat atau lonjong, dengan sitoplasma berwarna merah kebiruan dan permukaan yang berada pada sisi tulang yang diresorpsi sedikit kasar (Salim *et al*, 2015).



Gambar 2.3 Perbandingan Histologis tulang alveolar tikus dengan pewarnaan Hematoksin-Eosin menggunakan mikroskop elektrik dengan perbesaran 400x. Ket: (A) Kelompok K-, (B) Kelompok K+, (C) Kelompok P1, dan (D) Kelompok P2. Tanda panah menunjukkan sel osteoklas (Prasetyaningrum *et al.*, 2018)

2.7.2. Osteoklastogenesis

Osteoklas merupakan sel yang memediasi resorpsi tulang, terbentuk dari proses diferensiasi dari *hematopoietic*, *myeloid*, dan prekursor multipotensial melalui interaksi dua sitokin yaitu *macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)* dan *receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)*. Kedua sitokin osteoklastogenik ini berperan dalam regulasi proliferasi, kelangsungan hidup, diferensiasi dan aktivasi sel osteoklas. Proses diferensiasi osteoklas atau osteoklastogenesis melibatkan triad molekuler yang terdiri dari *Receptor Activator of nF- κ B (RANK)*, *Receptor Activator of nF- κ B Ligand (RANKL)*, dan *osteoprotegerin (OPG)* (Hendrijantini *et al.*, 2019).

Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) dihasilkan oleh osteoblas atau sel stromal sumsum tulang dan mengikat reseptor pada pre-osteoklas yang disebut c-Fms, anggota dari tyrosine kinase receptor. *Receptor Activator of nF- κ B Ligand (RANKL)* adalah mediator kunci terjadinya pembentukan osteoklas. RANKL merupakan *membrane-bound protein*, anggota dari TNF (tumor necrosis factor) yang diekspresikan oleh bermacam sel seperti osteoblas, fibroblas dan sel limfosit (Ayu, 2018). Osteoprotegerin (OPG) dihasilkan oleh sel osteoblas dan sel stromal *bone marrow*, berperan sebagai regulator negatif osteoklastogenesis.

Osteoprotegerin (OPG) merupakan membran yang mengelilingi dan mensekresi protein yang melekat pada RANKL untuk menghambat perannya terhadap reseptor RANK (Hikmah dan Shita, 2013).

Sitokin RANKL akan berikatan dengan *receptor activator of NF- κ B* (RANK) yang terletak pada prekursor osteoklas, yang kemudian memicu diferensiasi dan proliferasi osteoklas menjadi aktif. Pembentukan dan aktivasi osteoklas melibatkan peran faktor transkripsi NFATC1. *Nuclear Factor of Activated T cells 1* (NFATC1) merupakan *regulator* utama RANKL yang menginduksi diferensiasi osteoklas dan memainkan peran penting dalam fusi dan aktivasi osteoklas melalui peningkatan regulasi berbagai gen yang bertanggung jawab untuk perlekatan osteoklas, migrasi, pengasaman, degradasi anorganik dan organik matriks tulang (Herniyanti, 2016).

Dalam interaksi RANKL-RANK, OPG berperan sebagai reseptor umpan yang dapat berikatan dengan RANKL dan memblokir ikatan dan aktivasi RANKL dengan RANK (Chen *et al.*, 2017). Hambatan ikatan RANKL dengan RANK oleh OPG dapat memicu apoptosis dari osteoklas sehingga menurunkan proses resorpsi tulang (Ayu, 2018). RANK/RANKL/OPG memiliki peran penting dalam homeostasis tulang (Amarasekara *et al.*, 2018). Rasio antara OPG dan RANKL menentukan tingkat aktivasi RANK dan tingkat osteoklastogenesis (Messina *et al.*, 2019).

2.7.3 Resorpsi Tulang

Rasio RANKL/OPG merupakan determinan proses resorpsi tulang, dimana peningkatan regulasi RANKL dan penurunan regulasi OPG dapat menyebabkan *bone loss*. Terdapat beberapa faktor endogen yang mempengaruhi pengendalian sistem RANKL / RANK / OPG termasuk beberapa sitokin (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-4, IL-11, dan IL-17), hormon (vitamin D, estrogen, glukokortikoid) dan faktor transkripsi mesenkim (Tobeiha *et al.*, 2020).

Pengikatan RANKL oleh reseptor RANK (RANKL-RANK) merupakan proses awal destruksi tulang yang akan memicu prekursor osteoklas untuk berdiferensiasi menjadi osteoklas aktif. Aktivitas osteoklas dalam meresorpsi tulang dilakukan dengan memproduksi *tartrate-resistant acid phosphate* (TRAP) dan ion hidrogen (asam hidroklorid) yang memiliki pH lemah dan meningkatkan kelarutan kristal hidroksiapatit (HAp) dan matriks organik, juga mengeluarkan kolagenase dan enzim proteolitik, serta hidrolase lisosomal yang menyebabkan

matriks tulang melepaskan sebagian substansi dasar kalsium fosfat dalam mineral tulang (Vidyahayati *et al*, 2016).

Osteoklas merupakan sel yang memediasi resorpsi tulang, terbentuk dari proses diferensiasi dari *hematopoietic, myeloid*, dan prekursor multipotensial melalui interaksi dua sitokin yaitu *macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)* dan *receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)*. Kedua sitokin osteoklastogenik ini berperan dalam regulasi proliferasi, kelangsungan hidup, diferensiasi dan aktivasi sel osteoklas (Lorenzo, 2017). M-CSF secara konstitutif diekspresikan oleh osteoblas, dan RANKL diproduksi oleh osteoblas, limfosit, dan fibroblas (Lee *et al*, 2014).

RANKL adalah anggota superfamili reseptor *tumor necrosis factor (TNF)* yang diekspresikan oleh sel *mesenchymal* dari sel keturunan osteoblas. Ekspresi RANKL dirangsang dalam sel-sel osteoblas oleh banyak faktor yang merangsang dan mengatur pembentukan dan aktivitas osteoklas. RANKL selanjutnya akan berikatan dengan *receptor activator of NF- κ B (RANK)* pada prekursor osteoklas, yang memicu diferensiasi dan proliferasi osteoklas menjadi aktif. Pembentukan dan aktivasi osteoklas melibatkan peran faktor transkripsi NFATC1. *Nuclear Factor of Activated T cells 1 (NFATC1)* merupakan *regulator* utama RANKL yang menginduksi diferensiasi osteoklas dan memainkan peran penting dalam fusi dan aktivasi osteoklas melalui peningkatan regulasi berbagai gen yang bertanggung jawab untuk perlekatan osteoklas, migrasi, pengasaman, degradasi anorganik dan organik matriks tulang (Herniyanti, 2016).

2.8. Tikus Sprague-Dawley

Penggunaan hewan percobaan pada penelitian kesehatan banyak dilakukan untuk uji kelayakan atau keamanan suatu bahan obat dan juga untuk penelitian yang berkaitan dengan suatu penyakit. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) banyak digunakan sebagai hewan percobaan pada berbagai penelitian. Terdapat tiga galur tikus putih yang memiliki kekhususan untuk digunakan sebagai hewan percobaan antara lain *Wistar, Long evans* dan *Sprague dawley* (Frianto *et al*, 2015).

Sprague-Dawley adalah tikus *outbred*, pertama kali dikembangkan oleh Robert S. Dawley pada tahun 1920-an melalui perkawinan tikus wistar ke hibrida yang berasal dari laboratorium dan stok liar. *Sprague-Dawley* digunakan secara luas untuk pengembangan model hewan dari kondisi manusia seperti



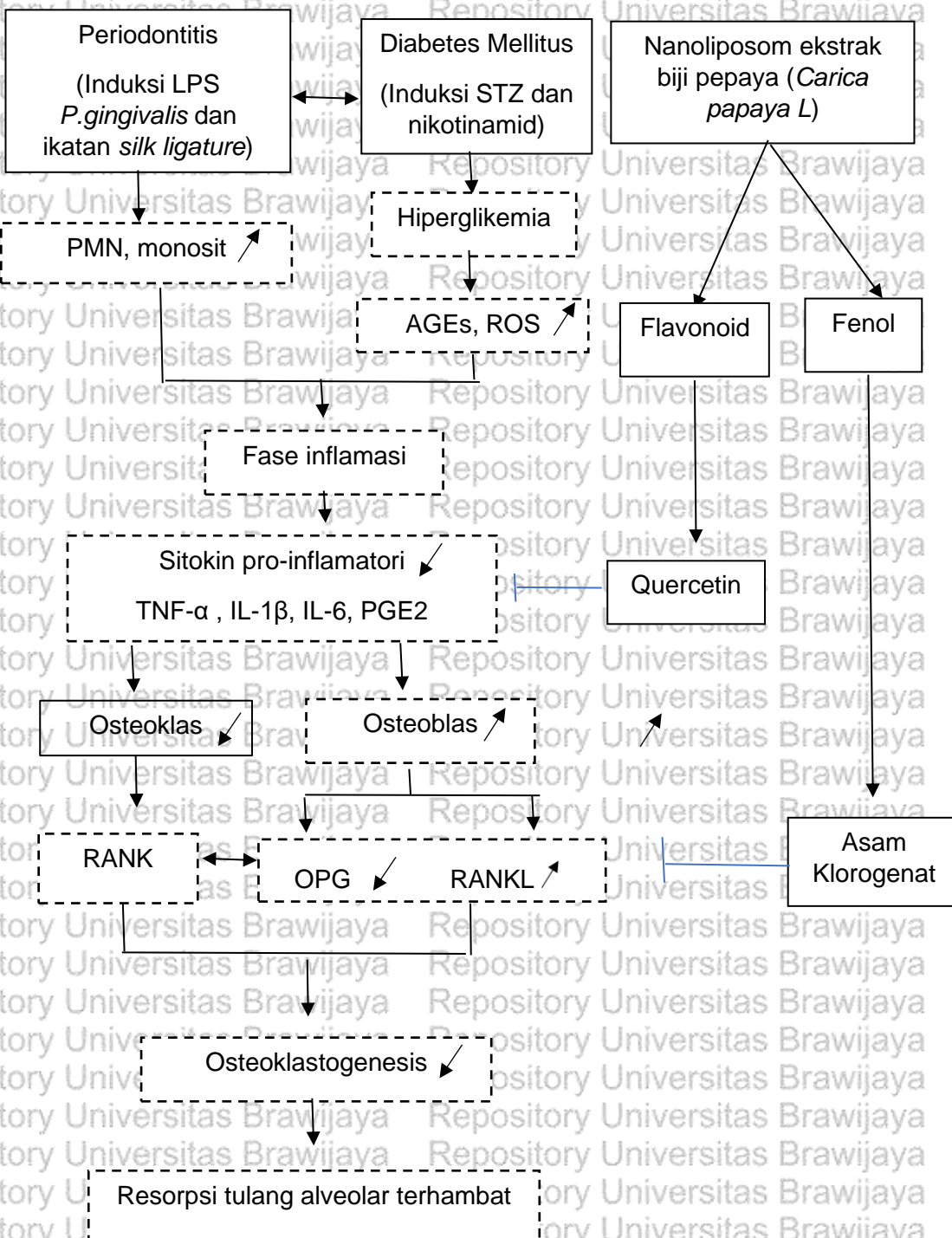
diabetes, obesitas, kanker dan penyakit kardiovaskular (Brower et al, 2015). *Sprague-Dawley* adalah strain albino hibrida dengan ciri kepala yang panjang dan sempit, memiliki tingkat reproduksi yang tinggi, dan insidensi tumor spontan yang rendah. Salah satu kelebihan tikus galur *Sprague Dawley* adalah temperamen yang tenang dan memerlukan penanganan yang mudah (Johnson, 2012).




BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian




Tabel 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan gambar :
 : Proses yang tidak diteliti

 : Proses yang diteliti

 : Tahapan proses

 : Menghambat

 : Meningkatkan

 : Menurun
3.2 Keterangan Kerangka Konsep Penelitian

Periodontitis dan diabetes mellitus memiliki hubungan dua arah, diabetes merupakan faktor predisposisi dari periodontitis dan periodontitis dapat memperburuk kontrol metabolik kondisi diabetes (Khumaedi *et al*, 2019). Kondisi hiperglikemia pada diabetes mellitus menyebabkan peningkatan *advanced glycation end-product* (AGEs) sehingga terjadi peningkatan pelepasan radikal bebas yaitu *reactive oxygen species* (ROS) yang dapat merusak jaringan. Terjadi gangguan sistem kekebalan tubuh pada kondisi diabetes mellitus dalam proses inflamasi yang meliputi kemotaksis, gangguan adhesi dan reaktivitas monosit yang berlebih dan apoptosis dini sel PMN. Gangguan ini akan merusak kemampuan eradikasi bakteri oleh sel PMN dan meningkatkan aktivasi sitokin pro-inflamatori yaitu *interleukins* 1 β dan 6 (IL 1 β dan 6) dan TNF- α yang akan merusak jaringan periodontal (Klokkeveld and Mealey, 2012). Sitokin pro-inflamatori diketahui dapat mempengaruhi osteoklastogenesis melalui peran osteoblas dimana terjadi peningkatan ekspresi RANKL (Kular *et al*, 2012).

Biji pepaya diketahui memiliki banyak manfaat dalam bidang kesehatan, yaitu kandungan flavonoid yang memiliki metabolit sekunder *quercetin* berfungsi sebagai anti-inflamasi dan antioksidan, terbukti melalui peningkatan jumlah osteoblas pada tikus yang diinduksi periodontitis (Pusporini *et al*, 2019). Kandungan lain pada biji pepaya adalah asam klorogenat yang merupakan bagian dari komponen fenolik yang berfungsi sebagai antioksidan (Yazid *et al*, 2019) dan

menurunkan regulasi RANKL sehingga dapat menurunkan jumlah osteoklas dan resorpsi tulang (Kwak *et al*, 2013) (Zunjar *et al*, 2015) (Pusporini *et al*, 2020).

Dalam penelitian ini dilakukan ekstraksi biji pepaya menggunakan metode maserasi dan sintesis nanoliposom. Penggunaan nanoliposom terbukti dapat memperbaiki indeks terapeetik dari obat, melindungi dari degradasi enzimatik, memperbaiki profil farmakokinetika, menurunkan toksisitas dan pelepasan zat aktif terkendali (Ajazuddin, 2010). Pembuatan nanoliposom dilakukan dengan memperkecil ukuran diameter liposom dengan sonikasi (Dwiastuti dkk, 2016). Pemilihan metode ekstraksi bergantung pada sifat bahan dan senyawa yang akan diisolasi, jika senyawa yang diinginkan rentan terhadap pemanasan maka metode yang dapat dipilih adalah maserasi dan perkolasi (Mukhriani, 2014) (Febrina *et al*, 2015). Maserasi merupakan metode sederhana yang sangat baik dan sering digunakan dalam skala kecil maupun skala industri (Mukhriani, 2014). Metode maserasi dapat diproses dengan mudah dan tidak perlu dilakukan pemanasan, sehingga memiliki kemungkinan kecil terurai atau mengalami kerusakan pada bahan alam (Susanty, 2016).

3.3 Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian ini adalah terdapat pengaruh antara pemberian nanoliposom ekstrak biji pepaya dengan jumlah osteoklas pada tikus model diabetik periodontitis.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium yang menggunakan *True Experimental* (experimental yang murni) dikerjakan pada laboratorium secara *in vivo* dengan desain penelitian yang menggunakan rancangan *Randomized Post-Test Only Control Group Design* yaitu rancangan acak dengan tes akhir dan kelompok kontrol). Rancangan ini dipilih karena memiliki ciri adanya dua kelompok yang ditentukan secara random yaitu kelompok eksperimen dan kelompok kontrol. Pada desain penelitian ini kelompok eksperimen diberi perlakuan sedangkan kelompok kontrol tidak diberi perlakuan, hal ini dilakukan untuk menemukan *cause-effect relationships*.

