



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

ANALISIS MATRIKS METALLOPROTEINASE-8, ALKALINE PHOSPATASE, NEUTROFIL ELASTASE DALAM GINGIVAL CREVICULAR FLUID PADA PENYAKIT PERIODONTAL

DISERTASI



**NILA KUSUMA
1031202010**

**PROGRAM PASCA SARJANA S3 FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG 2014**

UCAPAN TERIMA KASIH

Atas Rahmat dan Karunia ALLAH SWT penulis telah dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan disertasi ” **Analisis Matriks Metalloproteinase-8, Alkaline Phospatase, Neutrofil Elastase Dalam Gingival Crevicular Fluid pada Penyakit Periodontal Fluid**”.

Penulis menyadari bahwa selama proses penulisan disertasi ini tidak terlepas dari peran serta dan dukungan dari promotor, para guru besar dan seluruh staf pengajar mata kuliah yang ada di Program Pascasarjana Universitas Andalas. Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih serta penghargaan yang setinggi-tingginya kepada :

1. Prof. dr. H. Fadil Oenzil, Ph.D.Sp.GK selaku promotor yang telah sabar, ikhlas dan meluangkan waktu serta memberikan ilmu dan bimbingannya dan juga dukungan moril, dorongan serta motivasi dalam pelaksanaan penelitian sampai selesai penulisan deisertasi ini selesai.
2. Prof. DR. dr. Eryati Darwin, PA. (K) selaku Ko Promotor I yang telah dengan sabar ikhlas dan meluangkan waktu serta memberikan ilmu dan bimbingannya dan juga dukungan moril, dorongan serta motivasi dalam pelaksanaan penelitian sampai selesainya penulisan disertasi ini.
3. Prof. DR. dr. Hj, Yanwirasti, PA (K) selaku Ko Promotor II dan juga sebagai ketua Program S3 Biomedik Pasca Sarjana Fakultas Kedokteran Universitas yang telah dengan sabar, ikhlas dan meluangkan waktu serta memberikan ilmu dan

bimbingannya dan juga dukungan moril, dorongan serta motivasi dalam pelaksanaan penelitian sampai selesainya penulisan disertasi ini.

4. Kepada tim penguji proposal dan sekaligus tim penguji disertasi terdiri dari Prof. dr. Nur Indrawati Lipoeto Ph.D.Sp.GK, DR.dr. H. Hafni Bahctiar, MPH, DR. dr. Afriwardi Sp.KO dan DR. drg. Viviyanti Azwar, MARS yang telah memberikan saran, nasehat dan perbaikan yang berharga untuk perbaikan usulan proposal sampai terwujud disertasi ini.
5. Rektor Universitas Andalas yang telah memberika kesempatan bagi penulis untuk mengikuti kuliah di Program Pasca Sarjana di Universitas Andalas.
6. Direktur Program Pasca Sarjana Prof. Dr. Syafrudin Karimi, SE, MA dan mantan Direktur Program Pasca Sarjana Universitas Andalas Prof. Dr. Hazli Nurdin, MSc, dan Prof. Dr. Ir. Novirman Jamarun, MSc yang telah member kesempatan kepada penulis untuk mengikuti program ini.
7. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Andalas yang telah memberikan kesempatan pada penulis untuk mengikuti program S3 Biomedik Pasca Sarjana Fakultas Kedokteran universitas Andalas.
8. Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Andalas DR. dr. Afriwardi Sp. KO yang member dukungan moril, dorongan serta motivasi dalam pelaksanaan penelitian sampai selesainya penulisan disertasi ini serta masih memberikan izin bagi penulis untuk melanjutkan mengikuti kuliah di Program Pasca Sarjana Fakultas Kedokteran Universitas Andalas.

9. Kepada seluruh staf dosen di Program Pasca Sarjana Universitas Andalas khususnya program S3 Biomedik yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang memberikan bekal ilmiah untuk persiapan penyelesaian disertasi ini.
10. Kepala Lab Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas yang memberi izin kepada peneliti untuk menggunakan fasilitas laboratorium yang beliau pimpin sehingga semua data penelitian ini dapat diperoleh .
11. Semua pihak yang telah membantu dari awal sampai selesainya penulisan disertasi ini. Semoga Allah SWT melimpahkan rahmat, hidayah, kesehatan dan ampunan-Nya kepada semua pihak yang telah banyak membantu penulis.

Penulis sangat menyadari bahwa disertasi ini masih jauh dari kesempurnaan, sehingga kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan untuk kesempurnaannya. Semoga semua yang dituangkan dalam disertasi ini dapat bermanfaat bagi kita semua, Amin.

Desember, 2013

Penulis

RINGKASAN

ANALISIS MATRIKS METALLOPROTEINASE-8, ALKALINE PHOSPHATASE, NEUTROFIL ELASTASE DALAM GINGIVAL CREVICULAR FLUID PADA PENYAKIT PERIODONTAL FLUID

Penyakit periodontal adalah penyakit yang mengenai jaringan pendukung gigi yaitu gingiva dan jaringan periodontal yang merupakan jaringan yang menghubungkan antara gigi penyangga yaitu tulang alveolar. Penyakit periodontal yang paling sering mengenai jaringan periodontal adalah gingivitis dan periodontitis, merupakan penyakit urutan kedua teratas pada kelainan rongga mulut.

Gingivitis dalam keadaan ringan tidak menimbulkan rasa sakit sehingga kurang mendapat perhatian, tetapi bila dibiarkan gingivitis dapat menjadi periodontitis yang berbentuk destruktif terhadap jaringan periodontal dimana hilangnya struktur jaringan periodontal dan *loss dental* dari lengkung rahang yang akhirnya menimbulkan kelainan wajah dan gangguan pencernaan. Pada kondisi periodontitis tingginya jumlah bakteri anaerob di dalam jaringan pendukung periodontal merupakan lokal infeksi pada jaringan tubuh dan organ lainnya yang akan menginfeksi secara sistemik melalui pembuluh darah dan dapat mengakibatkan kematian.

Diagnosa penyakit periodontal dilakukan berdasarkan indeks periodontal dengan pengukuran klinis tradisional yaitu *probing* kedalaman poket, perdarahan saat *probing*, kehilangan perlekatan klinis, indeks plak, radiografi. Indeks yang digunakan ini sering kali kegunaannya terbatas. Menurut *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), lebih dari 50% sering terdapat salah pengertian dalam menentukan keparahan penyakit periodontal sehingga mengakibatkan kerancuan dalam menegakkan diagnosa dan memilih treatment. *Scaling* dan *root planing* sebagai *initial therapy* tidak menuntaskan penyakit Periodontal. Pada saat ini belum ada *Gold Standard* untuk kriteria diagnosis klinik

penyakit periodontal sehingga diperlukan pengembangan tes diagnostik baru yang dapat mendeteksi keberadaan penyakit yang aktif.

Dalam penelitian ini dilakukan satu metode yang dapat mengidentifikasi kelainan periodontal dengan langkah-langkah obyektif seperti pemeriksaan peranan enzimatik sebagai respon host terhadap interaksi bakteri penyebab penyakit Periodontal. Kandungan enzimatik di dalam saliva pada penderita penyakit periodontal telah diteliti sebelumnya. Terdapat korelasi antara kadar enzimatik pada saliva dan plasma darah.

Perubahan enzimatik karena peningkatan inflamasi pada penyakit periodontal ini dapat diukur untuk menegakkan diagnosa sesuai dengan tingkat keparahan penyakit Periodontal yang memiliki skala ukur yang diharapkan dapat menjadi penanda pada penyakit Periodontal. Pengukuran enzim ini dapat menunjukkan ada atau tidak adanya patogen periodontal, inflamasi gingiva dan periodontal, *host*-imun inflamasi respon terhadap spesies patogen tertentu, dan kerusakan jaringan periodontal. Media biologis yang dipilih yaitu cairan sulkus gingiva (GCF) karna keberadaannya sangat dekat dengan lokasi inflamasi penyakit periodontal

Penelitian pendahuluan pada 8 sampel sehat, 8 gingivitis ringan, dan 8 periodontitis ringan telah dilakukan untuk mengukur kadar *Matrix Metalloprotease 8* (MMP-8), *Alkaline Phosphatase* (ALP), *Neutrofil Elastase* (NE). Kemudian dilanjutkan dengan pemeriksaan kadar *Matrix Metalloprotease 8* (MMP-8), *Alkaline Phosphatase* (ALP), *Neutrofil Elastase* (NE) dalam *Gingival Crevicular Fluid* (GCF) dengan uji Elisa, pada 20 sampel sehat, 20 sampel gingivitis ringan, dan 20 sampel periodontitis ringan. Hasil pemeriksaan kadar ketiga enzim tersebut digunakan dalam menegakkan diagnosa yang akurat dan tepat terhadap penyakit gingivitis, periodontitis dengan spesimen *Gingival Crevicular Fluid* (GCF). Sehingga diperoleh diagnostik yang tepat untuk menentukan perawatan dan pengobatan akurat yang memiliki skala ukur. Tujuan penelitian ini adalah membuktikan Hubungan Kadar

Matriks Metalloproteinase-8, Alkaline Phosphatase, Neutrofil Elastase dalam Gingival Crevicular Fluid dengan penyakit periodontal.

Hasil penelitian ini menyimpulkan bahwa penanda yang paling kuat hubungannya pada penyakit periodontal dalam *Gingival Crevicular Fluid*, setelah dilakukan hasil uji statistik pada penelitian ini didapatkan hubungan yang bermakna antara kadar *Matrix Metalloproteinase-8, Alkaline Phosphatase* dan *Neutrophyl Elastase* pada penyakit periodontal dalam *Gingival Crevicular Fluid*. Hasil uji analisis multivariat dengan Uji MANOVA, akhirnya didapatkanlah penanda yang paling kuat hubungannya dengan penyakit periodontal adalah *Matrix Metalloproteinase-8*. karena *MMP-8* bekerja menghancurkan kolagen tipe 1 dan struktur gingiva, dimana jaringan ikat gingiva terdiri dari rangkaian bundel serat kolagen dengan komponen utama terdiri dari serat kolagen 60%. Dengan terbuktinya hubungan paling kuat antara kadar *Matrix Metalloprotease-8* dengan penyakit periodontal, maka terjadi kadar *MMP-8* yang tinggi dapat dijadikan indikator tingginya inflamasi pada penyakit periodontal.

Disarankan dalam aplikasi terapi penyakit periodontal selanjutnya menggunakan cairan fisiologis tubuh seperti GCF sebagai salah satu skala ukur yang menyatakan kondisi kesehatan pasien. Dalam mendiagnosa, menegaskan prognosa, dan mengevaluasi treatment sangat penting berdasarkan skala ukur.

SUMMARY

ANALYSIS MATRIX METALLOPROTEINASE - 8 , ALKALINE
PHOSPHATASE AND NEUTROPHIL ELASTASE
IN PERIODONTAL DISEASE ON GINGIVAL CREVICULAR FLUID

Periodontal disease is a disease that affects the supporting tissues of teeth and gingiva of periodontal tissue that connects the abutment namely alveolar bone . Periodontal disease that affects the periodontal tissues are gingivitis and periodontitis , the incidence is the second highest disease on oral disease.

In the state of mild gingivitis, it is painless so it makes less attention , but if it didn't get a proper treatment can turn into periodontitis, a destructive form of periodontal tissue that cause the loss of periodontal tissue structure and loss of the dental arch and facial abnormalities and gastrointestinal disorder. On the condition of periodontitis, there is high number of anaerobic bacteria in the periodontal supporting tissues, which is a local infection in the body tissues and other organs that will infect systemically through the blood vessels and can lead to death .

The diagnosis of periodontal disease can be done by periodontal index with traditional clinical measurements like probing pocket depth , bleeding on probing , clinical attachment loss , plaque index , radiography. The use of periodontal index is often limited in usefulness. According to the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) , more than 50 % there is often misunderstanding in determining the severity of periodontal disease causing confusion in diagnosis and selecting treatment . Scaling and root planing as an initial therapy in Periodontal disease does not resolve the problem. At this time there is no Gold Standard for clinical diagnosis criteria of periodontal disease, the development of new diagnostic tests that can detect the presence of active disease .

In this research, a method that can identify periodontal disorders with objective measures such as examination of enzymatic role as the host response to the interaction of bacteria that cause periodontal disease . The enzymatic content of saliva

in patients with periodontal disease have been studied previously . There is a correlation between enzymatic levels in saliva and blood plasma .

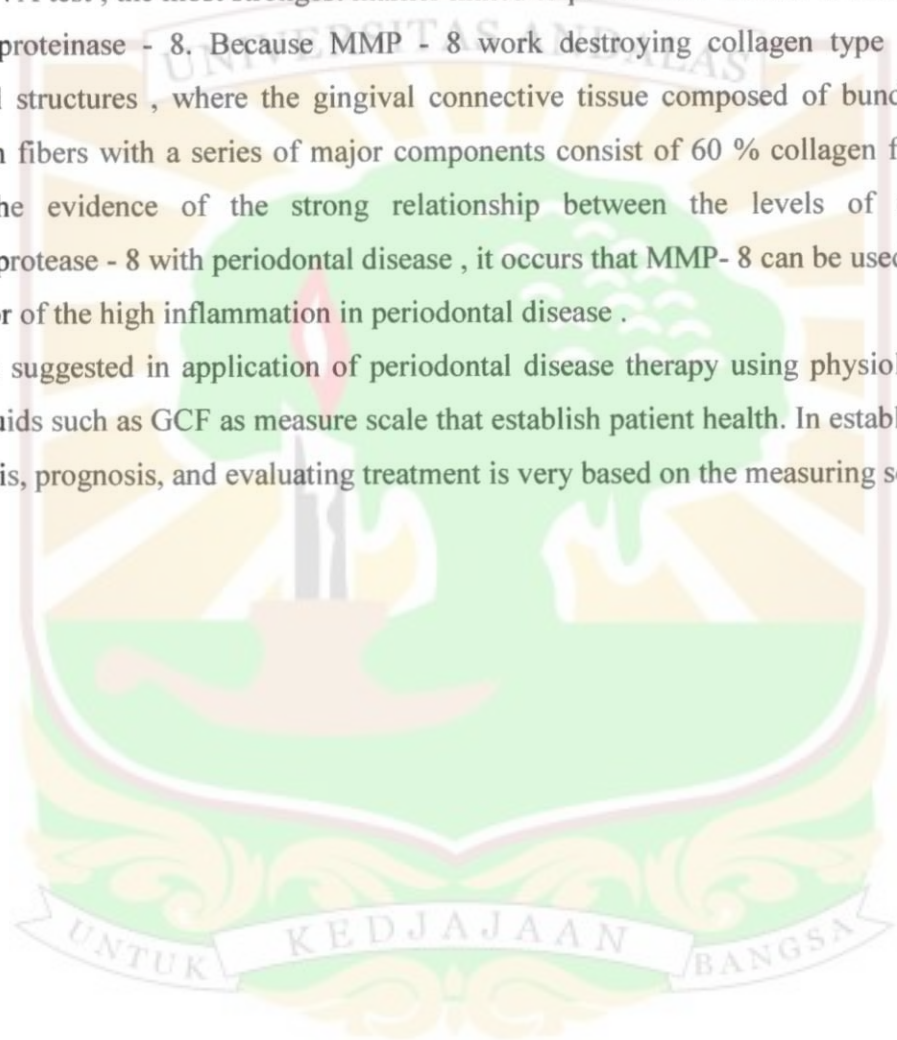
Enzymatic changes due to increased inflammation in periodontal disease can be measured for diagnosis according to the severity of periodontal disease that has a measuring scale that is expected to be a marker of periodontal disease . Measurement of these enzymes can indicate the presence or absence of periodontal pathogens , gingival and periodontal inflammation , host - immune inflammatory response against a particular pathogen species , and the destruction of periodontal tissue . Selected biological media that gingival crevicular fluid (GCF) because its existence is very close to the location of periodontal disease.

