

TESIS

**MINYAK IKAN (ω -3 PUFA) MENURUNKAN
AKTIVITAS FAGOSITOSIS PMN SECARA
KUANTITATIF PADA TIKUS PUTIH (WISTAR)
JANTAN YANG DIPAPAR *Streptococcus mutans***

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



I DEWA AYU RATNA DEWANTI

**PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2001**

**MINYAK IKAN (ω -3 PUFA) MENURUNKAN
AKTIVITAS FAGOSITOSIS PMN SECARA
KUANTITATIF PADA TIKUS PUTIH (WISTAR)
JANTAN YANG DIPAPAR *Streptococcus mutans***

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

TESIS

Untuk Memperoleh Gelar Magister
dalam Program Studi Imunologi
pada Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga



Oleh :

I DEWA AYU RATNA DEWANTI

NIM. 099813093 M

**PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2001**

LEMBAR PENGESAHAN

Tesis ini telah disetujui
Tanggal, 7 Februari 2001

Oleh :

Pembimbing Ketua,

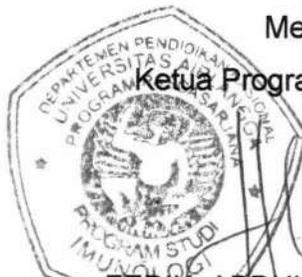
Prof. dr. ATASIATI IDAJADI, Sp. MK
NIP. 130128 215

Pembimbing,

Prof. drg. RETNO LAKSMININGSIH, MHPed
NIP. 130 206 163

Mengetahui.

Ketua Program Studi Imunologi,



FEDIK ABDUL RANTAM, drh, Ph.D
NIP. 131 653 434

Telah Diuji Pada

Tanggal, 7 Februari 2001

Panitia Penguji Tesis

Ketua : Fedik Abdul Rantam, drh., Ph.D

Anggota : 1. Prof. Drg. Retno Laksmningsih, MHPEd

2. Prof. Dr. P. G. Konthen, dr, Sp. PD

3. Dr. Eddy Bagus Wasito, dr. MS, SpMK

4. Prof. Dr. H. Sarmanu, drh., MS

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Tuhan Yang Maha Esa, atas berkah dan rahmatNya, sehingga dapat terselesaikannya penulisan dengan judul **MINYAK IKAN MENURUNKAN AKTIVITAS FAGOSITOSIS PMN SECARA KUANTITATIF PADA TIKUS YANG DIPAPAR DENGAN *Streptococcus mutans*.**

Penulis menyampaikan terima kasih yang tak terhingga kepada kedua pembimbing, Prof. Dr. Atasiati Idajadi, Sp. MK almarhum dan Prof. drg. Retno Laksiminingsih, MHPed, yang telah meluangkan waktu di sela-sela kesibukan beliau untuk memberikan bimbingan.

Penulis juga menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Fedik Abdul Rantam, drh, Ph.D yang telah memberikan dorongan semangat dan bimbingan, Prof. Dr. Sarmanu, drh., MS, yang membimbing dalam menganalisis hasil penelitian serta Prof. Dr. P. G. Konthen, dr. Sp. PD, Dr. Eddy Bagus Wasito, dr. MS, SpMK, yang ikut serta memberikan saran dan bimbingan.

Terima kasih yang tak terhingga juga penulis sampaikan kepada bapak-bapak pejabat yang telah memberikan fasilitas kepada penulis untuk melaksanakan pendidikan S2 di Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga Surabaya :

1. Menteri Pendidikan Nasional Indonesia
2. Rektor Universitas Airlangga Surabaya
3. Direktur Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga Surabaya
4. Ketua Program Studi Immunologi Pasca Sarjana Universitas Airlangga Surabaya
5. Rektor Universitas Jember
6. Dekan Kedokteran Gigi Universitas Jember
7. Kepala Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

8. Kepala PUSVETMA, Surabaya.
9. Kepala laboratorium biologi MIPA Universitas Jember.

Ucapan yang sama penulis sampaikan kepada :

1. Rekan sejawat di Lab. Oral Medicine FKG Universitas Jember :
drg. Kunin N, drg. Erna S, drg. Dyah I, drg. Atik K, drg. Yustianti.
2. Sejawat di Lab. Parasitologi FKG Universitas Jember :
drg. Hestionini, drg. Niken P, dr. Rini.
3. drg. I. D. A. Susilawati, M.Kes, drg. Didin E. I, M.Kes, drg. Izzata B., M. Kes, drg. Sri Erliani, drg. Teky I., drg. Depi P.
4. Kawan-kawan S2 Imunologi
5. Kawan-kawan yang membantu penelitian : Bagus, Amd., Agus, Amd., Setyo Pinardi, Amd.

Ucapan terima kasih saya sampaikan kepada para kerabat yang telah memberikan dukungan dengan tulus :

1. Bapak I.D.G Gelgel dan Ibu Supriyati, Dra.
2. Kakak-kakakku : Ir. I.D.G Cahyadi, drg. I.D.A Susilawati, M.Kes,
Drs. I.D.G Cakrabuana.
3. Kakak Ipar : drg. Purwanto, M.Kes., Festi Wahyu N, SKG
4. Letda. drg. Suhartono yang selalu memberikan dukungan.
5. Keponakanku : Inke K., Punky S., Retno P., Widia A.

Surabaya,..... 2000

Penulis

RINGKASAN

Penelitian ini mempelajari tentang minyak ikan (ω -3 PUFA) dalam menurunkan aktivitas fagositosis PMN secara kuantitatif pada tikus yang dipapar *S. mutans* serta mengetahui sejauh mana minyak ikan dengan dosis yang berbeda dapat menurunkan aktivitas fagositosis PMN. Minyak ikan yang mengandung 25–35% ω -3 poliunsaturated fatty acid (ω -3 PUFA), diketahui dapat menekan inflamasi dengan cara menurunkan produksi sitokin proinflamatori (IL-1, IL-6, IL-8, TNF α) dan diduga mempengaruhi produksi prostaglandin E₂ (PGE₂) dan leukotrin B₄ (LTB₄).

Penelitian yang merupakan eksperimental laboratoris dengan menggunakan rancangan acak lengkap. Unit sampel yang digunakan adalah tikus Wistar jantan berumur 1,5 bulan dengan berat 100 – 200 gr berjumlah 28 ekor yang dibagi dalam 4 kelompok (masing-masing 7 ekor), Kelompok kontrol adalah tikus yang diberi makanan standar. Kelompok perlakuan dibagi 3 kelompok (P₁, P₂, P₃) yaitu tikus yang diberi diet tambahan minyak ikan dengan dosis 0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml. Semua diet tambahan diberikan selama 14 hari. Selanjutnya semua tikus diinjeksi *S. mutans* secara intraperitoneal (10^3 dalam 100 μ l salin). Tiga hari kemudian dilakukan analisis PMN dengan menggunakan mikroskop cahaya pada sediaan darah yang berasal dari ekor tikus. PMN yang aktif (terlihat menfagositosis bakteri) dihitung dengan mengikuti hukum Poisson, yaitu persentase PMN yang aktif per 100 leukosit. Selain itu juga dilakukan penghitungan jumlah bakteri yang difagosit PMN. Data yang diperoleh dianalisis dengan Anava dan dilanjutkan dengan uji LSD.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa minyak ikan menurunkan aktivitas fagositosis PMN secara kuantitatif. Disamping itu penambahan dosis minyak ikan secara nyata semakin menurunkan aktivitas fagositosis PMN secara kuantitatif ($P < 0,05$).

ABSTRACT

This experimental study purposed to examine the effect of dietary fish oil (ω -3 PUFA) in reducing the PMN phagocytic activity in rat exposed by *S. mutans*. In addition the effect of fish oil dose was also explored at had been demonstrated that ω -3 PUFA suppressed inflammatory process by means of reducing interleukin (IL – 1, IL – 6, IL – 8, TNF α) production, and possibly affected phagocytic activity. This ω -3 PUFA activity is possibly mediated by the effects on prostaglandin (PGE₂) and leucotrine (LTB₄) production.

Twenty-eight male post weaning wistar rats were divided into 4 groups (1 controle and 3 treatment groups). Controle group fed with standard diet while the three treatment groups fed with fish oil 0,5 ml; 1 ml; 1,5 ml respectively. After 14 days diet treatment, all of the rats were injected with *S. mutans* (10^{-3} in 100 μ salin) intraperitoneal. Three days later, PMN analysis was performed on the blood preparation taken from rat tail, by means of light microscope. The active PMN (PMN with bacteria inside the cell) were counted with Poisson law, namely percentage of active PMN per 100 leucocytes. The amount of bacteria phagocyted by PMN were counted as well. Data were analyzed statistically by ANAVA and LSD. The result indicated that dietary supplementation of fish oil (ω -3 PUFA) quantitatively reduced PMN phagocytic activity ($P < 0,05$). The more fish oil dose were ingested the less PMN were activated.

Further study were needed to explore the effect of duration and frequency of fish oil supplementation on the PMN phagocytic activity both quantitatively and qualitatively, and also on other immune response.

Key Word : Fish oil; ω -3 PUFA; PMN (Polymorphonuclear)

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN JUDUL LUAR	ii
PRASARAT GELAR	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
PENETAPAN PANITIA	v
HALAMAN UCAPAN TERIMAKASIH	vi
RINGKASAN	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1. Tujuan Umum	4
1.3.2. Tujuan Khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Minyak Ikan	6
2.1.1 Metabolisme Asam Arakidonat	7
2.1.2 Prostaglandin E ₂	9
2.1.3 Leukotrin	10
2.2 Membran Sel	11
2.3 Imunitas	13

2.4	Hipersensitivitas	14
2.5	Fagositosis	16
2.5.1	Kemotaksis	21
2.5.2	Fagositosis.....	22
2.5.3	Neutrofil.....	26
2.6	Pengaruh Minyak Ikan pada Aktivitas Fagositosis dan Sitokin.....	29
2.7	<i>Streptococcus mutans</i>	31
2.7.1	Pengertian dan Ciri-ciri	31
2.7.2	Patogenesis Karies oleh <i>Streptococcus mutans</i>	31
2.7.3	Peran Fagositosis terhadap Karies	33
BAB 3	KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	35
3.1	Kerangka Konseptual	35
3.2	Hipotesis.....	36
BAB 4	METODE PENELITIAN.....	37
4.1	Jenis dan Rancangan Penelitian	37
4.2	Unit Sampel	37
4.3	Besar Sampel	37
4.4	Variabel Penelitian	37
4.5	Definisi Operasional	38
4.6	Bahan	38
4.7	Alat	39
4.8	Lokasi dan Waktu Penelitian	39
4.9	Pengelompokan Sampel	39
4.10	Prosedur Pelaksanaan Penelitian	40
4.10.1	Diet Tikus	40
4.10.2	Pemeliharaan Tikus	40
4.10.3	Bakteri	40

4.10.4	Inokulasi <i>S. mutans</i>	41
4.10.5	Analisis Sel Fagositosis	41
4.10.5.1	Cara Membuat Sediaan Hapus	41
4.10.5.2	Pewarnaan Giemsa	42
4.10.5.3	Cara Memeriksa	42
4.10.6	Skema Penelitian	44
4.10.7	Analisis Statistik	45
BAB 5	HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	46
BAB 6	PEMBAHASAN	52
BAB 7	KESIMPULAN DAN SARAN	61
7.1	Kesimpulan.....	61
7.2	Saran.....	61
DAFTAR PUSTAKA	62
LAMPIRAN	67

DAFTAR GAMBAR

No		Halaman
2.1	Struktur Asam Eikosapentanoat	6
2.2	Struktur Asam Arakidonat.....	8
2.3	Skema Metabolisme Eikosanoid.....	9
2.4	Struktur Membran Sel	12
2.5	Reaksi yang terjadi pada Pertemuan Hospes dengan Benda Asing.....	13
2.6	PMN Manusia Sedang Menfagosit <i>Micrococcus Pyogenes</i> Var. <i>Aureus</i>	19
2.7	Gambaran Mikrograf Elektron dari PMN dalam Menfagosit Bakteri Staphilokokus.....	19
2.8	Perincian Ultrastruktur Neutrofil dan Proses Pencernaan Intrasel dari Bakteri yang Difagosit.....	29
5.1	Diagram Batang dari Rata-Rata Jumlah PMN Aktif	47
5.2	Diagram Batang dari Persentase Jumlah PMN Aktif	47
5.3	Diagram Batang dari Rata-Rata Jumlah Bakteri yang Difagosit PMN.....	49
5.4	PMN yang Aktif dalam Fagositosis (Hasil Penelitian dengan Pengecatan Giemsa).....	51
6.1	Kelompok Senyawa Eikosanoid dan Biosintesisnya.....	58

DAFTAR TABEL

No	Halaman
2.1	Persentase dari Distribusi Streptokokus Rongga Mulut pada Lokasi yang Berbeda 33
5.1	Jumlah PMN yang Aktif (Persentase)..... 46
5.2	Jumlah Bakteri yang Difagosit PMN 48

DAFTAR LAMPIRAN

1.	Foto Pelaksanaan Penelitian :	
1.1	Beberapa Alat yang Digunakan dalam Penelitian	67
1.2	Tikus Wistar Jantan yang Digunakan dalam Penelitian	67
1.3	Cara Pemberian Minyak Jagung dan Minyak Ikan pada Tikus	68
1.4	Cara Pemaparan <i>S. mutans</i> pada Tikus	68
1.5	Cara Pemotongan Ekor Tikus	69
2.	Data Hasil Penelitian dan Hasil Analisis Statistik Aktivitas Fagositosis PMN dari Berbagai Dosis Minyak Ikan dan Kontrol (Minyak Jagung)	70

BAB 1 PENDAHULUAN



1.1 Latar Belakang

Minyak ikan yang mengandung 25-35% ω -3 (omega-3) poliunsaturated fatty acid (ω -3 PUFA) (Chee, dkk., 1990), telah diketahui dapat menekan inflamasi dengan cara menurunkan produksi sitokin proinflamatori (IL-1, IL-6, IL-8, TNF α) dan diduga mempengaruhi aktivitas fagositosis. Hal ini terjadi karena ω -3 PUFA mempengaruhi metabolisme asam arakidonat yaitu eikosanoid yang dapat menurunkan produksi prostaglandin E2 (PGE₂) dan leukotrin B4 (LTB₄) (Block, dkk., 1996).

Asam arakidonat adalah PUFA yang ditemukan secara istimewa pada mamalia (Whelan, 1996). Asam ini dapat di metabolisme dengan sistem terpisah yaitu jalur lipoksigenase dan siklooksigenase, dimana ketepatan jalur tersebut tergantung ketersediaan enzim dan berkompetisi dengan asam arakidonat (Dahl, 1988). Adapun sejumlah bahan yang diproduksi melalui oksidasi asam arakidonat antara lain prostaglandin, leukotrin, derivat hidroperoksida, prostasiklin, tromboksan, lipoksin dan hepoksilin (Whelan, 1996).

Minyak ikan mempunyai efek anti inflamasi oleh karena kemampuannya merubah komposisi membran phospholipid, yang mengakibatkan terjadinya perubahan pada fluiditas membran, perubahan ikatan sitokin pada reseptornya, perubahan aktivitas protein (Grimble dan Tapia, 1998).

Leukotrin, khususnya LTB₄ yang berperan dalam kemotaksis, agregasi, pelepasan enzim dan pembangkitan superoksida pada PMN (Meydani dan Dinarello, 1993) diketahui dapat mempertinggi produksi IL-1 pada monosit manusia yang diinduksi lipopolisakarida secara *in-vitro* (Rola-Pleszczycki dan Lemaire, 1985). Sebaliknya berkurangnya sintesis

leukotrin menyebabkan berkurangnya produksi sitokin proinflamatori (Block, dkk., 1996).

Prostaglandin E2 mempunyai efek inflamatori, imunomodulasi dan menurunkan inflamasi. Keadaan yang dapat ditemui pada penyakit gigi dan mulut seperti gusi kemerahan, bengkak, degradasi kolagen dan kehilangan tulang alveolar dapat disebabkan sendiri oleh adanya dan aksi langsung PGE₂ (Offenbacher, dkk., 1993). Prostaglandin juga dapat menghambat proliferasi sel T dan leukotrin untuk menghambat produksi interleukin-1 (IL-1) (Kundsén, dkk., 1986).

IL-1 yang merupakan salah satu dari sitokin proinflamatori merupakan mediator untuk terjadinya resorpsi tulang secara lokal (Tatakis, 1993). Menurut Ne (1999) IL-1 aktif pada semua tahap pembentukan osteoklas, deferensiasi dan aktivasi osteoklas secara langsung. Disamping itu IL-1 juga dapat meningkatkan resorpsi tulang secara tidak langsung dengan menstimulasi dan pelepasan PGE₂, meningkatkan kolagenesi, GM-CSF (*Granulocyte-macrophage-Colony Stimulating Factor*) dan G-CSF (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*).

Penelitian tentang diet minyak ikan yang dikaitkan dengan inflamasi maupun produksi sitokin telah banyak dilakukan antara lain yang menjelaskan tentang modulasi inflamasi dan produksi sitokin yang berhubungan dengan diet ω -3 PUFA yang dilakukan oleh Block, dkk., (1996); Whelan (1996); Grimble dan Tapia (1998).

Produksi sitokin dapat mempengaruhi fungsi fagositosis PMN (polimorfonuklear) yang merupakan sel utama dalam melakukan fagositosis nampaknya merupakan faktor penting penyebab semakin parahnyanya penyakit gigi dan mulut (Numabe, dkk, 1998). Prostaglandin juga dapat berperan dalam produksi sitokin, seperti IL-1.

Penyakit periodontal dan karies merupakan kelainan di rongga mulut yang paling sering di jumpai di Indonesia. Penyebab utamanya adalah bakteri gram negatif dan positif (Anan, dkk1991; Lehner, 1995). Penyakit ini menunjukkan adanya responsimun lokal dan sistemik (Tani-

Ishii, dkk., 1995) dan mengakibatkan terjadinya destruksi tulang yang meningkat (Matumoto, dkk., 1998). Adanya mekanisme yang kompleks dari penyakit ini menimbulkan dugaan terlibatnya reaksi hipersensitivitas, meskipun peranan tipe I, III, IV hipersensitivitas tersebut belum jelas (Lehner, 1995).

Lindhe (1990) menyatakan bahwa dalam plak gigi terdapat bermacam-macam species bakteri. Namun demikian, *Streptococcus mutans* nampaknya merupakan bakteri yang sangat penting peranannya dalam terjadinya karies gigi dan gingivitis. *S. mutans* yang merupakan bakteri terbanyak di rongga mulut diketahui sebagai penyebab utama terjadinya karies gigi.

Komponen bakteri yang terlibat dalam penyakit gigi dan mulut dapat menginduksi produk beberapa mediator polipeptida atau sitokin proinflamatori yang terlibat dalam periodontitis yaitu IL-1 β , IL-1 α , IL-6, IL-8 dan TNF- α (Stashenko, 1990; Agarwal, dkk., 1993; Hofstand, 1993; Matsuo, dkk., 1994; Tani-Ishii, dkk., 1995) dan PGE₂ (Miyachi, dkk., 1996; Yoshimura, 1997) yang berkaitan secara langsung maupun tidak langsung dengan adanya resorpsi tulang. Begitu juga resorpsi tulang pada manusia (Matsuhito, dkk., 1998). Sedangkan Jawetz, dkk., 1986 menyatakan bahwa komponen bakteri dapat meningkatkan aktivitas Fagositosis host. PMN yang merupakan sel fagosit pada proses peradangan kronik adalah imunokompeten yang pertama kali mengenali setiap antigen/imunogen yang ada. Dimana keterlibatan PMN dalam respon imun baik secara *in vivo* maupun *in vitro* dapat dilakukan untuk mengungkap fungsinya secara tepat (Soehardjo, 1998). PMN sangat dikhususkan untuk melaksanakan fungsi Fagositosis penghancuran semua benda-benda berupa partikel. Sel ini membersihkan dan menghancurkan bakteri tertentu, sel yang rusak atau tidak berguna, sel tumor, benda koloid (Belanti, 1993). Namun demikian apabila reaksi fagositosis ini berlebihan juga akan menimbulkan kerusakan yang berlebihan pula. Keberadaan PMN pada penyakit gigi dan mulut mempunyai arti penting pada setiap derajat peradangan yang

dikaitkan dengan keparahan penyakit. Penelitian sel imunokompeten saat ini mendapat perhatian yang besar pada penyakit gigi dan mulut. Minyak ikan yang mengandung ω -3 PUFA diduga dapat menurunkan aktivitas fagositosis PMN baik kuantitas maupun kualitasnya. Namun demikian, pada penelitian ini akan dibatasi pada kuantitasnya saja.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah yang telah diuraikan diatas, maka dapat diambil masalah sebagai berikut :

1. Apakah minyak ikan menurunkan aktivitas fagositosis PMN secara kuantitatif pada tikus yang dipapar dengan *S.mutans* ?
2. Apakah pemberian dosis minyak ikan yang berbeda akan berpengaruh terhadap jumlah bakteri yang difagosit olhe PMN ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum :

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisa pengaruh minyak ikan terhadap aktivitas fagositosis PMN secara kuantitatif pada tikus yang dipapar dengan *S.mutans*.

