

KK
KKA
TKD 28/11
Sar
P

TESIS

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BIJI JINTEN HITAM (*Nigella sativa*) TERHADAP JUMLAH SEL MAKROFAG, LIMFOSIT, DAN SEL PLASMA PADA JARINGAN IKAT GINGIVA MENCIT (*Mus Musculus*) YANG DIINDUKSI PERIODONTOPATOGEN

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

RIMA PARWATI SARI

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2007**

Tesis ini telah diuji dan dinilai oleh panitia penguji
Pada tanggal, 9 Agustus 2007

PANITIA PENGUJI

- Ketua : Dr. Hari Basuki Notobroto, dr., MKes.
- Anggota : 1. Dr. Endang Isbandiati, dr., MS., SpFK.
2. Ramadhani R.B., dr., MKes.
3. Hamzah, dr., Sp FK.
4. Erni Maduratna Setiawati, drg., MKes., Sp Perio.

LEMBAR PENGESAHAN

**TESIS INI TELAH DISETUJUI
PADA TANGGAL, 9 Agustus 2007**

Oleh

Pembimbing Ketua



Dr. Endang Isbandiati, dr., MS., SpFK.
NIP. 130 610 069

Pembimbing

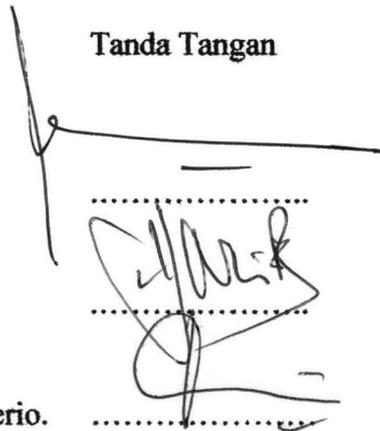


Ramadhani R.B., dr., MKes.
NIP. 131 588 569

PENGUJI

1. Hamzah, dr., Sp FK.
2. Dr. Hari Basuki Notobroto, dr., MKes.
3. Erni Maduratna Setiawati, drg., MKes., Sp Perio.

Tanda Tangan



UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah, segala puji hanya bagi Allah SWT yang telah menunjukkan jalan terbaik bagi hamba-Nya. Hanya atas kehendak-Nya pula maka penulis dapat menyelesaikan tesis ini. Untuk dapat memulai sesuatu pekerjaan memang terasa sulit apalagi sesuatu itu baru, begitu juga seperti yang penulis alami, namun kesulitan tersebut tidak dapat dijadikan alasan untuk menjadi putus asa dalam berusaha. Tanpa ada kesulitan mungkin tidak ada kemajuan karena kesulitan merupakan bagian dari proses menuju pada suatu kemajuan.

Dalam mengatasi berbagai kesulitan yang dihadapi penulis banyak mendapat bantuan dari berbagai pihak. Untuk itu pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Pemerintah Republik Indonesia cq Menteri Pendidikan Nasional melalui Tim Manajemen Program Magister yang telah memberikan bantuan finansial, sehingga meringankan beban saya dalam menyelesaikan tesis ini.

Seiring dengan selesainya tesis ini, perkenankan kami mengucapkan terima kasih yang tak terhingga dan penghargaan setinggi-tingginya kepada :

1. Rektor Universitas Hang Tuah Prof. Dr. Sapto J Poerwowidagdo, MSc. beserta staf yang telah memberikan kesempatan dan dukungan dana kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan program Magister ini.
2. Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah Bambang Suchahyo, drg., SpOrt. beserta staf yang telah banyak membantu saya dalam menyelesaikan studi di program Magister ini.
3. Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar Prof. Retno Handajani, dr, MS, Ph.D atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti program Magister ini.

4. Dr. Endang Isbandiati, dr., MS., SpFK., selaku ketua minat Ilmu Farmakologi dan juga Pembimbing Ketua yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah meluangkan waktu serta memberikan dorongan, bimbingan dan sarannya demi terselesainya tesis ini.
5. Ramadhani R.B., dr., MKes., selaku Pembimbing yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah meluangkan waktu serta memberikan dorongan, bimbingan dan sarannya demi terselesainya tesis ini.
6. Kepala Laboratorium Farmakologi Universitas Airlangga, Hamzah, dr., Sp FK., dan juga dosen penguji yang telah banyak memberikan masukan-masukan yang berharga untuk memperbaiki tesis ini.
7. Dr. Hari Basuki Notobroto, dr., MKes., selaku ketua penguji dan telah banyak membantu dan memberi masukan dalam bidang statistik dan penulisan.
8. Erni Maduratna Setiawati, drg., MKes., Sp Perio., selaku dosen penguji yang banyak memberikan ide, dan motivasi serta masukan-masukan yang sangat berharga bagi penulis untuk memperbaiki tesis ini
9. Seluruh staf pengajar dan karyawan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah membantu dengan tulus ikhlas memberikan ilmu dan berbagi pengalamannya selama studi serta saran-sarannya untuk memperbaiki tesis ini.
10. Teman-temanku tersayang Siti Maemonah, SKep., Ns., MKes., yang telah memberikan kritikan, bantuan dan motivasi yang selalu diberikan kepada penulis selama proses pembuatan hingga terselesainya tesis ini.
11. Sahabat-sahabatku di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah yang telah berbagi pengalaman dan juga memberikan dorongan semangat untuk menyelesaikan tesis ini.

12. M. N. Washol yang telah banyak membantu dan memberikan dorongan semangat untuk menyelesaikan tesis ini.

13. Semua pihak yang telah membantu tetapi tidak dapat disebutkan disini.

Penulis menyadari bahwa hasil penulisan tesis ini masih banyak kekurangan dan jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu saran dan masukan yang berharga sangat penulis harapkan, agar nantinya tulisan ini dapat bermanfaat bagi upaya pengembangan keilmuan dan kesehatan di Indonesia dan kesejahteraan umat pada umumnya.

Penulis

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BIJI JINTEN HITAM (*Nigella sativa*)
TERHADAP JUMLAH SEL MAKROFAG, LIMFOSIT, DAN SEL PLASMA
PADA JARINGAN IKAT GINGIVA MENCIT (*Mus Musculus*) YANG
DIINDUKSI PERIODONTOPATOGEN**

RINGKASAN

Periodontitis merupakan penyakit yang sering menyebabkan terjadinya inflamasi yang cukup hebat. Penyakit periodontal ini diawali dengan induksi kolonisasi bakteri pada permukaan gigi yang masuk melalui junctional epithelium dan jaringan ikat gingiva sehingga memicu respons imunoinflamasi.

Paradigma baru tentang patogenesis penyakit periodontal, mengungkapkan keterlibatan mediator lipid inflamasi dalam mengatur respons inflamasi. Mediator proinflamasi, seperti prostaglandin dan leucotrien perlu diimbangi dalam mengatur ulang penanda inflamasi oleh lipoxin (LX). Peran LX dalam mengontrol dan mengatur inflamasi banyak diperbincangkan sebagai suatu terobosan dalam mengatur strategi pengobatan baru untuk mengontrol dan mengatur keberadaan mediator inflamasi akibat masuknya antigen ke jaringan dalam penyakit inflamasi seperti periodontitis.

Nigella sativa atau yang lebih dikenal sebagai jinten hitam, mengandung *fixed oil*, *volatile oil*, protein, alkaloids, dan saponin. Kandungan aktifnya yang banyak mengandung *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) menunjukkan aktiivitas antiinflamasi.

Penelitian eksperimental laboratoris ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh ekstrak biji jinten hitam terhadap penurunan jumlah sel makrofag, limfosit dan sel plasma pada jaringan ikat gingiva mencit yang diinduksi periodontopatogen.

Penelitian yang dilakukan di Laboratorium Biokimia Universitas Airlangga Surabaya ini menggunakan 35 ekor mencit jantan, usia 7-8 minggu, berat badan 17-32

gram yang dibagi dalam 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 7 ekor mencit. K (-) adalah kelompok kontrol negatif dan K(+) adalah kelompok kontrol positif. P1 adalah kelompok yang diinduksi periodontopatogen dan ekstrak biji jinten hitam dosis 600 mg/kg BB selama 4 hari. P2 adalah kelompok yang diinduksi periodontopatogen dan ekstrak biji jinten hitam dosis 1200 mg/kg BB selama 4 hari.. P3 adalah kelompok yang diinduksi periodontopatogen dan ekstrak biji jinten hitam dosis 2400 mg/kg BB selama 4 hari. Sel makrofag, limfosit dan sel plasma dihitung pemeriksaan jaringan interdental gingiva yang diambil dari mencit perlakuan untuk dibuat sediaan histopatologi dengan pewarnaan HE (*haematoxylin eosin*)

Hasil penelitian menunjukkan bahwa induksi periodontopatogen pada kelompok K(+) dapat meningkatkan jumlah sel makrofag ($\bar{x}=60,00\pm 12,11$), limfosit ($\bar{x}=17,86\pm 4,10$) dan sel plasma ($\bar{x}=9,57\pm 2,15$), yang memicu reaksi inflamasi kronis dibanding kelompok K(-) ($\bar{x}=7,00\pm 4,43$; $4,57\pm 2,44$; $0,71\pm 0,76$), sedangkan pemberian ekstrak biji jinten hitam dapat menurunkan sel makrofag ($\chi P1=17,86\pm 9,67$; $\chi P2=19,29\pm 8,20$; $\chi P3=8,00\pm 7,12$), limfosit (P1= $6,57\pm 3,21$; P2= $6,00\pm 2,77$; P3= $4,57\pm 3,78$) dan sel plasma (P1= $4,00\pm 1,41$; P2= $3,00\pm 1,41$; P3= $1,00\pm 1,15$).

Berdasarkan hasil uji ANOVA didapatkan hasil bahwa pada masing-masing kelompok baik sel makrofag, limfosit dan sel plasma terdapat perbedaan secara bermakna ($p<0,05$). Namun pada hasil uji LSD ada perbedaan hasil dimana pada variable sel makrofag dan sel plasma perbedaan yang sangat bermakna ditunjukkan pada kelompok K(+) yang dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang lain ($p=0,000$). Sedangkan pada kelompok K (-) yang dibandingkan kelompok K (+), kelompok ekstrak jinten hitam dosis 1 (P1), dan kelompok ekstrak jinten hitam dosis 2 (P2) menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p<0,05$). Hasil yang menunjukkan perbedaan bermakna juga ditunjukkan pada kelompok P1 yang dibandingkan dengan

kelompok P3. Pada variabel limfosit tidak menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$) pada kelompok K(-) yang dibandingkan kelompok P1, kelompok P2 dan kelompok P3. Begitu pula pada perbandingan antar masing-masing kelompok pemberian ekstrak biji jinten hitam.

Hasil penelitian ini menyimpulkan bahwa pemberian ekstrak biji jinten hitam dapat menghambat proses inflamasi dengan menurunkan jumlah sel makrofag, limfosit dan sel plasma pada jaringan ikat gingiva mencit yang diinduksi periodontopatogen.

SUMMARY

THE INFLUENCE OF BLACK SEED (*Nigella sativa*) EXTRACT TO THE NUMBER OF MACROPHAGES, LYMPHOCYTES AND PLASMA CELLS IN CONNECTIVE TISSUE OF MICE (*Mus Musculus*) GINGIVAL INDUCED BY PERIDONTOPATHOGEN

Periodontitis is a disease that frequently cause the severe inflammation. Periodontal disease be started by induced of colonization of bacteria at teeth surface that come into through junctional epithelium and connection tissue of gingival so that trigger imunoinflammation respons.

The new paradigm about pathogenesis of periodontal disease, inform about influence mediator of lipid inflammation in arrange of inflammation respons. The mediator of proinflammation, as prostaglandines and leucotrienes is necessary to be balanced in rearrange sign of inflammation by lipoxin (LX). The role of LX in controlling and regulating of inflammation have been discussed as a resolution in arrange of strategy in new treatment to control for the release of inflammatory mediators at the site of injury to tissue in inflammation disease as periodontitis.

Nigella sativa or black cumin or black seed, contain *fixed oils, volatile oils, protein, alkaloids, and saponin*. The most constituents of the seeds that contained polyunsaturated fatty acid (PUFA) showed antiinflammation activity.

The aim of laboratory experiment research was improve influence of *Nigella sativa* to decrease of macrophages, lymphocyte and plasma cells amount in connective tissue of mice gingival that be induced by periodontopathogen.

This study was done at Biokimia Laboratory of Airlangga University in Surabaya, by used 35 male mice, the age are 7-8 weeks, body weight are 17-32 grams that divided into 5 groups, each group consist of 7 mice. K(-) is negative control

group and K(+) is positive control group. P1 is the group that be induced by periodontopathogen and extract of black seed in dosage of 600 mg/kg BW for 4 days. P2 is the group that be induced by periodontopathogen and extract of black seed in dosage of 1200 mg/kg BW for 4 days. P3 is the group that be induced by periodontopathogen and extract of black seed in dosage of 2400 mg/kg BW for 4 days. Macrophages, lymphocytes, and plasma cells be counted from interdental gingival connective tissue be made histopathology by Haemotoxyllin Eosin (HE) fixation.

The result was the induction of periodontopathogen in K(+)group could increased macrophages ($\chi = 60,00 \pm 12,11$), lymphocyte ($\chi = 17,86 \pm 4,10$) K(-), plasma cells ($\chi = 9,57 \pm 2,15$), that trigger chronic inflammation reaction be compared by K(-) group ($\chi = 7,00 \pm 4,43$; $4,57 \pm 2,44$; $0,71 \pm 0,76$), beside that extract of black seed extract could decreased macrophages ($\chi P1 = 17,86 \pm 9,67$; $\chi P2 = 19,29 \pm 8,20$; $\chi P3 = 8,00 \pm 7,12$), and could decreased lymphocytes ($\chi P1 = 6,57 \pm 3,21$; $\chi P2 = 6,00 \pm 2,77$; $\chi P3 = 4,57 \pm 3,78$), and also plasma cells ($\chi P1 = 4,00 \pm 1,41$; $\chi P2 = 3,00 \pm 1,41$; $\chi P3 = 1,00 \pm 1,15$).

Based on ANOVA test got result at each group for macrophage, lymphocyte, and plasma cells there are different significantly ($p < 0,05$). But in LSD test there are different result where macrophage and plasma cells variables had different significantly be pointed at K(+) group that be compared by another groups ($p = 0,000$). Beside that for K(-) group be compared by K(+), P1, P2 groups had different significantly ($p < 0,05$). The result has different significantly in P1 group that be compared P3 group. At lymphocyte variable there is no different significantly ($p > 0,05$) in K(-) group be compared by P1, P2, P3 groups. And also at comparison among treatment groups.

The result of this study concluded that *Nigella sativa* seed could inhibited inflammation process by decrease macrophages, lymphocyt, and plasma cells amount in connective tissue of mice gingival by induced periodontopathogen.

ABSTRACT

THE INFLUENCE OF BLACK SEED (*Nigella sativa*) EXTRACT TO THE NUMBER OF MACROPHAGES, LYMPHOCYTES AND PLASMA CELLS IN CONNECTIVE TISSUE OF MICE (*Mus Musculus*) GINGIVAL INDUCED BY PERIDONTOPATHOGEN

Rima Parwati Sari

Background : Periodontitis is a disease that cause the inflammation that be started by induction of bacteria colonization at teeth surface frequently. The bacteria came into the teeth through junctional epithelium and connective tissue of gingival, so, triggered the imunoinflamation respons. **Objectives :** The aim of this study was improvement the influence of black seed extract to decreased the number of macrophages, lymphocytes and plasma cells. **Material and method :** This experimental study was held in laboratory with Completely Randomized Design. Thirty five (35) mice were divided into 5 groups. K (-) group as negative control group (without treatment), K (+) group as positive control group (only periodontopathogen-induced), P1 group (periodontopathogen-induced and *Nigella sativa* extract dose 600 mg/kg bodyweight for 4 days), P2 group (periodontopathogen-induced and *Nigella sativa* extract dose 1200 mg/kg bodyweight for 4 days), P3 group (periodontopathogen-induced and *Nigella sativa* extract dose 2400 mg/kg bodyweight for 4 days). Macrophages, lymphocytes, and plasma cells be counted from interdental gingival connective tissue be made histopathology by Haemotoxyllin Eosin (HE) fixation. **Result :** All of datas in this study that have been analyzed by ANOVA and LSD test showed that macrophage, limphosite and plasma cell were significantly higher in K (+) group than in K (-) group. Macrophage, limphosite and plasma cell were significantly lower in P1, P2 and P3 group than in K (+) group. **Conclusion:** *Nigella sativa* ekstrak could decreased the number of macrophages, lymphocytes and plasma cells in connective tissue of mice gingival induced by periodontopathogen.

Keywords : black seed, macrophages, lymphocytes, plasma cells, periodontopathogen

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan.....	i
Sampul Dalam.....	ii
Prasyarat Gelar.....	iii
Persetujuan.....	iv
Penetapan Panitia.....	v
Ucapan Terima Kasih.....	vi
Ringkasan	x
Summary	xiii
Abstract	xvi
Daftar Isi.....	xvii
Daftar Tabel.....	xix
Daftar Gambar.....	xx
Daftar Lampiran	xxii
Daftar Singkatan dan Istilah.....	xxiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	7
1.3. Tujuan Penelitian	7
1.3.1. Tujuan Umum	7
1.3.2. Tujuan Khusus	7
1.4. Manfaat Penelitian	8
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1. Jaringan Periodontal	9
2.1.1. Gingiva.....	9
2.1.2. Struktur penyangga gigi	11
2.2. Penyakit periodontal	13
2.3. Periodontopatogen.....	14
2.4. Patogenesis periodontitis.....	16
2.4.1. Toksin periodontopatogen.....	16
2.4.2. Respon imun pada penyakit periodontal.....	17
2.4.3. Peran mediator lipid dalam penyakit periodontal.....	19
2.5. Inflamasi kronik.....	22
2.6. Sel mononuklear.....	24
2.6.1. Sel makrofag.....	24
2.6.2. Limfosit.....	26
2.6.3. Sel plasma.....	28
2.7. Antiinflamasi untuk terapi periodontitis.....	30
2.7.1. Mekanisme antiinflamasi	30
2.7.2. Pentingnya antiinflamasi untuk terapi periodontitis	34
2.8. Jinten hitam (<i>Nigella sativa</i>).....	35
2.8.1. Taksonomi.....	36
2.8.2. Morfologi.....	36
2.8.3. Kandungan	38
2.8.4. Penelitian tentang aktivitas antiinflamasi dan respon imun jinten hitam.....	38
2.8.5. Dosis biji jinten hitam.....	41

BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	42
3.1. Dasar Teori.....	42
3.2. Kerangka Konseptual Penelitian.....	45
3.3. Hipotesis Penelitian.....	46
BAB IV METODE PENELITIAN	47
4.1. Rancangan Penelitian	47
4.2. Unit eksperimen dan replikasi.....	48
4.2.1. Unit eksperimen	48
4.2.2. Replikasi	48
4.3. Variabel Penelitian.....	49
4.3.1. Klasifikasi variabel	49
4.3.2. Definisi operasional variabel	49
4.4. Bahan Penelitian.....	50
4.4.1. Hewan coba	50
4.4.2. Makanan dan minuman hewan coba	50
4.4.3 Bahan untuk perlakuan	51
4.4.4. Unit analisis	51
4.5. Instrumen Penelitian.....	51
4.6. Lokasi dan Waktu Penelitian	52
4.7. Prosedur Penelitian	53
4.7.1. Penelitian pendahuluan untuk menentukan dosis ekstrak biji jinten hitam	53
4.7.2. Prosedur pelaksanaan penelitian	53
4.8. Analisis Data.....	55
4.9. Alur Penelitian	56
BAB 5 HASIL PENELITIAN	57
5.1. Hasil Uji Statistik Deskriptif.....	57
5.2. Hasil Uji Normalitas.....	58
5.3. Hasil Uji Homogenitas.....	58
5.4. Jumlah Sel Makrofag.....	59
5.7. Jumlah Limfosit.....	62
5.8. Jumlah Sel Plasma.....	63
BAB 6 PEMBAHASAN	66
6.1. Pemeriksaan Sel Makrofag.....	66
6.2. Pemeriksaan Limfosit.....	69
6.3. Pemeriksaan Sel Plasma.....	70
BAB 7 SIMPULAN DAN SARAN	72
7.1. Simpulan.....	72
7.2. Saran.....	72
DAFTAR PUSTAKA.....	73

DAFTAR TABEL

		Halaman
Tabel 2.1.	Spesies bakteri yang terdapat pada periodontitis kronis	16
Tabel 2.2.	Perbandingan gambaran inflamasi akut dan kronik	23
Tabel 2.3.	Kandungan dan komponen aktif ekstrak biji jinten hitam	39
Tabel 5.1.	Rata-rata dan simpangan baku (standart deviasi) jumlah sel makrofag, limfosit dan sel plasma	57
Tabel 5.2.	Hasil uji normalitas distribusi (uUji <i>Kolmogorov-Smirnov</i>)	58
Tabel 5.3.	Hasil uji homogenitas (uji <i>Levene</i>)	59
Tabel 5.4.	Hasil uji ANOVA sel makrofag	60
Tabel 5.5.	Hasil Uji LSD sel makrofag	60
Tabel 5.6.	Hasil uji ANOVA limfosit	62
Tabel 5.7.	Hasil Uji LSD limfosit	63
Tabel 5.8.	Hasil uji ANOVA sel plasma	64
Tabel 5.9.	Hasil Uji LSD sel plasma	65

DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar 2.1.	Gambaran klinis gingival sehat	10
Gambar 2.2.	Epitel gingival manusia	10
Gambar 2.3.	Struktur penyangga gigi	12
Gambar 2.4.	Pemacuan sel mast	17
Gambar 2.5.	Mekanisme respon imun patogenesis kelainan periodontal	18
Gambar 2.6.	Respon pertahanan tubuh	19
Gambar 2.7.	Metabolisme asam arachidonat	22
Gambar 2.8.	Grafik rangkaian kejadian dalam inflamasi	23
Gambar 2.9.	Sel makrofag	24
Gambar 2.10.	Proses ingesti pada makrofag	26
Gambar 2.11.	Limfosit	27
Gambar 2.12.	Seleksi Klon	28
Gambar 2.13.	Sel plasma	29
Gambar 2.14.	Inflamasi : mediator kimia endogen	30
Gambar 2.15.	Biosintesa prostanoid	31
Gambar 2.16.	Mekanisme OAINS dan <i>selective COX-2 inhibitor</i>	32
Gambar 2.17.	Peran lipid mediator dalam inflamasi	33
Gambar 2.18.	Tanaman jinten hitam	37
Gambar 2.19.	Bunga jinten hitam	37
Gambar 2.20.	Biji jinten hitam	38
Gambar 3.1.	Kerangka konseptual	45
Gambar 5.1.	Grafik rata-rata jumlah sel makrofag sel limfosit dan sel plasma menurut kelompok perlakuan	58

	Halaman
Gambar 5.2.	Grafik rata-rata jumlah sel makrofag menurut kelompok 59
Gambar 5.3.	Daya ingesti sel makrofag pada kelompok kontrol positif 61
Gambar 5.4.	Daya ingesti sel makrofag pada kelompok pemberian ekstrak biji jinten hitam 61
Gambar 5.5.	Grafik rata-rata jumlah limfosit menurut kelompok 62
Gambar 5.6.	Grafik rata-rata jumlah sel plasma menurut kelompok 64

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman	
Lampiran 1	Penentuan jumlah replikasi	79
Lampiran 2	Cara pembuatan ekstraksi biji jinten hitam metode sohlet	80
Lampiran 3	Penentuan dosis ekstrak biji jinten hitam pada mencit	82
Lampiran 4	Pemilihan penderita periodontitis	87
Lampiran 5	Penjelasan informasi penelitian	88
Lampiran 6	Inokulasi bakteri periodontopatogen	89
Lampiran 7	Data berat badan mencit sebelum dilakukan perlakuan	91
Lampiran 8	Tahapan pembuatan sediaan histologi	92
Lampiran 9	Cara penghitungan sel makrofag, limfosit, dan sel plasma dalam satu lapang pandang pada gambaran histopatologi	95
Lampiran 10	Hasil penghitungan unit analisis	96
Lampiran 11	Pengolahan Data (Statistik)	99

DAFTAR SINGKATAN DAN ISTILAH

AG	: <i>attached gingival</i>
APC	: <i>antigen presenting cell</i>
ATLs	: <i>aspirin-triggered 15-epi-lipoxins</i>
cAMP	: <i>cyclic adenosine monophosphat</i>
C	: <i>complement</i>
CEJ	: <i>cemento enamel junction</i>
CO	: <i>carbon monoxide</i>
COX	: <i>cyclooxygenase</i>
COX-1	: <i>cyclooxygenase-2</i>
COX-2	: <i>cyclooxygenase-2</i>
ELISA	: <i>enzyme-linked immunosorbant assay</i>
FGM	: <i>free gingival margin</i>
HE	: <i>haematoxylin eosin</i>
5-HETE	: <i>5-hydroxy eicosa-tetraenoic acid</i>
HPA	: <i>histopatologi</i>
IG	: <i>interdental gingival</i>
IP	: <i>interdental papilla</i>
IL-1	: <i>interleukin-1</i>
LTB ₄	: <i>leucotriene B₄</i>
LX	: <i>lipoxin</i>
LXA ₄	: <i>lipoxin A₄</i>
LXB ₄	: <i>lipoxin B₄</i>
PMN	: <i>polymorphonuclear</i>
LO	: <i>lipoxygenase</i>
5-LO	: <i>5-lipoxygenase</i>
12-LO	: <i>12-lipoxygenase</i>
15-LO	: <i>15-lipoxygenase</i>
LT	: <i>leucotrienes</i>
MDA	: <i>malondyaldehyde</i>
NK cells	: <i>natural killer cells</i>
NO	: <i>nitric oxide</i>
OAINS	: <i>obat antiinflamasi non steroid</i>
PAF	: <i>platelet activating factor</i>
PBMC	: <i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PG	: <i>prostaglandine</i>
PGE ₂	: <i>prostaglandine E₂</i>
PGG ₂	: <i>prostaglandine G₂</i>
PGH ₂	: <i>prostaglandine H₂</i>
PGI ₂	: <i>prostacyclin</i>
PUFA	: <i>polyunsaturated fatty acid</i>
ROS	: <i>reactive oxygen species</i>
TXB ₂	: <i>thromboxan B₂</i>
TNF- α	: <i>tumor necrosis factor alpha</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

1. 1. Latar Belakang

Penyakit periodontal merupakan penyakit yang sering menyebabkan terjadinya inflamasi yang cukup hebat. Bentuk penyakit periodontal yang ringan adalah gingivitis yang ditandai dengan adanya warna kemerahan, pembengkakan dan cenderung terjadinya perdarahan pada gingiva, sedangkan periodontitis merupakan suatu bentuk penyakit periodontal yang merusak dan lebih hebat (Amar *and* Han, 2003). Penyakit periodontal ini diawali dengan induksi kolonisasi bakteri pada permukaan gigi yang masuk melalui *junctional epithelium* dan jaringan ikat gingiva sehingga memicu respons imunoinflamasi (Delima *et al*, 2002). Pada populasi orang dewasa bentuk penyakit periodontal yang banyak sekali ditemukan adalah periodontitis kronis yang ditandai dengan kehilangan perlekatan jaringan pada gigi (Newman *et al*, 2002).

Banyak sekali mikroorganisma yang berpotensi menimbulkan penyakit periodontal terlebih pada kasus periodontitis ditemukan bakteri pathogen yang lebih kompleks. Mikroorganisme yang terdiri dari plak subgingiva mampu secara langsung mempengaruhi jaringan periodontal dan juga tergantung dari mekanisme respons tubuh pasien. Bagaimanapun peran serta plak sangat penting seperti halnya aktivitas bakteri itu sendiri dalam menentukan tingkat keparahan penyakit periodontal. Periodontopatogen yang berperan adalah *Actinobacillus. actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Bacteroides forsythensis* (Amar *and* Han, 2003 ; Liébana *et al*, 2004).

Periodontopatogen merupakan bakteri gram negative yang mengeluarkan toksin atau lipopolisakarida yang memicu reaksi pertahanan tubuh terhadap benda

asing yang masuk (antigen) (Roitt, 2003). Bakteri periodontopatogen mestimulasi aktivitas komplemen melalui jalur *C3* dan *C5* yang menghasilkan fragmen *C3a* dan *C5a* (Roeslan, 2002). Fragmen-fragmen kecil ini mempunyai aktivitas anafilatoksin yang mampu memicu zat-zat perantara keluar dari sel mast, sehingga dapat mengakibatkan atraksi kemotaktik *Polymorphonuclear* (PMN) leukosit (neutrofil) yang memfagositosis antigen bakteri (Roitt, 2003 ; Roeslan, 2002). Ada dua jalur utama, yaitu pelepasan mediator bentuk jadi yang ada dalam granula dan metabolisme asam arachidonat yang dihasilkan melalui aktivasi fosfolipase. Kedua jalur ini dipicu oleh mekanisme Ca^{2+} intrasel dan *cyclic adenosin monophosphat (cAMP)* (Roitt, 2002). Mekanisme biokimia dan mediator molekuler yang bertanggung jawab untuk mengatur respon inflamasi dalam periodontitis terfokus pada mediator lipid dalam inflamasi (Van Dyke and Serhan, 2003).