4.2. Sampel Penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah tikus putih galur *Sprague Dawley*.

4.2.1. Kriteria Inklusi

1. Tikus putih jantan galur *Sprague Dawley*.
2. Berat 250-300 gram, berumur 4-5 bulan.
3. Kondisi sehat: berbulu putih tebal, tidak terdapat kelainan anatomis, dan gerakan aktif.
4. Belum pernah digunakan sebagai sampel penelitian.

4.2.2. Kriteria Eksklusi

1. Tikus sakit selama masa adaptasi 1 bulan.
2. Tikus mati saat masa adaptasi 1 bulan.
3. Tikus mati selama masa perlakuan berlangsung.

4.2.3. Estimasi Jumlah Pengulangan

Sampel penelitian akan dilakukan pengulangan bagi tiap kelompok untuk mencegah terjadinya bias pada hasil penelitian. Banyaknya pengulangan yang diperlukan dalam penelitian ini dapat dihitung dengan menggunakan rumus Federer (1963).

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

$$(n-1)(9-1) \geq 15$$

$$8(n-1) \geq 15$$

$$8n \geq 15+8$$

$$n \geq 2,8$$

Berdasarkan perhitungan di atas, digunakan 3 ekor tikus untuk setiap kelompok, sebagai cadangan ditambahkan 1 tikus pada setiap kelompok sehingga jumlah tikus di tiap kelompok adalah 4 tikus. Dalam penelitian ini tikus akan dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan pada hari ke-3, 7 dan 14. Sehingga jumlah total kelompok perlakuan adalah 9 kelompok yaitu:

- Kelompok kontrol atau K(3): Tikus yang diinduksi diabetik periodontitis dan tidak diberi perlakuan, dilakukan pengorbanan hari ke-3
- Kelompok kontrol atau K(7): Tikus yang diinduksi diabetik periodontitis dan tidak diberi perlakuan, dilakukan pengorbanan hari ke-7
- Kelompok kontrol atau K(14): Tikus yang diinduksi diabetik periodontitis dan tidak diberi perlakuan, dilakukan pengorbanan hari ke-14
- Kelompok perlakuan 1 atau P1(3): Tikus yang diinduksi diabetik periodontitis dan diberikan ekstrak etanol biji pepaya 96%, dilakukan pengorbanan hari ke-3
- Kelompok perlakuan 1 atau P1(7): Tikus yang diinduksi diabetik periodontitis dan diberikan ekstrak etanol biji pepaya 96%, dilakukan pengorbanan hari ke-7
- Kelompok perlakuan 1 atau P1(14): Tikus yang diinduksi diabetik periodontitis dan diberikan ekstrak etanol biji pepaya 96%, dilakukan pengorbanan hari ke-14
- Kelompok perlakuan 2 atau P2(3): Tikus yang diinduksi diabetik periodontitis dan diberikan nanoliposom ekstrak etanol biji pepaya 96%, dilakukan pengorbanan hari ke-3
- Kelompok perlakuan 2 atau P2(7): Tikus yang diinduksi diabetik periodontitis dan diberikan nanoliposom ekstrak etanol biji pepaya 96%, dilakukan pengorbanan hari ke-7
- Kelompok perlakuan 2 atau P2(14): Tikus yang diinduksi diabetik periodontitis dan diberikan nanoliposom ekstrak etanol biji pepaya 96%, dilakukan pengorbanan hari ke-14

Jadi, jumlah tikus yang dibutuhkan seluruhnya untuk penelitian ini adalah 4×9 kelompok perlakuan = 36 ekor tikus.



4.3. Variabel Penelitian

4.3.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak biji pepaya, nanoliposom ekstrak biji pepaya dan tikus yang diinduksi diabetik periodontitis.

4.3.2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah jumlah osteoklas yang didapatkan melalui jaringan mandibular pada hewan coba tikus putih galur *Sprague Dawley* model diabetik periodontitis.

4.3.3. Variabel Kontrol

1. Jenis kelamin.
2. Berat badan.
3. Usia.
4. Kondisi anatomis.
5. Makanan dan minuman yang dikonsumsi oleh hewan coba.
6. Kebersihan kandang.
7. Kemungkinan adanya penyakit lain pada tikus.
8. Aplikasi bakteri *Porphyromonas gingivalis* 0,03 mL dengan konsentrasi 1×10^9 CFU/mL.
9. Aplikasi nanoliposom ekstrak biji pepaya dengan dosis 0,03 mL.

4.4. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian akan dilakukan bulan Mei - Agustus 2020. Pembuatan ekstrak biji pepaya dilakukan di Matera Medika Batu-Malang. Sintesis nanoliposom ekstrak biji pepaya dilakukan di Laboratorium Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan untuk induksi dan perlakuan hewan coba periodontitis model diabetes melitus akan dilakukan di Laboratorium Biologi Oral Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya, sedangkan untuk karakterisasi nanoliposom dilakukan di Laboratorium Fisika ITS, untuk pembuatan blok parafin dan pewarnaan preparat dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.5. Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1. Perawatan Hewan coba

1. Kandang bak plastik ukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 sejumlah 36 buah.
2. Tutup kandang dari anyaman kawat.
3. Tempat makan dan botol air minum.

4. Pakan jenis BR-1 yang dicampur air secukupnya dengan jumlah 50 gram per tikus, diberikan 1x sehari.
5. Serbuk kayu.
6. Air mineral.
7. Timbangan tikus dengan bak tikus.

4.5.2. Pembuatan Ekstrak Biji Pepaya

Alat yang dibutuhkan untuk pembuatan ekstrak biji pepaya adalah blender, corong *Buchner*, timbangan gram, timbangan miligram, neraca analitik, cawan porselen, gelas ukur 500 ml, bejana maserasi, pipet tetes, sonde, labu ukur 50 ml, *beaker glass*, pengaduk kaca, tabung kaca dan tutupnya untuk menyimpan ekstrak, kertas, plastik, sendok porselen, tisu, kain katun putih, kertas saring, dan *rotary evaporator waterbath*. Bahan yang digunakan adalah biji pepaya kering sebanyak 1 kilogram, etanol 70% dan air.

4.5.3. Pembuatan Nanoliposom Ekstrak Biji Pepaya

Alat yang digunakan adalah labu alas bulat, *rotary evaporator*, *sonikator ultrasonic e*, timbangan digital OHAUS, gelas ukur, pipet tetes, spatula sendok pengaduk, tabung *Erlenmeyer*, dan botol kaca wadah nanoliposom yang sudah disterilkan. Bahan yang digunakan adalah fosfolipid lesitin, tween 20, kloroform, PBS pH 7,4, dan larutan ekstrak biji pepaya.

4.5.4. Induksi Model Diabetik Periodontitis

4.5.4.1. Induksi Diabetes Mellitus pada Tikus *Sprague Dawley*

Alat yang digunakan adalah syringe 1 ml, glukometer digital, strip DR untuk mengecek kadar glukosa pada tikus, dan *blade*. Bahan yang digunakan adalah STZ, *buffer* sitrat, normal saline, nikotinamid, *cotton*, kasa steril, *povidone iodine* 10%, alkohol 70%.

4.5.4.2. Induksi Periodontitis pada Tikus *Sprague Dawley*

Alat yang digunakan adalah mikropipet, kaca mulut, *Silk Ligature* ukuran 3,0, syringe 3 ml dan *probe*. Bahan yang digunakan adalah ketamine HCL, LPS *P. gingivalis* 5 µg, alkohol 70%, *cotton*, kasa steril, dan *povidone iodine* 10%.

4.5.5. Pembedahan Hewan Coba

Alat yang digunakan pembedahan hewan coba adalah gunting bedah, pinset, papan bedah, pot untuk menyimpan, label, *handscoon* dan masker. Bahan yang digunakan adalah *formalin buffer* 10%, alkohol 70%, NaCl 0,9% fisiologis (untuk mencuci hasil pembedahan).



4.5.6. Pembuatan Preparat Jaringan

Alat yang diperlukan adalah pisau *scalpel*, pinset, saringan, talenan, tissue *cassette*, mesin prosesor otomatis, mesin *vacuum*, mesin blocking, *freezer* (-20 °C), mesin *microtome*, pisau *microtome*, *water bath* 46 °C, kaca objek, kaca penutup, rak khusus pewarnaan, dan oven 60 °C.

Pembuatan preparat jaringan membutuhkan bahan utama berupa potongan jaringan hewan coba yang telah dilakukan fiksasi dengan *Buffer Neutral Formalin* (BNF 10%), *xylol*, *ethanol absolute*, gliserin 99,5% ewit (albumin), larutan hematoksilin, litium karbonat, larutan eosin, dan larutan dekalsifikasi EDTA.

4.5.7. Pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE)

Alat yang digunakan untuk proses pewarnaan HE adalah *chamber* pengecatan, objek glass/slide, *cover glass*, dan label. Bahan yang digunakan adalah *xylol*, alkohol, cat hematoksilin, cat eosin, dan entellan.

4.5.8. Penghitungan Osteoklas

Penghitungan jumlah sel osteoklas dapat dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dan untuk meningkatkan indeks bias pada perbesaran 400x dapat digunakan minyak emensi.

4.6. Definisi Operasional

4.6.1. Ekstrak Biji Pepaya

Ekstrak biji pepaya yang digunakan berasal dari biji pepaya spesies *Carica papaya linn* matang, berwarna coklat kehitaman. Biji pepaya yang telah dikeringkan[U1] kemudian diblender untuk memperkecil ukurannya. Sebanyak 500 gram serbuk biji pepaya dimaserasi dengan larutan alkohol 70% selama 3 hari, kemudian difiltrasi menggunakan kain katun putih dan corong buchner. Evaporasi sampai tingkat kering yang optimal pada suhu 40°C hingga menghasilkan ekstrak kental berbau manis, berwarna coklat berupa padatan 24%. Proses ekstraksi diulang empat kali dan disimpan di lemari es 4°C. (Pusporini *et al*, 2020)

4.6.2. Nanoliposom Ekstrak Biji Pepaya

Nanoliposom ekstrak biji pepaya dapat mengoptimalkan upaya penghantaran obat (*drug delivery*). Pembuatan nanoliposom ini dengan menggunakan metode sonikasi dengan mencampurkan lesitin dan ekstrak biji pepaya kemudian dipanaskan pada suhu 40°C selama 40 menit dan dilakukan sonikasi hingga mencapai ukuran nanopartikel yaitu di bawah 1 mikron atau 1000 nm. (Ningsih dkk, 2017)

4.6.3. Diabetes Melitus

Diabetes mellitus merupakan penyakit metabolik yang ditandai dengan kondisi hiperglikemia. Kondisi diabetes pada hewan coba dapat dilakukan dengan induksi secara intraperitoneal *Streptozotocin* (STZ) yang akan merusak fungsi sel beta pankreas dan nikotinamid untuk memperlambat kerusakan. (Szkudelski, 2012) Sebelum dan setelah induksi perlu dilakukan pengecekan kadar gula darah puasa. Pembuatan kondisi diabetes pada hewan coba akan terdiri dari tahap persiapan, induksi dan observasi.

4.6.4. Periodontitis

Periodontitis merupakan inflamasi yang progresif pada jaringan periodontal akibat reaksi yang tidak seimbang antara respon imun terhadap bakteri patogen. Kondisi periodontitis dilakukan pada hewan coba dengan mengikat benang dari sutra (*Silk Ligature*) ukuran 3,0 pada daerah subgingiva di sekeliling gigi insisivus anterior rahang bawah, kemudian LPS *P. gingivalis* 5 µg sebanyak 0.05 ml PBS ditetaskan di insisivus sentral bagian bukal satu kali sehari selama 7 hari. (Pusporini *et al*, 2019)

4.6.5. Jumlah Osteoklas

Jumlah osteoklas per lapang pandang yang ada pada preparat sampel dari spesies yang diambil pada hewan coba. Sediaan diamati pada hari ke 3, 7 dan 14 masing-masing sebanyak 5 lapang pandang dengan pewarnaan *Hematoksilin-Eosin (HE)* (Prasetyaningrum *et al*, 2018). Sel osteoklas yang diamati secara mikroskopis akan berupa sel raksasa multinukleus berbentuk bulat atau lonjong, dengan sitoplasma berwarna merah kebiruan dan permukaan yang berada pada sisi tulang yang diresorpsi sedikit kasar (Salim *et al*, 2015).

4.7. Prosedur Penelitian

4.7.1. Ethical Clearance

Proposal etik penelitian telah melalui uji etik di Komisi Etik Penelitian (*Animal Care and Use Committee*) Universitas Brawijaya dengan surat keterangan nomor 1198-KEP-UB.

4.7.2. Perawatan Hewan Coba

Aklimatisasi hewan coba dilakukan selama 1 bulan di Animal House Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya. Tikus putih jantan galur *Sprague Dawley* ini dipelihara di kandang yang terbuat dari bak plastik bersih berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm dengan tutup kandang yang dibuat dari



anyaman kawat. Hewan coba dipelihara di suhu ruangan berkisar antara 18°C - 27°C, ventilasi kandang harus baik. Satu kandang berisi satu tikus. Penggantian serbuk kayu dilakukan 3 hari sekali saat masa aklimatisasi dan setiap hari saat perlakuan. Pemberian minum dengan air mineral sebanyak kurang lebih 30 ml per hari dan pemberian makanan berkisar 50 mg per hari.

4.7.3. Pembuatan Ekstrak Biji Pepaya

Ekstrak biji pepaya yang digunakan berasal dari biji pepaya spesies *Carica papaya* Linn matang, berwarna coklat kehitaman. Biji pepaya yang masih basah dicuci dengan air sebanyak dua kali lalu dianginkan pada suhu ruang selama 4 minggu, kemudian diblender untuk memperkecil ukurannya. Sebanyak 500 gram serbuk biji pepaya dimaserasi dengan larutan alkohol 70% selama 3 hari, kemudian difiltrasi menggunakan kain katun putih dan menggunakan corong *buchner*. Filtrat kemudian dievaporasi sampai tingkat kering yang optimal pada suhu 40°C hingga menghasilkan ekstrak kental berbau manis, berwarna coklat berupa padatan 24.0% (w/w). Proses ekstraksi diulang empat kali dan serbuk padat yang dihasilkan ditimbang setelah proses ekstraksi, disimpan pada wadah kedap udara dan air, lalu dimasukkan dalam lemari es pada suhu 4°C. (Pusporini *et al*, 2020)

4.7.4. Pembuatan Nanoliposom Ekstrak Biji Pepaya

Berdasarkan panduan dari Laboratorium Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, prosedur pembuatan nanoliposom ekstrak biji pepaya adalah sebagai berikut:

1. Sebanyak 810 mg Lesitin dan 1620 mg tween 20 dengan perbandingan 1:2 dilarutkan pada kloroform sebanyak 103,2 mL, setelah itu dapat dimasukkan ke dalam labu alas bulat.
2. Kemudian dapat dilakukan evaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu $60 \pm 2^\circ\text{C}$ dengan kecepatan 150 rpm sampai kloroform tersebut menguap.
3. Hasil dari tahap ini adalah akan terbentuk lapisan film. Lapisan film didiamkan selama kurang lebih 24 jam pada suhu ruang yang berkisar $< 30^\circ\text{C}$.
4. Kemudian lapisan film tersebut dapat ditambahkan larutan ekstrak biji pepaya 810 mg dalam PBS pH 7,4 sebanyak 120 mL dan kemudian diputar menggunakan *rotary evaporator* selama kurang lebih 2 jam pada suhu $60 \pm 2^\circ\text{C}$ dengan kecepatan 60 rpm hingga homogen.