1.3.2 Tujuan Khusus :

Mengetahui sejauh mana pengaruh minyak ikan ditinjau dari pemberian dosis minyak ikan yang berbeda terhadap aktivitas fagositosis PMN secara kuantitatif dengan menghitung :

1. a. Jumlah sel PMN aktif dan persentase PMN yang aktif dari tikus yang diberi minyak ikan dengan dosis 0,5 (P_1), 1 (P_2) dan 1,5 (P_3), makanan standar (KO).
b. Jumlah bakteri yang difagosit PMN dari KO, P_1 , P_2 , P_3 .
2. a. Membandingkan rata-rata dari jumlah sel PMN yang aktif dan membandingkan rata-rata persentase sel PMN yang aktif.
c. Membandingkan rata-rata jumlah bakteri yang difagosit oleh sel PMN.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini bermanfaat untuk memberikan informasi ilmiah tentang peran minyak ikan dalam menurunkan aktivitas fagositosis PMN, serta memberikan informasi kepada masyarakat tentang peran minyak ikan sebagai anti inflamasi, sehingga dapat dikonsumsi secara benar. Disamping itu dengan penelitian ini nantinya diharapkan dapat berguna untuk menunjang penelitian lebih lanjut yang berkaitan dengan berbagai respons imun minyak ikan (ω -3) yang dikaitkan dengan berbagai penyakit inflamatori.

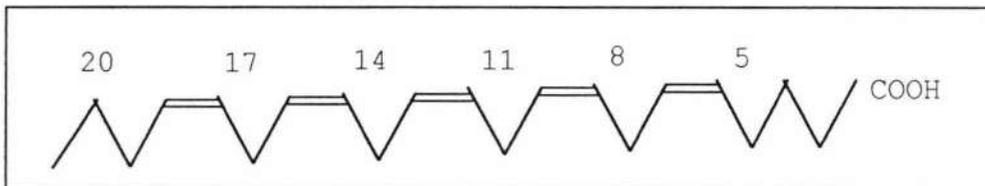
BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Minyak Ikan

Minyak ikan merupakan lemak yang berbentuk cair, berasal dari ikan. Minyak tersebut diisolasi dari ikan yang hidup pada tumbuhan di bawah permukaan laut, misalnya ikan cod, hiu dan hering (Winarno, 1997). Minyak ikan mengandung 25 - 35 % ω -3 PUFA dengan 22 % *eicosapentaenoic acid* (EPA) dan 11 % *docosahexaenoic acid* (DHA) (Galli cit Raz, dkk, 11994).

Struktur asam lemak eikosapentonat (ω -3, 20:5, $\Delta^{5,8,11,14,17}$), memperlihatkan kandungan ikatan rangkap yang dimulai pada atom ketiga dari ujung terminal metil, mempunyai 20 atom karbon serta 5 ikatan rangkap yang terletak pada atom karbon ke-5,8,11,14,17 dari ujung terminal karboksil (Murray, dkk., 1991).



Gambar 2.1. Struktur Asam Eikosapentanoat (sumber Murray, dkk.,1991).

Omega-3 PUFA dapat mempengaruhi faktor resiko kardiovaskulaer, menghambat pertumbuhan tumor dan diduga melemahkan efek endotoksin (Turek, dkk., 1998). Minyak ikan mempunyai efek anti inflamasi oleh karena kemampuannya merubah komposisi membran phospholipid, yang mengakibatkan terjadinya perubahan pada fluiditas membran, perubahan ikatan sitokin pada reseptornya, perubahan aktivitas protein (Grimble dan Tapia, 1998), dan mempengaruhi metabolisme eikosanoid serta berinteraksi langsung dengan aktivitas

seluler (Peck, 1994). Fluiditas membran mempunyai pengaruh kuat pada fungsi membran yang penting, seperti pembentukan dan aktivitas membran yang dihubungkan dengan enzim dan reseptor pada *second messenger system*. Dimana aktivitas enzim adenilat siklase yang mengkatalisis *second messenger cyclic adenosine monophosphate (cAMP)* dalam responnya kepada hormon dan *growth regulator binding* pada reseptor permukaan sel sensitiv terhadap fluiditas membran (Wiseman, 1996). Meningkatnya fluiditas membran yang berpengaruh pada penghambatan proliferasi Limfosit T ekspresi reseptor IL-2 Limfosit T dan perubahan fungsi makrofag dalam fagositosis, khususnya endositosis untuk partikel besar seperti makroorganisme dan debris sel.

Adapun keuntungan minyak ikan yang potensial adalah :

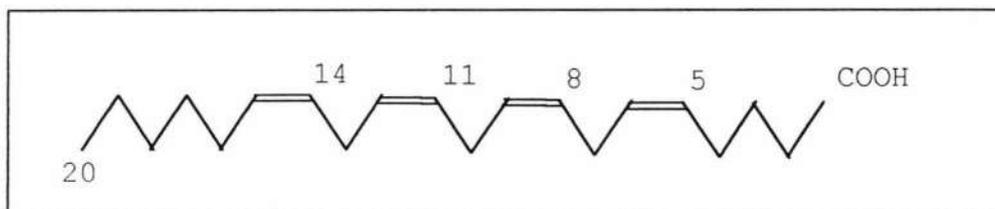
1. EPA (*Eicosa Pentaenoic Acid*) mengganti sebagai *Arachidonic Acid (AA)* dalam jaringan atau kumpulan prekursor eikosanod, dengan demikian mengurangi persediaan AA (*Arachidonic Acid*) untuk mensintesis eikosanoid.
2. EPA akan bersaing langsung dengan sisa-sisa AA untuk oksigenase dengan enzim yang mensintesis eikosanoid (*Cyclooxygenase dan Lipoxygenase*).
3. Eikosanoid yang disintesis dari EPA (contoh, PGE₃, TXA₃, LTB₅ atau LTC₅) mengurangi sifat inflamasi (Galli dkk, cit Raz, dkk, 1997 ; Calder, 1998). Eikosanoid mengatur produk sitokin oleh karena itu konsumsi ω -3 PUFA yang meningkat akan merubah produk eikosanoid (Meydani dan Dinarello, 1993).

2.1.1 Metabolisme asam arakidonat

Asam arakidonat adalah PUFA yang ditemukan secara istimewa pada mamalia (Whelan, 1996). Sumber utama asam arakidonat adalah membran phospholipid, walaupun asam lemak bebas juga merupakan sumber prekursor eikosanoid. Esterifikasi asam arakidonat dilepas oleh aksi phospholipase A₂ yaitu ikatan enzim pada membran yang diaktifkan

oleh kalsium yang melepaskan asam arakidonat terutama dari *phosphatdyl cholid* dan phospholipase C, yang spesifik untuk *phosphatidylinositol* (Peck, 1994).

Struktur asam arakidonat (ω -6, 20:4, $\Delta^{5,8,11,14}$), memperlihatkan kandungan ikatan rangkap yang dimulai pada atom keenam dari ujung terminal metil, mempunyai 20 atom karbon serta 4 ikatan rangkap yang terletak pada atom karbon ke-5,8,11,14 dari ujung terminal karboksil (Murray, dkk., 1991).

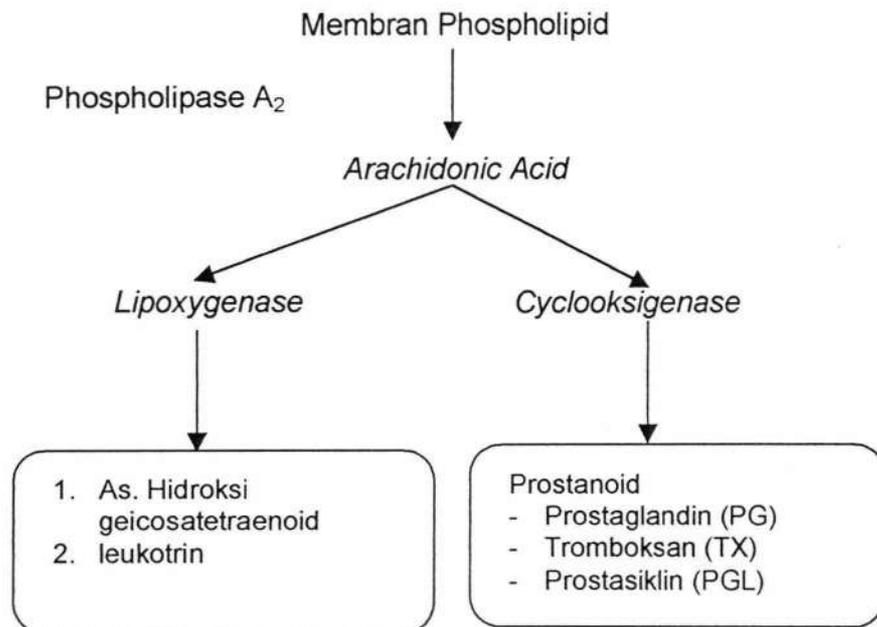


Gambar 2.2. Struktur Asam Arakidonat (sumber Murray, dkk., 1991).

Sejumlah besar bahan yang dapat diproduksi melalui oksidasi asam arakidonat adalah prostaglandin, leukotrin, hidroksi dan derivat hidroksiperksida, prostaskilin, trombosan, lipoksin dan hepoksilin (Whelan, 1996). Pelepasan eikosanoid distimulasi oleh beberapa substansi yaitu kolagen, trombin, bradikinin, kompleks antibodi-antigen, oksigen radikal bebas, faktor pertumbuhan dan eseterifikasi asam arakidonat yang lebih lanjut akan memodifikasi enzim untuk menghasilkan eikosanoid (Peck, 1994).

Asam arakidonat dapat dimetabolisme dengan sistem yang terpisah yaitu dengan jalur lipoksigenase dan siklooksigenase. Ketepatan jalur tersebut tergantung dari kesediaan enzim yang sesuai, dan berkompetisi dengan substrat asam arakidonat (Dahl, 1988). Lipoksigenase (kelompok dari penambahan enzim oksidasi) menghasilkan pembentukan *hydroxygeico-satetraenoic acid* dan leukotrin, sedang siklooksigenase mengkatalis perubahan *arachodonic acid* dalam

prostanoid. Prostaglandin dan metabolisme *arachidonic acid* diimplikasikan dalam patogenesis penyakit gigi dan mulut (Stashenko, 1990). Senyawa prostanoid yang dihasilkan adalah PGD_2 , PGE_2 , PGF_2 , PGL_2 , TXA_2 . Sedangkan senyawa leukotrien adalah LTA_4 , LTB_4 , LTC_4 , LTD_4 , LTE_4 (Murray, dkk., 1991).



Gambar 2.3. Skema metabolisme eikosanoid (sumber Stashenko, 1990).

2.1.2 Prostaglandin E2

Prostaglandin merupakan derivat asam lemak dengan 20 atom karbon dan mempunyai cincin sklopentan. Senyawa ini banyak tersebar dalam organ tubuh. Pembentukan dan pelepasannya karena adanya aktivitas enzim fosfolipase A2 (Nasution, 1983). Prostaglandin terdiri dari beberapa kelas yaitu D, E, F, G, H dan I. Telah lama eksistensi Prostaglandin telah diketahui keberadaannya, tapi perannya pada inflamasi baru dinyatakan pada tahun 1960, dan bukti Prostaglandin sebagai tanda keparahan penyakit periodontal (Gemmel, dkk., 1997).

Secara teoritis beberapa perubahan inflamasi dan periodontopatologi yang terjadi dalam penyakit periodontal seperti gingivitis, degradasi kolagen dan kehilangan tulang dapat disebabkan secara langsung oleh adanya aksi prostaglandin E₂ (Rola-Pleszczynski, 1985). Pengaruh vasoaktif PGE₂ dipertinggi oleh interaksi sinergis dengan mediator inflamasi yang lain yaitu bradikinin, pemecahan fragmen komponen komplemen dan histamin (Offenbacher, dkk., 1993).

Pengaruh PGE₂ yang menurun pada target sel adalah sebagai media reseptor dan ikatan PGE₂ juga mentriger timbulnya cAMP intra seluler. Tingginya cAMP berperan penting terhadap fungsi PGE₂ yang beragam (Takayama, 1996). Pengaruh kenaikan kadar cAMP diketahui menyebabkan relaksasi otot polos, vasokonstriksi pembuluh darah serta berpengaruh dalam pelepasan mediator yang menurun. Beberapa data menyatakan bahwa gen regulatori yang mengganti transkripsi gen lain memerlukan peningkatan cAMP untuk aktivitasnya. Selain itu dapat mempengaruhi IL-2 reseptor, major *histocompatibility complex* (MHC) kelas I dan II, IL-1 β , IL-6 dan TNF- α . Dengan demikian dalam monosit PGE₂ berperan penting terhadap peningkatan level cAMP untuk mempertinggi ekspresi dari produk yang spesifik dalam merespon monosit (Offenbacher, dkk., 1993). Hal tersebut juga berlaku pada proses fungsi fagositosis. Fungsinya PGE₂ dapat meningkatkan fungsi fagositosis yang meliputi kemotaksis, kimokinesis, agregasi dan metabolisme oksidasi leukosit. Aktivitas fagositosis yang meningkat merupakan salah satu penyebab terjadinya kerusakan yang lebih parah (Parker, 1986 ; Peck, 1994).

2.1.3 Leukotrin

Leukotrin dikenal sebagai mediator aktivitas leukosit. Perannya menstimulasi agregasi dan kemotaksis dari *Polymorphonuclear Cells* (PMNs). Seperti metabolisme asam arakidonat yang lain, leukotrin tidak disimpan dalam jaringan, tapi disintesis dari prekursor asam lemak dari sel

yang distimulasi dan diaktifkan oleh enzim yang dikenal sebagai lipoksigenase. Leukotrin ini merupakan molekul yang pertama ditemukan dalam leukosit, mempunyai 3 ikatan rangkap yang berkonjugasi. Leukotrin mempunyai aksi biologi yang penting dan berpartisipasi pada kondisi patofisiologis, seperti inflamasi anafilaksis dan asam maupun fungsi normal neuroendokrin dan berperan pada respon imun (Davies, 1988 ; Torabinejad, dkk., 1991).

Menurut Rola-Pleszczyski dan Lemaire, (1985) leukotrin B₄ dilaporkan meningkatkan produksi IL-1 pada monosit manusia yang diinduksi oleh lipopolisakarida secara *in-vitro*. Pada tikus, penghambatan lipoksigenase menekan sirkulasi TNF pada makrofag peritoneal secara *ex-vivo* (Block, dkk., 1996). Penghambatan leukotrin ini dapat dilakukan oleh PGE₂ (Khudsen, dkk., 1986).

Senyawa-senyawa leukotrien merupakan kelompok senyawa triena terkonjugasi yang dibentuk dari asam eikosanoat dalam leukosit, sel mastosit, trombosit dan makrofag melalui lintasan lipoksigenase sebagai reaksi terhadap rangsangan imunologis maupun non imunologis. Senyawa yang terbentuk pertama adalah leukotrien B₄ dan C₄. Senyawa leukotrien C₄, D₄, E₄ bersama leukotrien B₄ dapat menyebabkan permeabilitas vaskuler, penarikan dan pengaktifan leukosit. Senyawa ini merupakan regulator penting pada berbagai reaksi inflamasi atau hipersensitivitas, seperti asma (Murray, dkk., 1991).

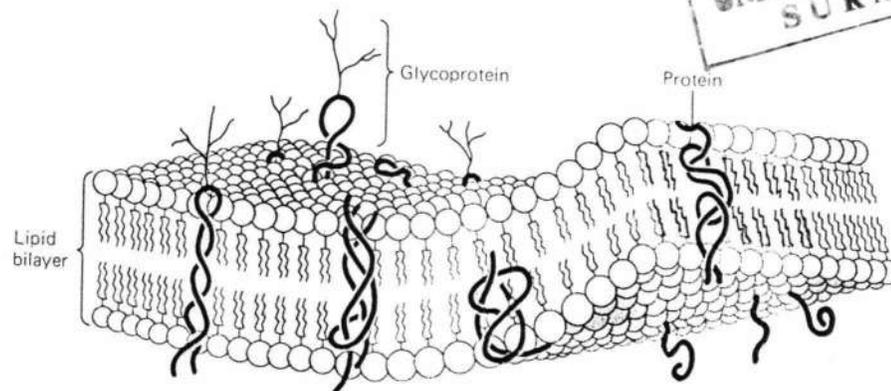
2.2 Membran Sel

Membran plasma terutama terdiri dari lipid dan protein. Struktur inti dari membran adalah lipid bilayer. Lipid menyusun 50% dari seluruh masa membran, tetapi bervariasi pada berbagai jenis sel. Jenis lipid yang ditemukan pada membran adalah fosfolipid, kolesterol dan glikolipid. Kesemua molekul-molekul ini tidak larut dalam air, tetapi mereka semua mempunyai daerah hidrofilik atau daerah yang dapat berinteraksi dengan air dan disebut molekul amfipatik (Devlin, 1996).

Fosfatidilkolin merupakan lipid amfipatik, mempunyai gugus kepala yang hidrofilik dan dua ekor asam lemak hidrofobik yang masing-masing mengandung 14 – 24 karbon yang tidak bercabang. Asam lemak dengan atom karbon 16 – 18 paling sering dijumpai pada fosfolipid : asam palmitat dan oleat (Murray, 1996).

Pergerakan molekul fosfolipid individual dalam lipid bilayer merupakan struktur yang dinamis. Molekul fosfolipid bergerak ke lateral di sepanjang satu lapisan membran, tetapi menyeberang dari satu lapisan ke lapisan lain sulit terjadi. Molekul fosfolipid dapat berotasi, selain itu ekor hidrokarbonnya mobil dan mengalami pergerakan flexing yang cepat. Kecepatan pergerakan ini akan lebih cepat jika ekor hidrokarbonnya pendek dan mengandung ikatan ganda (Devlin, 1996).

Komposisi membran sangat penting sebab akan berpengaruh terhadap konformasi dan aktivitas dari membran yang dihubungkan dengan enzim dan reseptor termasuk *second messenger system* dan *cell signaling* (Wiseman, 1996). Adapun gambar struktur membran plasma dapat dilihat pada gambar berikut ini.



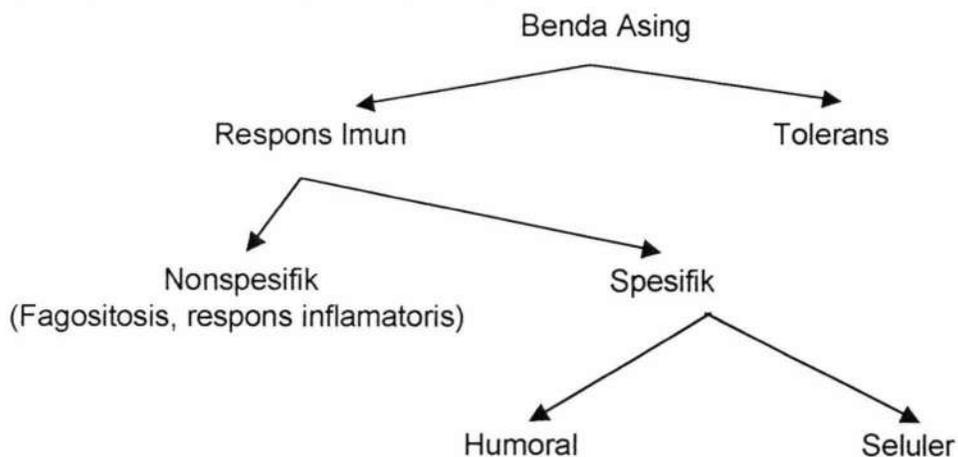
Gambar 2.4. Struktur membran plasma (sumber Rodes, 1996).

