

**EFEK EKSTRAK DAUN MIANA UNGU
(*Coleus scutellarioides* (L) Benth) TERHADAP BACTERIAL
LOAD DAN EKSPRESI GEN mRNA INTERLEUKIN-10 PADA
TIKUS WISTAR YANG DIINDUKSI *Aggregatibacter
actinomycetemcomitans***

The Effect of Purple Miana Leaf Extract
(*Coleus scutellarioides* (L) Benth) on Bacterial Load and
Interleukin-10 mRNA genes Expression in Wistar Rats Induced
with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

UMMUL KHAIRI AMSYAH



**PROGRAM STUDI S3 KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**

**EFEK EKSTRAK DAUN MIANA UNGU
(*Coleus scutellarioides* (L) Benth) TERHADAP BACTERIAL
LOAD DAN EKSPRESI GEN mRNA INTERLEUKIN-10 PADA
TIKUS WISTAR YANG DIINDUKSI *Aggregatibacter
actinomycetemcomitans***

Disertasi

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Doktor

Program Studi

Ilmu Kedokteran

Disusun dan diajukan oleh

UMMUL KHAIRI AMSYAH

Kepada

PROGRAM PASCASARJANA

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2020

DISERTASI

EFEK EKSTRAK DAUN MIANA UNGU (*Coleus scutellarioides* (L) Benth) TERHADAP *BACTERIAL LOAD* DAN EKSPRESI GEN mRNA INTERLEUKIN -10 PADA TIKUS WISTAR YANG DIINDUKSI *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Disusun dan diajukan oleh

UMMUL KHAIRI AMSYAH
Nomor Pokok C013171025

telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Disertasi
pada tanggal 24 Juni 2020
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui
Komisi Penasehat,



Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK (K)
Promotor



Prof. Dr. drg. Hasanuddin Thahir, MS, Sp. Perio(K)
Ko-Promotor



Prof. Dr. Gemini Alam M.Si, Apt
Ko-Promotor

Ketua Program Studi S3
Ilmu Kedokteran,



dr. Agussalim Bukhari, M.Clin.Med, Ph.D, Sp.GK (K)

Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin



Prof.dr. Budu, Ph.D,Sp.M(K), M.Med.Ed

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Yang bertanda tangan di bawah ini

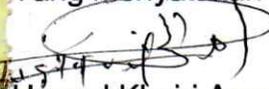
Nama : Ummul Khairi Amsyah
Nomor Mahasiswa : C013171025
Program Studi : Ilmu Kedokteran

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan disertasi ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.



Makassar, 24 Juni 2020

Yang menyatakan


Ummul Khairi Amsyah

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, atas limpahan rahmatNya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini yang berjudul “**Efek Ekstrak Daun Miana Ungu (Coleus scutellarioides (L) Benth) terhadap Bacterial Load dan Ekspresi Gen mRNA Interleukin-10 pada Tikus Wistar yang Diinduksi Aggregatibacter actinomycetemcomitans** “ sebagai salah satu persyaratan mencapai gelar doktor – Program Studi Ilmu Kedokteran Universitas Hasanuddin, Makassar.

Saya menyadari bahwa disertasi ini mempunyai kekurangan sehingga dengan kerendahan hati penulis mengharapkan kritik, saran dan koreksi dari semua pihak. Dalam kesempatan ini, penulis dengan tulus menyampaikan terima kasih kepada **Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph. D, Sp. MK (K)** sebagai Promotor, **Prof. Dr. drg. Hasanuddin Tahir, Sp. Perio (K)** dan **Prof. Dr. Gemini Alam, M. Si, Apt** sebagai Co-Promotor atas bantuan dan bimbingan yang telah diberikan mulai dari pengembangan minat terhadap permasalahan penelitian, pelaksanaan penelitian sampai dengan penulisan disertasi ini. Terima kasih juga penulis sampaikan kepada **Dr.dr.Burhanuddin Bahar, MS** yang senantiasa membimbing, memberikan inspirasi dan memotivasi terus menerus, **Dr. Drs. A. Mushawwir Taiyeb, M.Kes** sebagai penguji eksternal yang dalam penulisan ini sangat banyak memberikan masukan dan arahan, **Prof. drg. H. M. Dharma Utama, Ph. D, Sp. Pros (K), dr.**

Agussalim Bukhari, M. Med, Ph. D,Sp. GK(K), Dr. Rizalinda Sjahril, M.Sc, Ph.D, Sp.MK, Prof. Dr. drg. Asmawati, M. Kes yang memberikan dukungan dalam penelitian ini.

Terima kasih juga kepada Ibundaku tersayang **Hj. Syamsudduha** dan seluruh keluarga atas dukungannya dan buat yang terkasih dan tersayang suamiku **Bripka Rudianto Rosneng, S.Pd** yang dengan setia mendampingi dalam penyelesaian disertasi ini, dan yang terakhir ucapan terima kasih juga disampaikan kepada teman-teman seperjuangan Ilmu Kedokteran dan mereka yang namanya tidak tercantum tetapi telah banyak membantu penulis dalam menyelesaikan disertasi ini.

Makassar, 24 Juni 2020

Ummul Khairi Amsyah

ABSTRAK

UMMUL KHAIRI AMSYAH. Analisis Efek Ekstrak Daun Miana Ungu (*Coleus scutellarioides* (L) Benth) terhadap Bacterial Load dan Ekspresi Gen mRNA interleukin-10 pada Tikus Wistar yang Diinduksi *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (dibimbing oleh Mochammad Hatta, Hasanuddin Tahir, dan Gemini Alam).

Penelitian ini bertujuan mengetahui efek ekstrak daun miana ungu terhadap *bacterial load* dan ekspresi gen mRNA Interleukin-10 pada tikus wistar yang telah diinduksi dengan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental laboratorium dengan desain *pretest posttest with control group*. Sampel terdiri atas lima belas tikus wistar yang dibagi dalam tiga kelompok penelitian. Pengambilan sampel dilakukan secara acak sesuai dengan kriteria penelitian. Analisis data dilakukan secara statistik dengan menggunakan uji *paired sample T*, uji *repeat anova* dan uji lanjut *one way anova*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terjadi penurunan *bacterial load* yang signifikan pada kelompok ekstrak daun miana ungu dengan nilai $p = 0,001$ ($p < 0,05$), dan pada kelompok *levofloxacin* dengan nilai $p = 0,03$ ($p < 0,05$), sedangkan pada kelompok akuades terjadi peningkatan *bacterial load* namun tidak signifikan dengan nilai $p = 0,597$ ($p > 0,05$). Hasil uji lanjut menunjukkan terdapat perbedaan rerata yang signifikan antara ekstrak daun miana ungu dengan akuades, akuades dengan *levofloxacin*, namun tidak ada perbedaan rerata yang signifikan antara ekstrak daun miana ungu dengan *levofloxacin* ($p > 0,05$). Pemeriksaan ekspresi gen mRNA Interleukin-10, terjadi peningkatan yang signifikan pada kelompok ekstrak daun miana ungu dengan nilai $p = 0,001$ ($p < 0,05$) dan pada kelompok *levofloxacin* dengan nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$), sedangkan pada kelompok akuades terjadi penurunan ekspresi gen mRNA Interleukin-10 yang signifikan dengan nilai $p = 0,003$ ($p < 0,05$). Hasil uji lanjut menunjukkan perbedaan didapatkan pada semua pengukuran ($p > 0,05$).

Kata kunci: Miana, IL-10, *Bacterial Load*, *A.actinomycetemcomitans*



ABSTRACT

UMMUL KHAIRI AMSYAH. *An Analysis on the Effect of Purple Miana Leaf Extract (Coleus scutellarioides (L) Benth) on Bacterial Load and Interleukin-10 mRNA genes Expression in Wistar Rats Induced with Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (supervised by **Mohammad Hatta, Hasanuddin Tahir, and Gemini Alam**)

The aim of this research is to discuss the effect of purple miana leaf extract on bacterial load and IL-10 expression in rats induced with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

This research was an experimental laboratory research type with a pre-test post-test design with a control group. The sample consisted of fifteen wistar rats divided into three study groups. The sample was determined randomly according to research criteria. The data were analyzed statistically using paired sample T test, repeat anova test, and one way anova further test.

The results of the research indicate that there is a significant decrease of bacterial load in purple miana leaf extract group with a value of $p=0.001$ ($p<0.05$) and levofloxacin group with a value of $p=0.03$ ($p<0.05$), while in aquadest group there is an increase of bacterial load but it is insignificant with a value of $p=0.597$ ($p>0.05$). The results of further test indicate that there is a significant mean difference between purple miana leaf extract and aquadest ($p=0.042$) and the one between aquadest and levofloxacin ($p=0.023$), but there is an insignificant mean difference between purple miana leaf extract and levofloxacin ($p=0.571$). In the examination of interleukin-10 gen mRNA expression, there is a significant increase in purple miana leaf extract group with a value of $p=0.001$ ($p>0.05$) and in levofloxacin group with a value of $p=0.000$ ($p>0.05$), while in aquadest group there is a significant decrease in interleukin-10 gen mRNA expression with a value of $p=0.003$ ($p<0.05$). The results of further test indicate that the mean difference is indicated by all measurements ($p<0.05$).

Key words : miana, IL-10, bacterial load, *A. actinomycetemcomitans*



DAFTAR ISI

	halaman
PRAKATA	iv
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN	xiii
I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	12
C. Tujuan penelitian	13
D. Manfaat Penelitian	13
II. TINJAUAN PUSTAKA	15
A. Tinjauan Tentang Periodontitis	15
B. Tinjauan Tentang Aggregatibacter Actinomycetemcomitans	25
C. Tinjauan Tentang Tumbuhan Miana	33
D. Tinjauan Tentang Imunitas	44
E. Tinjauan Tentang Interleukin-10	58
F. Kerangka Teori	65
G. Kerangka Konsep	66

H.	Hipotesis	66
I.	Definisi Operasional	67
III.	METODE PENELITIAN	68
A.	Jenis dan Desain Penelitian	68
B.	Lokasi dan Waktu Penelitian	69
C.	Subjek Penelitian	70
D.	Bahan dan Protokol Penelitian	71
E.	Etika Penelitian	88
F.	Analisis Data	88
G.	Alur Penelitian	89
H.	Jadwal Penelitian	90
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN	91
A.	Hasil Penelitian	91
B.	Pembahasan	104
V.	KESIMPULAN DAN SARAN	126
	DAFTAR PUSTAKA	128
	LAMPIRAN	147

DAFTAR GAMBAR

Nomor	halaman
1. Poket periodontal	22
2. Pemeriksaan poket periodontal	23
3. <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	25
4. Foto plate isolasi utama sampel plak subgingiva dari subjek LJP	29
5. Morfologi koloni Strain <i>A.actinomycetemcomitans</i> dari media spesifik dan non spesifik	29
6. Daun miana	36
7. Mekanisme prinsip imunitas alami dan adaptif	45
8. Kerangka teori	65
9. Kerangka konsep	66
10. Desain Penelitian	68
11. Alur Penelitian	89
12. Jadwal Penelitian	90
13. Kandungan kuantitatif ekstrak daun miana ungu	94
14. Dinamika perubahan bacterial load berdasarkan kelompok selama waktu penelitian	97
15. Dinamika perubahan ekspresi gen mRNA Interleukin-10	101

DAFTAR TABEL

Nomor	halaman
1. The Community Periodontal Index of Treatment Needs (CPITN)	23
2. Skrining fitokimia secara kualitatif ekstrak daun miana ungu	91
3. Perbedaan dinamika bacterial load antar kelompok selama waktu pengamatan	96
4. Hasil analisis <i>one way anova bacterial load</i> ketiga kelompok yang berbeda setelah intervensi	98
5. Perbedaan dinamika ekspresi IL-10 antar kelompok selama Waktu pengamatan	100
6. Hasil analisis <i>one way anova</i> ekspresi gen mRNA Interleukin-10 ketiga kelompok yang berbeda setelah Intervensi	102
7. Hasil analisis korelasi Pearson	104

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		halaman
1.	Hasil identifikasi daun miana ungu	147
2.	Rekomendasi persetujuan etik	149
3.	Hasil uji kualitatif ekstrak daun miana ungu	150
4.	Hasil uji kuantitatif kadar flavonoid total	151
5.	Hasil uji kuantitatif kadar polifenol total	152
6.	Data primer hasil penelitian	153
7.	Olah data spss pemeriksaan <i>bacterial load</i>	154
8.	Olah data pemeriksaan ekspresi gen mRNA Interleukin-10	159

DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN

Lambang/singkatan	Arti dan keterangan
AaGM	<i>Aggregatibacter actinomy-</i> <i>cetemcomitans</i> growth medium
ATCC	American Type Culture Collection
Balb/c	Tikus albino, Mencit
CCL2	Chemokine ligand
CCR	Chemokine receptor
CD4	Cluster differential four
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte- associated protein 4
CXC	Chemokine
DNA	Deoxyribonucleic acid
et al.	et alii, dan kawan-kawan
Foxp3	Forkhead box P3, scurfin, protein
g/mol	gram per mol
GCF	Gingival crevicular fluid
hBD	human α -defensin
HCl	Hidrogen klorida

Lambang/singkatan	Arti dan keterangan
IgA	Immunoglobulin A
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
L6	Lysis buffer
MCP	Monocyte Chemotactic Protein
MHC	Major histocompatibility complex
mRNA	messenger ribonucleic acid
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
Na ₂ CO ₃	Natrium karbonat
PAMP	Pathogen-associated Molecular patterns
PBMC	mononucleated perifer
PMN	Polymorphonuclear neutrophilic
R	Randomisasi
RISKESDAS	Riset Kesehatan Dasar
rpm	Revolusi per menit
TGF-	Transforming growth factor beta

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Penyakit periodontal adalah penyakit inflamasi kronis periodonsium ditandai dengan kehilangan ligamen periodontal dan kerusakan tulang alveolar di sekitarnya dan merupakan penyebab utama kehilangan gigi. Sekitar 800 spesies bakteri yang diidentifikasi dalam rongga mulut dan dihipotesiskan bahwa interaksi kompleks antara infeksi bakteri dan respons inang dapat menyebabkan penyakit periodontal (Nazir, 2017).

Penyakit periodontal merupakan salah satu penyakit yang sangat banyak diderita manusia, sehingga kebanyakan masyarakat menganggap keadaan ini sebagai sesuatu yang biasa. Studi epidemiologis menunjukkan bahwa antara 44 % - 57 % orang dewasa menderita periodontitis ringan, sedangkan 10 % dari orang dewasa di negara maju menderita periodontitis lanjut (Fitri dan Hidayati, 2012).