The preliminary study on 8 healthy samples, 8 mild gingivitis, and 8 mild periodontitis has been conducted to measure the level of Matrix Metalloprotease 8 (MMP-8), Alkaline Phosphatase (ALP), Neutrophil Elastase (NE). The study is proceed by measuring level of Matrix Metalloprotease 8 (MMP-8), Alkaline Phosphatase (ALP), Neutrophil Elastase (NE) in Gingival Crevicular Fluid (GCF) by Elisa test on 20 healthy samples, 20 mild gingivitis, and 20 mild periodontitis. The result of enzymes level measurement is used in establishing an accurate and appropriate diagnosis to gingivitis, periodontitis with specimens Gingival crevicular Fluid (GCF) in order to obtain the correct diagnosis to determine and treat accurately which has measuring scale. The purpose of this study is to prove the Relationship of Matrix Metalloproteinase-8, Alkaline Phosphatase, Neutrophil Elastase Levels in Gingival Crevicular Fluid and Periodontal Disease.

The level of matrix metalloprotease 8 (MMP - 8) , Alkaline Phosphatase (ALP) , Neutrophil elastase (NE) with elisa test in establishing an accurate diagnosis , appropriate to the disease gingivitis , periodontitis with specimens Gingival crevicular Fluid (GCF) in order to obtain appropriate diagnostic care and treatment to determine accurately which has a measuring scale. The purpose of this study is to see the relationship Levels of Matrix Metalloproteinase - 8 , Alkaline Phosphatase , Neutrophil elastase Gingivitis and Periodontitis in the Gingival crevicular Fluid .

The results of this study concluded that the marker most strongly linked to periodontal disease in Gingival crevicular Fluid , after the results of statistical tests performed in this study found a significant association between levels of Matrix Metalloproteinase - 8 , Alkaline Phosphatase and Neutrophyl Elastase on periodontal disease in Gingival crevicular Fluid . The test results of multivariate analysis with MANOVA test , the most strongest marker linked to periodontal disease is the Matrix Metalloproteinase - 8. Because MMP - 8 work destroying collagen type 1 and gingival structures , where the gingival connective tissue composed of bundles of collagen fibers with a series of major components consist of 60 % collagen fibers . With the evidence of the strong relationship between the levels of matrix metalloprotease - 8 with periodontal disease , it occurs that MMP- 8 can be used as an indicator of the high inflammation in periodontal disease .

It is suggested in application of periodontal disease therapy using physiological body fluids such as GCF as measure scale that establish patient health. In establishing diagnosis, prognosis, and evaluating treatment is very based on the measuring scale.



ABSTRAK

ANALISIS MATRIKS METALLOPROTEINASE-8, ALKALINE PHOSPHATASE, NEUTROFIL ELASTASE DALAM GINGIVAL CREVICULAR FLUID PADA PENYAKIT PERIODONTAL FLUID

Penyakit periodontal yang mengenai jaringan gingival dinamakan penyakit gingivitis, dan akan berlanjut menjadi periodontitis yang berbentuk destruktif terhadap jaringan periodontal dimana hilangnya stuktur jaringan periodontal dan *loss dental* dari lengkung rahang yang akhirnya menimbulkan kelainan wajah dan gangguan pencernaan. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan hubungan kadar *Matrix Metalloproteinase-8*, *Alkaline Phosphatase*, *Neutrofil Elastase* pada penyakit periodontal dalam *Gingival Crevicular Fluid*.

Pada penelitian ini melibatkan 60 orang sampel dengan 20 orang sampel sehat, 20 orang sampel gingivitis ringan, 20 orang sampel periodontitis awal. Kadar enzim yang diteliti diuji dengan menggunakan teknik ELISA. Pada penelitian *cross sectional* membandingkan kadar ketiga enzim masing-masing terhadap sampel sehat, gingivitis ringan dan periodontitis awal pada setiap kelompok. Analisis data dilakukan dengan cara univariat untuk mendidkripsikan masing-masing variable, untuk melihat distribusi normal ($p > 0.05$) dilakukan Kolmogorov Smirnof Test. Apabila terdistribusi normal dilakukan uji ANOVA untuk mengetahui perbedaan rata rata kadar MMP-8, *Alkaline Phosphatase*, *Neutrofil Elastase* jika didapatkan hasil yang signifikan kemudian dilanjutkan dengan Post Hoc Bonferroni. Untuk melihat enzim yang paling kuat hubungannya antara MMP-8, *Alkaline Phosphatase*, *Neutrofil Elastase* terhadap sample sehat, penderita gingivitis dan periodontitis dengan derajat kepercayaan 95 %, dilakukan uji homogenitas ($p > 0.05$) dan dapat dilanjutkan dengan uji MANOVA.

Penelitian ini menyimpulkan bahwa bahwa terdapat hubungan yang bermakna antara kadar *Matrix Metaloprotease-8*, *Alkaline phosphatase* dan *Neutrofil Elastase* pada penyakit periodontal dalam Gingival Crevicular Fluid. Dan didapatkan penanda yang paling kuat hubungannya dengan penyakit periodontal adalah *Matrix Metalloproteinase-8*.

Hasil penelitian ini dapat digunakan para praktisi agar dapat menegakkan diagnosa yang tepat dan penanganan yang tepat pada penyakit periodontal dengan skala ukur kadar enzim *Matrix Metalloproteinase-8*, sehingga penderita penyakit periodontal tidak berkelanjutan menimbulkan komplikasi.

Kata kunci : Penyakit Periodontal, MMP-8, ALP, NE

ABSTRACT

ANALYSIS MATRIX METALLOPROTEINASE - 8 , ALKALINE PHOSPHATASE AND NEUTROPHIL ELASTASE IN PERIODONTAL DISEASE ON GINGIVAL CREVICULAR FLUID

Periodontal disease affecting the gingival tissues is gingivitis , and when it is not properly treated, will be a destructive periodontitis of periodontal tissue structure where the periodontal tissues and loss of the dental arch and facial abnormalities and can indicate the gastrointestinal disorder. This study aims to prove the relationship levels of Matrix Metalloproteinase - 8 , Alkaline Phosphatase , Neutrophil elastase in periodontal disease in Gingival Crevicular Fluid .

In this study involving 60 people with a sample of 20 healthy samples , 20 samples of mild gingivitis , periodontitis initial 20 samples . Studied enzyme levels tested using ELISA technique . In a cross-sectional study comparing three levels of each enzyme to sample healthy , mild gingivitis and periodontitis early in each group . Data analysis was performed by means of univariate to describe each variable , Kolmogorov Smirnov Test is used to see a normal distribution ($p > 0.05$). If normally distributed ANOVA test to determine differences in average levels of MMP - 8 , Alkaline Phosphatase , Neutrophil elastase if obtained significant results followed by a Bonferroni post hoc . To see the most powerful enzyme relationship between MMP - 8 , Alkaline Phosphatase , Neutrophil elastase to sample healthy , gingivitis and periodontitis patients with a 95% confidence level , homogeneity test ($p > 0.05$), and can proceed with the MANOVA test .

This study concluded that there is a significant correlation between the levels of matrix metalloproteinase - 8 , Alkaline phosphatase and Neutrophil elastase in periodontal disease in Gingival crevicular Fluid . And obtained the strongest markers of periodontal disease is Matrix Metalloproteinase - 8 .

The results of this study can be used by practitioners in order to establish a proper diagnosis and appropriate treatment of periodontal disease by measuring the scale of Matrix Metalloproteinase-8, there is no complication in person with periodontitis.

Keywords : Periodontal Disease, MMP-8, ALP, NE

DAFTAR ISI

KULIT LUAR	i
SAMPUL DEPAN.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
LEMBAR PERNYATAAN.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
RINGKASAN.....	viii
SUMMARY.....	xii
ABSTRAK.....	xvi
ABSTRACT	xvii
DAFTAR ISI	xviii
DAFTAR GAMBAR.....	xxi
DAFTAR TABEL	xxii
DAFTAR SINGKATAN	xxiv

BAB 1 PENDAHULUAN

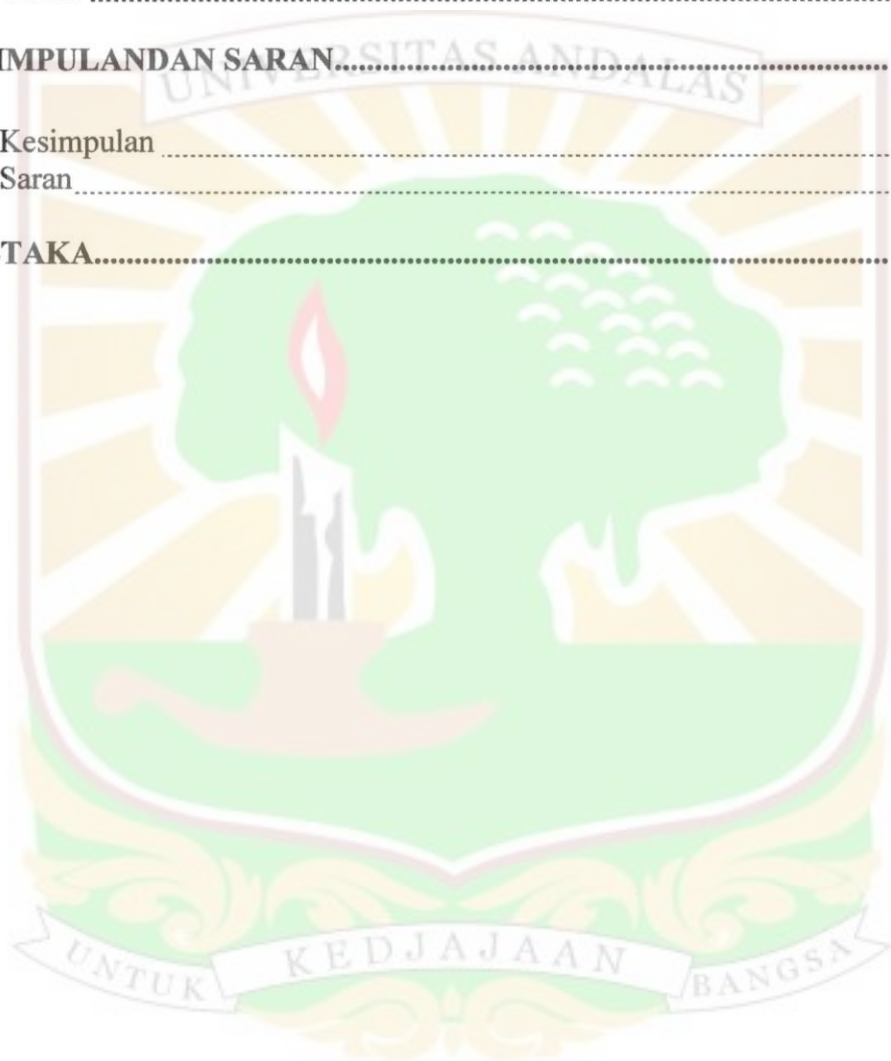
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian	5
1.3.1. Tujuan Umum	5
1.3.2. Tujuan Khusus	5
1.4. Manfaat Penelitian	5

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Gingiva.....	7
2.1.1 Anatomi Mikroskopis Jaringan Lunak Pendukung Gigi.....	7
2.1.1.1 Serabut Gingiva	8
2.1.1.2 Sulcus Gingiva	9
2.1.1.3 Epithellium Attachment	10
2.1.2 Anatomi Mikroskopis Jaringan Keras Pendukung Gigi	11
2.1.2.1 Ligament Periodontal	11
2.1.2.2 Sementum	12
2.1.2.3 Tulang Alveolar	14
2.2 Klasifikasi Penyakit Periodontal	15
2.2.1 Faktor-faktor Penyebab Penyakit Periodontal	16
2.2.2 Mekanisme Keterlibatan Bakteri Patogenik Dalam Penyakit Periodontal	17
2.2.3 Patogenesis Penyakit Periodontal	20
2.2.3.1. Initial Lession	22
2.2.3.2. Early Lession	24
2.2.3.3. Established Lession	26
2.2.4 Sistem Pertahanan pada Gingivitis, Periodontitis	32
2.2.5 Interaksi Host dan Bakteri pada Penyakit Periodontal	36
2.3 GCF sebagai Salah Satu Spesimen dalam Menegakkan Diagnosa.....	40
2.3.1 Komposisi GCF	45
2.3.2 Aktifitas Selluler dan Humoral Didalam Cairan Sulkus.....	47
2.3.3 Metode Pengumpulan GCF	48