2.3 Imunitas

Istilah Imunitas berasal dari bahasa latin Immunis (bebas dari pajak atau bebas dari beban). Dalam penggunaan secara klasik, imunitas diartikan sebagai daya tahan relatif hospes terhadap reinfeksi mikroba tertentu. Sekarang jelas bahwa respons-respons imun tidak selalu menguntungkan atau tidak selalu terkait dengan daya tahan terhadap infeksi. Respons imun dapat diklasifikasikan menjadi 2 kategori :

1. Respons imunologik nonspesifik
2. Respons imunologik spesifik

Respons imunologik spesifik tergantung pada adanya pemaparan benda asing dan pengenalan selanjutnya dan kemudian reaksi terhadapnya. Sebaliknya respons imunologik nonspesifik terjadi sesudah pemaparan inisial dan selanjutnya terhadap benda asing, respons ini tidak tergantung pada pengenalan spesifik. Adapun kemungkinan hasil yang terjadi pada pertemuan antara hospes dengan benda asing seperti tertera pada gambar berikut (Bellanti, 1993).



Gambar 2.5. Reaksi yang Terjadi pada Pertemuan Hospes dengan Benda Asing (sumber Bellanti, 1993).

Pertemuan pertama antara hospes dengan benda asing menimbulkan respon elemen fagositik ke daerah benda asing tersebut

masuk. Hal ini dapat terjadi sebagai suatu kejadian tersendiri atau sebagai bagian respons inflamatoris (Bellanti, 1993).

2.4 Hipersensitivitas

Hipersensitivitas menurut Garna (1996) adalah respons imun yang berlebihan sehingga menimbulkan kerusakan jaringan tubuh. Reaksi tersebut oleh Gell dan Coombs dibagi dalam 4 tipe reaksi berdasarkan kecepatan dan mekanisme imun yang terjadi, yaitu :

- I. Reaksi hipersensitivitas cepat
- II. Antibodi terhadap sel
- III. Kompleks antigen – antibodi
- IV. Reaksi hipersensitivitas lambat

I. Reaksi hipersensitivitas cepat

Faktor terpenting yang berperan pada reaksi ini adalah IgE. Tipe ini disebut juga reaksi anafilaksis yang timbul segera sesudah terpapar alergen. Adapun urutan kejadian reaksi tipe I, yaitu :

1. Fase sensitisasi adalah waktu yang dibutuhkan untuk pembentukan IgE sampai diikatnya oleh reseptor spesifik pada permukaan sel mastosit dan basofil.
2. Fase aktivasi yaitu waktu selama terjadi pemaparan ulang dengan antigen spesifik, mastosit melepas isinya yang berisikan granula.
3. Fase efektor yang merupakan respons kompleks sebagai efek bahan yang dilepas mastosit dengan aktivitas farmakologik.

Dalam fase aktivasi terjadi perubahan membran sel sebagai akibat metilasi fosfolipid yang diikuti influs Ca^{++} . Peningkatan cAMP akan menghambat, sedang cAMP membantu degranulasi. Disamping histamin, mediator lain seperti prostaglandin, leukotrin (SRS – A) yang dihasilkan asam arakidonat akan berperan.

II. Reaksi hipersensitivitas tipe II (reaksi sitotoksik)

Reaksi ini terjadi karena dibentuknya jenis IgG dan IgM terhadap antigen. Antibodi tersebut mengaktifkan sel K. Selanjutnya ikatan antigen-antibodi mengaktifkan komplemen yang melalui reseptor C3b memudahkan fagositosis dan menimbulkan lisis (Boedina, 1996).

III. Reaksi hipersensitivitas tipe III

Reaksi ini terjadi bila kompleks antigen – antibodi ditemukan dalam jaringan atau sirkulasi/dinding pembuluh darah dan mengaktifkan komplemen. Antibodi yang terlibat IgG dan IgM. Komplemen yang diaktifkan akan melepaskan *Macrophage Chemotactic Factor*. Makrofag yang dikerahkan, melepaskan enzim yang dapat merusak jaringan sekitar (Boedina, 1996).

IV. Reaksi hipersensitivitas tipe IV

Reaksi ini disebut juga reaksi hipersensitivitas lambat, *Cell Mediated Immunity (CML)*, *Delayed Type Hipersensitivity (DTH)* atau reaksi tuberkulin yang timbul 24 jam setelah paparan antigen. Reaksi terjadi karena respon sel T yang sudah disensitisasi terhadap antigen tertentu. Disini tidak ada peranan antibodi. Makrofag yang diaktifkan dapat menimbulkan kerusakan jaringan (Garna, 1996).

Ketidakseimbangan jenis lain pada alergi menurut Bellanti (1993) pada sistem saraf autonom, yang kepadanya ketidakseimbangan imunologik dapat ditumpangkan.

Sistem saraf autonom disusun dari sistem parasimpatis (kolinergik) dan sistem simpatis (adrenergik). Kedua sistem ini memberi pengaruh berlawanan pada berbagai macam organ. Pada sel mediator seperti sel mast, mediator diatur oleh agonis adrenergik maupun agonis kolinergik. Respons simpatis dan parasimpatis memberi pengaruh melalui pesuruh kedua, sistem nukleotida siklik. Rangsangan sistem parasimpatis menimbulkan produksi asetilkolin, yang mengubah bentuk inaktif guanilat

siklase menjadi bentuk aktif. Selanjutnya enzim ini mengubah guanosin trifosfat (GTP) menjadi guanin monofosfat siklik (cGMP).

Dengan cara yang sama sistem simpatis mempengaruhi jumlah cAMP. Rangsangan pada saraf simpatis dapat menimbulkan 2 pengaruh :

1. Rangsangan pada reseptor α yang menyebabkan penurunan kadar cAMP intraseluler.
2. Rangsangan pada reseptor β menyebabkan kenaikan cAMP yang dapat mengkatalisis perubahan ATP menjadi AMP siklik.

Keseimbangan cAMP dan cGMP dipengaruhi oleh berbagai macam reaktan, termasuk mediator inflamatoris seperti histamin, prostaglandin. Sekresi mediator dapat terjadi setelah interaksi sekurang-kurangnya dua molekul IgE terkait membran dengan antigen dan terjadi serangkaian peristiwa biokimia. Peristiwa pelepasan mediator adalah langkah yang memerlukan energi, karena ion (misal Ca^{++}) harus ada. Beberapa mediator (misal histamin) belum ditemukan dalam sel, sedangkan yang lain seperti leukotrin C_4 , D_4 , E_4 (SRS - A) disintesis dari prekursor (Bellanti, 1993).

2.5 Fagositosis

Salah satu upaya untuk mempertahankan diri terhadap masuknya antigen, misalnya antigen bakteri, adalah menghancurkan bakteri bersangkutan secara non spesifik dengan proses fagositosis. Dalam hal ini salah satu leukosit yang termasuk fagosit memegang peran yang sangat penting dalam PMN. Supaya dapat terjadi fagositosis, sel-sel fagositosis tersebut harus berada dalam jarak dekat dengan partikel bakteri, atau lebih tepat lagi bahwa partikel tersebut harus melekat pada permukaan fagosit. Untuk mencapai hal ini maka fagosit harus bergerak menuju sasaran. Hal ini dimungkinkan berkat dilepaskannya zat atau mediator tertentu yang disebut faktor leukotaktik atau kemotaktik yang berasal dari bakteri maupun yang dilepaskan oleh neutrofil atau makrofag yang sebelumnya telah berada di lokasi bakteri, atau yang dilepaskan oleh

komplemen. Selain faktor kemotaktik yang menarik fagosit menuju antigen sasaran, untuk proses fagositosis selanjutnya bakteri perlu mengalami opsonisasi terlebih dahulu. Ini berarti bakteri terlebih dahulu dilapisi oleh imunoglobulin atau komplemen (C3b), agar supaya lebih mudah ditangkap oleh fagosit. Selanjutnya partikel bakteri masuk ke dalam sel dengan cara endositosis dan oleh proses pembentukan fagosom ia terperangkap dalam kantong fagosom seolah-olah ditelan kemudian dihancurkan, baik dengan proses oksidasi-reduksi maupun oleh derajat keasaman yang ada dalam fagosit atau penghancuran oleh lisozim dan gangguan metabolisme bakteri (Boedina, 1996).

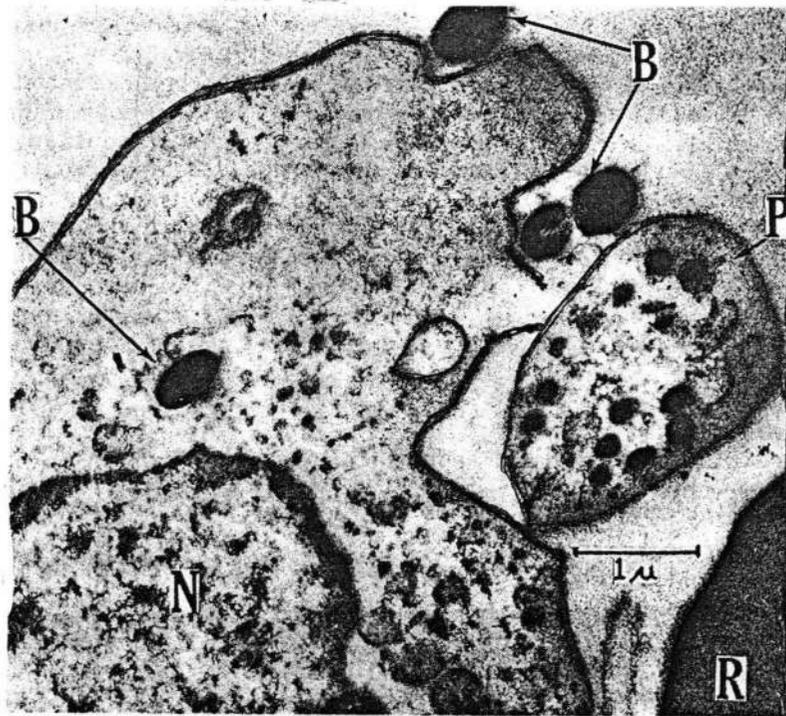
Proses fagositosis adalah bagian dari respons imun nonspesifik dan memainkan peran pada pertemuan pertama hospes dengan benda-benda asing, endositosis adalah istilah yang lebih umum, meliputi baik *fagositosis* dan *pinositosis* (memakan zat-zat non-partikel, misalnya tetes cairan). Keduanya memainkan peran proses penelanan dan makan partikel-partikel atau cairan dari lingkungannya, dan kelompok-kelompok sel khusus yang melaksanakan fungsi-fungsi tersebut biasanya dinamakan sel-sel fagositik. Dalam beberapa kasus, pencernaan lebih lanjut benda-benda ini menjadi fragmen-fragmen yang lebih kecil memudahkan pelenyapannya. Pada manusia, fagositosis dilakukan terutama oleh *fagosit mononuklear*, *neutrofil*, dan dalam jumlah yang kecil oleh *eosinofil* (Bellanti, 1993).

Sistem fagosit mononuklear (SFM) terdiri dari kelompok-kelompok sel monotip yang terbesar di seluruh tubuh di tempat mana mereka secara efektif dapat menyisihkan benda-benda asing dan puing-puing dari darah, limfa dan jaringan-jaringan. Istilah SFM telah disarankan untuk mengganti istilah yang kurang tepat, sistem retikulo endotelial (SRE). Istilah SRE ini diciptakan oleh Aschoff untuk memberi batasan kepada elemen-elemen morfologik sistem imun yang bekerja fagositik seperti ditegaskan oleh pembersihan partikel-partikel. Fagosit mononuklear terdiri dari monosit

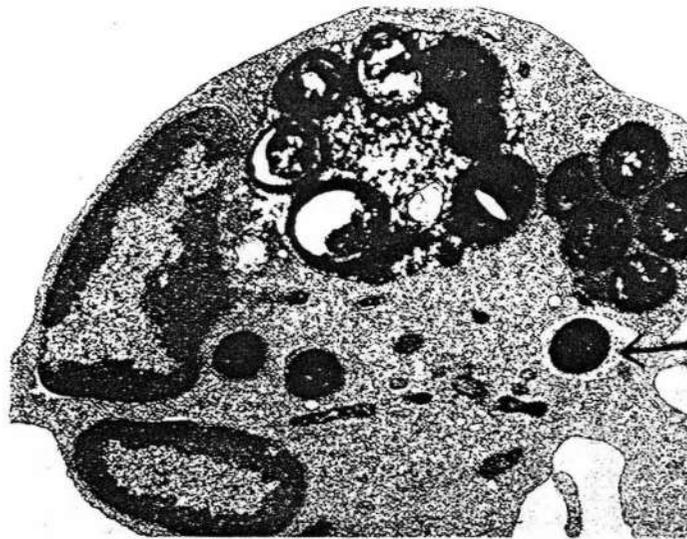
dalam sirkulasi darah dan makrofag yang terdapat di berbagai jaringan tubuh.

Makrofag sangat dikhususkan untuk melaksanakan fungsi penelanan dan penghancuran semua benda-benda berupa partikel dengan proses endositosis. Sel-sel ini membersihkan dan menghancurkan bakteri-bakteri tertentu, sel-sel yang rusak atau tidak berguna, sel-sel tumor, benda-benda koloid dan molekul-molekul besar. Proses fagositik kadang-kadang dipermudah oleh antibodi, karena partikel-partikel yang diselimuti antibodi ditelan secara lebih efisien; komplemen, suatu seri protein serum dalam reaksi berurutan, dapat juga terlibat sebagai penguat fagositosis. Istilah *opsonin* digunakan untuk menggambarkan prinsip peningkatan fagositik baik antibodi maupun komplemen. Monosit-monosit dalam sirkulasi ditarik ke daerah injuri (kemotaksis) oleh sejumlah faktor beberapa di antaranya berasal dari sistem komplemen atau disekresi oleh limfosit-T. Di sini monosit dapat berdiferensiasi lebih lanjut menjadi makrofag dan dapat diaktifkan dengan berbagai cara baik mengikuti endositosis atau melalui zat-zat humoral, termasuk antibodi, komplemen atau produk-produk limfosit (limfokin). Sekali sel-sel ini diaktifkan, maka mereka meningkatkan aktivitas metabolisme (*activated macrophages*) dan memperlihatkan peningkatan fungsi, misal aktivitas mikrobisid. Beberapa peneliti yakin bahwa selain peranan dalam pertahanan dan pengawasan, sistem makrofag penting dalam pengenalan pertama dan dalam pemrosesan antigen, langkah yang mungkin perlu untuk menginduksi respons imunologik spesifik (Garna, 1997).

Pada manusia granulosit dalam sirkulasi terdiri dari tiga macam sel yang secara morfologis dapat dibedakan ikut terlibat dalam banyak reaksi-reaksi imunologik di jaringan; sel-sel ini termasuk neutrofil, eosinofil dan basofil, dari ketiga sel ini hanya neutrofil yang terutama berperan fagositik sedang eosinofil hanya sedikit sekali (Bellanti, 1993).



Gambar 2.6. PMN manusia sedang menfagositosis *Micrococcus pyogenes aureus*, pembesaran 27.500 kali (sumber. Nason, 1965).



Gambar 2.7. Gambaran mikrograf elektron dari PMN dalam menfagositosis bakteri stafilokokus (sumber Volk., dkk, 1986).

Fagositosis merupakan komponen penting pada inflamasi. Dalam proses inflamasi ada 3 hal yang terjadi sebagai berikut :

1. Pengiriman persediaan darah ke tempat benda asing, mikroorganisme atau jaringan yang rusak.
2. Peninggian permeabilitas kapiler yang ditimbulkan oleh pengerutan sel endotel. Hal tersebut memungkinkan melekul yang lebih besar seperti antibodi dan fagosit bergerak keluar pembuluh darah dan sampai di tempat benda asing, mikroorganisme atau jaringan yang rusak.
3. Leukosit, terutama fagosit polimorfonuklear dan makrofag dikerahkan dari sirkulasi dan bergerak ke tempat benda asing, mikroorganisme atau jaringan yang rusak. Hal tersebut dipermudah oleh pelepasan C3a dan C5a pada aktivitas komplemen yang bersifat kemotaksis.

Dalam proses tersebut banyak pula leukosit dihancurkan. Kemudian makrofag lain yang memasuki daerah tersebut akan mengakhiri inflamasi. Ketiga kejadian tersebut di atas disebut inflamasi. C3a dan C5a merupakan pula anafilatoksin yang dapat melepaskan histamin melalui degranulasi mastosit dan basofil yang juga mempunyai sifat biologik. Selain C3a dan C5a pada aktivitas komplemen dilepas pula bahan-bahan lain yang berperan pada inflamasi (Garna, 1996).

Fagosit akhirnya memakan benda asing. Mikroorganisme atau jaringan yang rusak. Selama proses tersebut enzim lisosom dilepas oleh fagosit keluar sel, sehingga hal itu dapat menimbulkan kerusakan pada jaringan sekitarnya. Jelas bahwa sistem imun non spesifik dan sistem imun spesifik bekerja sama dengan usaha untuk mengembalikan keseimbangan badan dan bahwa dalam usaha tersebut, hal-hal yang tidak menyenangkan untuk tubuh seperti panas, bengkak, sakit dan kerusakan jaringan dapat terjadi. (Garna, 1996)

Pada penyakit periodontal dan karies gigi fagositosis mempunyai peranan yang sangat penting dalam patogenesis penyakit. (Numabe, dkk., 1998). Dimana reseptor PMN yang berikatan dengan Ig G, Ig M dan C₃ akan mengaktifkan sel-sel fagosit dan menyebabkan pelepasan enzim

lisosom baik oleh PMN maupun makrofag yang dapat menyebabkan kerusakan yang besar (Lehner, 1995 ; Numabe, dkk., 1998)

Peran utama sel-sel fagositik dalam pengaturan tubuh adalah lokalisasi dan pemusnahan benda-benda asing, misalnya mikroorganisme. Beberapa fungsi terpadu mungkin diperlukan untuk mencapai tujuan ini. Pertama, sel harus sampai pada tempat benda asing tersebut (kemotaksis). Kemudian mereka harus makan benda asing itu (fagositosis). Akhirnya sesudah beberapa tahap metabolik, mereka harus menghancurkan benda asing itu atau menghambat replikasi mikroorganisme tersebut (pembuluh mikroorganisme).

2.5.1 Kemotaksis

Leukosit polimorfonuklear dapat dipengaruhi oleh rangsangan kemotaktik yang berasal dari sistem komplemen, dari bakteri dan juga dari faktor-faktor yang berasal dari limfosit. Neutrofil secara langsung atau tidak langsung juga terlibat dalam pembentukan zat yang dikenal sebagai *slow reactive substance* (SRS – A), sekarang dikenal sebagai leukotrin C₄, D₄ dan E₄, yaitu suatu faktor humoral yang menyebabkan kontraksi otot-otot polos. Faktor-faktor lain yang dihasilkan oleh granulosit termasuk kinin, yaitu suatu polipeptida kecil yang vasokatif. Zat ini merupakan mediator farmakologik yang penting pada reaksi hipersensitivitas cepat (Bellanti, 1993).

Sejumlah zat-zat kemotaktik untuk monosit dan makrofag juga telah termasuk di dalamnya adalah produk-produk sistem komplemen dan seri limfosit, misalnya faktor pengaktif makrofag (*macrophage-activating factor* = MAF). Juga zat-zat yang menghambat kemotaksis monosit telah ditunjukkan pada ekstrak-ekstrak jaringan tumor.

Ada sejumlah zat-zat yang bersifat kemotaktik terhadap eosinofil yang serupa dengan zat-zat kemotaktik terhadap neutrofil. Termasuk pada zat-zat ini antara lain kompleks antigen-antibodi; kemotaktik; produk-produk seri limfosit, misalnya limfokin, dan *eosinophilic chemotactic factor*

of *anaphylaxis* (ECF – A), yaitu suatu zat yang dilepaskan dari sel mast jaringan dan basofil perifer yang mungkin sangat penting pada patogenesis reaksi hipersensitivitas tipe cepat. ECF – A juga terbukti dikeluarkan dari leukosit PMN.

2.5.2 Fagositosis

Secara urut langkah berikutnya adalah fagositosis, yaitu suatu proses ingesti partikel oleh sel. Proses ini dapat dibagi dalam dua fase, ialah fase perlekatan dan fase ingesti.