Mikroorganisme plak merupakan faktor utama yang menyebabkan kelainan pada jaringan periodontal. Bakteri yang

paling dominan pada penyakit periodontal adalah bakteri Gram-negatif anaerob seperti *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* dan *Bacteroides forsythus*. Bakteri-bakteri ini berperan penting dalam perkembangan penyakit periodontal seperti pembentukan poket periodontal, kerusakan serat periodontal dan tulang alveolar. Reaksi inflamasi yang disebabkan oleh bakteri-bakteri dalam plak menyebabkan terjadinya penurunan progresif dari ligamen periodontal dan tulang alveolar dan akhirnya terjadi mobilitas serta kehilangan gigi (Tedjasulaksana, 2016).

A.actinomycetemcomitans adalah Gram-negatif kokobasilus kapnofilik, yang umumnya diisolasi dari rongga mulut remaja dan dewasa muda yang menderita penyakit periodontal agresif. *A.actinomycetemcomitans* telah terlibat dalam infeksi ekstra oral termasuk endokarditis, arthritis, kehamilan terkait septikemia, abses otak dan osteomielitis. Namun sumber utama pada rongga mulut sehingga membutuhkan translokasi *A.actinomycetemcomitans* dari rongga mulut ke tempat infeksi ekstra oral (Herbert *et al.*, 2016).

Data epidemiologi periodontitis agresif dilaporkan 20 tahun terakhir dengan prevalensi sangat bervariasi karena mungkin disebabkan oleh perbedaan cara pemeriksaan dan defenisi

penyakit. Prevalensi relatif lebih tinggi terdapat di Amerika Selatan, Negara Afrika dan Asia. Prevalensi yang tinggi terdapat di India yaitu 22% (Rusyanti, 2014), di Indonesia, menurut data RISKESDAS 2018 menunjukkan persentase kasus periodontitis sebesar 74,1% (Wijaksana, 2019).

Tingkat keparahan yang tinggi pada periodontitis agresif, tidak sesuai dengan faktor lokal (bakteri plak) yang ada dan beberapa penelitian berhasil mengidentifikasi adanya kelainan sistem pertahanan inang. walaupun keberadaan bakteri patogen spesifik pada periodontitis agresif dapat dipergunakan sebagai indikator diagnosis periodontitis agresif, akan tetapi penemuan terbaru menyatakan bahwa serangan bakteri saja tidak cukup untuk merusak jaringan periodontal, adanya respon imun inang terhadap serangan bakteri tersebut membantu perusakan jaringan periodontal. Interaksi antara mikroorganisme dan jaringan inang inilah yang menyebabkan perubahan jaringan, destruksi jaringan ikat, dan resorpsi tulang alveolar sehingga secara klinis terlihat sebagai penyakit periodontal (Rusyanti, 2014).

A.actinomycescomitans menginduksi sitokin yang mempolarisasi sel T helper (Th), termasuk sel Th1, Th2 dan Th17. Sel Th1 menghasilkan IL-1b, IL-2, IL-12, IFN- γ dan TNF- yang

menginduksi respon imun seluler, Sel Th2 memproduksi IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 yang menginduksi respon imun humoral sedangkan Th17 terutama menghasilkan IL-17 yang mempromosikan perekrutan netrofil yang cepat dan terlibat dalam respon inflamasi awal melawan patogen dan cedera (Ulm *et al.*, 2010). Dengan demikian, *A.actinomycescomitans* memulai respon Th1 dan Th2 kompleks selama perkembangan penyakit (Herbert *et al.*, 2016).

Penyakit periodontal merupakan masalah kesehatan masyarakat sehingga perlu dilakukan perawatan. Tujuan utama terapi periodontal adalah untuk mengurangi infeksi bakteri dan menyembuhkan/meregenerasi jaringan periodontal yang sakit, sehingga dapat memberikan periodonsium sehat yang mendukung pembentukan kembali mikrobiota periodontal yang kompatibel dengan inang (Haffajee *et al.*, 2006).

Perawatan periodontal konvensional meliputi eliminasi mikroorganisme periodontopatik dengan debridemen mekanik seperti scaling dan root planing (SRP). Meskipun SRP dianggap sebagai *gold standard* dalam pengobatan periodontitis kronis dan telah ditetapkan melalui beberapa studi longitudinal terapi periodontal, keberadaan dan persistensi patogen periodontal yang

ditentukan dapat mengganggu hasil klinis pada penyakit dan pasien tertentu. Eliminasi yang tepat dari mikroorganisme ini selama perawatan akan meningkatkan respon klinis dan meminimalkan risiko kehilangan perlekatan. Dengan demikian, antibiotik penting dalam pengobatan periodontitis dengan alasan bahwa penyakit periodontal adalah infeksi yang disebabkan oleh kelompok mikroorganisme spesifik yang terkait dengan karakteristik genetik inang tertentu (Pradeep *et al.*, 2015).

Keuntungan terapi antibiotik secara sistemik yaitu memberantas dan mencegah infeksi oleh bakteri patogen periodontal yang menyerang jaringan periodontal subepitel atau yang berkoloni di daerah rongga mulut. Sedangkan pada terapi antibiotik lokal, patogen periodontal tidak secara total tereliminasi dan dapat terjadi rekolonisasi bakteri pada bagian yang dirawat (Saijonmaa-Koulumies, 2002).

Antibiotik yang paling banyak diteliti dalam pengobatan penyakit periodontal sebagai tambahan SRP termasuk tetrasiklin dan metronidazol, yang sering digabungkan dengan amoksisilin (Walker and Karpinia, 2002) dan makrolida (azitromisin, klaritromisin) (Sampaio *et al.*, 2011, Pradeep and Kathariya, 2011). Kelemahan utama yang terkait dengan rejimen obat ini adalah

penurunan kepatuhan, karena kebutuhan untuk minum banyak pil sehari (Pradeep *et al.*, 2015) dan peningkatan resistensi bakteri (Al-Haroni *et al.*, 2006). Karena kelemahan antibiotik yang sudah ada ini, ada kebutuhan untuk menyelidiki antibiotik lain. L-isomer sintetik dari kuinolon ofloxacin, levofloxacin (LFX), bisa menjadi salah satu alternatif karena efektif terhadap berbagai bakteri Gram-positif, Gram-negatif, dan atipikal serta aktif terhadap beberapa spesies yang resisten terhadap penisilin dan makrolida (Anderson and Perry, 2008). Beberapa penelitian telah menunjukkan hasil yang baik dengan penggunaan tambahan fluorokuinolon pada periodontitis (Pradeep *et al.*, 2015).

LFX telah menunjukkan keunggulan dibandingkan ciprofloxacin dalam hal efikasi klinis dan kekambuhan penyakit, LFX ditemukan berhasil pada semua pasien yang menderita infeksi invasif *A.actinomycescomitans* dan tidak ada dari pasien menunjukkan kekambuhan (Wang *et al.*, 2010). Levofloxacin, sebuah fluorokuinolon generasi terbaru merupakan isomer dari ofloxacin. Kuinolon memiliki penetrasi yang baik ke dalam jaringan dan aktivitas antibakteri dalam sel setelah pemberian oral. Kuinolon generasi yang lama hanya bekerja pada bakteri Gram-negatif aerob, sedangkan LFX aktif terhadap berbagai bakteri Gram-positif

dan Gram-negatif. LFX didistribusikan secara luas dalam jaringan dan cairan ke seluruh tubuh, dan terakumulasi dalam sel fagositik (Van Bambeke *et al.*, 2005). Dalam sebuah penelitian pada 25 pasien periodontitis dewasa, ofloxacin sistemik sebagai tambahan untuk operasi flap ditemukan dapat menekan *A. Actinomycetemcomitans* (Kleinfelder, Mueller, Lange, 2000).

Sebagian besar penelitian telah menunjukkan hasil klinis yang meningkat dengan penggunaan antibiotik tambahan, tetapi beberapa penelitian telah menunjukkan hasil yang bertentangan (Pradeep *et al.*, 2015). Pada tahun 2011, di Amerika Serikat, antibiotik fluorokuinolon digunakan oleh sekitar 23,1 juta pasien rawat jalan (70% diantaranya adalah ciprofloxacin, 28% levofloxacin) dan 3,8 juta pasien rawat inap (diantaranya 63% levofloxacin, 28% ciprofloxacin). Meskipun demikian, pada tahun 2011, di Amerika Serikat kedua antibiotik tersebut mendapat lebih dari 2000 tuntutan hukum karena efek samping yang ditimbulkan. Fluorokuinolon bersifat toksik mempunyai efek samping yang lebih berat dari antibiotik lain, menimbulkan kerusakan permanen bahkan kematian jika tidak digunakan secara tepat. Efek samping yang ditimbulkan adalah gangguan pencernaan, gangguan SSP, gangguan ginjal, gangguan penglihatan, gangguan kulit, gangguan

hati, atrofi dan tendinitis, gangguan kardiovaskular, gangguan hematologi, reaksi imunologi, gangguan metabolik, dan teratogenik (Raini, 2016).

Adanya efek samping penggunaan obat antibiotik, maka perlu dilakukan pencarian solusi lain misalnya dengan menggunakan tanaman obat yang telah diketahui memiliki efek samping yang rendah (Bansod and Rai, 2008).

Tanaman obat menunjang peningkatan respon kekebalan tubuh terhadap penyakit. Zat aktif yang terkandung dalam tanaman seperti flavonoid bekerja sebagai immunomodulator merupakan komponen penting dalam menunjang imunitas tubuh karena dapat meningkatkan aktivitas proliferasi limfosit (Pakadang *et al.*, 2015). Obat herbal populer di masyarakat berdasarkan informasi produk-produk herbal dalam bentuk sediaan farmasi. WHO memperkirakan bahwa 80 % penduduk dunia masih mempercayakan kesehatan pada pengobatan tradisional terutama yang bersumber dari tanaman obat (Depkes, 2007).

Salah satu tanaman obat yang paling sering digunakan masyarakat untuk pengobatan ialah miana. Tanaman miana merupakan sebuah tanaman yang unik karena memiliki varietas yang sangat banyak. Perbedaan varietas terlihat dari perbedaan

warna daun yang sangat beragam. Warna daun yang beraneka ragam mulai dari keemasan, kehitaman pink, merah, ungu hingga kombinasi dari beragam warna. Warna-warni daun disebabkan karena pigmen yang dimilikinya. Formasi pigmen didalam daun ditentukan secara genetik dan juga dipengaruhi faktor lingkungan (Harborne, 2006). Perbedaan warna daun antar varietas miana ditentukan oleh kandungan pigmen yang termasuk ke dalam golongan flavonoid. Flavonoid merupakan kelompok fenol yang terbesar yang ditemukan di alam (Achmad, 2006).

Tumbuhan miana (*Coleus scutellarioides* [L] Benth) banyak digunakan secara tradisional untuk mengobati beberapa penyakit seperti mata, wasir, bisul, demam nifas, radang telinga, abses, borok, luka bernanah, keputihan, kencing manis, sembelit, dispepsia, cacingan, gigitan ular, dan serangga beracun. Penggunaan daun miana sebagai tanaman obat tidak hanya berdasar pada pengalaman empiris saja, tetapi telah didukung oleh beberapa penelitian tanaman. Beberapa kajian farmakologi telah dilakukan yang menunjukkan bahwa daun miana berkhasiat sebagai antibakteri (Pakadang *et al.*, 2015, Kumala, Shirly, dan Desi, 2009, Mpila, Fatimawati, Wiyono, 2012), imunostimulan (Palette *et al.*, 2017, Syamsuri *et al.*, 2018), antifungi (Karo *et al.*,

2018).

Penelitian oleh Kumala *et al.* (2009) memperlihatkan hasil konsentrasi ekstrak daun miana 1 % dapat menghambat *S.aureus* dan *E.coli* serta pada konsentrasi 10 % dan 20% daun miana dapat menghambat pertumbuhan beberapa bakteri Gram-positif dan Gram-negatif (Kumala, Shirly, dan Desi, 2009). Mpila 2012 menunjukkan peningkatan konsentrasi daun miana menghasilkan diameter zona hambat pertumbuhan bakteri semakin besar terhadap kadar hambat minimal (KHM) *S.ureus* 20%, *E.coli* 10%, dan *P.aeruginosa* 40% (Mpila, Fatimawati, Wiyono, 2012).

Penelitian lain oleh Pakadang *et al.* (2015) menunjukkan bahwa ekstrak daun miana dengan dosis 510 mg/kgbb sangat efektif untuk menurunkan jumlah koloni *Mycobacterium tuberculosis* dan meningkatkan proliferasi jumlah sel T dan meningkatkan kadar TNF- serta meningkatkan kadar IFN- pada tikus putih (Pakadang *et al.*, 2015). Selanjutnya Palette *et al.* (2017) menunjukkan ekstrak daun miana ungu dengan dosis 510 mg/kgbb mampu menurunkan ekspresi gen mRNA Interleukin-10 secara signifikan pada mencit Balb/c yang diinduksi dengan *Mycobacterium tuberculosis* secara intraperitonium. Efek ekstrak daun miana ungu lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok rifampisin namun tidak berbeda

signifikan (Palette *et al.*, 2017). Syamsuri *et al.* (2018) menunjukkan ekstrak daun miana dengan dosis 510 mg/kgbb mampu menurunkan ekspresi mRNA TLR4 secara signifikan pada mencit Balb/c yang diinduksi dengan *Salmonella thypi* (Syamsuri *et al.*, 2018). Karo *et al.* (2017) menunjukkan ekstrak daun miana dosis 500 mg/kgbb dan 750 mg/kgbb berhasil menekan pertumbuhan fungi load, menekan peningkatan kadar IgM dan dapat meningkatkan ekspresi mRNA gen IL-37 selama pemakaian 2, 3, 5 dan 14 hari dan tidak kalah efeknya dengan ketokonazole (Karo *et al.*, 2017).

Interleukin-10 memainkan peran protektif dalam perkembangan penyakit, levelnya dapat menjadi faktor pengatur dalam membatasi perkembangan gingivitis ke periodontitis bahkan kehadirannya terhadap faktor lokal. Oleh karena itu, level Interleukin-10 harus lebih tinggi pada pasien dengan gingivitis dan lebih rendah pada pasien dengan periodontitis. Peran sitokin antiinflamasi seperti Interleukin-10 dalam membatasi perkembangan dan mempertahankan keseimbangan dalam kondisi peradangan seperti gingivitis dan periodontitis membutuhkan penyelidikan lebih lanjut (Fenol, Sasidharan, dan Krishnan, 2014).