2.4	Penegakan Diagnosa Pada Gingivitis dan Periodontitis	50
2.4.1	Konvensional	50
2.4.2	Biomarker Pada Penyakit Periodontal.....	52
2.4.2.1	MMP-8	55
2.4.2.2	Alkaline Phospate.....	66
2.4.2.3	Neutrofil Elastase	72
BAB 3	KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....	77
3.1.	Kerangka Konsep.....	77
3.2.	Hipotesis Penelitian.....	79
BAB 4	METODOLOGI PENELITIAN	80
4.1.	Desain Penelitian	80
4.2.	Lokasi dan Waktu Penelitian	80
4.3.	Populasi dan Sampel	80
4.3.1.	Populasi	80
4.3.2.	Sampel	80
4.3.3.	Kontrol	80
4.3.4.	Besar Sampel	80
4.4.	Kriteria Inklusi dan Eksklusi	81
4.4.1.	Kriteria Inklusi	81
4.4.2.	Kriteria Eksklusi	81
4.5.	Variabel Penelitian	82
4.5.1.	Variabel Independen	82
4.5.2.	Variabel Dependen	82
4.6.	Bahan dan Instrumen Penelitian	82
4.6.1.	Bahan Penelitian	82
4.6.2.	Instumen Penelitian	82
4.7.	Defenisi Operasional	83
4.7.1.	Periodontitis	83
4.7.2.	MMP-8	84
4.7.3.	Alkaline Phosphatase	84
4.7.4.	Neutrofil Elastase	84
4.8.	Persyaratan Etik Penelitian	85
4.9.	Pemantapan Mutu (Quality Assurance)	86
4.9.1.	Persyaratan Subjek	86
4.9.2.	Pengambilan Sampel	87
4.9.3.	Penyimpanan Sampel	87
4.9.4.	Pengiriman Sampel	88
4.9.5.	Pemeriksaan Sampel	88
4.9.6.	Pemeriksaan Laboratorium	89
4.9.6.1.	Uji ELISA MMP-8	89
4.9.6.2.	Uji ELISA Alkaline Phosphatase	92
4.9.6.3.	Uji ELISA Neutrofil Elastase	94
4.10.	Prosedur Pengumpulan Data	97
4.10.1.	Kerangka Operasional Penelitian	97
4.10.2.	Penjelasan Kerangka Operasional Penelitian	97
4.10.3.	Prosedur Penelitian	98
4.13.	Analisa Data	98

BAB 5	HASIL PENELITIAN	100
	5.1. Karakteristik Sampel Penelitian	100
BAB 6	PEMBAHASAN	106
	6.1. Karakteristik Penderita	106
	6.2. Hubungan kadar MMP-8 pada penyakit periodontal dalam GCF	106
	6.3. Hubungan kadar Alkaline phosphatase pada penyakit periodontal dalam GCF	109
	6.4 Hubungan kadar NE pada penyakit periodontal dalam GCF	110
	6.5. Enzim yang paling kuat hubungannya pada penyakit periodontal dalam	112
BAB 7	KESIMPULANDAN SARAN	115
	7.1. Kesimpulan	115
	7.2. Saran	115
	DAFTAR PUSTAKA	117



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. <i>Interdental papila</i>	9
Gambar 2.2 Serabut periodontal.....	10
Gambar 2.3 Struktur Jaringan Keras Pendukung Gigi	12
Gambar 2.4 Initial Lesion	22
Gambar 2.5 Early Lesion.....	24
Gambar 2.6 Established Lesion	26
Gambar 2.7 Advanced Lesion	28
Gambar 2.8 Anatomi Gingival <i>Crevicular</i>	41
Gambar 2.9 Vaskular Gingiva dan Cairan Krevikular	42
Gambar 2.10 Komposisi GCF	44
Gambar 2.11 Teknik Absrobing Paper Intrасulcular Method	48
Gambar 2.12 Struktur MMP	56
Gambar 2.13 Langkah-langkah Pemecahan Kolagen oleh Kolagenase	64
Gambar 2.14 Struktur Alkaline Phospatase.....	66
Gambar 2.15 Mekanisme Kerja ALP	67
Gambar 2.16 NE Dihasilkan oleh Granula Azurophilic.....	74
Gambar 2.17 Mekanisme Kerja Neutrofil Elastase	75
Gambar 3.1 Gambaran Skematis Enzimatik pada Gingivitis dan Periodontitis.....	77

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Mikrobiologi Periodontal	18
Tabel 2.2 Patogenesis Penyakit Periodontal	31
Tabel 2.3 Grup MMP	57
Tabel 2.4 Jenis ALP pada Manusia	68
Tabel 2.5 Enzim Proteolitik Pada Manusia	73
Tabel 4.1 Jadwal penelitian.....	91
Tabel 5.1 Rata-rata umur subjek penelitian berdasarkan jenis kelamin	100
Tabel 5.2 Hasil Uji Normalitas Kolmogorov-Smirnov pada Enzim <i>Matrix Metalloproteinase-8</i> (ng/dl), <i>Alkaline Phosphatase</i> (ng/dl) dan <i>Neutrophyl Elastase</i> (ng/dl) berdasarkan PDI	100
Tabel 5.3 Perbedaan Rata-rata Kadar <i>Matrix Metalloproteinase-8</i> (ng/dl) pada Penyakit Periodontal dalam <i>Gingival Crevicular Fluid</i> berdasarkan PDI.....	101
Tabel 5.4 Perbedaan Rata-rata Kadar Enzim <i>Matrix Metalloproteinase-8</i> (ng/dl) antar kelompok PDI	101
Tabel 5.5 Perbedaan Rata-rata Kadar <i>Alkaine Phosphatase</i> (ng/dl) pada Penyakit Periodontal dalam <i>Gingival Crevicular Fluid</i> berdasarkan PDI.....	102
Tabel 5.6 Perbedaan Rata-rata Kadar Enzim <i>Alkaline Phosphatase</i> (ng/dl) antar kelompok PDI).....	102
Tabel 5.7 Perbedaan Rata-rata Kadar <i>Neutrophyl Elastase</i> (ng/dl) pada Penyakit Periodontal dalam <i>Gingival Crevicular Fluid</i> berdasarkan PDI.....	103

Tabel 5.8	Perbedaan Rata-rata Kadar Enzim <i>Neutrophyl Elastase</i> (ng/dl) antar kelompok PDI	103
Tabel 5.9	Hasil Uji Homogenitas pada Enzim <i>Matrix Metalloproteinase-8</i> (ng/dl), <i>Alkaline Phosphatase</i> (ng/dl) dan <i>Neutrophyl Elastase</i> (ng/dl).....	104
Tabel 5.10	Hasil Uji MANOVA Menunjukkan Enzim yang Paling Kuat Hubungannya pada Penyakit Periodontal dalam <i>Gingival Crevicular Fluid</i>	105



DAFTAR SINGKATAN

ACP	= Acid Phosphatase
ALP	= Alkaline Phosphatase
ALT	= Alanin Aminotransferase
APC	= Antigen Presenting Cell
AST	= Aspartat Aminotransferase
BCGF	= <i>T-cell derived B-cell growth factor</i>
BOP	= Bleeding On Probing
BSE	= Batas Semento Enamel
CD	= Cluster of differentiation
CK	= Creatine Kinase
COX	= <i>cyclooxygenases</i>
CR	= C-reactive
CV	= <i>coefficient of variation</i>
DPP	= Protease Dipeptidyl
ELA2	= Elastase 2
E-ROP	= enzyme – substrat complex
E-P	= phospo-enzyme
E-Pi	= non covalent phosphate complex
GCF	= Gingival crevicular fluid
GCAP	= Germ Cell Alkaline Phospatase
GGT	= Gamma-GlutamilTransferase
GI	= Gingival Index
IAP	= Intestinal Alkaline Phospatase
ICAM-1	= Intercellular Adhesion Molekul-1

iC3b	= Inactive Complement 3b
IgG	= Immunoglobulin G
IgG1	= Immunoglobulin G1
IgG3	= Immunoglobulin G3
IgM	= Immunoglobulin M
IL-8	= Interleukin-8
LAF	= <i>lymphocyte activating factor</i>
LAP	= Latence Associated Peptide
LDH	= LactateDehidrogenase
LFA-1	= Leukosit Function Associated Antigen-1
LOS	= Lipooligosakarida
LPN	= Leukosit Polimorfonuklear
LPS	= Lipopolisakarida
MCP	= Monocyte chemoattractant protein
MHC	= Mayor Histocompatibility Complex
MMP	= Matrix Metalloproteinase
MNEI	= Murine Neutrophyl Elastase Inhibitor
NE	= Neutrophil elastase
NHANES	= <i>National Health and Nutrition Examination Survey</i>
NIDCR	= Institut Nasional Penelitian Gigi dan Craniofacial
OAF	= Osteoclast Activating Factor
OFNASET	= Oral Fluid NanoSensorTest
OH	= Oral Hygiene
PA	= Protective Ag
PDI	= Periodontal Disease Index

PGE	= Prostaglandin E
PLAP	= Placental Alkaline Phosphatase
PMN	= Polimorfonuklear
pNPP	= p Nitrophenyl Phosphat
RANTES	= Regulated and normal T cell expressed and secreted
ROP	= Phospomonoester
SBA	= Soluble Biotinylated-Collagen Assays
SCA	= secretory leukocyte protease inhibitor
Ser-102	= Serine-102
SLPI	= Serine Leucocyte Protease Inhibitor
Td	= <i>Treponema & Eubacterium</i>
TIMP	= Tissue Inhibitor Metalloproteinase
TNAP	= Tissue-nonspecific alkaline phosphatase
TNF	= Tissue Necrotizing Factor



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Surat Keterangan Lolos Kaji Etik	125
Lampiran 2 Surat Keterangan Melakukan Penelitian dari Kepala Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas.....	126
Lampiran 3 Protokol Penelitian.....	127
Lampiran 4 Penjelasan Sebelum Persetujuan.....	129
Lampiran 5 Pernyataan Persetujuan Subjek	133
Lampiran 6 Surat Pernyataan Kesediaan Menjadi Subjek Penelitian.....	134
Lampiran 7 Nilai Absorban MMP-8 Standar Panjang Gelombang 450nm	135
Lampiran 8 Analisis Data Enzim MMP-8 dengan BioRAD X mark tm	136
Lampiran 9 Gambar Kurva Standar MMP-8 Panjang Gelombang 450 nm	138
Lampiran 10 Nilai Absorban ALP Standar Panjang Gelombang 450nm.....	139
Lampiran 11 Analisis Data Enzim ALP dengan BioRAD X mark tm	140
Lampiran 12 Gambar Kurva Standar ALP pada Panjang Gelombang 450 nm.....	142
Lampiran 13 Nilai Absorban NE Standar Panjang Gelombang 450nm.....	143
Lampiran 14 Analisis Data Enzim NE dengan BioRAD X mark tm	144
Lampiran 15 Gambar Kurva Standar NE pada Panjang Gelombang 450 nm	146
Lampiran 16 Data Dasar Penelitian.....	147
Lampiran 17 Rata-rata Umur Subjek Berdasarkan Jenis Kelamin.....	148
Lampiran 18 Uji Normalitas Kolmogorov-Smirnov pada Enzim <i>Matrix</i> <i>Metalloproteinase-8</i> (ng/dl), <i>Alkaline Phosphatase</i> (ng/dl), dan <i>Neutrophyl Elastase</i> (ng/dl)	149

Lampiran 19	Uji One-Way ANOVA pada Enzim <i>Matrix Metalloproteinase-8</i> (ng/dl), <i>Alkaline Phosphatase</i> (ng/dl), dan <i>Neutrophyl Elastase</i> (ng/dl) berdasarkan PDI	150
Lampiran 20	Hasil Uji Post-Hoc Bonferroni pada Enzim <i>Matrix Metalloproteinase-8</i> (ng/dl), <i>Alkaline Phosphatase</i> (ng/dl), dan <i>Neutrophyl Elastase</i> (ng/dl) berdasarkan PDI	151
Lampiran 21	Hasil Uji Homogenitas pada Enzim <i>Matrix Metalloproteinase-8</i> (ng/dl), <i>Alkaline Phosphatase</i> (ng/dl), dan <i>Neutrophyl Elastase</i> (ng/dl) berdasarkan PDI	152
Lampiran 22	Hasil Uji MANOVA pada Enzim <i>Matrix Metalloproteinase-8</i> (ng/dl), <i>Alkaline Phosphatase</i> (ng/dl), dan <i>Neutrophyl Elastase</i> (ng/dl) berdasarkan PDI	153
Lampiran 23	Pengambilan GCF	154
Lampiran 24	Sampel Sehat	154
Lampiran 25	Sampel Gingivitis Ringan	155
Lampiran 26	Sampel Periodontitis Ringan.....	155
Lampiran 27	Vortex-Heidolph 0-2500 rpm.....	156
Lampiran 28	Shaker-Heidolph Unimax 0-10 rpm.....	156
Lampiran 29	Biorad X mark tm microplate spectrophotometer.....	157
Lampiran 30	Human Total MMP-8 Immunoassay, Catalog Number DMP800, R+D System, Inc. Minneapolis, MN USA.....	158
Lampiran 31	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Catalog Number SEB472 HU, Kit for Alkaline Phosphatase (ALP).....	158
Lampiran 32	Human PMN-Elastase Platinum ELISA, Catalog Number BMS:269, Bender Med System ^mHb, Campus Vienna Brocenter, 1030 Vienna Austria.....	159

Lampiran 33 GCF yang Dikumpulkan dari Sampel Sehat, Sampel Gingivitis
Ringan dan Sampel Periodontitis Ringan 159



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit periodontal merupakan masalah dalam kesehatan gigi, karena penyakit ini menempati urutan kedua teratas, pada kelainan rongga mulut. Gingivitis dalam keadaan ringan tidak menimbulkan rasa sakit sehingga kurang mendapat perhatian, tetapi bila dibiarkan gingivitis dapat menjadi periodontitis yang berbentuk destruktif terhadap jaringan periodontal dimana hilangnya struktur jaringan periodontal dan *loss dental* dari lengkung rahang yang akhirnya menimbulkan kelainan wajah dan gangguan pencernaan. Pada kondisi periodontitis tingginya jumlah bakteri anaerob di dalam jaringan pendukung periodontal merupakan lokal infeksi pada jaringan tubuh dan organ lainnya yang akan menginfeksi secara sistemik melalui pembuluh darah dan dapat mengakibatkan kematian (Perinetti *et al.*, 2008; Syafri, 2008).