5. Selanjutnya didiamkan supaya mengembang selama kurang lebih 1 jam pada suhu ruang yang berkisar $<30^{\circ}\text{C}$, dan dilanjutkan dengan sonikasi selama 30 menit menggunakan sonikator ultrasonik e.

4.7.5. Pembuatan Model Diabetik Periodontitis

4.7.5.1. Induksi Diabetes Mellitus pada Hewan Coba

Setelah puasa selama minimal 8 jam, tikus diinjeksikan dengan nikotinamid 150 mg/kg yang dilarutkan dengan *normal saline* secara intraperitoneal dilanjutkan dengan injeksi STZ (*Streptozotocin*) dengan dosis 50 mg/kg yang dilarutkan dengan buffer sitrat (pH = 4,5) 15 menit kemudian. Prosedur induksi diulangi selama 24 jam kemudian dengan dosis yang sama. (Muhammad dkk, 2016)

4.7.5.2. Pemeriksaan Hasil Induksi

Pemeriksaan hasil induksi dilakukan dengan mengambil darah dari ekor tikus dan level glukosa dapat diukur dengan menggunakan glukometer komersial. Tikus dinyatakan diabetes mellitus apabila glukosa darah puasa > 126 mg/dL. (Firdaus dkk, 2016)

4.7.5.3. Induksi Periodontitis pada Hewan Coba

Sebelum diinduksi periodontitis, tikus dianestesi dengan diinjeksi ketamine HCL secara intramuskular pada otot paha belakang dengan dosis 0,2 ml/200 gram berat BB. Induksi periodontitis dilakukan dengan mengikat benang dari sutra (*Silk Ligature*) ukuran 3,0 pada daerah *subgingiva* di sekeliling gigi insisivus anterior RB, kemudian LPS *P. gingivalis* 5 μg sebanyak 0.05 ml PBS diteteskan di insisivus sentral bagian bukal satu kali sehari selama 7 hari. Tindakan ini dimodifikasi dari Prasetya, 2013, Pusporini, 2018, dan Prahasanti, 2019.

4.7.5.4. Pemeriksaan Hasil Induksi Periodontitis

Pemeriksaan hasil induksi periodontitis dilakukan pada daerah rahang bawah hewan coba dengan melihat adanya kemerahan, bengkak, kehilangan perlekatan pada gingiva dan terbentuknya poket periodontal antara 1-2 mm. (Pusporini, 2019)

4.7.6. Pengobatan pada Kelompok Perlakuan

1. Pada kelompok kontrol (K) kondisi tikus yang diinduksi diabetik periodontitis dan tidak diberi perlakuan.

2. Pada kelompok perlakuan 1 (P1) kondisi tikus yang diinduksi diabetik periodontitis diberi sediaan ekstrak etanol biji pepaya 96% secara peroral 0,5 ml / ekor 1 kali sehari dan diteteskan sebanyak 0,03 ml / ekor pada sulkus gingiva antara insisivus kanan dan kiri rahang bawah menggunakan mikropipet.
3. Pada kelompok perlakuan 2 (P2) kondisi tikus yang diinduksi diabetik periodontitis diberikan sediaan nanoliposom ekstrak etanol biji pepaya 96% secara peroral 0,5 ml / ekor 1 kali sehari dan diteteskan sebanyak 0,03 ml // ekor pada sulkus gingiva antara insisivus kanan dan kiri rahang bawah menggunakan mikropipet. (Isnania dkk, 2014)

4.7.7. Pengorbanan dan Pembedahan Hewan Coba

Pengambilan sampel jaringan dilakukan pada hari ke 4, 8, dan 15 dengan cara *cervical dislocation*. Prosedur *cervical dislocation* yaitu dengan memisahkan otak dari tulang belakang dengan cara memegang hewan coba pada bagian dasar tengkorak dengan satu tangan dan tangan yang lain memegang pangkal leher kemudian tarik dengan kuat, cepat dan tegas ke arah yang berlawanan. Prosedur ini dilakukan dengan keadaan hewan coba teranestesi. (Carbone *et al*, 2014)

Kemudian hewan coba dibersihkan dengan NaCl 0,9% fisiologis dan dimasukkan dalam pot untuk menyimpan organ yang sudah diberikan larutan formalin 10%.

4.7.8. Sanitasi Hewan Coba

Semua sisa organ dari tikus yang sudah dibedah dan tidak terpakai dilakukan prosedur insinerasi secara layak. Sampah prosedur pembedahan yang tidak terpakai dibuang dalam satu kantong plastik, sampah medis dipisahkan tersendiri dan diserahkan ke Rumah Sakit Saiful Anwar untuk proses pembuangan. Insinerasi dilakukan di halaman belakang laboratorium Farmakologi dengan 3 lubang sebesar 100 cm x 30 cm x 50 untuk 75 tikus.

4.7.9. Pembuatan Blok Parafin dan Preparat Jaringan

Sampel untuk pemeriksaan histopatologi harus segar, artinya jaringan diambil secepat mungkin setelah hewan mati. Keterlambatan akan menyebabkan jaringan menjadi busuk. Ukuran jaringan yang diambil 1 cm³. Jaringan tersebut juga harus segera dilakukan fiksasi. Apabila jaringan berupa tulang maka harus dimasukkan di larutan dekalsifikasi dengan perbandingan antara jaringan dan larutan 1:20 dengan waktu perendaman selama 24 jam. Proses untuk pembuatannya adalah:

Prosedur pembuatan preparat histologis berdasarkan Zulfadhli (2016):

1. Memotong jaringan organ

Setelah jaringan organ yang berada didalam fiksasi matang, jaringan ditiriskan pada saringan selanjutnya dipotong dengan menggunakan pisau dengan ketebalan 0,3-0,5 mm dan disusun ke dalam tissue cassette, kemudian sejumlah tissue cassette dimasukkan ke dalam keranjang khusus.

2. Fiksasi

Tujuan utama fiksasi adalah untuk menjaga sel dan komponen jaringan pada keadaan "*life like state*" sehingga dapat mencegah atau menahan proses degeneratif yang dimulai segera setelah jaringan kehilangan pasokan darah (Bindhu, 2013). Fiksasi dengan buffer formalin 10%, fiksasi selama \pm 24 jam. Kemudian bilas dengan menggunakan air mengalir untuk menghilangkan sisa larutan fiksasi.

3. Dehidrasi

Dehidrasi untuk menarik air dari jaringan yang sudah difiksasi menggunakan alkohol bertingkat masing-masing selama 1-2 jam, yaitu:

- Alkohol 70%

- Alkohol 80%

- Alkohol 95%

- Alkohol 100% x 3

4. *Clearing* (dealkoholisasi)

Penarikan alkohol dari jaringan dengan *xylene*. Proses *clearing* ini menggunakan bermacam-macam zat penjernih, yaitu *xylol* atau *xylene* dan *toluol* atau *toluene* (Waheed, 2012). Sebelum diberi *xylene*, jaringan dari alkohol absolut diletakan dulu dikertas hisap. *Clearing* dilakukan selama \pm 12 jam.

5. Infiltrasi

Upaya menyusupkan parafin ke dalam jaringan sampel sebagai penyangga sediaan agar dapat dilakukan penyimpanan dengan menggunakan parafin cair selama 1,5 jam. Prosesnya dalam oven (inkubator) dengan temperatur 55° - 60°C.

6. *Embedding* atau pembuatan blok

Penanam jaringan dalam parafin padat. Buat kotak-kotak kecil dari karton, tuang parafin murni cair ke dalam kotak tersebut, dengan cepat pindahkan jaringan yang telah diinfiltresi tadi kedalam kotak yang berisi parafin cair tersebut, atur letak preparat sesuai potongan. Selanjutnya blok parafin dilepas dari cetakan dan disimpan di freezer (-20°C) sebelum dilakukan pemotongan.

7. *Sectioning* atau pemotongan blok parafin

Iris blok parafin dengan scalpel, permukaan yang akan diiris dengan pisau mikrotom berbentuk segi empat teratur dengan ketebalan berkisar 4µm secara transversal. Potongan tersebut diletakkan secara hati-hati di atas permukaan air dalam waterbath bersuhu 46°C. Dalam hal ini potongan harus dirapikan, kemudian diletakkan di atas kaca objek yang telah diolesi ewith, yang berfungsi sebagai bahan perekat. Kaca objek dengan jaringan di atasnya disusun di dalam rak khusus dan dimasukkan ke dalam inkubator bersuhu 60°C sampai preparat siap untuk diwarnai.

4.7.10. Pengecatan Preparat Jaringan Menggunakan Pewarnaan HE

Tujuan pengecatan histologi *Hematoxilin-Eosin* untuk mengetahui ada tidaknya morfologi sel abnormal dalam jaringan yang diperiksa. Prinsip pengecatan histologi *Hematoxilin-Eosin*, yaitu kromatin dalam inti akan mengikat cat yang bersifat basa (hematoxilin) dan protein sitoplasma akan mengikat cat yang bersifat asam (eosin) sehingga sel akan berwarna biru keunguan. Preparat yang akan diwarnai diletakkan pada rak khusus dan dicelupkan secara berurutan ke dalam larutan dengan waktu sebagai berikut (Feldman, 2014):

- *clearing agent* atau xylol x 3 (selama 3 menit)
- alkohol absolut x 2 (selama 1 menit)
- alkohol 95% selama 1 menit

- alkohol 70% selama 1 menit
- *Distilled* atau *deionized water* (air suling) selama 1 menit
- Hematoxylin 6–7 menit
- *Distilled* atau *deionized water rinse* selama 1 menit
- 10 % acetic acid dalam alkohol 95% selama 1 menit
- *Distilled* atau *deionized water rinse* selama 1 menit
- Scott's tap water 1 min
- *Distilled* atau *deionized water rinse* selama 1 menit
- alkohol 70% (*pre rinse*) selama 1 menit
- Eosin 1-5 min
- alkohol 95% selama 1 menit
- alkohol absolut x 3 (selama 1 menit)
- *clearing agent* atau xylol x 3 (selama 1 menit)

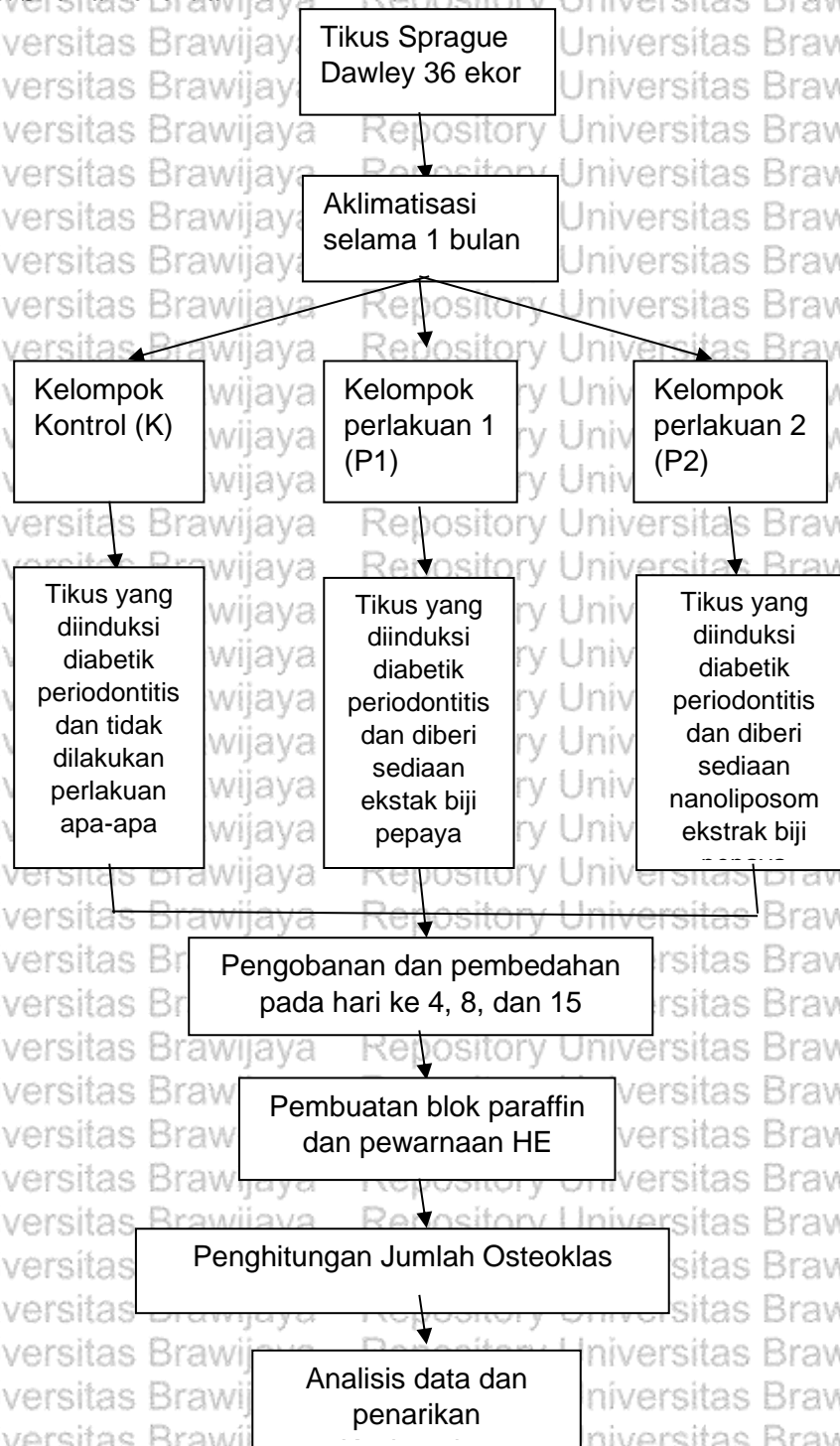
Setelah itu preparat diangkat satu persatu dari larutan xylol dalam keadaan basah, diberi satu tetes cairan perekat dan selanjutnya ditutup dengan kaca penutup.

4.7.11. Pengamatan Jumlah Osteoklas

Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah sel osteoklas pada tulang alveolar menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x yang dilakukan pada lima lapang pandang.



4.8. Skema Penelitian



4.9. Analisis Data

Hasil dari perhitungan dari jumlah osteoklas pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dianalisis secara statistik pada komputer. Langkah- langkah untuk uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut:

1. Uji normalitas

Bertujuan untuk menginterpretasikan apakah suatu data berdistribusi normal atau tidak karena pemilihan hipotesis berdasar kepada normal tidaknya suatu data. Untuk data yang memiliki distribusi normal maka digunakan mean dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Setelah mengetahui hasil dari distribusinya dapat menentukan apakah digunakan uji parametrik untuk sebaran data normal dan non parametrik apabila sebaran tidak normal

2. Uji homogenitas

Bertujuan untuk menguji berlaku atau tidaknya asumsi ANOVA, yaitu apakah data yang diperoleh dari setiap perlakuan memiliki varian yang homogen. Apabila didapatkan varian yang homogen, maka analisa dapat dilanjutkan menggunakan uji ANOVA.