Kajian farmakologi khasiat daun miana ungu terhadap bakteri *A.actinomyetemcomitans* serta efeknya terhadap ekspresi gen mRNA Interleukin-10 terkait dengan penyakit periodontal belum dilaporkan. Data dan informasi diatas memotivasi peneliti untuk mengeksplor tanaman herbal daun miana ungu dalam sediaan ekstrak dengan kandungan zat aktif yang memiliki potensi sebagai antibakteri dan antiinflamasi, sehingga peneliti ingin mengkaji lebih dalam efek pemberian ekstrak daun miana ungu terhadap *bacterial load* (jumlah koloni bakteri *A.actinomyetrmcomitans*) dan ekspresi gen mRNA Interleukin-10 pada tikus wistar yang diinduksi dengan *A.actinomyetemcomitans*.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang seperti tersebut di atas, maka diajukan beberapa rumusan masalah sebagai berikut :

- a. Apakah ekstrak daun miana ungu berpengaruh pada *bacterial Load* pada tikus wistar yang telah diinduksi dengan *A.actinomyetemcomitans*?
- b. Apakah ekstrak daun miana ungu berpengaruh pada ekspresi gen mRNA Interleukin-10 pada tikus wistar yang telah diinduksi dengan *A.actinomyetemcomitans*?
- c. Apakah ada hubungan antara *bacterial load* dengan ekspresi

gen mRNA Interleukin-10 pada tikus wistar yang telah diinduksi dengan *A.actinomycescomitans*?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan umum :

Untuk mengetahui efek ekstrak daun miana ungu terhadap *bacterial load* dan ekspresi gen mRNA Interleukin-10 pada tikus wistar yang telah diinduksi dengan *A.actinomycescomitans*.

1.3.2. Tujuan khusus

- a. Mengetahui efek ekstrak daun miana ungu terhadap *bacterial load* pada tikus wistar yang telah diinduksi dengan *A.actinomycescomitans*.
- b. Mengetahui efek ekstrak daun miana ungu terhadap ekspresi gen mRNA Interleukin-10 pada tikus wistar yang telah diinduksi dengan *A.actinomycescomitans*.
- c. Mengetahui hubungan antara *bacterial load* dengan ekspresi gen mRNA Interleukin-10 pada tikus wistar yang telah diinduksi dengan *A.actinomycescomitans*.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Aspek pengembangan Ilmu

- a. Memberikan informasi ilmiah mengenai ekstrak daun miana ungu sebagai antibakteri dan antiinflamasi melalui ekspresi

gen mRNA Interleukin-10.

- b. Sebagai data yang bisa dijadikan dasar untuk penelitian lanjutan ekstrak daun miana ungu sebagai obat herbal terstandar.

1.4.2. Manfaat Aplikasi

Mendukung pengalaman/penggunaan empiris daun miana ungu dalam pengobatan dan mendukung program pemerintah dalam pengobatan periodontitis dengan melibatkan masyarakat.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan tentang Periodontitis

2.1.1. Pengertian Periodontitis

Periodontitis merupakan suatu penyakit inflamasi destruktif pada jaringan penyangga gigi yang disebabkan oleh mikroorganisme spesifik, yang menghasilkan kerusakan lanjut ligamen periodontal dan tulang alveolar dengan terbentuknya poket, resesi gingiva, maupun keduanya. Periodontitis biasanya berkembang dari gingivitis yang sudah terjadi, walaupun tidak semua gingivitis berkembang menjadi periodontitis. Perubahan komposisi dan potensi patogenik dari mikroorganisme plak terhadap faktor resistensi pejamu dan jaringan sekitarnya menentukan perubahan dari gingivitis menjadi periodontitis dan keparahan kerusakan jaringan periodontal (Kodir, Herawati dan Murdiastuti, 2014).

Periodontitis merupakan penyakit inflamasi kronis, dimulai dengan infeksi mikroba, diikuti oleh penghancuran jaringan lunak yang dimediasi host yang disebabkan oleh leukosit hiperaktif atau

primer dan pembentukan sitokin dan matriks metalloproteinase yang menyebabkan jaringan ikat dan penghancuran tulang yang bermakna secara klinis (Friedewald *et al.*, 2009).

2.1.2. Etiologi

Periodontitis merupakan penyakit inflamasi kronis yang disebabkan oleh bakteri, menghancurkan jaringan ikat dan tulang yang mendukung gigi. Periodontitis sering terjadi dengan bentuk ringan hingga sedang yang mempengaruhi 30% hingga 50% orang dewasa dan bentuk umum yang parah mempengaruhi 5% hingga 15% dari semua orang dewasa di Amerika Serikat. Periodontitis memiliki prevalensi yang lebih tinggi di negara berkembang dan variasi global yang cukup besar, meskipun prevalensi penyakit umum yang parah tampaknya serupa di sebagian besar populasi (Friedewald *et al.*, 2009).

Penumpukan bakteri plak pada permukaan gigi merupakan penyebab utama penyakit periodontal terutama golongan bakteri Gram-negatif anaerob. Bakteri tersebut akan mengeluarkan toksin lipopolisakarida (LPS) yang selanjutnya toksin ini dapat menginduksi kejadian - kejadian seluler di jaringan periodontal khususnya pada tulang alveolar (Pradnyani, 2017).

2.1.3. Patomekanisme Terjadinya Periodontitis

Penyakit periodontal merupakan penyakit inflamasi yang disebabkan oleh bakteri, inflamasi periodontal dapat berkembang menjadi penyakit yang destruktif yang menyebabkan kerusakan jaringan periodontal (Newman, 2014).

Untuk dapat menimbulkan kerusakan, bakteri harus

- (1) berkolonisasi pada sulkus gingiva dengan menyerang pertahanan hospes,
- (2) merusak barrier krevikular epitel
- (3) memproduksi substansi yang dapat menimbulkan kerusakan jaringan baik secara langsung maupun tidak langsung (Eley and Manson, 2004).

Beberapa patogen periodontal diperkirakan mempunyai mekanisme poten untuk menyerang atau merusak pertahanan hospes termasuk kerusakan langsung dari PMN dan makrofag. Mekanisme poten tersebut berupa leukotoksin yang diproduksi oleh beberapa strain *A.actinomycetemcomitans* yang dapat merusak PMN dan makrofag; mengurangi kemotaksis PMN. Sejumlah spesies bakteri dari genus *Bacteroides*, *Capnocytophaga* serta *A.actinomycetemcomitans* dapat mengurangi kemotaksis PMN dan mengurangi fagositosis serta penghancuran intrasel; degradasi

imunoglobulin. Spesies *Bacteroides* dan *Capnocytophaga* yang mempunyai pigmentasi hitam dapat memproduksi protease yang dapat mendegradasi IgA, IgG dan fibrin. Beberapa spesies *Bacteroides* berpigmen hitam mempunyai aktivitas fibrinolitik yang dapat mengurangi terjebaknya bakteri oleh fibrin untuk fagositosis permukaan; selain menyerang mekanisme pertahanan tubuh non-spesifik, sejumlah bakteri patogen Gram-negatif dan *Spirochaeta* yang terdapat pada subgingiva juga menyerang mekanisme pertahanan tubuh yang spesifik, seperti bakteri menyerang dengan jalan merubah fungsi limfosit dan memproduksi imunosupresi. Merusak daerah krevikular adalah cara bakteri selanjutnya untuk menginfeksi hospes. Hal ini dapat dilakukan oleh beberapa bakteri pada flora subgingiva baik secara langsung maupun tidak langsung. Faktor-faktor langsung yang toksik bagi epitelium disekresi oleh *B.gingivalis*, *B.intermedius*, spesies *Capnocytophaga* dan *A.actinomycetencomitans*. Keadaan yang ditimbulkan akibat toksik ini akan meningkatkan permeabilitas krevikular epitelium terhadap produk bakteri dan kemungkinan juga terhadap bakteri itu sendiri. Kerusakan jaringan oleh bakteri dapat dilakukan dengan cara menghasilkan enzim yang dapat merusak jaringan periodontal. Enzim proteolitik yang dihasilkan oleh bakteri yang berhubungan

dengan penyakit periodontal antara lain adalah kolagenase yang dihasilkan oleh spesies *Bacteroides* dan *A.actinomycetencomitans*. Enzim elastase dihasilkan oleh *Spirochaeta*, tripsin oleh *B.gingivalis*, aminopeptida oleh *Bacteroides* dan spesies *Capnocytophaga* (Eley and Manson, 2004).

Ada berbagai metabolit bakteri dan produk toksik yang dapat merusak jaringan dan merangsang terjadinya inflamasi. Mereka termasuk ammonia, amin toksin, indol, asam organik, hidrogen sulfida, metimerkaptan, dan dimetil disulfida. Salah satunya adalah endotoksin lipopolisakarida (LPS) pada dinding sel bakteri Gram-negatif dan dikeluarkan ketika bakteri mati. Ekstrak dari bakteri Gram-negatif yang diisolasi dari poket periodontal dapat menyebabkan aktivasi sel B-poliklonal, yang ikut berperan pada patologi periodontal dengan cara merangsang limfosit untuk membentuk antibodi. Pada semua tahap periodontitis, bakteri dapat ditemukan pada permukaan akar dan terdapat bebas di dalam poket. Dari daerah ini, bakteri akan masuk ke jaringan melalui epitel poket yang mengalami ulserasi. Banyak bakteri Gram-negatif yang mempunyai kemampuan untuk melekat pada bakteri Gram-positif dan sel epitel. Kemampuan ini merupakan faktor penting pada

pembentukan kolonisasi subgingiva dan juga memungkinkan bakteri berkoloni pada permukaan sel epitel poket (Eley and Manson, 2004).

Proses utama yang menyebabkan hilangnya perlekatan dan pembentukan poket:

1. Plak subgingiva yang meluas ke arah apikal yang menyebabkan epitel junction terpisah dari permukaan gigi.
2. Respon inflamasi epitel poket berakibat pada destruksi dari jaringan ikat gingiva, membran periodontal dan tulang alveolar.
3. Proliferasi di apikal dari epitel junction menyebabkan migrasi dari perlekatan epitel.
4. Tingkat kerusakan jaringan tidak bersifat konstan, tetapi episodik, sejumlah tipe penyakit dapat terjadi, mulai dari kerusakan slowly progressive hingga aktivitas episodik yang berkembang cepat (Winn *et al.*, 2006).

2.1.4. Manifestasi Klinis dan Diagnosis Penyakit Periodontal

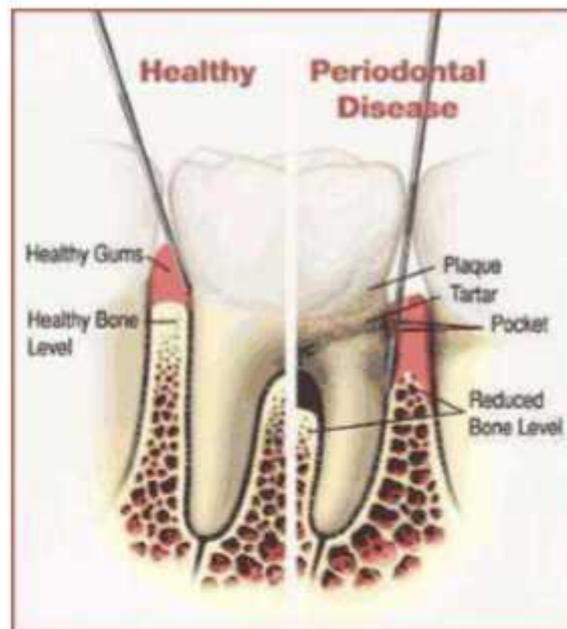
Pemeriksaan periodontal dapat dilakukan dengan melakukan penilaian pada bagian vestibular, lingual, mesial, dan distal gigi. Pemeriksaan kedalaman poket periodontal, clinical attachment loss, perdarahan pada probing, dan resesi gingiva dapat pula dilakukan. Indeks gingiva dapat ditetapkan sebagai 0 : normal; 1: inflamasi ringan yang ditandai dengan adanya sedikit perubahan warna dan

edema tetapi tidak didapatkan adanya perdarahan saat probing; 2 : inflamasi sedang ditandai dengan kemerahan, edema dengan perdarahan saat probing; 3 : inflamasi berat ditandai dengan kemerahan dan edema, serta ulserasi dan perdarahan spontan (Kumar *et al.*, 2013).

Mengukur kedalaman probe adalah indikator yang baik untuk mendiagnosis penyakit periodontal. Tidak akan ditemukan destruksi dari epitel penyokong atau pembentukan poket pada periodontal yang sehat serta kedalaman probe kurang dari 4 mm. Poket periodontal dapat mencapai 4-12 mm. Secara klinis, pasien dengan poket periodontal 4 mm atau lebih didiagnosis dengan periodontitis. Pasien dengan poket periodontal 6 mm atau lebih didiagnosis dengan periodontitis berat. Banyak individu tidak melakukan perawatan terhadap penyakit periodontitis karena gejala yang minimal dari perdarahan gingiva. Hal ini dapat menyebabkan gingivitis yang tidak ditatalaksana berkembang menjadi periodontitis ireversibel, yang menyebabkan kehilangan gigi (Kim and Amar, 2006).

Periodontal sehat mempunyai skor indeks gingival 0, kedalaman probe < 4mm, dan tidak didapatkan clinical attachment loss, sedangkan gingivitis memiliki skor indeks gingiva 1,

kedalaman probe < 4mm, dan tidak terdapat clinical attachment loss, periodontitis memiliki clinical attachment loss dan kedalaman probe > 4mm (Kumar *et al.*, 2013).

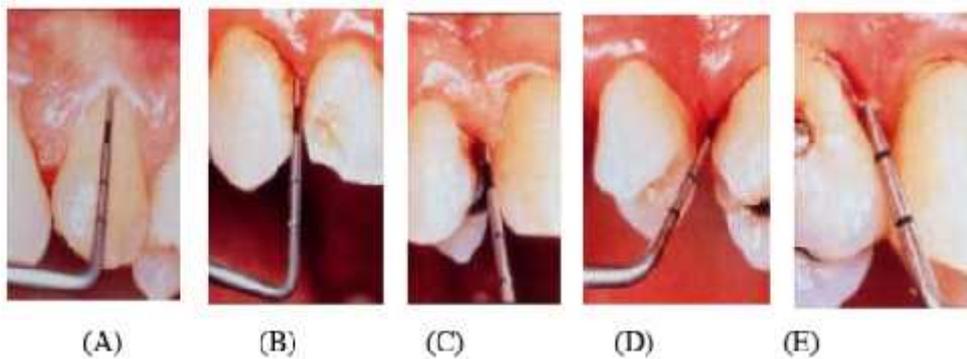


Gambar 1. Poket Periodontal (Santoso, 2013).