Selama fase perlekatan, terjadi sentuhan kuat dengan partikel. Sentuhan ini dapat terjadi secara langsung antara partikel dan fagosit melalui proses tanpa dorongan, dalam hal mana perlekatan ini sangat tergantung pada sifat-sifat permukaan partikel yang akan difagositosis, misal hidrofobisitas dan tegangan permukaan. Pada keadaan lain, perlekatan melibatkan peran serta 2 jenis reseptor membrana plasma fagosit: (1) satu reseptor untuk fragmen Fc dari molekul imunoglobulin, dan (2) reseptor untuk C3b, suatu komponen dari komplemen.

Proses ingesti adalah langkah fagositosis selanjutnya dan memainkan peran penelanan partikel. Fagosit menginvasi membrana plasmanya dan kemudian partikel dimasukkan ke dalam sitoplasma dan ditutup dalam vakuola (fagosoma), dengan dindingnya dibentuk dari membrana plasma yang terinvaginasi. Lagi pula, protein serupa aktin dan miosin yang tampak ikut berperan serta dalam proses ingesti melalui pembentukan mikrofilamen-mikrofilamen telah diisolasi (Bellanti, 1993).

Sesudah pembentukan fagosoma, membrana yang menyelimuti partikel-partikel itu, sedikit demi sedikit menjauh dari permukaan membrana, dan dimasukkan ke dalam sel, membentuk vakuola fagositik. Granula-granula lisosom dalam leukosit masuk bersamaan dengan fagosoma ini, dan membrana dari kedua struktur ini berfusi menjadi fagolisosom. Granula-granula lisosom pecah, melepaskan isi enzimatisnya ke dalam vakuola dan bercampur dengan partikel-partikel yang diingesti.

Proses ini disebut degranulasi, dan berperan sebagai mitra morfologik dalam pemindahan enzim-enzim dari granula lisosom ke dalam fagosom. Granula-granula leukosit (primer) analog dengan lisosom sel-sel lain dan berisi beberapa enzim hidrolitik dan zat-zat bakterisid lain. Pertama, kisaran keasaman ini dicapai oleh sel selama "percepatan respirasi" ("*respiratory burst*") berkaitan dengan fagositosis seperti diterangkan di bawah ini. Kedua, kebanyakan enzim yang terdapat dalam granula-granula primer mempunyai pH optimum sama dengan kisaran asam ini. Fakta-fakta ini memberu kesan bahw turunnya pH selama fagositosis dapat memicu proses digestif dengan melepaskan enzim hidrolitik yang berfungsi terbaik pada pH rendah (Roit, 1995).

Menurut Bellanti (1993), sesudah pembentukan vakuola fagositik, rangkaian reaksi biokimia dimulai di dalam sel-sel fagositik. Jalur metabolik yang terutama terlibat termasuk jalur glikolitik dan *shunt* hexose monofosfat (HMP). Lagi pula, makrofag alveolar menggunakan jalur asam trikarbosiklik, yang merupakan sumber energi utama. Secara bersama, stimulasi dari jalur-jalur ini diakhiri dengan percepatan respirasi dan terdiri atas kejadian berikut ini: (1) peningkatan glikolisis; (2) peningkatan nyata aktivitas *shunt* HMP; dan (3) kenaikan kebutuhan konsumsi oksigen dan kenaikan produksi H_2O_2 dan asam laktat. Meningkatnya produksi asam laktat, sebagian bertanggung jawab terhadap penurunan pH dalam fagosoma. Menyertai percepatan respirasi adalah peningkatan peredaran RNA dan fosfolipid, yaitu kejadian-kejadian yang penting dalam sintesis protein dan pembentukan membrana. Perubahan-perubahan ini sangat menyolok pada neutrofil tetapi juga terlihat pada fagosit mononuklear dalam skala yang lebih kecil.

Salah satu dugaan enzim utama yang terlibat dalam metabolisme sel fagosit adalah NADPH oksidase. Enzim ini dapat melayani dua macam fungsi: (1) ia menyediakan sumber NADP yang mungkin merupakan faktor pengatur terbatas dari aktivitas HMP *shunt*; atau (2) ia mungkin terlibat dalam pembentukan H_2O_2 yang merupakan komponen esensial dalam

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

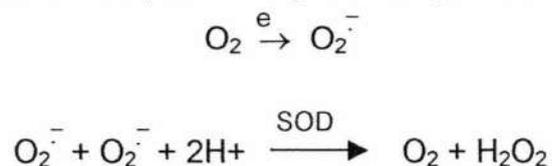
reaksi mikrobisid. Lagi pula, NADP juga ikut berperan serta dalam beberapa fungsi metabolik lain, misalnya produksi glutation, metabolisme RNA, metabolisme lipid, dan pembentukan membran, kejadian-kejadian yang esensial untuk fungsi sel fagositik. Sistem enzim lain yang terlibat dalam konversi NADPH menjadi NADP, termasuk glutation peroksidase yang mengoksidasi glutation tereduksi (GSH) menjadi bentuk teroksidasinya (GSSG) dalam lingkungan H_2O_2 , GSSG selanjutnya direduksi menjadi GSH dan pada gilirannya mengubah NADPH menjadi NADP.

Dengan percepatan respirasi, terjadi peningkatan produksi H_2O_2 atau anion superoksida (O_2^-). Anion superoksid mengalami dismutasi dalam lingkungan enzim superoksid dismutase, dengan hasil berikutnya H_2O_2 . Produksi H_2O_2 lebih menyolok pada PMN daripada dalam jaringan atau dalam makrofag alveolar dan tampaknya sangat penting pada fungsi mikrobisid PMN. Agar berhasil menghancurkan dan melenyapkan mikroorganisme misalnya bakteri, langkah selanjutnya dalam proses fagositosis adalah pembunuhan dan penghancuran mikroorganisme oleh sel fagositik.

Sistem yang terdiri dari H_2O_2 , halide dan MPO telah dibuktikan mempunyai aktivitas mikrobisid yang kuat, memperbesar daya mikrobisid sel-sel fagositik, terutama PMN. Peranan sistem ini pada fagosit mononuklear kurang jelas. Mekanisme kerja kompleks MPO- H_2O_2 -halide diduga terlibat dalam pembentukan aldehid dan hipoklorid atau halogenasi dari protein-protein bakteri, dan pengaruhnya dapat mematikan mikroorganisme. Arti reaksi ini jelas terlihat pada beberapa gangguan klinis fungsi neutrofil, adanya kegagalan pembentukan H_2O_2 menyebabkan pembunuhan bakteri sempurna dan secara klinis terjadi infeksi berulang misal CGD, yang memberi kesan bahwa ada mekanis lain selain sistem MPO- H_2O_2 -halide yang melakukan aktivitas anti mikroba. Sistem lain ini diberi nama sistem mundur (*back-up system*). Bila konsentrasi H_2O_2 , kerja

MPO dapat diganti oleh katalase. Jalur pengganti seperti ini mungkin penting pada makrofag, yang peranan MPO nya kurang jelas.

Di antara sistem MPO-independen, H_2O_2 sendiri mempertunjukkan aktivitas anti mikroba, dan karena H_2O_2 ini dihasilkan selama peristiwa fagositik ia mungkin dapat membantu kemampuan membunuh sel fagositik. Radikal superoksida (O_2^-) yang dihasilkan selama fagositosis dibentuk oleh reduksi univalen molekul oksigen dan merupakan bagian yang sangat penting dalam aktivitas bakterisid. Dismutasi radikal superoksida ini selanjutnya dilakukan oleh dismutase superoksida (*superoxyde dimutase SOD*) dan menghasilkan pembentukan H_2O_2 .



Radikal superoksida (O_2^-), di samping aktivitas bakterisidnya sendiri, melalui dismutasi dapat menghasilkan H_2O_2 yang bersifat mikrobisid. Hal ini menunjukkan bahwa radikal superoksida bekerja sebagai perantara pada produksi H_2O_2 dan secara tidak langsung memperbesar sistem yang ditengahi MPO (*MPO-mediated*). Singlet oksigen (O_2^*) adalah suatu molekul oksigen yang dalam keadaan bermuatan listrik dan memancarkan cahaya (kemiluminesensi) bila ia kembali ke keadaan tingkat dasar triplet (O_2). Penemuan biokimia ini telah digunakan juga untuk penilaian fungsi sel-sel fagositik. Sumber Singlet oksigen ini (O_2^*) mungkin merupakan reaksi yang ditengahi MPO (*MPO-mediated*) yang dapat membentuk hipoklorit. Singlet oksigen dapat juga bereaksi dengan kelompok-kelompok kimia tidak jenuh tertentu, misalnya kelompok-kelompok etilen, membentuk dioksitan melalui ikatan rangkat yang tidak stabil, dan mungkin toksis terhadap mikroorganisme dan karenanya bertanggung jawab pada pembunuhan yang dilakukan oleh sistem yang ditengahi MPO. Pendapat lain tentang mekanisme antimikroba, termasuk sistem askorbat-peroksida, yang dapat berfungsi dalam sinergisma dengan

lisosom dan bahkan dapat lebih kuat di dalam lingkungan ion logam seperti kobal dan tembaga. Oksidasi asam amino dapat juga menambah pembentukan H_2O_2 .

Fagosit mononuklear sangat kurang dalam aktivitas mieloperoksidase, oleh karena itu harus mengambil jalan mekanisme mikrobisid yang lain. Meskipun sekarang mekanisme mikrobisid fagosit mononuklear sedikit diketahui, mereka mempertunjukkan percepatan metabolik dan generasi H_2O_2 dan O_2^- seperti yang dipertunjukkan oleh PMN, tetapi dalam jumlah sedikit.

Mekanisme independen oksigen rupa-rupanya juga menambah kemampuan membunuh sel fagosit, karena anaerobiosis tidak seluruhnya menghalangi aktivitas mikrobisid mereka. Meskipun ada bukti bahwa lisozim dapat dilibatkan secara langsung dalam pembunuhan bakteri, enzim ini mungkin juga bekerja dalam proses digesti sesudah pembunuhan bakteri. Laktoferin, suatu protein yang mengikat besi, leukin dan fagositin, terdapat di dalam granula spesifik PMN tetapi tidak terdapat dalam fagosit mononuklear, juga telah dibuktikan mempunyai sifat bakteristatik. Protein granula kationik juga memperlihatkan aktivitas antimikroba, mungkin sesudah terikat dengan mikroorganisme, suatu fungsi yang juga tidak terdapat dalam laktat sebagai akibat percepatan pernafasan menurunkan pH intraseluler dan dengan demikian memberikan suatu kondisi yang baik untuk kerja enzim digestif, daripada berfungsi secara langsung sebagai agen mikrobisid.

2.5.3 Neutrofil

Sel-sel ini, yang merupakan 60-70% leukosit yang beredar, berkembang dalam sumsum tulang dan dikeluarkan ke dalam sirkulasi. Garis tengah mereka sekitar 12 μm , dengan satu inti yang terdiri atas 2-5 lobus yang berbentuk sosis (biasanya 3 lobus) satu sama lain saling dikaitkan oleh benang-benang halus kromatin. Neutrofil imatur mempunyai inti yang tidak bersegmen yang berbentuk tapal kuda.

Inti semua granulosit mengikuti bentuk kromatin yang sama dimana massa heterkromatin yang padat tersebar pada pinggir membran inti. Zona-zona yang kromatinnya jarang terutama terletak pada tengah inti.

Granula-granula yang terdapat pada neutrofil (50-200 dalam setiap sel) dikelilingi oleh suatu membran yang dapat dibagi dalam 2 jenis: azurofilik dan spesifik. Selain sifat pewarnaannya, granula-granula juga berbeda dilihat dari bentuk kronologik tiap-tiap jenis granula selama perkembangan granulosit dalam sumsum tulang ; bentuk histologis dari 2 jenis granula-granula dalam mikroskop elektron ; dan enzim yang terdapat dalam tiap jenis, yang menunjukkan perbedaan dalam fungsinya. Granula azurofilik tampak pertama kali pada stadium pematangan promielosit dan jumlahnya berkurang dengan tiap-tiap pembelahan sel yang berturut-turut; mereka terdapat dalam sel-sel matang, tetapi sebagian besar kehilangan pewarnaannya; mereka besar dan di bawah mikroskop elektron tampak penuh elektron. Neutrofil mengandung enzim-enzim lisosom dan peroksidase.

Setelah segmentasi intinya, neutrofil berada dalam stadium akhir diferensiasi, mempunyai kemampuan sintesis protein yang terbatas. Neutrofil matang jarang mengandung retikulum endoplasma granuler, sedikit mikrokondria, aparatus Golgi rudimenter, dan sedikit granula glikogen. Ini adalah sel terminal yang melakukan fungsi fagositik, ia tidak mampu menggantikan protein yang digunakan dan akhirnya mati.

Neutrofil merupakan garis depan pertahanan seluler terhadap invasi jasad renik. Mereka menfagosit partikel-partikel kecil dengan aktif, dan hal ini mungkin disebabkan spesialisasi membrannya untuk proses ini. Sel-sel tidak aktif dan berbentuk sferis waktu beredar tapi bentuknya berubah bila melekat pada substrat padat, dimana mereka bermigrasi dengan pseudopodia. Sel bergerak dengan kecepatan 19-36 μ m/menit. Setelah melekat pada permukaan penyokong, granulosit mengalami proses yang dinamakan "ekspansi" atau penyebaran, ditandai oleh emisi

sitoplasmik yang menonjol ke berbagai arah yang di ubah menjadi jumbaiian hialoplasma (sitoplasma tanpa granula), garis tengah mencapai 20 μm . perlu dicatat bahwa granula-granula mempertahankan jarak 3-5 μm dari pinggir sel dimana terjadi pengerutan membran. Pada proses ini, dasar sel tidak melekat pada substrat tetapi mempertahankan dirinya di atas permukaan dan hanya menyentuh substrat dengan tonjolan-tonjolan filamentosa hialoplasma.

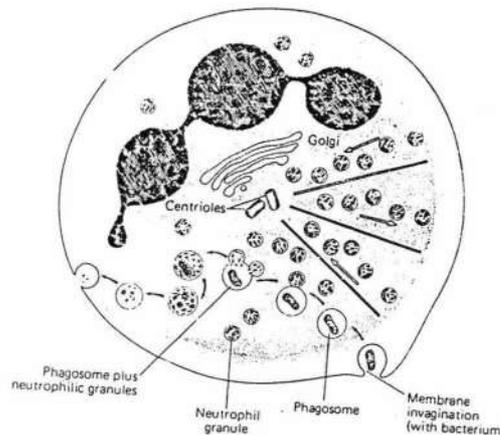
Partikel-partikel yang difagosit oleh neutrofil dikelilingi oleh pseudopodia yang bersatu mengelilinginya, jadi partikel akhirnya menempati suatu vakuola (fagosom) yang dibatasi oleh membran yang berasal dari permukaan sel dan mengandung cairan ekstrasel dengan isinya. Segera setelah itu, granula azurofilik dan granula spesifik menggabungkan membrannya pada membran fagosom dan mengosongkan isinya ke dalam fagosom, sehingga melindungi sitoplasma dari kontak dengan enzim-enzim yang terdapat dalam granula. Pada proses ini terdapat pengeluaran granula dan akibatnya jumlah granula berkurang. Adanya asam-amino D oksidase dalam granula azurofilik penting dalam pencernaan dinding sel bakteri yang mengandung asam-amino D. lisosom yang terdapat dalam granula-granula ini juga penting untuk destruksi dinding sel bakteri.

Enzim ke tiga juga sebagai pembantu efek bakterisidal polimorfonuklear neutrofil. Selama proses fagositosis, dibentuk peroksida. Mieloperosida yang terdapat dalam neutrofil berikatan dengan peroksida dan halida bekerja pada molekul tirosin dinding sel bakteri dan menghancurkannya.

Di bawah pengaruh zat toksik tertentu seperti streptolisin (toksin *Streptococcus*), membran granula-granula neutrofil pecah, mengakibatkan proses pembengkakan diikuti oleh aglutinasi organel-organel dan destruksi neutrofil.

Neutrofil mempunyai metabolisme yang sangat aktif dan mampu melakukan glikolisis baik secara aerob maupun anaerob. Mereka terutama

tergantung pada proses akhir untuk suplai energinya. Siklus Krebs kurang penting, karena mungkin dipandang dari kurangnya mitokondria pada sel-sel ini. Kemampuan neutrofil untuk hidup dalam lingkungan anaerob sangat menguntungkan, karena mereka dapat membunuh bakteri dan membantu membersihkan debris pada jaringan nekrotik. Fagositosis oleh neutrofil merangsang aktivitas heksosa monofosfat shunt, meningkatkan glikogenolisis.



Gambar 2.8. Perincian ultrastruktur neutrofil dan proses pencernaan intrasel dari bakteri yang difagosit (sumber Volk., dkk, 1986).

2.6 Pengaruh Minyak Ikan pada Aktivitas Fagositosis dan sitokin

Minyak ikan pada mamalia mempengaruhi imunitas humoral dan imunitas seluler yang disebabkan oleh PGE_2 (Fritsche, dkk., 1992). Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa ω -3 PUFA menekan produksi sitokin. Salah satu mekanisme yang terlibat adalah metabolisme eikosanoid (Jolly, dkk., 1997). Hal ini terjadi karena peningkatan derajat ω -3 PUFA pada diet secara progresif akan menurunkan kandungan asam arakidonat pada jaringan fosfolipid sel target dan efektor sehingga terjadi peningkatan derajat ω -3 PUFA (Whelan, 1996 ; Korver dan Klasing, 1997). Struktur yang mirip antara jaringan asam arakidonat dengan asam

eikosapentanoid dari minyak ikan memungkinkan bertambahnya efektivitas asam eikosapentanoid sebagai antagonis asam arakidonat dan metabolismenya (Whelan, 1996). Penggantian ini dapat menghasilkan penurunan pelepasan tanda proinflamasi oleh sel efektor dan dapat juga menurunkan responsifitas sel target terhadap tanda proinflamasi (Korver dan Klasing, 1997).

Dalam beberapa penelitian, diet ω -3 PUFA akan menurunkan produksi PGE₂ dan LTB₄ yang berperan dalam kemotaksis, agregasi, pelepasan enzim dan pembangkitan Supperoksida pada PMN (Meydani dan Dinarello, 1993). Diet ω -3 PUFA juga menekan sel media respon imun dan produk prostaglandin pada anjing jenis beagle (Wonder, dkk., 1997). Perubahan produksi eikosanoid prostaglandin dan leukotrin telah dipostulatkan sebagai mekanisme perubahan produksi sitokin setelah melakukan diet asam lemak (Block, dkk., 1996). Endres dalam Block, (1996) menyatakan bahwa besarnya penurunan produksi TNF pada pemberian minyak ikan sebanyak 10 mg disebabkan berkurangnya produk leukotrin. Data ini menunjukkan bahwa berkurangnya sintesis leukotrin menyebabkan berkurangnya produksi sitokin setelah pemberian Diet ω -3 PUFA (Block, dkk., 1996).

Meydani, dkk (1993), menunjukkan bahwa produk sitokin yaitu IL-1 β , IL-6 dan TNF- α dari sel mononuklear secara bermakna lebih rendah pada manusia setelah mengkonsumsi minyak ikan. Dilaporkan bahwa minyak ikan yang dikonsumsi oleh wanita dan laki-laki yang sehat tidak hanya menekan produk TNF saja tapi juga IL-1, IL-2 dan IL-6. Penekanan ini terjadi 10 minggu setelah diet minyak ikan terus-menerus (Meydani, dkk., 1991). Penelitian oleh Grimbell (1994) juga ditemukan penurunan produksi IL-6 dan TNF pada sel mononuklear darah perifer tikus yang mengkonsumsi asam lemak selama empat hari (Bloc, dkk., 1996). Pada binatang percobaan yang diberi diet minyak ikan untuk melihat respon endotoksin dan sitoksin proinflamasi menunjukkan adanya penurunan IL-1 β , IL-6 dan TNF- α , IL-8 sehingga dikatakan bermanfaat untuk terapi

inflamasi akut maupun kronis (Calder, 1997). Billiar, dkk., (1998) melaporkan penurunan bioaktivitas IL-1 dan produk TNF secara *in-vitro* pada makrofag hati tikus setelah enam minggu diberi diet minyak ikan. Adanya penurunan PGE₂ dan sitokin tersebut diduga akan mempengaruhi oleh perubahan fungsi makrofag yang dipengaruhi oleh meningkatnya fluiditas membran oleh karena minyak ikan (Torabinejad, dkk., 1991, Peck, 1994 ; Block, dkk., 1996).