3. Uji *One-Way ANOVA*

Bertujuan untuk membandingkan nilai rata-rata dari masing-masing kelompok perlakuan dan mengetahui bahwa minimal terdapat dua kelompok yang berbeda secara signifikan

4. *Post Hoc Test* (*Uji Least Significant Difference*)

Bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes Uji ANOVA. Uji Post Hoc yang digunakan adalah uji Tukey dengan tingkat kemaknaan 95% ($p=0,05$)

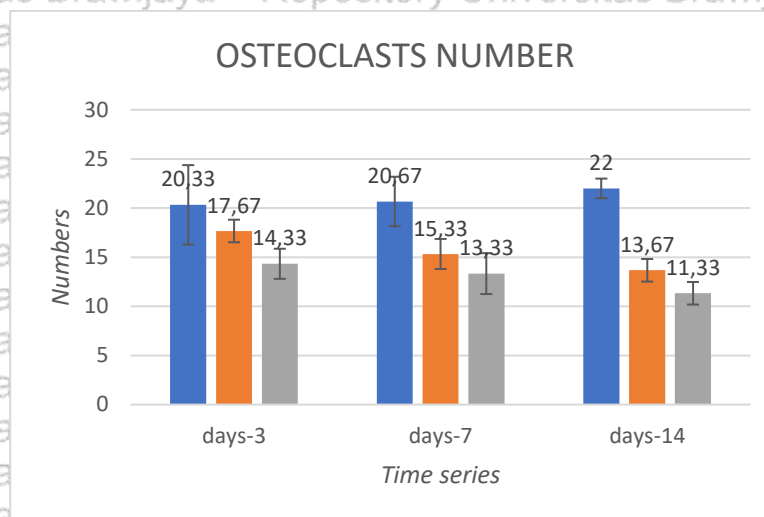


BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Penelitian

Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah sel osteoklas pada tulang alveolar area apikal menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x yang dilakukan pada lima lapang pandang preparat histologis dengan pewarnaan *Hematoxylin-Eosin (HE)*. Hasil penghitungan rata-rata sel osteoklas hari ke 3, 7 dan 14 pada kelompok kontrol, perlakuan 1 (P1) dan perlakuan 2 (P2) ditunjukkan pada gambar 5.1.

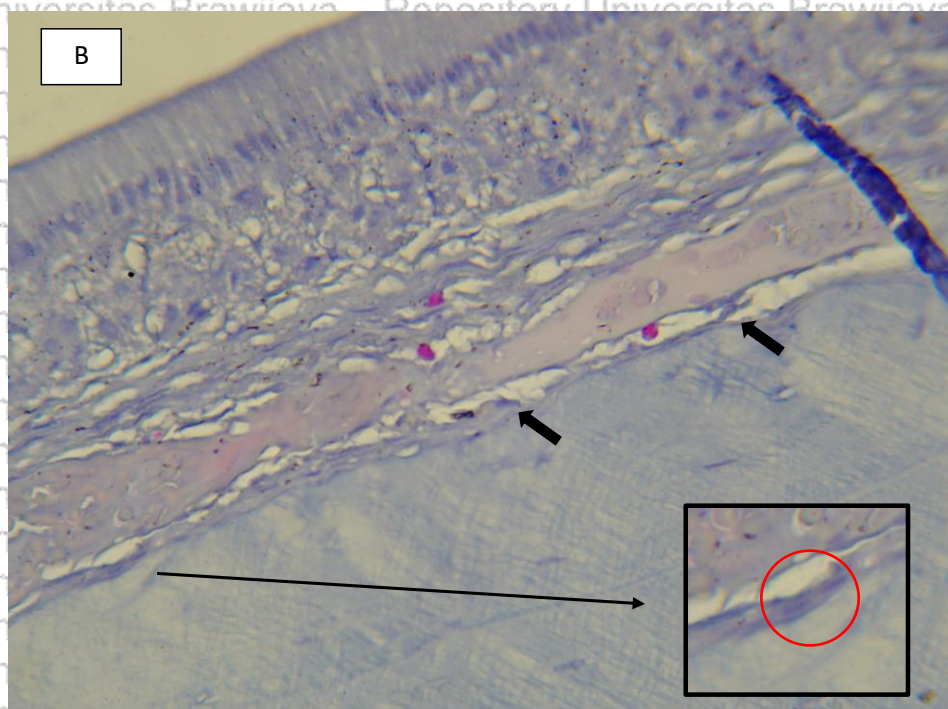
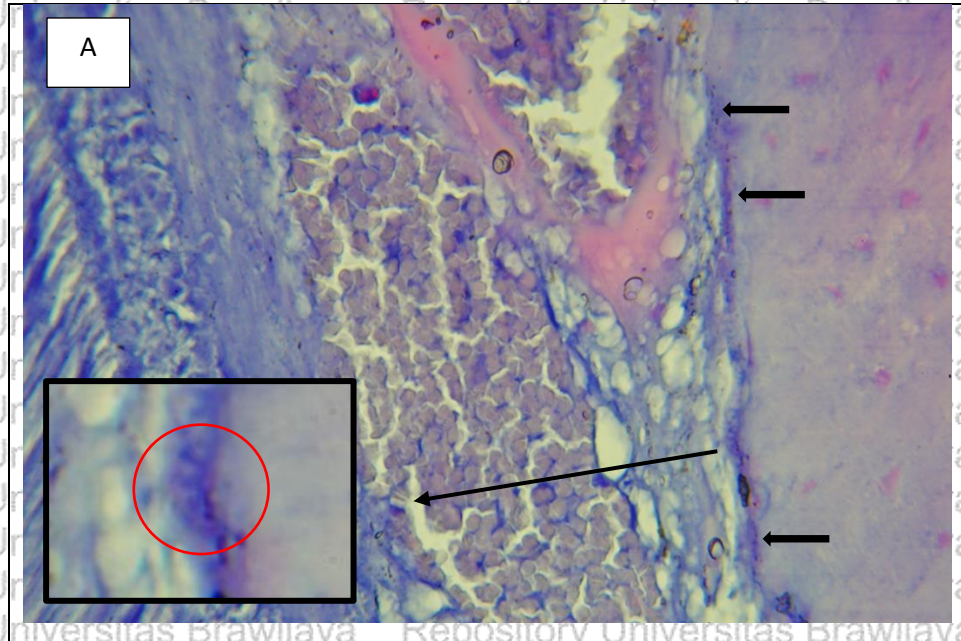


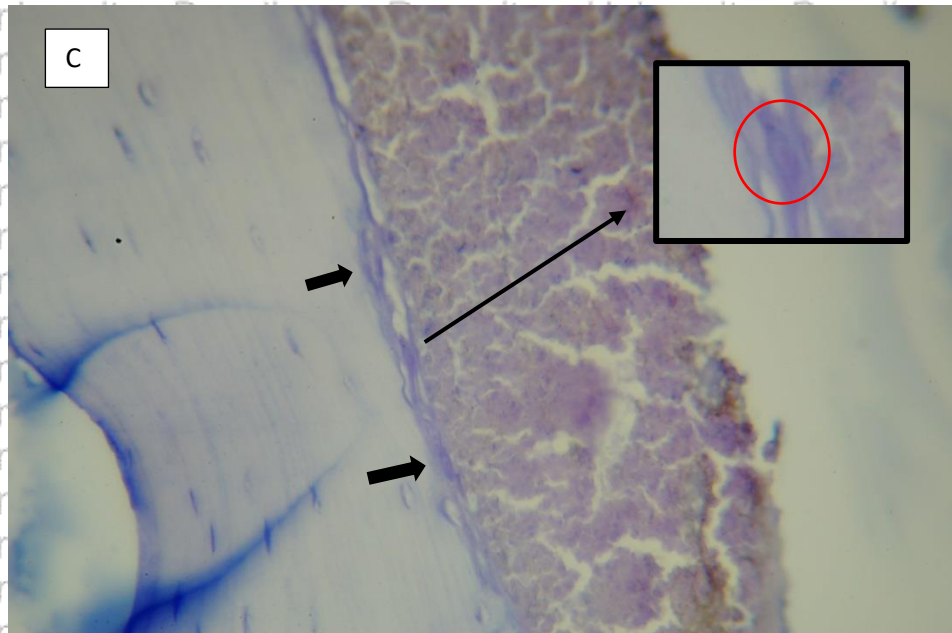
Mean \pm SD	Hari ke-3	Hari ke-7	Hari ke-14
■ Kontrol	20.33 \pm 4.04	20.67 \pm 2.52	22.00 \pm 1.00
■ Perlakuan 1	17.67 \pm 1.15	15.33 \pm 1.53	13.67 \pm 1.15
■ Perlakuan 2	14.33 \pm 1.53	13.33 \pm 2.08	11.33 \pm 1.15

Gambar 5.1. Diagram hasil perhitungan rata-rata jumlah sel osteoklas pada kelompok kontrol (K), perlakuan 1 (P1), dan perlakuan 2 (P2) pada hari ke 3, 7 dan 14.

Pada hari ke-3, didapatkan jumlah sel osteoklas pada kelompok kontrol (K) paling banyak dengan rata-rata sebanyak 20.33. Kelompok Perlakuan 1 (P1) lebih banyak jika dibandingkan dengan kelompok

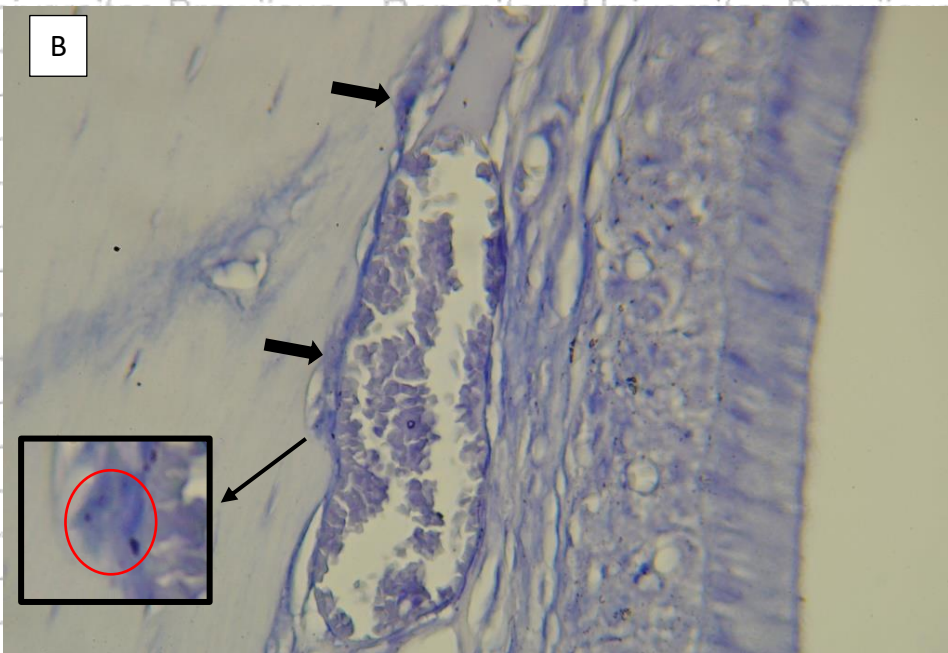
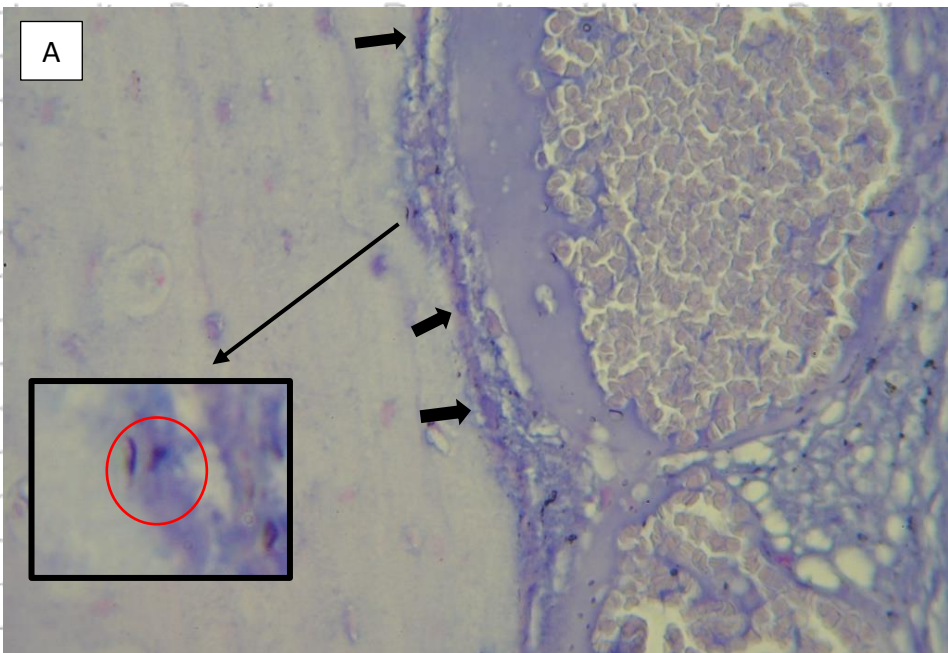
Perlakuan 2 (P2), dimana rata-rata sel osteoklas pada P1 adalah 17.67 dan P2 adalah 14.33. Hasil pengamatan jumlah sel osteoklas dengan mikroskop cahaya pada hari ke-3 ditunjukkan pada gambar 5.2.

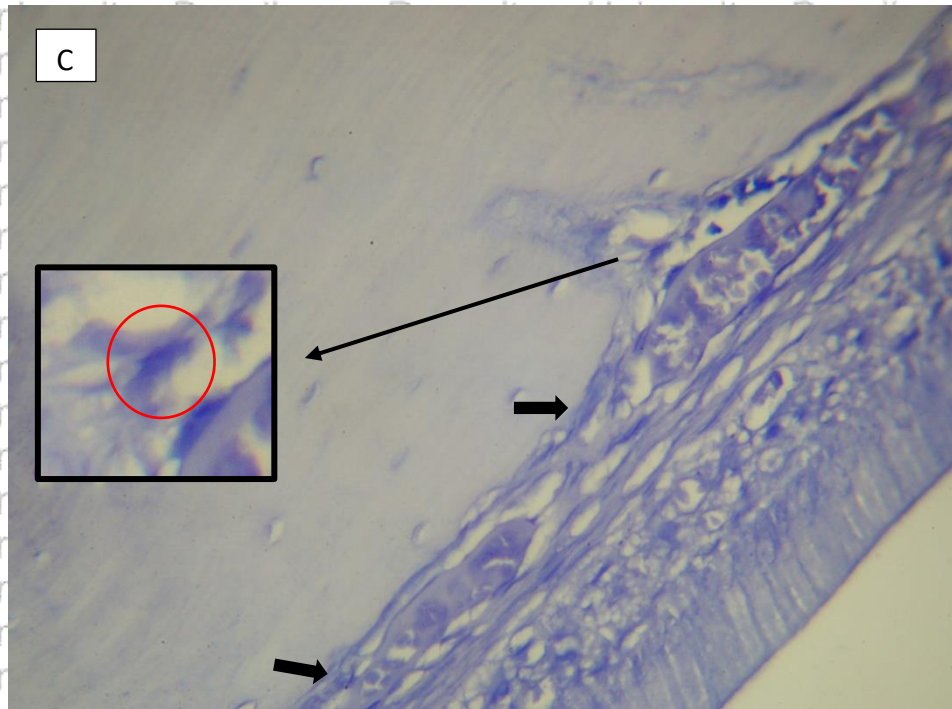




Gambar 5.2 Gambaran sel osteoklas dengan pewarnaan *Hematoxylin-Eosin (HE)* perbesaran 400x pada hari ke-3 : (A) Kelompok Kontrol (K), (B) Kelompok Perlakuan 1 (P1), (C) Kelompok Perlakuan 2 (P2). Tanda panah hitam menunjukkan sel osteoklas.