Salah satu instrumen yang sering digunakan dalam mendiagnosis penyakit periodontal adalah menggunakan The Community Periodontal Index of Treatment Needs (CPITN). CPITN merupakan suatu sistem screening yang cepat dan mudah dilakukan. CPITN diperkenalkan pertama kali pada tahun 1982, dan direvisi pada tahun 1987 dan 1997 oleh WHO seperti yang terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1. The Community Periodontal Index of Treatment Needs (CPITN, WHO, 1997)

Skor	Status Periodontal	Kode	Kebutuhan Perawatan
0	Periodontal sehat	0	Tidak membutuhkan perawatan
1	Secara langsung atau dengan kaca mulut terlihat perdarahan setelah probing	I	Memerlukan perbaikan <i>oral hygiene</i>
2	Sewaktu probing terasa adanya kalkulus tetapi seluruh daerah hitam (pada probe) masih terlihat	II	Perbaikan <i>oral hygiene</i> dan <i>scaling</i> profesional
3	Saku dengan kedalaman 4 – 5 mm (tepi gingiva berada pada bagian probe berwarna hitam)	III	Perbaikan <i>oral hygiene</i> dan <i>scaling</i> profesional
4	Saku dengan kedalaman 6 mm (bagian probe berwarna hitam tidak terlihat lagi)	IV	Perbaikan <i>oral hygiene</i> , <i>scaling</i> profesional dan perawatan komperhensif

Gambar 2. Pemeriksaan Poket Periodontal. (A) Skor 0 (B) Skor 1 (C) Skor 2 (D) Skor 3 (E) Skor 4 (Carranza *et al.*, 2002)

2.1.5. Perawatan Penyakit Periodontal

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

perawatan penyakit periodontal non bedah. Perawatan periodontal non bedah meliputi pemeliharaan kebersihan mulut, *scalling*, *root planning* dan pemberian antibiotik untuk mencegah dan mengurangi penyakit periodontal (Plemons and Eden, 2004).

Initial phase therapy yang merupakan terapi awal perawatan penyakit periodontal merupakan tindakan yang paling penting untuk semua pasien dengan kelainan periodontal (Perry, Schmid, Takei, 2006). Tujuan utama *scalling root planning* adalah mengembalikan kondisi gingiva menjadi sehat kembali dengan mengeluarkan faktor-faktor yang menyebabkan inflamasi gingiva seperti plak, kalkulus, endotoksin (Pattison and Pattison, 2006).

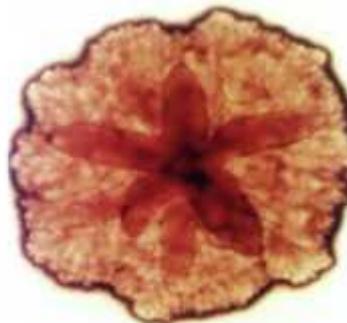
Pemberian antibiotik secara sistemik mempunyai potensi yang besar untuk mengontrol bakteri ini karena bisa menjangkau daerah subgingiva melalui cairan sulkus gingiva (Slots, 2004). Pemakaian antibiotik diperlukan bagi pasien yang tidak berhasil dengan perawatan *scalling root planning* serta pada pasien dengan penyakit periodontal akibat penyakit sistemik sebagai profilaksis pada tindakan periodontal non bedah (Slots and Jorgensen, 2000). Keuntungan terapi antibiotik secara sistemik yaitu dapat memberantas dan mencegah infeksi bakteri patogen periodontal

yang menyerang jaringan periodontal atau yang berkoloni di dalam rongga mulut (Bidault, Fatiha, Grenier, 2007).

2.2 Tinjauan tentang *A.actinomycetemcomitans*

2.2.1. Morfologi *A.actinomycetemcomitans*

A.actinomycetemcomitans berbentuk bulat, oval atau batang. berukuran sekitar 0,4x1,0 μm , didominasi dengan beberapa bentuk kokkus, merupakan bakteri tidak berspora, tidak bergerak dan tidak bercabang. Nama ini mengacu pada struktur dalam berbentuk bintang yang kadang-kadang terlihat dalam koloni pada media selektif dan pada bentuk batang pendek atau bacillary sel (Gambar 3). Bakteri ini merupakan ekologi utama di mukosa mulut, plak gigi dan poket periodontal (Sriraman, Mohanraj and Neelakantan, 2014).



Gambar 3. *A.actinomycetemcomitans*

Mikroorganisme ini dikaitkan dengan infeksi pada manusia termasuk infeksi endokarditis, abses otak dan penyakit periodontal. *A.actinomycescomitans* adalah Gram-negatif kokobasilus fakultatif tak bergerak, yang memiliki fimbria. Tumbuh pada agar darah dan coklat, membentuk koloni setelah inkubasi 48 hingga 72 jam. Bakteri anaerobik tidak bergerak ini tidak hanya tumbuh pada suhu 37° C, tetapi juga pada suhu 20° C sampai 42° C akan menghasilkan koloni pada plate khusus dan sulit melepasnya dari permukaan agar plate. Kultur terbentuk setelah 5-7 hari pertumbuhan (Kesic *et al.*, 2009).

A.actinomycescomitans biasanya ditemukan di plak gigi, poket periodontal dan sulkus gingiva. Kehadirannya di poket periodontal dikaitkan dengan penyakit periodontal agresif. Mikroorganisme menghasilkan banyak faktor virulensi: leukotoksin sebagai yang paling penting, kemudian bakteriosin, faktor penghambat kemotaksis, faktor sitotoksik, faktor pengikat protein, faktor immunosupresif, kolagenase lipopolisakarida, faktor penghambat fibroblas, penentu resistensi antibiotik, dan faktor penghambat fungsi polimorfonuklear leukosit (Kesic *et al.*, 2009).

Endotoksin *A.actinomycescomitans* memiliki potensi untuk memodulasi respon inang dan berkontribusi pada kerusakan

jaringan. Kemampuan lipopolisakarida *A.actinomycetemcomitans* untuk merangsang makrofag untuk melepaskan interleukin IL-1 α , IL-1 β , dan tumor necrosis factor (TNF) adalah yang paling penting. Sitokin ini mampu merangsang resorpsi tulang (Kesic *et al.*, 2009).

2.2.2. Klasifikasi Taksonomi *A.actinomycetemcomitans*

Klinger pada tahun 1912 pertama kali mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri *A.actinomycetemcomitans*. Bakteri tersebut dinamakan demikian karena dihubungkan dengan *Actinomyces israelii* pada infeksi aktinomikotik. Tahun 1921, Lieske mereklasifikasi penamaan bakteri tersebut menjadi *Bacterium comitans*. Topley dan Wilson tahun 1929 mengganti nama genus dengan Actinobacilus. Tahun 1962 King dan Tatum menyebutkan kemiripan yang dekat fenotip *Actinobacilus actinomycetemcomitans* dengan *Haemophilus aphrophilus*. Pada tahun 1985 Potts dkk menyusun kembali penamaan genusnya menjadi *Haemophilus actinomycetemcomitans*. Norskov-Lauritsen dan Killan tahun 2006 mengusulkan penamaan terbaru untuk bakteri ini yaitu *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Mythireyi and Krishnababa, 2012).

Secara taksonomi, bakteri *A.actinomycetemcomitans* diklasifikasikan sebagai berikut: (Mythireyi and Krishnababa, 2012)

Kingdom : Bacteria
Filum : Proteobacteria
Kelas : Gammaproteobacteria
Ordo : Pasteurellales
Famili : Pasteurellaceae
Genus : *Aggregatibacter*
Spesies : *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

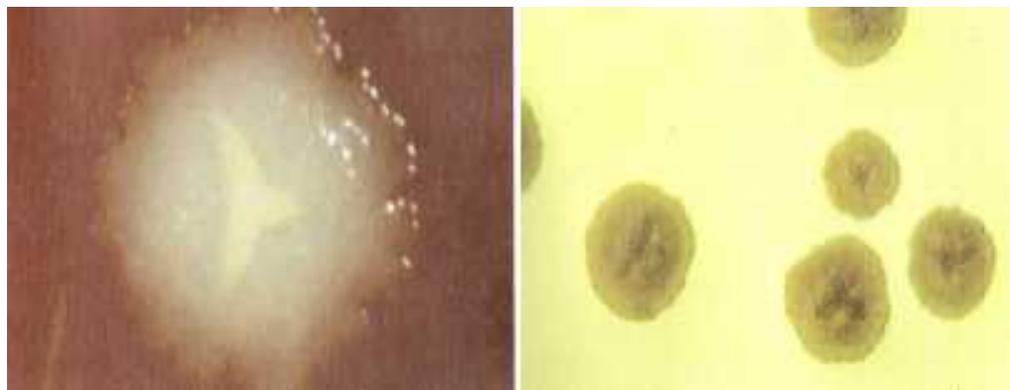
2.2.3. Karakteristik Kultur

A.actinomycetemcomitans adalah Gram-negatif kokobasillus non-motil kecil, kapnofilik dan fakultatif anaerob, tumbuh baik dalam 5% CO₂ di udara atau anaerob dan tumbuh dalam koloni dengan membutuhkan waktu 24-48 jam. Pada media pertumbuhan padat, isolat *A.actinomycetemcomitans* segar menempel pada agar dan membentuk koloni lingkaran 0,5 hingga 1 mm dengan tepi yang sedikit tidak beraturan. Isolat oral segar *A.actinomycetemcomitans* selalu bentuk fimbria dan berbentuk kecil (~1mm), permukaan kasar, koloni tembus cahaya, dengan morfologi internal berbentuk bintang. Morfologi koloni kasar telah dikaitkan dengan adanya fimbria panjang dan terbungkus pada permukaan sel. Koloni dari varian halus tidak memiliki struktur dalam seperti bintang dan sel-sel tidak mengekspresikan fimbria.

Varian koloni halus tanpa fimbriasi tumbuh sebagai koloni bulat buram yang besar pada agar (Gambar 4) (Mythireyi and Krishnababa, 2012).



Gambar 4. Foto plate isolasi utama sampel plak sub gingiva dari subjek dengan LJP. Mayoritas koloni cembung bulat kecil di plate adalah isolat *A.actinomyetemcomitans*



Gambar 5. Morfologi koloni strain *A.actinomyetemcomitans*

2.2.4. Peran *A.actinomycetemcomitans* terhadap Periodontitis

Istilah virulensi secara umum didefinisikan sebagai kemampuan suatu mikroorganisme dalam menyebabkan terjadinya infeksi (Kler, Malik, 2010). Faktor virulensi yang dimiliki *A.actinomycetemcomitans* antara lain fimbria, adhesin, leukotoksin, CDT, faktor penghambat kemotaktik, lipopolisakarida, dan juga kolagenase (Sriraman, Mohanraj and Neelakantan, 2014). Kolonisasi awal *A.actinomycetemcomitans* diperantarai oleh fimbria dan adhesin. Fimbria memberikan bentuk morfologi yang kasar pada permukaan bakteri (Kler, Malik, 2010, Wahasugui *et al.*, 2012). Adhesin merupakan protein yang memediasi ikatan antara bakteri dan reseptor spesifik pada sel epitel. Mekanisme kerjanya dihubungkan dengan membran terluar bakteri dan melepaskan adhesin dalam bentuk vesikel (Mythireyi and Krishnababa, 2012).

Setelah berkolonisasi *A.actinomycetemcomitans* mengeluarkan faktor virulensi utama yaitu leukotoksin. Leukotoksin merupakan anggota dari pore forming toxin. Leukotoksin paling banyak terlihat pada membran ekstraselular sel bakteri. Kemampuan strain *A.actinomycetemcomitans* bervariasi dalam memproduksi leukotoksin. Strain ini dapat diklasifikasikan menjadi leukotoxin

producing – strains dan non leukotoxin-producing strains (Kler and Malik, 2010, Johansson, 2011). Mekanisme leukotoksisitas leukotoksin meliputi aktifitas membranolitik yang menghasilkan lubang pada sel target sehingga menyebabkan terjadi osmolisis akibat influks air ke dalam sel (Johansson, 2011, Henderson, Ward and Ready, 2010). Mekanisme bakteri dalam mengganggu sistem pertahanan inang juga diperankan oleh *Cytolethal Distending Toxin* (CDT). CDT adalah toksin subunit trimerik yang dihasilkan oleh bakteri Gram-negatif pada mukosa. Toksin CDT menyebabkan melemahnya sistem imun inang, sehingga antibodi tidak dapat menetralsir efek toksik dari toksin tersebut. CDT menginduksi distensi (pengerumbungan) sel, menyebabkan berhentinya siklus sel, dan kematian sel inang. *Cytolethal Distending Toxin* pada *A.actinomycescomitans* (AaCDT) dapat menginduksi berhentinya siklus G2 sel dan apoptosis sel termasuk sel limfosit (Kler and Malik, 2010, Henderson, Ward and Ready, 2010). Oleh sebab itu, toksin ini berperan penting pada patogenitas bakteri melalui sistem imun. Kemampuan untuk menginduksi kematian sel inang dapat memicu kerusakan jaringan dan terlambatnya proses penyembuhan. Pada kasus periodontitis, hal ini dapat

menyebabkan hilangnya gigi (Kler and Malik, 2010, Matangkasombut *et al.*, 2010).

Upaya lain yang dilakukan *A.actinomycetemcomitans* bertahan dari serangan host yaitu dengan memproduksi faktor penghambat kemotaksis yang dapat menghambat kemotaksis PMN. Faktor ini dapat mengurangi jumlah PMN yang mampu memfagositosis dan membunuh bakteri pada lesi lokal. Hal tersebut menyebabkan pertahanan pertama inang dalam menyerang bakteri dengan pengerahan sel-sel fagosit pada area invasi dapat terganggu. Kemampuan untuk mengganggu kemotaksis sel-sel tersebut menyebabkan bakteri mampu bertahan dari serangan inang (Kler and Malik, 2010).

Kerusakan jaringan merupakan kunci dari penyakit periodontal. *A.actinomycetemcomitans* memproduksi lipopolisakarida yang memiliki potensi menyebabkan kerusakan susunan sel dan jaringan inang. Lipopolisakarida (LPS) *A.actinomycetemcomitans* memiliki spektrum imunologik yang luas pada aktivitas endotoksik. Lipopolisakarida pada *A.actinomycetemcomitans* dapat menstimulasi makrofag untuk menghasilkan interleukin (interleukin-1 , interleukin-1), Tumor Necrosis Factor (TNF) dan sitokin yang terlibat pada inflamasi

jaringan dan resorpsi tulang. Aktivitas resorpsi tulang oleh LPS terjadi akibat stimulasi PGE2 yang dilepaskan oleh osteoblas dan sel lain. *A.actinomycescomitans* diketahui mengaktifkan komplemen cascade melalui jalan alternatif. Mekanisme ini menyebabkan tersebarnya prostaglandin dan memungkinkan resorpsi tulang pada kasus periodontitis. Selain LPS, kerusakan jaringan pada periodontitis juga diperankan oleh kolagenase. Kolagenase merupakan komponen matriks ekstraselular bakteri. *A.actinomycescomitans* memproduksi kolagenase yang dapat menyerang serat-serat kolagen sehingga menyebabkan degradasi kolagen pada jaringan periodontal (Mythireyi and Krishnababa, 2012, Kler and Malik, 2010).