Mediator yang dilepas dari dalam granula mengerahkan neutrofil dan komponen komplemen plasma ke tempat invasi mikroba, sehingga dapat menambah edema dan meningkatkan aliran cairan celah gusi. Efek ini diperpanjang oleh *leucotriene B₄ (LTB₄)* yang dihasilkan dari jalur *lipoxigenase (LO)*. *LT* ini berperan dalam kemotaksis, pelepasan enzim, pembangkitan superoksida pada *PMN*, dapat mempertinggi produksi *interleukin-1 (IL-1)* pada monosit dan meningkatkan produksi sitokin proinflammatory dari makrofag dan limfosit (Martel-Pelletier *et al*, 2003 ; Rola, 1985 cit Arundina, 2002).

Produk lain yang dihasilkan dalam metabolisme asam arachidonat yang terlibat dalam proses inflamasi adalah *prostaglandine E₂ (PGE₂)* yang dihasilkan dari jalur *cyclooxygenase (COX)*. Aktivasi sel inflamasi menyebabkan pelepasan lokal asam arachidonat dari membran plasma sel. Aktivitas ini dikatalisis oleh fosfolipase A₂. Keradangan jaringan periodontal menyebabkan suatu peninggian substansi

arachidonat bebas. Arachidonat bebas ini dimetabolisme secara oksidatif oleh sel mononuklear (makrofag) melalui jalur *COX* yang menghasilkan *PGE₂*. Makrofag memproduksi serta melepas *PGE₂* dan *IL-1* yang akan merangsang pembentukan *osteoclast*. Selain itu produk *IL-1* dapat menginduksi pelepasan *PGE₂* dari fibroblas gingiva (Miyasaki, 2006; Arundina, 2002). Mediator proinflamasi seperti prostaglandin dan leukotriene adalah mediator-mediator yang mengatur keseimbangan dalam suatu proses inflamasi yang dihasilkan oleh suatu kelompok molekul yang bernama lipoxin (LX) (Kantarci and Van Dyke, 2003).

Respons imun lokal terjadi di daerah celah gusi yang berusaha mengeliminasi antigen yang dihadapi melalui mekanisme limfosit T yang dapat memproduksi limfokin karena sudah disensitisasi antigen dan mediator ini akan mengaktivasi, menarik dan menghambat migrasi makrofag. Hal ini juga terjadi sebagai akibat limfokin yang disekresi oleh limfosit B yang juga tersensitisasi antigen. Lesi yang menetap dikarakterisasi dengan infiltrasi sel plasma secara lokal dan limfosit di dalam darah perifer dapat distimulasi untuk berproliferasi oleh antigen plak. Selanjutnya terjadi mekanisme respons seluler dan humoral untuk menghancurkan antigen dengan efek samping kerusakan jaringan (Roeslan, 2002).

Obat antiinflamasi non steroid (OAINS) merupakan obat yang umum digunakan untuk mengobati nyeri. Obat ini menghambat proses inflamasi dengan menghambat jalur *COX*, seperti *PGE₂*, *tromboxan B₂* (*TXB₂*) dan *prostacyclin* (*PGI₂*). Terbukti pada pemberian sistemik asam asetilsalisilat (aspirin) 500 mg per hari selama 6 minggu setelah pembersihan mekanik dilaporkan adanya perawatan periodontal tambahan yang efektif (Paquette and Williams, 2000). Selain itu beberapa penelitian membuktikan bahwa penghambatan aktivitas siklooksigenase oleh aspirin dan OAINS seperti indomethacin dapat menurunkan resorpsi tulang alveol sampai

28%. OAINS lain seperti ibuprofen, piroxicam, asam meklofenamat dalam bentuk topikal dan naproxen dalam pemberian per oral menunjukkan suatu hambatan resorpsi tulang alveol dan mengurangi perdarahan gingiva (Miyasaki, 2006). Obat-obat tersebut memang mudah didapat dan menunjukkan keefektifan dalam banyak kondisi klinis, walaupun masih menjadi suatu kontroversi dalam berbagai literatur klinik tentang keamanan dan efek samping penghambat jalur cyclooxygenase-2 (*COX-2*) dalam sistem gastrointestinal dan kardiovaskular (Kantarci and Van Dyke, 2005).

Saat ini banyak obat antiinflamasi yang digunakan secara klinis masih memiliki efek samping yang tidak diinginkan. Pendekatan untuk membuat satu 'super-inhibitor' atau antagonis yang menghambat inflamasi, belum menghasilkan resolusi yang utuh. Hal ini menunjukkan adanya kendala dalam proses penghambatan inflamasi dan diduga adanya kejanggalan. Ada dua alasan kejanggalan tersebut. Pertama, ditemukannya mediator proinflamasi dalam jumlah sangat banyak dan tidak ada sumber produsen yang jelas dalam menghasilkan mediator tersebut. Kedua, bahan anti-inflamatori saat ini, penghambat *cyclooxygenase-1 (COX-1)* dan *COX-2*, *glukocorticoid* dan prostaglandin sendiri serta enzim yang diturunkannya tidak dapat mengatur proses inflamasi dan bahkan memperpanjang proses inflamasi. Akhirnya dapat terlihat bahwa ada wacana hubungan antara respons tubuh dan mediator lipid lipoxin (LX) yang mengaktifkan mekanisme pertahanan antimikroba dalam sel epitel (Levy et al, 2003 ; Kantarci and Van Dyke, 2005).

Sesungguhnya pada beberapa penyakit terutama yang kronis, keterlibatan suatu proses autoimun juga mempengaruhi. Hal serupa juga ditemukan pada penyakit periodontitis kronis. Banyak penelitian yang memfokuskan pada penghambatan jalur lipoxigenase yang penting dalam sintesa leucotriene. Enzim kunci yang penting dalam hal ini adalah *5-lipoxigenase (5-LO)*. *5-LO* bertanggung jawab pada perubahan

permeabilitas pembuluh darah selama terjadinya inflamasi akut dan berperan dalam OAINS yang menginduksi kerusakan saluran cerna. Hal yang penting karena penghambatan *COX* bisa mendorong suatu metabolisme asam arakhidonat ke dalam jalur *5-LO*, sehingga pengobatan dengan OAINS bisa meningkatkan pembentukan leucotrien yang dapat menginduksi kerusakan dan ulserasi saluran pencernaan (Dharmananda, 2003 ; Martel-Pelletier *et al*, 2003).

Paradigma baru tentang patogenesis penyakit periodontal, mengungkapkan keterlibatan mediator lipid inflamasi dalam mengatur respons inflamasi. Mediator proinflamasi, seperti prostaglandin dan leucotrien perlu diimbangi dalam mengatur ulang penanda inflamasi oleh LX. Peran LX dalam mengontrol dan resolusi inflamasi banyak didiskusikan sebagai suatu terobosan dalam mengatur strategi pengobatan baru untuk mengontrol dan mencegah neutrofil akibat masuknya antigen ke jaringan dalam penyakit inflamasi seperti periodontitis (Van Dyke *and* Serhan, 2003).

Lipoxin adalah eicosanoid yang mengandung *trihydroxytetraene* yang ditemukan secara *in vivo* pada manusia selama respons multiseluler, seperti inflamasi kronis. Cabang mekanisme *eicosanoid* ini menghasilkan produk yang mengandung tetraene khusus yang bertugas sebagai 'tanda berhenti' untuk neutrofil yang mengatur tahapan kunci dalam pengaturan leukosit dan mencegah timbulnya neutrofil akibat masuknya zat asing (Kantarci *and* Van Dyke, 2003). LX dapat dibentuk dari sumber endogen asam arachidonat dari bermacam-macam spesies, dari ikan sampai manusia, secara *in vivo*. Selain jalur asam arachidonat langsung, aksi biologi LX didapatkan melalui beberapa jalur lain, seperti aspirin-triggered *15-epi-lipoxins (ATLs)* dan *polyunsaturated fatty acid (PUFA)* yang dapat diubah menjadi asam arachidonat. Dua kelompok utama asam lemak tersebut adalah omega-6 dan omega-3 yang mempunyai potensi terapeutik dalam pengaturan inflamasi dan penyakit kronik (Kantarci *and* Van

Dyke, 2005 ; Dharmananda, 2003). Pernyataan tersebut di depan mengungkapkan ada pendekatan lain terhadap pengobatan penyakit kronis untuk dapat menurunkan inflamasi dan meminimalisir gejala yang ditimbulkan oleh penyakit tersebut. Perlu kiranya memahami proses yang terjadi dalam mekanisme inflamasi agar dapat memaksimalkan efek antiinflamasi dan diperoleh toksisitas yang rendah (Dharmananda, 2003). Deregulasi inflamasi melalui modulasi berbagai tanaman terus diupayakan. Hal ini disebabkan banyak fitomedicine yang tersedia dan menunjukkan aktivitas dalam menghambat *COX-2* dan *5-LO* (Wallace, 2002).

Nigella sativa atau yang lebih dikenal sebagai jinten hitam digunakan sebagai obat tradisional di seluruh penjuru dunia untuk pengobatan dan pencegahan sejumlah penyakit dalam kondisi akut sebaik kondisi kronisnya, seperti asma, rematik, sakit kepala, demam, and influenza (Gilani *et al*, 2004 ; Randhawa and Al-Ghamdi, 2002). Biji jinten hitam mengandung *fixed* dan *volatile oils*, protein, alkaloids, dan saponin. Aktivitas biologis banyak ditunjukkan dengan keberadaan *fixed oil* dan *thymoquinone* yang merupakan komponen terbesar minyak essensialnya (Ali and Blunden, 2003).

Ekstrak air *Nigella sativa* dilaporkan mempunyai aktivitas antiinflamasi, analgesik dan antipiretik pada hewan coba. Hal ini terbukti dengan efek penghambatannya pada odema telapak kaki yang diinduksi *carragenan* (Al-Ghamdi, 2001). Selain itu juga *fixed oil* kasarnya menghambat kedua jalur *COX* dan *5-LO* dalam metabolisme asam arakhidonat pada leukosit peritoneal tikus yang distimulasi oleh *calcium ionophore A23187*, yang ditunjukkan dengan adanya penghambatan *TXB₂* dan *LTB₄* (Houghton *et al*, 1995).

Dari penelitian tersebut timbul ketertarikan untuk meneliti tentang pemberian ekstrak biji Jinten hitam terhadap penurunan jumlah sel mononuklear pada mencit yang diinduksi periodontopatogen. Oleh karena itu pada penelitian ini dilakukan

penghitungan sel makrofag, limfosit dan sel plasma pada jaringan ikat gingiva melalui gambaran histopatologi (HPA) pada mencit yang diinduksi periodontopatogen.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang permasalahan di atas, maka dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

Apakah pemberian ekstrak biji Jinten hitam dapat menurunkan jumlah sel makrofag, limfosit dan sel plasma pada jaringan ikat gingiva mencit yang diinduksi periodontopatogen?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Membuktikan pengaruh ekstrak biji jinten hitam terhadap penurunan jumlah sel makrofag, limfosit dan sel plasma pada jaringan ikat gingiva mencit yang diinduksi periodontopatogen

1.3.2. Tujuan Khusus

Dari tujuan umum tersebut dapat dirinci menjadi beberapa tujuan khusus, yaitu:

1. Membuktikan bahwa pemberian ekstrak biji jinten hitam dapat menurunkan jumlah sel makrofag pada jaringan ikat gingiva mencit yang diinduksi periodontopatogen.
2. Membuktikan pengaruh pemberian ekstrak biji jinten hitam terhadap penurunan limfosit pada jaringan ikat gingiva mencit yang diinduksi periodontopatogen.

3. Membuktikan pengaruh pemberian ekstrak biji jinten hitam terhadap penurunan sel plasma pada jaringan ikat gingiva mencit yang diinduksi periodontopatogen.

1.4. Manfaat Penelitian

1. Menambah khazanah ilmu pengetahuan kedokteran khususnya tentang obat-obatan.
2. Menjadi dasar ilmiah pengembangan jinten hitam menjadi pengobatan alternatif antiinflamasi pada penyakit periodontitis
3. Menjadi dasar ilmiah pengembangan pengobatan dengan menggunakan bahan-bahan alamiah.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Jaringan Periodontal

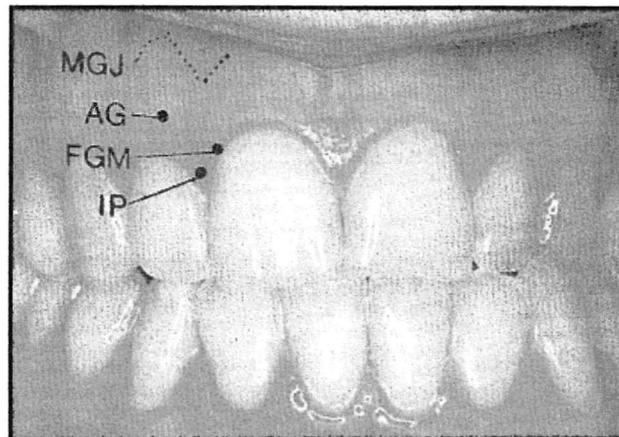
Jaringan periodontal atau periodonsium terdiri dari 4 jaringan yang berbeda, yaitu gingiva, ligamen periodontal, sementum dan tulang alveol. Jaringan-jaringan tersebut merupakan jaringan yang menyangga gigi agar dapat bertahan dengan baik di dalam soketnya dan melindungi akar gigi dan struktur yang berdekatan dengan lingkungan eksternal yang dapat membahayakan kerusakan periodonsium atau kegoyangan gigi (Bartold *and* Narayanan, 1998).

Periodonsium dibagi menjadi 2 bagian, yaitu gingiva, yang mempunyai fungsi utama melindungi jaringan di bawahnya, dan bagian penyangga yang terdiri dari ligamen periodontal, sementum dan tulang alveol (Newman *et al*, 2002). Masing-masing komponen periodontal mempunyai komposisi biokimia dan arsitektur jaringan ikat yang berbeda namun berfungsi sebagai suatu unit yang terintegrasi. Unsur biokimia pada satu komponen periodontal dapat mempengaruhi aktivitas seluler struktur yang lain. Fungsi terbesar periodonsium adalah menyangga gigi dan secara tidak langsung berpengaruh pada kekuatan pengunyahan (Schluger *et al*, 1990).

2.1.1. Gingiva

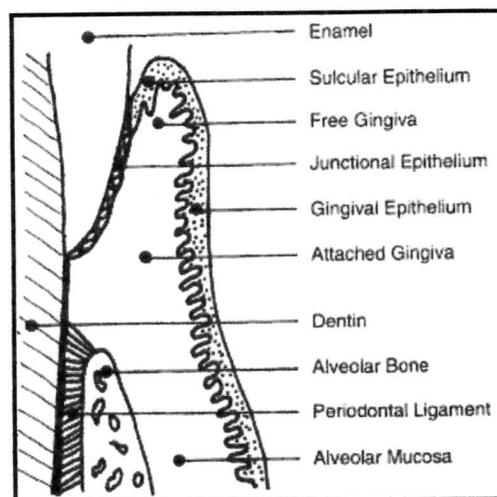
Gingiva adalah mukosa rongga mulut yang mengelilingi servikal gigi dan pada kondisi normal menutup permukaan akar gigi dan tulang alveol. Jaringan gingiva berdasarkan lokasi anatominya disubklasifikasikan menjadi *free gingival margin (FGM)*, *interdental gingiva (IG)* atau *interdental papilla (IP)* dan *attached gingiva (AG)*, gambar 2.1. Semua struktur ini terdiri dari suatu epitel yang melapisi jaringan ikat yang lebih dalam lagi pada *lamina propria* sampai daerah yang tulang alveol. Kedua jaringan tersebut mempunyai struktur matriks ekstraseluler, tetapi dengan

fungsi dan struktur yang sangat berbeda (Schluger *et al*, 1990 ; Bartold *and* Narayanan, 1998).



Gambar 2.1. Gambaran klinis gingiva sehat.
(Bartold *and* Narayanan, 1998)

Epitel gingiva tepatnya bukan suatu jaringan ikat, tapi berhubungan dengan jaringan ikat yang terletak di bawahnya dan merupakan suatu komponen periodontal yang esensial dan berperan penting dalam mekanisme pertahanan tubuh melawan serangan bakteri pada jaringan periodontal. Epitel mempunyai bentuk yang bervariasi pada lokasi yang berbeda, bentuk ini dapat dikenal oleh tanda yang berlainan. Epitel ini dikenal sebagai *junctional epithelium*, *sulcular epithelium* dan *gingival epithelium* (Bartold *and* Narayanan, 1998), gambar 2.2.



Gambar 2.2. Epitel gingiva manusia
(Bartold *and* Narayanan, 1998)

Di antara komponen epitel tersebut, *junctional epithelium* dianggap sebagai struktur gingiva yang paling menarik karena terletak antara jaringan ikat periodonsium yang lunak dan termineralisasi seperti gingiva, ligamen periodontal, tulang alveol dan sementum yang berperan penting dalam homeostasis jaringan dan mekanisme pertahanan melawan mikroorganisme dan toksinnya. *Junctional epithelium* mensintesis berbagai molekul yang memperantarai migrasi *PMN* leukosit menuju sulcus gingiva (Bosshardt *and* Lang, 2005).

Di bawah gingiva epitel adalah *lamina propria* gingiva, yaitu jaringan ikat gingiva. Gingiva melekat pada permukaan gigi dan tulang alveol melalui perlekatan *fibrous* jaringan ikat yang didominasi oleh fibroblast. Selain itu juga sel-sel yang terdapat pada jaringan ikat gingiva sebagian besar berasal dari pembuluh darah dan darah itu sendiri. Sel-sel ini adalah sel endotel, *PMN* leukosit, makrofag, limfosit, sel plasma dan sel mast. Pada jaringan ikat gingiva, sel inflamasi ini tetap ada dalam jumlah yang relatif sedikit. Sel-sel tersebut meningkat jumlahnya selama proses inflamasi masing-masing mempunyai jumlah yang berbeda tergantung dari tingkat keparahannya (Schluger *et al*, 1990 ; Bartold *and* Narayanan, 1998).

2.1.2. Struktur penyangga gigi

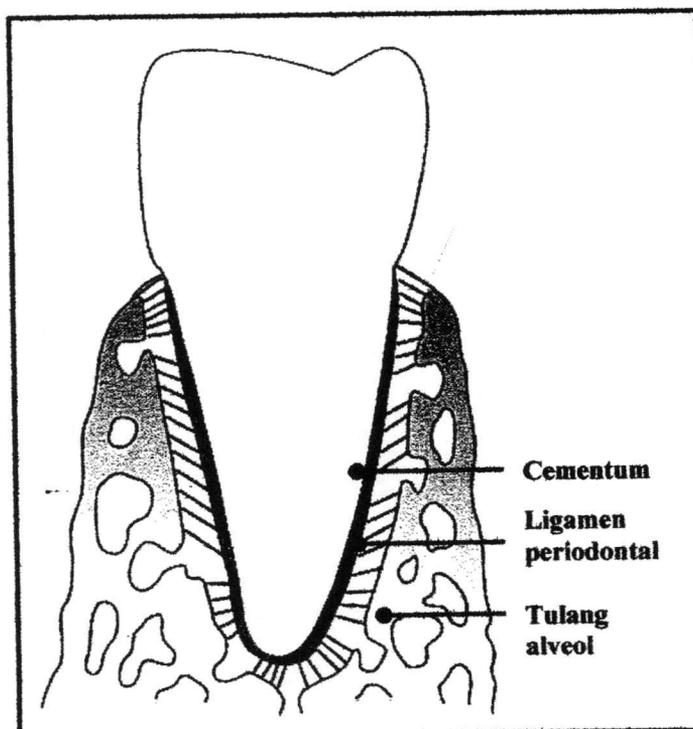
Bagian penyangga gigi adalah ligamen periodontal, sementum dan tulang alveol, strukturnya saling terkait satu sama lain sehingga dapat berfungsi optimal dalam mempertahankan gigi (Newman *et al*, 2002).

Ligamen periodontal adalah jaringan ikat yang mengelilingi akar dan merupakan bagian yang menghubungkannya dengan tulang. Jaringan ini merupakan kelanjutan jaringan ikat gingiva yang mendapatkan aliran darah melalui pembuluh darah di tulang. Elemen yang paling penting pada ligamen periodontal adalah serat

kolagen yang diatur dalam bentuk struktur yang jelas (Newman *et al*, 2002 ; Bartold *and* Narayanan, 1998).

Sementum merupakan bagian paling kecil dari periodonsium yang menutup permukaan gigi dari *cementoenamel junction (CEJ)* sampai akar gigi dan juga garis akar gigi saluran akar. Bagian ini merupakan salah satu komponen yang terpenting pada struktur perlekatan karena merupakan tempat yang dilalui oleh jaringan ikat ligamen periodontal yang masuk ke gigi. Secara histologi, sementum sangat mirip dengan tulang dan gigi, namun analisis kimia dan fisik lebih lembut dibanding dentin (Newman *et al*, 2002 ; Bartod *and* Narayanan, 1998).

Tulang alveol merupakan bagian tulang maksila dan mandibula yang membentuk dan mendukung socket gigi (*alveoli*). Dibentuk saat gigi erupsi untuk menghasilkan perlekatan tulang pada pembentukan ligamen periodontal. Bagian ini tidak terbentuk saat gigi hilang (Newman *et al*, 2002). Lihat gambar 2.3.



Gambar 2.3. Struktur penyangga gigi
(Newman *et al*, 2002)

2.2. Penyakit Periodontal

Periodonsium selalu berusaha mempertahankan fungsinya sebagai jaringan yang menyangga gigi dengan mengadakan perlawanan terhadap stres mekanik dan invasi mikroba. Namun sejumlah situasi dapat mengubah struktur dan fungsinya secara hebat, sehingga menyebabkan kerusakan struktur penyangga gigi, termasuk tulang alveol dan kehilangan perlekatan jaringan gigi yang secara signifikan menyebabkan tanggalnya gigi (Bartold *and* Narayanan, 1998 ; Delima *et al*, 2002).

Penyakit periodontal tersebut secara luas dibedakan menjadi dua kelompok. Kelompok pertama termasuk penyakit yang diturunkan yang disebabkan karena kerusakan dalam struktur protein gen akibat mutasi, delesi, atau insersi. Kelompok kedua adalah penyakit yang didapat seperti proses inflamasi yang secara langsung mengubah periodonsium. Kondisi ini biasanya merupakan akibat respons inflamasi terhadap bakteri rongga mulut yang masuk melalui junctional epithelium (Bartold *and* Narayanan, 1998 ; Bosshardt *and* Lang, 2005). Kondisi lain yang juga termasuk dalam kelompok kedua ini adalah penyakit diabetes. Saat ini dugaan bahwa diabetes tipe 1 dan 2 merupakan suatu kelainan sistem imun bawaan dan akibat suatu kondisi kronis, dimana terjadi proses inflamasi derajat rendah yang sangat mudah dipicu hingga menimbulkan peradangan termasuk infeksi pada periodonsium (Bartold *and* Narayanan, 1998 ; Amar *and* Han, 2003).

Penyakit periodontal yang umum adalah suatu proses inflamasi struktur penyangga gigi yang disebabkan oleh sejumlah mikroorganisme rongga mulut. Mikroorganisme ini membentuk suatu lapisan yang disebut plak gigi yang dapat terus menerus berakumulasi, sehingga mengubah kondisi periodonsium (Edesi-Neuss, 2005)

Penyakit periodontal atau disebut juga dengan periodontitis merupakan suatu infeksi yang unik dan tidak berhubungan langsung dengan invasi bakteri yang besar-besaran, namun merupakan suatu proses yang bertahap. Gingivitis adalah peradangan pada gingiva dan merupakan tahap awal terjadinya periodontitis. Hal ini ditandai dengan gingiva yang membengkak yang mudah berdarah saat dilakukan pengukuran kedalaman poket, suatu kedalaman pada daerah antara gingiva dan gigi. Seseorang dengan gingivitis dan tidak diobati bisa berkembang menjadi periodontitis, yaitu suatu reaksi inflamasi yang mengakibatkan kerusakan ligamen periodontal dan tulang alveoli. Apabila hal ini tetap dibiarkan akan menyebabkan kegoyangan gigi yang bersifat menetap (Hafernick, 2000).

2.3. Periodontopatogen

Pada penelitian terdahulu telah diperkirakan sekitar 500 spesies koloni bakteri yang terdapat pada rongga mulut manusia yang sebagian besar merugikan. Mikroorganisme tersebut hidup dalam suatu komunitas yang kompleks membentuk lapisan tipis pada permukaan gigi. Pada umumnya mikroorganisme ini dapat hidup dengan baik tanpa merusak apabila kebersihan rongga mulut baik. Namun jika kebersihan rongga mulut tersebut menurun atau jelek, interaksi dinamik tersebut dapat memicu infeksi oportunistik yang merusak periodonsium (Edesi-Neuss, 2005).

Beberapa penelitian membuktikan bahwa tidak semua kondisi periodontal langsung menampakkan kerusakan walaupun telah banyak diinvasi oleh berbagai macam bakteri dengan jumlah besar. Hal ini tergantung dengan keefektifan mekanisme respons pertahanan tubuh dan hanya bakteri dengan spesies tertentu dengan keunikannya mampu mengubah karakteristik sistem pertahanan tubuh dalam rongga mulut sehingga terjadi suatu kerusakan jaringan (Ebersole and Taubman, 1994).

Bakteri yang terdapat pada periodonsium sehat yang terbanyak berasal dari spesies gram positif *facultatif*, *Streptococcus spp* (seperti *S. sanguis* dan *S. mitis*) dan *Actinomyces spp* (seperti *A. viscosus* dan *A. naeslundii*). Sebagian kecil juga ditemukan spesies gram negative, yang terbanyak adalah *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Capnocytophaga*, *Neisseria* dan *veillonella spp*. Penelitian mikroskopis menimbulkan dugaan bahwa sejumlah *spirochete* dan mikroorganisme lain juga ditemukan. Walaupun mikroorganisme tersebut banyak ditemukan dalam jumlah besar di periodonsium, tapi tidak menunjukkan kehilangan perlekatan jaringan, tapi di daerah periodonsium tertentu ditemukan adanya kerusakan aktif periodontal dalam jumlah sangat rendah (Newman *et al*, 2002).

Sebenarnya konsep patogen ditujukan untuk mikroorganisme spesifik yang menyebabkan penyakit yang spesifik pula. Tidak dapat diaplikasikan pada semua penyakit periodontal. Namun tidak ada spesies tunggal yang paling berperan pada kerusakan periodonsium pada semua kasus gingivitis atau periodontitis. (Moore *and* Moore, 1994)

Ternyata mikroorganisme patogen yang terdapat pada penyakit periodontal merupakan polimikroba dan hal ini menyebabkan munculnya reaksi sistem pertahanan yang beragam melawan infeksi tersebut. Penyebutan periodontopatogen dapat diaplikasikan pada bakteri yang mempunyai mekanisme spesifik untuk mengacaukan pertahanan tubuh dan menyebabkan kerusakan jaringan periodontal yang cepat. Patogen seperti itu tidak akan pernah bekerja dalam isolasi, selalu menjadi bagian dari suatu komunitas bakteri yang kompleks (Edesi-Neuss, 2005).

Komunitas bakteri yang terdapat pada periodontitis sebagian besar merupakan spesies anaerob (90%) dan gram negatif (75%) yang berpotensi dalam mempercepat keparahan penyakit periodontal (Newman *et al*, 2002 ; Edesi-Neuss, 2005). Dalam

penelitian di bidang periodontologi terdapat sekitar 10-20 spesies berperan dalam patogenesis kerusakan penyakit periodontal (Socransky, 1970), tabel 2.1.

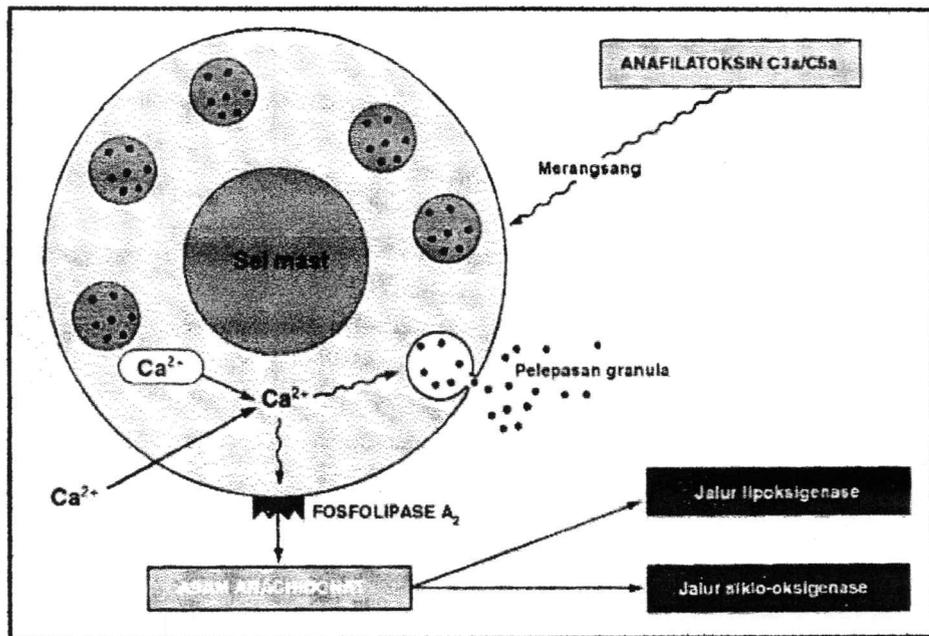
Tabel 2.1. Spesies bakteri yang terdapat pada periodontitis kronis
(Edesi-Neuss, 2005)

Periodontitis kronis
<i>Treponema</i> spp.
<i>Prevotella intermedia</i>
<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>Tannerella forsythensis</i>
<i>Peptostreptococcus micros</i>
<i>Campylobacter rectus</i>
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>
<i>Eikenella corrodens</i>
<i>Fusobacterium</i> spp.
<i>Selenomonas</i> spp.
<i>Eubacterium</i> spp.