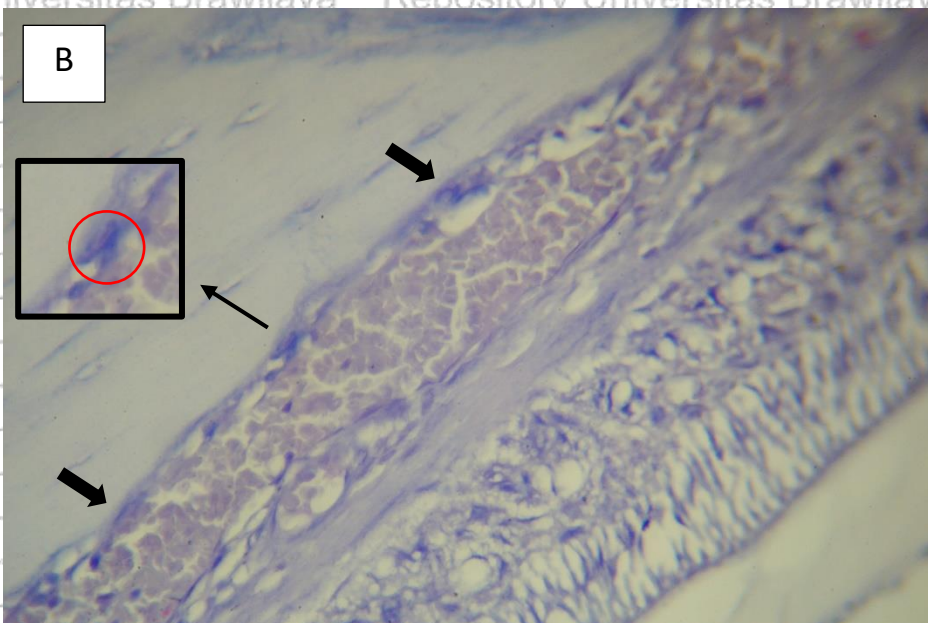
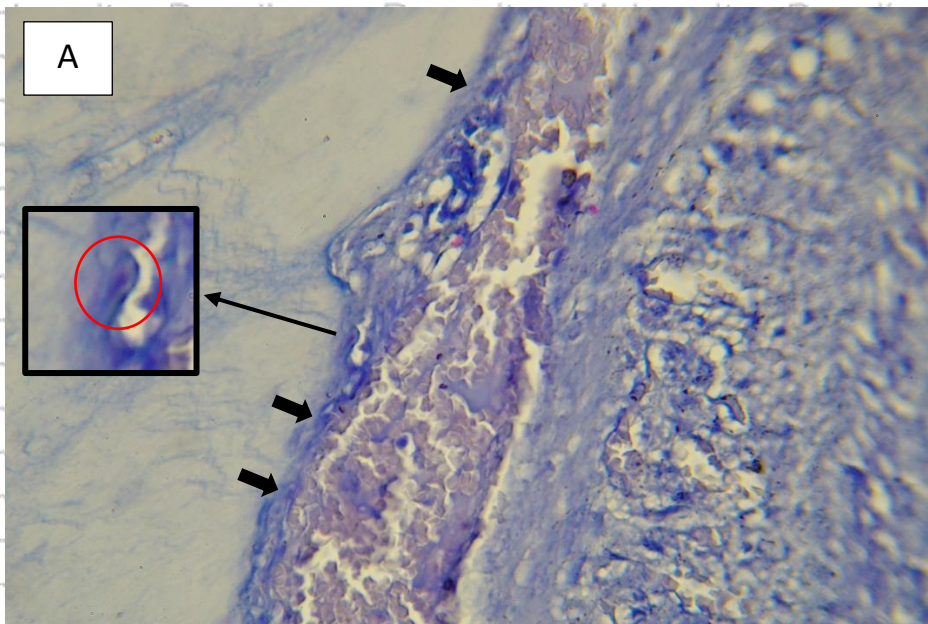
Pada hari ke-7, didapatkan jumlah sel osteoklas pada kelompok kontrol (K) paling banyak dengan rata-rata sebanyak 20.67. Kelompok Perlakuan 1 (P1) lebih banyak jika dibandingkan dengan kelompok Perlakuan 2 (P2), dimana rata-rata sel osteoklas pada P1 adalah 15.33 dan P2 adalah 13.33. Hasil pengamatan jumlah sel osteoklas dengan mikroskop cahaya pada hari ke-7 ditunjukkan pada gambar 5.3.

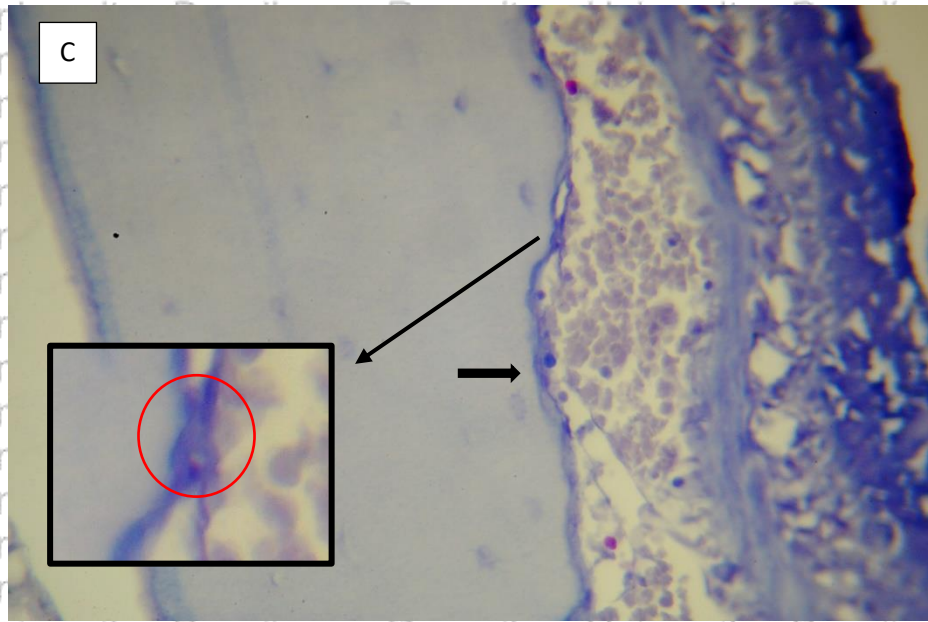




Gambar 5.3. Gambaran sel osteoklas dengan pewarnaan *Hematoxylin-Eosin (HE)* perbesaran 400x pada hari ke-7 : (A) Kelompok Kontrol (K), (B) Kelompok Perlakuan 1 (P1), (C) Kelompok Perlakuan 2 (P2). Tanda panah hitam menunjukkan sel osteoklas.

Pada hari ke-14, didapatkan jumlah sel osteoklas pada kelompok kontrol (K) paling banyak dengan rata-rata sebanyak 22.00. Kelompok Perlakuan 1 (P1) lebih banyak jika dibandingkan dengan kelompok Perlakuan 2 (P2), dimana rata-rata sel osteoklas pada P1 adalah 13.67 dan P2 adalah 11.33. Hasil pengamatan jumlah sel osteoklas dengan mikroskop cahaya pada hari ke-14 ditunjukkan pada gambar 5.4.





Gambar 5.4. Gambaran sel osteoklas dengan pewarnaan *Hematoxylin-Eosin (HE)* perbesaran 400x pada hari ke-14 : (A) Kelompok Kontrol (K), (B) Kelompok Perlakuan 1 (P1), (C) Kelompok Perlakuan 2 (P2). Tanda panah hitam menunjukkan sel osteoklas.

5.2 Analisa Data

Data perhitungan jumlah sel osteoklas dianalisis menggunakan uji normalitas terlebih dahulu. Apabila data berdistribusi normal, maka dilakukan uji homogenitas ragam menggunakan *Levene's test*. Selanjutnya, bila data dinyatakan normal dan homogen, dilakukan uji *One-way Anova*. Setelah itu, dilanjutkan dengan uji *post-hoc Tukey*. Tabel perhitungan statistika penelitian ini terlampir.

5.2.1 Uji Normalitas

Uji normalitas data menggunakan uji Shapiro-Wilk. Data penelitian dikatakan berdistribusi normal apabila nilai signifikansi $p > 0,05$. Hasil uji normalitas data ditunjukkan pada tabel 5.2.

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Jumlah Sel hari ke-3	.218	9	.200*	.945	9	.633
Jumlah Sel hari ke-7	.206	9	.200*	.948	9	.673
Jumlah Sel hari ke-14	.261	9	.079	.845	9	.066

Tabel 5.1. Uji Normalitas data Jumlah Sel Osteoklas

Hasil signifikansi uji normalitas jumlah sel osteoklas pada kelompok kontrol(K), perlakuan 1 (P1) maupun perlakuan 2 (P2) di hari ke-3 adalah 0.633, pada hari ke-7 adalah 0,673 dan pada hari ke-14 adalah 0,066. Hal ini membuktikan data berdistribusi normal.

5.2.2 Uji Homogenitas

Pengujian homogenitas ragam dilakukan menggunakan *Levene's test*. Uji homogenitas ragam dikatakan terpenuhi apabila hasil perhitungan lebih besar dari 0,05 ($p > 0,05$). Hasil uji normalitas data ditunjukkan pada tabel 5.3.

Test of Homogeneity of Variances

Jumlah Sel hari ke-3	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
	2.433	2	6	.168
Jumlah Sel hari ke-7	Levene Statistic	df1	df2	Sig.

	.373	2	6	.703
Jumlah Sel hari ke-14	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
	.235	2	6	.797

Tabel 5.2. Uji Homogenitas data Jumlah Sel Osteoklas

Hasil signifikansi uji homogenitas jumlah sel osteoklas pada kelompok kontrol (K), perlakuan 1 (P1) dan perlakuan 2 (P2) di hari ke-3 adalah 0.168, pada hari ke-7 adalah 0.703 dan pada hari ke-14 adalah 0.797.

Hal ini membuktikan varian data jumlah sel osteoklas pada ketiga kelompok homogen.

5.2.3 Uji *One-Way Anova*

Uji *One-Way Anova* dilakukan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan jumlah sel osteoklas antar kelompok. *One-Way Anova* dapat digunakan apabila data berdistribusi normal dan variasi data homogen. Dalam uji *One-Way Anova* apabila nilai signifikansi kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) maka dikatakan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok, apabila nilai signifikansi lebih dari 0.05 ($p > 0.05$) maka dikatakan tidak terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok. Hasil uji *one-way anova* ditunjukkan pada tabel 5.4, tabel 5.5 dan tabel 5.6.

	n	Rata-rata (SB)	Nilai P/ sig.
Kelompok Kontrol	3	20.33 (4.04)	0.077
Kelompok Perlakuan 1	3	17.66 (1.15)	
Kelompok Perlakuan 2	3	14.33 (1.52)	

Tabel 5.3. Uji *One-Way Anova* Jumlah Sel Osteoklas hari ke-3

	n	Rata-rata (SB)	Nilai P/ sig.
Kelompok Kontrol	3	20.66 (2.51)	0.012
Kelompok Perlakuan 1	3	15.33 (1.52)	
Kelompok Perlakuan 2	3	13.33 (2.08)	

Tabel 5.4. Uji *One-Way Anova* Jumlah Sel Osteoklas hari ke-7

	n	Rata-rata (SB)	Nilai P/ sig.
Kelompok Kontrol	3	22.00 (1.00)	<0.001
Kelompok Perlakuan 1	3	13.66 (1.15)	
Kelompok Perlakuan 2	3	11.33 (1.15)	

Tabel 5.5. Uji *One-Way Anova* Jumlah Sel Osteoklas hari ke-14

Hasil pengujian *One-Way Anova* antara kelompok Kontrol (K), Perlakuan 1 (P1) dan Perlakuan 2(P2) pada hari ke-3 menunjukkan hasil signifikansi 0.077, pada hari ke-7 menunjukkan signifikansi 0.012, dan pada hari ke-14 menunjukkan hasil signifikansi <0.001. Pada hari ke-3 nilai signifikansi >0.05, maka tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok Kontrol (K), Perlakuan 1 (P1) dan Perlakuan 2 (P2). Sedangkan, pada hari ke-7 dan 14 nilai signifikansi <0.05, sehingga dengan tingkat signifikansi 5%, dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok Kontrol (K), Perlakuan 1 (P1) dan Perlakuan 2 (P2) pada hari ke-7 dan 14.

5.2.4 Uji *Post-hoc Tukey*

Uji *Post-hoc Tukey* dilakukan setelah uji *One-Way Anova* dengan hasil nilai signifikansi kurang dari 0.05 ($p < 0.05$). Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan pada 2 kelompok perlakuan sampel yang independen dengan membandingkan 2 kelompok. Bila uji

Post-Hoc Tukey menghasilkan nilai signifikansi kurang dari 0.05 ($p < 0.05$), maka terdapat perbedaan bermakna antar dua kelompok yang diuji. Hasil uji *Post-Hoc Tukey* pada hari ke-7 dan 14 ditunjukkan pada tabel 5.7 dan tabel 5.8.

	Perbedaan Rata-rata	IK 95%		Nilai P/sig.
		Minimum	Maksimum	
K vs P1	5.33	0.11	10.54	0.046
K vs P2	7.33	2.11	12.54	0.012
P1 vs P2	2.00	-3.21	7.21	0.507

Tabel 5.6. Uji *Post-hoc Tukey* perbandingan kelompok K, P1 dan P2 pada hari ke-7.

Nilai signifikansi antara kelompok kontrol (K) dengan perlakuan 1 (P1) sebesar 0.0046 ($p < 0.05$), antara kelompok kontrol (K) dengan perlakuan 2 (P2) sebesar 0.012 ($p < 0.05$) dan kelompok perlakuan 1 (P1) dengan kelompok perlakuan 2 (P2) sebesar 0.507 ($p > 0.05$). Oleh karena itu, dapat disimpulkan dengan tingkat signifikansi 5%, terdapat perbedaan yang signifikan dari jumlah sel osteoklas antara kelompok kontrol (K) dengan kelompok perlakuan 1 (P1) dan kelompok kontrol (K) dengan kelompok perlakuan 2 (P2). Namun tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan 1 (P1) dan kelompok perlakuan 2 (P2).

	Perbedaan Rata-rata	IK 95%		Nilai P/sig.
		Minimum	Maksimum	
K vs P1	8.33	5.56	11.1	<0.001
K vs P2	10.66	7.89	13.43	<0.001
P1 vs P2	2.33	-0.43	5.10	0.092

Tabel 5.7. Uji *Post-hoc Tukey* perbandingan kelompok K, P1 dan P2 pada hari ke-14.

Nilai signifikansi antara kelompok kontrol (K) dengan perlakuan 1 (P1) sebesar <0.001 ($p < 0.05$), antara kelompok kontrol (K) dengan perlakuan 2 (P2) sebesar <0.001 ($p < 0.05$) dan kelompok perlakuan 1 (P1) dengan kelompok perlakuan 2 (P2) sebesar 0.092 ($p > 0.05$). Oleh karena itu, dapat disimpulkan dengan tingkat signifikansi 5%, terdapat perbedaan yang signifikan dari jumlah sel osteoklas antara kelompok kontrol (K) dengan kelompok perlakuan 1 (P1) dan kelompok kontrol (K) dengan kelompok perlakuan 2 (P2). Namun tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan 1 (P1) dan kelompok perlakuan 2 (P2).