2.3. Tumbuhan Miana (*Coleus scutellarioides* (L) Benth)

Tumbuhan miana memiliki sinonim *Coleus scutellarioides* (L) Benth, *Coleus atropurpureus* (Benth.), *Plectranthus scutellarioides* (L.) R.Br., *Solenostemon scutellarioides* (Hamidah, 2019).

Klasifikasi tanaman miana berdasarkan buku Dalimartha (2000) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Magnoliophyta
Classis	: Magnoliopsida

Subclassis	: Asteridae
Ordo	: Lamiales
Familia	: Lamiaceae (Labiatae)
Genus	: Coleus
Spesies	: <i>Coleus scutellarioides</i> (L) Benth

Miana (*Coleus scutellarioides* (L) Benth) merupakan tanaman asli dari Asia Tenggara. Namun saat ini miana (*Coleus scutellarioides* (L) Benth) tersebar luas dan ditemukan di seluruh dunia (Anita, Arisanti dan Fatmawati, 2018). Tumbuhan miana tumbuh subur di daerah dataran rendah sampai ketinggian 1500 m di atas permukaan laut dan merupakan tanaman semusim. Umumnya tumbuhan ini ditemukan di tempat lembab dan terbuka seperti pematang sawah, tepi jalan pedesaan, di kebun-kebun sebagai tanaman liar atau tanaman obat (Yuniarti, 2008).

2.3.1. Morfologi Tumbuhan Miana

Tumbuhan miana memiliki batang herbal, tegak atau berbaring pada pangkalnya dan merayap tinggi berkisar 30-150 cm, dan termasuk kategori tumbuhan basah yang batangnya mudah patah. Daun tunggal, helaian daun berbentuk hati, pangkal membulat atau melekok menyerupai bentuk jantung dan setiap tepiannya dihiasi oleh lekuk-lekuk tipis yang bersambungan dan

didukung tangkai daun dengan panjang tangkai 3-4 cm yang memiliki warna beraneka ragam dan ujung meruncing dan tulang daun menyirip berupa alur. Batang bersegi empat dengan alur yang agak dalam pada masing-masing sisinya, berambut, percabangan banyak, berwarna ungu kemerahan. Permukaan daun agak mengkilap dan berambut halus panjang dengan panjang 7-11 cm, lebar 3-6 cm berwarna ungu kecoklatan sampai ungu kehitaman. Bunga berbentuk untaian bunga bersusun, merah dan ungu. Tumbuhan miana memiliki aroma bau yang khas dan rasa yang agak pahit. Jika seluruh bagian diremaskan mengeluarkan bau yang harum. Untuk memperbanyak tumbuhan ini dilakukan dengan cara stek batang dan biji (Yuniarti, 2008).

Tumbuhan ini dikenal masyarakat Indonesia dengan nama daerah yaitu: si gresing (batak), adang-adang (Palembang), miana, plado (sumbar), jawer kotok (sunda), iler, kentangan (Jawa), ati-ati, saru-saru (bugis), majana (Madura), Toraja sarenakko (Sentra informasi IPTEK, 2012).



Gambar 6. Tanaman Miana (*Coleus scutellaroides* (L) Benth)

2.3.2. Kandungan Kimia Tumbuhan Miana

A. Flavonoid

Flavonoid terutama senyawa yang larut dalam air dan dapat diekstraksi dengan etanol 70%. Flavonoid berupa senyawa fenol, karena itu warnanya berubah bila ditambahkan basa atau ammonia sehingga mudah dideteksi pada kromatogram atau dalam larutan. Senyawa ini mengandung sistem aromatik yang terkonjugasi dan daerah itu menunjukkan pita serapan kuat pada daerah spektrum ultra violet (V) dan spektrum tampak. Terbentuknya warna merah, kuning atau jingga di lapisan amil alkohol pada uji fitokimia menunjukkan adanya flavonoid (Harborne, 1987).

B. Tanin

Tanin adalah polifenol yang larut dalam air yang biasanya ditemukan pada tanaman herba dan kayu yang lebih tinggi. Tanin telah dilaporkan bersifat bakterisida terhadap *Staphylococcus aureus*. Sifat astringen dari tanin dapat menginduksi kompleksasi dengan enzim atau substrat. Banyak enzim mikroba dalam filtrat kultur mentah atau dalam bentuk murni dihambat ketika dicampur dengan tanin. Toksisitas tanin mungkin terkait dengan aksinya pada membran mikroorganisme (Akiyama *et al.*, 2001).

C. Saponin

Saponin merupakan senyawa dalam bentuk glikosida yang tersebar luas pada tumbuhan tingkat tinggi. Saponin membentuk larutan koloid dalam air dan membentuk busa yang mantap jika dikocok dan tidak hilang dengan penambahan asam (Harborne, 1987).

Saponin merupakan golongan senyawa alam yang rumit, yang mempunyai massa dan molekul besar, dengan kegunaan luas (Burger *et al.*, 1998). Saponin diberi nama demikian karena sifatnya menyerupai sabun "Sapo" berarti sabun. Saponin adalah senyawa aktif permukaan yang kuat dan menimbulkan busa bila

dikocok dengan air. Dikenal juga jenis saponin yaitu glikosida triterpenoid dan glikosida struktur steroid tertentu yang mempunyai rantai spirotekal. Kedua saponin ini larut dalam air dan etanol, tetapi tidak larut dalam eter (Robinson, 1995).

D. Alkaloid

Alkaloid adalah senyawa metabolit sekunder terbanyak yang memiliki atom nitrogen, yang ditemukan dalam jaringan tumbuhan dan hewan. Sebagian besar senyawa alkaloid bersumber dari tumbuh-tumbuhan, terutama angiosperm. Lebih dari 20% spesies angiosperm mengandung alkaloid (Wink, 2008).

Alkaloid dapat ditemukan pada berbagai bagian tanaman seperti bunga, biji, daun, ranting, akar dan kulit batang. Alkaloid umumnya ditemukan dalam kadar yang kecil dan harus dipisahkan dari campuran senyawa yang rumit yang berasal dari jaringan tumbuhan. Pada kehidupan sehari-hari alkaloid selama bertahun-tahun telah menarik perhatian terutama karena pengaruh fisiologisnya terhadap bidang farmasi, tetapi fungsinya dalam tumbuhan hampir sama. Hal ini disebabkan karena alkaloid bersifat basa, sehingga dapat mengganti basa mineral dalam mempertahankan kesetimbangan ion dalam tumbuhan.

Alkaloid pada tanaman berfungsi sebagai racun yang dapat melindunginya dari serangga dan herbivora, faktor pengatur pertumbuhan, dan senyawa simpanan yang mampu menyuplai nitrogen dan unsur-unsur lain yang diperlukan tanaman (Wink, 2008).

Untuk menunjang penggunaan tanaman miana sebagai obat tradisional yang mempunyai dasar maka penelitian penelitian tentang kandungan zat aktif daun miana telah dilakukan oleh beberapa peneliti. Vivi *et al.* (2008) membandingkan hasil uji karakteristik simplisia daun miana dan buah sirih (dalam %) yaitu ; susut pengeringan (90,98 : 87,26) penetapan kadar air (12,04:12,06), kadar abu total (10,51:6,99), kadar abu larut air (2,69:3,74), kadar sari larut air (14,7:17,5), kadar sari larut etanol (11,38:8,92) (Vivi *et al.*, 2008).

Lumbessy *et al.* (2013) telah melakukan uji kualitatif sampel iler, ketepeng, rumput mutiara, rumput teki dan pegagan mengandung flavonoid. Total kandungan flavonoid tertinggi pada ketepeng 26,86 mg/ml dan iler 14,25 mg/ml (Lumbessy, Abijulu, Paendong, 2013). Khattak dan Taher (2011) meneliti ekstrak dari genus coleus. *Coleus blumei* (red malaysia = ati-ati merah) yang merupakan spesies yang sama dengan *Coleus scutellarioides*

telah memberikan aktivitas antioksidan dengan nilai IC₅₀ 15,9 µg/ml (vitamin C = 2,48 µg/ml sebagai pembanding). Kandungan senyawa kimia dalam ekstrak yang ditemukan adalah: flavonoid 13,66 mg QE/g ekstrak (QE=quercetin equivalents), fenol 85,35 mg GAE/g (GAE= gallic acid equivalents). Sampai dosis 5000 mg/kg berat badan mencit tidak ada kematian hewan, tidak toksis dan tidak ada lesi patologis (Khattak and Taher, 2011). Mutiatikum *et al.* (2010) menentukan hasil uji karakteristik simplisia miana dari 3 kota (Manado, Kupang dan Papua) yaitu ; penetapan kadar air (9,7-11,91), penetapan kadar tanin total (3,26-3,7), kadar abu total (9,4-16,61), kadar abu tidak larut asam (1,04-1,81), kadar abu larut air (2,24-5,39), kadar sari larut air (15,22-19,34), kadar sari larut etanol (16,52-17,2). Dalam penelitian ini, senyawa kimia dari tanaman obat yang diperoleh dari tiga tempat berbeda ditentukan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tanin adalah penanda dan sidik jari dari masing masing fraksi (misalnya n-heksan, etil asetat dan etanol) memiliki kromatogram yang sama (Mutiatikum, Alegantina and Astuti, 2010).

2.3.3. Peran Daun Miana sebagai Antibakteri

Telah diketahui daun miana memiliki berbagai senyawa antibakteri. Senyawa antibakteri tersebut adalah flavonoid, polifenol, saponin, tanin, dan alkaloid. Penelitian tentang khasiat daun miana sebagai antibakteri telah dilakukan dan telah dibuktikan dapat menghambat pertumbuhan beberapa bakteri Gram-positif dan Gram-negatif (Kumala, Shirly dan Desi, 2009).

Beberapa studi menyebutkan flavonoid memperlihatkan aktivitas antimikroba, antiinflamasi dan antioksidan. Sifat antibakteri tersebut dikaitkan karena senyawa tersebut merupakan metabolit sekunder yang disintesis oleh tumbuh-tumbuhan sebagai respon terhadap infeksi mikroba. Kerja antimikroba flavonoid yaitu dengan membentuk kompleks dengan protein ekstraselular sehingga akan merusak membran sel bakteri. Ekstrak tumbuhan yang mengandung flavonoid mengindikasikan adanya aktivitas antimikroba yang secara signifikan dapat menyerang berbagai strain bakteri (Noorhamdi, Nurdiana, Aditiarso, 2010, Dent *et al.*, 2013, Prihantoro, Indra, Sumarno, 2006, Mirkarimi *et al.*, 2013).

Fenol berikatan dengan protein melalui ikatan hidrogen sehingga mengakibatkan struktur protein menjadi rusak (Susanti, 2008). Fenol mampu menyebabkan koagulasi protein sel dan

melisiskan sel pada kadar yang tinggi, sedangkan pada konsentrasi rendah terbentuk kompleks protein fenol dengan ikatan yang lemah dan segera mengalami peruraian sehingga efek anti bakterinya menjadi lemah (Sari, Djannah, Nurani, 2010).

Tanin memiliki potensi antimikroba dengan mekanisme kerja mengendapkan protein bakteri sehingga terjadi inaktivasi enzim yang diproduksi bakteri dan menginaktivasi transpor protein dinding sel bakteri sehingga merusak dinding sel bakteri tersebut (Noorhamdi, Nurdiana, Aditiarso, 2010, Mirkarimi *et al.*, 2013). Tanin dengan berat molekul rendah memiliki aktivitas yang lebih baik daripada tanin dengan berat molekul yang lebih besar (Costabile *et al.*, 2011). Tanin dapat diklasifikasikan ke dalam tanin kondensasi dan tanin hidrolisis. Penelitian yang dilakukan oleh Lim *et al.* (2006) menunjukkan bahwa hanya tanin hidrolisis yang menunjukkan aktivitas antibakteri, tanin hidrolisis ditemukan memiliki aktivitas antibakteri yang jauh lebih baik dibandingkan tanin kondensasi atau campuran dari keduanya (Lim, Darah, Jain, 2006).

Saponin mempunyai efek menurunkan tegangan permukaan sehingga dapat merusak membran sel serta merusak protein sel bakteri. Hal ini didasarkan pada sifat sitotoksik dari saponin dan

kemampuannya dalam mempengaruhi permeabilitas membran sitoplasma sehingga dapat melisis sel mikroba (Noorhamdi, Nurdiana, Aditiarso, 2010, Siregar, Sabdono, Pringgenies, 2012).

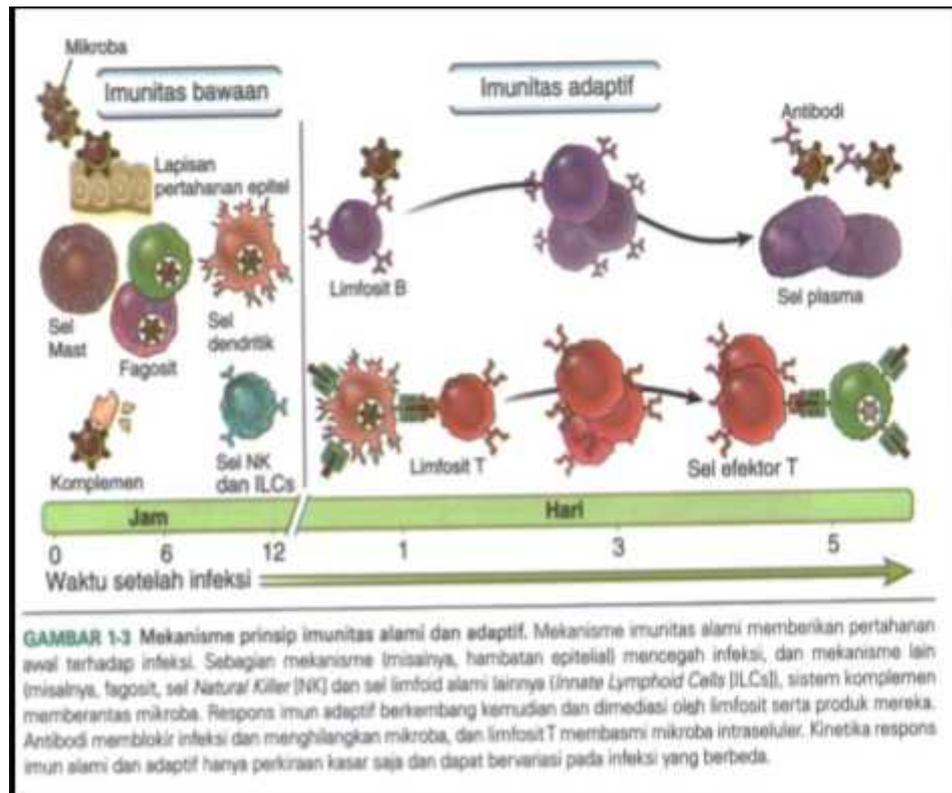
Alkaloid memiliki aktivitas antibakteri dengan cara merusak dinding sel melalui komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri (Juliantina *et al.*, 2009). More *et al.* (2012) melaporkan bahwa fraksi alkaloid terisolasi tidak dapat melawan bakteri Gram-negatif. Hal ini disebabkan karena membran luar bakteri Gram-negatif memiliki barier penetrasi berbagai molekul antibakteri dan ruang periplasma mengandung enzim yang mampu mendegradasi molekul eksogen (More *et al.*, 2012). Alkaloid dikaitkan dengan kemampuan menghambat replikasi DNA bakteri dengan cara menghambat aktivasi enzim yang berperan pada proses pengarahannya nukleotida pada pita DNA tunggal induk sebagai cetakannya. Adanya gangguan replikasi DNA menyebabkan terganggunya pembelahan sel. Selain itu sintesa protein untuk metabolisme bakteri maupun untuk sintesa dinding sel akan terhambat. Pada akhirnya pertumbuhan bakteri akan terhambat (Noorhamdi, Nurdiana, Aditiarso, 2010, Siregar, Sabdono, Pringgenies, 2012).