2.4. Patogenesis Periodontitis

2.4.1. Toksin periodontopatogen

Kolonisasi periodontopatogen dapat melakukan penetrasi ke sel epitel jaringan gingival. Dalam jaringan gingiva, aksi protektif dapat timbul bila tubuh dapat memproduksi antibodi yang melawan periodontopatogen yang merupakan suatu antigen yang menstimulasi aktivitas komplemen melalui jalur C3 dan C5. yang menghasilkan fragmen C3a dan C5a (Kimura, 2005 ; Roeslan, 2002), gambar 2.4. Fragmen-fragmen kecil ini mempunyai aktivitas anafilatoksin yang mampu memicu mediator keluar dari sel mast, sehingga mengakibatkan atraksi kemotaktik PMN netrofil dan merangsang monosit yang memfagositosis antigen bakteri (Roitt, 2003 ; Roeslan, 2002 ; Arundina, 2002).



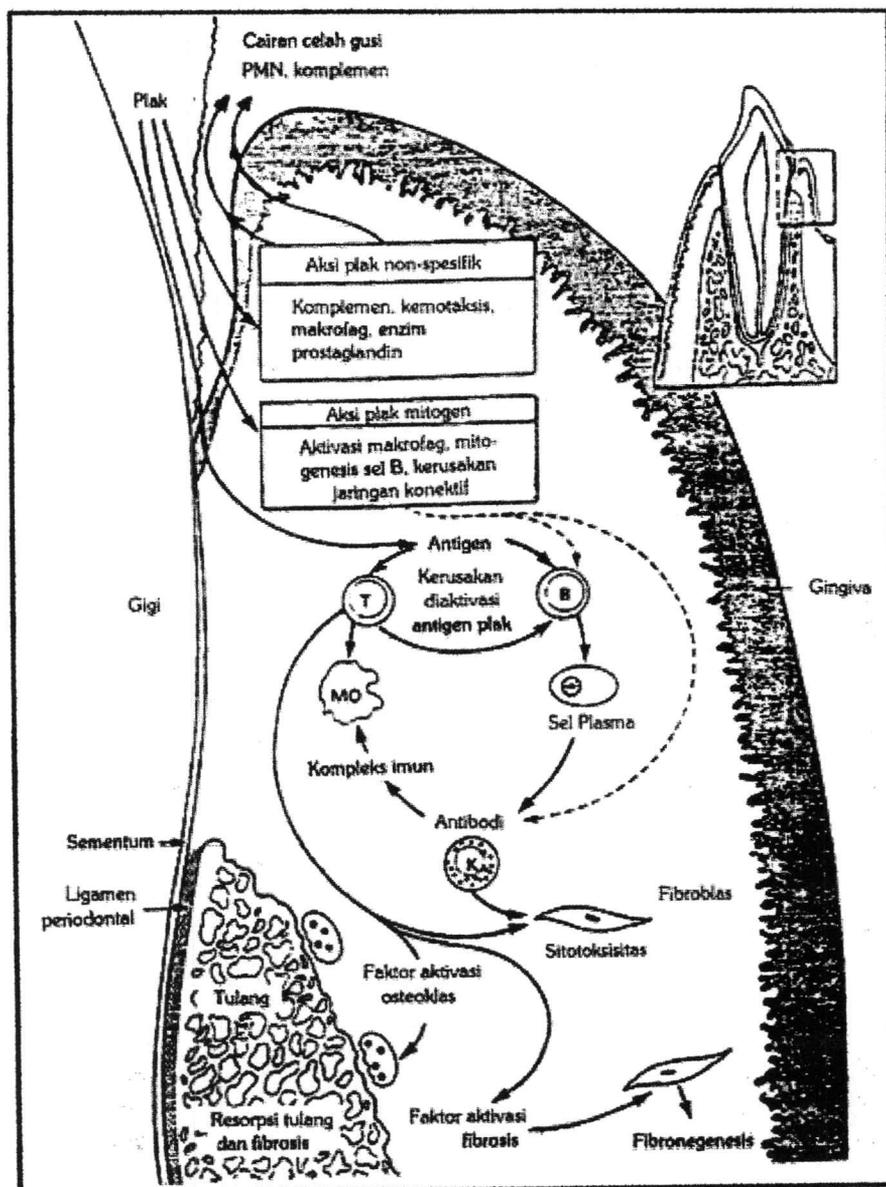
Gambar 2.4. Pemacuan sel mast (Roitt, 2003)

Pelepasan mediator-mediator inflamasi monosit yang sangat banyak, seperti PGE_2 dan *tumor necrosis factor alpha* (*TNF- α*) pada pasien periodontitis kronis menimbulkan pemikiran bahwa hal tersebut berhubungan dengan patogenesis penyakit ini (Offenbacher and Salvi, 1999 ; Mahanonda *et al*, 2004). Kebanyakan penelitian-penelitian tersebut dilakukan dengan menggunakan *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) atau monosit yang diisolasi dari pasien yang sedang mengalami infeksi periodontal aktif. Dari hasil penelitian tersebut diketahui bahwa selama infeksi bakteri, virus dan parasit aktif, terjadi keabnormalan imunologi yang signifikan, yaitu peningkatan derajat sitokin, yang dapat dilihat melalui pemeriksaan darah perifer (Hober *et al.*, 1993; May *et al*, 2000; Groeneveld *et al*, 2003 ; Mahononda *et al*, 2004).

2.4.2. Respons Imun Pada Penyakit Periodontal

Pada gingivitis dan periodontitis, respons imun dapat menimbulkan efek protektif dan destruktif. Bakteri subgingival yang berasal dari plak gigi yang kebanyakan terdiri dari bakteri gram negatif dan anaerob dapat memapar daerah

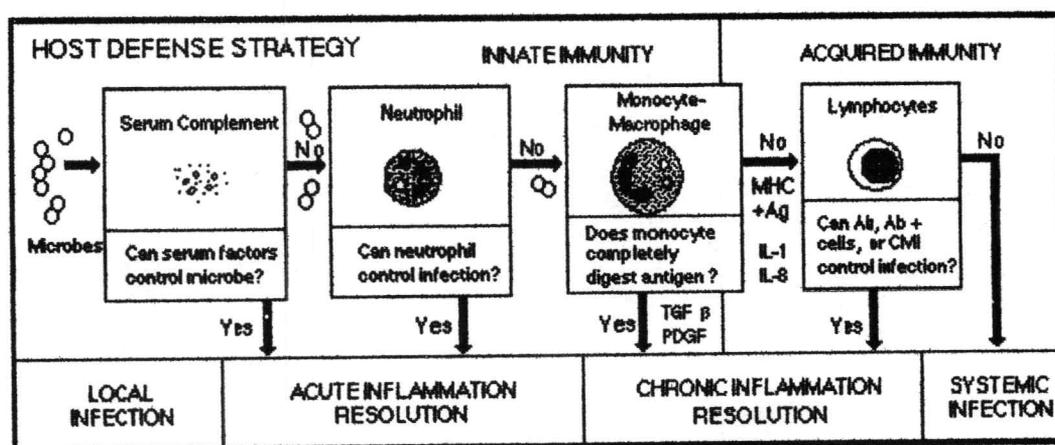
gusi. Antigen bakteri ini melakukan penetrasi ke dalam jaringan gingival dan menimbulkan respon penjamu sistemik dan lokal.



Gambar 2.5. Mekanisme respon imun patogenesis kelainan periodontal (Roeslan, 2002)

Respon imun lokal di daerah celah gusi yang cairannya mengandung antibodi dan komplemen diduga dapat bereaksi dan mengeliminasi antigen kuman. Namun sebagian antigen bakteri akan menelusup ke jaringan gingival. Antigen dihadapi oleh limfosit-T yang memproduksi limfokin karena sudah disensitiasi antigen dan mediator ini mengaktifasi, menarik, dan menghambat migrasi makrofag. Hal yang sama juga terjadi sebagai akibat limfokin yang disekresi oleh limfosit-B yang juga tersensitiasi

antigen. Lesi yang menetap dikarakterisasikan dengan infiltrasi sel plasma secara lokal dan limfosit di dalam darah perifer dapat distimulasi untuk berproliferasi oleh antigen plak. Hal yang terjadi selanjutnya adalah ditigkatkannya respons seluler dan humoral untuk menghancurkan antigen dengan efek samping kerusakan jaringan. Kondisi ini biasanya terjadi pada kasus periodontitis dengan lesi yang sudah lanjut ditandai mekanisme imunopatologi yang destruktif hingga berakibat hilangnya gigi (Roeslan, 2002), gambar 2.5. dan 2.6.



Gambar 2.6. Respon pertahanan tubuh (Miyasaki, 2006)

2.4.3. Peran Mediator lipid dalam penyakit periodontal

Respons vaskuler dan seluler baik inflamasi akut dan kronik diperantarai oleh faktor kimia yang dihasilkan dari plasma atau sel dan memicu rangsangan inflamasi. Faktor-faktor ini mempunyai peran kunci, tidak hanya pada respons awal tetapi juga respons tubuh yang dapat menjelaskan proses inflamasi (Fierro and Serhan, 2001).

Biosintesis mediator oleh interaksi transeluler dan sel-sel diakui mempunyai peran penting dalam menjelaskan dan menghasilkan mediator lipid dalam suatu proses inflamasi dan berperan penting dalam perkembangan mekanisme inflamasi. Mediator lipid *platelet activating factor (PAF)*, *lysolipids* dan banyak eicosanoid dari asam arachidonat, termasuk prostanoid, leucotrien dan kandungan lainnya yang

berperan penting dalam suatu proses transformasi biologi yang tergolong mediator pro-inflamasi. (Fierro *and* Serhan, 2001 ; Kantarci *and* Van Dyke, 2005)

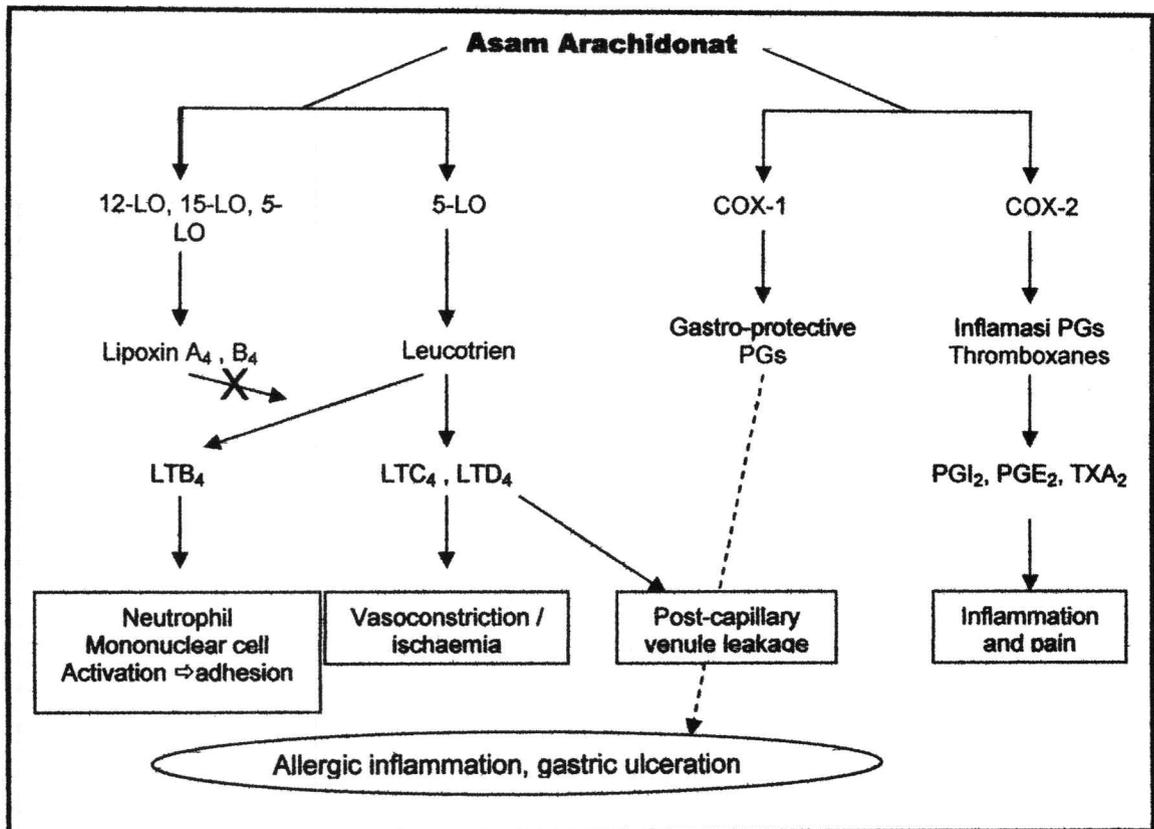
Keterlibatan isoform *COX-2* dan peran mediator lipid dalam patogenesis penyakit periodontal masih terus diteliti dan data yang diperoleh dari penelitian sebelumnya membuktikan bahwa periodontitis menggambarkan suatu model inflamasi penting yang melibatkan mediator lipid. Hal yang mendasari pernyataan tersebut adalah ada kandungan *PGE₂* dan produk *5-LO*, *LTB₄* serta produk interaksi biosintesa *LX*, *lipoxin A₄* (*LXA₄*) pada sampel cairan crevicular dari penderita periodontitis (Pouliot *et al.*, 2000).

Asam arachidonat melalui aktivitas jalur *COX* diubah ke dalam *prostaglandine G₂* (*PGG₂*). Selanjutnya dalam perjalanan metabolisme asam arachidonat, dikenal sebagai sintesis prostaglandin, *PGG₂* dikatalisasi ke dalam *prostaglandine H₂* (*PGH₂*) yang sangat tidak stabil, sehingga secara cepat diubah ke dalam bentuk prostaglandin lain, yaitu *PGE₂*, *prostacyclin* (*PGI₂*), and *thromboxane* (*TXA₂*) (Fitzgerald dan Patrono, 2001). *COX* ditemukan mempunyai 2 isoenzim, yaitu *COX-1* dan *COX-2* yang keduanya mempunyai aktivitas yang mirip dan identitas yang 64% sama. Hal penting yang membedakan *COX-1* dan *COX-2* adalah sifat-sifat fungsionalnya (O'Banion *et al*, 1999). *COX-1* diperlukan untuk memelihara fungsi normal seperti melindungi mukosa saluran cerna (gastrointestinal), memelihara fungsi ginjal serta stabilisasi dan aktivitas platelet, sedangkan *COX-2* lebih dibatasi jumlahnya dan hanya pada beberapa jaringan, tetapi menampakkan jumlah yang banyak pada respon terhadap pemicu terjadinya inflamasi (Martel-Pelletier *et al*, 2003).

Kelompok kedua generasi eicosanoid adalah leukotrien (LT) yang disintesis oleh aktivitas *5-LO* dan mempunyai peran besar dalam proses inflamasi. Metabolit aktif yang dihasilkan pada jalur *5-LO* adalah *LTB₄*. Target efek biologis *LTB₄*

ditemukan pada sel inflamasi utama karena merupakan stimulator poten aktivasi leukosit dan adesi sel ini terhadap endotel pembuluh darah, yang menimbulkan respons kemokinetik dan kemotaktik (Bray, 1981 cit Martel-Pelletier *et al*, 2003). Selama paparan singkat pada LTB_4 , yang utama ditarik adalah PMN , lebih jauh lagi leukotrien ini merangsang produksi dan pelepasan sitokin proinflamasi dari makrofag dan limfosit. Hal ini menunjukkan bahwa LTB_4 terlibat dalam patogenesis periodontitis (Martel-Pelletier *et al*, 2003 ; Kantarci and Van dyke, 2003).

LX, hasil interaksi lipoksigenase yang merupakan kelompok mediator lipid lain yang dibentuk selama metabolisme asam arachidonat. Kelompok ini diturunkan selama interaksi seluler yang terjadi sebagai bagian dari respons tubuh multiseluler terhadap inflamasi. LX dibentuk oleh metabolisme transseluler dari suatu derivat intermediate *5(6)-epoxytetraene* yang menghasilkan metabolit aktif *lipoxin A₄* (LXA_4) dan *lipoxin B₄* (LXB_4). Lipoxin tersebut disintesa tidak hanya melalui jalur *5-LO* tetapi juga oleh jalur *12-lipoxygenase (12-LO)* dan *15-lipoxygenase (15-LO)*. LX dapat dipertimbangkan sebagai mediator yang menghentikan *signaling* yang memberikan efek antiinflamasi. LXA_4 dan LXB_4 mempunyai suatu aksi penghambatan pada efek yang diperantarai LTB_4 dalam suatu inflamasi dengan menurunkan kemotaksis granulosit dan dengan merangsang aktivasi sel mononuklear. (Martel-Pelletier *et al*, 2003), gambar 2.7.



Gambar 2.7. Metabolisme asam arachidonat
(Martel-Pelletier *et al*, 2003)

2.5. Inflammasi kronik

Inflamasi diawali dengan reaksi akut yang berkembang dalam suatu fase kronik bila rangsangan yang masuk tidak cukup dihilangkan atau terjadi pengulangan terhadap penyebab inflamasi. Lebih jauh lagi, hal yang mungkin bisa terjadi respons inflamasi akut tidak terjadi sama sekali dan gambaran histologi inflamasi kronik dimanifestasikan langsung (Kantarci *and* Van dyke, 2005 ; Bartold *and* Narayanan, 1998).

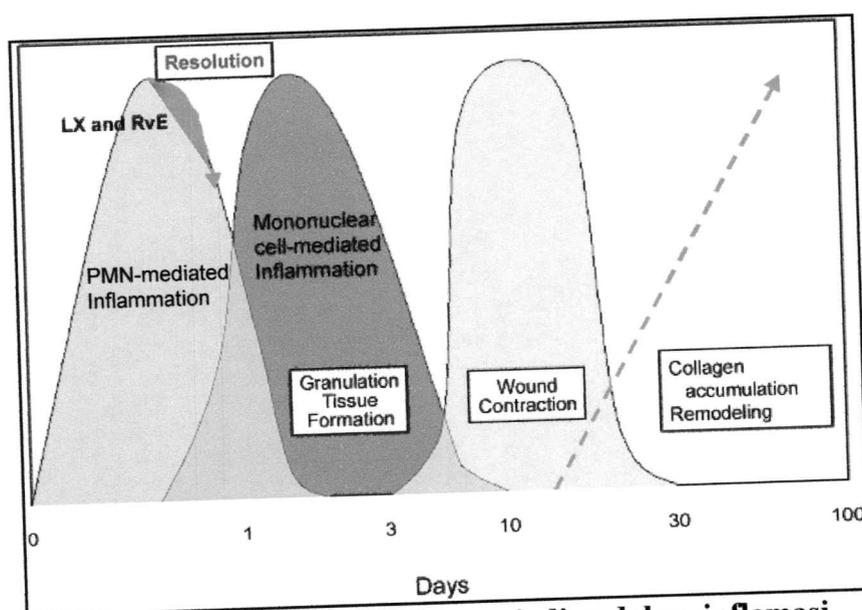
Inflamasi akut berlangsung cepat, secara relatif merupakan proses yang pendek yang ditandai dengan eksudasi cairan dan migrasi leukosit, yang utama adalah neutrofil, sedangkan inflamasi kronik dapat berlangsung lebih lama dan ditandai dengan infiltrasi sel mononuklear (makrofag, limfosit dan sel plasma), proliferasi

fibroblast dan pembentukan jaringan ikat, secara jelas dipaparkan dalam tabel 2.2. (Kantarci *and* Van dyke, 2005 ; Bartold *and* Narayanan, 1998).

Tabel 2.2. Perbandingan gambaran inflamasi akut dan kronik
(Bartold dan Narayanan, 1998)

Feature	Acute Inflammation	Chronic Inflammation
Vascular reaction	Prominent with clinical signs	Less prominent, cold swelling
Inflammatory cell	Polymorphonuclear leukocytes	Monocytes, lymphocytes, plasma cells
Pus	Present	Not characteristic
Pain	Often severe	Often absent
Connective tissue destruction	Prominent	Prominent
Fibroblast proliferation	Absent	Present
New connective tissue	Absent	Present

Ciri-ciri yang selalu ada pada inflamasi akut adalah *PMN* leukosit yang muncul pertama dan diikuti sel mononuklear. Pada model inflamasi experimental dapat didokumentasikan dengan baik bahwa *PMN* mendahului pemunculan sel mononuklear yang kemudian menghilang sambil sel mononuklear mempersiapkan mengadakan suatu cara yang membatasi keberadaannya dan menarik kembali jaringan granulasi, khususnya pada daerah yang ada di sekitarnya (Kantarci *and* Van Dyke, 2005), perhatikan gambar 2.8.

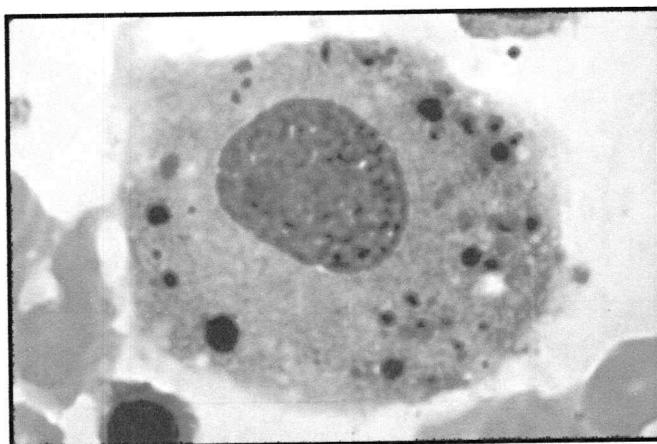


Gambar 2.8. Grafik rangkaian kejadian dalam inflamasi
(Kantarci dan Van Dyke, 2005)

2.6. Sel Mononuklear

2.6.1. Sel Makrofag

Sel yang paling banyak ditemukan dalam suatu inflamasi kronik adalah makrofag. Sel ini didiferensiasikan dari monosit yang dikeluarkan dari sumsum tulang dan diubah oleh aksi interferon- γ menjadi makrofag dengan ukuran diameter yang lebih besar dari 22 μm (McMahon *and* Sloan, 2000 ; Newman *et al*, 2002), gambar 2.9. Saat diaktifkan sel mengubah morfologi, sifat biokimiawi dan fungsinya dan menjadi mirip sel epitel squamous. Makrofag tergolong sistem retikuloendotelial, terdapat di jaringan konektif di seluruh dasar membrane pembuluh darah kecil, termasuk di jaringan ikat gingival (McMahon *and* Sloan, 2000 ; Roeslan, 2002). Makrofag berdiferensiasi dan terdapat di jaringan ikat lokal, sehingga dapat berhubungan dengan limfosit dan sel lain di sekitarnya (Newman *et al*, 2002).



Gambar 2.9. Sel makrofag (anonimous, 2006)

Perubahan dalam morfologi sel dihubungkan dengan perubahan dalam fungsi sel, dengan jalan makrofag mengadakan transformasi dari sel fagosit murni menjadi sel yang dapat mensekresi sejumlah bahan aktif yang berperan sebagai mediator inflamasi (McMahon *and* Sloan, 2000).

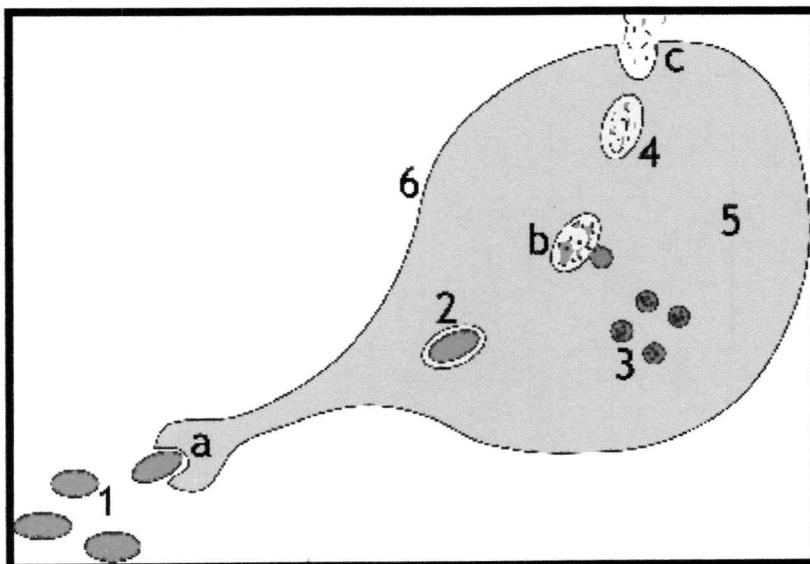
Proses Fagositosis pada Makrofag

Fagositosis merupakan awal mekanisme pertahanan tubuh terhadap zat asing, terjadi pencaplokan partikel melalui reseptor yang bersifat spesifik atau non spesifik pada permukaan membran sel dengan cara membentuk gelembung yang berasal dari membrane selnya. Proses fagositosis dapat diikuti dengan jelas tahap-tahapnya yang selanjutnya diikuti oleh penyatuan gelembung-gelembung (fagosom) tersebut dengan gelembung lisosom yang mengandung cairan enzim. Pada saat ini dapat terjadi pencernaan partikel tersebut (Subowo, 2000).

Proses fagositosis dapat dibagi dalam dua fase, yaitu fase perlekatan dan fase ingesti. Selama fase perlekatan, terjadi sentuhan kuat dengan partikel yang dinamakan proses opsonisasi. Sentuhan ini dapat terjadi secara langsung antara partikel dan fagosit melalui proses tanpa dorongan; dimana perlekatan ini sangat tergantung pada sifat-sifat permukaan partikel yang difagositosis, misal hidrofobisitas dan tegangan permukaan. Pada keadaan lain, perlekatan melibatkan peran serta 2 jenis reseptor membran plasma fagosit yaitu reseptor untuk fragmen Fc dari molekul immunoglobulin dan reseptor untuk C_{3b} suatu komponen dari komplemen. Fungsi reseptor bukan saja untuk kepentingan opsonisasi saja, melainkan juga untuk kepentingan lain, misalnya reseptor untuk limfokin agar makrofag dapat teraktivasi. Reseptor untuk *colony stimulating factor* sangat berguna untuk pembelahan sel-sel makrofag yang berkaitan dengan fungsi yang begitu banyak (Roitt, 1997 cit Arundina, 2002 ; Subowo, 2000).

Proses ingesti adalah langkah fagositosis selanjutnya dan memainkan peran penelanan partikel. Fagosit menginvasi membran plasmanya dan kemudian partikel dimasukkan ke dalam sitoplasma dan ditutup vakuola (fagosom), dengan dinding yang dibentuk dari membran plasma yang terinvasi (gambar 2.10a).

Sesudah pembentukan fagosom, membrana yang meliputi partikel-partikel itu, sedikit demi sedikit menjauh dari permukaan membrana dan dimasukkan ke dalam sel, membentuk vakuola fagositik. Granula-granula lisosom masuk bersamaan dengan fagositik ini dan membrana dari kedua struktur ini berfungsi menjadi fagolisosom (gambar 2.10b.). Granula-granula lisosom pecah, melepaskan isi enzimatiknya ke dalam vakuola dan bercampur dengan partikel-partikel yang diingesti. Proses ini disebut degranulasi (gambar. 2.10c.) dan berperan sebagai mitra morfolitik dalam pemindahan enzim-enzim dari granula lisosom ke dalam fagosom. Granula-granula ini analog dengan lisosom sel-sel lain dan berisi beberapa enzim hidrolitik dan zat-zat bakterisid lain (Bellanti, 1993 dan Roitt, 1997 *cit* Arundina, 2002).



Gambar 2.10. Proses ingesti pada makrofag (anonimus, 2006)

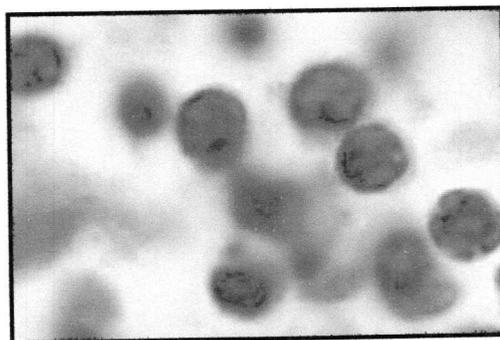
- | | | |
|------------|---|----------------|
| a. | Ingesti mell fagosisosis | |
| b. | Penggabungan fagolisosom, patogen dipecah | |
| c. | Dikeluarkan dari membra sel | |
| 1. Patogen | 3. Lisosom | 5. Sitoplasma |
| 2. Fagosom | 4. Bahan cair | 6. Membran sel |

2.6.2. Limfosit

Sel limfoid pada sistem imunitas spesifik, terdiri atas limfosit dan sel plasma. Begitu tersensitiasi antigen, limfosit menjadi imunosit yaitu seri sel limfoid yang merespons stimulasi antigen dan bertindak sebagai sel mediator imunitas spesifik.