2.7 *Streptococcus mutans*

2.7.1 Pengertian dan ciri-ciri

Streptococcus mutans yang merupakan keluarga *streptococaceae* mempunyai 21 species, dibagi dalam kelompok *hemolytic pyogenic*, kelompok viridans, kelompok lactic dan kelompok *enterococcus* (Burnet dan Schurstr, 1980).

Streptococcus mutans termasuk kelompok bakteri yang mempunyai sifat acidogenic yang menghasikan asam selama pertumbuhannya dan aciduric yaitu tumbuh dalam lingkungan yang bersifat asam (Miller dan Palenik, 1994).

Streptococcus mutans merupakan tipe sel gram positif, berbentuk bulat, biasanya dijumpai berpasangan atau berbentuk seperti rantai. Diameter sel *Streptococcus mutans* berkisar antara 0,5 – 0,75 μm .

2.7.2 Patogenesis Karies oleh *Streptococcus mutans*

Pada plak dan pengaruh kadar sukrose yang rendah, *Streptococcus mutans* ditemukan dalam jumlah prosentase yang kecil, tetapi jumlah ini akan meningkat sampai 50% atau lebih pada keadaan dimana terdapat kadar sukrose yang tinggi. Terdapat korelasi antara jumlah *Streptococcus mutans* dengan aktivitas karies, yaitu bila aktivitas karies tinggi dijumpai peningkatan jumlah *Streptococcus mutans*. *Streptococcus mutans* dapat diisolasi dari lesi karies gigi manusia (Burnett dan Schuster, 1980)

Carranza dan Perry (1986); Liquist dan Emilson (1990) mengatakan bahwa genus *Streptococcus* merupakan bakteri yang terbanyak dalam rongga mulut, dan *Streptococcus mutans* dianggap sebagai bakteri yang berperan dalam pembentukan plak gigi.

Dalam kaitan dengan terjadinya karies gigi, sifat virulensi *Streptococcus mutans* ditunjukkan dengan kemampuannya membentuk plak gigi dari sukrose. Bakteri ini mempunyai enzim ekstraseluler, yaitu Glucosil – Transferase, yang mampu membentuk glikan ikatan α (1-3). Polisakarida ekstraseluler ini, tak mudah larut dalam air dan bersifat lengket sehingga memudahkan perlekatan bakteri ini pada permukaan gigi. *Streptococcus mutans* akan memetabolisme karbohidrat menjadi asam yang dapat mengakibatkan demineralisasi gigi. Melalui mekanisme inilah *Streptococcus mutans* menunjukkan sifat kariogeniknya (Roeslan, 1992).

Struktur dan komposisi antigenik *Streptococcus mutans* merupakan pertimbangan penting dalam pengertian respons umum. Seperti pada kokus gram positif lainnya terjadi dari dinding sel dan membran protoplasma yang meliputi protoplasma organisme. Matriks dinding sel terdiri dari peptidoglikan rantai silang yang mempunyai komposisi gula amino N-asetil, asam N-asetinuramik dan beberapa peptida. Antigen permukaan dinding sel terlihat dalam imunogenitas organisme seperti yang terlihat pada gambar berikut ini. Asam lipoteikhoik (LTA) berasal dari membran protoplasma, tetapi berpenetrasi ke dinding sel dengan fungsi sebagai komponen permukaan. LTA mempunyai komponen karbohidrat yang mungkin memperkaya LTA dengan beberapa spesifitas. Komponen lain LTA adalah fosfat gliserol yang menjadi pendukung bakteri gram positif dan mungkin bertanggung jawab terhadap hampir semua reaksi silang diantara LTA (Lehmiger, 1995).

Streptococcus mutans pertama kali ditemukan pada tahun 1924 oleh Clarke. Bakteri ini dapat menghasilkan suatu polisakarida

ekstraseluler yang disebut mutan (Burnet dan Schuester, 1980 ; Mc. Ghee, 1982 dalam Trelia Boel, 2000).

Soet (1990) menyatakan bahwa *Streptococcus mutans* ditemukan pada plak gigi (permukaan gigi licin), dan pada saliva dalam persentase yang bervariasi.

Tabel 2.1. Persentasi dari distribusi *Streptococcus rongga* mulut pada lokasi yang berbeda.

Lokasi	Spesies (%)				
	<i>S. mutans</i>	<i>S. sanguis</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>S. mitior</i>	<i>S. miller</i>
Plak Gigi	1 – 60	15 – 25	0,1	1 – 10	1 – 10
Gingiva	0 – 02	10 – 15	1	5 – 10	14 – 56
Mukosa bukal	01	10 – 15	10 – 15	5 – 60	-
Dorsum lidah	0,1	1 – 5	25	10 – 15	5 – 10
Saliva	0,1	1 – 10	15	10 – 20	1 – 10

(Mc. Ghee, 1982)

Streptococcus mutans dapat dibedakan dari *Streptococcus* lainnya melalui kemampuan melakukan fermentasi manitol, serbitol, bentuk koloni dan kemampuan mensintesis, dekstran, levan dan mutan.

Streptococcus mutans termasuk *Streptococcus* yang dijumpai pada plak gigi, dapat memfermentasi manitol dan sorbitol serta menghasilkan ekstraseluler glukans dari sukrosa. Pada umumnya *Streptococcus mutans* bersifat kariogenik.

2.7.3 Peran Fagositosis Terhadap Karies

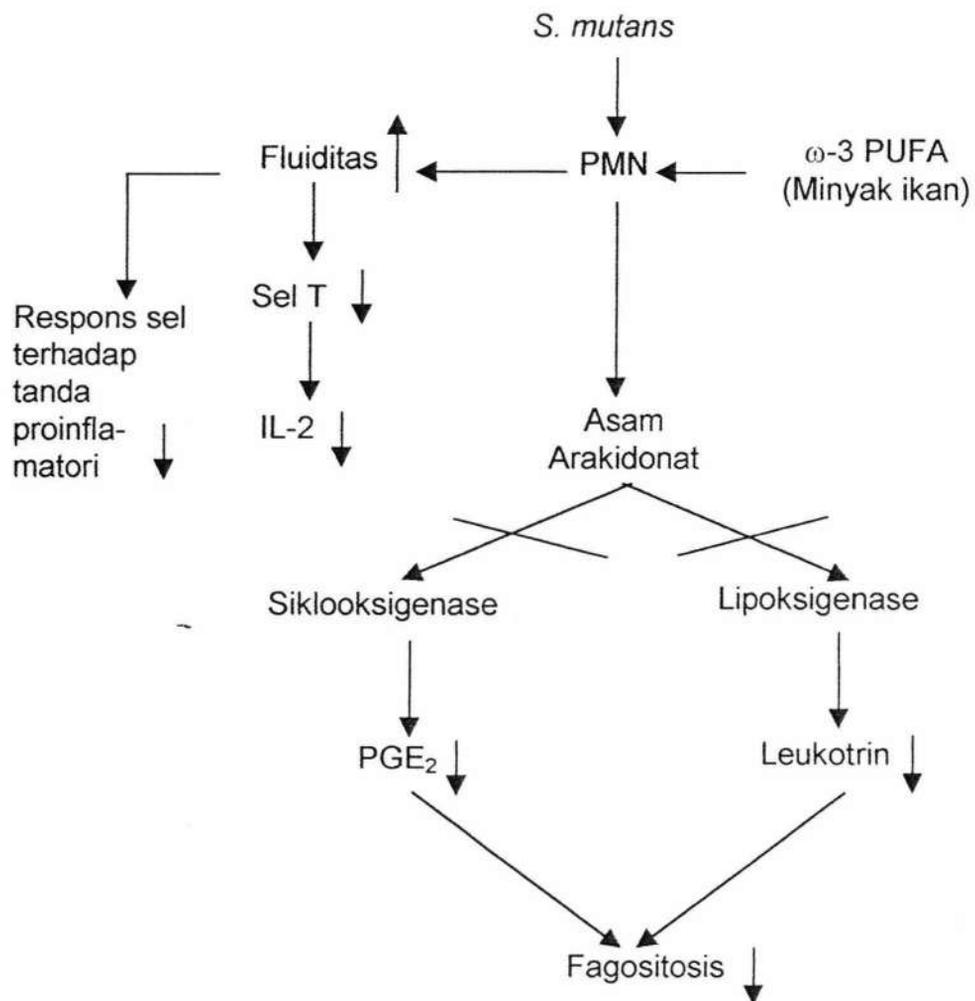
Serum antibodi mempunyai peranan dalam opsonisasi *Streptococcus mutans* dan tampaknya mempunyai peranan khusus adalah IgG. Leukosit PMN mempunyai reseptor khusus untuk Fc dari IgG yang dapat terjadi ikatan antara *Streptococcus mutans* dan antibodi yang melekat pada membran PMN. Kompleks tersebut kemudian menyebabkan

terbentuknya vakuol yang disebut fagosom, yang kemudian bersatu dengan lisosom dan membentuk fagolisosom. Organisma kemudian akan dibunuh oleh aksi dari enzim lisosom. Komplemen adalah merupakan agen opsonisasi yang lain, dengan IgG dan IgM akan mengaktifkan komplemen ketika kombinasi dengan antigen C3b selama terdapat reseptor pada leukosit PMN. Opsonisasi, fagositosis dan pembunuhan oleh leukosit PMN atau makrofag adalah merupakan salah satu fungsi protektif yang esensial terhadap *Streptococcus mutans* (Lehner, 1995).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konseptual



Keterangan :

ω -3 PUFA (minyak ikan) yang diberikan pada tikus yang dipapar dengan *Streptococcus mutans* akan menurunkan kandungan asam arakidonat derajat ω -3 PUFA. Struktur yang mirip antara asam arakidonat dengan asam eikosapentanoid akan berperan sebagai antagonis asam arakidonat yang mengakibatkan bertambahnya efektivitas kerja ω -3 PUFA. Dengan adanya penurunan asam arakidonat, maka metabolisme 2

jalur (siklooksigenase dan lipoksigenase) akan terganggu. Adanya hambatan jalur tersebut, pembentukan PGE_2 (dari siklooksigenase) dan leukotrin (dari lipoksigenase) juga menurun.

Penurunan PGE_2 akan mengakibatkan penurunan sitokin IL-1, IL-6, IL-8, $TNF\ \alpha$ yang berakibat penurunan fagositosis PMN. Sedangkan penurunan leukotrin akan berpengaruh juga pada penurunan fagositosis PMN.

Adanya peningkatan fluiditas membran dapat berpengaruh terhadap respons sel terhadap tanda proinflamatori, kemungkinan juga dapat berpengaruh terhadap aktivitas fagositosis PMN.

3.2 Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini adalah :

1. Minyak ikan menurunkan aktivitas fagositosis PMN secara kuantitatif.
2. Semakin tinggi dosis minyak ikan yang diberikan, semakin menurunkan jumlah bakteri yang difagosit oleh PMN.

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan eksperimental laboratoris. Adapun rancangan penelitian yang dipergunakan adalah rancangan acak lengkap. Penelitian ini menggunakan tikus wistar jantan yang berumur 1,5 bulan dengan berat 100 – 200 g yang dibagi menjadi 4 kelompok (masing-masing 7 ekor) yang terdiri dari kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan, yang sebelumnya dilakukan adaptasi selama 7 hari dan diberi makan, minum secara *ad libitum*. Perlakuan (3 kelompok) yang diberikan adalah minyak ikan dengan dosis 0,5 ml, 1,5 ml dan 1,5 ml dengan pemberian 1 kali perhari dan dipapar *S. mutans* setelah dua minggu (14 hari). Kelompok kontrol adalah tikus yang diberi makanan standar dan dipapar *S. mutans* setelah 14 hari. Sedangkan pemberian minyak ikan secara peroral selama 14 hari. Banyaknya ulangan untuk tiap-tiap perlakuan adalah 7. Jadi jumlahnya semuanya 28.

4.2 Unit Sampel : Tikus Wistar Jantan yang berumur 1,5 bulan dengan berat 100-200 g yang diperoleh dari PUSVETMA Surabaya.

4.3 Besar Sampel : Berdasarkan penelitian tentang minyak ikan (Vreden, 1995 ; Blok,1996), jumlah sampel yang digunakan masing-masing kelompok 7 ulangan.

4.4 Variabel Penelitian:

4.4.1 Variabel tergantung : Leukosit (PMN)

4.4.2 Variabel bebas : Minyak ikan, *S. mutans*

4.4.3 Variabel terkendali : prosedur lab, analisis sampel, cara memelihara hewan, cara memberi



makanan hewan percobaan, kondisi dan umur hewan percobaan.

4.5 Definisi Operasional

Aktivitas fagositosis PMN adalah proses penelanan dan penghancuran bakteri tertentu, sel yang rusak dan benda koloid. Dimana salah satu alat ukur yang dipakai untuk mengukur aktivitas ini adalah dengan mikroskop cahaya dengan cara menghitung jumlah PMN yang aktif (menfagosit bakteri). Dimana bakteri yang telah ditelan akan terlihat masuk ke dalam vakuol yang disebut Fagosom dan bergabung dengan lisosom sehingga terbentuk fagolisosom. Sedangkan sel PMN berbentuk bulat, inti berlobi, bersegmen 2 atau 3, Sitoplasmanya mengandung granula kecil-kecil berwarna merah atau coklat,

Minyak ikan merupakan lemak yang berbentuk cair yang berasal dari ikan Cod, Hiu, Hering yang mengandung PUFA (*Poliunsaturated fatty acid*), EPA (*Eisopentaenoic acid*), DHA (*Docosahexaenoic acid*).

S. mutans merupakan bakteri gram positif, berbentuk bulat yang dijumpai berpasangan atau berbentuk seperti rantai dengan diameter sel 0,5 – 0,75 μm . Minyak jagung adalah asam lemak tak jenuh (PUFA) yang mengandung asam arakidonat.

4.6 Bahan :

- 4.6.1 Minyak ikan, *S. mutans*
- 4.6.2 Makanan standar
- 4.6.3 Cat Giemsa
- 4.6.4 PMN
- 4.6.5 Metanol
- 4.6.6 EDTA
- 4.6.7 Minyak Ikan
- 4.6.8 Tikus
- 4.6.9 Makanan Tikus

4.6.10 Emersen Oil Xylol Tissue Lensa

4.7 Alat :

4.7.1 Kandang Tikus dan Perlengkapannya

4.7.2 Alat Sentrifugasi

4.7.3 Mikroskop Cahaya

4.7.4 Tabung Reaksi

4.7.5 Inkubator

4.7.6 Obyek Glass, Cover Glass

4.7.7 Sonde Tumpul

4.7.8 Disposable Syringe

4.7.9 Gunting Bedah

4.7.10 Ose

4.8 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.8.1 Lokasi Penelitian : Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember dan Lab. Biologi Fakultas MIPA Universitas Jember.

4.8.2 Waktu Penelitian : Agustus – Oktober 2000

4.9 Pengelompokan Sampel :

4.9.2 Kelompok kontrol (KO)

7 sampel tikus yang diberi makanan standar dan dipapar *S. mutans*

4.9.3 Kelompok perlakuan (KP) :

Tujuh sampel yang diberi diet minyak ikan dengan dosis berbeda dan diinfeksi *S. mutans*. Adapun pengelompokan berdasarkan dosis minyak ikan : (masing-masing 7 sampel)

Kp₁ : diet minyak ikan 0,5 ml perhari.

Kp₂ : diet minyak ikan 1 ml perhari.

Kp₃ : diet minyak ikan 1,5 ml perhari.

4.10 Prosedur Pelaksanaan Penelitian

4.10.1 Diet tikus

Dua puluh delapan tikus diberikan makanan standar dari ACT pakan ternak yang komposisinya sebagai berikut :

Kadar air	maksimum	13 %
Protein	maksimum	15 – 17 %
Lemak	maksimum	2,5 %
Serat kasar	maksimum	6 %
Abu	maksimum	13,5 %
Calcium	maksimum	3,25 – 0,95 %
Phosphor	maksimum	0,7 – 0,95 %

Tujuh ekor tikus tidak diberikan makanan tambahan, sedangkan 21 tikus (yang dibagi 3 kelompok) diberikan tambahan minyak ikan dengan dosis 0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml sekali perhari yang diberikan per oral dengan menggunakan sonde. Diet minyak ikan diberikan selama 14 hari. (Stephen, dkk., 1995 ; Raz, dkk., 1997).

4.10.2 Pemeliharaan Tikus

Tikus dipelihara dalam kandang, dimana masing-masing kandang berisi 2 tikus dengan perlakuan yang sama dan pemeliharaan di bantu oleh orang yang berpengalaman.

4.10.3 Bakteri

Bakteri yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah *S. mutans* yang diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya.

4.10.4 Inokulasi *S. mutans*

Tikus Wistar jantan di papari dengan *S. mutans* secara intra peritoneal (10^{-3} dalam 100 μ l salin). Selanjutnya darah diambil dari ekor setelah 3 hari inokulasi.

4.10.5 Analisis Sel fagositosis

4.10.5.1 Cara membuat sediaan hapus

1. Kaca objek dipilih yang bertepi betul-betul rata untuk digunakan sebagai "kaca penghapus". Kemudian dipatahkan sudut kaca objek tersebut menurut garis diagonal untuk dapat menghasilkan sediaan hapus darah yang tidak mencapai tepi kaca objek.
2. Satu tetes darah yang diletakkan pada \pm 2–3 mm dari ujung kaca objek. Kaca penghapus diletakkan dengan sudut 30–45 derajat terhadap kaca objek di depan tetes darah.
3. Kaca penghapus ditarik ke belakang sehingga menyentuh tetes darah, ditunggu sampai darah menyebar pada sudut tersebut.
4. Dengan gerak yang mantap kaca penghapus didorong sehingga terbentuk hapusan darah sepanjang 3 – 4 cm pada kaca objek. Darah harus habis sebelum kaca penghapus mencapai ujung dari kaca objek. Hapusan darah tidak terlalu tipis atau terlalu tebal, ketebalan ini dapat diatur dengan mengubah sudut antara kedua kaca objek dan kecepatan menggeser. Makin besar sudut atau makin cepat menggeser, makin tipis hapusan darah yang dihasilkan.

5. Hapusan darah dibiarkan mengering di udara dan diberi tanda sesuai perlakuan.

4.10.5.2 Perwarna Giemsa (Prinsip Romanowsky)

1. Sediaan hapusan diletakkan pada dua batang gelas di atas bak tempat pewarnaan.
2. Fiksasi sediaan hapus dengan metanol absolut selama 2 – 3 menit.
3. Sediaan hapus digenangi dengan zat warna Giemsa yang baru diencerkan. Larutan Giemsa yang dipakai adalah 5%, diencerkan dulu dengan larutan dapar dan dibiarkan selama 20 – 30 menit.
4. Dibilas dengan air ledeng, mula-mula dengan aliran lambat kemudian lebih kuat dengan tujuan menghilangkan semua kelebihan zat warna. Sediaan hapus diletakkan dalam rak dalam posisi tegak dan biarkan mengering.