Menurut *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) pada tahun 2009 - 2010, setiap dua orang Amerika dewasa yang berumur 30 tahun menderita penyakit periodontal. Sekitar 42% atau 64,7 juta orang dewasa Amerika memiliki *mild* Periodontitis dan *moderate* periodontitis. Pada orang dewasa yang berumur 65 atau lebih tua prevalensi meningkat menjadi 70,1 %. Berdasarkan jenis kelamin, secara umum persentase gingivitis pada laki-laki (54,47%) sedikit lebih tinggi dibandingkan perempuan (45,53%). Ini berhubungan dengan keadaan *oral hygiene* (OH), dimana perempuan lebih memiliki OH yang baik dibandingkan dengan laki-laki seperti yang sudah diteliti pada 100 sampel di kota Yogyakarta pada tahun 2008. Keadaan OH inilah yang merupakan faktor lokal yang

mempengaruhi keparahan gingivitis. Kondisi gingivitis yang tidak segera diatasi akan terus berpengaruh terhadap jaringan periodontal yang mengakibatkan hilangnya struktur jaringan periodontal dan *loss dental* dari lengkung rahang (Syafri,2008). Gingivitis mengenai lebih dari 80% anak umur muda, sedangkan hampir semua populasi dewasa sudah pernah mengalami gingivitis, periodontitis atau keduanya . Berdasarkan data Survey Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) 2011 prevalensi penyakit Periodontal mencapai 60% pada masyarakat Indonesia, dan data dari DKK Padang tahun 2011,prevalensi penyakit periodontal 3,9% yaitu sebanyak 9.721 penderita penyakit periodontal. Bila sudah terjadi peridontitis akan lebih sulit perawatan. Oleh karena itu, dokter gigi seharusnya berhati-hati dalam mendeteksi tahap awal dari gingivitis dan segera menerapkan perawatan yang efektif sekaligus memonitor dan memberi terapi sebagai bagian dari *recall protocol* (Fiorellini *et al.*, 2006).

Pada saat ini diagnosa penyakit periodontal dilakukan berdasarkan indeks periodontal dengan pengukuran klinis tradisional yaitu *probing* kedalaman poket, perdarahan saat *probing*, kehilangan perlekatan klinis, indeks plak, radiografi. Indeks yang digunakan ini sering kali kegunaannya terbatas. Menurut *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), lebih dari 50% sering terdapat salah pengertian dalam menentukan keparahan penyakit periodontal sehingga mengakibatkan kerancuan dalam menegakkan diagnosa dan memilih treatment (Fernando *et al.*,2009). *Scalling* dan *root planing* sebagai *initial therapy* tidak menuntaskan penyakit Periodontal (Kardum 2001;Pejcic, 2007). Pada saat ini belum ada *Gold Standard* untuk kriteria diagnosis klinik penyakit periodontal (Manau, 2008) sehingga diperlukan pengembangan tes diagnostik baru yang dapat

mendeteksi keberadaan penyakit yang aktif, memprediksi perkembangan penyakit masa depan dan mengevaluasi respon terhadap terapi periodontal. Dengan demikian akan dapat meningkatkan manajemen klinis pasien yang menderita penyakit periodontal.

Oleh karena itu diperlukan satu metode yang dapat mengidentifikasi kelainan periodontal dengan langkah-langkah obyektif seperti pemeriksaan peranan enzimatik sebagai respon host terhadap interaksi bakteri penyebab penyakit Periodontal. Kandungan enzimatik di dalam saliva pada penderita penyakit periodontal telah diteliti sebelumnya. Terdapat korelasi antara kadar MMP-8 dan TIMP-2 pada saliva dan plasma darah (Meschiari *et al.*,2013). Aktivitas *Alkaline Phosphatase* berkorelasi dengan bertambahnya dalam poket dan kehilangan tulang alveolar pada penyakit periodontal dan dinyatakan bahwa kadar ALP di dalam saliva 3 kali lebih tinggi dibanding di dalam serum darah (Ishikawa, 1970; Usal *et al.*,2008; Malhotra *et al.*,2010). Menurut Nakashima (1994) dan Ranjan *et al* (2010) menyatakan bahwa kadar ALP dalam saliva 3 kali lebih banyak daripada ALP yang terdapat di dalam serum. Hal ini menyatakan bahwa ALP sangat aktif di jaringan periodontal. Enzim Neutrophyl Elastase telah diteliti oleh Radjokovic (2010) dan dinyatakan hanya sedikit lebih rendah kadar NE di kelenjar saliva 3 pmol dibanding plasma darah yang nilainya 4 pmol. Belum diterapkannya pemeriksaan secara obyektif dalam menegakkan diagnosa dan mengukur skala keberhasilan perawatan penyakit Periodontal menyebabkan prevalensi penyakit ini masih tinggi.

Penyakit periodontal terjadi karena interaksi antigen bakteri dengan *host-jaringan* sehingga mengaktivasi neutrofil, produksi antibodi, dan resorpsi tulang

(Nagase, 2002). Fungsi neutrofil untuk mengontrol serangan bakteri secara fagositosis dan juga mengeluarkan *Matrix Metalloprotease* (MMP-8) yang bisa berkontribusi untuk kerusakan jaringan (Tester, 2007). *Alkaline Phosphatase* berkontribusi dalam identifikasi tempat infeksi bakteri dan pembaharuan tulang (Ranjan *et al.*, 2010). Neutrophyl Elastase bekerja dengan menghancurkan elastin, pada jaringan pendukung elastin berguna untuk memberikan kemampuan jaringan untuk meregang dan mendukung kesehatan sel (Uitto, 2003).

Perubahan enzimatik karena peningkatan inflamasi pada penyakit periodontal ini dapat diukur untuk menegakkan diagnosa sesuai dengan tingkat keparahan penyakit Periodontal yang memiliki skala ukur yang diharapkan dapat menjadi penanda pada penyakit Periodontal. Pengukuran enzim ini dapat menunjukkan ada atau tidak adanya patogen periodontal, inflamasi gingiva dan periodontal, *host*-imun inflamasi respon terhadap spesies patogen tertentu, dan kerusakan jaringan periodontal. Media biologis yang dipilih yaitu air liur, serum, plak sub gingiva, biopsi jaringan, dan cairan sulkus gingiva (GCF).

Diagnosis dini dan pengobatan penyakit periodontal adalah penting karena sifat awal penyakit ini adalah *reversible* tetapi jika tidak mendapat terapi yang tepat dan akurat maka penyakit periodontal akan bersifat *irreversible*. Prosedur diagnostik ini dapat memberikan informasi yang tepat mengenai tipe penyakit periodontal, lokasi yang terinflamasi dan tingkat keparahannya. Temuan ini berfungsi sebagai dasar untuk perencanaan pengobatan dan menyediakan data penting selama rencana perawatan periodontal dan pemantauan fase perkembangan penyakit.

Berdasarkan masalah diatas secara klinis maka pada penelitian ini akan diteliti : *Matrix Metalloprotease 8* (MMP-8), *Alkaline Phospatase* (ALP), *Neutrofil Elastase* (NE) dalam menegakkan diagnosa yang akurat, tepat terhadap penyakit gingivitis, periodontitis dengan spesimen *Gingival Crevicular Fluid* (GCF) sehingga diperoleh diagnostik yang tepat untuk menentukan perawatan dan pengobatan akurat yang memiliki skala ukur.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah diatas, maka dapat dirumuskan masalahnya sebagai berikut ;

1. Apakah ada perbedaan kadar *Matrix Metalloproteinase-8* dalam *Gingival Crevicular Fluid* pada penyakit periodontal?
2. Apakah ada perbedaan kadar *Alkaline phospatase* dalam *Gingival Crevicular Fluid* pada penyakit periodontal?
3. Apakah ada perbedaan kadar *Neutrofil Elastase* dalam *Gingival Crevicular Fluid* pada penyakit periodontal?
4. Diantara ketiga enzim tersebut manakah yang paling kuat hubungannya dengan penyakit periodontal?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Menganalisis hubungan kadar *Matrix Metalloproteinase-8*, *Alkaline Phospatase*, *Neutrofil Elastase* dalam *Gingival Crevicular Fluid* dengan penyakit periodontal.

1.3.2 Tujuan Khusus

- 1) Membuktikan perbedaan kadar *Matrix Metalloproteinase-8* dalam *Gingival Crevicular Fluid* pada penyakit periodontal.
- 2) Membuktikan perbedaan kadar *Alkaline phosphatase* dalam *Gingival Crevicular Fluid* pada penyakit periodontal.
- 3) Membuktikan perbedaan kadar *Neutrofil Elastase* dalam *Gingival Crevicular Fluid* pada penyakit periodontal.
- 4) Mengetahui enzim yang paling kuat hubungannya diantara ketiga enzim dalam *Gingival Crevicular Fluid* dengan penyakit periodontal.

1.4 Manfaat Penelitian

Dengan didapatnya enzim yang kuat hubungannya dalam *Gingival Crevicular Fluid* dengan penyakit periodontal. , maka penelitian ini dapat memberi kontribusi pada :

1.4.1 Pengembangan Ilmu

1. Meningkatkan pengertian pentingnya enzim yang paling kuat hubungannya sebagai enzim yang paling berperan dalam mendeteksi dini perjalanan penyakit periodontal.
2. Meningkatkan pemilihan dalam menentukan *treatment* yang tepat pada penyakit periodontal yang mempunyai skala ukur.

1.4.2 Terapan

Mendapatkan enzim yang paling kuat hubungannya dalam *Gingival Crevicular Fluid* dengan penyakit periodontal, maka dalam praktek sehari-hari, para praktisi dapat melakukan upaya pencegahan terjadinya

gangguan dengan penanganan yang tepat, sehingga penderita penyakit periodontal tidak berkelanjutan menimbulkan komplikasi.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Gingiva

Gingiva adalah bagian mukosa rongga mulut yang mengelilingi gigi dan menutupi linggir (*ridge alveolar*), yang merupakan bagian dari aparatus pendukung gigi, *periodontium*, dan membentuk hubungan dengan gigi. Gingiva dapat beradaptasi terhadap perubahan lingkungan dan rongga mulut yang merupakan bagian pertama dari saluran pencernaan dan daerah awal masuknya makanan dalam sistem pencernaan. Jaringan rongga mulut terpapar terhadap sejumlah besar stimulus, temperatur dan konsistensi makanan dan minuman, komposisi kimiawi, asam dan basa sangat bervariasi. Gingiva yang sehat berwarna merah muda, tepinya seperti pisau sama dengan kontur gigi geligi (Manson dan Eley, 1993; Highfield 2009; Solanki 2012).

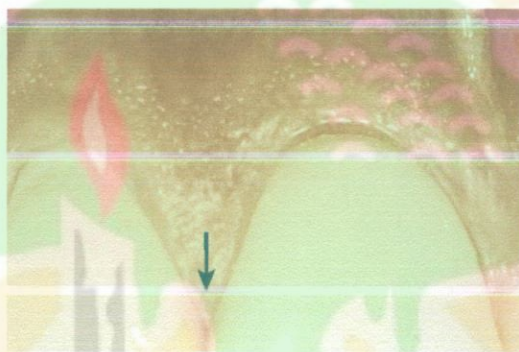
2.1.1 Anatomi Mikroskopik Jaringan Lunak Pendukung Gigi

Menurut Itjiningsih Wangijaya Hashanur (1991), Solanki (2012) secara klinis dan mikroskopis gingiva dapat dibagi menjadi :

1. *Marginal gingiva / unattached gingiva* yaitu bagian dari *free gingiva* (bagian dari gingiva yang mengelilingi gigi dan tidak melekat pada gigi) yang terletak di labial / bukal dan lingual / palatinal gigi, lebarnya kurang dari satu milimeter.
2. *Attached gingiva*, yaitu : bagian dari gingiva yang melekat erat dengan jaringan sementum dan tulang *alveolar*. *Gingiva attachment* terletak mulai lekukan yang disebut *free gingiva groove* (batas antara *marginal gingiva* dan *gingiva attachment*) sampai pada mukosa *alveolar*. Lebarnya

berkisar antara satu sampai sembilan millimeter dan tergantung pada letak gigi individu. *Gingival attachment* yang melekat pada *cement* disebut *gingival cemental*, sedangkan *gingival attachment* yang melekat pada *processus alveolaris* disebut *gingival alveolar*.

3. *Interdental papilla*, yaitu bagian dari gingiva yang mengisi ruang interdental sampai di bawah titik kontak gigi, terdiri dari *unattached* dan *attached* gingival, bila ada diastema, *interdental papilla* melekat erat dengan *processus alveolaris* disebut *gingival alveolar*.



Gambar 2.1 *Interdental Papilla* (Fiorellini *et al.*,2011)

Menurut J.D. Manson dan B.M. Eley (1993), Corbet (2012) dikatakan bahwa *regio interdental* berperan sangat penting karena merupakan daerah stagnasi bakteri yang paling resisten dan strukturnya menyebabkan daerah ini sangat peka, di daerah ini biasanya timbul lesi awal gingivitis.

2.1.1.1 Serabut gingiva.

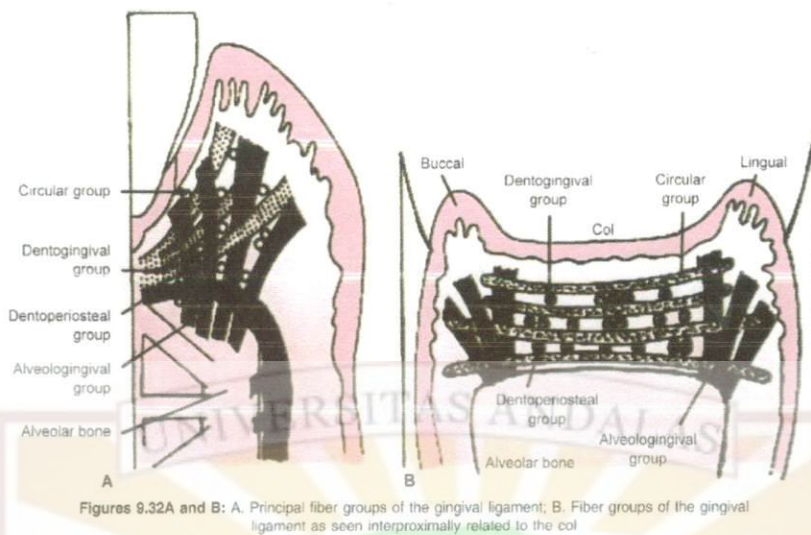
Jaringan ikat gingiva terdiri dari rangkaian bundel serat kolagen yang mengandung pembuluh darah dan saraf, fibroblas, makrofag, sel mast, limfosit sel plasma dan sel-sel pertahanan lainnya (Elley *et al.*,2010). Jaringan ikat merupakan komponen utama pada gingiva terdiri dari serat kolagen 60%, fibroblas 5%, pembuluh darah, saraf dan matriks 35%

(Graber *et al.*, 2005). Serat kolagen dapat dibedakan menjadi beberapa kelompok :

- *Dentogingival fiber*
- *Circular fiber*
- *Dentoperiosteal fiber*
- *Transeptal fiber*

Kolagen disintesis oleh fibroblas dan disekresikan dalam bentuk inaktif yaitu prokolagen, kemudian diubah menjadi tropokolagen. Pada rongga ekstraselular, tropokolagen dipolimerisasi menjadi benang-benang kolagen yang kemudian beragregasi ke dalam bundel kolagen dengan membentuk ikatan silang (Elley *et al.*, 2010).