Steroid dapat berinteraksi dengan membran fosfolipid sel yang bersifat impermeabel terhadap senyawa-senyawa lipofilik sehingga menyebabkan integritas membran menurun, morfologi membran sel berubah, dan akhirnya dapat menyebabkan membran sel rapuh dan lisis (Noorhamdi, Nurdiana, Aditiarso, 2010, Siregar, Sabdono, Pringgenies, 2012).

2.4. Tinjauan tentang Imunitas

Mekanisme pertahanan inang terdiri dari imunitas alami yang memberikan perlindungan segera terhadap infeksi dan imunitas adaptif yang berkembang lebih lambat namun memberikan perlindungan yang lebih spesialis terhadap infeksi (Abbas, Lichtman and Pillai, 2016).

Imunitas alami selalu ada pada individu-individu sehat dan disiapkan untuk menghambat masuknya mikroba dan untuk mengeliminasi mikroba yang berhasil memasuki jaringan inang secara cepat. Imunitas adaptif memerlukan ekspansi dan diferensiasi limfosit sebagai respon terhadap mikroba sebelum memberikan pertahanan yang efektif. Imunitas ini beradaptasi terhadap adanya infeksi mikroba. Pertahanan lini pertama pada imunitas alami dilakukan oleh barrier epitel kulit dan mukosa serta oleh sel dan antibiotik alami yang berada



Gambar 7. Mekanisme prinsip imunitas alami dan adaptif (Abbas, Lichtman and Pillai, 2016).

di epitel, yang semuanya berfungsi untuk menghambat masuknya mikroba. Bila mikroba menghancurkan epitel dan memasuki jaringan atau sirkulasi, mereka diserang oleh fagosit, limfosit spesifik yang disebut sel limfoid alami misalnya sel Natural Killer (NK), dan beberapa protein plasma, termasuk protein dari sistem komplemen. Keseluruhan mekanisme imunitas alami ini secara spesifik mengenali dan bereaksi terhadap mikroba. Selain memberikan pertahanan awal terhadap infeksi, respon imun alami meningkatkan respon imun adaptif terhadap agen agen infeksius (Abbas, Lichtman and Pillai, 2016).

Sistem imun adaptif terdiri atas limfosit dan produk produknya, misalnya antibodi. Respon imun adaptif terutama penting terhadap pertahanan mikroba infeksius yang bersifat patogenik terhadap manusia (yaitu dapat menyebabkan penyakit) dan mampu melawan imunitas alami. Dua jenis imunitas adaptif yaitu imunitas humoral dan imunitas seluler, diperantarai oleh sel-sel dan molekul yang berbeda dan masing-masing dirancang untuk memberikan pertahanan terhadap mikroba ekstra dan intra seluler. Imunitas humoral diperantarai oleh protein yang dinamakan antibodi, yang diproduksi oleh sel-sel yang disebut limfosit B. Antibodi masuk ke dalam sirkulasi dan cairan mukosa, lalu menetralkan dan mengeliminasi mikroba serta toksin mikroba yang berada diluar sel-sel inang, dalam darah, cairan ekstraseluler yang berasal dari plasma dan di dalam lumen dari organ-organ mukosa, seperti traktus gastrointestinalis dan traktus respiratorius. Imunitas seluler karena prosesnya diperantarai oleh sel-sel yang disebut sel limfosit T. Beberapa limfosit T mengaktifasi fagosit untuk menghancurkan mikroba yang telah dimakan oleh sel fagosit ke dalam fagosit intraseluler (Abbas, Lichtman and Pillai, 2016).

2.4.1. Respon Imun Bawaan pada Penyakit Periodontal

Epitel periodontal merupakan barier fisik terhadap infeksi dan memiliki peran aktif dalam pertahanan bawaan inang, karena sel-sel epitel berada dalam kontak konstan dengan produk bakteri (Dunsche, 2002). Adanya penyakit aktif, migrasi epitel menyebabkan poket periodontal yang dalam yang mengakibatkan invasi bakteri, peradangan dan destruksi jaringan ikat, kehilangan tulang dan kemungkinan kehilangan gigi. Epitel dapat berpartisipasi dalam infeksi dengan memberi sinyal respon imun bawaan lebih lanjut dan respon imun dapatan. Sel-sel epitel juga dapat merespon bakteri dengan meningkatkan proliferasi, mengubah peristiwa pensinyalan sel, dan mengubah diferensiasi sel dan kematian sel serta mengubah homeostasis jaringan. Sel langerhans dan sel dendritik asal sumsum tulang yang terletak di dalam epitel adalah penghubung dengan imunitas dapatan. Sel-sel langerhans di epidermis dan mukosa mulut bertanggung jawab terhadap komunikasi dengan sistem imunitas (Chalermarp, Azuma, 2009).

Sekarang diakui bahwa epitel di seluruh tubuh menghasilkan beragam peptida antimikroba setidaknya empat famili (α -defensin, β -defensins, cathelicidins, saposins) yang telah ditemukan pada manusia (Marshall, 2004). Peptida ini telah dikaitkan dengan saliva

epitel junction gingiva semuanya terkait dengan ekspresi defensin, lebih khusus α -defensin hBD-1, hBD-2 dan hBD-3 (Dunsche, 2002). Integritas epitel barrier secara khusus terganggu oleh patogen mikroba yang berbeda yang menyerang sel-sel junction dan dengan demikian memisahkan sel dari satu sama lain (Galán, 2000). Famili peptida atau protein antibiotik alami diekspresikan dalam epitel dan oleh neutrofil. Protein ini memiliki aktivitas melawan bakteri Gram-positif dan Gram-negatif, serta terhadap ragi dan beberapa virus. Peptida antimikroba ini berfungsi dengan berasosiasi dengan permukaan mikroba anionik, kemudian berkumpul untuk membentuk pori-pori atau mengganggu membran mikroba, meskipun bukti baru berpotensi menunjukkan target sitoplasma tambahan (Hancock, 1997).

α -defensin dan cathelicidin LL37 adalah peptida yang aktif secara proteolitik dengan level yang tinggi dalam neutrofil yang bermigrasi melalui epitel junction ke sulkus gingiva (Marshall, 2004). Beberapa peneliti percaya bahwa peran utama α -defensin memberi sinyal respon imun bawaan dan dapatan lainnya sementara LL37 dan α -defensin paling penting sebagai antimikroba dalam sulkus gingiva (Lehrer, Ganz, 2002). Peptida ini mampu mengaktifkan jalur komplemen klasik dan meningkatkan produksi IL-8 oleh sel epitel,

yang dapat meningkatkan rekrutmen neutrofil ke tempat infeksi (Van Wetering, 1997).

Imunitas bawaan memiliki kemampuan yang cukup besar untuk mengenali bakteri sebagai *non-self agent* karena mikroorganisme ini menghadirkan PAMP di dinding bakteri, yang dikenali oleh reseptor pengenalan pola (PRRs) pada permukaan sel imun. PAMP penting untuk kelangsungan hidup mikroba. Mereka ditemukan dalam lipopeptida, peptidoglikan, flagelin dan DNA bakteri, baik untuk bakteri Gram-negatif (lipopolisakarida (LPS)) atau bakteri Gram-positif (asam lipoteikoat). Famili toll-like receptor (TLR) adalah kelas PRR dengan karakteristik terbaik dan mendeteksi beberapa PAMP. TLR mamalia terdiri dari keluarga besar yang terdiri dari setidaknya 11 anggota. TLRs 1-9 dilestarikan antara manusia dan tikus, dan masing-masing mengenali pola molekul unik yang terkait dengan kelas patogen yang berbeda (Mariano *et al.*, 2010).

TLR4 mengenali LPS yang merupakan komponen dinding sel utama dari bakteri Gram-negatif. Laporan menunjukkan bahwa TLR2 dapat mengenali beberapa jenis atipik LPS dari *Leptospira interrogans* dan *P.gingivalis*. TLR2 dan TLR4 mengenali komponen bakteri yang sebagian besar ada dalam membran sel bakteri. TLR5 mengenali flagelin yang merupakan komponen protein flagela yang

memanjang keluar dari membran luar bakteri Gram-negatif. TLR9 mengenali motif CpG yang tidak termetilasi yang ditemukan dalam DNA bakteri dan juga dalam DNA virus (Mariano *et al.*, 2010).

TLR diekspresikan pada berbagai sel termasuk sel limfoid dan non limfoid dan pada berbagai permukaan epitel termasuk sel dendritik. TLR2, TLR3, TLR4 dan TLR5 secara diferensial diekspresikan pada epitel oral, bronkial dan gastrointestinal. Pengenalan patogen oleh TLR yang diekspresikan dari sel-sel epitel mengarah pada produksi sitokin, kemokin, dan peptida antimikroba yang menginduksi perekrutan lebih banyak sel-sel inflamasi ke tempat-tempat yang terinfeksi. Interaksi TLR dengan mikroorganisme komensal juga diperlukan untuk mempertahankan homeostasis epitel. LPS bakteri selanjutnya dapat berinteraksi dengan reseptor sel makrofag atau dendritik termasuk CD14 dan TLR untuk merangsang produksi sitokin inflamasi dan mediator lainnya. Beberapa penulis telah menunjukkan bahwa model destruksi jaringan yang berfokus pada produksi IL-1 sebagai mediator utama dari destruksi jaringan periodontal termasuk stimulasi kolagenolitik dan agen destruksi tulang. Penting untuk dicatat bahwa sel-sel selain makrofag hadir dalam lesi periodontal (seperti fibroblas) yang juga menghasilkan sitokin inflamasi, mediator lipid, dan MMP (Mariano *et al.*, 2010).

2.4.2. Respon imun adaptif pada penyakit periodontal

Respon imun adaptif diaktifkan ketika barier epitel dengan peptida antimikroba dan komponen lain dari sistem bawaan diterobos. Sitokin atau interleukin merupakan bagian integral dari respons ini dan mewakili utusan antar sel (Fisman, Adler, Tenenbaum, 2008, Seymour *et al.*, 2004). Dalam perjanjian dengan Gemmell dan Seymour (2004), respon imun terhadap infeksi diatur oleh keseimbangan antara sitokin T helper 1 (Th 1) dan T helper 2 (Th 2) (Gemmell, Seymour, 2004, Seymour *et al.*, 1993). Beberapa penelitian menunjukkan penurunan respons Th1 pada periodontitis, sementara yang lain menunjukkan peningkatan respons Th2 (Seymour *et al.*, 1993, Sigusch *et al.*, 1998). Di sisi lain terkait dengan penyakit periodontal, Boyle, Simonet dan Lacey (2003) mengemukakan bahwa integritas jaringan tulang tergantung pada pemeliharaan keseimbangan antara resorpsi tulang oleh osteoklas dan deposisi tulang oleh osteoblas. Mekanisme pengaturan utama aktivitas osteoklas tampaknya dilakukan oleh anggota famili reseptor TNF, RANK (aktivator reseptor faktor nuklear-), osteoprotegerin (OPG), dan ligan RANK (RANKL). RANK diekspresikan pada prekursor osteoklastik dan pada osteoklas dewasa, sementara RANKL, sebuah protein transmembran, diekspresikan terutama pada osteoblas dalam kondisi homeostatis.

Interaksi antara RANK dan RANKL diperlukan untuk diferensiasi dan aktivasi osteoklas, suatu peristiwa yang diatur oleh OPG, yang sangat menghambat resorpsi tulang dengan mencegah keterlibatan RANK-RANKL (Boyle, Simonet, Lacey, 2003). Menariknya, RANKL juga menginduksi produksi beberapa substansi seperti MCP-1/CCL2 yang dapat berkontribusi pada resorpsi tulang (Kim *et al.*, 2006). Osteoblas ditemukan untuk mengekspresikan beberapa reseptor kemokin selama sintesis yang dapat memodulasi fungsinya melalui pengikatan kemokin. Selain itu, osteoklas dapat menghasilkan kemokin penting yang terlibat dalam rekrutmen neutrofil dan subset limfosit yang berbeda, menunjukkan peran yang menarik bagi osteoblas dalam pengembangan reaksi imun inflamasi (Lisignoli *et al.*, 2004).

2.4.3 Sel T Regulator (Treg)

Sel T Regulator adalah sel-sel yang memiliki fungsi pengaturan karena diketahui menekan proliferasi dan aktivasi sel T. Sel regulator disebut sel penekan. Baru-baru ini mereka digambarkan sebagai sel T CD4 + yang berfungsi penuh. Sel-sel ini mensekresi TGF- dan IL-10. Oleh karena itu, diperlukan untuk regulasi respon inflamasi. Mereka memainkan peran penting dalam respon tolerogenik dan penekanan respon inflamasi terhadap antigen diri. Sel T regulator diklasifikasikan menjadi sel alami (Treg) dan adaptif (Tr1, Th3).

Sementara, sel Treg telah berevolusi untuk memberikan perlindungan terhadap autoantigen, sel-sel Tr1 diperlukan untuk toleransi genetika (Arun, Talwar, Kumar, 2011).