Secara morfologik dan sifat-sifat biofisiknya, limfosit merupakan kelompok utama leukosit (Roeslan, 2002). Sel ini mempunyai tiga fungsi, yaitu secara aktif terlibat dalam pengrusakan antigen, secara langsung bersama sel lain membantu mengeliminasi antigen dan berfungsi sebagai suatu *memory* untuk antigen, sehingga jika menghadapi serangan kedua atau berikutnya, respons dapat dibentuk lebih cepat dan sangat kuat (McMahon *and* Sloan, 2000).

Sel limfosit adalah sel kecil dengan luas yang relatif, nukleus yang bulat sitoplasma kecil dan sedikit organel. Sel ini ditemukan dalam jumlah besar di aliran darah, khususnya di organ limfoid dan sedikit di organ lainnya (McMahon *and* Sloan, 2000), gambar 2.11.



Gambar 2.11. Limfosit (anonimous, 2006)

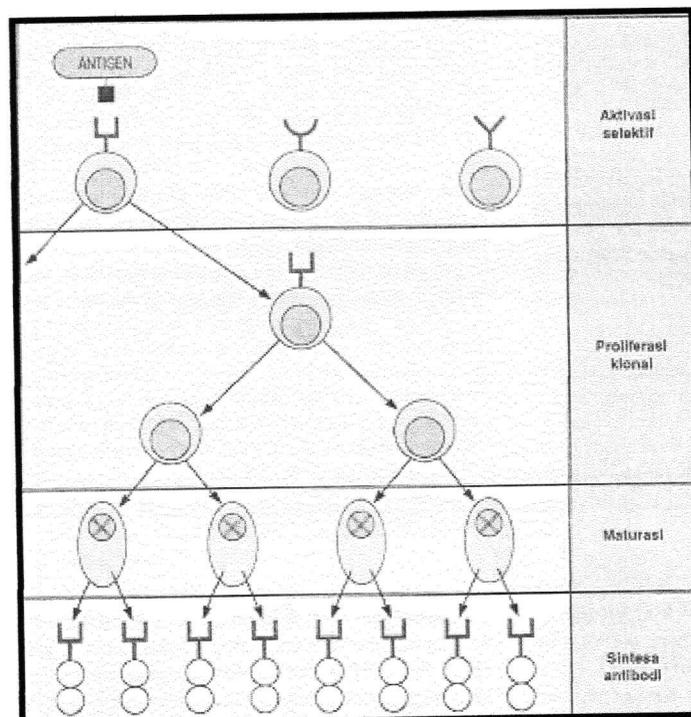
Dalam suatu kelompok limfosit terdapat populasi yang heterogen. Hal ini dapat dilihat reaksi dengan antibody monoklonal terhadap antigen permukaan limfosit. Berdasarkan ekspresi petanda (*markers*) pada permukaan selnya, limfosit teridentifikasi dalam tiga populasi, yaitu limfosit-T, limfosit-B dan sel *natural killer* (*NK*). Masing-masing sel dapat dikenali berdasarkan reaksinya terhadap antigen dan kehadiran molekul unik yang ditemukan pada permukaan jenis sel limfosit spesifik. Limfosit-T menemukan antigen melalui struktur membrannya yang disebut kompleks antigen reseptor limfosit-T / *CD3* (kompleks *CD3/TCR*), sedangkan limfosit-B menemukan antigen melalui molekul imunoglobulin permukaan. Pada sel *NK* tidak

ditemukan reseptor antigen limfosit-T maupun immunoglobulin pada permukaannya (Roeslan, 2002).

Sebagai mediator reaksi seluler (*cell-mediated immunity*), limfosit-T dapat memproduksi berbagai faktor limfokin yang dapat meningkatkan kemampuan sel lain yang berperan sebagai picu inflamasi. Beberapa di antaranya dilepaskan saat limfosit tersensitisasi antigen (Roeslan, 2002).

2.6.3. Sel Plasma

Saat antigen memasuki tubuh, ia dihadang oleh barisan siaga limfosit yang mempesona dan memiliki antibody yang masing-masing berbeda sesuai dengan tempat pengenalan antigen yang dimilikinya masing-masing. Antigen hanya berikatan dengan reseptor yang benar-benar cocok. Limfosit dengan reseptor yang telah mengikat antigen menerima suatu sinyal pemacuan. Namun karena tubuh tidak mungkin memproduksi begitu banyak limfosit untuk menghasilkan setiap jenis

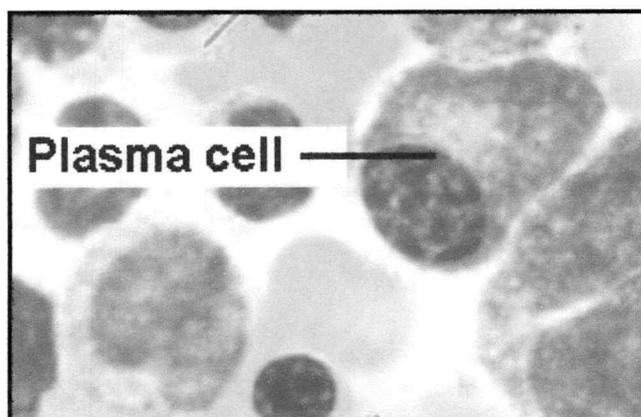


Gambar 2.12. Seleksi klon (Roitt, 2003)

antibodi, maka untuk mengimbangi hal ini, limfosit yang dipacu melalui kontak dengan antigen menjalani gelombang proliferasi secara berturut-turut membangun klon sel plasma yang besar dan menghasilkan antibodi sesuai rancangan limfosit induknya. Melalui sistem seleksi klonal, kadar antibodi yang cukup besar dapat dihasilkan untuk memerangi infeksi secara efektif (Roitt, 2003), gambar 2.12.

Dari penjelasan di depan dapat diartikan bahwa sel plasma mempunyai fungsi utama memproduksi imunoglobulin yang disekresi ke dalam serum dan jaringan. Sel ini merupakan sel efektor limfosit-B yang mengalami transformasi (McMahon and Sloan, 2000). Aktivasi limfosit-B terjadi melalui dua cara, yaitu interaksi langsung dengan antigen tanpa aksi *antigen presenting cell (APC)* dan melalui sinyal berbagai faktor yang dilepas oleh limfosit-T atau monosit (Roeslan, 2002).

Secara morfologi, sel plasma memiliki diameter 15-20 μm , berbentuk bulat atau lonjong. Sel ini mempunyai nukleus eksentrik yang menunjukkan gumpalan perifer kromatin nuklear, memberikan suatu penampakan yang digambarkan seolah-olah seperti roda kereta. Karena sel ini mengalami biosintesis yang tinggi, sitoplasma selnya mengandung banyak ribosom dan retikulum endoplasmik kasar yang memberikan warna basofilik dalam pewarnaan *haematoxylin eosin (HE)* (McMahon and Sloan, 2000), gambar 2.13.

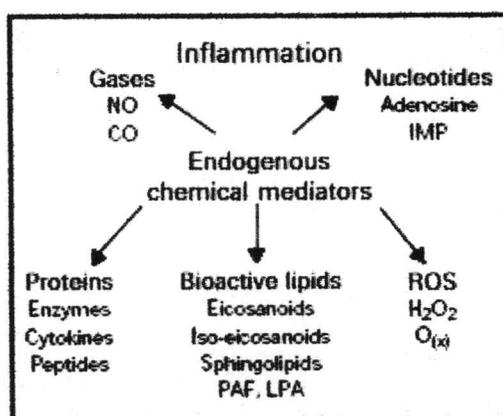


Gambar 2.13. Sel plasma (anonymous, 2006)

2.7. Antiinflamasi untuk Terapi Periodontitis

2.7.1. Mekanisme Antiinflamasi

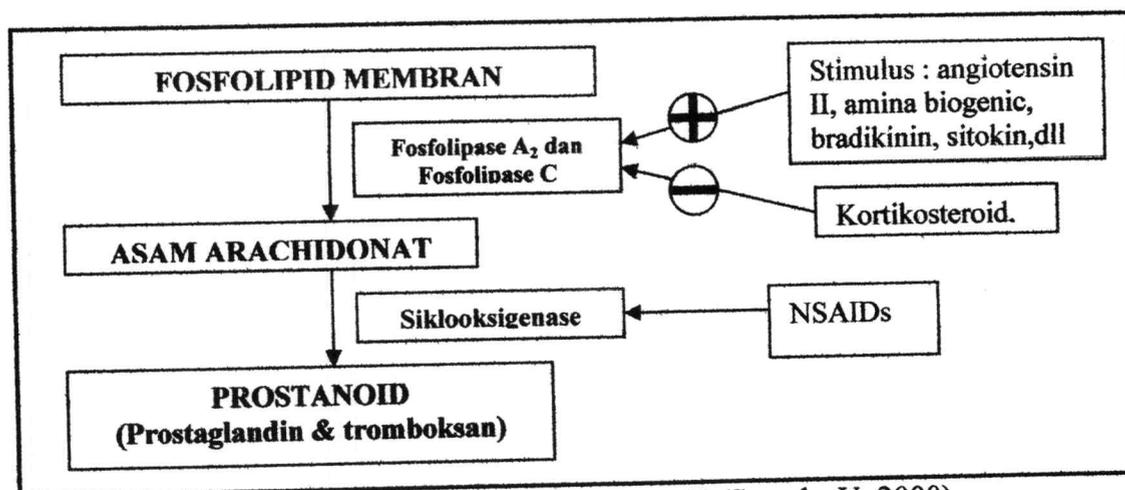
Proses peradangan diawali, diditingkatkan atau dikoordinasi oleh aksi dari berbagai mediator kimia. Mediator-mediator ini mengatur keberadaan leukosit dan mengontrol respons leukosit. Dalam beberapa tahun ini, banyak mediator kimia yang telah diidentifikasi sebagai mediator lipid baru, sitokin dan kemokin baru, gas NO (*nitric oxide*) dan CO (*carbon monoxide*), *reactive oxygen species* (ROS) dan peran baru nukleotida, seperti *adenosine* dan *inosine* (gambar 2.14). Mediator –mediator kimia ini diduga berperan sebagai proinflamasi dan /atau memicu peningkatan inflamasi. Eicosanoid klasik, seperti prostaglandin dan leukotrien, memperluas aksinya dan mempunyai peran kunci dalam inflamasi (Fierro *and* Serhan, 2001 ; Van Dyke *and* Serhan, 2003).



Gambar 2.14. Inflamasi : mediator kimia endogen (Fierro dan Serhan, 2001)

Senyawa eicosanoid dianggap sebagai hormon lokal yang berfungsi lewat reseptor yang berkaitan dengan protein-G untuk menimbulkan efek biokimiawinya (Mayes, 1999). Asam arachidonat (gambar 2.15.) dilepaskan dari fosfolipid membran oleh fosfolipase A2 dan fosfolipase C. Jumlah asam arachidonat yang bebas merupakan faktor yang membatasi kecepatan sintesis eikosanoid. Fosfolipase A2 dan C diaktifkan oleh berbagai bahan fisiologis (seperti angiotensin II, amina-amina

biogenic, bradikinin, sitokin, histamine, epinephrine, trombin, endotelin) dan stimuli farmakologis non-spesifik (Ca ionophore, forbol ester) melalui peningkatan Ca^{2+} intraseluler (Campbell *and* Halushka, 1996 ; Saareks V,2000).

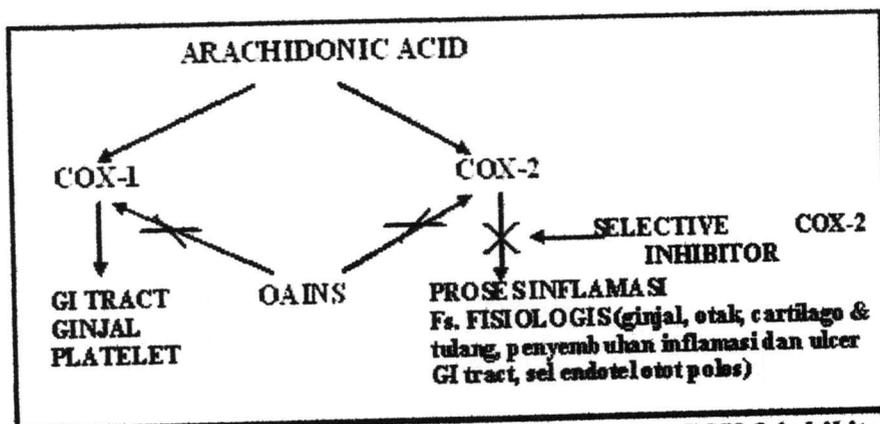


Gambar 2.15. Biosintesis prostanoic acid (Saareks V, 2000)

Obat anti inflamasi non steroid (OAINS) merupakan obat yang lazim digunakan untuk mengobati nyeri dan inflamasi. Walaupun OAINS juga mempunyai efek analgesik dan anti piretik, tetapi sifat anti inflamasi merekalah yang paling baik dalam menangani gangguan-gangguan yang dihubungkan dengan intensitas proses inflamasi. Aktivitas OAINS terjadi pada metabolisme asam arachidonat melalui produk jalur *COX* yang menghambat terbentuknya prostaglandin, dengan tujuan menurunkan proses peradangan.

Ada dua isoform jalur *cyclooxygenase* yang dihambat oleh OAINS pada umumnya, yaitu jalur *COX-1* dan *COX-2*. Aktivitas jalur *COX-1* memiliki fungsi fisiologis sebagai pemelihara, yaitu melindungi mukosa gastrointestinal, menjaga fungsi platelet dan ginjal, sebaliknya aktivitas *COX-2* merangsang produksi prostaglandin yang bekerja sama dengan enzim protease dan mediator inflamasi lainnya, menyebabkan timbulnya proses peradangan. Penghambatan pada *COX-1* ini menghasilkan efek samping, seperti iritasi pada gastrointestinal yang mengarah pada terbentuknya ulkus (tukak), memperpanjang waktu perdarahan dan pada penggunaan

jangka panjang terjadi gangguan fungsi ginjal (May *et al*, 2001). Perhatikan gambar 2.16.

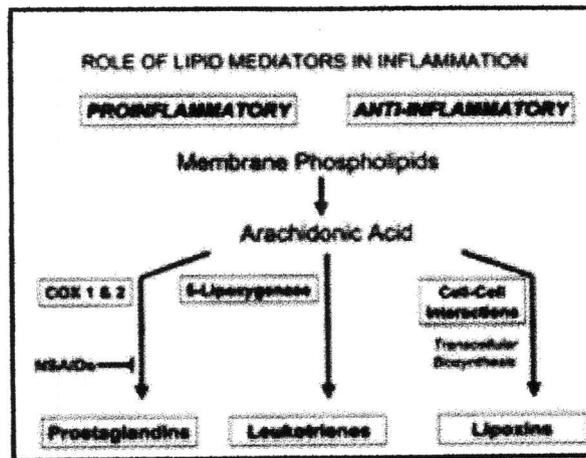


Gambar 2.16. Mekanisme OAINS dan *selective COX-2 inhibitor* (Sari, 2003)

Segera setelah penemuan konsep jalur *COX-1* dan *COX-2* banyak perusahaan obat memproduksi obat yang secara khusus mempunyai kandungan yang hanya menghambat *COX-2* untuk meningkatkan kemampuan menurunkan efek samping pada saluran cerna. Hal ini terbukti dari beberapa penelitian yang menyatakan *selective COX-2 inhibitor* lebih sedikit menimbulkan ulkus pada gastrointestinal dibandingkan dengan OAINS yang lazim digunakan (Meyer-Kirchrat *and* Schror, 2000 ; Buttgerit *et al*, 2001).

Obat-obat tersebut di depan memang mudah didapat dan menunjukkan keefektifan dalam banyak kondisi klinis, walaupun masih menjadi suatu kontroversi dalam berbagai literatur klinik tentang keamanan dan efek samping penghambat *COX-2* dalam sistem gastrointestinal dan kardiovaskular (Kantarci *and* Van Dyke, 2005), gambar 2.16.

Penemuan adanya molekul endogen yang terlibat dalam mengatur ulang respons inflamasi yang timbul karena antigen yang masuk ke jaringan, memberi kesempatan untuk mengeksplorasi pengobatan baru berdasarkan manipulasi jalur baru dalam mekanisme inflamasi (gambar 2.17).



Gambar 2.17. Peran lipid mediator dalam inflamasi
(Van Dyke and Serhan, 2003)

Jalur alami yang mengatur ulang respons inflamasi tersebut diharapkan bisa menurunkan efek samping yang tidak diinginkan (Kantarci and Van Dyke, 2003).

LX dapat dibentuk dari sumber endogen asam arachidonat dari bermacam-macam spesies, dari ikan sampai manusia, secara *in vivo*. Selain sumber-sumber tersebut, aksi biologi LX didapatkan melalui beberapa jalur lain, seperti *aspirin-triggered 15-epi-lipoxins (ATLs)* dan *polyunsaturated fatty acid (PUFA)* yang dapat diubah menjadi asam arachidonat. Dua kelompok utama asam lemak tersebut adalah omega-6 dan omega-3 yang mempunyai potensi terapeutik dalam pengaturan inflamasi dan penyakit kronik (Kantarci and Van Dyke, 2005 ; Dharmananda, 2003).

Hewan tidak mempunyai kapasitas untuk mengubah asam lemak jenuh dibanding tumbuhan, termasuk manusia, karena itu perlu bagi hewan untuk mendapatkan *PUFA* esensial yang dihasilkan dari suatu sumber tumbuhan untuk makanannya (Rivers and Frankel, 1981). Makanan yang kaya asam linoleat atau asupan asam lemak esensial yang terdiri dari 1-2% dari jumlah total kalori dapat menghambat gejala patologis. Makanan yang tinggi kandungan *PUFA* bermanfaat dalam menghambat pembentukan *PG₂* series dan *TXA₂* (Lanzmann-Petithory, 2001 ; Kantarci and Van Dyke, 2003).

2.7.2. Pentingnya Antiinflamasi pada Terapi Periodontitis

Pemahaman tentang paradigma baru dalam patogenesis periodontitis yang mengawali konsep bahwa luka jaringan oleh inflamasi merupakan dampak ketidakmampuan tubuh untuk memutus proses inflamasi, bukan karena proses awal inflamasi itu sendiri yang menyebabkan keparahan. Pemikiran ini karena inflamasi diperlukan untuk melindungi tubuh dari infeksi, tetapi inflamasi yang lama atau menetap dapat juga menyebabkan penyakit, karenanya dugaan tersebut, dalam suatu penyakit seperti periodontitis, merupakan resolusi inflamasi yang akan melindungi tubuh dari luka jaringan, saat agen infeksi masih dibersihkan (Van Dyke *and* Serhan, 2003).

Periodontitis merupakan suatu model inflamasi penting untuk penelitian mediator lipid yang menunjukkan begitu banyaknya peran *COX-2* dalam perkembangan keparahan penyakit periodontal (Pouliot *et al.*, 2000). Hal ini terlihat melalui suatu pengujian sampel cairan *crevicular* pada penderita periodontitis yang menemukan adanya kandungan *PGE₂* dan *LTB₄*, serta interaksinya dengan *LXA₄* dalam menghasilkan neutrofil dan monosit (Miyasaki, 2006).

Sampai saat ini, masih banyak penelitian yang memfokuskan pada pengaruh umum dan penggunaan luas obat yang hanya memperhatikan sebagian perjalanan proses inflamasi. Namun setelah ditunjukkan adanya suatu pemisahan sementara antara eicosanoid, selain menghasilkan prostaglandin (PG) dan leukotrien (LT) juga menghasilkan LX, maka terbuka kemungkinan ada jalur lain yang dapat difungsikan dalam resolusi inflamasi ini (Levy, *et al.*, 2001)

Pendekatan untuk membuat satu '*super-inhibitor*' atau antagonis yang menghambat inflamasi dan tidak memiliki efek samping yang tidak diinginkan belum memperlihatkan hasil yang maksimal (Levy *et al.*, 2003). Namun wacana mekanisme

mediator lipid sangat menarik sebagai masukan pengobatan baru, karena mempunyai molekul yang kecil (<500 MW), diterima sebagai sintesa organik murni dan dapat diproduksi dengan fasilitas farmasi yang tersedia (Kantarci dan Van Dyke, 2005). Wacana ini terbukti pada penelitian tentang buah Cranberry yang dapat menghambat sitokin pro-inflamasi dan respons kemokin yang diinduksi bakteri periodontopathogen (Bodet *et al*, 2006).

2.8. Jinten hitam (*Nigella sativa*)

Dalam pengobatan pada abad 21 ini dikembangkan obat-obat baru yang berasal dari tanaman di banyak negara di dunia (Aditama, 2000). Prospek obat alami masa depan semakin cerah apalagi kecenderungan masyarakat untuk kembali ke alam dengan meninggalkan obat-obat sintetis semakin besar. Angka statistik menunjukkan di tahun 1994 sekitar 28,4 % masyarakat perkotaan mengobati sendiri penyakit yang diderita dan angka ini meningkat menjadi 35,4% di tahun 1995 (BPS, 1996).

Jinten hitam (*Nigella sativa*) merupakan tanaman tertua yang digunakan dalam pengobatan sepanjang sejarah manusia. Tanaman ini telah digunakan sebagai pengobatan secara alami selama kurang lebih 2000 tahun. Tanaman ini banyak tumbuh di daerah Mediterania, Yunani, Eropa, Timur tengah dan Asia termasuk Indonesia (Al Jassir, 1992; Kasule, 2000; Avicena, 2000). Di Indonesia tumbuh antara lain di Sumatra, Jawa Barat dan Jawa Tengah.

Sesuai dengan budaya masing-masing, penggunaan jinten hitam berbeda-beda di masing-masing negara. Di Amerika digunakan untuk influenza, asma, batuk dan untuk meningkatkan sistem imun. Di India digunakan untuk meningkatkan produksi susu, anti tumor dan bakterisida. Di Indonesia digunakan untuk mengobati nyeri, keputihan, batuk, asma dan radang selaput mata. Pada pengobatan arab tradisional, jinten hitam secara sendiri atau dikombinasi dengan madu untuk mengobati asma

bronkhial (Boskabody, 2002). Selain itu, di Timur Tengah dan Timur Jauh, jinten hitam biasa digunakan secara tradisional untuk pengobatan asma bronkhial, bronkitis dan reumatik serta penyakit-penyakit yang berkaitan dengan inflamasi (Randhawa and Al-Ghamdi, 2002).

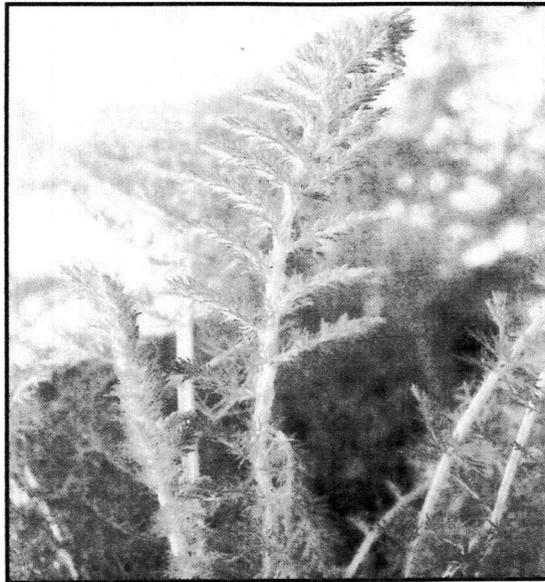
2.8.1. Taksonomi

Tanaman ini mempunyai taksonomi sebagai berikut :

Divisi	: <i>Magnoliophyta</i>
Klas	: <i>Magnoliopsidae</i>
Subklas	: <i>Magnoliidae</i>
Order	: <i>Ranunculales</i>
Famili	: <i>Ranunculaceae</i>
Genus	: <i>Nigella</i>
Spesies	: <i>Nigella sativa</i> (Anonimous, 2006)

2.8.2. Morfologi

Tanaman jinten hitam termasuk tanaman setahun. Berbatang tegak dan biasanya berusuk, serta berbulu kasar yang kadang-kadang rapat atau jarang. Bulu-bulu yang ada di batang ini umumnya berkelenjar. Daun jinten hitam berbentuk lanset dan bergaris dengan panjang 1,5-2 cm, ujung meruncing, serta memiliki tiga tulang daun yang berbulu. Daun bagian bawah bertangkai dan bagian atas duduk. Sementara itu, daun pembalut bunga relatif kecil (Sufrida and Edi, 2006), gambar 2.18.



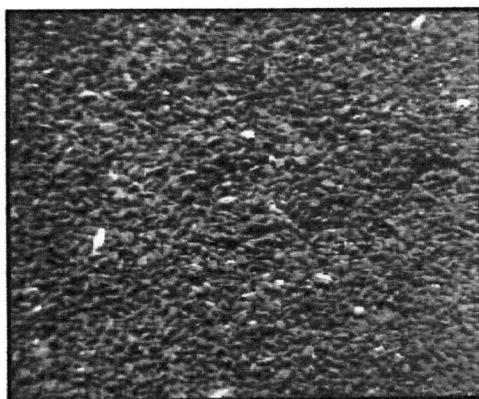
Gambar 2.18. Tanaman jinten hitam
(Sufrida dan Edi, 2006).

Bunga jinten hitam memiliki lima kelopak bunga dengan bentuk bulat telur, ujung agak meruncing sampai agak tumpul, serta pangkal mengecil membentuk sudut yang pendek dan besar. Mahkota bunga umumnya ada delapan dengan bentuk agak memanjang, lebih kecil daripada kelopak bunga, serta berbulu jarang dan pendek. Bibir bunga ada dua buah. Bibir bunga bagian atas pendek, lanset dan ujung memanjang berbentuk benang. Ujung bibir bunga bagian bawah tumpul. Benang sari banyak dan gundul. Kepala sari jarang dan sedikit tajam dengan warna kuning (Sufrida and Edi, 2006), gambar 2.19.



Gambar 2.19. Bunga jinten hitam
(Sufrida dan Edi, 2006).

Bagian yang bisa dimanfaatkan orang adalah bijinya. Biji jinten hitam kecil dan pendek (panjangnya hanya 1-3 mm), berwarna hitam, berbentuk trigonal (bersudut tiga tidak beraturan), berkelenjar dan tampak seperti batu api jika diamati dengan mikroskop. Biji-biji ini berada di dalam buah yang berbentuk telur atau agak bulat (Sufrida *and* Edi, 2006), gambar 2.20.



Gambar 2.20. Biji jinten hitam
(Sumber: Al jassir, 1997)

2.8.3. Kandungan

Banyak penelitian yang menerangkan bahwa jinten hitam adalah tumbuhan alam yang bijinya sering digunakan untuk pengobatan. Biji jinten hitam mengandung lebih dari 100 nutrisi biologis yang bernilai tinggi, beberapa di antaranya belum diidentifikasi. Kandungannya merupakan sumber asam lemak dan protein esensial serta kaya vitamin dan mineral (Al Jassir, 1997; Basir, 1998). Biji jinten hitam yang sudah melalui tahapan penelitian fitokimia menunjukkan banyak mengandung *fixed oil*, protein dan *volatile oil* serta berbagai nutrisi yang lain. Perhatikan tabel 2.3.

2.8.4. Penelitian tentang aktivitas antiinflamasi dan respons imun *Nigella sativa*

Beberapa kegunaan Jinten hitam dalam pengobatan tradisional mendorong berbagai penelitian untuk mengisolasi komponen aktif dan melakukan penelitian baik secara *in vivo* dan *in vitro* pada hewan coba dan manusia untuk dapat memahami

aktivitas farmakologinya, termasuk penelitian tentang aktivitas antiinflamasi dan stimulasi imun (Randhawa and Al-Ghamdi, 2002).

Minyak esensial jinten hitam dan komponen aktif *thymoquinone* ditemukan memiliki aktivitas antiinflamasi, penghambatan edema dan pembentukan granuloma (Mutabagani and El-Mehdy, 1997). Penelitian yang lebih mendalam, *fixed oil* jinten hitam dan suatu komponen aktif, *thymoquinone*, ditemukan dapat menghambat generasi eicosanoid dan peroksidasi membran lipid melalui penghambatan jalur COX

Tabel 2.3. Kandungan dan komponen aktif Jinten hitam
(Randhawa and Al-Ghamdi MS, 2002)

Kandungan	Jenis	Component aktif
Fixed oil (32-40 %)*	Unsaturated fatty acids	Arachidonic, eicosadienoic, linoleic, linolenic, oleic and almitoleic acid
	Saturated fatty acids	Palmitic, stearic and myristic acid
		Beta-sitosterol, cycloeucaenol, cycloartenol, sterol esters and sterol glucosides
Volatile oil (0.4-0.45 %)*		Nigellone, thymoquinone, thymohydroquinone, dithymoquinone, thymol, carvacrol, α & β -pinene, d-limonene, d-citronellol, p-cymene and 2-(2-methoxypropyl)-5-methyl-1,4-benzenediol ^{6,16-18}
Proteins (16-19.9 %)*	Amino acids	Arginine, glutamic acid, leucine, lysine, methionine, tyrosine, proline and threonine, etc. ¹³
Alkaloids		Nigellicine, nigellidine, nigellimine-N-oxide
Coumarins		6-methoxy-coumarin, 7-hydroxy-coumarin, 7-oxy-coumarin ¹⁹⁻²³
Saponins:	Triterpenes	Alpha-hedrin ²⁴
	Steroidal	Steryl-glucosides, ²⁵ acetyl-steryl-glucoside
Minerals (1.79-3.74%)*		Calcium, phosphorous, potassium, sodium and iron ^{13,26}
Carbohydrates (33.9%)* Fiber (5.5%)* water (6 %)*		

dan *5-LO* metabolisme asam arachidonat dalam suatu leukosit peritoneal tikus yang distimulasi oleh *calcium ionophore A23187*, yang ditunjukkan dengan adanya penghambatan *TXB₂* dan *LTB₄* (Houghton *et al*, 1995 ; Zarka, 1996).