1. Serabut gingival atau serabut gingival bebas yang melekat pada sementum dan melebar ke luar ke gingivadan ke atas tepi gingiva untuk bergabung dengan tepi gingiva untuk bergabung dengan periosteum dari daerah perlekatan gingiva.
2. *Alveolar gingival* atau serabut puncak tulang *alveolar* yang keluar dari puncak tulang *alveolar* dan berjalan ke coronal ke arah gingival.
3. Serabut sirkular yang mengelilingi gigi.
4. Serabut *transeptal* yang berjalan dari satu gigi ke gigi lainnya di *coronal* ke *septum alveolar*.



Gambar 2.2 Serabut Periodontal (Itoiz *et al.*, 2008)

2.1.1.2 Sulcus Gingiva

Menurut Carranza *et al* (2006), *sulcus* gingiva terdapat di daerah gingiva bebas dan berperan penting dalam penyakit *periodontal*, berbentuk huruf V dan dalam keadaan normal atau sehat dalamnya berkisar antara nol sampai dua millimeter. Adapun batas-batasnya adalah sebagai berikut :

1. Bagian lateral oleh *epithelium lining* dari gingival *margin*
2. Bagian media oleh jaringan gigi
3. Bagian dasarnya terdapat *epithelial attachment*.

2.1.1.3 Epithelial Attachment

Menurut Itjiningsih (1991) dan Kidd (2005), *epithelial attachment* adalah bagian *epithel* dari gingival *margin* yang mengadakan perlekatan dengan jaringan gigi, terdiri dari beberapa lapis *epithel*, pada orang muda lapisan ini sebanyak tiga sampai empat lapis dan pada orang tua lapisan ini makin bertambah. Panjangnya 0,25 – 0,6 mm. Tempat perlekatan *epithelial attachment* pada gigi, sangat erat hubungannya dengan pertumbuhan gigi, Pertumbuhan gigi yang berhubungan

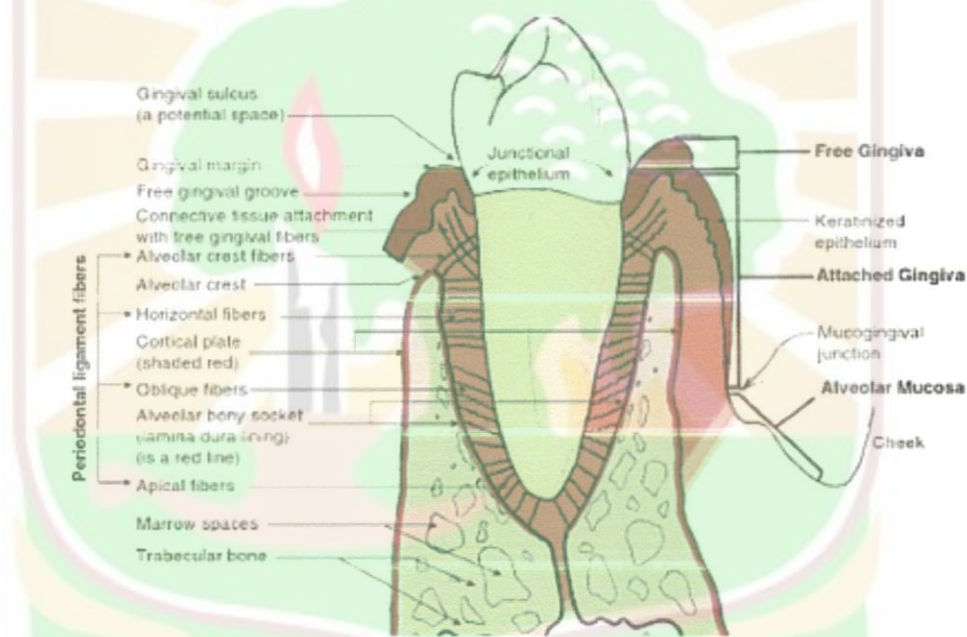
dengan dengan *epithelial attachment* berjalan terus menerus selamahidup.

Pertumbuhan ini dibagi atas :

1. Pertumbuhan yang aktif, yaitu pertumbuhan gigi ke jurusan oklusal
2. Pertumbuhan yang pasif, yaitu pergerakan dari *epithelial attachment* ke jurusan *apex* gigi.

Kedua pertumbuhan ini berjalan bersama-sama dan sampai mencapai antagonis pertumbuhannya berkurang.

2.1.2 Anatomi Mikroskopik Jaringan Keras Pendukung Gigi



Gambar 2.3 Struktur jaringan keras pendukung gigi. (Riekne *et al.*, 2012)

2.1.2.1 Ligament periodontal

Ligamen periodontal terdiri atas pembuluh darah yang kompleks dan serabut jaringan ikat (kolagen) yang mengelilingi akar gigi dan melekat ke prosesus alveolar (inner wall of the alveolar bone). Ligamen periodontal tidak hanya menghubungkan gigi ke tulang rahang tetapi juga menopang gigi pada soketnya dan menyerap beban yang mengenai gigi. Beban selama mastikasi,

menelan dan berbicara sangat besar variasinya, juga frekuensi, durasi, dan arahnya. Struktur ligamen biasanya menyerap beban tersebut secara efektif dan meneruskannya ke tulang pendukung.

Ketebalan ligamen periodontal bervariasi dari 0,3-01 mm. Yang terbesar pada mulut soket dan pada apeks gigi dan tersempit pada aksis rotasi gigi, yang terletak sedikit apikal dari pertengahan akar. Pada keadaan sehat gigi mempunyai rentang gerakan yang normal. Seperti bagian rangka lainnya, stres fungsional dibutuhkan untuk mempertahankan integritas ligamen periodontal. Bila stres fungsional besar, ligamen biasanya juga lebih tebal dan bila gigi tidak berfungsi ligamen akan menjadi tipis, setipis 0,06 mm. Dengan terjadinya proses ketuaan ligamen akan menjadi lebih tipis.

Ligamen terdiri dari serabut jaringan ikat yang tersusun dengan teratur pada matriks substansi dasar yang dilewati pembuluh darah dan saraf. Serabut-serabut tersebut dikelompokkan sesuai dengan orientasi dominannya, serabut puncak tulang alveolar, berjalan dari sementum pada leher gigi ke puncak tulang alveolar. Serabut horizontal, berjalan dari sementum ke puncak tulang alveolar. Serabut oblik, membentuk komponen utama dari ligamen dan berjalan dari tulang sedikit ke apikal untuk berinsisio pada sementum sehingga dapat menahan gigi dalam soketnya. Dan yang terakhir adalah, serabut apikal, yang memancar dari apeks ke dasar soket. Disini juga dapat diikutsertakan serabut interradiokular yang terletak di daerah furkasi gigi berakar jamak dan seperti serabut transeptal, berjalan dari akar ke koronal akar menuju puncak tulang alveolar.

2.1.2.2 Sementum

Sementum adalah jaringan kalsifikasi tanpa vaskuler disekeliling akar gigi. terdapat 2 tipe cementum yang tersusun dalam lamellae yg dipisahkan oleh garis paralel inkremental sepanjang axis akar, yaitu tipe acellular / primary, tipe cellular / secondary. Acellular sementum yang pertama kali terbentuk pada sepertiga servikal atau setengah akar dan tidak mengandung sel, sementum ini terbentuk sebelum gigi mencapai oklusal plane dengan ketebalan sekitar 30 -230 μm . Sedangkan cellular sementum terbentuk setelah gigi mencapai oklusal plane, irreguler dan mengandung sel (cementocytes), sementum ini lebih sedikit terkalsifikasi dibandingkan acellular sementum.

Sementum selular biasanya ditumpuk pada sementum aselular pada sepertiga apical akar dan bergantian dengan lapisan sementum aselular. Sementum selular ditumpuk pada kecepatan yang lebih besar dari sementum aselular dan dengan demikian menjebak sementoblas di dalam matriks. Sel-sel yang terjebak ini disebut sementosit. Sementosit terletak pada kripa sementum dan dikenal sebagai lacuna. Dari lacuna, kanal-kanal, disebut kanalikuli, yang berisi perpanjangan protoplasmic sementosit dan berfungsi sebagai jalan mengangkut nutrisi ke sementosit, menjalin dengan kanalikuli lain dari lakuna lain untuk membentuk suatu sistem yang dapat dipersamakan dengan sistem Havers (haversian sistem) tulang. Karena sementum adalah avascular, nutrisinya berasal dari ligament periodontal. Karena lapisan incremental sementum ditumpuk, ligamen periodontal dapat berpindah tempat lebih jauh, dan akibatnya beberapa sementosit mungkin mati dan meninggalkan lakuna kosong (Grossman, 1995) .

Ketebalan sementum menggambarkan salah satu fungsinya. Tebal sementum sekitar 20 sampai 50 μm pada hubungan sementum-email dan tebal sementum adalah sekitar akar. Sementum yang lebih tebal pada apeks disebabkan karena penumpukannya yang terus menerus selama kehidupan eruptif gigi untuk mempertahankan tingginya pada bidang oklusal. Penumpukan sementum yang terus-menerus juga memberi bentuk pada foramen apical dewasa. Foramen bila menjadi dewasa, menjadi konis, dengan aspek kerucut, disebut diameter minor (konstriktur), menghadap pulp dan dasar, disebut diameter mayor, menghadap ligament periodontal. Penumpukan sementum yang terus menerus menaikkan diameter mayor dan menghasilkan suatu deviasi rata-rata foramen apical sebesar 0,2 sampai 0,5 mm dari pusat apeks akar. Diameter minor menentukan penghentian apical instrumentasi dan obturasi saluran akar dan rata-rata adalah 0,5 mm dari permukaan semental pada gigi-gigi kecil dan 0,75 mm dari permukaan pada gigi-gigi dewasa. Meskipun hubungan sementum-sementum bertepatan dengan diameter minor, sementum dapat tumbuh tidak rata dan dapat mengubah hubungan ini (Grossman, 1995; Park *et al.*, 2010) .

Memperbaiki adalah fungsi lain sementum. Fraktur akar dan resorpsi biasanya diperbaiki oleh sementum. Penutupan akar yang belum dewasa pada prosedur apeksifikasi disempurnakan oleh deposisi sementum atau jaringan yang menyerupai sementum. Sementum juga memiliki fungsi protektif. Lebih resisten terhadap resorpsi dari tulang. Hal ini diperkirakan karena avaskularitasnya. Akibatnya, gerakan ortodontik akar biasanya dapat dilakukan dengan kerusakan resorptif minimum. Fungsi-fungsi lain adalah deposisi

sementum yang terus menerus dan penyumbatan foramina aksesori dan apical setelah perawatan saluran akar (Grossman, 1995; Park *et al.*, 2010).

2.1.2.3 Tulang Alveolar

Tulang alveolar adalah bagian dari maxilla dan mandibula, membentuk socket gigi. tulang alveolar terdiri atas, External plate dari Cortical bone, dinding tipis bagian dalam dari socket merupakan tulang yg kompak yg disebut alveolar bone proper, cancellous trabeculae diantara 2 lapisan kompak. Interdental septum terdiri dari tulang cancellous supporting. Komposisi tulang alveolar terdiri dari, Cells of Alveolar Bone adalah osteoblas, osteoklas dan osteosit. Extra-cellular Matrix, terdiri atas 2/3 bahan anorganik (calcium and phosphate) dan 1/3 bahan organik (collagen type I, with small amounts of non collagenous proteins) Osteoblas membentuk matrix organik yg mengandung kolagen disebut Osteoid (prebone), yang kemudian terkalsifikasi membentuk tulang (bone).

Osteoblas yg terjebak dlm matrix tulang menjadi Osteosit, berlokasi dalam lakuna (ruang dalam tulang) yang berkoneksi melalui celah kecil disebut canaliculi. Resorpsi tulang terkait dengan sel bernama Osteoklas, yang merupakan sel berinti banyak dan ditemukan pada permukaan tulang yang cekung (Howship's lacunae). Di dalam tulang alveolar, lakuna terdapat pada periosteal (outer), endosteal (marrow) maupun permukaan ligamen periodontal pada tulang.

Seperti tulang lainnya, tulang alveolar juga mengalami remodelling sebagai respons terhadap stress mekanis dan kebutuhan metabolisme terhadap fosfor dan kalsium. Pada keadaan sehat, remodelling prosessus berfungsi mempertahankan volume keseluruhan dari tulang dan anatomi keseluruhan relatif stabil.

2.2 Klasifikasi Penyakit Periodontal

Gingivitis adalah peradangan gusi yang terjadi pada gingiva. Pada tahap yang lebih lanjut gambaran gingivitis secara klinis ditandai dengan gingiva yang bertambah merah warnanya, edema, pendarahan, berubah konturnya, kehilangan adaptasinya terhadap gigi.

Klasifikasi Penyakit Periodontal berdasarkan the *International Workshop for Classification of Periodontal Diseases*, 1999 adalah :

1. Penyakit Gingiva (*Gingival Disease*)
2. Periodontitis Kronis
3. Periodontitis Agresif
4. Periodontitis Sebagai Manifestasi dari Penyakit Sistemik
5. Penyakit Periodontal Nekrotik
6. Abses Periodonsium
7. Periodontitis berkaitan dengan lesi endodontik
8. Penyakit Periodontal karena kondisi dan kelainan bentuk

2.2.1 Faktor-Faktor Penyebab Penyakit Periodontal

Potensi patogenik bakteri plak bervariasi antar individu dan antar sisi pada rongga mulut. Plak dalam jumlah sedikit dapat ditolerir individu sehat tanpa menimbulkan penyakit periodontal karena adanya mekanisme pertahanan *host*. Keadaan sehat akan beralih menjadi keadaan sakit apabila jumlah bakteri plak meningkat secara signifikan, dan faktor virulensinya melampaui daya ambang individu dan kemampuan pertahanan *host* menurun.