Sel T Regulator (Treg) berperan penting dalam induksi toleransi perifer terhadap antigen diri dan asing. Sejumlah besar bukti mengaitkan peran penting sel-sel ini dalam disregulasi imunologis yang mendasari penyakit autoimun, penyakit radang kronis, dan kanker, serta dalam imunobiologi transplantasi. Dua kelas Treg yang paling relevan yang dijelaskan dalam subset CD4 + adalah sel regulator tipe 1 (Tr1) dan Treg CD4+, CD25+. Kedua subset Treg ini berbeda dalam sejumlah fitur biologis penting termasuk profil sekresi sitokin spesifik, penanda seluler, kemampuan untuk berdiferensiasi dalam menanggapi rangsangan spesifik antigen (Boyle, Simonet, Lacey, 2003).

Melampaui subpopulasi Th1 dan Th2 dari sel T yang menentukan respon terhadap infeksi berdasarkan pada pola sitokin yang diinduksi, subset berbeda dari sel T CD4 + yang disebut sel T regulator, telah menerima fokus yang kuat sejak dekade terakhir, karena perannya dalam regulasi jaringan yang mengontrol respons imun. Sel Treg yang terjadi secara alami, sel T CD4 + dan CD25 +, berasal langsung dari timus selama tahap awal perkembangan sel T

janin dan neonatal. Sel-sel ini membentuk sekitar 5-10% dari kumpulan sel T perifer dan secara konstituen mengekspresikan beberapa mediator penekan, seperti CD25 (reseptor IL-2 rantai α), glukokortikoid yang diinduksi TNF-R (GITR), sitotoksik limfosit T Ag-4 (CTLA-4), CD103 dan faktor transkripsi Foxp3 (Maggi *et al.*, 2005).

Berbeda dengan sel Treg alami intratimik, sel Treg diinduksi dihasilkan di perifer setelah patogen dihilangkan untuk mencegah autoimunitas sekunder. Generasi mereka tergantung pada faktor perifer seperti maturasi dan jenis sel penyaji antigen (APC) (Jonuleit *et al.*, 2000), ketersediaan sitokin seperti TGF- β (Chen *et al.*, 2003) dan keberadaan antigen dosis rendah (Apostolou and von Boehmer, 2004). Akhirnya, sel Treg yang diinduksi berhubungan dengan sel T regulator Tr1 dan Th3. Sel-sel Tr1 ditandai oleh pola produksi sitokin, menghasilkan IL-10 dan TGF- β dan IL-5 tingkat tinggi, IFN- γ dan IL-2 dalam jumlah rendah, dan tidak ada IL-4 (Roncarolo *et al.*, 2006) dan telah terbukti mencegah perkembangan penyakit autoimun yang dimediasi Th1 dan menekan respon imun terhadap patogen, tumor dan aloantigen (Veldman, Nagel, Hertl, 2006). Subset Th3 dari sel T regulator digambarkan dengan mensekresi TGF- β dan IL-1 inhibitor, yang keduanya memiliki peran

penting dalam regulasi imun (Maggi, *et al.*, 2005, Liu and Leung, 2006).

Sel Treg sekarang secara luas dianggap sebagai mediator utama toleransi perifer. Toleransi perifer adalah kurangnya respons limfosit dewasa di perifer terhadap antigen spesifik. Berbagai mekanisme penekanan potensial yang digunakan oleh sel Treg dapat dikelompokkan ke dalam empat mode aksi dasar : (Arun, Talwar, Kumar, 2011).

1. Penekanan oleh sitokin penghambat seperti IL-10 dan TGF- β .
2. Penekanan dengan sitolisis: Aktivitas sitolitik sel Treg dimediasi oleh granzyme A dan perforin melalui adesi CD18, menghasilkan penekanan sel B, sel T sitotoksik dan fungsi sel NK. Selain itu, sel Treg yang teraktivasi menginduksi apoptosis sel T efektor T melalui TRAIL-DR5 (tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-death receptor 5)
3. Penekanan oleh gangguan metabolisme: sel Treg memediasi efek supresif sebagai 'gangguan metabolisme' dari target sel T efektor.
4. Penekanan dengan modulasi pematangan atau fungsi DC: Sel Treg menekan respons imun dengan menargetkan DC. Selain efek langsung sel Treg pada fungsi sel T, sel Treg juga dapat memodulasi pematangan dan/ atau fungsi DC yang diperlukan

untuk aktivasi sel T efektor. Interaksi langsung antara sel-sel Treg dan DCs melalui molekul costimulator limfosit T antigen 4 (CTLA4), melemahkan aktivasi sel T efektor. Selain menginduksi DC untuk menghasilkan molekul immunosupresif, Sel Treg juga dapat mempengaruhi respons imun dengan memodulasi rekrutmen dan fungsi jenis sel lain seperti sel mast, monosit, dan makrofag.

2.4.4. Sel Treg dalam penyakit periodontal

Keberadaan sel T regulator telah dikaitkan dengan beberapa respon imun, seperti alergi, asma, dermatitis atopik, rhinitis (Elkord, 2006), dan partisipasi sel Treg pada penyakit periodontal (Nakajima *et al*, 2005, Ernst, *et al.*, 2007, Cardoso *et al.*, 2008). Seperti disebutkan sebelumnya, lesi inflamasi periodontitis disebabkan oleh sekelompok bakteri periodontopatik dan ditandai oleh sejumlah besar sel B dan sel plasma bersama dengan sejumlah besar sel T dan konsentrasi sitokin Th1 dan Th2 yang berbeda (Fisman, Adler, Tenenbaum, 2008, Seymour *et al.*, 2004). Di antara himpunan bagian sel T, partisipasi sel T regulator dalam penyakit periodontal telah banyak dipelajari. Beberapa pencarian menunjukkan bahwa mengidentifikasi CD4, CD25, CTLA-4 sebagai faktor transkripsi Foxp3 dan beberapa sitokin dan kemokin seperti penanda IL-10, IL-4, IL-17, ILF-17, TGF- β , dan RANKL dari sel

Treg pada lesi periodontal (Elkord, 2006). Peningkatan frekuensi sel Treg dibuktikan oleh Cardoso et al (2008) dalam infiltrat inflamasi jaringan gingiva dari pasien dengan penyakit periodontal kronis memperkuat gagasan untuk keterlibatan jenis sel dalam patogenesis penyakit periodontal (Cardoso et al., 2008). Namun, fungsi akurat sel Treg dalam pengembangan penyakit periodontal masih belum diketahui dan pemahaman tentang peran sel populasi akan berdampak pada pemahaman saat ini dan pengobatan penyakit periodontal (Mariano *et al.*, 2010).

Bukti mengenai peran pasti yang dimainkan oleh sel Treg dalam memediasi penyakit periodontal terus menjadi kontroversial. Nakajima (2005) dan Cardoso (2008) menunjukkan bahwa pasien periodontitis menunjukkan peningkatan persentase sel Treg dalam jaringan ikat gingiva dibandingkan dengan pasien gingivitis. Disimpulkan bahwa kadar Treg diregulasi dalam lesi periodontitis kronis sebagai perlindungan terhadap antigen sendiri seperti kolagen-1 (Nakajima *et al.*, 2005, Cardoso *et al.*, 2008). Ernst (2007) menunjukkan bahwa sel Treg menurunkan ekspresi RANKL pada penyakit periodontal (Ernst *et al.*, 2007). Namun, kapasitas mereka untuk menyediakan fungsi imunoregulasi pada penyakit periodontal telah dipertanyakan. Meskipun sifat pasti dari peran

yang dimainkan oleh sel Treg tidak diketahui, sel-sel ini memberikan pengaruh penting pada respons sel T secara keseluruhan (Cardoso *et al.*, 2008).

2.5. Tinjauan tentang Interleukin-10

2.5.1. Biosintesis Interleukin-10

Interleukin-10 pertama kali dikenal karena kemampuannya untuk menghambat aktivasi dan fungsi efektor dari sel T, monosit dan makrofag. Fungsi rutin IL-10 tampaknya terutama menghambat atau meniadakan respon peradangan, selain mengendalikan perkembangan dan diferensiasi sel B, sel NK, sel Th, sel T CD8, mastosit, granulosit, sel dendritik, keratinosit dan sel endotelial, dan bersifat immunosupresif terhadap sel mieloid (Redford *et al.*, 2010).

Interleukin-10 adalah sitokin pleiotropik yang dikenal karena sifat immunosupresifnya. Ia memiliki peran ganda; yaitu memainkan peran utama dalam menekan respon imun dan inflamasi serta aktivasi sel B (Yamazaki *et al.*, 2001) dan telah terlibat dalam supresi destruksi jaringan (Goutoudi, Diza and Arvanitidou, 2004). Hal ini juga meningkatkan produksi antagonis reseptor IL-1 (IL-1ra) dalam leukosit polimorfonukleat yang dirangsang dengan lipopolisakarida (LPS) dan menekan produksi metalloproteinase

(Lacraz *et al.*, 1995). Oleh karena itu, Interleukin-10 memiliki peran pengaturan penting dalam membatasi durasi dan tingkat respon inflamasi (Cassatella *et al.*, 1993).

Interleukin-10 dapat menghambat kemampuan sel mieloid seperti makrofag dan sel dendritik untuk mengaktifkan sel Th 1 sehingga produksi sitokin dari sel Th 1 dapat diinhibisi (Redford *et al.*, 2010). Selama infeksi mediator imun antiinflamasi Interleukin-10 dapat menghambat aktivitas yang berlebihan dari sel Th 1, Sel NK, dan makrofag yang semuanya diperlukan untuk patogen (Couper, Blount, Riley, 2008).

Interleukin-10 dihasilkan oleh makrofag dan limfosit T terutama T. Regulator. Target kerja Interleukin-10 di makrofag dan sel dendritik untuk menghambat peningkatan IFN- γ yang berlebihan termasuk produksi IL-12 dan ekspresi costimulator serta menekan molekul MHC II (Abbas and Lichman, 2011). Interleukin-10 memiliki potensi kuat sebagai antiinflamasi yang dapat menekan semua sitokin proinflamasi yang berperan dalam timbulnya nyeri patologi (Oliveira, Sakata, Issy, 2011). Fungsi dominan dari Interleukin-10 sebagai antiinflamasi, mengatur respon imun dan membatasi kerusakan jaringan namun produksi sitokin Interleukin-10 yang berlebihan secara langsung menekan fungsi APC dari sel yang

terinfeksi sehingga menghambat respon sel T CD 4 mengakibatkan kegagalan untuk mengendalikan infeksi (Harborne, 2006).

Interleukin-10 pertama kali diidentifikasi pada tingkat molekuler oleh DNAX Research Institute. Sebagai faktor yang diproduksi oleh sel T helper 2 (Th2), Interleukin-10 menghambat produksi sitokin oleh sel Th1. Interleukin-10 juga menunjukkan efek stimulasi tambahan pada timosit, sel B, dan sel mast. Interleukin-10 sebenarnya diproduksi oleh banyak jenis sel lain, termasuk sel B, sel mast, eosinofil, makrofag, dan sel dendritik (DC), dan sejumlah besar subset sel T seperti sel T CD8 + dan sel T CD 4+ pada tikus dan manusia (Zhang *et al.* 2014).

Interleukin-10 dapat menurunkan sintesis sitokin proinflamasi dan kemokin seperti IL-1, IL-6, dan TNF- (Mosser, Zhang, 2008). Ini juga dapat menurunkan sintesis oksida nitrat, gelatinase dan kolagenase. Netralisasi spesifik Interleukin-10 juga dianggap sebagai pengatur penting homeostasis tulang dalam kondisi homeostatik dan inflamasi (Lee *et al.*, 2009).

2.5.2. Peran Interleukin-10 terhadap penyakit periodontal

Periodontitis didefinisikan sebagai penyakit peradangan pada jaringan pendukung gigi yang disebabkan oleh mikroorganisme spesifik yang mengakibatkan kerusakan progresif

ligamentum periodontal dan tulang alveolar dengan pembentukan poket, resesi atau keduanya. Kerusakan yang diakibatkan oleh penyakit periodontal bermanifestasi dalam kerusakan tulang pendukung gigi yang bervariasi (Heinrich *et al.*, 2010).

Penyakit periodontal dimulai dan ditopang oleh plak mikroba yang terakumulasi di daerah krevikular gingiva dan menginduksi respons inflamasi (Scarel-Caminaga *et al.*, 2004). Meskipun faktor mikroba, lingkungan, perilaku dan sistemik dilaporkan mempengaruhi risiko periodontitis sedang hingga berat, ada bukti kuat untuk mendukung bahwa respon imun inang terhadap tantangan mikroba juga terkait dengan berbagai bentuk klinis periodontitis (Sumer *et al.*, 2007).

Jaringan kompleks sitokin pro dan antiinflamasi bekerja dalam jaringan periodontal yang meradang. Di antara sitokin lain, Interleukin-10 adalah sitokin multifungsi yang penting. Peningkatan atau penurunan tingkat IL-10 yang disebabkan oleh perbedaan genetik pejamu sangat penting untuk kontrol keseimbangan antara inflamasi, humoral dan tantangan mikroba. Interleukin-10 adalah sitokin antiinflamasi, diproduksi oleh sel T-helper 2 (Th2), makrofag dan B yang menghambat sintesis sitokin proinflamasi seperti IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- dan IFN- . Interleukin-10 menekan produksi

metalloproteinase, sekaligus meningkatkan sintesis inhibitor jaringan metalloproteinase dalam makrofag (Lacraz *et al.*, 1995). Selain itu, ia merangsang produksi osteoprotegrin yang menghambat resorpsi tulang dengan mencegah keterlibatan RANK-RANKL. Interleukin-10 dapat menjadi sitokin pelindung pada penyakit periodontal dan mengatur sitokin proinflamasi termasuk yang terlibat dalam kehilangan tulang alveolar. Individu yang merupakan produsen Interleukin-10 yang tinggi lebih terlindung dari periodontitis kronis karena peran antiinflamasi Interleukin-10. Oleh karena itu, peningkatan sitokin antiinflamasi yang ditentukan secara genetik; Interleukin-10 akan turun mengatur respon imun terhadap bakteri periodontopatogenik (Scarel-Caminaga *et al.*, 2004).

Berbagai biomarker yang diekspresikan selama proses inflamasi pada periodontitis dilepaskan dalam cairan sulkus gingiva (GCF) berfungsi sebagai penanda diagnostik yang penting. Selain itu, koleksi GCF adalah prosedur non-invasif atau invasif minimal (Lamster, 1997). Peradangan periodontal melibatkan peningkatan stimulator inflamasi seperti IL-1 dan penurunan inhibitor inflamasi seperti Interleukin-10 dan dampak ganda tersebut dapat menjadi faktor yang mendasari perubahan progresif berat yang melekat pada periodontitis (Deschner *et al.*, 2000). Beberapa penelitian

telah menyelidiki efek dari sitokin ini terutama Interleukin-10 pada pasien dengan periodontitis agresif (Kamma *et al.*, 2004).