5.3 Pembahasan

Penelitian ini bertujuan untuk mengamati perbedaan jumlah sel osteoklas pasca pemberian nanoliposom ekstrak etanol biji pepaya 96% pada tikus model diabetik periodontitis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok perlakuan 1 (P1) dan kelompok perlakuan 2 (P2) memiliki rata-rata penurunan jumlah osteoklas dibanding kelompok kontrol. Jumlah sel osteoklas pada kelompok kontrol (K) menunjukkan terjadinya resorpsi tulang alveolar akibat reaksi inflamasi sebagai respon host terhadap LPS *P. gingivalis* pada jaringan periodontal yang ditandai dengan infiltrasi leukosit polimorfonuklear, produksi spesies oksigen reaktif (ROS), dan mediator inflamasi seperti sitokin dan prostaglandin, amplifikasi enzim litik, aktivasi osteoklas, edema, dan pelebaran pembuluh darah (Pusporini *et al.*, 2017). Kondisi hiperglikemia pada diabetes mellitus mendorong pembentukan AGEs (*advanced glycation end products*) yang apabila berikatan dengan reseptor RAGE akan meningkatkan inflamasi dan *oxidative stress* (OS) yang ditandai dengan produksi *reactive oxygen species* (ROS) sehingga merusak perbaikan jaringan (Bullon *et al.*, 2014) (Xiaoyu *et al.*, 2017) (Polak and Shapira, 2018).

Pada hari ke-3, terdapat penurunan rata-rata jumlah sel osteoklas, namun tidak terdapat perbedaan jumlah sel osteoklas yang signifikan antara kelompok Kontrol (K), Perlakuan 1 (P1) dan Perlakuan 2 (P2) berdasarkan hasil Uji *One-Way Anova*. Perbedaan jumlah sel osteoklas yang signifikan antar kelompok terjadi pada hari ke-7 dan 14. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Kwak *et al* pada tahun 2013 yang menyebutkan bahwa asam klorogenat dapat menghambat destruksi tulang yang dimediasi oleh peradangan. Pada penelitian tersebut terjadi perbaikan secara signifikan pada kerusakan tulang yang diinduksi oleh LPS pada hari ke-8. Asam klorogenat merupakan komponen fenolik pada biji pepaya yang berfungsi sebagai antioksidan yang dibutuhkan untuk mencegah kerusakan jaringan lebih lanjut akibat tingginya produksi *reactive oxidative stress* (ROS), menurunkan jumlah osteoklas dan menghambat resorpsi tulang melalui penurunan regulasi RANKL (Zunjar *et al*, 2015) (Yazid *et al*, 2019) (Pusporini *et al*, 2019; 2020).

Pada hari ke-7, terdapat penurunan rata-rata jumlah sel osteoklas antar kelompok kontrol (K), kelompok perlakuan 1 (P1) dan kelompok perlakuan 2 (P2). Hasil Uji *Post-Hoc Tukey* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antar kelompok kontrol (K) dengan kelompok perlakuan 1 (P1) dan kelompok kontrol (K) dengan kelompok perlakuan 2 (P2). Hal ini menunjukkan bahwa kandungan senyawa aktif pada biji pepaya (*Carica papaya L.*) berfungsi sebagai anti-inflamasi dan dapat menghambat proses resorpsi tulang alveolar yang terbukti dari penurunan jumlah sel osteoklas. Dudarić (2015) menyatakan bahwa kandungan polifenol dapat mengurangi mediator inflamasi dan mempengaruhi mekanisme pembentukan tulang dengan menghambat osteoklastogenesis, menghambat aktivitas osteoklas dengan memblokir produksi RANKL, dan menurunkan produksi faktor pro-inflamatori seperti COX-2. Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang terkandung dalam biji pepaya dan *quercetin* merupakan salah satu *subclass* senyawa flavonoid (D'Andrea *et al*, 2015). *Quercetin* dapat berperan sebagai anti-inflamasi dan antioksidan. Mekanisme kerja *quercetin* berkaitan dengan penghambatan produksi

sitokin pro-inflamatori (IL-1 β dan TNF- α), berkurangnya ekspresi molekul inflamasi, penghambatan jalur pensinyalan intraseluler seperti *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) dan NF κ B sehingga terjadi pengurangan inflamasi dan *stress oxidative* (Napimoga *et al*, 2013).

Berdasarkan hasil Uji *Post-Hoc Tukey* pada hari ke-7 dan 14, tidak terdapat perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan 1 (P1) dengan kelompok perlakuan 2 (P2). Namun, terdapat perbedaan rata-rata jumlah sel osteoklas antar kelompok, dimana jumlah sel osteoklas pada kelompok perlakuan 2 (P2) lebih rendah dibanding jumlah sel osteoklas pada kelompok perlakuan 1 (P1). Menurut Hienz (2015), fase resorpsi berlangsung sekitar 8-10 hari dan diduga fase tersebut merupakan rentang hidup dari osteoklas. Selama fase resorpsi, osteoklas bekerja menghilangkan komponen mineral dan organik dari matriks tulang. Setelah sebagian besar mineral dan matriks organik telah dihilangkan, terjadi fase *reversal* yang berlangsung selama 7-14 hari, menandai transisi dari destruksi ke perbaikan. Setelah menyelesaikan satu resorpsi *lacuna*, osteoklas dapat bergerak sepanjang permukaan tulang dan memulai kembali resorpsi atau menjalani apoptosis. Pada fase *reversal*, terjadi pelepasan faktor kopling resorpsi ke pembentukan dari protein pengikatnya akibat lingkungan asam yang diciptakan oleh osteoklas. Selanjutnya faktor ini menghambat resorpsi dengan menekan pembentukan osteoklas dan menstimulasi osteoblastogenesis. Dalam serangkaian peristiwa aktivasi sel autoregulasi yang dikendalikan secara lokal, fase resorptif osteoklas sepuluh hari biasanya diikuti oleh fase perbaikan selama tiga bulan. Pergerakan osteoklas pada sepanjang permukaan tulang untuk memulai kembali resorpsi atau melakukan apoptosis dapat menjadi penyebab tidak terdapatnya perbedaan signifikan antar jumlah sel osteoklas pada kelompok perlakuan 1 (P1) dengan kelompok perlakuan 2 (P2). Selain itu, proses preparasi nanopartikel terhadap liposom sebagai sistem penghantaran obat dapat mempengaruhi efektivitas penghantaran obat. Menurut Martien (2012), untuk memahami masalah yang dapat terjadi pada proses sintesis nanopartikel, dapat dilakukan karakterisasi secara menyeluruh pada



nanopartikel, selain dari ukuran partikel, perlu diketahui karakter morfologi partikel dan nilai potensial zeta.

Pada proses resorpsi tulang oleh sel osteoklas, terjadi pelepasan faktor turunan matriks tulang yang dapat mengatur pembentukan sel osteoblas (Kular *et al.*, 2012). Sel osteoblas mempengaruhi regulasi osteoklastogenesis melalui sistem regulasi dari OPG / RANKL / RANK.

Rasio RANKL/OPG merupakan determinan proses resorpsi tulang (Pusporini *et al.*, 2019). Berdasarkan hasil Uji *Post-Hoc Tukey* pada hari ke-14 terdapat perbedaan bermakna antar kelompok kontrol (K) dengan kelompok perlakuan 1 (P1) dan kelompok kontrol (K) dengan kelompok perlakuan 2 (P2). Hal ini sesuai dengan penelitian *in vitro* yang dilakukan Sokos pada tahun 2014 dimana OPG atau prostaglandin E2 dalam kokultur *Periodontal Ligament Fibroblasts* (PDLF) dengan sel CD14+ selama 14 hari memiliki efek penghambatan pada pembentukan *osteoclast-like cell*. *Periodontal Ligament Fibroblasts* (PDLF) memblokir osteogenesis dalam periodonsium dengan melepaskan regulator lokal seperti sitokin dan *growth factor* untuk mempertahankan pemisahan akar gigi dari tulang alveolar (Nugraeni *et al.*, 2009).

Pada hari ke-14, Jumlah sel osteoklas pada kelompok kontrol (K) merupakan yang tertinggi. Hal ini dapat disebabkan karena kondisi hiperglikemia yang kronis menyebabkan proses penyembuhan yang lambat akibat peningkatan sitokin pro-inflamatori, *advanced glycation end-products* (AGE's) dan *reactive oxygen species* (ROS) (Hidayat *et al.*, 2018).

Jumlah sel osteoklas pada kelompok perlakuan 2 (P2) merupakan yang terendah dari seluruh *time series*, menunjukkan bahwa kondisi inflamasi pada hewan coba telah terkontrol. Listari (2019) menyatakan bahwa dengan terkontrolnya inflamasi dapat menghambat ekspresi RANKL yang berlebih.

Hal ini dapat menghambat *osteoclastogenesis* yang berlebih sehingga dapat terjadi *bone formation*. Hasil uji dan pengamatan sel osteoklas pada hari ke-14 membuktikan bahwa terjadi penghambatan proses resorpsi tulang pada kerusakan tulang alveolar pasca pemberian nanoliposom ekstrak etanol biji pepaya 96% pada pengobatan di hari ke-14 melalui penghambatan produksi



RANKL dan peningkatan produksi OPG oleh sel osteoblas menyebabkan terganggunya pengikatan RANKL oleh reseptor RANK (RANKL-RANK) yang merupakan proses awal destruksi tulang.

Berdasarkan hasil pembahasan dapat disimpulkan terdapat perbedaan jumlah sel osteoklas antar kelompok, sehingga hipotesis penelitian diterima yaitu terdapat pengaruh pemberian nanoliposom ekstrak biji pepaya terhadap jumlah sel osteoklas pada tikus model diabetik periodontitis.



BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian analisis data dan pembahasan tentang pengaruh pemberian nanoliposom ekstrak etanol biji pepaya 96% terhadap jumlah osteoklas pada tikus model diabetik periodontitis, dapat disimpulkan bahwa:

1. Pemberian nanoliposom ekstrak etanol biji pepaya 96% berpengaruh dalam penurunan jumlah osteoklas pada tikus model diabetik periodontitis.
2. Terdapat perbedaan jumlah sel osteoklas antar kelompok perlakuan, dengan jumlah sel osteoklas pada hari ke-14 merupakan jumlah terendah dan jumlah osteoklas pada hari ke-3 merupakan yang tertinggi.

6.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan pada bab sebelumnya, saran yang diperoleh adalah :

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efektivitas nanoliposom ekstrak etanol biji pepaya 96% sebagai terapi alternatif diabetik periodontitis
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek samping dan toksisitas nanoliposom ekstrak etanol biji pepaya 96% sebagai terapi alternatif diabetik periodontitis.



DAFTAR PUSTAKA

- Abe, T., Hajishengallis, G. 2013. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *J Immunol Methods*. 394(0): 49–54. doi:10.1016/j.jim.2013.05.002.
- Ajazuddin & Saraf, S. 2010. Applications Of Novel Drug Delivery System For Herbal Formulations. *Fitoterapia*, 81, 680-689.
- Akbarzadeh, A., Rezaei-sadabady, R., Davaran, S., Joo, S.W., Zarghami, N., 2013. Liposome : classification , preparation , and applications. *Nanoscalereslett*, 8, 1–9.
- Amazu LU, Azikiwe CCA, Njoku CJ, Osuala FN, Nwosu PJC, Ajugwo AO, Enye J, 2010. Antiinflammatory activity of the methanolic extract of the seeds of *Carica papaya* in experimental animals, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*: 884-886.
- Amarasekara, D., Hyeongseok, Y., Sumi, K., Nari, L., Hyunjong, K., Jaerang, R. 2018. Regulation of Osteoclast Differentiation by Cytokine. <https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e8>
- American Diabetes Association. (2017). “Standards of Medical Care in Diabetes 2017”. Vol. 40. USA : ADA.
- Andriani, I., Chairunissa, F. A. 2019. Periodontitis Kronis dan Penatalaksanaan Kasus dengan Kuretase. *Insisiva Dental Journal: Majalah Kedokteran Gigi Insisiva*, 8 (1): 25-30.
- Andriena, N., et al. 2012. Pengaruh Irama Sirkadian Terhadap Jumlah Osteoklas Tulang Alveolar Marmut (*Cavia Cobaya*).
- Asmat U, Abad K, Ismail K. Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review. *Saudi Pharm J*. 2016;24(5):547-553. doi:10.1016/j.jsps.2015.03.013
- Atun, S., 2014, Metode Isolasi dan Identifikasi Struktur Senyawa Organik Bahan Alam, *Jurnal Konservasi Cagar Budaya Borobudur* 8(2): 53-61. *Oral Biology Dental Journal* Vol. 4 (2): 17-22.
- Ayu, K. V. (2018). EFEK INDUKSI LPS TERHADAP JUMLAH OSTEOLAS PADA RESORPSI TULANG ALVEOLAR TIKUS PUTIH JANTAN (*Rattus norvegicus*) GALUR SPRAGUE DAWLEY. *Interdental: Jurnal Kedokteran Gigi*, 14(1), 13-17. <https://doi.org/10.46862/interdental.v14i1.368>.



Brower, M., Grace, M. et al. Comparative analysis of growth characteristics of Sprague Dawley rats obtained from different sources. *Lab Anim Res* Vol. 31(4): 166-173.

Brunetti, Giacomina & Mori, Giorgio & d'amelio, Patrizia & Faccio, Roberta. (2015). Pathogenesis of Bone Diseases: The Role of Immune System. *Journal of Immunology Research*. 2015. 10.1155/2015/785845.

Bullon, P., Cordero, M. D., Quiles, J. L., Morillo, J. M., del Carmen Ramirez-Tortosa, M. & Battino, M. (2011) Mitochondrial dysfunction promoted by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide as a possible link between cardiovascular disease and periodontitis. *Free Radic Biol Med* 50, 1336-1343.

Calvache, J. N., Cueto, M, Farroni A., et al. 2016. Antioxidant characterization of new dietary fiber concentrates from papaya pulp and peel (*Carica papaya* L.). *Journal of Functional Foods* 27 (2016) 319–328.

Calvo IF, Salgado CM. TGFβ1 (transforming growth factor beta 1). *Atlas genetic cytogenetic oncology haematology*, 2013. Available from: http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/TGFβ1ID4_2534ch19q13.html.

Campos Carlos, 2012, Chronic Hyperglycemia and Glucose Toxicity: Pathology and Clinical Sequelae, *Post Graduate Medicine*, Vol. 124, no.6, pp. 1-8

Carbone L, Carbone E T, et al. 2012. Assessing Cervical Dislocation as a Humane Euthanasia Method in Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2012 May; 51(3): 352–356.

D'Andrea, G. 2015. **Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications?** *Fitoterapia* Vol. 106: 256-271. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.09.018>.

Carranza, F.A. and Takei H.H, 2012. Clinical Diagnosis, In Newman, M.G., Takei, H.H., Klokkevold, P.R., and Carranza, F.A., *Carranza's Clinical Periodontology*, 10th ed., Saunders Elsevier. St. Louis Missouri.

Carranza, F.A., Newman, M.G., Takel, H.H., dan Klokkevold, P.R.. 2015. *Carranza's Clinical Periodontology 12th Edition*. Canada: Elsevier.



Chaudhury, A., Duvoor, C. et al. 2017. Clinical Review of Antidiabetic Drugs: Implications for Type 2 Diabetes Mellitus Management. *Frontiers in Endocrinology* Vol. 8(6): 1-12.

Chen, X., Zhongqiu, W., Na, D., Guoying, Z., Edward, M S., Chao, X. 2018. Osteoblast-osteoclast interaction. *Connective Tissue Research* Vol. 59(2): 99-107.