Pada gingivitis dan periodontitis respon imunitas tersebut mempunyai fungsi protektif maupun destruktif.

Didalam rongga mulut ada jutaan bakteri yang dibutuhkan (flora normal), bakteri khas yang terdapat pada jaringan periodontal adalah bakteri gram negatif yang anaerob. Dapat diperkirakan didalam gusi terdapat kantong yang makin kedasar makin tidak ada oksigennya, sehingga bakteri anaerob makin tumbuh subur. (Ahmad Syaify, 2008).

Kelainan yang terjadi dalam rongga mulut disebabkan oleh ketidakseimbangan faktor-faktor yaitu : *host, agent, environment, psikoneuroimunologi*. Gingivitis sering dijumpai karena akumulasi plak *supragingival* dan tepi gingiva, terdapat hubungan bermakna skor plak dan skor gingivitis (Musaikan, 2003; Situmorang, 2010).

Lapisan plak pada gingiva menyebabkan gingivitis atau radang gingiva, umur plak menentukan macam kuman dalam plak, sedangkan macam kuman dalam plak menentukan penyakit yang ditimbulkan oleh plak. Plak tua adalah plak yang umurnya tujuh hari mengandung kuman *coccus, filament, spiril* dan *spirochaeta*. Plak tua ini menyebabkan gingivitis (Be, 1987; Lang, 2009).

Plak gigi terbukti dapat memicu dan memperparah inflamasi gingiva. Secara histologis, beberapa tahapan gingivitis menjadi karakteristik sebelum lesi berkembang menjadi periodontitis (Gjeramo *et al.*, 2009).

2.2.2 Mekanisme Keterlibatan Bakteri Patogenik Dalam Penyakit Periodontal

Penyebab utama inflamasi penyakit periodontal adalah bakteri, tetapi tidak merupakan patogen tunggal (Lang *et al.*, 1973; Guttmiller *et al.*, 2002). Enzim MMP-8 yang dihasilkan oleh *host* dan bakteri dapat merusak jaringan periodontal.

Struktur protein utama dari jaringan ikat gingiva dan ligamen periodontal adalah kolagen dan proteoglikan (Wahyukundari, 2009).

Tabel 2.1 Mikrobiologi Penyakit Periodontal

Periodontal Sehat	Gingivitis	Periodontitis Kronis	Aggressive Periodontitis
Gram Positive :	Gram positive :	Gram Positive :	Actinobacillus actinomycetemcomitans
Streptococcus orails	Lactobacillus species	Eubacterium brachy	
Streptococcus sanguis	Actinomyces naeslundii	Eubacterium nodatum	Prophyromonas gingivalis
Streptococcus mitis	Peptostreptococcus micros	Mogibacterium timidum	Tannerella forsythia
Actinomyces gerencseriae	Streptococcus onginosus	Parvimonas micra	Prevotella intermedia
Actinomyces naeslundii		Peptostreptococcus stomatis	Prevotella nigrescens
		Parvimonas micra	Eikenella corrodens
Gram Negatif :	Gram Negatif :	Gram Negatif :	Selenomonas sputigena
Fusobacterium species	Fusobacterium nucleatum	Tannerella forsythia	
Prevotella nigrescens	Prevotella intermedia	Fusobacterium nucleatum	Fusobacterium nucleatum
Veillonella species	Winonalla parvula	Prophyromonas gingivalis	Campylobacter rectus
	Campylobacter species	Prevotella intermedia	Peptostreptococcus micros
	Haemophilus species	Prevotella loeschii	Campylobacter concisus
	Treponema species	Dialister pneumosintes	
		Campylobacter rectus	
		Treponema spp.	

Microbiologi Penyakit Periodontal (Saroch, 2013)

Tanda awal dan persisten dari penyakit periodontal adalah kerusakan jaringan ikat yang terbentuk dari protein ini yang diserang oleh protease yang berasal dari bakteri atau hospes (Page *et al.*, 1976; Kumagai, 2005). Bakteri yang berhubungan dengan penyakit periodontal dapat memproduksi berbagai enzim proteolitik yang ikut berperan pada kerusakan jaringan, yaitu; kolagenase dari spesies *Bacteroides*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* dan *Spirochaeta* (Robertson *et al.*, 1982; Kumar, 2005).

Pada penderita penyakit periodontal produk kolagenase pada leher gingiva dan poket periodontal yang terinflamasi akan berbeda dalam aktifitas dan kadarnya dibandingkan pada leher gingival dan poket periodontal yang sehat. Bakteri patogenik didalam mekanisme penyakit periodontal dapat berkembang melalui beberapa tahap yaitu:

- a. Invasi bakteri yang terdiri dari dua yaitu, *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* invasi melewati sel sel epitel sampai ke jaringan ikat dibawahnya dan *Porphyromonas Gingivalis* invasi ke sel sel epitel.
- b. Memproduksi Eksotoksin
 - A. *Actinomycetemcomitans* dan *Campylobacter rectus* memproduksi leukotoksin yang dapat membunuh netrofil sehingga mengganggu mekanisme pertahanan antibakterial primer
- c. Peranan kandungannya (endotoksin, komponen permukaan, komponen kapsular, dan lainnya)

- Endotoksin atau LOS terdapat pada membran luar semua bakteri gram negatif, yang dilepas apabila sel mati dan desintegrasi; merupakan substansi toksik yang mengaktifkan respon *host*.

Gingivitis berawal dari daerah margin gusi yang dapat disebabkan oleh invasi bakteri atau rangsang endotoksin. Endotoksin dan enzim dilepaskan oleh bakteri gram negatif yang menghancurkan substansi interseluler epitel sehingga menimbulkan ulserasi epitel sulkus. Selanjutnya enzim dan toksin menembus jaringan pendukung di bawahnya. Peradangan pada jaringan pendukung sebagai akibat dari dilatasi dan pertambahan permeabilitas pembuluh darah, sehingga menyebabkan warna merah pada jaringan, edema, perdarahan, dan dapat disertai eksudat. Bentuk penyakit gusi yang umum terjadi adalah gingivitis kronis ditandai dengan pembengkakan gusi dan lepasnya epitel perlekatan. Gingivitis merupakan peradangan gusi yang paling sering terjadi dan merupakan respon inflamasi tanpa merusak jaringan pendukung (Carranza dan Newman, 1996; Jenkins dan Allan, 1999; Rossmann 2011).

Substansi toksik seperti asam lemak, asam butirat dan asam proprionat, indol, amonia dan glikan diproduksi bakteri subgingiva gram positif dan gram negatif.

- Produk samping metabolisme seperti H_2S , NH_3 , dan asam lemah diproduksi Pg toksik terhadap sel.

- Peptidoglikan (komponen dinding sel pada bakteri gram positif dan gram negatif) mengaktifkan komplemen, aktivitas immunosupresif, menstimulasi resorpsi tulang, dan menstimulasi makrofag menghasilkan *prostaglandin* dan kolagenase.
- *Actinomycetemcomitans* memproduksi faktor yang dapat menghambat respon imunitas terhadap dirinya atau bakteri lain

d. Memproduksi Enzim

- Kolagenase yang diproduksi *Porphyromonas Gingivalis* dan strain *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* menghancurkan kolagen.
- Protease dan fosfolipase A diproduksi *Porphyromonas Gingivalis* berperan dalam kerusakan terhadap jaringan superfisial periodonsium.
- *Hyaluronidase* yang diproduksi bakteri mampu mengubah permeabilitas gingiva dengan jalan membiarkan proliferasi epitel penyatu ke arah apikal sepanjang permukaan akar gigi.

e. Menghindar dari respon *host*

- Leukotoksin yg dihasilkan *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* dapat menghancurkan PMN.
- Spesies *Bacteroides*, *Capnocytophaga* dan *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* dapat menghambat kemotaksis dan melemahkan fagositosis PMN.
- Bakteri gram negatif dan spirokheta mampu mengubah fungsi limfosit dan memproduksi agen immunosupresif .

- *Porphyromonas Gingivalis*, *Prevotella Intermedia*, *Peptostreptococcus Micros*, dan spesies *Capnocytophaga* memproduksi enzim protease yang dapat mendegradasi IgA dan IgG
- *Porphyromonas Gingivalis* memproduksi fibrinolisin yang dapat mengurangi kemampuan fibrin memerangkap bakteri untuk difagositosis
- *Porphyromonas Gingivalis* dan *Treponema & Eubacterium* spp dapat menghambat produksi superoksida yang akan menurunkan kemampuan *host* membunuh bakteri

2.2.3 Patogenesis Penyakit Periodontal

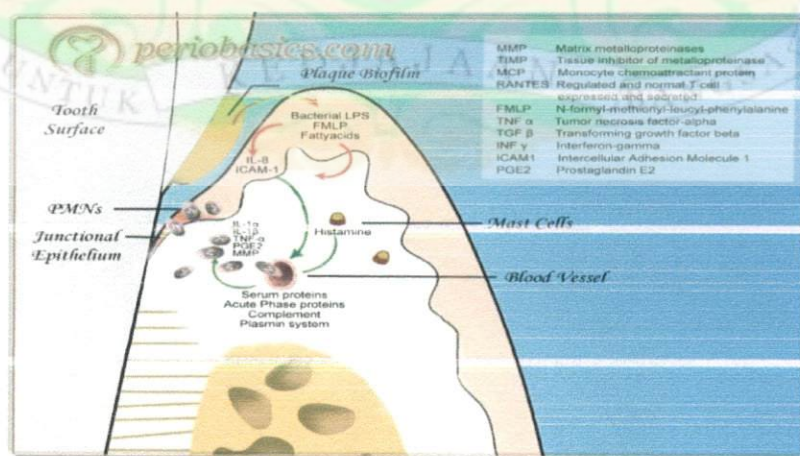
Penyakit periodontal yang salah satunya adalah gingivitis mempunyai beberapa etiologi penyakit periodontal. Konsep etiologi perlu dipahami karena konsep pencegahan dan perawatan penyakit gingiva adalah tergantung pada pemahaman terhadap kaitan antara faktor-faktor etiologi dengan patogenesis penyakit gingiva. Interaksi antara lokal dan sistemik pada penyakit gingiva, faktor sistemik merupakan faktor sekunder dengan jalan memperparah respon peridontium terhadap iritan lokal. Namun faktor sistemik dapat berperan primer dengan menyebabkan terjadinya hiperplasia gingiva, dalam hal ini justru faktor lokal berperan sekunder dengan memperparah hiperplasia apabila telah terjadi inflamasi.

Perubahan patologis pada gingivitis berhubungan dengan jumlah mikroorganisme yang terdapat di dalam sulkus gusi. Organisme tersebut, mempunyai kandungan interseluler seperti kolagen, substansi dasar, glikokaliks

(*cell coat*) dan memiliki kemampuan mensintesis produk berupa kolagenase, *hialuronidase*, *protease*, kondrotin sulfatase atau endotoksin yang dapat mengakibatkan kerusakan pada epethelial dan jaringan ikat. Selanjutnya terjadi perluasan ruang antara sel-sel *epithelial junction* yang terjadi selama gingivitis ringan, kondisi ini memungkinkan agen infeksi diperoleh dari bakteri untuk mendapat jalan masuk ke dalam jaringan ikat.

Pada penelitian sebelumnya, tidak dapat dibedakan secara tepat antara jaringan gusi normal dibandingkan dengan tahap *initial lesion* dari gingivitis. Pada biopsi awal dari gingiva normal terdapat kandungan sel-sel inflamasi yang predominan terdiri dari sel-sel T, dengan sangat sedikit sel B atau plasma sel. Sel-sel ini tidak merusak jaringan tetapi akan menjadi penting saat merespon bakteri atau substansi lain yang mengganggu jaringan gusi. Di awal terjadinya gangguan pada gusi, aliran kontan neutrofil bermigrasi dari pembuluh darah *flexus gingival* melewati *epithel junction*, ke *margin gingiva*, dan masuk ke dalam sulkus gingiva. Berdasarkan histopalogi perkembangannya Page dan Schroeder membedakan gingivitis pada beberapa tahap, yaitu;

2.2.3.1 Initial Lesion



Gambar 2.4 Initial Lesion (Saroeh, 2013)

Initial Lesion (tahap awal), merupakan tahap pertama terjadinya gingivitis yang ditandai dengan tertariknya netrofil secara kemotaksis oleh kandungan bakteri (LPS, FMLP, fatty acid) , adanya perubahan vaskuler berupa dilatasi pembuluh darah perifer disertai dengan naiknya aliran darah, perubahan sel-sel epitel, dan degradasi kolagen yang diakibat oleh produk bakteri.

Perubahan inflamasi tahap awal ini terjadi dalam respon terhadap aktivasi mikroba dari residen leukosit dan stimulasi dari sel *endothelial*. Secara klinis respon awal gingiva terhadap bakteri plak ini tidak akan terlihat. Plak yang terakumulasi secara terus menerus khususnya diregio interdental yang terlindung mengakibatkan inflamasi yang cenderung dimulai pada daerah papila interdental dan menyebar dari daerah ini ke sekitar leher gigi. Perubahan terlihat pertama kali di sekitar pembuluh darah gingiva yang kecil, disebelah apikal dari *epithelium junction*. Pembuluh ini mulai bocor dan kolagen perivaskular mulai menghilang, digantikan dengan beberapa sel inflamasi, sel plasma dan limfosit-terutama limfosit T-cairan jaringan dan protein serum. Disini terlihat peningkatan migrasi leukosit melalui epitelium fungsional dan eksudat dari cairan jaringan leher gingiva. Selain meningkatnya aliran eksudat cairan dan PMN, tidak terlihat adanya tanda-tanda klinis dari perubahan jaringan pada tahap penyakit ini.