Penelitian pada hewan telah mengkonfirmasi bahwa kurangnya Interleukin-10 menyebabkan tulang keropos dan kehilangan tulang alveolar, memberikan bukti lebih lanjut dari metabolisme tulang oleh Interleukin-10. Pada periodontitis, Interleukin-10 telah ditunjukkan sebagai pengatur penting homeostasis tulang alveolar (Zhang *et al.*, 2014). Interleukin-10 dalam penyakit periodontal dan perawatan periodontal sebagai sitokin antiinflamasi yang penting (Rossi and Zlotnik, 2000). Sementara itu, model hewan tikus menunjukkan bahwa Interleukin-10 memiliki efek antiinflamasi pada periodontitis. Saat ini beberapa penelitian mengungkapkan bahwa polimorfisme promotor gen Interleukin-10 terlibat dalam perkembangan penyakit periodontal. Genotip spesifik (-819TT/-592AA) dengan ekspresi Interleukin-10 yang rendah dapat memperburuk respon peradangan dan menyebabkan pertumbuhan berlebih dari gingiva (Luo, Gong and Yu, 2013). Haplotip ATA Interleukin-10, sebagai "produsen Interleukin-10 rendah," terbukti sebagai indikator risiko untuk *generalized aggressive periodontitis* (Reichert *et al.*, 2008).

Penyakit kehilangan tulang sangat mempengaruhi kualitas kesehatan dan kehidupan orang. Karena Interleukin-10 dapat berkontribusi terhadap pemeliharaan massa tulang dengan menghambat penyerapan tulang osteoklas dan stimulasi pembentukan tulang osteoblas, kami berhipotesis bahwa kegunaan Interleukin-10 akan menjadi strategi terapi baru dalam penyakit keropos tulang. Ini mungkin terutama menjadi pilihan perawatan yang menarik untuk keropos tulang terkait peradangan seperti penyakit periodontal dan lesi periapikal. Penggunaan Interleukin-10 akan membantu mempercepat proses penyembuhan fraktur dan meningkatkan osseointegrasi dengan implantasi gigi pada subjek osteoporosis (Zhang *et al.*, 2014).

2.7. Resiko Penggunaan Obat Tradisional

Sekitar 100 tahun yang lalu, tumbuhan alami adalah obat utama untuk mengobati penyakit manusia. Diperkirakan 25% obat-obatan modern dibuat dari tanaman yang pertama kali digunakan secara tradisional seperti aspirin dan efedrin. Namun, ada bukti ilmiah terbatas untuk menetapkan keamanan dan kemanjuran sebagian besar produk herbal. Dengan aplikasi luas dari obat-obatan kimia, obat-obatan herbal dan terapi tradisional lainnya telah menunjukkan kontraksi yang tajam. Dalam beberapa dekade

terakhir, spektrum penyakit telah berubah dan penyakit kronis yang kompleks telah menjadi bagian utama. Efek dari pengobatan Barat tidak memuaskan dan masalah reaksi obat yang merugikan juga sangat menonjol. Pengobatan komplementer dan alternatif, terutama herbal, telah mendapat perhatian lebih dan juga menjadi populer (Zhang, Onakpoya, Posadzki and Eddouks, 2015)

Pada umumnya penggunaan obat tradisional dinilai lebih aman daripada penggunaan obat modern. Hal ini disebabkan karena obat tradisional memiliki efek samping yang relatif lebih sedikit daripada obat modern. Akan tetapi tetap diperlukan ketepatan penggunaan obat tradisional untuk meminimalisir efek sampingnya, yakni : kebenaran obat, ketepatan dosis, ketepatan waktu penggunaan, ketepatan cara penggunaan, tidak disalahgunakan, dan ketepatan pemilihan obat untuk penyakit tertentu (Sumayyah dan Salsabila, 2017).

Seiring dengan peningkatan konsumsi dunia yang signifikan, keamanan herbal telah disorot. Menyalahgunakan obat herbal menyebabkan banyak efek samping yang parah, mereka tidak sepenuhnya bebas dari kemungkinan toksisitas atau efek samping oleh karena itu untuk memastikan keamanan penggunaan produk

obat herbal, obat herbal harus dikelola sebagai obat (Zhang *et al.*, 2015).

Ada sejumlah penyebab efek samping obat-obatan herbal, yang dapat dibagi menjadi alasan “langsung” dan “tidak langsung”.

Toksisitas Intrinsik. Alasan langsung adalah toksisitas intrinsik dari beberapa ramuan pada dosis terapeutik normal atau overdosis. Efek samping yang terkait dengan Ephedra, Aristolochia, dan Aconitum telah menunjukkan bahwa herbal dapat menghasilkan toksisitas pada manusia.

Toksisitas Eksternal. Efek buruk yang terkait dengan obat-obatan herbal dapat terjadi akibat kontaminasi produk dengan logam beracun, kesalahan identifikasi atau penggantian bahan herbal, atau produk yang diproses atau disiapkan secara tidak benar (Lee *et al.*, 2000).

Penggunaan obat-obatan herbal yang tidak tepat dapat menyebabkan efek negatif atau berbahaya. Misalnya, ramuan "Ma Huang" (Ephedra) secara tradisional digunakan di Cina untuk mengobati sesak napas, sementara itu dipasarkan sebagai suplemen makanan yang diformulasikan untuk pengurangan berat badan di AS. Penggunaan overdosis menyebabkan setidaknya

selusin kematian, serangan jantung, dan stroke (Haller and Benowitz, 2000, Ernst, 2000).

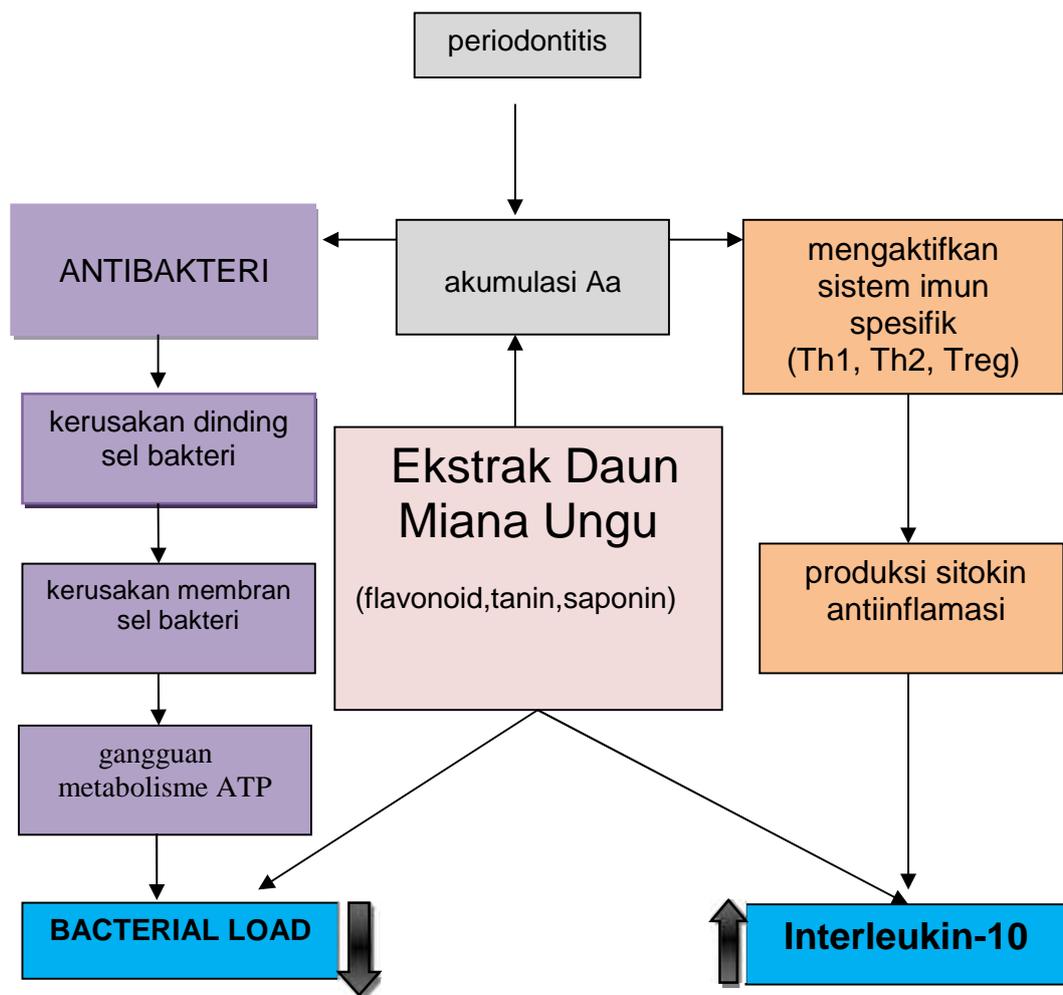
Semua obat-obatan herbal adalah campuran kompleks lebih dari satu bahan aktif. Banyaknya bahan aktif akan meningkatkan kemungkinan interaksi antara obat herbal dan obat konvensional. Selain itu, pengguna ramuan obat biasanya menderita kondisi kronis yang kemungkinan besar mereka akan minum obat yang diresepkan bersamaan. Ini, pada gilirannya, semakin meningkatkan potensi interaksi ramuan obat (Zhang, Tan, Tong *et al.*, 2011).

Khasiat dan toksisitas obat herbal sebagian besar didasarkan pada pengetahuan tradisional dan pengalaman klinis. Tidak ada data yang memadai tentang herbal beracun, organ target toksik, rentang dosis aman, dosis aman yang efektif, dan dosis toksik minimum. Dengan demikian, untuk menentukan efek toksik dan buruk dari masing-masing obat herbal adalah basis penting untuk memastikan keamanan penggunaan obat herbal. Penelitian di seluruh dunia tentang keamanan obat herbal masih belum luas atau cukup dalam. Untuk langkah selanjutnya, lebih banyak perhatian harus diberikan pada penelitian tentang toksisitas dan interaksi ramuan obat dari ramuan obat yang biasa digunakan yang merupakan pekerjaan yang paling penting dan mendesak. Untuk

pemantauan keamanan klinis, sistem pelaporan spontan efektif dalam mengidentifikasi masalah keamanan yang relevan dengan terapi (Sumayyah dan Salsabila, 2017).

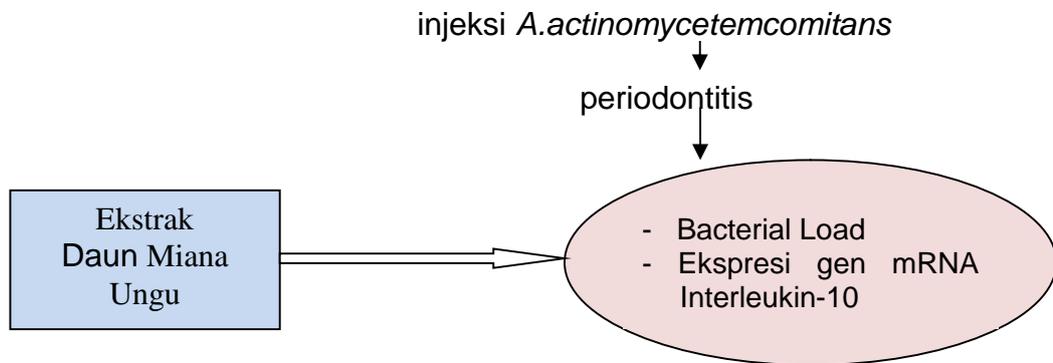
Kerangka peraturan untuk obat-obatan herbal dapat memberikan jaminan yang lebih besar kepada konsumen. Namun, peraturan dan spesifikasi obat-obatan herbal berbeda-beda di setiap negara. Obat-obatan herbal dikelola sebagai suplemen makanan, makanan fungsional, produk kesehatan, atau obat-obatan, yang menyebabkan standar diferensial dan pasar semrawut. Untuk memastikan kualitas dan keamanan obat-obatan herbal, Organisasi Kesehatan Dunia harus mengusulkan perencanaan terpadu global, yang meliputi standar manajemen global, sumber radikal herbal, pembibitan benih, penanaman, panen dan penyimpanan, proses rasional, pembuatan, dan standar kualitas. Selain itu, sistem jaminan keselamatan terdiri dari praktik klinis rasional dan pemantauan risiko harus ditetapkan untuk meningkatkan keamanan herbal dan memainkan peran yang lebih penting dalam menjaga kesehatan manusia (Zhang, Onakpoya, Posadzki and Eddouks, 2015).

2.6. Kerangka teori



Gambar 8. Kerangka Teori

2.7. Kerangka Konsep



Gambar 9. Kerangka Konsep dan Variabel

Variabel Penelitian

- Variabel bebas: variabel yang mempengaruhi nilai variabel terikat yaitu Ekstrak Daun Miana Ungu.
- Variabel terikat: variabel yang nilainya dipengaruhi variabel yang lain, merupakan variabel yang akan dianalisa yaitu *bacterial load* dan ekspresi gen mRNA Interleukin-10.

2.8. Hipotesis Penelitian

- Ekstrak Daun Miana Ungu berpengaruh terhadap *bacterial load* pada tikus wistar yang telah diinduksi dengan *A.actinomycescomitans*.
- Ekstrak Daun Miana Ungu berpengaruh terhadap ekspresi gen mRNA Interleukin-10 pada tikus wistar yang telah diinduksi dengan *A.actinomycescomitans*.

- c. Ada hubungan antara *bacterial load* dengan ekspresi gen mRNA Interleukin-10 pada tikus wistar yang telah diinduksi dengan *A.actinomycetemcomitans*.

2.9. Definisi Operasional

- a. Ekstrak daun miana ungu adalah daun miana ungu yang diproses sehingga menghasilkan produk ekstrak dosis 510 mg/kg BB yang diberikan pada tikus wistar. Pengolahan ekstrak daun miana ungu menggunakan etanol dan dilakukan di Laboratorium Fitofarmaka, Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin.
- b. *Bacterial Load* adalah Jumlah koloni *A.actinomycetemcomitans* yang ditentukan berdasarkan hasil perhitungan coloni forming unit (CFU) menggunakan 3 paper point ukuran 15 ke dalam sulcus gingiva gigi anterior rahang bawah selama 10 detik.
- c. Ekspresi gen mRNA Interleukin-10 adalah faktor transkripsi diferensiasi T.Regulator untuk meregulasi inflamasi agar aktivitas respon imun tidak berlebihan, menggunakan pemeriksaan RT-PCR. (Realtime Polymerase Chain Reaction).
- d. Tikus Wistar adalah hewan coba jenis kelamin jantan yang sehat, berusia 2-3 bulan, berat badan 200-300 gram.