4.10.5.3 Cara memeriksa (Aktivitas Fagositosis)

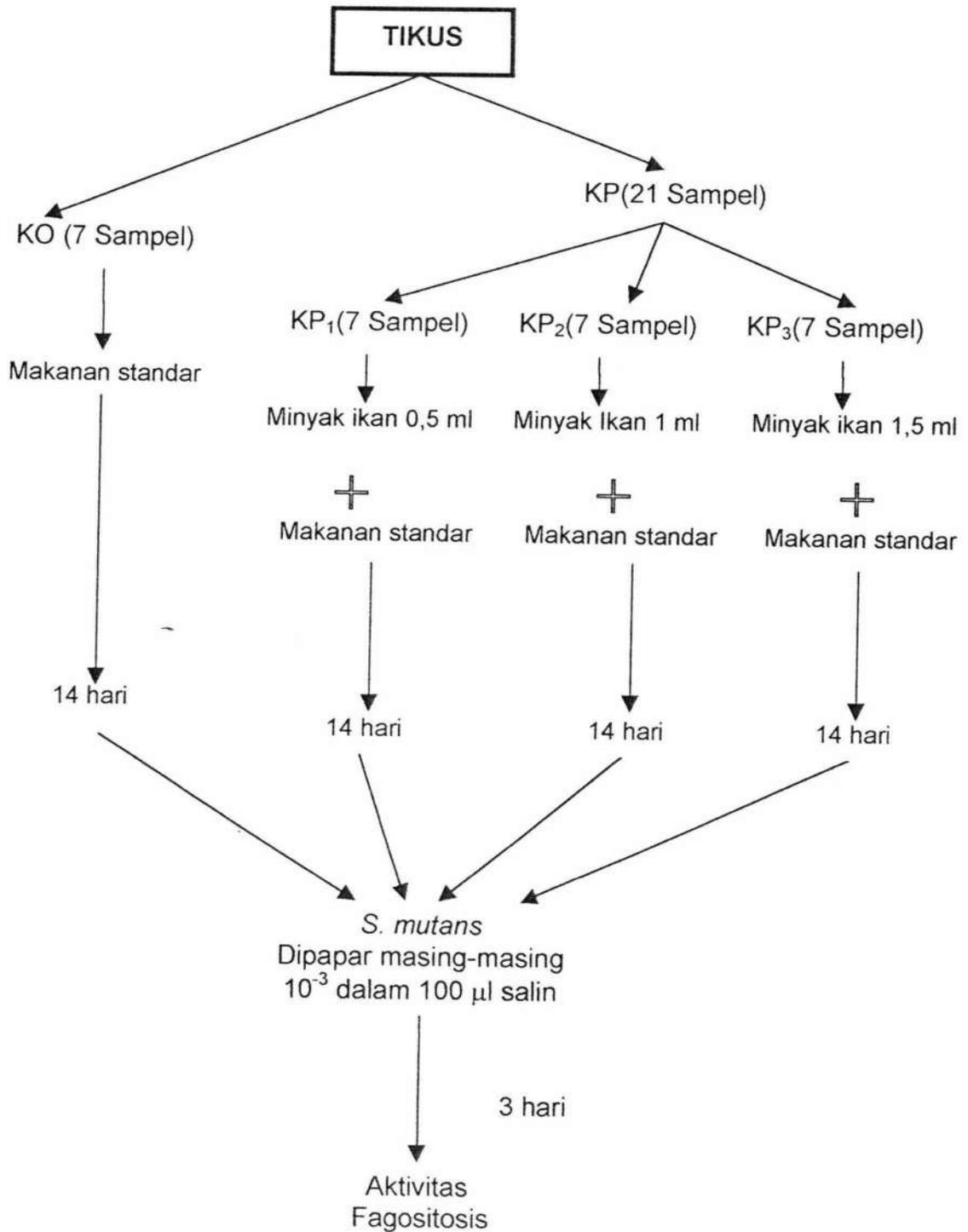
Satu tetes minyak emersi diletakkan pada bagian sediaan hapus yang baik untuk diperiksa dan tutup dengan kaca tutup. Kemudian dilihat dengan pembesaran lemah (lensa objektif 10 x dan lensa okuler 10 x) untuk mendapatkan gambaran menyeluruh dan apakah penyebaran sel-sel darah cukup merata; diperhatikan pula jumlah leukosit dan kelompok trombosit. Selanjutnya dilihat dengan lensa objektif 40 x; dengan pembesaran ini dapat dilihat keadaan eritrosit, leukosit, trombosit serta kelainan lain yang ada serta dapat dilakukan penilaian lebih lanjut dari sediaan hapus menggunakan lensa objektif 100 x

menggunakan minyak imersi dengan menyingkirkan kaca penutup dan mendorong ke tepi dan mengangkatnya. Kemudian ditetaskan 1 tetes minyak emersi pada sediaan hapus. Dengan menggunakan objektif yang sesuai (pembesaran 1000 kali) perhitungan PMN yang aktif dilakukan atas 100 leukosit. Dari 100 leukosit tersebut dihitung berapa jumlah PMN yang aktif menfagosit bakteri (mengikuti hukum poisson).

Selain itu juga dihitung jumlah bakteri yang difagosit oleh PMN. Sedangkan jumlah PMN aktif yang telah dihitung dipersentase dengan rumus :

$$\%PMN \text{ aktif} = \frac{\sum PMN \text{ aktif}}{\sum PMN \text{ aktif} + \text{tidak aktif}} \times 100\%$$

4.10.6 Skema Penelitian



4.10.7 Analisis Statistik

Data yang telah diperoleh dianalisis dengan menggunakan ANAVA untuk mengetahui adanya perbedaan, selanjutnya untuk mengetahui perbedaan dari masing-masing kelompok dilakukan pengujian dengan uji LSD.

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

Hasil penelitian dari aktivitas fagositosis PMN pada tikus yang dipapar dengan *S. mutans* tercantum pada tabel 5.1. Kelompok percobaan tersebut dianalisis dengan menggunakan ANAVA dan dilanjutkan dengan analisis LSD (*Least Significant Difference*) untuk membedakan rata-rata tiap kelompok percobaan. Dimana untuk melihat aktifitas fagositosis dapat diketahui dari jumlah PMN yang aktif, (persentase PMN yang aktif) dan jumlah bakteri yang difagosit.

5.1 Jumlah PMN yang Aktif (Persentase) dan Perbandingannya

Tabel 5.1. Data Jumlah PMN yang Aktif (Persentase)

n	Kontrol		Perlakuan					
		%	P1	%	P2	%	P3	%
1	29	85,20	27	77,14	26	74,29	22	64,71
2	29	87,88	25	73,53	24	70,59	20	64,52
3	28	84,85	24	75	26	74,29	19	53,33
4	30	85,71	26	76,47	23	71,88	22	64,71
5	29	85,29	27	77,14	27	72,97	20	64,52
6	28	84,85	26	74,29	26	74,29	22	64,71
7	28	87,5	27	75	25	73,53	22	62,86
\bar{X}	28,71 ^a	85,90 ^a	26 ^c	75,51 ^c	25,29 ^c	73,12 ^c	21 ^d	62,76 ^d
SD	0,76	1,41	1,16	1,43	1,39	1,43	1,30	1,21

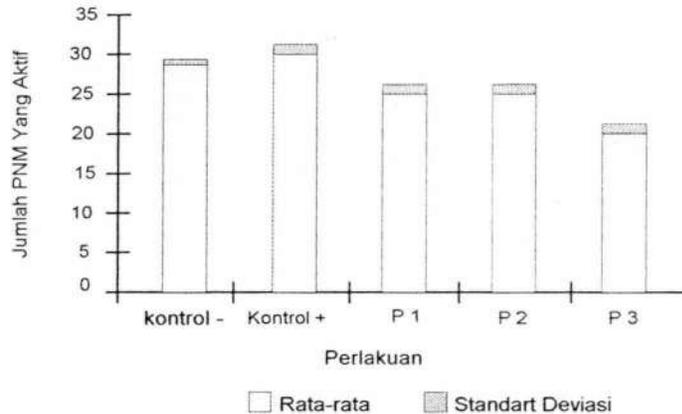
Keterangan. Superskrip dengan huruf yang tidak sama menunjukkan perbedaan yang signifikan

- KO (Kontrol) : Mendapatkan makanan standar
- P₁ (Perlakuan 1) : Mendapatkan diet minyak ikan dengan dosis 0,5 ml per hari
- P₂ (Perlakuan 2) : Mendapatkan diet minyak ikan dengan dosis 1 ml per hari
- P₃ (Perlakuan 3) : Mendapatkan diet minyak ikan dengan dosis 1,5 ml per hari

Dari ringkasan ANAVA diketahui bahwa F hitung ternyata lebih besar dari pada F tabel ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan jumlah PMN aktif antara kelompok percobaan. Selanjutnya

untuk menentukan perbedaan aktivitas PMN antar perlakuan, dilakukan uji LSD, dan hasilnya tertera pada Lampiran 3.

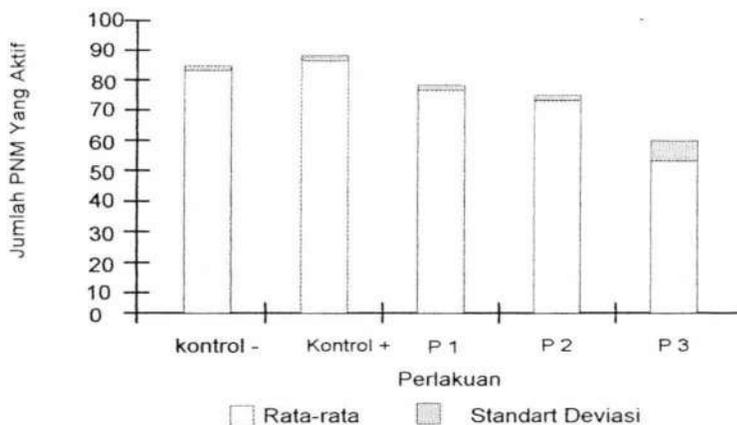
Berikut ini adalah gambaran diagram batang dari jumlah PMN yang aktif, persentase PMN aktif, jumlah bakteri yang difagosit PMN serta gambaran dari hasil penelitian.



Gambar 5.1. Diagram batang dari rata-rata jumlah PMN aktif

Keterangan :

Dari diagram batang di atas dapat diketahui bahwa rata-rata jumlah PMN yang aktif semakin menurun dengan semakin bertambah dosis minyak ikan berbeda bermakna, kecuali antara P₁ dengan P₂ (tidak bermakna).



Gambar 5.2. Diagram batang dari persentase jumlah PMN aktif.

Keterangan :

Diagram batang menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis minyak ikan yang diberikan, rata-rata persentase PMN yang aktif semakin menurun, kecuali antara P_1 dengan P_2 (tidak bermakna).

Dari hasil analisis jumlah PMN yang aktif dapat dijelaskan beberapa hal berikut :

1. Bila KO dibandingkan dengan P_1 , P_2 , P_3 terdapat perbedaan yang signifikan, yang menunjukkan bahwa diet minyak ikan dapat menurunkan jumlah PMN yang aktif menfagosit.
2. Kelompok P_1 dibandingkan dengan P_2 tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa dengan penambahan dosis minyak ikan 0,5 ml menjadi 1 ml tidak semakin menurunkan aktivitas fagositosis PMN.
3. Kelompok P_1 dibandingkan dengan P_3 terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Dari hasil ini berarti dapat dikatakan dengan penambahan minyak ikan menjadi 1,5 ml dapat semakin menurunkan aktivitas fagositosis PMN.
4. Kelompok P_2 bila dibandingkan P_3 terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$), berarti dengan dosis minyak ikan 1,5 ml/hari, maka aktivitas fagositosis PMN semakin menurun.

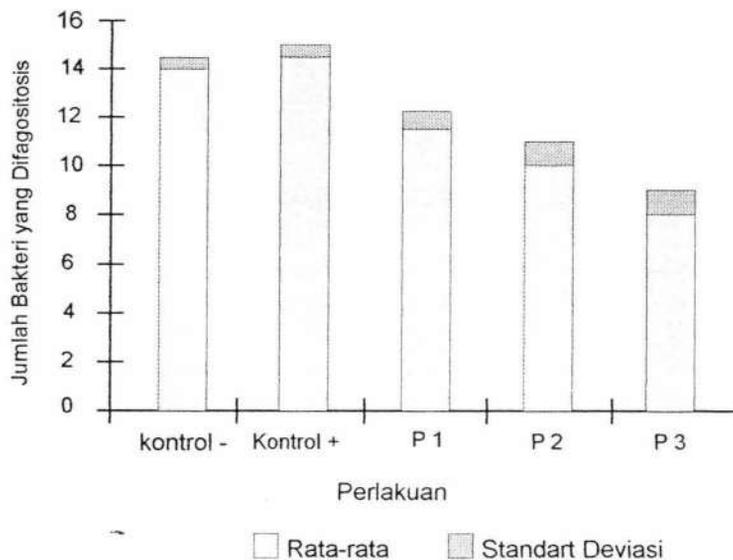
5.2 Jumlah Bakteri yang Difagosit dan Perbandingannya

Tabel 5.2. Jumlah Bakteri yang Difagositosis

n	Kontrol		Perlakuan	
		P1	P2	P3
1	13	13	11	9
2	13	13	11	8
3	14	12	10	7
4	14	11	10	9
5	14	10	12	7
6	14	12	10	9
7	15	11	12	8
\bar{X}	13,89 ^a	11,71 ^c	10,86 ^c	8,14 ^d
SD	0,76	1,11	0,90	0,90

Keterangan. Superskrip dengan huruf yang tidak sama menunjukkan perbedaan yang signifikan

Selanjutnya dari ringkasan ANAVA (Lampiran 3) diketahui F hitung (55,30) dibandingkan F tabel 4,02 hasilnya lebih besar ($p > 0,05$) F hitung. Hal ini menunjukkan bahwa dari jumlah bakteri yang difagosit PMN menunjukkan perbedaan. Untuk mengetahui perbedaan antar kelompok percobaan dilakukan uji LSD (Lampiran 3). Adapun diagram batang dari jumlah bakteri yang difagosit adalah sebagai berikut ini.



Gambar 5.3. Diagram batang dari rata-rata jumlah bakteri yang difagosit PMN

Keterangan :

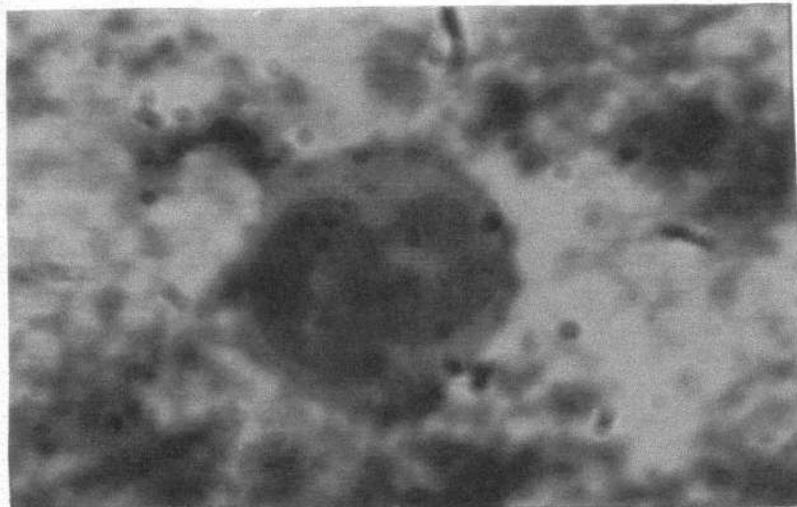
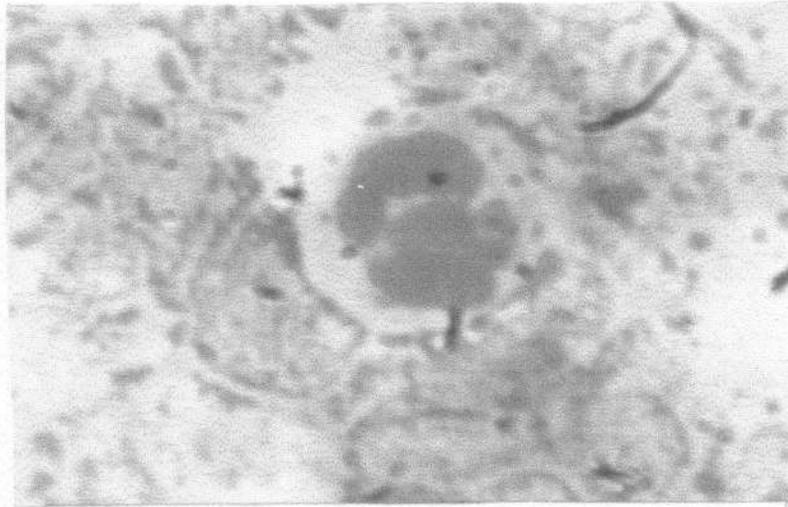
Diagram batang di atas menunjukkan bahwa rata-rata jumlah bakteri yang difagosit PMN semakin menurun dengan semakin bertambah dosis minyak ikan yang diberikan, kecuali dengan P₁ dan P₂ meskipun terdapat perbedaan tetapi tidak bermakna.

Dari hasil analisis jumlah bakteri yang difagosit PMN dapat dijelaskan beberapa hal berikut :

1. Bila kontrol dibandingkan P₁, P₂, P₃ terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Ini menunjukkan bahwa diet minyak ikan dapat menurunkan jumlah bakteri yang difagosit PMN.

2. Kelompok P_1 jika dibandingkan P_2 tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa hasil penambahan 0,5 ml dari 0,5 ml, tidak mempengaruhi penurunan jumlah bakteri yang difagosit PMN.
3. Kelompok P_1 jika dibandingkan P_3 menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Dari hasil ini dikatakan bahwa dosis 1,5 ml dapat menurunkan jumlah bakteri yang difagosit PMN.
4. Kelompok P_1 jika dibandingkan P_3 menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) ini berarti bahwa dengan penambahan diet minyak ikan dari 1 ml menjadi 1,5 ml akan berpengaruh terhadap penurunan jumlah bakteri yang difagosit PMN.

Dari hasil penelitian dapat ditunjukkan pada gambar berikut, memperlihatkan sel PMN yang aktif menfagosit *S. mutans*.



Gambar 5.4. PMN yang aktif dalam Fagositosis (Hasil Penelitian dengan pengecatan Giemsa)

Keterangan :

Pada foto di atas terlihat PMN yang sedang aktif melakukan Fagositosis. (Tanda panah adalah *S. mutans* yang difagosit PMN).

BAB 6

PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa minyak ikan (ω -3) yang diberikan per oral pada tikus, telah dapat menurunkan aktivitas fagositosis PMN secara kuantitatif. Pemberian dosis minyak ikan 0,5 ml ; 1 ml ; 1,5 ml per hari diketahui dapat semakin menurunkan aktivitas fagositosis. Penurunan ini ditandai dengan penurunan yang signifikan ($p < 0,05$) dari jumlah PMN yang aktif, persentase PMN yang aktif dan jumlah bakteri yang difagosit oleh PMN. Kecuali antara P_1 (0,5 ml) dan P_2 (1 ml) secara statistik tidak berbeda nyata baik pada jumlah PMN yang aktif (persentase) maupun jumlah bakteri yang difagosit. Hal itu terjadi dikarenakan rentang dosis yang kurang besar atau dapat dikatakan bahwa 0,5 ml dan 1 ml merupakan rentang dosis minimal.

6.1 Jumlah PMN yang Aktif (Persentase)

Pemberian dosis 0,5 ml, 1 ml dan 1,5 ml secara nyata dapat menurunkan aktivitas fagositosis PMN. Hal ini terbukti dengan adanya perbedaan yang signifikan antara perlakuan dan kontrol ($p < 0,05$). Hasil ini menunjukkan bahwa hanya dengan dosis 0,5 ml telah menurunkan aktivitas PMN. Sementara itu penelitian oleh Chee, dkk., 1990 menyebutkan dengan dosis 1 ml telah dapat menurunkan sitokin proinflamatori. Efek penurunan aktivitas PMN pada pemberian dosis ω -3 0,5 ml tidak berbeda nyata dengan dosis 1 ml ($p > 0,05$), tetapi bila dibanding dengan pemberian dosis 1,5 ml terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Adanya perbedaan tersebut berkaitan dengan laju aktivitas penghambatan enzim siklooksigenase dan lipooksigenase oleh ω -3. Namun demikian efek penambahan dosis tersebut terhadap laju reaksi penghambatan kedua enzim tersebut, masih diperlukan penelitian lebih lanjut. Selain itu apakah penambahan dosis lebih lanjut ($> 01,5$ ml)

akan semakin menurunkan aktivitas fagositosis PMN juga masih perlu diteliti.

6.2 Jumlah Bakteri yang Difagosit

Hasil serupa ditemukan pada efek penambahan dosis ω -3 terhadap jumlah bakteri yang difagosit oleh PMN. PUFA yang dapat mempengaruhi produksi PGE₂ dan LTB₄ akan merubah mekanisme fagositosis PMN. Mobilitas PMN ke arah bakteri akan menurun yang berdampak pada menurunnya jumlah bakteri yang difagosit. Penurunan kemampuan PMN untuk memfagosit bakteri mungkin juga berkaitan dengan adanya perubahan pada komponen membran sel PMN, sehingga mengakibatkan terganggunya atau terhambatnya proses perlekatan dan ingesti bakteri. Perubahan pada komponen membran yang dapat menyebabkan perubahan protein membran antara lain ICAM – 1 (*Intercellular Adhesion Molecule – 1*) yang diketahui berperan dalam interaksi dengan antigen yang akhirnya menyebabkan PMN tidak dapat mengenali bakteri.

Menurunnya aktivitas fagositosis PMN secara kuantitatif oleh minyak ikan kemungkinan berkaitan dengan hal-hal berikut : perubahan-perubahan yang terjadi pada lipid membran sel, cAMP, sintesis eikosanoid serta pada produksi sitokin.