Pada penelitian lain, minyak jinten hitam, *nigellone (polythymoquinone)* dan turunan *thymoquinone* diteliti untuk mengevaluasi efek bahan-bahan tersebut pada pembentukan produk *5-LO* dari *PMN* leukosit. Hasil penelitian tersebut menemukan konsentrasi penghambatan produk *5-LO* dan produksi *5-hydroxy eicosa-tetraenoic acid (5-HETE)*, diduga disebabkan efek antioksidan, yang juga menunjukkan peranannya dalam memperbaiki penyakit inflamasi (El-Dakhakhny, 2002).

Selain penelitian tersebut di atas, masih banyak para peneliti yang mencoba mengeksplorasi biji Jinten hitam dengan cara yang lebih mudah, yaitu dengan menggunakan ekstrak air. Beberapa hasil yang didapatkan adalah ekstrak air Jinten hitam masih mampu menunjukkan aktivitas antiinflamasi, analgesik dan antipiretik pada hewan coba. Hal ini terbukti dengan efek penghambatannya pada odema telapak kaki yang diinduksi carragenan. Selain itu juga terjadi peningkatan dalam penelitian *hot plate reaction time* pada mencit yang diduga merupakan efek analgesik dan efek pada *yeast-induced pyrexia* (Al-Ghamdi, 2001). Penelitian berikutnya yang masih menggunakan ekstrak air membuktikan bahwa ekstrak air jinten hitam menghambat produksi NO, suatu mediator proinflamasi yang memungkinkan sebagian aktivitas antiinflamasi melalui mekanisme ini (Mahmood *et al*, 2003).

Efek imunomodulator juga ditemukan pada fraksi protein Jinten hitam melalui *ion-exchange chromatography*. Efek protein ini pada produksi sitokin, diuji lebih jauh menggunakan *enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA)*. Hasilnya menunjukkan bahwa fraksi jinten hitam efektif menurunkan produksi sitokin (Haq *et al*, 1999).

2.8.5. Dosis biji jinten hitam (*Nigella sativa*)

Pada penelitian yang dilakukan oleh Hartati di Fakultas Kedokteran Brawijaya pada tahun 2001, dengan menggunakan ekstrak jinten hitam dengan dosis 0.6 gr /kg BB, 1,2 gr / kgBB dan 2,4 gr /kg BB, ternyata dapat memperbaiki kerusakan sel-sel epitel bronkus tikus wistar yang diakibatkan oleh diet atherogenik selama 10 minggu. Hal ini ditandai dengan kembali normalnya jumlah inti sel, tumbuhnya kembali silia serta menurunnya sel radang di lapisan mukosa bronkus dibanding yang hanya mendapat diet atherogenik (Hartati, 2001).

Penelitian lain yang telah dilakukan tentang pengaruh pemberian ekstrak jinten hitam terhadap penurunan kadar *malondyaldehyde* (MDA) dengan dosis yang sama dengan penelitian Hartati di atas menunjukkan adanya penurunan kadar MDA yang bermakna pada kelompok tikus wistar yang mendapat ekstrak jinten hitam, terutama pada dosis 2,4 g/kg BB/hari (Prasiska, 2004 ; Sari and Revianti, 2006). Hal ini membuktikan bahwa jinten hitam mengandung bahan-bahan aktif yang bersifat sebagai antioksidan dan antiinflamasi yang mampu bertindak sebagai *scavenging enzym* yang dapat mengeliminasi senyawa oksigen reaktif (Burst and Bucar, 2000).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Dasar Teori

Nigella sativa atau yang lebih dikenal sebagai jinten hitam merupakan tumbuhan yang digunakan sebagai obat tradisional di seluruh penjuru dunia untuk mengobati berbagai penyakit, termasuk penyakit kronis seperti asma dan *rheumatoid arthritis* (Gilani *et al*, 2004 ; Randhawa *and* Al-Ghamdi, 2002). Bagian tanaman yang sering dipakai sebagai obat adalah bijinya. Biji jinten hitam banyak mengandung komponen aktif *fixed oil*, *volatile oil*, saponin dan alkaloid yang semuanya menunjukkan khasiat sebagai antiinflamasi (Al Jassir, 1997; Basir, 1998).

Fixed oil merupakan bagian yang banyak mengandung *PUFA* yang banyak mengandung omega-6 (asam linoleat), yang pada penelitian akhir-akhir ini banyak diselidiki tentang manfaatnya terhadap berbagai penyakit inflamasi kronis (Dharmananda, 2003); begitu juga dengan kandungan *volatile oil*-nya yang terbukti pada penelitian terdahulu dapat menghambat jalur *COX* dan *5-LO*. Kedua jalur ini berperan dalam proses terjadinya suatu inflamasi (Houghton *et al*, 1995).

Penyakit periodontal merupakan suatu penyakit yang menyerang jaringan penyangga gigi yang diawali dengan suatu peradangan yang terjadi pada daerah gingiva yang disebabkan oleh induksi kolonisasi bakteri yang spesifik. sehingga memicu respons imunoinflamasi (Delima *et al*, 2002). Keparahan terhadap penyakit ini tergantung dari respon tubuh penderita. Dalam hal ini dapat terjadi suatu mekanisme yang memicu reaksi pertahanan tubuh terhadap toksin yang dikeluarkan oleh bakteri yang dianggap sebagai antigen yang masuk (Roitt, 2002). Respons imun lokal di daerah celah gusi yang mengandung antibodi dan komplemen bereaksi dan mengeliminasi antigen kuman. Antigen ini akan dihadapi oleh limfosit-T yang

memproduksi limfokin karena sudah disensitasi antigen dan mediator ini mengaktivasi, menarik, dan menghambat migrasi makrofag. Hal yang sama juga terjadi sebagai akibat limfokin yang disekresi oleh limfosit-B yang juga tersensitasi antigen. Lesi yang menetap dikarakterisasi dengan infiltrasi sel plasma secara lokal dan limfosit di dalam darah perifer dapat distimulasi untuk berproliferasi oleh antigen plak. Kejadian selanjutnya adalah dibangkitkannya respons seluler dan humoral untuk menghancurkan antigen dengan efek samping kerusakan jaringan (Roeslan, 2002).

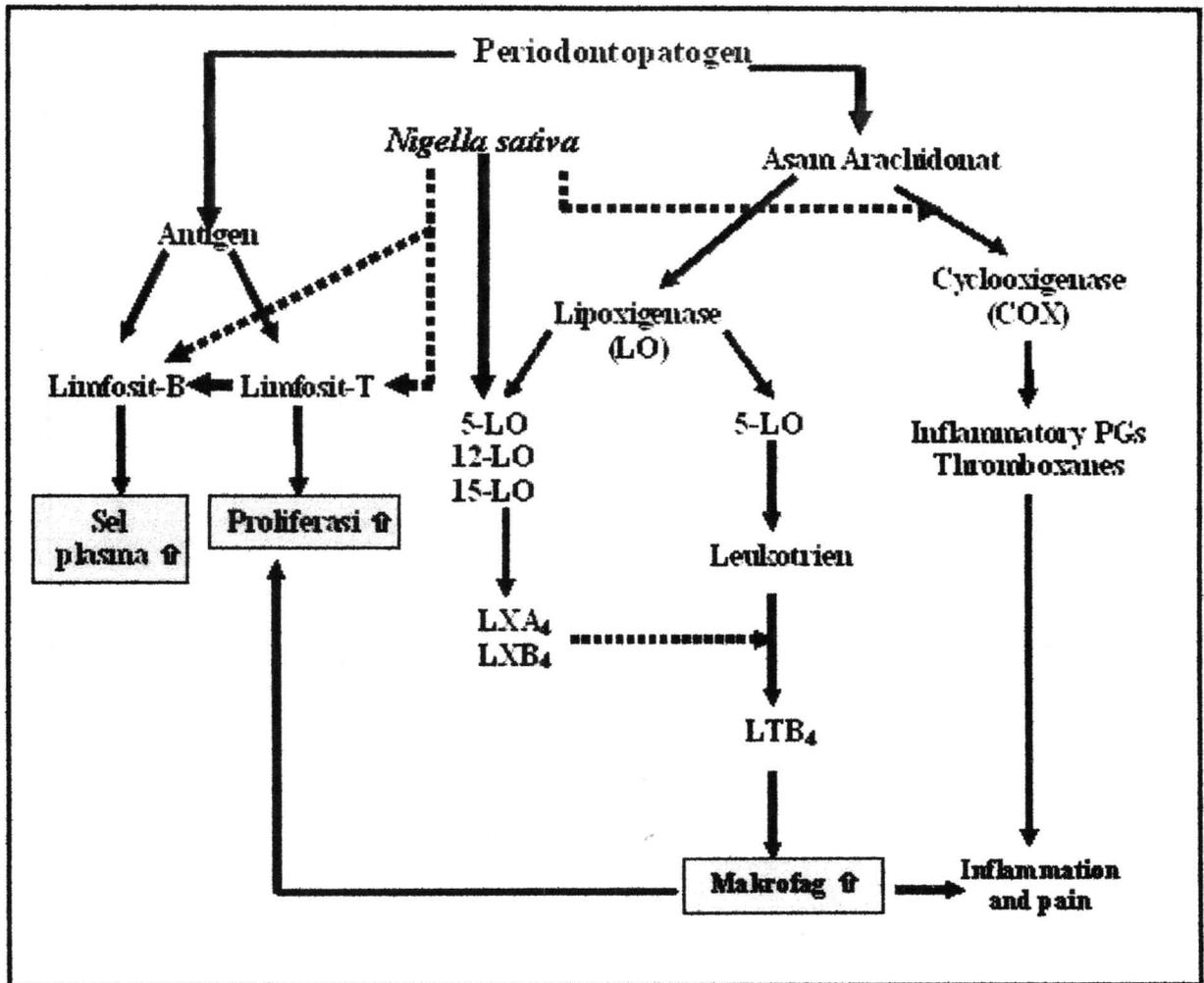
Pada jalur lain periodontopatogen mestimulasi aktivitas komplemen yang mampu memicu zat-zat perantara keluar dari sel mast, sehingga mengakibatkan atraksi kemotaktik neutrofil dan merangsang monosit yang memfagositosis antigen bakteri (Roitt, 2003 ; Roeslan, 2002 ; Arundina, 2002). Mekanisme ini terjadi dalam pengaturan respons inflamasi yang dikendalikan melalui sintesis asam arachidonat. Awalnya ada dua jalur yang dihasilkan dalam sintesa tersebut, yaitu jalur *COX-2* dan *5-LO*. Jalur *COX-2* menghasilkan produk *PGE₂* yang berperan dalam proses inflamasi, sedangkan *5-LO* menghasilkan *LTB₄* yang berperan dalam kemotaksis, pelepasan enzim, pembangkitan superoksida pada *PMN*, dapat mempertinggi produksi *IL-1* pada monosit yang diinduksi periodontopathogen dan meningkatkan produksi sitokin proinflamasi dari makrofag dan limfosit (Martel-Pelletier, 2003 ; Rola, 1985 cit Arundina, 2002).

Dengan adanya anggapan bahwa respons pertahanan tubuh berpengaruh terhadap terjadinya penarikan neutrofil yang berlanjut dengan pelepasan mediator lainnya, maka timbul pemikiran bahwa ada jalur lain dalam mekanisme asam arachidonat yang berperan sebagai antiinflamasi. Hal ini terungkap dengan diimbangnya produk dari kedua jalur tersebut dengan suatu bentuk molekul yang disebut lipoxin (Martell-Pelletier 2003 ; Van Dyke dan Serhan, 2003).

Lipoxin adalah eicosanoid yang mengandung *trihydroxytetraene* yang ditemukan secara *in vivo* pada manusia selama respons multiseluler, seperti inflamasi kronis. Cabang mekanisme *eicosanoid* ini menghasilkan produk yang mengandung *tetraene* khusus yang bertugas sebagai ‘tanda berhenti’ untuk neutrofil yang mengatur tahapan kunci dalam pengaturan leukosit dan mencegah timbulnya neutrofil akibat masuknya zat asing (Kantarci *and* Van Dyke, 2003). LX dapat dibentuk dari *PUFA* yang dapat diubah menjadi asam arachidonat. *PUFA* banyak diperoleh dari tumbuhan dan mempunyai potensi terapeutik dalam pengaturan inflamasi dan penyakit kronik (Kantarci *and* Van Dyke, 2005 ; Dharmananda, 2003).

Hal ini dapat mengungkapkan bahwa dengan pemberian makanan yang mengandung *PUFA* dan bahan atau obat yang dapat membantu menghambat jalur inflamasi, maka proses terjadinya inflamasi lebih jauh dapat mudah diatasi. Hal ini dapat diukur dengan penurunan sel inflamasi kronis pada tempat yang diinduksi bakteri periodontopatogen.

3.2. Kerangka Konseptual



Gambar 3.1. Kerangka konseptual

Keterangan gambar :

- : merangsang
- : menghambat

3.3. Hipotesis Penelitian

Rumusan hipotesis penelitian adalah sebagai berikut :

1. Pemberian ekstrak biji *Nigella sativa* dapat menurunkan jumlah sel makrofag pada jaringan ikat gingiva mencit yang diinduksi periodontopatogen.
2. Pemberian ekstrak biji *Nigella sativa* dapat menurunkan jumlah sel limfosit pada jaringan ikat gingiva mencit yang diinduksi periodontopathogen
3. Pemberian ekstrak biji *Nigella sativa* dapat menurunkan jumlah sel plasma pada jaringan ikat gingiva mencit yang diinduksi periodontopatogen.

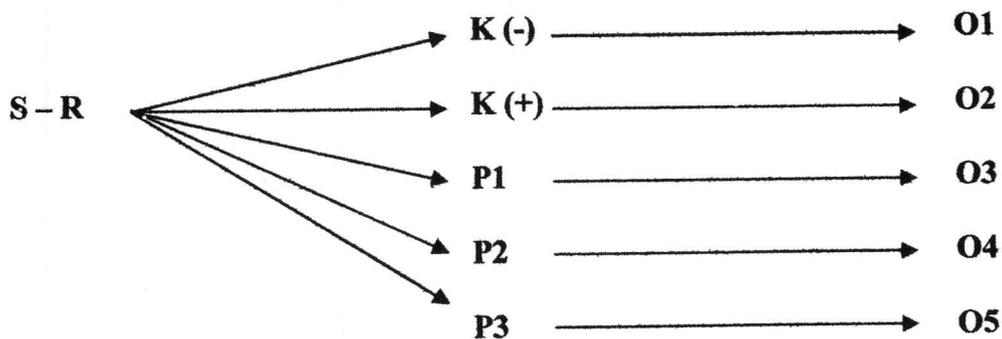


BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini tergolong penelitian eksperimental laboratoris karena ada kelompok yang mendapatkan perlakuan, dengan menggunakan rancangan penelitian *Completely Randomized Design* (Rancangan Acak Lengkap = RAL) (Hanafiah, 2003). Subyek penelitian dibagi dalam 5 (lima) kelompok secara random, dua kelompok sebagai kontrol dan sisanya diberikan ekstrak biji jinten hitam dengan berbagai dosis. Secara skematis rancangan penelitian tersebut dapat digambarkan sebagai berikut :



Keterangan :

- S = Sampling
 R = Randomisasi
 K(-) = Kelompok kontrol negatif (diinjeksi dengan aquadest dan diberi pelarut Na CMC 0,5% 3 kali pemberian, selama 4 hari)
 K(+) = Kelompok kontrol positif (diinduksi periodontopatogen dan diberi pelarut Na CMC 0,5% 3 kali pemberian, selama 4 hari)
 P1 = Kelompok perlakuan 1 (diinduksi periodontopatogen dan diberi ekstrak biji jinten hitam dosis 600 mg/kgBB/hari, 3 kali pemberian, selama 4 hari)
 P2 = Kelompok perlakuan 2 (diinduksi periodontopatogen dan diberi ekstrak biji jinten hitam dosis 1200 mg/kgBB/hari, 3 kali pemberian, selama 4 hari)
 P3 = Kelompok perlakuan 3 (diinduksi periodontopatogen dan diberi ekstrak biji jinten hitam dosis 2400 mg/kgBB/hari, 3 kali pemberian, selama 4 hari)
 O1 = Jumlah sel makrofag, sel limfosit dan sel plasma kelompok kontrol negatif
 O2 = Jumlah sel makrofag, sel limfosit dan sel plasma kelompok kontrol positif
 O3, O4, O5 = Jumlah sel makrofag, sel limfosit dan sel plasma kelompok P1, P2, P3

4.2. Unit Eksperimen dan Replikasi

4.2.1. Unit eksperimen

Unit eksperimen adalah mencit (*Mus musculus*), jenis kelamin jantan, umur 7-8 minggu, berat sekitar 17-32 gram dengan kondisi sehat yang ditandai dari gerakannya yang aktif dari Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Surabaya.

4.2.2. Replikasi

Jumlah replikasi pada penelitian ini adalah 35 ekor mencit yang terbagi dalam 5 kelompok, masing-masing kelompok 7 ekor mencit. Jumlah replikasi minimal ditentukan berdasarkan rumus (Hanafiah, 2003) :

$$(k - 1) (r - 1) \geq 15$$

Keterangan :

k = jumlah kelompok

r = replikasi, ulangan

Jadi jumlah replikasi minimal per kelompok adalah 5 (lampiran 1.)

Namun dalam penelitian kemungkinan bisa terjadi kesalahan yang menyebabkan hewan coba mati atau terjadi kesalahan sewaktu proses akhir pemeriksaan (f) sekitar 20%, maka jumlah replikasi dikoreksi dengan menggunakan rumus (Higgins and Klaimbaum, 1985):

$$(1 / 1 - f) \times r$$

Jadi jumlah replikasi menjadi 6,25 yang dibulatkan menjadi 7 ekor per kelompok perlakuan. (lampiran 1.)

4.3. Variabel Penelitian

4.3.1. Klasifikasi variabel

A. Variabel Bebas (independen)

1. Pemberian ekstrak biji jinten hitam

B. Variabel Tergantung (dependen)

1. Jumlah sel makrofag
2. Jumlah sel plasma
3. Jumlah sel limfosit

C. Variabel kendali

1. Umur mencit
2. Jenis kelmain mencit
3. Berat badan mencit
4. Makanan dan minuman mencit
5. Perawatan dan sanitasi kandang
6. Waktu perlakuan

4.3.2. Definisi operasional

Variabel-variabel yang digunakan pada penelitian ini dapat didefinisikan sebagai berikut :

1. Pemberian ekstrak biji jinten hitam adalah ekstrak ethanol yang dibuat dari biji Jinten hitam dengan cara maserasi menggunakan pelarut alkohol 96% yang diberikan ke mencit dalam bentuk sediaan yang telah dicampur dengan Na CMC 0,5% dan diberikan dengan dosis yang sudah dikonversikan sebagai berikut : kelompok dosis 600 mg/kgBB/hari, 1200 mg/kgBB/hari dan 2400 mg/kgBB/hari

2. Jumlah sel makrofag adalah jumlah sel satu lapang pandang dengan pembesaran 400 kali dan pewarnaan HE yang paling banyak ditemukan dalam suatu inflamasi kronik dengan pengamatan yang dilakukan sebanyak 5 kali oleh orang yang berbeda
3. Jumlah limfosit adalah rata-rata jumlah sel satu lapang pandang dengan pembesaran 400 kali dan pewarnaan HE yang secara aktif terlibat dalam pengrusakan antigen dan secara langsung membantu mengeliminasi antigen dengan pengamatan yang dilakukan sebanyak 5 kali oleh orang yang berbeda
4. Jumlah sel plasma adalah rata-rata jumlah sel satu lapang pandang dengan pembesaran 400 kali dan pewarnaan HE yang berbentuk bulat atau lonjong, mempunyai nukleus eksentrik yang menunjukkan gumpalan perifer kromatin nuklear, memberikan suatu penampakan yang digambarkan seolah-olah seperti roda kereta dengan pengamatan yang dilakukan sebanyak 5 kali oleh orang yang berbeda

4.4. Bahan Penelitian

4.4.1. Hewan coba

Menggunakan *mencit (Mus musculus)* jenis kelamin jantan, yang berumur 7 – 8 minggu, berat badan 17-32 gram dengan kondisi sehat dari Laboratorium Ilmu Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.

4.4.2. Makanan dan minuman hewan coba

1. Makanan yang diberikan pada hewan coba adalah pakan ternak
2. Minuman yang diberikan pada hewan coba adalah air yang berasal dari PDAM dan diberikan secara adlibitum

4.4.3. Bahan untuk perlakuan

- A. Ekstrak biji Jinten hitam (lihat lampiran 2)
- B. Periodontopatogen (lihat lampiran 3)
- C. Aquadest steril

4.4.4. Unit analisis

Unit analisis untuk pemeriksaan variabel adalah jaringan interdental gingiva yang diambil dari mencit perlakuan untuk dibuat sediaan histopatologi dengan pewarnaan HE (*haematoxylin eosin*) yang digunakan untuk menghitung jumlah sel makrofag, sel limfosit dan sel plasma (lampiran 4).

4.5. Instrumen penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini dapat dikelompokkan menjadi :

1. Alat untuk pemeliharaan dan perlakuan hewan coba :
 - a. Kandang plastik polypropilen usuran 20 cm X 15 cm X 15 cm yang ditutup dengan kawat kassa dengan usuran lubang 6 mm
 - b. Botol minum
 - c. Tempat makan dari aluminium
 - d. Sekam
 - e. Sonde untuk pemberian ekstrak biji Jinten hitam
 - f. Spuit tuberculin 1 cc untuk induksi periodontopathogen
2. Alat untuk pembiusan dan pengambilan jaringan ikat gingiva :
 - a. Toples kecil dan penutupnya dari kaca untuk pembiusan
 - b. Instrumen bedah minor (pinset chirurgis, scalpel, mes, pinset)
 - c. Pot kecil dengan tutup plastik untuk fiksasi jaringan
 - d. Kertas label dan kertas saring

3. Alat untuk pembuatan preparat histopatologi metode parafin dengan pewarnaannya
 - a. Mikrotom putar
 - b. Pot kecil untuk dehidrasi, clearing dan infiltrasi
 - c. Blok dari timah berbentuk L untuk embedding
 - d. Lampu spirtus
 - e. Water bath
 - f. Pinset
 - g. Gelas obyek dan penutupnya
 - h. Staining jar
4. Alat pengambilan data :
 - a. Mikroskop cahaya binokuler merk Canon Alphaphot Ys yang dilengkapi kamera
 - b. Counter

4.6. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di 3 tempat di lingkungan Universitas Airlangga Surabaya, yaitu Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi untuk pembuatan ekstrak biji jinten hitam, Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran untuk pemeliharaan dan perlakuan hewan coba serta pengambilan jaringan dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas kedokteran. Waktu penelitian dilakukan pada bulan Maret sampai Agustus 2007.

4.7. Prosedur Penelitian

4.7.1. Penelitian Pendahuluan Untuk Menentukan Dosis Ekstrak Biji Jinten Hitam

Penelitian pendahuluan dilakukan untuk eksplorasi dosis ekstrak biji jinten hitam yang akan digunakan dalam penelitian. Dosis yang digunakan 300, 600 dan 1200 mg/kgBB/hari. Pada pemeriksaan sediaan histopatologi dosis 300 mg mg/kgBB/hari masih didapatkan jumlah sel makrofag yang banyak pada jaringan ikat gingiva mencit, sedangkan pada pemberian dosis 600 mg mg/kgBB/hari mulai didapatkan hasil dimana jumlah sel makrofag dan limfosit mengalami penurunan namun tidak sebanyak pada dosis 1200 mg/kgBB/hari. Pada penelitian ini digunakan ekstrak biji jinten hitam dengan dosis 600 dan 1200 mg/kgBB/hari, serta dosis di atasnya yaitu 2400 mg/kgBB/hari untuk melihat hasil yang optimal.

4.7.2. Prosedur Pelaksanaan Penelitian

1. Aklimatisasi

Aklimatisasi hewan coba selama 1 minggu dalam kondisi laboratorium. Bila ada yang sakit dikeluarkan dari penelitian.

2. Pembagian Kelompok Hewan Coba

Penelitian dilakukan secara eksperimental di dalam laboratorium. (alur penelitian ini dapat dilihat pada lampiran 4). Penelitian ini menggunakan 2 faktor perlakuan yaitu induksi periodontopatogen dan besarnya dosis ekstrak biji Jinten hitam. Mencit dibagi menjadi dua kelompok kontrol dan tiga (3) kelompok perlakuan yang masing-masing terdiri dari 7 ekor. Pembagian kelompok tikus tersebut adalah sebagai berikut :

Kelompok kontrol negatif: Diinduksi dengan menggunakan aquadest steril dan diberi pelarut Na CMC 0,5% 3 kali pemberian sehari, selama 4 hari.

Kelompok kontrol positif : Diinduksi periodontopatogen dan diberi pelarut Na CMC 0,5% 3 kali pemberian sehari, selama 4 hari.

Kelompok Perlakuan 1: Diinduksi periodontopatogen dan diberi ekstrak biji Jinten hitam dengan dosis 600 mg / kg BB / hari yang dilarutkan Na CMC 0,2% terbagi dalam 3 kali pemberian, selama 4 hari

Kelompok Perlakuan 2: Diinduksi periodontopatogen dan diberi ekstrak biji Jinten hitam dengan dosis 1200 mg / kg BB / hari yang dilarutkan Na CMC 0,2% terbagi dalam 3 kali pemberian, selama 4 hari

Kelompok Perlakuan 3: Diinduksi periodontopatogen dan diberi ekstrak biji Jinten hitam dengan dosis 2400 mg / kg BB / hari yang dilarutkan Na CMC 0,2% terbagi dalam 3 kali pemberian, selama 4 hari

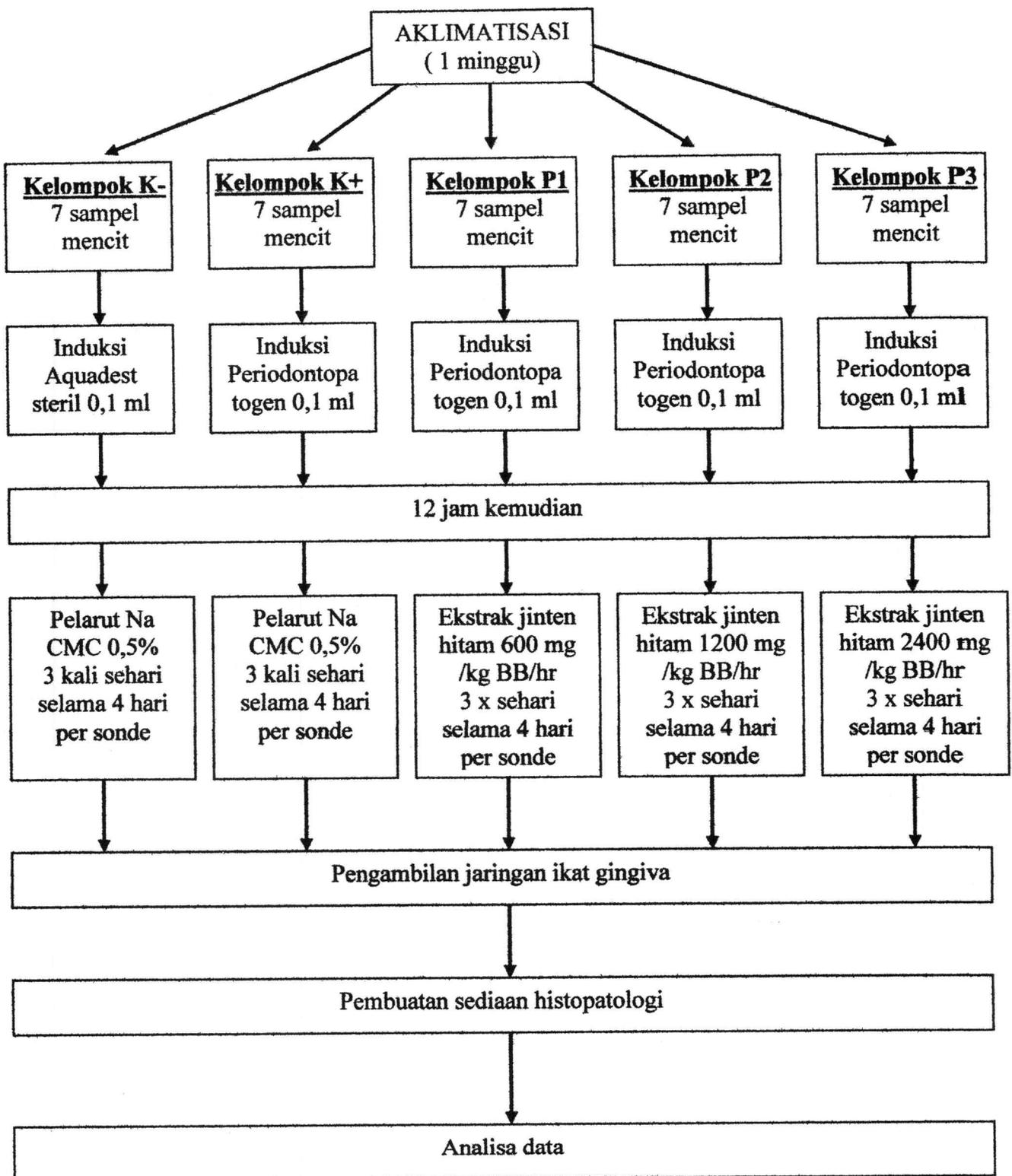
3. Perlakuan Hewan Coba

- a. Bakteri periodontopatogen diinduksikan pada daerah interdental gingiva incisivus bawah mencit sebanyak 0,1 ml yang mengandung 10^5 periodontopatogen dalam 100 μ l salin (Zambon dan Christersson, 1993 dalam Arundina, 2002) (lampiran 5).
- b. Setelah 12 jam sejak induksi periodontopatogen, maka ekstrak biji jinten hitam mulai diberikan sesuai dengan dosis kelompok masing-masing yang terbagi dalam 3 kali pemberian.
- c. Pemberian ekstrak biji jinten hitam dilakukan dengan menggunakan sonde, yaitu spuit yang ujung jarumnya telah ditumpulkan.
- d. Pemberian ekstrak biji jinten hitam dilakukan selama 4 hari

4. Pengambilan Sampel

- a. Pada hari ke 5, mencit dibunuh dengan menggunakan eter untuk memudahkan pengambilan gingiva.