Cheraghi, M., Negahdari, B., Daraee, H., Eatemadi, A. 2017. Heart targeted nanoliposomal/nanoparticles drug delivery: An updated review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 86 (2017): 316–323.

Chiefari, E., Arcidiacono, B., Foti, D., Brunetti, A. 2017. Gestational diabetes mellitus: an updated overview. *Jurnal Endocrinol Invest.* DOI 10.1007/s40618-016-0607-5.

Decroli, Eva. 2019. *Diabetes Mellitus Tipe 2*. Padang: Pusat Penerbitan Bagian Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Andalas.

Devi, A., Yuktiana, K., Nurul, R. 2017. Efek Antibakteri Ekstrak Air Buah Pepaya (*Carica papaya L.*) Muda terhadap *Lactobacillus acidophilus*. *Bandung Meeting on Global Medicine & Health (BaMGMH)*, Vol. 1 No. 1.

Dua, J.S., Rana, A.C., Bhandari, A.K., 2012. Liposome : Methods of Preparation and Applications. *Int J Pharm*, 3, 14–20.

Dudarić L, Fužinac-Smojver A, Muhvić D, Giacometti J. The role of polyphenols on bone metabolism in osteoporosis. 2015; 77(2): 290–298. doi: 10.1016/j.foodres.2015.10.017

Eloy, J.O., de Souza, M.C., Petrilli, R., Barcellos, J.P.A., Lee, R.J., Marchetti, J.M., 2014. Liposomes as Carriers of Hydrophilic Small Molecule Drugs: Strategies to Enhance Encapsulation and Delivery. *Colloids Surf. B Biointerfaces.*, 123, 345–363.

Ermawati, T. (2015). PERIODONTITIS DAN DIABETES MELITUS. *STOMATOGNATIC - Jurnal Kedokteran Gigi*, 9(3), 152-154. Retrieved from <https://jurnal.unej.ac.id/index.php/STOMA/article/view/2136>

Fatimah, R. N. 2015. Diabetes Melitus Tipe 2. *Jurnal Majority* Vol. 4(5): 93-101.

Fauziah, L., Wakidah, M. 2019. Extraction of Papaya Leaves (*Carica papaya L.*) Using Ultrasonic Cleaner. *EKSAKTA* Vol. 19, No. 1, Februari 2019, 35-45.



Febrina, L., Rusli, R., Muflinah, F. 2015. Optimalisasi Ekstraksi dan Uji Metabolit Sekunder Tumbuhan Libo (*Ficus Variegata* Blume). *J. Trop. Pharm. Chem.* 2015. Vol 3 (2).

Feldman A T, Wolfe D. 2014. Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. *Methods Mol Biol* 2014;1180:31-43. doi: 10.1007/978-1-4939-1050-2_3.

Firdaus, Rimbawan, arliyati S. A., Roosita K. 2016. Model Tikus Diabetes yang Diinduksi Streptozotocin Sukrosa untuk Pendekatan Penelitian Diabetes Mellitus Gestasional. *Jurnal MKMI* Vol. 12 (1): 29-34.

Fitri, H., Fajri, F. N., et al. 2019. Efek Pemberian Zink Pasca Scaling Root Planning Terhadap Kadar MMP-8 Saliva Pada Pasien Gingivitis. *B-Dent: Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Baiturrahmah*, Vol 6, No. 2: page 132-141.

Frianto, F., Fajriaty, I., Riza, H. 2015. Evaluasi Faktor yang Mempengaruhi Jumlah Perkawinan Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) secara Kualitatif. *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN* Vol.3(1).

Hendrijantini N, Rostiny, Kurdi A, Ari MDA, Sitalaksmi RM, et al. Molecular triad RANK/ RANKL/ OPG in mandible and femur of Wistar rats (*Rattus norvegicus*) with type 2 diabetes mellitus. *Recent Adv Biol Med.* 2019; Vol. 5, Article ID 959614, 7 pages. <https://doi.org/10.18639/RABM.2019.95961>.

Herniyanti. 2016. Pengaruh Kafein Terhadap Ekspresi RANKL dan Jumlah Osteoklas Pada Pergerakan Gigi Ortodonti. *DENTA Jurnal Kedokteran Gigi* Vol. 10(1): 62-70.

Hienz, S. A., Paliwal, S., & Ivanovski, S. (2015). Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. *Journal of immunology research*, 2015, 615486. <https://doi.org/10.1155/2015/615486>

Hidayat, L., Hadi, P., & Radithia, D. (2018). Pengaruh Pemberian ZnSO₄ 1% Topikal Terhadap Ekspresi MMP-9 dan Jumlah Fibroblas Pada Penyembuhan Ulkus Traumatikus Tikus Wistar Diabetes Melitus. *E-Prodenta Journal of Dentistry*. 2018, 2(2): 163-171

Hikmah, N., Shita, A. D. P., Peran RANKL Pada Proses Reorpsi Tulang Alveolar Kondisi Diabetes. *Stomatognathic Jurnal Kedokteran Gigi* Vol. 10(3): 105-109.

Indahyani, D.E., Santoso, A., Utoro, T., Soesaty, M.H. 2010. *Fish Oil Regulates Bone Sialoprotein And Osteopontin In Alveolar Bone Resorption*. Naskah Lengkap Joint Scientific Meeting in Dentistry (JSMiD).



Isnaini, N., Ratnasari. 2018. Faktor risiko mempengaruhi kejadian Diabetes mellitus tipe dua. *Jurnal Keperawatan dan Kebidanan Aisyi* Vol. 14(1): 59-68.

Isnania, Fatimawali, Wehantouw F. 2014. Aktivitas Diuretik dan Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Biji Pepaya (*Carica papaya* L.) Pada Tikus Putih Jantan Galur Wistar (*Rattus norvegicus*). *Jurnal Ilmiah Farmasi-UNSRTAT* Vol. 3 (3): 188-195.

Jiménez, V. M., Mora-Newcomer, E., et al. 2013. *Biology of Papaya Plant*. Germany: Food Security Center, University of Hohenheim.

Johnson Mary. 2012. Labome: Laboratory Mice and Rats. <http://www.labome.com/method/LaboratoryMice-and-Rats.html>.

Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, Laporan Nasional RISKESDAS. p: 207, 2018.

Khumaedi, A. I., Sulistianingsih, R. D. P., Wijaya, I. P., & Soeroso, Y. (2019). The relationship of diabetes, periodontitis and cardiovascular disease. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*, 13(2), 1675-1678. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2019.03.023>.

Klokkevold PR. dan Mealey BL., 2012. Influence of Systemics conditions on the periodontium dalam Textbook of Carranza "Clinical Periodontology. 11ed : 304 – 19.

Kodir, A. I., Herawati, D., Murdiastuti, K. 2014. Perbedaan Efektivitas antara Pemberian secara Sistemik Ciprofloksasin dan Antibiotik setelah Scalling & Root Planing pada Periodontitis Kronis Penderita Hipertensi. *Jurnal KEdokteran Gigi* Vol. 5(4): 323-328.

Kubiczkova, L., Sedlarikova, L., Hajek, R., Sevcikova, S. 2012. TGF- β – an excellent servant but a bad master. *Journal of Translational Medicine* Vol. 10(183).

Kular, J., Tickner, J., Chim, S. M., Xu, J. 2012. An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clinical Biochemistry* 45 (2012) 863–873.

Kumar, N. S., Sreeja, D. PS. 2017. The surprising health benefits of papaya seeds: a review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2017; 6(1): 424-429.



Kumawat M, Sharma TK, Singh I, et al. Antioxidant Enzymes and Lipid Peroxidation in Type 2 Diabetes Mellitus Patients with and without Nephropathy. *N Am J Med Sci*. 2013;5(3):213-219. doi:10.4103/1947-2714.109193.

Kwak, S C., Lee C, Kim J Y., Oh H M, et al. 2013. Chlorogenic Acid Inhibits of Osteoclast Differentiation and Bone Resorption by Down Regulation of Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand-Induced Nuclear Factor of Activated T cell c1 Expression. *Biological and Pharmaceutical Bulletin Advance Publication by J-STAGE*. DOI: 10.1248/bpb.13-00430.

Lee D-E, Kim J-H, Choi S-H, Cha J-H, Bak E-J, Yoo Y-J. Periodontitis mainly increases osteoclast formation via enhancing the differentiation of quiescent osteoclast precursors into osteoclasts. *Journal of Periodontal Research* 2014; doi: 10.1111/jre.12203.

Listari, K M., Ruhadi, I., & Ulfa, N. (2019). Ekspresi RANKL Pada Defek Tulang Dengan Pemberian Xenograft Dibandingkan Dengan Zenograft dan PRF. *E-Prodenta Journal of Dentistry*. 2019. 3(1): 216-224. DOI : <http://dx.doi.org/10.21776/ub.eprodenta.2019.003.01.5>.

Llambes, F., Santiago, A.H., Raul, C. 2015. Relationship between Diabetes and Periodontal Infection. *World Journal of Diabetes*. Vol. 6(7): 927-935.

Lorenzo, Joseph. 2017. The many ways of osteoclast activation. *The Journal of Clinical Investigation*. Vol. 127 (7): 2530-2532.

Martien, Ronny & Adhyatmika, Adhyatmika & Irianto, Iramie & Farida, Verda & Sari, Dian Purwita. (2012). Perkembangan Teknologi Nanopartikel dalam Sistem Penghantaran Obat. *Majalah Farmaseutik*. 8. 133.

Messina, B. R., Christel, V., Isabelle, M. 2019. The osteoclast, a target cell for microorganisms. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2019.06.023>

Muhammad, dkk. 2016. Hubungan Disfungsi Ereksi Pada Penderita Diabetes Melitus Tipe 2 dengan Kualitas Hidup Di Poliklinik Penyakit Dalam Rsup Sanglah Provinsi Bali. Bali: *Jurnal eBiomedik*.

Mukhriani. 2014. Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Jurnal Kesehatan* Vol. 7(2): 361-367.



Nakamura, H. 20017. Morphology, Function and Differentiation of Bone Cells. *Journal of Hard Tissue Biology*. 16(1): 15-22.

Nativel B., Couret D., Giraud P. et al. 2017. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharides act exclusively through TLR4 with a resilience between mouse and human. *Scientific Reports* 7: 15789. DOI:10.1038/s41598-017-16190-y

Napimoga, M. H., Napimoga J. T. C., Macedo, C. G., et al. 2013. Quercetin Inhibits Inflammatory Bone Resorption in a Mouse Periodontitis Model. *Journal of Natural Products*, 76, 2316-2321.

Nazir, M. A. 2017. Prevalence of Periodontal Disease, Its Association with Systemic Diseases and Prevention. *International Journal of Helath Science* 11(2): 72 – 80.

Ningsih, N., Yasni, S., Yuliani, S. 2017. *Sintesis Nanopartikel Ekstrak Kulit Manggis Merah dan Kajian Sifat Fungsional Produk Enkapsulasinya*. *J. Teknol. dan Industri Pangan*, 28(1): 27-35.

Nugraeni, Yuli & Kamadjaja, David & Utomo, Haryono. (2009). Simple replantation protocol to avoid ankylosis in teeth intended for orthodontic treatment. *Dental Journal: Majalah Kedokteran Gigi*. 42. 10.20473/j.djmg.v42.i1.p25-30.

Ojiako, C. M., Okoye, E. I., Oli, A. N., et al. 2019. Preliminary studies on the formulation of immune stimulating complexes using saponin from Carica papaya leaves. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01962>.

Oktofani, L. A., Suwandi, J. F. 2019. Potensi Tanaman Pepaya (Carica papaya) sebagai Antihelmintik. *Majority Vol.* 8(1): 246-250.

Oshimori, N., & Fuchs, E. (2012). The Harmonies Played by TGF- β in Stem Cell Biology. *Cell Stem Cell*, 751–764.

Ozougwu, J.C., Obimba, K.C., Belonwu, C.D., Unakalamba, C.B., 2013. The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *J. Physiol. Pathophysiol.* 4 (4), 46–57.

Pangesti, T., Fitriani, I. N., Ekaputra, F., Hermawan, A. 2013. “Sweet Papaya Seed Candy” Antibacterial Escherichia coli Candy with Papaya Seed (Carica Papaya L). *PELITA*, Volume VIII, Nomor 2, Agustus 2013: 156-163.



Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, et al. Periodontitis; consensus report of workgroup 2 of the 2017 world workshop on the classification of periodontal and peri-implant diseases and conditions. *J Clin Periodontol*. 2018;45(Suppl 20):S162–70.

PERKENI, 2015, *Pengelolaan dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 di Indonesia*, PERKENI, Jakarta.

Peter, J. K. 2014. Antibacterial Activity of Seed and Leaf Extract of *Carica papaya* var. pusa dwarf Linn. *Journal of Pharmacy and Biological Science*, 9, 29-37.

Polak D, Shapira L. An update on the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes. *J Clin Periodontol*. 2018;45(2):150-166. doi:10.1111/jcpe.12803.

Poniatowski, L. A, Wojdasiewicz, P, et al. 2015. Transforming Growth Factor Beta Family: Insight into the Role of Growth Factors in Regulation of Fracture Healing Biology and Potential Clinical Applications. Hindawi Publishing Corporation *Mediators of Inflammation* Vol. 2015: 1-17.

Prasetya, R. C. 2013. Jumlah sel makrofag gingiva tikus wistar jantan yang diinduksi periodontitis setelah pemberian ekstrak etanolik kulit manggis. *Jurnal Dentofasial*, 12(3), 135-138.

Prasetyaningrum N, Soemardini, Fadillah M N. 2018. Efek Ekstrak Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis*) Terhadap Sel Osteoklas Tulang Alveolar Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). *E-Prodenta Journal of Dentistry*. 2018. 2(1): 130-139.

Preshaw, P. M., Alba, A. L., Herrera, D., Jepsen, S., Konstantinidis, A., Makrilakis, K., Taylor, R., 2012, *Periodontitis and Diabetes: A Two-Way Relationship*, *Diabetologia* (2012) 55:21–31

Pusporini, R., Ahmad, B., Agung, K. 2019. The Effect of Papaya Seed Ethanol Extract in Vivo on The Number of Osteoblast Cells of Periodontitis-Induced Rats. *Traditional Medicine Journal*. Vol. 24(1): 22-27.

Pusporini, R., Baabdullah, H. O., Andyka, V. 2020. Quantification of Quercetin and Chlorogenic Acid in Papaya Seed Ethanol Extract. *Asian J Pharm Clin Res*, Vol 13, Issue 1, 2020, 151-153.

Putri, D. C. A., Dwiastuti, R., et al. 2017. Optimasi Suhu Pencampuran dan Durasi Sonikasi dalam Pembuatan Nanoliposom. *JURNAL FARMASI SAINS DAN KOMUNITAS* Vol. 14(2): 79-85.



Quamilla, N. 2016. Stres dan Kejadian Periodontitis. *Journal of Syiah Kuala Dentistry Society* 1(2): 161 - 168.

RAMADON, DELLY; MUN'IM, ABDUL. Pemanfaatan Nanoteknologi dalam Sistem Penghantaran Obat Baru untuk Produk Bahan Alam. **JURNAL ILMU KEFARMASIAN INDONESIA**, [S.l.], v. 14, n. 2, p. 118-127, sep. 2017. ISSN 2614-6495. Available at: <http://jifi.farmasi.univpancasila.ac.id/index.php/jifi/article/view/20>. Date accessed: 30 dec. 2020.

Reddy Shantipriya. 2011. *Essentials Of Clinical Periodontology And Periodontics*, 3rd edition. Jaypee Brothers Co. India.