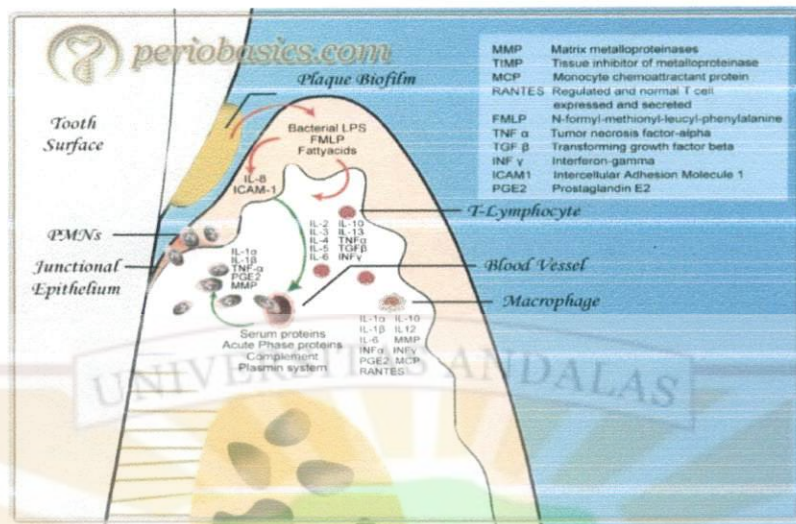
Secara mikroskopik, beberapa ciri khas inflamasi akut dapat dilihat pada jaringan ikat dibawah *epithelial junction*. Ciri morfologi perubahan pembuluh darah (berupa pelebaran kapiler dan venula) dan *adherence* dari neutrofil terhadap dinding pembuluh (magnasi) terjadi dalam satu minggu dan kadang-kadang lebih cepat dua hari setelah plak terakumulasi.

Terdapat akumulasi plak pada tahap awal terbentuknya lesi awal. Leukosit, *Polymorphonuclear Neutrophils* (PMN's) utama, meninggalkan pembuluh kapiler dengan bermigrasi melewati dinding (diapedesis, emigrasi), ke arah sulkus gingiva. PMN yang keluar ini membentuk *barrier* pada sulkus yang mengalami penurunan. PMN terlihat dalam jumlah banyak pada jaringan ikat, *epithelial junction* dan sulkus gusi. Eksudat dari cairan sulkus gingiva dan protein serum ekstrasvaskular terdapat disini. Sudah mulai tampak infiltrasi limfosit pada jaringan *subepithelial*. Maka akan terjadi peningkatan aliran cairan GCF di dalam sulkus gingiva.

Bakteri adalah penyebab utama dari penyakit periodontal, namun pada tahap ini hanya menyerang jaringan dalam batas normal dan hanya berpenetrasi superfisial, yang tidak diiringi dengan manifestasi yang jelas dari kerusakan jaringan melalui pemeriksaan elektrik mikroskop atau kadar ultra struktural, mereka tidak membentuk sebuah rembesan (*infiltrate*) dan kehadirannya tidak dipertimbangkan dalam perubahan patologi.

Karakter dan intensitas dari respon *host* akan menentukan lesi inisial dapat secara cepat merestorasi jaringan kembali ke kondisi normal atau sebaliknya perlahan-lahan akan berkembang menjadi lesi inflamasi kronik, dimana terjadinya infiltrasi makrofag dan sel limfosit yang akan muncul dalam beberapa hari (2-7 hari).

2.2.3.2 Early lesion



Gambar 2.5 Early Lesion (Saroch, 2013)

Early lesion (tahap dini), berkembang dari *Initial Lesion* dalam 1 minggu setelah permulaan akumulasi plak. Tahap kedua gingivitis yang ditandai dengan adanya eritema, terutama proliferasi kapiler, dan peningkatan pembentukan *loop* kapiler diantara *rete peg* atau *ridge*. Bila dilakukan *probing* terjadi perdarahan. Aliran GCF dan jumlah dari leukosit yang bertransmigrasi akan mencapai jumlah maksimum antara 6 sampai 12 hari setelah *Initial Lesion* gingiva.

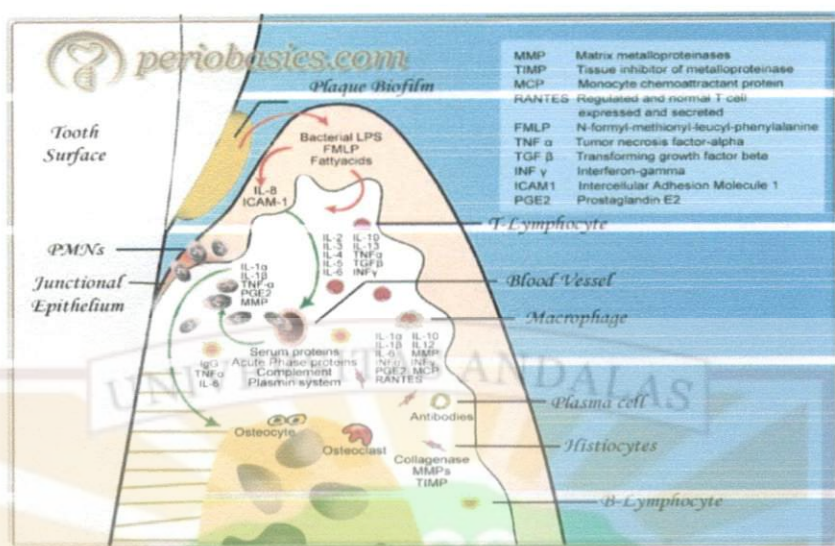
Pada pemeriksaan klinis dilakukan *probing*, bila terjadi pendarahan maka telah terjadi kerusakan serabut kolagen mencapai 70% yang dihancurkan disekitar infiltrasi seluler. Kelompok serat utama mengakibatkan kolagen terlihat berbentuk sirkular dan kumpulan-kumpulan serat dento gingiva. Perubahan pada ciri-ciri morfologi pada pembuluh darah juga dapat dilihat.

Produk-produk mikrobial mengaktifkan monosit dan membentuk substansi vasoaktif seperti IL-1α, IL-1β, TNF-α, PGE₂, MMP. *Early lesion* (tahap dini), ditandai dengan adanya infiltrat sel limfoid yang didominasi limfosit-T disertai kehilangan kolagen yang semakin banyak. Bila deposit plak masih tetap ada dalam

4 hari, perubahan inflamasi tahap awal akan berlanjut disertai dengan meningkatnya aliran cairan gingiva dan migrasi PMN. *Poly Morphonuclear Neutrofil* (PMN) yang telah meninggalkan pembuluh darah karena respon stimulus kemotaksis dari komponen plak yang berjalan ke epitelium menyeberangi lamina basalis dan ditemukan pada *epithelium* dan muncul di daerah poket. Perubahan yang terjadi baik pada *epithelium junction* maupun pada *epithelium* krevikular merupakan tanda dari pemisahan sel dan beberapa proliferasi dari sel basal. PMN's menarik bakteri dan terjadi fagositosis, selanjutnya akan dicerna oleh lisosom. Fibroblas menunjukkan perubahan sitotoksik dengan penurunan kapasitas produksi kolagen. Fibroblas mulai berdegenerasi dan bundel kolagen dari kelompok serabut dentogingiva pecah sehingga *seal* dari *cuff marginal* gingiva menjadi lemah.

Pada tahap inflamasi ini, makrofag memproduksi IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , INF- γ , PGE₂ selanjutnya produk tersebut menghasilkan kemotaksin seperti MCP dan RANTES (saat teraktivasi, mengatur ekspresi dan sekresi sel T). Kemudian infiltrasi leukosit pada jaringan ikat dibawah *epithelial junction* yang terdiri dari limfosit utama yaitu 75% sel T mayor, tetapi juga membuat beberapa migrasi neutrofil seperti makrofag, sel plasma, dan mast sel. Pada tahap ini tanda-tanda klinis dari inflamasi makin jelas terlihat. Papila interdental menjadi lebih merah dan bengkak serta mudah berdarah pada saat penyondean.

2.2.3.3 Established Lesion (Tahap Mantap)



Gambar 2.6 Established Lesion (Saroch, 2013)

Dalam respon inflamasi di dominasi oleh limfosit. Sel T terdiri dari Th dan Tc yang terlibat dalam respon imun, dan membantu dalam insiniasi respon sel-B yang mengarah dalam pembentukan antibodi. Tahap ini ditandai dari infiltrat yang predomnan oleh limfosit-B dan sel plasma, yang mungkin berhubungan dengan pembentukan batas poket gingival kecil dengan poket *epithelial*. Sel B yang ditemukan pada *Establish Lesion* predominant oleh *Immunoglobulin G1* (IgG1) dan G3 (IgG3). Respon dimediasi sel T yang menyebabkan pelepasan IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, TNF- α , TGF- β , INF- γ . Sitokin ynag dilepas oleh sel-T akan mengaktifkan makrofag yang berperan penting dalam kehadiran antigen. Peningkatan inflamasi akan meningkatkan jumlah makrofag. Selanjutnya, sel plasma akan mensintesis antibodi dan bertanggung jawab terhadap respon humoral. Aktivitas PMN yang mensintesis berbagai macam sitokin, leukokin dan MMP, TIMP akan mengakibatkan kerusakan jaringan ikat.

Pada tahap *Establish Lesion* yang terjadi pada dua atau 3 minggu setelah permulaan akumulasi plak, pembuluh darah *engorged* dan padat, vena kembali dirusak, dan mengakibatkan aliran darah menjadi lambat. Kondisi ini merupakan *anoxemia* gingiva lokal, yang ditandai dengan adanya corak kebiru-biruan pada gusi yang merah. Ekstravasasi dari sel darah merah kedalam jaringan ikat dan terganggunya hemoglobin dalam komponen pigmen dapat juga memperdalam warna dan kekronisan inflamasi gingiva. Hal ini menyebabkan warna gingiva menjadi lebih gelap.

Secara histologi, reaksi inflamasi kronik dapat diobservasi. Ciri khas pada *Establish Lesion* menunjukkan inflamasi gingival kronik berupa peningkatan sel plasma. Sel plasma menyerbu jaringan ikat tidak hanya dibawah *epithelial junction* tetapi juga menyerang jauh ke dalam jaringan ikat, sekitar pembuluh darah, dan antara kelompok-kelompok serat kolagen. Kehilangan kolagen pada tahap ini semakin banyak. Perkembangan lesi dari inflamasi akut dengan dominasi limfoid (mula-mula sel-T dan sel-B) diduga diatur oleh sitokin yang bertanggung jawab atas penarikan, diferensiasi dan pertumbuhan tipe sel yang spesifik sesuai tahapan lesinya. Penyingkiran plak secara tuntas biasanya disertai redanya lesi gingivitis kronis tanpa ada kerusakan jaringan yang tersisa.

Terjadi penurunan *junctional epithelium*/poket akibat akumulasi plak yang banyak. *Epithelial junction* mengungkap ruangan interseluler diisi dengan debris granula sel, termasuk lisosom diperoleh dari neutrofil, limfosit, dan monosit yang terganggu. Lisosom mengandung asam hidrolase yang dapat menghancurkan komponen jaringan. *Epithelial junction* berkembang menjadi rete pegs atau ridges yang menonjol dalam jaringan ikat, dan lamina basalis dihancurkan pada beberapa

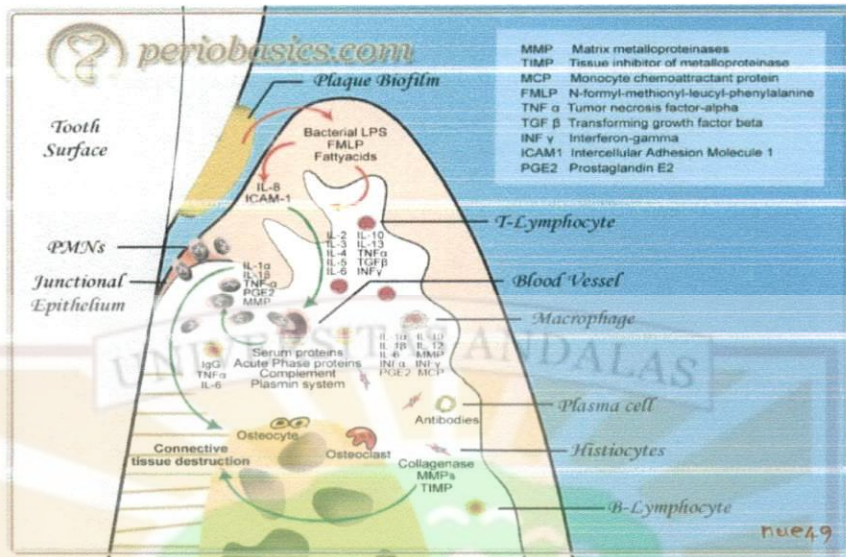
area. Pada jaringan ikat, serat kolagen dihancurkan disekitar perembesan dari plasma sel yang utuh dan terganggu.

Predominan dari sel plasma yang merupakan karakteristik dari *Establish Lesion*. Tetapi, pada beberapa penelitian predominansi sel plasma dalam mempengaruhi jaringan ikat tidak dapat terlihat. Peningkatan dari proporsi sel plasma diperjelas dengan gingivitis dalam waktu lama, perkembangan *Establish Lesion* mungkin melebihi enam bulan. Tahap ini terlihat adanya hubungan terbalik antara jumlah kelompok kolagen utuh dan jumlah sel-sel inflamasi. Aktivitas kolagenolitik ditingkatkan dalam jaringan gusi yang mengalami inflamasi melalui enzim kolagenase. Kolagenase secara normal berada pada jaringan gusi dan dihasilkan melalui beberapa bakteri pada rongga mulut dan PMN.

Inflamasi gingiva kronik yang terjadi pada *Establish Lesion* mengakibatkan peningkatan kadar asam dan alkalin fosfat, β -glukuronidase, β -galaktosidase, esterase, aminopeptida, sitokrom oksidase, elastase, laktat dehidrogenase, dan aril sulfatase, semuanya dihasilkan dari bakteri dan penghancuran jaringan. Tingkat mukopolisakarida netral diturunkan yang merupakan hasil degradasi substansi dasar.

Dua tipe *Establish Lesion* yaitu, yang pertama tetap stabil dan tidak mengalami progres dalam beberapa bulan atau tahun. Tipe yang kedua menjadi lebih aktif dan berubah untuk penghancuran lesi secara progresif. *Establish Lesion* dapat dilihat dengan jelas secara klinis seperti inflamasi gingiva pada umumnya yang terdapat dalam rongga mulut.