4.9. Alur Penelitian



BAB 5

HASIL PENELITIAN

Pembuktian untuk melihat pengaruh pemberian ekstrak biji jinten hitam terhadap penurunan sel radang pada jaringan ikat gingiva mencit yang diinduksi periodontopatogen, maka perlu dilakukan penghitungan jumlah sel makrofag, sel limfosit dan sel plasma sebagai parameter. Data yang diperoleh dari hasil penelitian tersebut selanjutnya dideskripsikan dan diuji dengan taraf signifikansi 5% dan diolah dengan komputer.

5.1. Hasil Analisis Deskriptif

Data hasil penelitian mencakup data variabel tergantung, kemudian data tersebut dianalisis secara statistik deskriptif yang bertujuan untuk memperoleh gambaran distribusi dan peringkasan data guna memperjelas penyajian hasil.

Tabel 5.1. Rata-rata dan Simpangan Baku (Standart Deviasi) jumlah sel makrofag, sel limfosit dan sel plasma

KELOMPOK	JUMLAH SEL MAKROFAG		JUMLAH SEL LIMFOSIT		JUMLAH SEL PLASMA	
	X	SD	X	SD	X	SD
K(-)	7,0000	4,4347	4,5714	2,4398	0,7143	0,7559
K(+)	60,0000	12,1106	17,8571	4,0999	9,5714	2,1492
P1	17,8571	9,6683	6,5714	3,2071	4,0000	1,4142
P2	19,2857	8,1999	6,0000	2,7689	3,0000	1,4142
P3	8,0000	7,1180	4,5714	3,7796	1,0000	1,1547

Keterangan :

K (-) : Kelompok kontrol negatif

K (+) : Kelompok kontrol positif (induksi periodontopatogen)

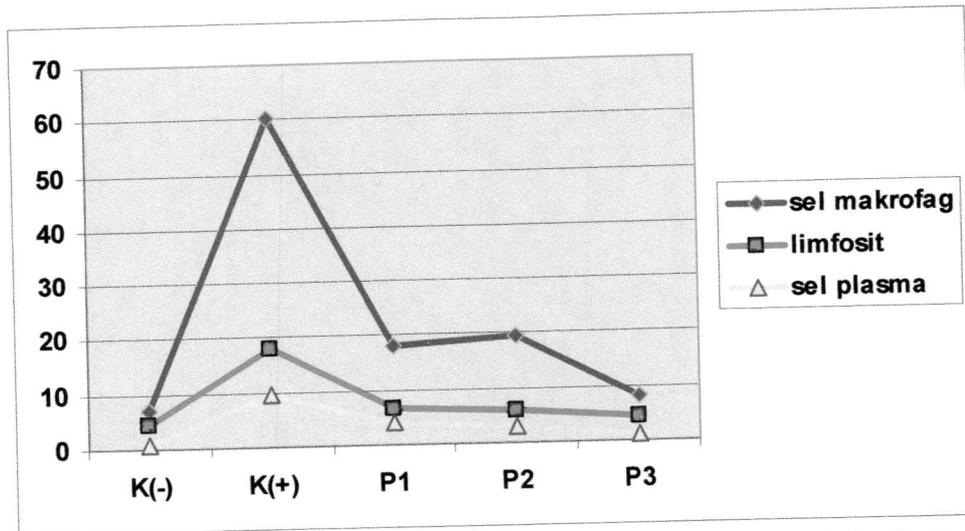
P1 : Kelompok Perlakuan 1 (induksi periodontopatogen + ekstrak biji *Nigella sativa* 600 mg/kg BB/ hari)

P2 : Kelompok Perlakuan 2 (induksi periodontopatogen + ekstrak biji *Nigella sativa* 1200 mg/kg BB/ hari)

P3 : Kelompok Perlakuan 3 (induksi periodontopatogen + ekstrak biji *Nigella sativa* 2400 mg /kg BB/ hari)

X : rata-rata

SD : Standart Deviasi



Gambar 5.1. Grafik rata-rata jumlah sel makrofag, jumlah limfosit dan jumlah sel plasma

5.2. Hasil Uji Normalitas

Sebelum melakukan analisis data hasil penelitian dengan Anova, maka data diuji normalitas distribusinya dengan uji *Kolmogorov-Smirnov* seperti pada tabel 5.2.

Tabel 5.2 Hasil uji normalitas distribusi (uji *Kolmogorov-Smirnov*)

Variabel	K-S (Z)	Sig (2-tailed)
Jumlah sel makrofag	1,247	0,089
Jumlah sel limfosit	1,334	0,057
Jumlah sel plasma	1,029	0,240

Berdasarkan tabel 5.2 dapat dilihat bahwa variable jumlah sel makrofag, sel limfosit dan sel plasma pada jaringan ikat gingiva mencit berdistribusi normal ($p > 0.05$).

5.3. Uji Homogenitas

Hasil uji homogenitas seperti tabel 5.3 menunjukkan bahwa variabel jumlah sel makrofag, sel limfosit dan sel plasma pada jaringan ikat gingiva mencit memiliki varians yang homogen antar kelompok ($p > 0.05$).

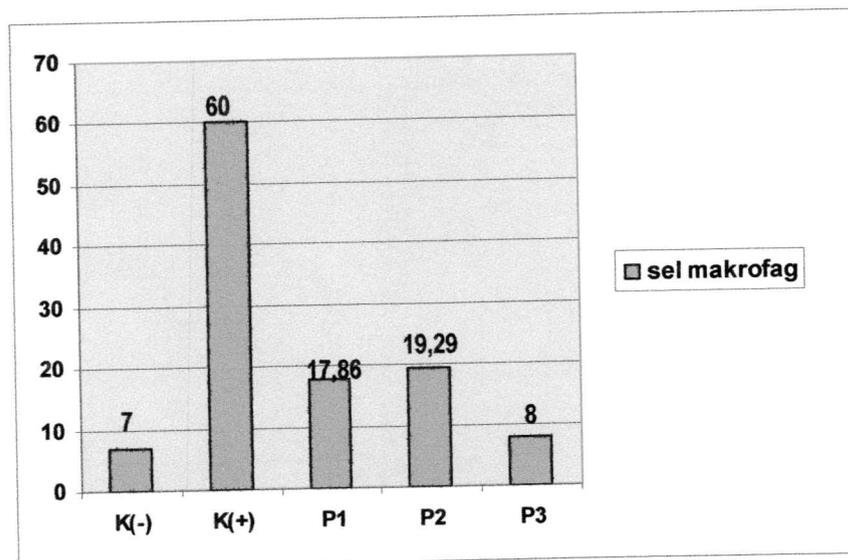
Tabel 5.3 Hasil uji homogenitas (uji *Levene*)

Variabel	Levene Statistic	df1	df2	Sig
Jumlah sel makrofag	1,209	4	30	0,327
Jumlah sel limfosit	0,981	4	30	0,432
Jumlah sel plasma	1,657	4	30	0,186

5.4. Jumlah Sel Makrofag

Berdasarkan hasil analisis statistik data penelitian, menunjukkan bahwa data jumlah sel makrofag mempunyai distribusi yang normal (menurut uji *Kolmogorov-Smirnov*; $p > 0,05$), lihat tabel 5.2, dan varians yang homogen (menurut uji *Levene*; $p > 0,05$), lihat tabel 5.3.

Rata-rata jumlah sel makrofag pada kelompok K (-), kelompok K (+), kelompok P1, kelompok P2 dan kelompok P3 berturut-turut adalah $7,00 \pm 4,43$; $60,00 \pm 12,11$; $17,86 \pm 9,67$; $19,29 \pm 8,20$; $8,00 \pm 7,12$, lihat gambar 5.2.



Gambar 5.2. Grafik rata-rata jumlah sel makrofag menurut kelompok

Hasil analisis *univariate* menunjukkan bahwa jumlah sel makrofag masing-masing kelompok perlakuan terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) seperti terlihat pada tabel 5.4.

Tabel 5.4. Hasil uji ANOVA

	F	Sig
Jumlah sel makrofag	43,751	0.000

Setelah melalui uji *LSD* (tabel 5.5) terdapat rincian hasil yang bervariasi antar masing-masing kelompok. Adanya perbedaan yang sangat bermakna ditunjukkan pada kelompok K(+) yang dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang lain ($p=0,000$), sedangkan pada kelompok K (-) yang dibandingkan kelompok K (+), kelompok ekstrak jinten hitam dosis 1 (P1), dan kelompok ekstrak jinten hitam dosis 2 (P2) menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p<0,05$). Hasil yang menunjukkan perbedaan bermakna juga ditunjukkan pada kelompok P1 yang dibandingkan dengan kelompok P3.

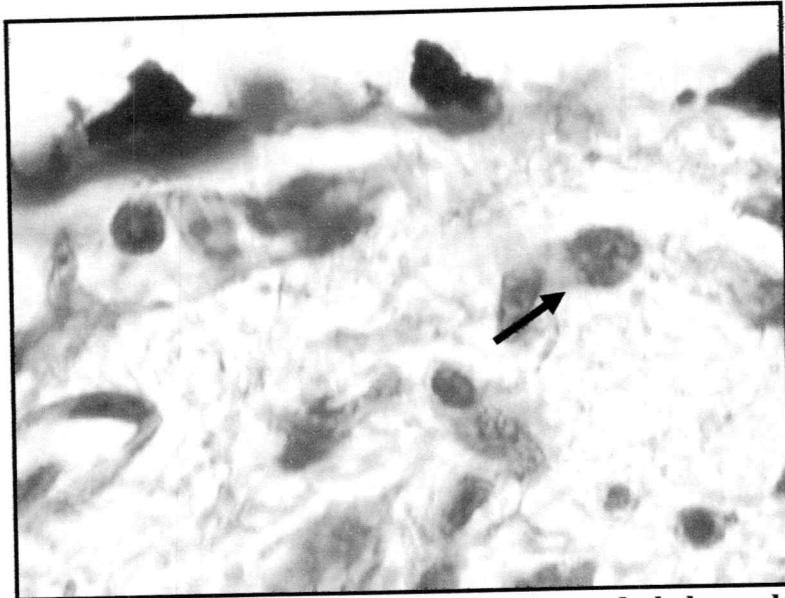
Tabel 5.5 Hasil uji LSD sel makrofag

Perbandingan Antar Kelompok		Jumlah sel makrofag
K (-)	K (+)	.000*
	P1	.026*
	P2	.013*
	P3	.831
K (+)	K(-)	.000*
	P1	.001*
	P2	.000*
	P3	.000*
P1	K(-)	.026*
	K(+)	.000*
	P2	.761
	P3	.042*
P2	K(-)	.013*
	K (+)	.000*
	P1	.761
	P3	.021*
P3	K(-)	.831
	K (+)	.000*
	P1	.042*
	P2	.021*

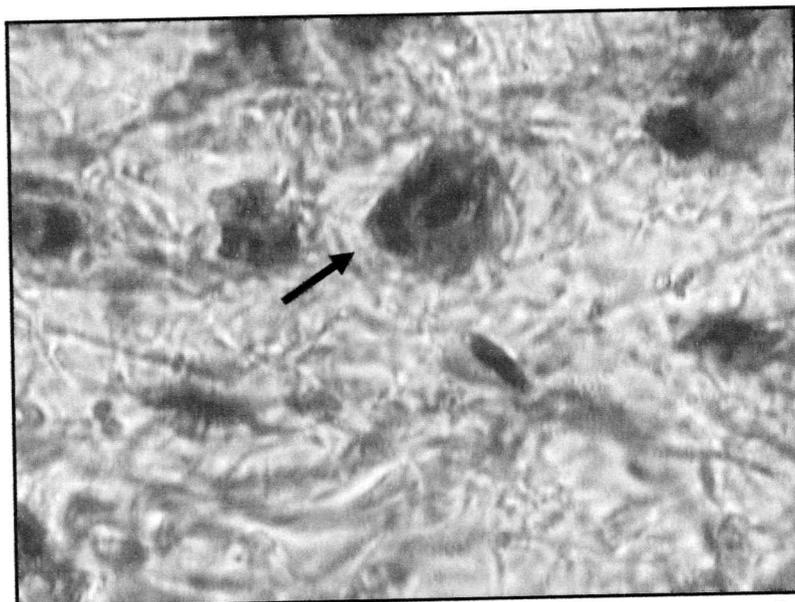
Uji *LSD* pada variabel sel makrofag juga ada yang menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna. Hal tersebut dapat dilihat pada kelompok K(-) yang

dibandingkan dengan kelompok P3 ($p=0,831$) dan kelompok P1 yang dibandingkan dengan kelompok P2 ($p=0,761$).

Pada pengamatan daya ingestion yang menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000 kali tampak adanya *giant cell* pada kelompok perlakuan yang menunjukkan adanya peningkatan fagositosis (gambar 5.1.).



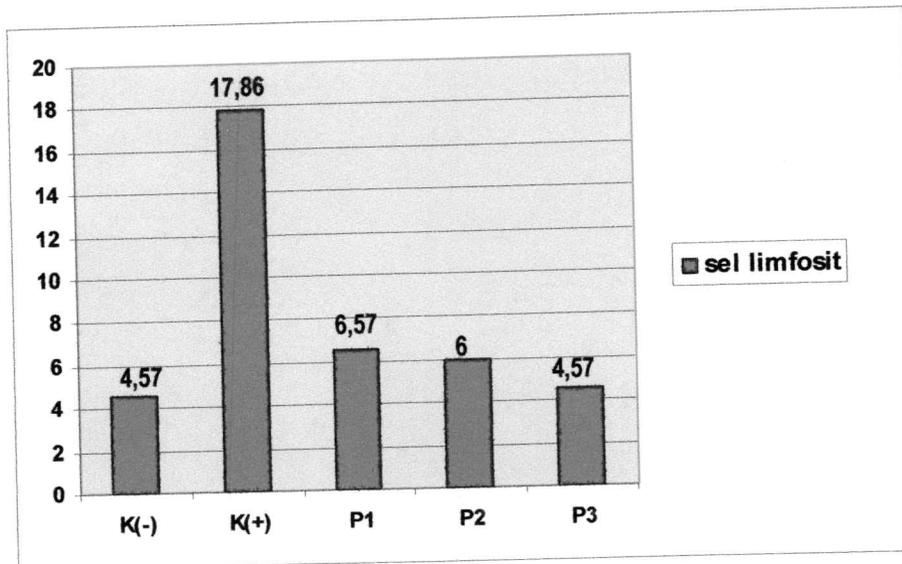
Gambar 5.3. Daya ingesti sel makrofag pada kelompok kontrol positif dengan pembesaran 1000x dan pewarnaan HE



Gambar 5.4. Daya ingesti sel makrofag pada kelompok pemberian ekstrak biji jinten hitam dengan pembesaran 1000x dan pewarnaan HE

5.5. Jumlah Limfosit

Hasil analisis statistik data penelitian, menunjukkan bahwa data jumlah sel limfosit mempunyai distribusi yang normal (menurut uji *Kolmogorov-Smirnov*; $p > 0,05$), lihat tabel 5.2, dan varians yang homogen (menurut uji *Levene*; $p > 0,05$), lihat tabel 5.3.



Gambar 5.5. Grafik rata-rata jumlah sel limfosit menurut kelompok
Rata-rata jumlah sel limfosit pada kelompok K (-), kelompok K (+), kelompok

P1, kelompok P2 dan kelompok P3 berturut-turut adalah $4,57 \pm 2,44$; $17,86 \pm 4,10$; $6,57 \pm 3,21$; $6,00 \pm 2,77$; $4,57 \pm 3,78$, lihat gambar 5.5.

Hasil analisis *univariate* menunjukkan bahwa jumlah limfosit masing-masing kelompok perlakuan terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) seperti terlihat pada tabel 5.6.

Tabel 5.6. Hasil uji ANOVA limfosit

	F	Sig
Jumlah limfosit	20,153	0.000

Pada uji *LSD* (tabel 5.7.) yang berfungsi untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan menunjukkan adanya perbedaan yang sangat bermakna pada kelompok K(+) yang dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang lain ($p = 0,000$).

Sedangkan pada kelompok K (-) yang dibandingkan P1, kelompok P2 dan kelompok P3 tidak menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna ($p>0,05$). Begitu pula pada perbandingan antar masing-masing kelompok pemberian ekstrak biji jinten hitam.

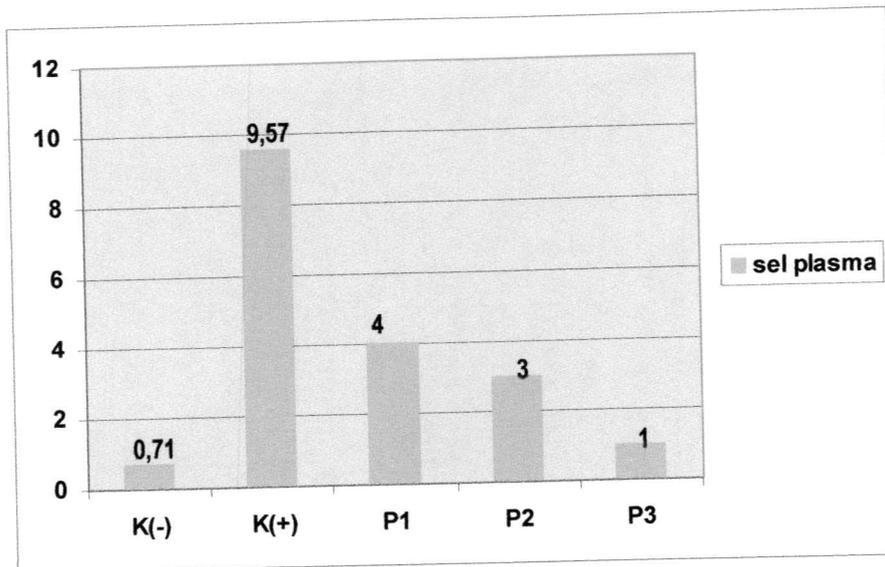
Tabel 5.7. Hasil uji LSD limfosit

Perbandingan Antar Kelompok		Jumlah sel limfosit
K (-)	K (+)	.000*
	P1	.268
	P2	.427
	P3	1.000
K (+)	K(-)	.000*
	P1	.000*
	P2	.000*
	P3	.000*
P1	K(-)	.268.
	K(+)	.000*
	P2	.749
	P3	.268
P2	K(-)	.427
	K (+)	.000*
	P1	.749
	P3	.427
P3	K(-)	1.000
	K (+)	.000*
	P1	.268
	P2	.427

5.6. Jumlah Sel Plasma

Hasil analisis statistik data penelitian, menunjukkan bahwa data jumlah sel plasma mempunyai distribusi yang normal (menurut uji *Kolmogorov-Smirnov*; $p>0,05$), lihat tabel 5.2, dan varians yang homogen (menurut uji *Levene*; $p>0,05$), lihat tabel 5.3.

Rata-rata jumlah sel plasma pada kelompok K(-), kelompok K(+), kelompok P1, kelompok P2 dan kelompok P3 berturut-turut adalah $0,71 \pm 0,76$; $9,57 \pm 2,15$; $4,00 \pm 1,41$; $3,00 \pm 1,41$; $1,00 \pm 1,15$, lihat grafik 5.6.



Gambar 5.6. Grafik rata-rata jumlah sel plasma menurut kelompok

Hasil analisis *univariate* menunjukkan bahwa jumlah sel plasma masing-masing kelompok perlakuan terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) seperti terlihat pada tabel 5.8.

Tabel 5.8. Hasil uji ANOVA sel plasma

	F	Sig
Jumlah sel plasma	42,611	0.000

Pada hasil analisa uji *LSD* variabel jumlah sel plasma kelompok K(+) yang dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang lain menunjukkan adanya perbedaan yang sangat bermakna ($p = 0,000$). Hasil yang menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna juga ditunjukkan kelompok K (-) yang dibandingkan dengan kelompok K (+), kelompok P1, dan kelompok P2 ($p < 0,05$). Selain itu perbedaan bermakna juga ditunjukkan pada kelompok P1 yang dibandingkan dengan kelompok P3.

Uji *LSD* pada variabel sel makrofag juga ada yang menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna. Hal tersebut dapat dilihat pada kelompok K(-) yang dibandingkan dengan kelompok P3 ($p = 0,715$) dan kelompok P1 yang dibandingkan dengan kelompok P2 ($p = 0,207$). Lihat tabel 5.9.

Tabel 5.9. Hasil uji LSD sel plasma

Perbandingan Antar Kelompok		Jumlah sel plasma
K (-)	K (+)	.000*
	P1	.000*
	P2	.006*
	P3	.715
K (+)	K(-)	.000*
	P1	.000*
	P2	.000*
	P3	.000*
P1	K(-)	.000*
	K(+)	.000*
	P2	.207
	P3	.001*
P2	K(-)	.006*
	K (+)	.000*
	P1	.207
	P3	.015*
P3	K(-)	.715
	K (+)	.000*
	P1	.001*
	P2	.015*

BAB 6

PEMBAHASAN

Tujuan penelitian ini adalah untuk membuktikan pengaruh ekstrak biji jinten hitam terhadap penurunan jumlah sel radang kronik pada jaringan ikat gingiva mencit yang diinduksi periodontopatogen. Sel radang kronik merupakan manifestasi inflamasi kronik yang dapat dilihat melalui gambaran histopatologi, yang salah satunya ditandai dengan infiltrasi sel mononuklear (makrofag, limfosit dan sel plasma).

6.1. Sel makrofag

Pada penelitian ini penghitungan jumlah sel makrofag digunakan sebagai parameter terjadinya kondisi inflamasi kronik. Hal ini disebabkan keberadaannya paling banyak ditemukan dalam suatu inflamasi kronik, karena berada di posisi terbaik dalam melawan bakteri yang hidup di sel-sel tuan rumah dan juga melalui jalur aktivasi komplemen. Di bawah rangsangan aktivasi komplemen, makrofag mempersiapkan suatu pola peristiwa seluler yang memperkuat jalur yang diperantarai sel mast sehingga akan terjadi peradangan akut lagi, dengan munculnya mediator-mediator proinflamasi (Roitt, 2003). Peristiwa seluler ini juga terjadi melalui biosintesa mediator yang mempunyai peran penting dalam menjelaskan dan menghasilkan mediator lipid dalam suatu proses inflamasi dan berperan penting dalam perkembangan mekanisme inflamasi (Fierro and Serhan, 2001).

Hal ini terbukti dengan banyaknya jumlah sel makrofag yang ditemukan pada kelompok kontrol positif dibandingkan kelompok lain yang telah diinduksi bakteri periodontopatogen. Namun pada kelompok kontrol positif tidak diberi pengobatan untuk mencegah inflamasi lebih lanjut.

Selain rangsangan melalui jalur aktivasi komplemen, aktivasi makrofag dapat dilakukan oleh mediator yang dilepaskan oleh limfosit (limfokin) yang dirangsang oleh antigen atau oleh endotoksin (Subowo, 2002). Hal ini berarti peningkatan jumlah limfosit akan berpengaruh terhadap aktivasi makrofag. Terbukti seiring dengan menurunnya limfosit maka jumlah makrofag juga semakin turun.

Pencegahan dan pengobatan penyakit periodontal akhir-akhir ini diupayakan melalui pembentukan LX yang merupakan produk yang dihasilkan melalui sintesa asam arachidonat. LX ini mulai banyak diteliti sebagai mediator lipid endogen yang mampu berfungsi sebagai antiinflamasi, karena produk yang dihasilkan dari jalur ini akan berfungsi menghambat LTB_4 yang bertugas untuk memproduksi neutrofil dan aktivasi mononuklear lebih banyak yang dapat menimbulkan peradangan akut lagi dan memicu timbulnya mediator proinflamasi lain yang mengarah pada kerusakan jaringan lebih lanjut (Martell-Pelletier, 2003 ; Kantarci *and* Van dyke, 2003). Lipoxin dapat memicu aktivitas makrofag melalui analognya LXA_4 dan LXB_4 , dengan cara mengubah perangai makrofag menjadi lebih bersifat fagositik. Hal ini akan berdampak dalam mengawali dan mengatur respon pertahanan tubuh yang akan mempercepat proses penyembuhan luka (Subowo, 2002).

Jinten hitam (*Nigella sativa*) merupakan tanaman obat yang banyak mengandung *PUFA* (asam linoleat) untuk dapat membentuk asam arachidonat lebih banyak yang sehingga membantu memproduksi LX sebagai antiinflamasi endogen yang meningkatkan aktivasi sel makrofag / monosit jaringan dan mengatur proses inflamasi kronis sehingga dapat mempercepat proses penyembuhan luka (Kantarci *and* Van Dyke, 2003 ; Fierro *and* Serhan, 2001).

Selain itu jinten hitam mempunyai kandungan *thymoquinone* yang membantu menghambat jalur COX dan 5-LO (Houghton *et al*, 1995). Hal ini terbukti pada

kelompok yang diberi ekstrak jinten hitam menunjukkan jumlah sel makrofag yang lebih kecil dibanding kelompok kontrol positif. Lihat grafik 5.2.

Pemberian ekstrak biji jinten hitam dengan dosis 600 mg/kgBB, 1200 mg/kgBB dan 2400 mg /kgBB per hari pada mencit setelah 12 jam induksi periodontopatogen, ternyata dapat menurunkan jumlah sel makrofag secara bermakna ($P_1=17,85\pm 9,67$; $P_2=19,29\pm 8,20$; $P_3=8,00\pm 7,12$), sehingga jumlah sel makrofagnya lebih kecil dibanding kelompok yang diinduksi periodontopatogen saja. ($K (+)=60,00\pm 12,11$). Kelompok P1 dengan pemberian ekstrak biji jinten hitam dosis 600 mg/kgBB menyebabkan penurunan jumlah sel makrofag ($p=0,000$) dibandingkan kelompok yang diinduksi periodontopatogen saja ($K(+)$) dan bila dibandingkan dengan $K(-)$ juga masih terdapat perbedaan bermakna yang berarti kemampuannya penurunan masih kurang. Namun bila dibandingkan dengan kelompok P2 tidak ada perbedaan yang berarti kenaikan dosis ekstrak biji jinten hitam sebesar 1200 mg/kgBB pada kelompok P2 tidak memberikan penurunan yang berarti ($p=0,761$).

Hal yang sama juga terjadi pada kelompok P2 yang dibandingkan dengan kelompok $K (-)$ dan $K (+)$. Namun ada perbedaan yang bermakna bila dibandingkan dengan kelompok P3.

Pada kelompok P3 pemberian ekstrak biji jinten hitam dosis 2400 mg/kgBB/hari juga menyebabkan penurunan jumlah sel makrofag yang bermakna ($p < 0,05$) dibandingkan kelompok $K+, P_1$ dan P_2 . Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak biji jinten hitam dosis 600 mg/kg BB/hari selama 4 hari sudah dapat menghambat mekanisme LTB_4 yang berperan mengaktifkan makrofag secara bermakna akibat induksi periodontopatogen. ($p < 0,05$). Perbedaan yang tidak bermakna terjadi antara kelompok $K(-)$ dengan P3 ($p=0,831$). Hal ini berarti bahwa

penggunaan dosis 2400 mg/kgBB/hari benar-benar dapat menghambat aktivasi makrofag sehingga proses inflamasi lebih lanjut tidak terjadi.

6.2. Limfosit

Limfosit berperan dalam menghadapi antigen, seperti toksin bakteri, yang masuk ke gingiva untuk dieliminasi. Ada 2 limfosit yang berperan respon imun lokal di daerah celah gusi, yaitu limfosit T dan limfosit B. Limfosit T akan menghadapi antigen yang masuk dengan memproduksi limfokin dan mediator ini akan mengaktivasi, menarik dan menghambat migrasi makrofag. Namun dengan bantuan protein dalam tubuh yang menimbulkan efek imunomodulator, tanpa bantuan limfosit T, antigen dapat merangsang limfosit B untuk berproliferasi untuk memproduksi imunoglobulin dan membentuk sel memori. (Roeslan, 2002 ; Gilani *et al*, 2004).