Rikawaraswati. 2015. Hubungan Diabetes Melitus dengan Tingkat Keparahan Jaringan Periodontal. *Kemas Nasional*, 9(3): 279-281.

Robert J. Genco, Ray C. Williams. *Periodontal Disease and Overall Health: A Clinician's Guide*. 2ed. Colgate-Palmolive Company: Pennsylvania; 2014: 10-13.

Rusyanti, Y. Analisis Kadar Interleukin- 8 pada Periodontitis Agresif. *IJAS Vol. 4 Nomor 3*: 154-161

Salim S, Rostiny, Kuntjoro M. 2015. Efek Kombinasi Spirulina Kitosan untuk Preservasi Soket Terhadap Osteoblas, Osteoklas dan Kepadatan Kolagen. *dentika Dental Journal*, Vol 18, No. 3, 2015: 225-231.

Salim, A. N., Sumardianto, Amalia, U. 2018. Efektivitas Serbuk Simplisia Biji Pepaya sebagai Antibakteri pada Udang Putih (*Penaeus merguensis*) selama Penyimpanan Dingin. *JPHPI* 2018, Volume 21 Nomor 2: 188-198.

Santana, L. F., Inada, A. C., et al. 2019. Nutraceutical Potential of Carica papaya in Metabolic Syndrome. *Nutrients* 2019, 11, 1608; doi:10.3390/nu11071608.

Sokos, D., Everts, V. and De Vries, T.J., 2015. Role of periodontal ligament fibroblasts in osteoclastogenesis: a review. *Journal of periodontal research*, 50(2), pp.152-159.

Subekti I., 2009. *Buku Ajar Penyakit Dalam: Neuropati Diabetik*, Jilid III, Edisi 4, Jakarta: Fakultas Kedokteran UI.

Sugito dan Egy Suwandi. 2017. Efektivitas Ekstrak Ethanol Daun Pepaya (*Carica papaa L*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* dengan Metode Difusi. *Jurnal Laboratorium Khatulistiwa* 1 (1) (2017) 21-25.



Susanty, Fairus Bachmid. 2016. Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi dan Refluks terhadap Kadar Fenolik dari Ekstrak Tongkol Jagung (*Zea mays L.*). *KONVERSI* Vol. 5 No. 2

Szkudelski, T. 2012. Streptozotocin–nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Experimental Biology and Medicine* 2012, 237:481-490.

Tamara, A., OKtiani, B. W., Taufiqqurahman, I. 2019. Pengaruh Ekstrak Flavonoid Propolis Kelulut (*G. thoracica*) terhadap Jumlah Sel Netrofil pada Periodontitis. *DENTIN Jurnal Kedokteran Gigi* Vol. III(1): 10-16.

Taufiq, et. al. 2015. Uji Aktivitas Antibakteri ekstrak Etanol Biji Buah Pepaya (*Carica papaya L.*) Terhadap *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*. *Prosiding Penelitian Spesia Unisba*. ISSN 2460-6472.

Tobeiha, M., Moghadasian, M. H., Amin, N., Jafarnejad, S. 2020. RANKL/RANK/OPG Pathway: A Mechanism Involved in Exercise-Induced Bone Remodeling. *Hindawi BioMed Research International* Volume 2020, Article ID 6910312, 11 pages. <https://doi.org/10.1155/2020/6910312>.

Vidyahayati, I. L., Dewi, A. H., Ana, I. K. 2016. Pengaruh Substitusi Tulang dengan Hidroksiapatit terhadap Proses Remodelling Tulang. *Media Medika Muda* Vol. 1(3): 157-164.

Wijaya, S., & Masulili, S. (2016). Beta defensin polipeptida antimikroba dalam hubungannya dengan periodontitis kronis dan agresif. *MKGK (Majalah Kedokteran Gigi Klinik) (Clinical Dental Journal) UGM*, 2(2), 106-113. doi:<https://doi.org/10.22146/mkgk.32006>

Wu, M., Guiqian, C., Li, Y P. 2016. TGF- β and BMP Signaling in Osteoblast, Skeletal Development, and Bone Formation, Homeostasis and Disease. Department of Pathology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, USA and 2Department of neurology, Bruke Medical Research Institute, Weil Cornell Medicine of Cornell University, White Plains, USA.

Wulansari, D. D. (2017). Pengaruh Pemberian Ekstrak Biji Pepaya (*Carica Papaya Linn.*) Terhadap Ekspresi Glucose Transporter 4 (Glut 4) pada Jaringan Otot Rangka Tikus Hiperglikemia (Doctoral dissertation, Universitas Airlangga).



Xiaoyu, S., Mao, Y., Dai, P., et al. 2017. Mitochondrial dysfunction is involved in the aggravation of periodontitis by diabetes. *Journal of Clinical Periodontology* Vol. 44 (5): 463-471.

Yazid, NS. M., Zulfikli, M. F., et al. 2019. Chlorogenic acid from banana and papaya peels inhibit lipid accumulation in 3T3-L1 cells. *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences* Vol. 15, No. 4 (2019) 561-56.

Yogiraj, V., Goyal, P. K., Chauhan, C. S., et al. 2014. Carica papaya Linn: An Overview. *International Journal of Herbal Medicine* 2014; 2 (5): 01-08.

Yosmar, R., Almasdy, D., Rahma, F. 2018. Survei Risiko Penyakit Diabetes Melitus Terhadap Masyarakat Kota Padang. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis* Vol. 5(2): 135-141.

Yucel and Bage-Linberg, T., Dan T. Bage, 2013. Inflammatory Mediators in The Pathogenesis of Periodontitis. *Experts Review in Molecular Medicine*. 15: 1-2 10.

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

Zaccardi, F., Webb, D. R., Yates, T. and Davies, M. J., 2015, Pathophysiology of Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus: a 90-year Perspective, *Postgrad. Med. J.*, 1-7.

Zhang, J., Yu, C. et al. 2018. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide induces cognitive dysfunction, mediated by neuronal inflammation via activation of the TLR4 signaling pathway in C57BL/6 mice. *Journal of Neuroinflammation* (2018) 15:37

Zunjar V, Mammen D, Trivedi BM. Antioxidant activities and phenolics profiling of different parts of Carica papaya by LCMS-MS. *Nat Prod Res* 2015;29:2097-9



LAMPIRAN**Lampiran 1. Pernyataan Keaslian Tulisan****PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Maria Elizabeth Indriyani Togu Ito

NIM : 175160107111003

Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dikatakan Tugas Akhir ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 29 Desember 2020

Yang Membuat Pernyataan



Maria Elizabeth Indriyani Togu Ito

175160107111003



Lampiran 2. Keterangan Kelayakan Etik



KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"

No: 1198-KEP-UB

KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:

PENELITIAN BERJUDUL : UJI KEMANFAATAN NANOLIPOSOM EKSTRAK BIJI
PEPAYA TERHADAP MODEL DIABETIK
PERIODONTITIS

PENELITI : KHUSNUL MUNIKA LISTARI

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 10 Desember 2019
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya

Prof.Dr.drh. Aulanni'am, DES.
NIP. 19600903 198802 2 001



Lampiran 3 Foto Penelitian



Penjemuran Biji Pepaya



Ekstrak Biji Pepaya



Nanoliposom Ekstrak Etanol Biji Pepaya
96%



Tikus putih (*Sprague dawley*)



Proses sonikasi dengan sonikator
Ultrasonic-e



Pembuatan Nanoliposom Ekstrak Etanol
Biji Pepaya 96%



Tikus Sprage Dawley



Adaptasi Hewan Coba



Glukometer Komersial



Syringe 1 ml



Strip DR



Alkohol 70%



STZ



Induksi DM menggunakan STZ dan Nikotinamid

Nikotinamid



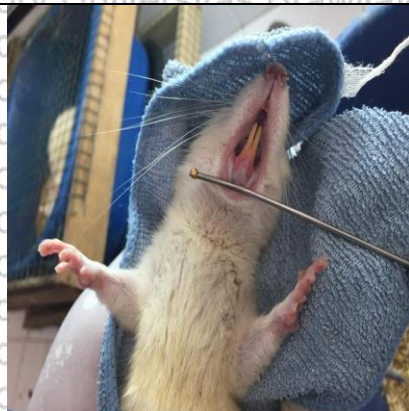
Induksi LPS *P.gingivalis* 5 μ g sebanyak 0,05 ml.



Pengikatan Silk Ligature Ukuran 3,0



Pemberian Obat Ekstrak Biji Pepaya dan Nanoliposom Ekstrak Biji Pepaya secara Peroral 0,5 ml dan Tetes 0,03 ml.



Pengecekan Sulkus Tikus Setelah Diberikan Obat



Dekaputasi Hewan Coba



Pemberian Bahan Dekalsifikasi



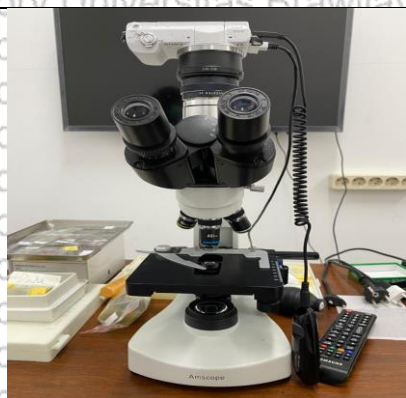
Fiksasi Tulang Mandibular Hewan Coba dengan Formalin 10%



Perendaman Sampel Dalam Larutan Dekalsifikasi



Slide Preparat Jaringan Menggunakan Pewarnaan *haematoxylin and eosin* (HE)



Pengamatan Sel Osteoblas Menggunakan Mikroskop Cahaya Olympus



Pengamatan Preparat dengan Mikroskop Cahaya Olympus dengan Perbesaran 400x

Lampiran 4. Kadar Gula Darah

Hari ke-3

Keterangan	GDP I	GDP II
KT	409	308
KT	312	328
KT	314	327
P1	352	215
P1	169	109
P1	290	196
P2	285	208
P2	334	162
P2	203	194

Hari ke-7

Keterangan	GDP I	GDP II
KT	176	223
KT	272	308
KT	225	203
P1	330	207
P1	299	198
P1	293	116
P2	325	244
P2	346	241
P2	263	203

Hari ke-14

Keterangan	GDP I	GDP II
KT	312	297
KT	326	290
KT	330	327
P1	194	180
P1	335	233
P1	352	238
P2	214	133
P2	285	130
P2	326	150

Lampiran 5. Hasil Perhitungan Sel Osteoklas

Hari ke-	LAPANG PANDANG					JUMLAH OSTEOKLAS	RATA - RATA	RATA-RATA KESELURUHAN
	1	2	3	4	5			
3	5	4	4	3	5	21	4,2	4,066666667
	4	6	7	3	4	24	4,8	
	3	4	2	3	4	16	3,2	
7	3	4	4	3	4	18	3,6	4,133333333
	6	4	4	3	4	21	4,2	
	4	3	5	7	4	23	4,6	
14	4	5	6	4	4	23	4,6	4,4
	5	5	5	4	3	22	4,4	
	3	5	5	4	4	21	4,2	

1. Kelompok Kontrol (K)

Hari ke-	LAPANG PANDANG					JUMLAH OSTEOKLAS	RATA-RATA	RATA-RATA KESELURUHAN
	1	2	3	4	5			
3	3	3	4	3	4	17	3,4	3,533333333
	4	5	4	3	3	19	3,8	
	3	4	4	3	3	17	3,4	
7	4	3	3	3	4	17	3,4	3,066666667
	3	4	3	2	2	14	2,8	
	4	2	2	4	3	15	3	
14	2	3	3	2	3	13	2,6	2,733333333
	3	2	3	2	5	15	3	
	2	2	3	2	4	13	2,6	

2. Kelompok Perlakuan 1 (P1)**3. Kelompok Perlakuan 2 (P2)**

Hari ke-	LAPANG PANDANG					JUMLAH OSTEOKLAS	RATA-RATA	RATA-RATA KESELURUHAN
	1	2	3	4	5			
3	2	4	2	3	3	14	2,8	2,866666667
	3	2	2	3	3	13	2,6	
	3	4	3	4	2	16	3,2	
7	2	3	3	2	1	11	2,2	2,666666667
	3	4	2	3	2	14	2,8	
	3	4	3	3	2	15	3	
14	2	1	2	4	1	10	2	2,266666667
	4	2	2	2	2	12	2,4	
	3	2	2	3	2	12	2,4	

Lampiran 6. Hasil Analisis Data Jumlah Osteoklas

Uji Normalitas

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
JumlahTS3	.218	9	.200*	.945	9	.633
JumlahTS7	.206	9	.200*	.948	9	.673
JumlahTS14	.261	9	.079	.845	9	.066

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

2. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Hari ke-3	2.433	2	6	.168
Hari ke-7	.373	2	6	.703
Hari ke-14	.235	2	6	.797

3. Statistik Deskriptif

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Hari ke-3	kontrol	3	20.3333	4.04145	2.33333	10.2938	30.3729	16.00	24.00
	p1	3	17.6667	1.15470	.66667	14.7982	20.5351	17.00	19.00
	p2	3	14.3333	1.52753	.88192	10.5388	18.1279	13.00	16.00
	Total	9	17.4444	3.43188	1.14396	14.8065	20.0824	13.00	24.00
Hari ke-7	kontrol	3	20.6667	2.51661	1.45297	14.4151	26.9183	18.00	23.00
	p1	3	15.3333	1.52753	.88192	11.5388	19.1279	14.00	17.00
	p2	3	13.3333	2.08167	1.20185	8.1622	18.5045	11.00	15.00
	Total	9	16.4444	3.74537	1.24846	13.5655	19.3234	11.00	23.00
Hari ke-14	kontrol	3	22.0000	1.00000	.57735	19.5159	24.4841	21.00	23.00
	p1	3	13.6667	1.15470	.66667	10.7982	16.5351	13.00	15.00
	p2	3	11.3333	1.15470	.66667	8.4649	14.2018	10.00	12.00
	Total	9	15.6667	4.94975	1.64992	11.8620	19.4714	10.00	23.00

4. Uji Anova

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Hari ke-3	Between Groups	54.222	2	27.111	4.067	.077
	Within Groups	40.000	6	6.667		
	Total	94.222	8			
Hari ke-7	Between Groups	86.222	2	43.111	9.949	.012
	Within Groups	26.000	6	4.333		
	Total	112.222	8			
Hari ke-14	Between Groups	188.667	2	94.333	77.182	.000
	Within Groups	7.333	6	1.222		
	Total	196.000	8			

5. Post Hoc LSD

Multiple Comparisons

	(I) Kelom-pok	(J) Kelom-pok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Hari ke-7	Kontrol	P1	5.33333*	1.69967	.046	.1183	10.5484
		P2	7.33333*	1.69967	.012	2.1183	12.5484
	P1	Kontrol	-5.33333*	1.69967	.046	-10.5484	-.1183
		P2	2.00000	1.69967	.507	-3.2151	7.2151
	P2	Kontrol	-7.33333*	1.69967	.012	-12.5484	-2.1183
		P1	-2.00000	1.69967	.507	-7.2151	3.2151
Hari ke-14	Kontrol	P1	8.33333*	.90267	.000	5.5637	11.1030
		P2	10.66667*	.90267	.000	7.8970	13.4363
	P1	Kontrol	-8.33333*	.90267	.000	-11.1030	-5.5637
		P2	2.33333	.90267	.092	-.4363	5.1030
	P2	Kontrol	-10.66667*	.90267	.000	-13.4363	-7.8970
		P1	-2.33333	.90267	.092	-5.1030	.4363

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.