6.3 Dasar Teori yang Mendukung Efek Minyak Ikan terhadap Fagositosis

6.3.1 Efek minyak ikan pada lipid dan reseptor membran.

Berbagai penelitian telah menunjukkan bahwa diet lipid dapat menyebabkan perubahan pada lipid membran sehingga mengakibatkan perubahan pada fluiditas membran sel. Inkubasi sel-sel dalam kultur dengan asam lemak eksogenous, menyebabkan perubahan komposisi asam lemak dan fluiditas membran (Cullen, Stubbs, Mahoni, Hoover dalam Peck 1994). Peningkatan jumlah PUFA dalam diet meningkatkan rasio asam lemak tak jenuh terhadap asam lemak jenuh

(polysaturated/saturated = P/S rasio) dan fluiditas membran (Leger, Fernandes, Berlin dalam Peck 1994).

Perubahan fluiditas membran yang berubah karena manipulasi diet lipid dapat menyebabkan perubahan fungsi sel. Murphy telah merangkum berbagai penelitian yang mengkaitkan komposisi asam lemak fosfolipid dengan fungsi enzim intramembran dan menyimpulkan bahwa fluiditas membran mempengaruhi fungsi protein intra membran. Terdapat bukti-bukti bahwa meningkatnya fluiditas membran menyebabkan meningkatnya mobilitas protein intramembran, misalnya penelitian Borochove dan Shinitzky dalam Peck 1994 menemukan bahwa peningkatan fluiditas membran menurunkan paparan protein membran terhadap lingkungan luar. Hal ini kemungkinan karena peningkatan membran dapat menyebabkan perubahan konformasi protein-protein membran, misalnya protein reseptor. Perubahan-perubahan pada reseptor sel dalam penelitian ini sel PMN, maka respons sel terhadap antigen juga berubah.

Penelitian pada protein-protein permukaan yang terlibat dalam aktivasi sel, mendapatkan informasi adanya pergerakan lateral protein-protein membran, juga interaksinya dengan sitoskeleton. Hoover, dkk., menduga bahwa ikatan asam lemak pada lipid tertentu mempengaruhi interaksi protein-lipid, konformasi protein dan akhirnya pada ikatan antara membran dengan sitoskeleton, yang menghasilkan perubahan pada aktivasi sel.

6.3.2 Efek minyak ikan pada *second messenger* dan *signaling cell* yang berkaitan dengan produksi sitokin.

Diet PUFA yang meningkatkan fluiditas membran dan mempengaruhi reseptor-reseptor pada membran dapat mempengaruhi *signaling cell* yang berkaitan dengan sitokin.

Perubahan pada *second messenger system* karena peningkatan terjadi pada cAMP karena pengaruh minyak ikan, terjadi karena peningkatan aktivitas enzim adenil siklase yang mengkatalisis sintesis

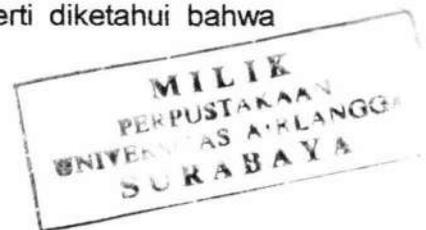
cAMP. Peningkatan cAMP diduga dapat berpengaruh terhadap penurunan respons sel terhadap tanda proinflamatori seperti terhadap penurunan sitokin proinflamatori dan fungsi fagositosis sel.

Beberapa penelitian tentang efek PUFA ω -3 pada transduksi sinyal intrasel yang berkaitan dengan produksi sitokin mendapatkan bahwa minyak ikan mempengaruhi *second messenger* DAG (Diasil gliserol) dan cAMP. Flower dalam Willem, 1996; Matras, Szamel dan Resch dalam Christopher 1997 mendapatkan bahwa suplemen PUFA ω -3 dapat meningkatkan konsentrasi DAG. Sedangkan Speiaer, dkk., dalam Willem 1996 mendapatkan bahwa PUFA ω -3 memodulasi aktivitas PKC (Protein kinase) dan cAMP. Berbagai penelitian tersebut menunjang bahwa minyak ikan dapat menginduksi perubahan-perubahan konsentrasi atau aktivitas faktor-faktor intrasel yang terlibat pada produksi sitokin.

Perubahan cAMP oleh minyak ikan kemungkinan lain adalah disebabkan oleh pengaruhnya pada sistem saraf autonom. Seperti diketahui bahwa sistem saraf autonom disusun dari sistem parasimpatis (kolinergik) dan sistem simpatis (adrenergik). Kedua sistem ini biasanya mendesakkan pengaruhnya yang berlawanan. Antara dua sistem ini tampak suatu keadaan seimbang yang memelihara pengendalian homeostasis atas sel mediator dan sel sasaran. Respons dua sistem ini memaksakan pengaruhnya melalui sistem pesuruh kedua yaitu nukleotida siklik. Rangsangan pada saraf parasimpatis akan menimbulkan pengaruh pada cGMP (Guanin Monofosfat Siklik), sedangkan pada saraf simpatis akan mempengaruhi cAMP.

Minyak ikan yang dapat mempengaruhi kenaikan cAMP kemungkinan juga dapat mempengaruhi saraf simpatis. Rangsangan pada saraf ini menyebabkan kenaikan cAMP yang terjadi melalui perubahan bentuk inaktif adenil siklase menjadi bentuk aktif, yang selanjutnya mengkatalisis ATP menjadi cAMP.

Secara normal kadar cAMP dan cGMP terjadi keseimbangan, namun pengaruh cAMP akan lebih menonjol. Seperti diketahui bahwa



keseimbangan ini dipengaruhi saraf simpatis dan parasimpatis serta oleh berbagai reaktan termasuk mediator inflamatori. Sesuatu yang dalam hal ini minyak ikan mampu merangsang adenil siklase, sehingga menambah kadar cAMP intraseluler dan menghambat pembentukan atau pelepasan mediator proinflamatori antara lain IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF α . Produksi sitokin ini mempengaruhi aktivitas fagositosis secara langsung ataupun dengan melalui produksi prostaglandin.

6.3.3 Efek ω -3 terhadap Metabolisme Eikosanoid

Penurunan aktivitas fagositosis PMN oleh minyak ikan kemungkinan berkaitan dengan metabolisme asam eikosanoid yaitu pada hambatan sintesis prostaglandin dan leukotrin. Minyak ikan bersaing dengan asam arakidonat untuk berikatan dengan enzim lipoksigenase dan siklooksigenase yang mengkatalisis perubahan asam arakidonat menjadi prostaglandin dan leukotrin. Jadi minyak ikan merupakan inhibitor kompetitif bagi prostaglandin dan leukotrin.

Asam arakidonat dibutuhkan untuk pembentukan senyawa eikosanoid (prostaglandin dan leukotrin). Proses ini melibatkan peran enzim siklooksigenase dan lipoksigenase. Adanya minyak ikan yang berperan sebagai pesaing yang dapat menghambat proses sintesis tersebut. Persaingan antara minyak ikan dan asam arakidonat terjadi karena kedua senyawa tersebut memiliki struktur yang serupa yaitu sama-sama merupakan asam lemak tak jenuh dengan atom karbon berjumlah 20. Perbedaannya hanya terletak pada jumlah dan letak ikatan rangkapnya, minyak ikan merupakan pentanoat ω -3, sedangkan asam arakidonat merupakan tetranat ω -6. Karena struktur yang mirip inilah, memungkinkan keduanya bersaing untuk berikatan dengan enzim siklooksigenase atau lipoksigenase. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa minyak ikan lebih mudah berikatan dengan kedua enzim tersebut. Hal ini diduga karena letak ikatan rangkapnya yang berada lebih ke ujung metil (ω -3), sehingga lebih reaktif dibandingkan ikatan rangkap ω -6 pada

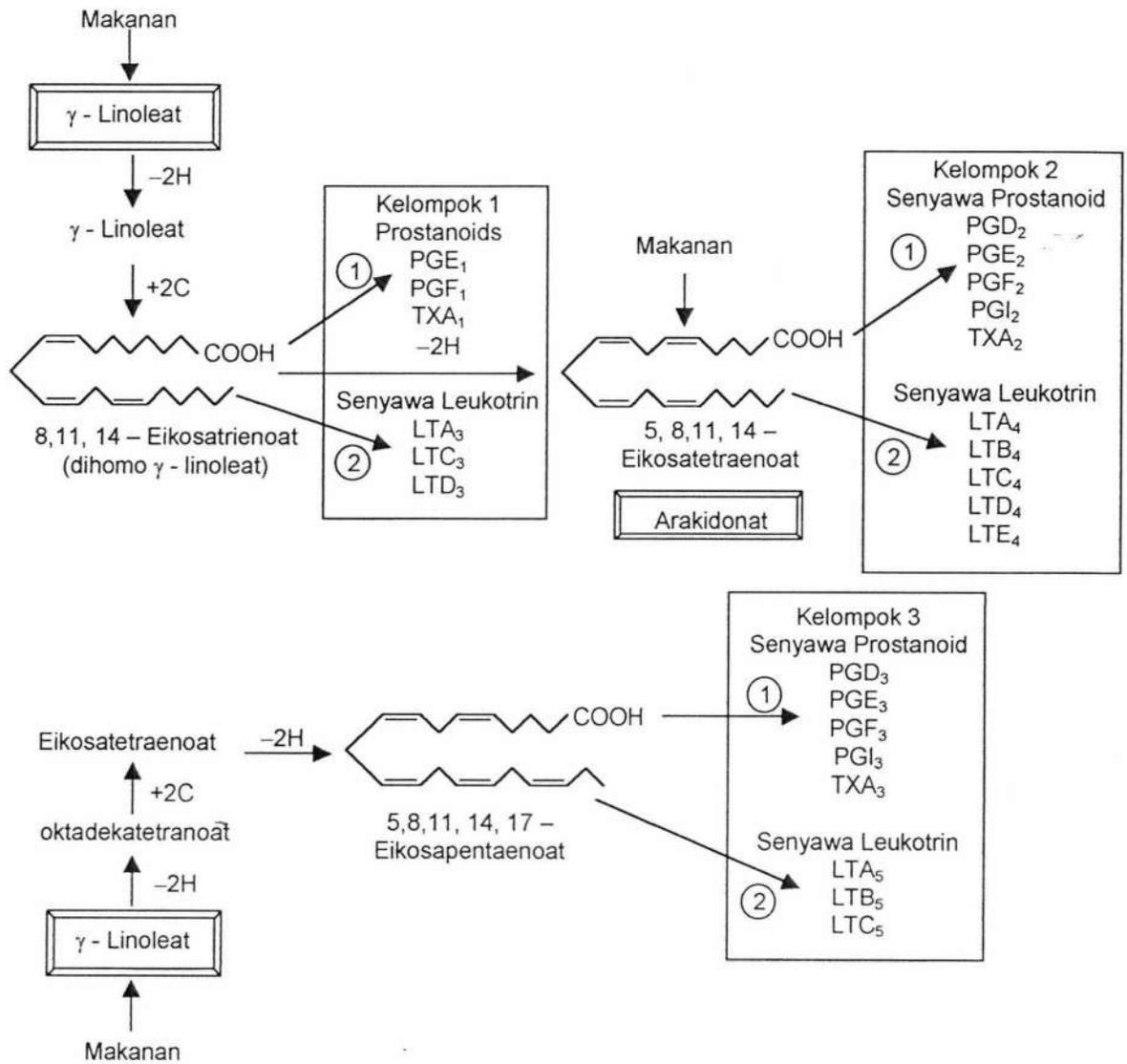
asam arakidonat. Hal ini seperti yang dikemukakan oleh Wiseman, Whelan, 1996, Turek 1998.

Hambatan pada jalur siklooksigenase akan berpengaruh terhadap penurunan PGE_2 yang dihasilkan oleh jalur ini. PGE_2 berpengaruh pada sel adalah sebagai media reseptor dan memicu timbulnya cAMP intra seluler. Tingginya cAMP berperan penting terhadap fungsi PGE_2 yang beragam, salah satunya adalah dalam mempengaruhi produksi sitokin. Pengaruh kenaikan cAMP dapat juga menyebabkan relaksasi otot polos, vasokonstriksi pembuluh darah serta pengeruh pada pelepasan mediator yang menurun. Beberapa data menyatakan bahwa gen regulatori memerlukan cAMP untuk aktivitasnya termasuk IL-2 reseptor, MHC klas I dan II, IL-1 β , IL-6 dan TNF α . Dengan demikian PGE_2 bertindak sebagai aktivator terhadap peningkatan level cAMP. IL-1 yang aktivitasnya juga ditentukan oleh prostaglandin ternyata dapat berperan balik dalam menstimulasi pelepasan prostaglandin, meningkatkan kolagenase, meningkatkan GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage-Coloni Stimulating Factor*) dan G-CSF (*Granulocyte-Coloni-Stimulating Factor*). Dengan adanya hambatan pada jalur siklooksigenase yang berpengaruh terhadap penurunan PGE_2 dan sitokin proinflamatori, akan berpengaruh terhadap penurunan aktivitas fagositosis.

Hambatan pada jalur lipoksigenase oleh minyak ikan yang berpengaruh pada produksi leukotrin dalam hal ini kemungkinan juga menyebabkan terjadinya penurunan aktivitas fagositosis. Leukotrin yang dikenal sebagai mediator aktivitas leukosit, perannya adalah menstimulasi agregasi dan kemotaksis dari PMN. Seperti metabolisme asam arakidonat yang lain, leukotrin, tetapi disintesis dari prekursor asam lemak dari sel yang distimulasi dan diaktifkan oleh enzim lipoksigenase. Leukotrin ini merupakan molekul yang mula-mula ditemukan dalam leukosit dan merupakan senyawa eikosanoat yang mempunyai 3 ikatan rangkap yang berkonjugasi. Leukotrin juga berperan dalam aksi biologik yang penting

pada kondisi patofisiologis, seperti inflamasi anafilaksis dan respons imun (Davies, 1998). Dengan turunnya produksi leukotrin oleh karena hambatan pada jalur lipoksigenase, maka aktivitas fagositosis dapat terhambat dan menjadi menurun.

Hambatan pada jalur siklooksigenase dan jalur lipoksigenase yang terjadi karena minyak ikan yang terutama mengandung EPA dapat bersaing langsung dengan asam arakidonat. Sehingga pada jalur siklooksigenase yang menghasilkan PGD_2 , PGE_2 , PGF_2 , TXA_2 yang digantikan oleh PGD_3 , PGE_3 , PGF_3 , PGL_3 , TXA_3 . Sedangkan jalur lipoksigenase yang mensintesis eikosanoid antara lain LTA_4 , LTB_4 , LTC_4 , LTD_4 , LTE_4 akan digantikan LTA_5 , LTB_5 , LTC_5 , LTD_5 , LTE_5 , yang berperan antagonis (gambar 6.1).



Gambar. 6.1. Kelompok senyawa eikosanoid dan biosintesisnya (sumber Murray, dkk., 1991).

Keterangan :

PG = Prostaglandin

LT = Leukotrin

TX = Tromboksan

1 = Lintasan siklooksigenase

PGL = Prostasiklin

2 = Lintasan lipoksigenase

Nomer di bawah garis = Jumlah total ikatan rangkap dalam molekul dan seri senyawa.

Hasil penelitian yang mendapatkan bahwa minyak ikan menurunkan aktivitas fagositosis PMN ini sesuai dengan beberapa penelitian diantaranya penelitian yang dilakukan oleh Chee, dkk., 1990 dan Block, dkk., 1996 yang menyatakan bahwa minyak ikan yang mengandung 25 - 35% n-3 PUFA mempunyai keuntungan yang potensial, yaitu :

1. EPA menggantikan asam arakidonat dalam jaringan atau kumpulan prekursor eikosanoid. Dengan demikian mengurangi persediaan asam arakidonat untuk mensintesis eikosanoid.
2. EPA akan bersaing langsung dengan sisa asam arakidonat untuk oksigenase dengan enzim yang mensintesis eikosanoid (siklooksigenase dan lipoksigenase).
3. Eikosanoid yang disintesis dari EPA dari minyak ikan dapat mengurangi sifat anti inflamasi.

Dari hal tersebut di atas dikatakan minyak ikan dapat menekan inflamasi dengan cara menurunkan sitokin proinflamatori yang berakibat menurunnya aktivitas fagositosis. Hasil ini sesuai dengan pendapat Numabe, dkk., 1998 yang menyatakan bahwa minyak ikan kemungkinan dapat mempengaruhi fungsi fagositosis.

6.4 Efek penurunan aktivitas fagositosis pada imunitas

Minyak ikan yang berpengaruh terhadap penurunan aktivitas fagositosis PMN dapat berperan sebagai anti inflamasi. Apabila dibandingkan kortikosteroid yang juga mempunyai efek anti inflamasi dengan mekanisme kerja yang sama yaitu menghambat produksi prostaglandin, kemungkinan minyak ikan mempunyai beberapa keunggulan, antara lain tidak menimbulkan efek samping seperti *bullneck*, *moonface*. Dari hal ketersediaannya minyak ikan mudah didapat, harganya murah dan tidak memerlukan resep dokter.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Dari penelitian tentang “Minyak ikan menurunkan Aktivitas Fagositosis PMN pada Tikus yang dipapar dengan *S. mutans*”, dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

1. Diet minyak ikan (ω -3 PUFA) dapat menurunkan aktivitas fagositosis PMN secara kuantitatif.
2. Semakin besar pemberian diet minyak ikan (ω -3 PUFA), maka semakin menurunkan pula jumlah bakteri yang difagosit oleh PMN.

7.2 Saran

Sehubungan pengaruh minyak ikan (ω -3 PUFA) dapat menurunkan aktivitas fagositosis PMN secara kuantitatif, hal ini tampaknya lebih ditujukan sebagai anti inflamasi dan lebih berkaitan dengan reaksi hipersensitifitas. Sedangkan untuk mengetahui aktivitas fagositosis secara lebih jauh masih diperlukan penelitian tentang interleukin yang berkaitan dengan inflamasi maupun hipersensitifitas. Selain itu sifat inflamasi dari minyak ikan yang juga dapat berperan sebagai imunosupresan, maka minyak ikan tidak dianjurkan untuk dikonsumsi dengan dosis yang lebih tinggi dan waktu lama, karena dapat menurunkan kekebalan tubuh.

DAFTAR PUSTAKA

- Anan, H., Akamine, A., Hara, Y., Malda, K., Hoshiguchi, I., Aono, M., 1991. A Histochemical Study Of Bone Remodelling During Experimental Apical Periodontitis in Rats, *J. Endod*, Vol. 17, No. 17:232-337.
- Argawal, S., Baron, C., Piesso, N.P., Quintero, J.L., Langkanip, H.N., John, L.P., Chandra, C.S., 1995. Synthesis Of Proinflammatory Cytokines by Human Gingival Fibroblastin Response to Lipopolysaccharides and Interleukin-1. *J. Periodont Res.* 30 : 382-389
- Bellanti, J.A.M.D., 1993. *Imunologi III*. Penerjemah A. Samik W. Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada, hlm 20 – 25.
- Block, W.L., Katan, M.B., Van der Meer, J.W.M., 1996, Modulation of Inflammation and Cytokine Production by Dietary (n-3) Fatty Acid, *J. Nutr.*, 126:1515-1533.
- Boedina, S.K, 1996. *Imunologi : Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. Edisi 3, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, hlm 5 - 7, 195 – 260.
- Burnett, G.W, and Schuster, G.S., 1980. *Oral Microbiology and Infections Diseases*. Studen ed. Williams & Wilkins, Baltimore/London. 14 : 146-150.
- Calder, P.C., 1998. Immunonoregulatory and anti Inflammatory Effects of n-3 Polyunsaturated Fathy Acid, *Braz-J-med-Biol-Res.*, apr:31 (4):467-490.
- Carranza, F.A, 1995. *Gingival Desease in Glickman's Clinical Periodontology* 6th. ed., Tokyo : W.B Sounders, p : 32 – 40.
- Chee, K.M., Gong, J.X., Godd, R., 1990. Fatty Acid Content of Marine Oil Capsules, *Lipids*, 25:523-528.
- Cohen, J.S., Reader, A., Fertel, R., Beck, M., Meyers, W., J., 1985. A Radioimmunoassay Determination of The Concentrations of Prostaglandin E2 and F2 α in Painfull and asytmatic Human Dental Pulp. *J. Endod*, 11:330-335.
- Dahl, M.V., 1988. *Clinical Immunodermatology*. Year Book Medical, Publisherd, INC, Chicago.
- Davis, W.L., 1986. *Oral Histology : Cell Structure and Function*, Philadelphia: W.B. Sounders Company.
- Devlin Thomas, M., 1996. *Biochemistry with Clinical Correlation*. Year Book Medical, Publisherd, INC, Chicago.