Namun dengan alasan yang belum diketahui, pada gingivitis dan periodontitis berat, respon lokal limfosit T terhadap antigen plak sangat kecil. Kerusakan jaringan pada kelainan periodontal mungkin dimediasi oleh limfokin, termasuk faktor aktivasi osteoklas, hormone paratiroid dan prostaglandin. Hal ini terbukti pada gambaran histopatologi penelitian ini jumlah sel limfosit yang diamati tidak sebanyak makrofag. (Roeslan, 2002) Lihat tabel 5.1. dan grafik 5.1.

Makrofag berperan besar dalam mengawasi dan mengatur respon imun. Peran tersebut berlangsung dalam memproses dan menyajikan antigen kepada limfosit dan dalam kemampuannya menghasilkan IL-1, agar limfosit menerima sinyal yang selanjutnya menjadi aktif (Subowo, 2002). Hal ini seperti yang digambarkan pada sediaan histopatologi antara kelompok pemberian ekstrak biji jinten hitam (P1, P2, P3) yang menunjukkan penurunan sel makrofag dan limfosit dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Lihat grafik 5.1. dan 5.3.

Pemberian ekstrak biji jinten hitam dengan dosis 600 mg/kgBB, 1200 mg/kgBB dan 2400 mg /kgBB per hari pada mencit setelah 12 jam induksi periodontopatogen, secara rerata dapat menurunkan jumlah sel limfosit ($P1=6,57\pm 3,20$; $P2=6,00\pm 2,77$; $P3=4,57\pm 3,77$), dibandingkan kelompok yang diinduksi periodontopatogen saja. ($K (+)=17,86\pm 4,10$). Setelah melalui uji Anova memang terlihat adanya perbedaan yang bermakna antar perlakuan. Pada hasil uji LSD ditemukan data yang lebih detail tentang hasil perbandingan antar kelompok dimana kemampuan semua kelompok pemberian ekstrak biji jinten hitam menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna dengan kelompok K (+). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak biji jinten hitam mampu menurunkan jumlah limfosit tanpa memperhatikan dosis besar atau kecil. Ini bisa berarti makrofag dengan cepat memproses dan menyajikan antigen kepada limfosit agar limfosit menerima sinyal yang selanjutnya menjadi aktif dan segera diteruskan dengan bertransformasi membentuk sel plasma atau berarti sebaliknya karena makrofag sudah mampu memfagositir antigen yang masuk karena tidak bersifat spesifik (Subowo, 2002).

6.3. Sel Plasma

Sel plasma merupakan sel efektor limfosit-B yang mengalami transformasi karena harus mengimbangi antigen untuk membentuk antibodi yang berjumlah jutaan melalui gelombang proliferasi. Fungsi utama sel plasma adalah memproduksi imunoglobulin yang akan disekresikan ke dalam serum dan jaringan, sehingga dapat melindungi tubuh dari gangguan imunogen (McMahon and Sloan, 2000 ; Roitt, 2003).

Pada kandungan jinten hitam terdapat protein, dimana protein ini dapat mempercepat timbulnya efek imunomodulator, sehingga kemungkinan dapat merangsang lebih cepat terbentuknya imunoglobulin melalui pembentukan limfosit B.

(Hu *et al*, 1992 *cit* Arundina, 2002) Hal ini terbukti dimana pada kelompok yang diberi ekstrak jinten hitam menunjukkan penurunan jumlah sel lebih yang lebih kecil dibanding kelompok kontrol positif.

Pemberian ekstrak biji jinten hitam dengan dosis 600 mg/kgBB, 1200 mg/kgBB dan 2400 mg /kgBB per hari pada mencit setelah 12 jam induksi periodontopatogen, ternyata dapat menurunkan jumlah sel plasma. Hal ini terlihat secara bermakna ($p=0.000$), sehingga jumlah sel plasmanya lebih kecil dibanding kelompok yang diinduksi periodontopatogen saja. (K (+)). Perbedaan yang bermakna terjadi pada masing-masing kelompok P1, P2 dan P3 dalam menurunkan jumlah sel plasma. Hal yang berbeda terjadi pada variabel limfosit. Hal ini menunjukkan dugaan bahwa limfosit B sangat cepat mengalami transformasi ke dalam sel plasma, karena tubuh mendapat asupan protein yang sangat banyak dari ekstrak biji jinten hitam, dimana hasil yang maksimal ditunjukkan pada kelompok P3.

Penurunan jumlah sel plasma pada masing-masing kelompok pemberian ekstrak biji jinten hitam ini disebabkan karena makrofag yang dapat merangsang aktivitas limfosit juga mengalami penurunan, sehingga pembentukan limfosit menjadi sel plasma juga menurun.

BAB 7

SIMPULAN DAN SARAN

7.1. Simpulan

Pemberian ekstrak biji jinten hitam dapat menghambat proses inflamasi dengan :

1. Menurunkan jumlah sel makrofag pada jaringan ikat gingiva mencit yang diinduksi periodontopatogen
2. Menurunkan jumlah sel limfosit pada jaringan ikat gingiva mencit yang diinduksi periodontopatogen
3. Menurunkan jumlah sel plasma pada jaringan ikat gingiva mencit yang diinduksi periodontopatogen

7.2. Saran

Penelitian ini memang dapat membuktikan bahwa ekstrak biji jinten hitam dapat menurunkan jumlah sel radang kronik, namun kemungkinan dapat timbul masalah-masalah lain, sehingga diperlukan penelitian-penelitian lanjutan seperti :

1. Penelitian yang mempelajari farmakokinetik dan farmakodinamik ekstrak biji jinten hitam
2. Penelitian untuk efek samping karena pemberian dosis yang cukup besar pada organ-organ vital, seperti hepar, ginjal dan lain-lain
3. Perlunya dibuatkan obat yang bersifat topikal agar mekanisme kerja obat lebih efektif

DAFTAR PUSTAKA

- Aditama TJ. 2000. 10 Masalah tuberculosis dan penanganannya. *Jurnal Respirologi Indonesia*. p. 8 –12
- Al-Ghamdi M.S., 2001. The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of *Nigella sativa*. *J. Ethnopharmacol.*, 76: 45-48.
- Ali BH, G Blunden. 2003. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytother Res*. 17 (4) : 299-305,
- Al Jassir, MS. 1992. *Chemical composition of black cumin (Nigella sativa) seed growing in saudi arabia food chemistry*. Saudi Arabia. p 239-242.
- Amar S, X Han. 2003. The impact of periodontal infection on systemic disease. *Med Sci Monit*. 9(12): RA291-299
- Anonimous, 2006. Habbatussauda obat segala penyakit, kecuali mati. Available from : url : http://www.bio-asli.desaku.net/hs_sains.asp. Accessed February 8 2007.
- Anonimous, 2006. Lymphocyte. Available from : url : <http://www.encyclopedia-history,geographyandbiography.htm>. Accessed January 21 2007.
- Anonimous, 2006. Macrophage. Available from : url : <http://www.encyclopedia-history,geographyandbiography.htm>. Accessed January 21 2007.
- Anonimous, 2006. Plasma Cells. Available from : url : <http://www.encyclopedia-history,geographyandbiography.htm>. Accessed January 21 2007.
- Arundina I, 2002. Pengaruh catechin dari ekstrak teh hijau terhadap penurunan jumlah PMN dan IgG pada mencit yang dipapar *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* (Tesis). Fakultas Kedokteran Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga. Surabaya
- Avicena, 2000 Primary Properties of Black Seed. Available from : url : <http://www.blackseedusa.com/black.seed.htm>, Accessed Juni 20 , 2004
- Bartold PM, AS Narayanan. 1998. *Biology of the periodontal connective tissues*. Quintessence Publishing, Illinois
- Basir FA. 1998. *Nigella sativa*. USA. Kesseli Lab. Available from : url : <http://bio.umb.edu/index.htm>, Accessed Juni 12, 2004
- Boskabody HM, B Shirmohammadi, 2002. Effect of *Nigella sativa* on isolated guinea pig trachea, *Archives of Iranian Medicine*. 5 (2) : 103 – 107
- Bosshardt DD, NP Lang, 2005. The junctional epithelium: from health to disease. *J Dent Res*. 84(1):9-20

- Bodet C, F Chandad, D Grenier, 2006. Anti-inflammatory activity of a high-molecular-weight cranberry fraction on macrophages stimulated by lipopolysaccharides from periodontopathogens. *Journal of Dental Research*. 85 (3) : 235-239
- BPS. 1996. *Statistik kesejahteraan rakyat 1995*. Jakarta
- Burist M, F Bucar, 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. (Abstract) *Phytotherapy*. 14(5). 323 – 328
- Buttgereit F, GR Burmester, LS Simon, 2001. Gastrointestinal toxic side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2 specific inhibitors. *Am J Med*. 110 suppl 3A:13s-9s
- Campbell V, Halushka, 1996. Lipid-derived autacoids : Eicosanoids and platelet activating factors in *Goodman & Gilman's, The Pharmacological basis of therapeutics*. 9th ed. McGraw-Hill, New York., p. 601-602, 605-607.
- Delima AJ, S Karatzas, S Amar, DT Graves, 2002. Inflammation and tissue loss caused by periodontal pathogens is reduced by interleukin-1 antagonist. *The Journal of Infectious Diseases*. 186 (4) : 511
- Dharmananda S, 2003. Reducing inflammation with diet and supplements: The story of eicosanoid inhibition. may. Available from : url : <http://www.itmonline.org/arts/lox.htm>. Accessed July 4, 2005
- Ebersole JL, MA Taubman, 1994. The protective nature of host responses in periodontal disease. *Periodontol* 2000. 5: 112-141.
- Edesi-Neuss ZL, 2005. Prevalence analysis of putative periodontal pathogens In patients with aggressive periodontitis and healthy elderly A molecular study (*Dissertation*). Fakultät der Charité, Universitätsmedizin Berlin
- El-Dakhakhny M., N Mady, N Lembert, HP Ammon, 2002. The hypoglycemic effect of *Nigella sativa* oil is mediated by extrapancreatic actions. *Planta Medica Medica*, 68: 465-466.
- Fierro IM, CN Serhan, 2001. Mechanisms in anti-inflammation and resolution: the role of lipoxins and aspirin-triggered lipoxins. *Braz J Med Biol Res*. 34 (5): 555-566
- Gilani AH, Q Jabeen, MAU Khan. 2004. A Review of medicinal uses and pharmacological activities of *Nigella sativa*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 7 (4): 441-451
- Groeneveld AB, AN Tacx, AW Bossink, GJ van Mierlo, Hack CE, 2003. Circulating inflammatory mediators predict shock and mortality in febrile patients with microbial infection. *Clin Immunol*. 106:106-115.

- Hanafiah KA, 2003. *Rancangan percobaan, teori dan aplikasi*. Fakultas Pertanian universitas Sriwijaya palembang. Jakarta. PT Raja Grafindo Persada
- Haq A, PI Lobo, M Al-Tufail, NR Rama, ST Al-Sedairy, 1999. Immunomodulatory effect of *Nigella sativa* proteins fractionated by ion-exchange chromatography. *International. J. Immunopharmacol.* 21: 283-295.
- Hafernick M, 2000. *Cosmetic Dentistry, TMJ Therapy, Restorative Dentistry, Implant Dentistry*. Available from : url : <http://www.austindental.com/>. Accessed April 15, 2000
- Hartati, IB. 2001. Pengaruh ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa*) terhadap gambaran histopatologi trakea pada tikus wistar dengan diet atherogenik (*Skripsi*). Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
- Higgins JE, AP Klinbaum, 1985. *Determining sample size in introduction to randomized clinical trials*. USA: Family Health International, p 24-25.
- Hober D, L Poli, B Roblin, P Gestas, E Chungue, G Granic, et al, 1993. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in dengue-infected patients. *Am J Trop Med Hyg.* 48:324-331.
- Houghton PJ, R Zarka , B de las Heras , JR Hoult , 1995. Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation (Abstract). *Planta Med.* Feb;61(1):33-6.
- Kantarci A, TE Van Dyke, 2003. Lipoxin in chronic inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 14(1):4-12
- Kantarci A, TE Van Dyke, 2005. Resolution of inflammation in periodontitis. *J Periodontol.* 76(11 Suppl): 2168-2174.
- Kasule OH, 2000. *Prophetic Medicine: Between The Nash and Empirical Experience*. Available from : url : <http://www.missionislam.com/health/prophetic.htm>. Accessed Februari 27 2006.
- Kimura S, 2005. Pathogenesis and symptoms of human periodontal disease. *Foods Food Ingredient J. Japan.* 210 (4)
- Lanzmann-Petithory D, 2001. Alpha-linolenic acid and cardiovascular diseases. *J Nutr Health Aging* 5:179-183.
- Levy O, G Canny, CN Serhan, SP Colgan, 2003. Expression of BPI (bactericidal/permeability-increasing protein) in human mucosal epithelia. *Biochem Soc Trans.* 31:795-800.
- Liébana J, AM Castillo, M Álvarez, 2004. Periodontal disease : microbiological consideration. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 9 Suppl : S75-91

- Mahanonda R, N Sa-Ard-Iam, O Charatkulangkun, A Promsudthi, RE Schifferle, K Yongvanichit, S Pichyangkul, 2004. Monocyte Activation by Porphyromonas gingivalis LPS in Aggressive Periodontitis with the Use of Whole-blood Cultures. *J Dent Res.* 83(7):540-545
- Mahmood MS, AH Gilani, A Khwaja, A Rashid, AH Gilani, 2003. The in vitro effect of aqueous extract of *Nigella sativa* seeds on Nitric Oxide Production. *Phytotherapy Res.*, 17: 921-924
- Martel-Pelletier J, D Lajeunesse, P Reboul, J-P Pelletier, 2003. Therapeutic role of dual inhibitors of 5-LOX and COX, selective and non-selective non steroidal anti-inflammatory drugs. *Ann Rheum Dis.* 62 : 501-509
- May J, B Lell, AJ Luty, CG Meyer, PG Kremsner, 2000. Plasma interleukin-10: tumor necrosis factor (TNF)-alpha ratio is associated with TNF promoter variants and predicts malarial complications. *J Infect Dis.* 182:1570-1573.
- Mayes PA, 1999. Metabolisme asam lemak tak jenuh dan eikosanoid dalam *Biokimia Harper*. Alih bahasa : Hartono A. edisi 24. Penerbit buku kedokteran EGC. Jakarta : 246
- McMahon RFT, P Sloan, 2000. *Essentials of pathology for dentistry*. Churchill Livingstone. China
- Meyer-Kirchrat J, K Schror, 2000. Cyclooxygenase-2 inhibition and side effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the gastrointestinal tract. *Curr Med Chem.* 7(11):1121-9
- Miyasaki K, 2006. Periodontal Immunology. Available from : url <http://www.egasmoniz.edu.pt/ficheiros/alunos/imunologia.oral/imunologia.periodontal.ingles.pdf>. Accessed Februari 27 2006.
- Moore WEC, LVH Moore, 1994. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 5: 66-77.
- Mutabagani A, SAM El-Mehdy, 1997. A study of the anti-inflammatory activity of *Nigella sativa* and thymoquinone in rats. *Saudi Pharmaceutical J.* 5: 110-113.
- Newman MG, HH Takei, FA Carranza. 2002. *Carranza's clinical Periodontology*. 9th ed. WB Saunders Co. Philadelphia.
- O'Banion MK, 1999. Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology. *Crit Rev Neurobiol.* 13:45-82.
- Offenbacher S, GE Salvi, 1999. Induction of prostaglandin release from macrophages by bacterial endotoxin. *Clin Infect Dis.* 28:505-513.
- Paquette DW, RC Williams, 2000. Modulation of host inflammatory mediators as a treatment strategy for periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 24 : 239-252.

- Pouliot M, CB Clish, NA Petasis, TE Van Dyke, CN Serhan, 2000. Lipoxin A4 analogues inhibit leukocyte recruitment to *Porphyromonas gingivalis*: a role for cyclooxygenase-2 and lipoxins in periodontal disease. *Biochemistry* 39:4761-4768.
- Prasiska OT. 2004. Pengaruh pemberian ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa*) terhadap kadar malondialdehide hepar tikus wistar yang dipapar asap rokok kronis (*Skripsi*). Fakultas Kedokteran Brawijaya, Malang
- Randhawa MA, MS Al-Ghamdi. 2002. A review of the pharmaco-therapeutic effects of *Nigella sativa*. *Pakistan J. Med. Res.* Vol.41, No.2
- Rivers JP, TL Frankel, 1981. Essential fatty acid deficiency. *Br MedBull.* 37:59-64.
- Roeslan BO, 2002. *Imunologi oral, kelainan di dalam rongga mulut*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta
- Roitt I, 2003. *Imunologi*. Ed. 8. Ali bahasa : Harahap A et al, Widya Medika. Jakarta
- Sari RP, 2003. Penggunaan *selective cox-2 inhibitor* di bidang kedokteran gigi : indikasi dan komplikasi. *Majalah Kedokteran Gigi*. edisi Khusus Temu Ilmiah Nasional III. 52 : 197 - 200
- Sari RP, S Revianti, 2006. Pengaruh pemberian ekstrak *nigella sativa* terhadap kadar malondialdehyde pada tikus yang mengalami inflamasi. *Denta Jurnal*. 1(1) :23-29
- Schluger S, RA Yuodelis, RC Page, 1990. *In periodontal disease*. 3rd ed. Philadelphia : Lea & Febiger.
- Serhan CN, A Jain, S Marleau, C Clish, A Kantarci, B Behbehani, et al, 2003. Reduced Inflammation and Tissue Damage in Transgenic Rabbits Overexpressing 15-Lipoxygenase and Endogenous Anti-inflammatory Lipid Mediators. *The Journal of Immunology*. 171: 6856-6865.
- Socransky SS, 1970. Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. *J Dent Res*. 49(2): 203-222.
- Subowo, 2002. *Imunobiologi*. Penerbit Angkasa. Bandung. 151-160
- Sufrida Y, J Edi, 2006. *Sembuhkan penyakit dengan habbatussauda (Jinten hitam)*. Agromedia Pustaka. Jakarta. 9-34
- Van Dyke TE, CN Serhan, 2003. Resolution of Inflammation: A New Paradigm for the Pathogenesis of Periodontal Diseases. *J Dent Res*. 82(2): 82-90
- Wallace JM, 2002. Nutritional and botanical modulation of the inflammatory cascade-eicosanoids, cyclooxygenases and lipoxygenases-as an adjunct in cancer therapy. *Integrative cancer therapies*. 1 (1) : 7-37

Zarka R, 1996. *Nigella sativa* : Investigation of anti-inflammatory activity and literature review. *JIMA*. 28 : 56-62

Lampiran 1.**PENENTUAN JUMLAH RELIKASI**

Besar sampel minimal ditentukan berdasarkan rumus (Hanafiah, 2003) :

$$(k - 1) (r - 1) \geq 15$$

Keterangan :

k = jumlah kelompok

r = replikasi, ulangan

maka hasil yang didapat : $(5 - 1) (r - 1) \geq 15$

$$4 r \geq 15$$

$$r \geq 15 / 4$$

$$r \geq 3,75$$

Jadi jumlah replikasi minimal per kelompok adalah 4

Namun dalam penelitian kemungkinan bisa terjadi kesalahan yang menyebabkan hewan coba mati atau terjadi kesalahan sewaktu proses akhir pemeriksaan, kesalahan / kelalaian tersebut dianggap sekitar 20% (f), maka jumlah replikasi dikoreksi dengan menggunakan rumus (Higgins dan Klimbaum, 1985):

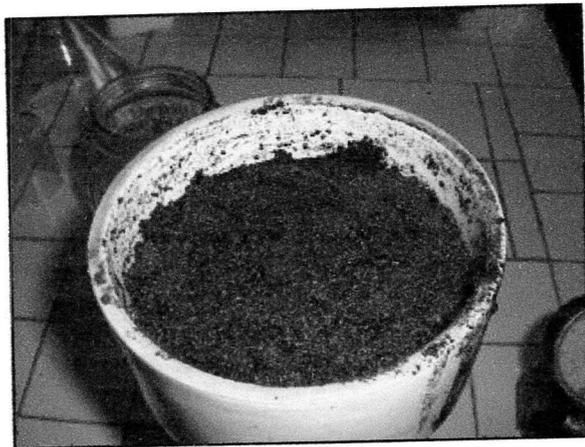
$$(1 / 1 - f) X r$$

Maka didapatkan : $\frac{1}{1 - 20\%} X 5 = 1,25 X 5 = 6,25 \approx 7$

Jadi jumlah replikasi tiap kelompok perlakuan adalah 7.

Lampiran 2.**CARA PEMBUATAN EKSTRAKSI BIJI NIGELLA SATIVA
METODE SOHLET**

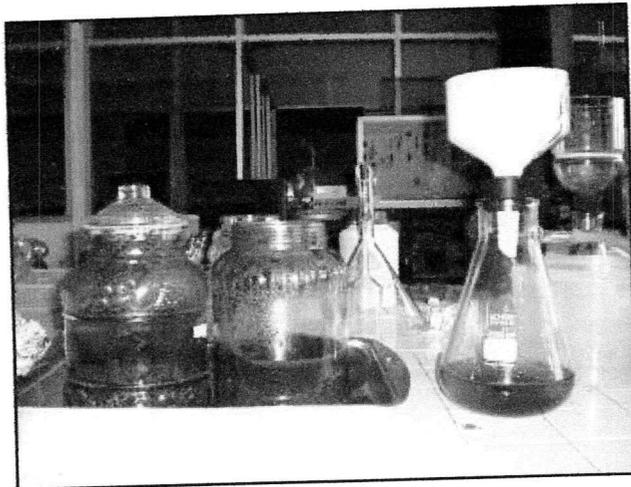
1. Nigella sativa dihaluskan dengan blender hingga menyerupai bubuk, kemudian ditimbang dengan timbangan analitik (misal a gr).



2. Selanjutnya direndam dengan ethanol 96% (a ml) selama 1 hari, terlindung dari cahaya sambil diaduk berulang-ulang lalu disaring dan diperas. Ampas saringan direndam lagi dengan ethanol selama 1 hari. Hal ini dilakukan berulang-ulang selama 5 hari terhitung perendaman pertama.



3. Hasil saringan (filtrate) yang didapat dicuci dengan ethanol 96% kembali kemudian dipindahkan ke dalam bejana tertutup, dibiarkan di tempat yang sejuk, terlindung dari cahaya matahari selama 2 hari. Setelah itu disaring kembali.



4. Tahap selanjutnya adalah penyulingan dengan menggunakan mesin *rotary evaporator* pada tekanan rendah dengan suhu tidak lebih dari 50° C hingga didapatkan ekstrak yang kental dengan asumsi seluruh kandungan ethanol telah menguap.



5. Selanjutnya untuk mendapatkan ekstrak biji *Nigella sativa* yang steril untuk dikonsumsi, maka dilakukan penyaringan dengan menggunakan mikroporous membrane dengan diameter $0,02 \mu\text{m}$.

Lampiran 3.**PENENTUAN DOSIS EKSTRAK BIJI JINTEN HITAM PADA MENCIT**

Pada penelitian terdahulu tentang antioksidan dan inflamasi pada tikus didapatkan hasil bahwa dosis pemberian ekstrak biji jinten hitam yang paling efektif adalah 2400 mg/kgBB per hari. Oleh karena pada penelitian ini menggunakan mencit sebagai hewan coba, maka perlu dikonversikan dosis tersebut di atas dengan kondisi mencit, yaitu 0,14. Jadi untuk dosis 2400 mg/kgBB per hari pada tikus sama dengan : $2400 \times 0,14 = 336$ Untuk memudahkan penghitungan maka dosis tersebut dibulatkan menjadi 300 mg/kgBB/hari

Sebelum dilakukan penelitian eksperimental, telah dilakukan uji coba dengan menggunakan dosis tersebut di atas (300 mg), 2 kali lipat (600 mg) dan 3 kali lipat (1200 mg). Hasilnya menunjukkan bahwa dengan dosis 1200 mg menunjukkan hasil yang lebih efektif. Oleh karena itu pada penelitian ini digunakan dosis 1200 mg sebagai dosis tengah. Jadi pembagian kelompok perlakuan adalah

1. Dosis 600 mg/kgBB/hari
2. Dosis 1200 mg/kgBB/hari
3. Dosis 2400 mg/kgBB/hari

Jumlah biji jinten hitam yang akan dibuat ekstrak sebanyak 2 kg yang menghasilkan ekstrak biji jinten hitam sebanyak 535 gram yang terdiri dari liquid (405 g = 75,7%) dan endapan atau gel (130 g = 24,3%)

Karena ekstrak tidak homogen dan pemberian dengan dosis terbagi menghasilkan jumlah yang sangat kecil sehingga menyebabkan kesulitan dalam pemberian, maka perlu dicampur dengan Na CMC 0,5%. Serta untuk memudahkan pemberian maka digunakan

perbandingan berat badan mencit dan jumlah ekstrak biji jinten hitam yang telah dilarutkan Na CMC 0,5% dengan satuan volume milliliter (ml/cc).

Kelompok perlakuan 1 (P1), dengan dosis 600 mg / kg BB / hari :

Misal asumsi berat tikus 30 gram yang berarti diperlukan pemberian dosis :

$$\frac{600 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} = \frac{a \text{ mg}}{30 \text{ g}} \quad a = 18 \text{ mg}$$

Karena terbagi dalam tiga (3) kali pemberian, maka setiap kali pemberian hanya diberikan 6 mg saja yang dilarutkan dalam Na CMC 0,5% hingga mencapai 0,3 cc. Jadi perlu larutan ekstrak biji jinten hitam minimal sebanyak 25,2 cc (0,3 cc X 7 mencit X 4 hari X 3 kali pemberian).

Untuk memudahkan pembuatan dan menghindari adanya kejadian yang tidak diinginkan (tumpah atau pecah) dalam proses pelaksanaan, maka pembuatan dilakukan sebagai berikut :

$$\frac{6 \text{ mg}}{0,3 \text{ cc}} = \frac{600 \text{ mg}}{30 \text{ cc}}$$

Jadi diperlukan 600 mg ekstrak biji jinten hitam yang dilarutkan Na CMC 0,5% hingga tercapai larutan ekstrak biji jinten hitam sebanyak 30 cc.

Kelompok perlakuan 2 (P2), dengan dosis 1200 mg / kg BB / hari :

Misal asumsi berat tikus 30 gram yang berarti diperlukan pemberian dosis :

$$\frac{1200 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} = \frac{a \text{ mg}}{30 \text{ g}} \quad a = 36 \text{ mg}$$

Karena terbagi dalam tiga (3) kali pemberian, maka setiap kali pemberian hanya diberikan 12 mg saja yang dilarutkan dalam Na CMC 0,5% hingga mencapai 0,3 cc. Jadi perlu larutan ekstrak biji jinten hitam minimal sebanyak 25,2 cc (0,3 cc X 7 mencit X 4 hari X 3 kali pemberian).

Untuk memudahkan pembuatan dan menghindari adanya kejadian yang tidak diinginkan (tumpah atau pecah) dalam proses pelaksanaan, maka pembuatan dilakukan sebagai berikut :

$$\frac{12 \text{ mg}}{0,3 \text{ cc}} = \frac{1200 \text{ mg}}{30 \text{ cc}}$$

Jadi diperlukan 1200 mg ekstrak biji jinten hitam yang dilarutkan Na CMC 0,5% hingga tercapai larutan ekstrak biji jinten hitam sebanyak 30 cc.

Kelompok perlakuan 3 (P3), dengan dosis 2400 mg / kg BB / hari :

Misal asumsi berat tikus 30 gram yang berarti diperlukan pemberian dosis :

$$\frac{2400 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} = \frac{a \text{ mg}}{30 \text{ g}} \quad a = 72 \text{ mg}$$

Karena terbagi dalam tiga (3) kali pemberian, maka setiap kali pemberian hanya diberikan 24 mg saja yang dilarutkan dalam Na CMC 0,5% hingga mencapai 0,3 cc. Jadi perlu larutan ekstrak biji jinten hitam minimal sebanyak 25,2 cc (0,3 cc X 7 mencit X 4 hari X 3 kali pemberian).

Untuk memudahkan pembuatan dan menghindari adanya kejadian yang tidak diinginkan (tumpah atau pecah) dalam proses pelaksanaan, maka pembuatan dilakukan sebagai berikut :

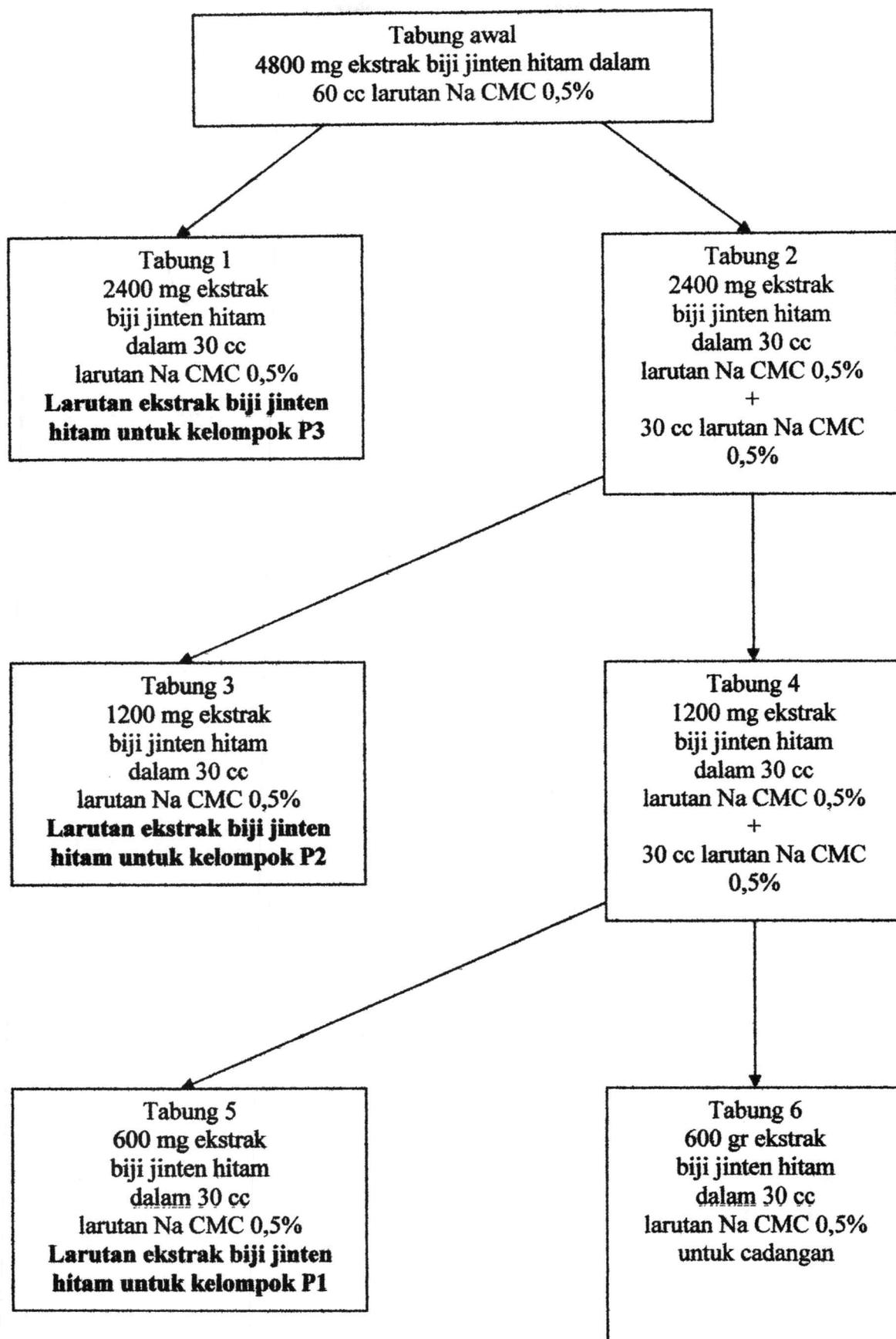
$$\frac{24 \text{ mg}}{0,3 \text{ cc}} = \frac{2400 \text{ mg}}{30 \text{ cc}}$$

Jadi diperlukan 2400 mg ekstrak biji jinten hitam yang dilarutkan Na CMC 0,5% hingga tercapai larutan ekstrak biji jinten hitam sebanyak 30 cc.

Prosedur pembuatan larutan ekstrak biji jinten hitam

1. Mula-mula dilakukan penimbangan ekstrak biji jinten hitam sebanyak 4800 mg yang dilarutkan dengan Na CMC 0,5% hingga mencapai volume sebanyak 60 cc.

2. Kemudian larutan ekstrak biji jinten hitam dibagi ke dalam tabung 1 dan tabung 2 dengan volume yang sama banyak (30 cc). Tabung 1 yang terdiri dari 2400 mg ekstrak biji jinten hitam dalam 30 cc larutan, merupakan tabung yang digunakan untuk pemberian kelompok P3.
3. Tabung 2 ditambah dengan 30 cc Na CMC 0,5% sehingga terdapat larutan yang terdiri dari 2400 gram ekstrak biji jinten hitam dalam 60 cc larutan.
4. Tabung 2 tersebut dibagi ke dalam tabung 3 dan tabung 4 dengan volume yang sama banyak (30cc). Tabung 3 tersebut yang terdiri dari 1200 mg ekstrak biji jinten hitam dalam 30 cc larutan, merupakan tabung yang digunakan untuk pemberian kelompok P2.
5. Tabung 4 ditambah dengan 30 cc Na CMC 0,5% sehingga terdapat larutan yang terdiri dari 1200 gram ekstrak biji jinten hitam dalam 60 cc larutan.
6. Tabung 4 tersebut dibagi ke dalam tabung 5 dan tabung 6 dengan volume yang sama banyak (30cc). Tabung 5 tersebut yang terdiri dari 600 mg ekstrak biji jinten hitam dalam 30 cc larutan, merupakan tabung yang digunakan untuk pemberian kelompok P1. Tabung 6 merupakan cadangan apabila terjadi sesuatu hal



Lampiran 4.**PEMILIHAN PENDERITA PERIODONTITIS****PEMILIHAN PENDERITA PERIODONTITIS**

Bakteri periodontopatogen diambil dari penderita periodontitis kronis dengan kriteria sebagai berikut :

1. Penderita laki-laki
2. Usia 40 – 50 tahun
3. Penderita tidak mempunyai penyakit sistemik
4. Penderita menunjukkan tanda-tanda adanya gingiva yang membengkak, perdarahan gusi dengan kedalaman poket lebih dari 5 mm dan adanya tahap awal resorpsi tulang alveol.

Selanjutnya penderita diberi penjelasan tentang tujuan penelitian (*Inform for inform consent*) dan menandatangani Surat Persetujuan Pemeriksaan.

Lampiran 5.**PENJELASAN INFORMASI PENELITIAN****(INFORM FOR INFORMED CONSENT)**

- Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak biji *Nigella sativa* pada penurunan sel radang kronik.
- Pada penelitian ini akan diambil bakteri plak gigi yang terdapat di daerah subgingiva gigi yang sesuai dengan kriteria penelitian. Selanjutnya bakteri tersebut akan diinkubator dan dilakukan inokulasi (perkembangbiakan bakteri)
- Data saudara
- bersifat rahasia dan akan diolah secara ilmiah

**DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
PROGRAM PASCA SARJANA UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

Surat Persetujuan Pemeriksaan

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama :

Umur :

Alamat/Telp :

Bersedia dilakukan pemeriksaan guna untuk kepentingan penelitian seperti yang telah dijelaskan di atas.

Surabaya,

Tanda tangan

Lampiran 6.**INOKULASI BAKTERI PERIODONTOPATOGEN**

Alat yang digunakan untuk pengambilan contoh bakteri yang akan diinokulasi terlebih dahulu disiapkan di dental unit, yaitu berupa :

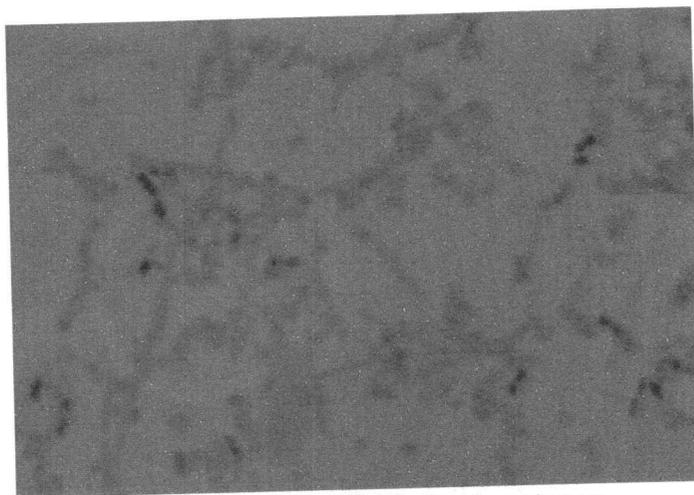
- Alat diagnosa (kaca mulut, pinset, dan sonde)
- Tabung reaksi yang berisi BHI (Brain heart infusion) cair
- Paper point untuk mengambil plak subgingiva
- Lampu spirtus (brender)

Penderita yang sudah dipilih untuk diambil contoh bakteri periodontopatogen disiapkan di Dental Unit yang tersedia di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah Surabaya.

Tehnik Pengambilan dan Inokulasi Bakteri

- Regio yang akan diambil contoh bakterinya, terlebih dahulu terlokalisir dengan menggunakan cotton roll.
- Ambil paper point dan ulaskan pada daerah yang terakumulasi plak dengan kriteria yang telah ditentukan di atas.
- Tabung reaksi dibuka dan dipanaskan bibirnya dengan lampu spirtus yang telah disediakan. Masukkan paper point tadi ke dalam tabung reaksi, panaskan kembali bibir tabung dan tutup.
- Tabung reaksi disimpan di inkubator selama 48 jam pada suhu 37⁰C dengan menggunakan anaerob jar yang di dalamnya diletakkan ges pack agar tidak tercemar udara atau oksigen karena bakteri periodontopatogen sebagian besar merupakan anaerob.

- Setelah diinkubator selama 48 jam, dilakukan penipisan hingga didapatkan 10^5 CFU/ ml yang kemudian dialrutkan dalam larutan salin
- Dilakukan pengecatan untuk mengetahui adanya bakteri periodontopatogen yang mempunyai karakteristik pada umumnya, yaitu bakteri gram negatif yang berbentuk batang berfilamen



Gambar Bakteri Periodontopatogen

Lampiran 7.**DATA BERAT BADAN MENCIT SEBELUM DILAKUKAN PERLAKUAN**

NO.	K (-)	K (+)	P1	P2	P3
1.	23	25	24	20	21
2.	21	21	23	30	25
3.	27	22	17	24	24
4.	19	27	25	23	18
5.	30	20	22	21	20
6.	23	32	21	27	27
7.	25	23	25	19	28

Lampiran 8.**TAHAPAN PEMBUATAN SEDIAAN HISTOLOGI**

Tahapan pembuatan sediaan histopatologi menurut metode Humason (1972) yang dikutip dari (Suntoro, 1983; Sudiana, 1993) melalui beberapa tahap kerja sebagai berikut:

1. Fiksasi.

Dilakukan dengan menggunakan larutan *buffer formaline* 10 % dengan tujuan agar mudah melakukan proses pemotongan, mempertahankan struktur serta komponen sel seperti semula, menampilkan perbedaan refraksi komponen jaringan serta untuk mencegah proses pembusukan atau mencegah pertumbuhan bakteri atau jamur

2. Dehidrasi

Merendam jaringan kedalam alkohol dengan konsentrasi yang meningkat, mulai dari alkohol 70 %, 80 %, 90 %, 96 % dan alkohol absolut. Tujuannya untuk menghilangkan sisa air dalam jaringan dan memberi suasana alkohol

3. Clearing

Merendam jaringan kedalam *xylol*, tahap ini dilakukan dengan tujuan agar jaringan menjadi transparan atau mengklarifikasi jaringan yang akan diblok

4. Impregnasi

Pertama jaringan dimasukkan kedalam campuran parafin cair dan *xylol* dengan perbandingan 1 : 1 pada suhu 65° C selama 30 menit. Kemudian jaringan dimasukkan kedalam parafin murni (dalam bentuk cairan) dengan suhu 55-58° C sebanyak tiga kali masing-masing selama 30 menit. Tujuannya agar konsistensi jaringan sama dengan bahan blok.

5. *Embedding*

Proses infiltrasi jaringan dengan parafin cair, dituangkan kedalam cetakan, kemudian jaringan dimasukkan kedalamnya dengan posisi yang diatur sebaik mungkin, lalu dianginkan hingga parafin menjadi beku. Tujuannya untuk memberikan suatu penyangga agar jaringan dapat dipotong dengan mikrotom tanpa menimbulkan distorsi yang berarti pada susunannya.

6. Pemotongan (*section*)

Jaringan yang telah diblok parafin dipotong menggunakan mikrotom, dengan tebal sayatan antara empat sampai enam mikron, dengan hasil irisan yang disebut *ribbon*.

7. *Mounting I*

Hasil irisan (*ribbon*) dimasukkan kedalam water bath dengan suhu 56° C, sehingga dalam beberapa saat akan mekar, dalam keadaan ini jaringan dilekatkan pada kaca sediaan dengan menggunakan perekat campuran asam cuka, albumin, dan aquadestilata dengan perbandingan 1 : 1 : 5

8. Deparafinisasi

Mula-mula dimasukkan kedalam larutan *xylol I*, selama dua menit lalu *xylol II* selama tiga menit. Kemudian dimasukkan secara berturut-turut kedalam alkohol absolut, alkohol 95 %, 80 %, dan alkohol 70 % masing-masing dua kali selama satu menit. Tujuannya untuk melarutkan sisa parafin.

9. Hidrasi

Mencuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kejenuhan, kemudian dibilas dengan aquadestilata

10. Pewarnaan

Sediaan dibersihkan dari kristal merkuri klorida dengan iodine dan direndam dengan larutan sodium tiosulfat, setelah itu dicuci dengan air yang mengalir selama 10-20 menit, lalu dibilas dengan aquadestilata. Pewarnaan dilanjutkan dengan larutan *haematoxylin* yang bertujuan menampakkan warna dasar yang kontras dengan inti sel sehingga mudah dalam mengidentifikasi sel. Kemudian diubah langsung pada larutan *eosin* selama 30-60 menit atau bahkan lebih lama. Didehidrasi dengan alkohol 95 % kemudian alkohol absolute.

11. Clearing

Dilakukan dengan merendam dalam larutan *xylol* I, selama tiga menit, dan *xylol* II selama tiga menit.

12. Mounting II

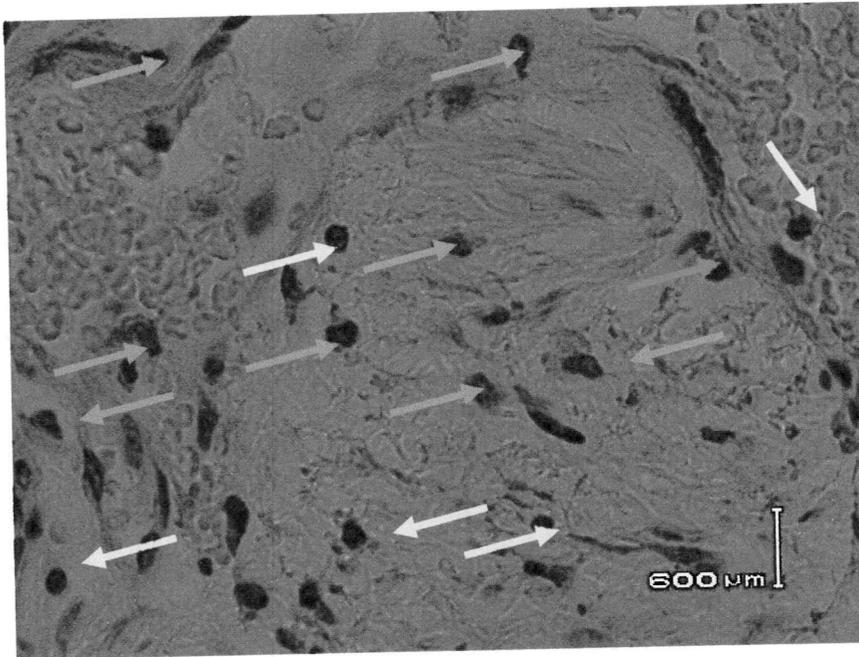
Merupakan suatu proses meletakkan kaca penutup jaringan (*cover glass*) diatas kaca sediaan. Mula-mula, perekat balsam kanada diteteskan secukupnya dikaca penutup (*cover glass*) kemudian dilekatkan pada kaca sediaan, dan dijaga agar tidak ada gelembung udara masuk di sela-sela antara dua kaca tersebut. Sisa-sisa perekat yang berasal dari sediaan dibersihkan agar cepat kering, dan sediaan dianginkan selama 24-48 jam di oven. Hasil dari pewarnaan ini, inti sel berwarna merah, fibril kolagen berwarna biru.

13. Labelling

Masing-masing sediaan diberi label sesuai dengan nomor urut sampel gunanya supaya memudahkan pemeriksaan ulang dan agar bahan tidak tertukar. Selanjutnya dilakukan pengamatan secara mikroskopis

Lampiran 9.

**CARA PENGHITUNGAN SEL MAKROFAG, LIMFOSIT,
DAN SEL PLASMA DALAM SATU LAPANG PANDANG
PADA GAMBARAN HISTOPATOLOGI
(Pembesaran 400 X)**



Keterangan :

- : sel makrofag
- : sel limfosit
- : sel plasma

Berdasarkan gambar di atas, maka :

- jumlah sel makrofag = 12
- jumlah sel limfosit = 5
- jumlah sel plasma = 1

Pengamatan ini dilakukan sebanyak 5 kali dan kemudian dijumlah

Lampiran 10

HASIL PENGHITUNGAN UNIT ANALISIS

Hasil Penghitungan Makrofag

KELOMPOK	I	II	III	IV	V	Σ
K(-)-1	1	1	1	1	1	5
K(-)-2	1	2	1	1	1	6
K(-)-3	2	2	3	1	3	11
K(-)-4	0	1	1	2	1	5
K(-)-5	1	0	0	0	1	2
K(-)-6	2	4	3	2	3	15
K(-)-7	0	1	1	1	2	5
K(+)-1	10	8	11	7	10	46
K(+)-2	13	11	12	10	14	60
K(+)-3	10	12	11	12	11	56
K(+)-4	14	17	15	16	17	78
K(+)-5	13	14	15	16	16	74
K(+)-6	9	8	10	11	10	48
K(+)-7	10	11	11	12	14	58
P1-1	2	3	4	3	3	17
P1-2	1	2	3	2	3	11
P1-3	2	3	4	3	3	15
P1-4	3	4	4	4	4	22
P1-5	5	6	8	7	7	37
P1-6	2	3	4	3	3	16
P1-7	1	2	2	1	1	7
P2-1	4	4	6	5	4	23
P2-2	4	5	4	6	6	25
P2-3	4	6	6	6	6	28
P2-4	2	3	3	2	2	12
P2-5	2	4	3	5	4	18
P2-6	0	1	1	2	1	5
P2-7	4	4	5	6	5	24
P3-1	0	1	0	0	0	1
P3-2	0	1	1	1	1	4
P3-3	0	0	1	2	1	4
P3-4	2	3	3	4	3	15
P3-5	0	0	1	0	0	1
P3-6	3	4	4	3	4	18
P3-7	2	2	3	3	3	13

Hasil Penghitungan Limfosit

KELOMPOK	I	II	III	IV	V	Σ
K(-)-1	1	1	1	1	1	5
K(-)-2	0	1	0	0	1	2
K(-)-3	0	0	0	1	0	1
K(-)-4	1	1	1	2	1	6
K(-)-5	1	1	1	0	1	4
K(-)-6	1	1	1	1	2	6
K(-)-7	1	2	2	1	2	8
K(+)-1	5	4	4	3	5	21
K(+)-2	4	5	4	5	5	23
K(+)-3	3	4	4	4	4	19
K(+)-4	2	2	3	3	3	13
K(+)-5	2	3	3	3	3	14
K(+)-6	3	4	4	5	5	21
K(+)-7	2	3	3	3	3	14
P1-1	2	2	2	2	3	11
P1-2	1	1	1	1	1	5
P1-3	1	0	0	0	0	1
P1-4	1	2	2	1	2	8
P1-5	1	1	1	2	1	6
P1-6	1	1	1	2	1	6
P1-7	1	2	2	2	2	9
P2-1	0	1	2	1	2	6
P2-2	1	2	2	2	3	10
P2-3	0	1	1	0	0	2
P2-4	1	1	1	1	2	6
P2-5	1	2	2	2	2	9
P2-6	0	1	1	2	1	5
P2-7	1	1	0	1	1	4
P3-1	2	1	1	1	1	6
P3-2	0	1	0	0	0	1
P3-3	0	0	1	2	1	4
P3-4	0	1	0	1	1	3
P3-5	1	1	1	1	1	5
P3-6	0	0	1	0	0	1
P3-7	2	2	3	2	3	12

Hasil Penghitungan Sel Plasma

KELOMPOK	I	II	III	IV	V	Σ
K(-)-1	0	1	0	0	0	1
K(-)-2	0	0	0	0	0	0
K(-)-3	0	0	1	0	1	2
K(-)-4	0	0	0	0	0	0
K(-)-5	0	0	0	1	0	1
K(-)-6	0	0	0	0	0	0
K(-)-7	0	1	0	0	0	1
K(+)-1	2	3	2	3	3	13
K(+)-2	3	2	2	2	2	11
K(+)-3	2	2	2	2	2	10
K(+)-4	1	2	1	2	1	7
K(+)-5	2	2	2	2	2	10
K(+)-6	1	2	1	2	1	7
K(+)-7	1	2	2	2	2	9
P1-1	1	1	1	1	1	5
P1-2	1	0	1	1	0	3
P1-3	0	1	1	1	1	4
P1-4	1	0	0	1	0	2
P1-5	1	1	1	1	1	5
P1-6	1	2	1	1	1	6
P1-7	0	1	0	1	1	3
P2-1	1	1	0	1	1	4
P2-2	1	0	0	1	0	2
P2-3	0	1	1	2	1	5
P2-4	0	1	0	0	1	2
P2-5	0	1	1	0	1	3
P2-6	0	0	0	0	1	1
P2-7	0	1	1	1	1	4
P3-1	0	0	0	1	1	2
P3-2	0	0	0	0	0	0
P3-3	0	0	0	1	0	1
P3-4	0	1	0	0	0	1
P3-5	0	0	0	0	0	0
P3-6	0	1	0	1	1	3
P3-7	0	0	0	0	0	0

Lampiran 11

PENGOLAHAN DATA (STATISTIK)

MEANS

Case Processing Summary

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Makrofag * Kelompok	35	100.0%	0	.0%	35	100.0%
Limfosit * Kelompok	35	100.0%	0	.0%	35	100.0%
Sel Plasma * Kelompok	35	100.0%	0	.0%	35	100.0%

Report

Kelompok		Makrofag	Limfosit	Sel Plasma
Kontrol Negatif	Mean	7.0000	4.5714	.7143
	N	7	7	7
	Std. Deviation	4.43471	2.43975	.75593
Kontrol Positif (PP)	Mean	60.0000	17.8571	9.5714
	N	7	7	7
	Std. Deviation	12.11060	4.09994	2.14920
PP + Ns 1	Mean	17.8571	6.5714	4.0000
	N	7	7	7
	Std. Deviation	9.66831	3.20713	1.41421
PP + Ns 2	Mean	19.2857	6.0000	3.0000
	N	7	7	7
	Std. Deviation	8.19988	2.76887	1.41421
PP + Ns 3	Mean	8.0000	4.5714	1.0000
	N	7	7	7
	Std. Deviation	7.11805	3.77964	1.15470
Total	Mean	22.4286	7.9143	3.6571
	N	35	35	35
	Std. Deviation	21.34215	5.98219	3.52256

NPAR TESTS**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		Makrofag	Limfosit	Sel Plasma
N		35	35	35
Normal Parameters(a,b)	Mean	22.4286	7.9143	3.6571
	Std. Deviation	21.34215	5.98219	3.52256
Most Extreme Differences	Absolute	.211	.226	.174
	Positive	.211	.226	.174
	Negative	-.158	-.124	-.150
Kolmogorov-Smirnov Z		1.247	1.334	1.029
Asymp. Sig. (2-tailed)		.089	.057	.240

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

ONEWAY**Test of Homogeneity of Variances**

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Makrofag	1.209	4	30	.327
Limfosit	.981	4	30	.432
Sel Plasma	1.657	4	30	.186

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Makrofag	Between Groups	13220.286	4	3305.071	43.751	.000
	Within Groups	2266.286	30	75.543		
	Total	15486.571	34			
Limfosit	Between Groups	886.743	4	221.686	20.153	.000
	Within Groups	330.000	30	11.000		
	Total	1216.743	34			
Sel Plasma	Between Groups	358.743	4	89.686	42.611	.000
	Within Groups	63.143	30	2.105		
	Total	421.886	34			

POST HOC TESTS

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Makrofag	Kontrol Negatif	Kontrol Positif (PP)	-53.00000(*)	4.64582	.000	-62.4880	-43.5120
		PP + Ns 1	-10.85714(*)	4.64582	.026	-20.3452	-1.3691
		PP + Ns 2	-12.28571(*)	4.64582	.013	-21.7738	-2.7977
		PP + Ns 3	-1.00000	4.64582	.831	-10.4880	8.4880
	Kontrol Positif (PP)	Kontrol Negatif	53.00000(*)	4.64582	.000	43.5120	62.4880
		PP + Ns 1	42.14286(*)	4.64582	.000	32.6548	51.6309
		PP + Ns 2	40.71429(*)	4.64582	.000	31.2262	50.2023
		PP + Ns 3	52.00000(*)	4.64582	.000	42.5120	61.4880
	PP + Ns 1	Kontrol Negatif	10.85714(*)	4.64582	.026	1.3691	20.3452
		Kontrol Positif (PP)	-42.14286(*)	4.64582	.000	-51.6309	-32.6548
		PP + Ns 2	-1.42857	4.64582	.761	-10.9166	8.0595
		PP + Ns 3	9.85714(*)	4.64582	.042	.3691	19.3452
	PP + Ns 2	Kontrol Negatif	12.28571(*)	4.64582	.013	2.7977	21.7738
		Kontrol Positif (PP)	-40.71429(*)	4.64582	.000	-50.2023	-31.2262
		PP + Ns 1	1.42857	4.64582	.761	-8.0595	10.9166
		PP + Ns 3	11.28571(*)	4.64582	.021	1.7977	20.7738
	PP + Ns 3	Kontrol Negatif	1.00000	4.64582	.831	-8.4880	10.4880
		Kontrol Positif (PP)	-52.00000(*)	4.64582	.000	-61.4880	-42.5120
		PP + Ns 1	-9.85714(*)	4.64582	.042	-19.3452	-.3691
		PP + Ns 2	-11.28571(*)	4.64582	.021	-20.7738	-1.7977
	Limfosit	Kontrol Negatif	Kontrol Positif (PP)	-13.28571(*)	1.77281	.000	-16.9063
PP + Ns 1			-2.00000	1.77281	.268	-5.6206	1.6206
PP + Ns 2			-1.42857	1.77281	.427	-5.0491	2.1920
PP + Ns 3			.00000	1.77281	1.000	-3.6206	3.6206
Kontrol Positif (PP)		Kontrol Negatif	13.28571(*)	1.77281	.000	9.6652	16.9063
		PP + Ns 1	11.28571(*)	1.77281	.000	7.6652	14.9063
		PP + Ns 2	11.85714(*)	1.77281	.000	8.2366	15.4777
		PP + Ns 3	13.28571(*)	1.77281	.000	9.6652	16.9063
PP + Ns 1		Kontrol Negatif	2.00000	1.77281	.268	-1.6206	5.6206
		Kontrol Positif (PP)	-11.28571(*)	1.77281	.000	-14.9063	-7.6652
		PP + Ns 2	.57143	1.77281	.749	-3.0491	4.1920
		PP + Ns 3	2.00000	1.77281	.268	-1.6206	5.6206
PP + Ns 2		Kontrol Negatif	1.42857	1.77281	.427	-2.1920	5.0491
		Kontrol Positif (PP)	-11.85714(*)	1.77281	.000	-15.4777	-8.2366
		PP + Ns 1	-.57143	1.77281	.749	-4.1920	3.0491
		PP + Ns 3	1.42857	1.77281	.427	-2.1920	5.0491
PP + Ns 3		Kontrol Negatif	.00000	1.77281	1.000	-3.6206	3.6206
		Kontrol Positif (PP)	-13.28571(*)	1.77281	.000	-16.9063	-9.6652
		PP + Ns 1	-2.00000	1.77281	.268	-5.6206	1.6206
		PP + Ns 2	-1.42857	1.77281	.427	-5.0491	2.1920

Sel Plasma	Kontrol Negatif	Kontrol Positif (PP)	-8.85714(*)	.77547	.000	-10.4409	-7.2734
		PP + Ns 1	-3.28571(*)	.77547	.000	-4.8694	-1.7020
		PP + Ns 2	-2.28571(*)	.77547	.006	-3.8694	-.7020
		PP + Ns 3	-.28571	.77547	.715	-1.8694	1.2980
	Kontrol Positif (PP)	Kontrol Negatif	8.85714(*)	.77547	.000	7.2734	10.4409
		PP + Ns 1	5.57143(*)	.77547	.000	3.9877	7.1552
		PP + Ns 2	6.57143(*)	.77547	.000	4.9877	8.1552
		PP + Ns 3	8.57143(*)	.77547	.000	6.9877	10.1552
	PP + Ns 1	Kontrol Negatif	3.28571(*)	.77547	.000	1.7020	4.8694
		Kontrol Positif (PP)	-5.57143(*)	.77547	.000	-7.1552	-3.9877
		PP + Ns 2	1.00000	.77547	.207	-.5837	2.5837
		PP + Ns 3	3.00000(*)	.77547	.001	1.4163	4.5837
	PP + Ns 2	Kontrol Negatif	2.28571(*)	.77547	.006	.7020	3.8694
		Kontrol Positif (PP)	-6.57143(*)	.77547	.000	-8.1552	-4.9877
		PP + Ns 1	-1.00000	.77547	.207	-2.5837	.5837
		PP + Ns 3	2.00000(*)	.77547	.015	.4163	3.5837
	PP + Ns 3	Kontrol Negatif	.28571	.77547	.715	-1.2980	1.8694
		Kontrol Positif (PP)	-8.57143(*)	.77547	.000	-10.1552	-6.9877
		PP + Ns 1	-3.00000(*)	.77547	.001	-4.5837	-1.4163
		PP + Ns 2	-2.00000(*)	.77547	.015	-3.5837	-.4163

* The mean difference is significant at the .05 level.