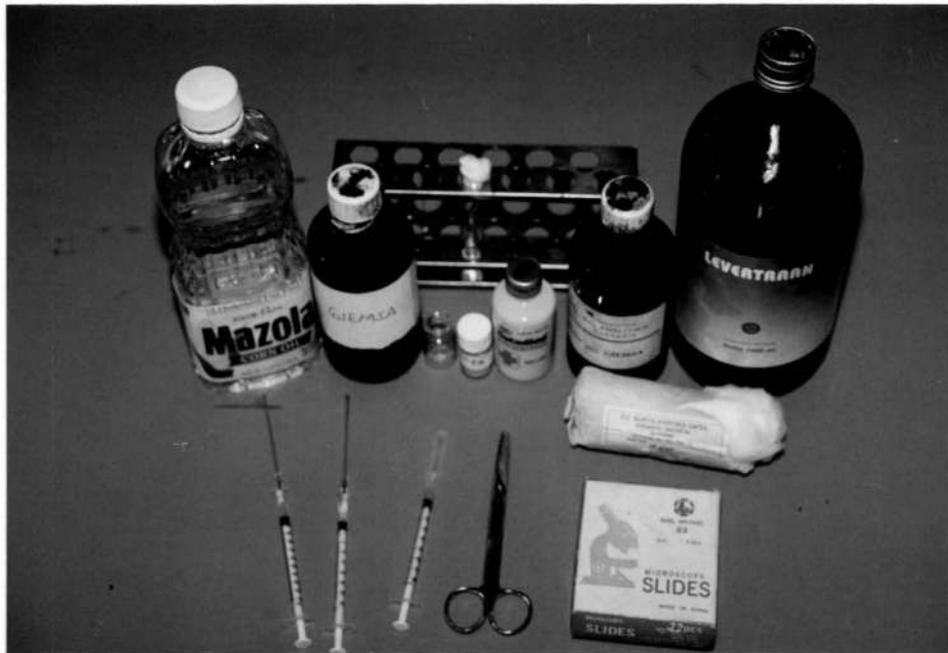
- Dinarello CA, 1993. Role of IL-1 and TNF in Systemic Responses to Infection and Inflammation, In Galli JI, Goldstein, Snyderman R, eds. Inflammation : Basic Principles and Clinical Correlations, 2nd ed, New York : Raven Press, p : 211 – 231.
- Dziak, R., 1993. Biochemical and Molecular Mediator of Bone Metabolism. J. Periodont, 64:407-415.
- Fritsche, K.L., Johnston, P.V., 1990. Effect of Dietary Omega-3 Fatty Acids on Cell-Mediated Cytotoxic activity in Balb 1c Mice. J. Nutr. 10:577-588.
- Garna, K.B., 1996. Immunologi Dasar. Edisi 3, Fakultas Kedokteran Indonesia, Jakarta, hlm 9-12.
- Gemmell, E., Marshall, R.I., Seymour, G.J., 1997. Cytokines and Prostaglandines in Immune Homeostasis and Tissue Destruction in Prostaglandin Disease, dalam The Pathogenesis of Periodontitis. Periodontology 2000, vol. 14.
- Grimbel, R.F. and Tappia, P.S., 1998. Modulation of Pro Inflammatory Cytokines Biology by Unsaturated Fatty Acids. Ernährungswiss, 37 (suppl) 1:57-65.
- Jawetz. E., Melnick, Adelberg, 1986. Mikrobiologi untuk Profesi Kesehatan (diterjemahkan oleh H. Tonang Judul Asli : *Review of Medical Microbiology*). Jakarta : EGC Penerbit Buku Kedokteran.
- Jolly, C.A., Jiang, Y.H., Chapkin, R.S., Mc Murray, D.N., 1997. Dietary (n-3) Polyunsaturated Fatty Acids Suppress Murine Lymphoproliferation, Interleukin-2 Secretion, and The Formation of Diacylglycerol and Ceramide, J. Nutr, 127:37-43.
- Knudsen, p.J., Dinarello, C.A., Strom, T.B., 1986. Prostaglandin Post-Transcriptional Interleukin-1 Synthesis by Increasing Intercellular Cyclic Adenosine Monophosphate. J. Immunol, 137:3189-3194.
- Korver, D.R., Klasing, K.C., 1997. Dietary Fish Oil Alters Specific and Inflammatory Immune Responses in Chicks. J. Nutr, 127:2039-2046.
- Kowasi, Y., Jaccard, F. And Cimasoni, G, 1980. Enzyme Activity in Human gingival crevicular fluid : considerations in data reporting based on analysis of individual crevicular sites. J. Clin Periodontol, 13 : 799 - 804.
- Lehner, 1995. Immunologi Penyakit Mulut. Alih bahasa Ratna F. Jakarta : Penerbit Buku kedokteran EGC.
- Lindquist, B and Emilson, C.G., 1980. Distribution and Prevalence of Mutans Streptococci in The Human Dentition. S. Dent Res., 69 : 1160 - 1166

- Loomer, P.M., Richard, P.E., Howard, C.T., 1998. Effects of *Phorphyromonas gingivalis* 2561 Extracts on Osteogenic and Osteoclastic cell Function in Co-culture. *J. Periodontol*, 69 : 1263 - 1270.
- Louise Mary Turgeon, 1996. *Immunology and Serology in Laboratory Medicine, Echinothrix diadema*. 2, Mosby-Year Book, Inc., St. Louis, Missouri.
- Mano, H., Wanatabe-Mano, M., Nakagawa, M., Hakeda, Y., Kumegawa, M., 1999. Effects of Various Bone Metabolism Related Factors on a Pure of Mature Osteoclasts. *Dentistry in Japan*, Vol. 35:169-173.
- Matsumoto, A., Anan, H., Maeda K., 1998. An Immunohistochemical Study of Behavior of Cells Expressing Interleukin-1 α and Interleukin -1 β within Experimentally Induced Periapical Lesions in Rats. *J. Endod.*, Vol.,24, 12:811-816.
- Matsuo, T., Ebisu, S., Naksnishi, T., Yonemura, K., Harada Y., Okada, H., 1994. Interleukin-1 β (Il-1 β), in Periapikal Exudates of Infected Root Canals: Correlations with the Clinical Findings of Involved Teeth. *J. Endod.*, Vo. 20, no. 9:432-435.
- Matsushita, K., Tajima, T., Abeyama, K., Maruyama, I., Takada, H., Nagaoka, S., 1998. Inflammatory Cytokines Production and Specific Antibody Respones Againts Possible Causative Bacteria in Patients with Multilesional Periapical Periodontitis. *J. Peridont. Rest.*, Vol. 24, No. 12: 817-820.
- Mc. Ghee., J. *Oral Streptococcus Whith Emphosis on S. Mutans in Dental Microbiology*, New York, Harper and Row, 1982, 679 – 690.
- Meydani, S.N., Dinarello, C.A., 1993. Influence of Dietary Fatty Acids on Cytokine Production and its Clinical Implications. *Nutr. Clin. Pract*, 8: 65-72.
- Meydani, S.N., Endres, S., Woods, M.M., Goldin, B.R., Soo, C., Morrill-Labrode, A., Dinarello, C.A., and Gorbach, S.L., 1991. Oral (N-3) Fatty Acid Supplementation Supresses Cytokine Production and Lymphocyte Proliferation : Comparation Between Yuong and Older Women. *J. Nutr.*, 121, 547-555.
- Miller, C.H. and Palenik, C.J., 1994. *Infection Contra and Management of Hazardous For Dental Team*. 1st ed. Mosby – Year Book Inc, St. Louis, 19 - 50
- Miyauchi, M., Takata, T., Ito, H., Ogawa, I., Koabayashi, J., Nikai, H., Izuhin, N., 1996. Immunohistochemical Detection of Prostaglandins E2, F2 α and 6-keto Prostaglandin f1 $\Delta\alpha$ in Experimentally Induced Periapical Inflammatory Lesions in Rats. *J. Endod.*, Vol 22, no. 12: 635-637.

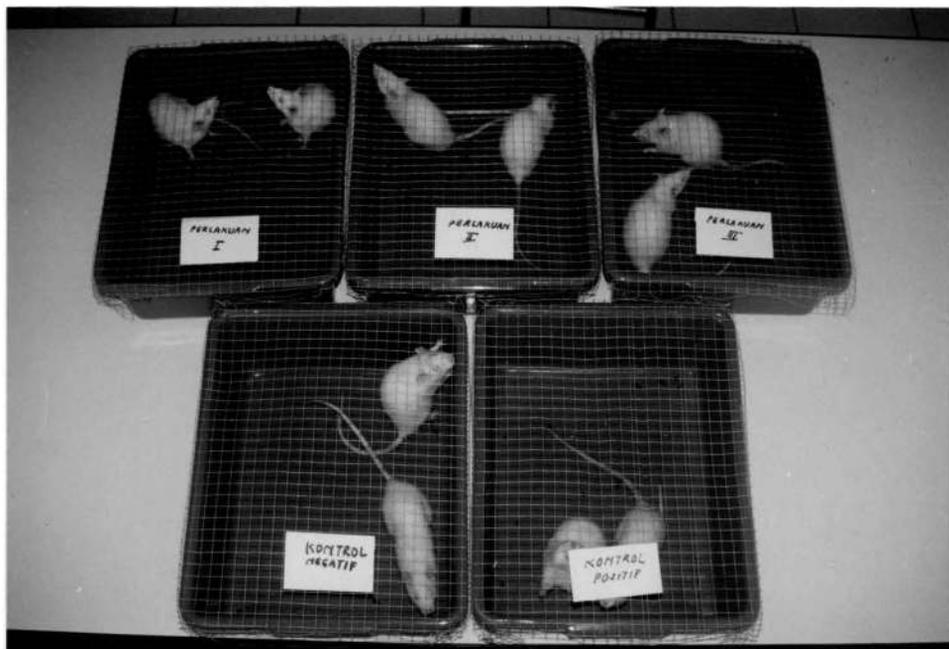
- Miyauchi, M., Ujihin, N., Nikai, H., Takata, T., Ito, H., Ogawa, I., 1992. Effect of Exogenous Applied Prostaglandine E-2 on Alveolar Bone Loss-Histometric Analysis. *J. Periodont*, 63:405-411.
- Murray Robert, K. Daryl, K. G., Peter, A. M., Victor, W. R., 1997. *Biokimia Harper* (diterjemahkan oleh Andry Hartono, judul asli : *Harper's Biochemistry*). Jakarta : EGC Penerbit Buku Kedokteran.
- Nason Alvin, 1965. *Modern Biology*, John Wiley and Sons, Inc. New York. London.
- Ne, R.F., Witherspoon, D.E., Gutman, J.L., 1999. Tooth Resorption, *Quintessence Int*, 30:9-25.
- Numabe Yukihiro, Tomohisa Ogawa, Hisahiro Kamai, Kohichi Kiyonobu, Son Sate, Kyuichi Kamoi, and Shinji Deguchi, 1998. Phagocytic Function of Salivary PMN after Smoking or Secondary Smoking. *J. Periodontal*, 3 : 102 - 107.
- Offenbacher, S., Heasman, P.A., Collins, J.G., 1993. Modulation of Host PGE-2 Secretions as a Determinant of Periodontal Disease Expression. *J. Periodontal*, 64:432-444.
- Parker, C.W., 1986. Leukotrienes and Prostaglandins in The Immune System. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res*, 16 : 113 – 134.
- Peck, M.D., 1994b, Interaction of Lipids with Immune Fuction II : Experimental and Clinical Studies of Lipids and Immunity. *J. Nutr. Biochem.*, 5:514-521.
- Raz, A., Komin-Blesky, N., Przeddecki, F., Obukowicz, M.G., 1997. Fish Oil Inhibits Δ -6 Desaturase Activity In-vivo: Utility in a Dietary Paradigm to Obtain Mice Depleted of Arachidonic Acid. *J. Nutr. biochem*, 8:558-565.
- Rodes, 1996. *Human Fisiologi*. Alih bahasa Ratna F. Jakarta : Penerbit Buku kedokteran EGC.
- Roeslan, B.O., 1992. Metabolisme Karbohidrat oleh S Mutans : Pembentukan Plak dan Terjadinya Karies Gigi. *Jurnal Kedokteran Gigi PDGI*, 41 (2) : 8 – 12.
- Rola-Pleszczynski, M., Lemaire, I., 1985. Leukotrienes Augment Interleukin-1 Production by Human Monocytes *J. Immunol.*, 135 : 3958-3961.
- Shapira, L., Yael Houry - Haddad, Igor, F., Amal, H, David, B-N, 1999. The Effect of Stress on the Inflammatory Response to *P. Gingivalis* in a Mouse Subcutaneous Chamber Model. *J Periodontol*.70 : 189 - 293.
- Soehardjo, I., 1998. Hubungan Peran Makrofag dengan Limfosit, Sel Plasma, Sel Plasma Aktif, Subkelas Immunoglobulin G pada Gingivitis Kronik. *Majalah Kedokteran Gigi*. 31 : 107 – 110.

- Stashenko, P., 1990. The Role of Immune Cytokines in The Pathogenesis of Periapical Lesions. *Endod Dent Traumatol*, 6: 89-96.
- Takayama, S.I., Yasuo, M., Shimauchi, H., Okada, H., 1996. Relationship Between Prostaglandin E2 Concentrations in Periapical Exudate from Root Canals and Clinical Findings of Periapical periodontitis. *J. Endodon.*, Vol. 22, 12:677-680.
- Tani-Ishii, N., Wang, C.Y., Stashenko, P., 1995. Immunolocalisation of Bone- Resorptive Cytokines in Rat Pulp and Periapical Lesions Following Surgical Pulp Exposure. *Oral Microbiol Immunol.*, 10:213-219.
- Tatakis, D.N., 1993. Interleukin-1 and Bone Metabolism : A review, *J. Periodontol.*, 64:416-431.
- Thurre, C., Robert, Mo, Cimasoni, G. And Baehni, P., 1984. Gingival Sulcular Leukocytes in Periodontitis and in Experimental Gingivitis in Humans, *J. Of Periodontal Research*, 19 : 457 - 468.
- Torabinejad dan Walton, 1987. Prinsip dan praktik ilmu Endodonsi, ed. 2., Penerbit Buku Kedokteran, EGC. Jakarta.
- Torabinejad, M., Cotti, E., Lessard, G., 1991. Leukotrienes : Their Possible Role in Pulpal and Periapical Disease. *Endod Dent Traumatol.*, 7 : 233-241.
- Trelia Boel, 2000. Daya Antibakteri Kombinasi Triklosan dan Zink Sitrat dalam Beberapa Konsentrasi Terhadap Pertumbuhan *S. Mutans*, *Dentika Majalah Ilmiah Kedokteran Gigi Universitas Sumatra Utara.*, vol. 5, 1 : 7 – 16.
- Volk, Benjamin, Kadner, Parsons, 1986. *Essentials of Medical Microbiology*, J.B lippincott Co.
- Vreden, S.G.S., Block, W.L., Sauerwein, R.W., Oettinger, M.C., Verhave, J.P., Meuwissen, J.H.E.T., Van der meer, J.W.M., Van den Broek, M.F., 1995. *Am. J. of Trop. Med and Hyg.*, 53:206-210.
- Wander, R.L., Hall, J.A., Gradin, J.L. m shi-Hua, D., Jewel, d.E., 1997. The Ratio of Dietary (n-6) to (n-3) fatty Acids Influence immune System function, Eicosanoid Metabolism, Lipid Peroxidation and Vitamin E Status in Aged Dogs. *J. Nutr*, 127: 1198-1205.
- Whellan, J., 1996. Antagonistic Effects of Dietary Arachidonic Acid and n-3 Polyunsaturated Fatty Acids. *J. Nutr*. 126:1086s-1091s.
- Winarno, F.G., 1997. *Kimia Pangan dan Gizi*, Jakarta : penerbit PT Gramedia Pustaka Utama.
- Yoshimura, A., Hara, Y., Kameko, Y., Kato, I., 1997. Secretion of IL-1 (TNF- α), IL-8 and IL-1 ra by Human Polysaccharides From Periodontopathic Bacteria. *J. Periodont Res*. 32 : 279-286.

Lampiran 1



1.1 Beberapa Alat yang Digunakan dalam Penelitian



1.2 Tikus Wistar Jantan yang Digunakan dalam Penelitian



1.5 Cara Pemotongan Ekor Tikus

Lampiran 2

Oneway

Descriptives

Jum. PMN aktif

	Kontrol	P1	P2	P3	Total
N	7	7	7	7	28
Mean	30.2857	26.0000	25.2857	21.0000	25.6429
Std. Deviation	1.4960	1.1547	1.3801	1.2910	3.5820
Std. Error	.5654	.4364	.5216	.4880	.6769
95% Confidence Interval for Mean					
Lower Bound	28.9021	24.9321	24.0093	19.8060	24.2539
Upper Bound	31.6693	27.0679	26.5621	22.1940	27.0318
Minimum	29.00	24.00	23.00	19.00	19.00
Maximum	33.00	27.00	27.00	22.00	33.00

Test of Homogeneity of Variances

Jum. PMN aktif

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.352	3	24	.788

ANOVA

Jum. PMN aktif

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	303.571	3	101.190	56.667	.000
Within Groups	42.857	24	1.786		
Total	346.429	27			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Jum. PMN aktif

LSD

(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	P1	4.2857*	.7143	.0000034073	2.8115	5.7599
	P2	5.0000*	.7143	.000003081	3.5258	6.4742
	P3	9.2857*	.7143	.000000000	7.8115	10.7599
P1	Kontrol	-4.2857*	.7143	.0000034073	-5.7599	-2.8115
	P2	.7143	.7143	.3272868813	-.7599	2.1885
	P3	5.0000*	.7143	.000003081	3.5258	6.4742
P2	Kontrol	-5.0000*	.7143	.000003081	-6.4742	-3.5258
	P1	-.7143	.7143	.3272868813	-2.1885	.7599
	P3	4.2857*	.7143	.0000034073	2.8115	5.7599
P3	Kontrol	-9.2857*	.7143	.000000000	-10.7599	-7.8115
	P1	-5.0000*	.7143	.000003081	-6.4742	-3.5258
	P2	-4.2857*	.7143	.0000034073	-5.7599	-2.8115

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

Oneway

Descriptives

Jum. bakteri difagosit PMN

	Kontrol	P1	P2	P3	Total
N	7	7	7	7	28
Mean	14.2857	11.7143	10.8571	8.1429	11.2500
Std. Deviation	.7559	1.1127	.8997	.8997	2.3979
Std. Error	.2857	.4206	.3401	.3401	.4532
95% Confidence Interval for Mean					
Lower Bound	13.5866	10.6852	10.0250	7.3107	10.3202
Upper Bound	14.9848	12.7434	11.6893	8.9750	12.1798
Minimum	13.00	10.00	10.00	7.00	7.00
Maximum	15.00	13.00	12.00	9.00	15.00

Test of Homogeneity of Variances

Jum. bakteri difagosit PMN

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.486	3	24	.695

ANOVA

Jum. bakteri difagosit PMN

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	134.679	3	44.893	52.375	.000
Within Groups	20.571	24	.857		
Total	155.250	27			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Jum. bakteri difagosit PMN

LSD

(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	P1	2.5714*	.4949	.0000253093	1.5501	3.5928
	P2	3.4286*	.4949	.0000003647	2.4072	4.4499
	P3	6.1429*	.4949	.0000000000	5.1215	7.1642
P1	Kontrol	-2.5714*	.4949	.0000253093	-3.5928	-1.5501
	P2	.8571	.4949	.0960999071	-.1642	1.8785
	P3	3.5714*	.4949	.0000001859	2.5501	4.5928
P2	Kontrol	-3.4286*	.4949	.0000003647	-4.4499	-2.4072
	P1	-.8571	.4949	.0960999071	-1.8785	.1642
	P3	2.7143*	.4949	.0000122450	1.6929	3.7357
P3	Kontrol	-6.1429*	.4949	.0000000000	-7.1642	-5.1215
	P1	-3.5714*	.4949	.0000001859	-4.5928	-2.5501
	P2	-2.7143*	.4949	.0000122450	-3.7357	-1.6929

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