2.2.3.4 Advanced Lesion



Gambar 2.7 Advanced Lesion (Saroch, 2013)

Advanced Lesion yang dapat berubah menjadi periodontitis, atau dapat juga disebut *periodontal breakdown*. Perbedaan dari gingivitis dan periodontitis terletak pada *bone resorption*, proliferasi apikal, ulserasi pada *junctional epithelium*, dan kerusakan progresif pada perlekatan jaringan ikat. Pada fase akut dimungkinkan adanya keterlibatan bakteri dan adanya abses.

Setelah masa fase ini, akan terbentuk gingivitis yang lebih parah lagi. Perubahan mikroskopik terlihat terus berlanjut, terdapat fibrosis pada gingiva dan manifestasi inflamasi yang menyebar dan kerusakan jaringan imunopatologi. Pada tahap ini sel-sel plasma terlihat mendominasi jaringan ikat, diinfiltrasi oleh berbagai sel imunologi aktif yang menyebabkan degradasi. Neutrofil berlanjut mendominasi epithelial junction dan celah gingiva. Limfosit masih tetap ada dan jumlah makrofag meningkat, dan sel-sel lain memberi respon imun yang lebih lanjut. Sel imunokompeten memproduksi berbagai sitokin, MMP, PGE₂ dan TIMP. Semua mengarah pada terganggunya hemotasis jaringan dan menyebabkan

kerusakan matriks jaringan ikat dan tulang, serta kolagen yang akan mengarah ke pembentukan saku gusi, yang akan menjadi Periodontitis.

Pada tahap ini sel mast juga ditemukan. Imunoglobulin, terutama IgG ditemukan di daerah epithelium dan jaringan Ikat. Gingiva sekarang berwarna merah, bengkak dan mudah berdarah. Dengan bertambah parahnya kerusakan kolagen dan pembengkakan inflamasi, tepi gingiva dapat dengan mudah dilepas dari permukaan gigi, memperbesar kemungkinan terbentuknya poket gingiva atau poket palsu (*false pocket*). Bila oedem inflamasi dan pembengkakan gingiva cukup besar, maka poket gingiva biasanya juga cukup dalam. Pada tahap ini sudah terjadi degenerasi sel-sel *epithelium junction* dan beberapa berproliferasi dari lapisan basal ke jaringan ikat di bawahnya, namun pada tahapan ini belum terlihat adanya migrasi sel-sel *epithelial* dalam jumlah besar ke permukaan akar.

Bila inflamasi sudah menyebar disepanjang serabut transeptal, maka akan terlihat adanya resorpsi puncak tulang alveolar. Resorpsi ini bersifat reversibel terutama dalam hubungannya dengan pemulihan inflamasi. Salah satu tanda penting dari penyakit ini adalah tidak ditemukannya bakteri pada *epithelium* maupun pada jaringan ikat. Karena jaringan fibrosa rusak pada inflamasi aktif, pada beberapa daerah agak jauh terlihat adanya proliferasi jaringan fibrosa dan pembentukan pembuluh darah baru. Aktivitas pemulihan yang produktif ini merupakan karakteristik yang sangat penting dari lesi kronis dan pada keadaan iritasi serta inflamasi jangka panjang, elemen jaringan fibrosa akan menjadi komponen utama dari perubahan jaringan. Jadi, kerusakan dan perbaikan berlangsung bergantian dan proporsi dari tiap-tiap proses ini akan mempengaruhi

warna dan bentuk gingiva. Bila inflamasi dominan, jaringan akan berwarna merah, lunak dan mudah berdarah.

Tabel.2.2 Patogenesis Penyakit Periodontal

STAGE	TIME (DAYS)	BLOOD VESSELS	JUNCTIONAL AND SULCULAR EPITELIUM	PREDOMINANT IMMUNE CELL	COLLAGEN	CLINICAL FINDINGS
I. Initial Lesion	2-4	Dilatasi vascular	Infiltrasi oleh PMN's	PMN's	Kehilangan perivaskular	Aliran cairan gingiva
II. Early lesion	4-7	Proliferasi vascular	Sama seperti stage I; rete peg formation; area atropik	Limfosit	Disekeliling infiltrat seluler menghancurkan 70% kandungan kolagen	Erytema; perdarahan dalam pemeriksaan
III. Established Lesion	14-21	Sama seperti stage II, ditambah stasis darah	Sama seperti stage II, tapi tingkatnya lebih tinggi	Plasma sel	Penghancuran terus berlanjut	Perubahan warna, ukuran, tekstur, dll
IV advance lesion	>21	proliferasi jaringan fibrosa dan pembentukan pembuluh darah baru	<i>bone resorption</i> , proliferasi apikal, ulserasi	Mast sel, IgG	Penghancuran kolagen meningkat	Gingiva merah, bengkak, mudah berdarah, kemungkinan adanya poket Palsu

Patogenesis Penyakit Periodontal (Carranza, 2011)

Initial lesi dari gingivitis berfokus pada inflamasi akut dengan vasodilatasi, edema, dan akumulasi dari PMN. Ada juga ulserasi dari lapisan *epithelium*, sulkus gingiva terdapat pendarahan saat *probing*. Pada beberapa pasien hal ini terlihat pada 2 hari setelah akumulasi plak dan jika dilakukan pengangkatan plak, kalkulus, dan dikontrol *oral hygiene* akan dapat membuat gingiva sehat kembali dalam 7-10 hari.

Pada tahap *establish lesion*, respon inisial akut disertai dengan inflamasi kronis dengan emphasis pada limfositik dan akumulasi sel plasma, proliferasi kapiler, dan penghancuran kolagen. Pada tahap ini, masih bisa berbalik tetapi membutuhkan periode yang panjang untuk jaringan gingiva dapat memulihkan dan mengembalikan fiber kolagen yang hilang.

Tahap lanjutan dari gingivitis berupa Periodontitis dimana pada tahap ini terjadi kehilangan jaringan tulang pendukung gigi yang mengakibatkan goyangnya gigi sehingga tidak bisa dipertahankan. Periodontitis tidak selalu merupakan proses yang kronis, tetap, dan progresif, namun juga dapat bersifat destruksi yang akut. Ketika fase akut dimulai, bakteri gram negatif secara predominan bergerak dan menginfeksi jaringan. Jaringan merespon keadaan ini secara akut dan spesifik dengan membentuk mikronekrosis dan atau abses supuratif. Pada kondisi ini, terjadi kerusakan periodontal di setiap proses aktifnya.

Infeksi akut menyebabkan mekanisme yang mendorong terjadinya kerusakan tulang. Produk-produk imunitas humoral dan seluler dapat menyebabkan *bone loss* seperti produk – produk bakteri. Mediator penting dalam proses ini adalah *Osteoclast Activating Factor* (OAF) dan *prostaglandin* PGE_2 yang kemudian menjadi mediator resorpsi tulang. Sintesis kolagen oleh osteoblas juga dikurangi oleh PGE_2 . Efek yang menstimulasi resorpsi tulang oleh *lipopolisakarida* bakteri juga mendukung terjadinya proses dan progres resorpsi tulang (Gilang, 2010).

2.2.4 Sistem Pertahanan pada penyakit periodontal

Penyakit periodontal terdiri dari gingivitis dan periodontitis. Periodontitis adalah penyakit inflamasi yang menyerang jaringan pendukung gigi, menyebabkan kerusakan progresif dari perlekatan jaringan pendukung dan tulang alveolar. Salah satu penyebabnya adalah adanya infeksi bakteri. Bakteri yang ada di dalam plak, termasuk lipopolisakarida (LPS) dan asam *lipoteichoic*, berinteraksi dengan *toll-like receptor* pada sel epitel, leukosit dan fibroblas, merangsang produksi sitokin seperti $IL-1\beta$, $TNF-\alpha$, $IL-6$, $IL-8$, prostaglandin E_2

(PGE2) (Madianos *et.al.*, 2005). Untuk memudahkan infiltrasi leukosit, fibroblas yang distimulasi oleh IL-1 β dan TNF- α mensekresi MMP yang mendegradasi molekul- molekul ECM termasuk kolagen (Nedbal *et al.*,2002 dan Rai *et al.*,2008). Telah diteliti bahwa pada penderita Periodontitis, terjadi peningkatan MMP-8 pada GCF (Pozo *et al.*,2009).

Tiga sitokin proinflamatori IL-1, IL-6 dan TNF muncul untuk mengambil peran utama pada penghancuran jaringan.IL-1 ditemukan dalam dua bentuk aktif, IL-1 α dan IL-1 β , dikodekan oleh *separate genes*.Keduanya adalah molekul inflamatori ampuh dan konstituen utama yang biasa disebut *osteoclast-activating factor*.Famili IL-1 juga termasuk dengan IL-1 reseptor tanpa stimulasi dari sel *host*. IL-6, sitokin inflamatori lain, mengarah ke remodeling tulang.TNF juga ditemukan dalam dua bentuk, TNF- α dan TNF- β . TNF- α membagi banyak aktifitas biologis yang sama seperti IL-1 termasuk stimulasi resorpsi tulang.

IL-1 diproduksi secara primer dengan aktivasi makrofag atau limfosit juga dikeluarkan oleh sel lain, termasuk sel mast, fibroblas, keratinosit dan sel endotelial. Bakteri LPS adalah aktivator ampuh dari produksi makrofag IL-1, sedangkan TNF- α dan IL-1 sendiri juga bisa mengaktifasi produksi IL-1.Kemampuan IL-1 untuk meng-*upregulate* produksinya sendiri yang dapat memberikan mekanisme amplifikasi signifikan, TNF- α juga diproduksi oleh makrofag yang diaktifkan, khususnya dalam merespon LPS bakteri. TNF- β diproduksi primer oleh subset Th-1 dan CD4+, sel T yang telah diaktifasi oleh antigen atau mitogen (Wada, 2004).

Efek proinflamtori dari IL-1 dan TNF- α yaitu menstimulasi dari sel endotelial untuk mengekspresikan selectin yang memfasilitasi perekrutan leukosit

kemudian aktivasi dari produksi makrofag IL-1, dan induksi dari *prostaglandin E* (PGE_2) oleh makrofag dan fibroblas gingiva. Bagian dari sitokin ini yang terkait dengan penghancuran jaringan melibatkan stimulasi dari resorpsi tulang dan induksi dari *tissue-degrading protease*. IL-1 merupakan stimulan ampuh dari proliferasi osteoklas, diferensiasi dan aktivasi. $\text{TNF-}\alpha$ punya efek yang mirip pada osteoklas tapi jauh lebih kuat daripada IL-1. Antara IL-1 dan $\text{TNF-}\alpha$ menginduksi produksi protease dalam sel mesenkim, termasuk MMP yang dapat berkontribusi pada penghancuran jaringan ikat (Malkowskaa,2004; Carranza,2011)

Data substansial dari studi *in vivo* mendukung konsep bahwa IL-1 dan $\text{TNF-}\alpha$ adalah molekul kunci dalam patogenesis Periodontitis. IL-1, IL-6 dan $\text{TNF-}\alpha$ ditemukan pada konsentrasi signifikan dalam GCF dari situs peradangan periodontal. Reduksi pada konsentrasi IL-1 juga terkait dengan treatment yang sukses dan meningkatkan kadar IL-6 dalam GCF yang terkait dengan situs yang tidak merespon dengan baik dalam fase inisial *non-surgical* dari terapi, meningkatnya keparahan periodontitis juga terkait dengan meningkatnya konsentrasi IL-1 dan penurunan konsentrasi IL-1 pada model primata dari percobaan Periodontitis, aplikasi dari antagonis ke IL-1 dan $\text{TNF-}\alpha$ mengakibatkan 80% reduksi pada perekrutan sel inflamatori dalam kedekatannya dengan tulang alveolar, dan 60% reduksi pada kehilangan tulang.

Prostaglandin adalah metabolit asam arakidonat yang dihasilkan oleh *cyclooxygenases* (COX-1, COX2). Asam arakidonat adalah suatu 20-karbon polyunsaturasi asam lemak yang ditemukan dalam membran plasma di hampir semua sel. COX-2 diatur oleh IL-1 β . $\text{TNF-}\alpha$ dan bakteri LPS dan tampaknya bertanggungjawab untuk menghasilkan PGE_2 yang terkait dengan inflamasi. Sel

primer bertanggungjawab untuk produksi PGE_2 dalam periodonsium adalah makrofag dan fibroblas. PGE_2 meningkat pada demonstrasi inflamasi situs periodontal dan kehilangan perlekatan induksi dari MMP dan resorpsi tulang osteoklastik diinduksi oleh PGE_2 (Bage, 2011).

PGE_2 tampaknya bertanggungjawab sebagian terhadap kehilangan tulang alveolar yang terkait dengan periodonitis. PGE_2 meningkat pada gingivitis dan periodontitis, khususnya pada peradangan aktif. Pemeriksaan pada GCF dapat dianggap sebagai tanda diagnostik untuk kehilangan tulang kedepannya (Carranza, 2011).

Limfokin yang pada awalnya digunakan untuk mediator yang diproduksi oleh limfosit yang teraktifkan oleh antigen dinamakan juga sitokin. Sitokin yang paling sering terlibat pada penyakit periodontal yaitu

- a. IL-1 terdiri atas IL- α dan IL-1 β yang memiliki aktivitas biologis berupa bergerakanya sel-sel inflamasi, meningkatkan resorpsi tulang, menstimulasi PGE yg dilepas monosit dan fibroblas, menstimulasi pelepasan *metalloprotease*, berpartisipasi dalam respon imun, *kemotaksis* netrofil dan makrofag, aktivasi sel-TH dan sel-NK, dan meningkatkan prokolagen fibroblas. Disekresi oleh: monosit, makrofag, sel-B, fibroblas, netrofil, sel-sel epitel yang distimulasi oleh fagositosis, C3a, C5a dan substansi lain. Tipe yang dominan pada periodonsium adalah IL-1 α , yang disekresi oleh makrofag.

Kadarnya pada GCF yang terinflamasi lebih tinggi, mencakup *osteoclast activating factor*/OAF (yang menstimulasi osteoklas) dan

lymphocyte activating factor/LAF (yang menstimulasi proliferasi sel-T).

- b. IL-2 terdiri atas IL-2 α dan IL-2 β , dulu dinamakan *T-cell growth factor* (oleh karena efeknya terhadap sel-T pengaktif mitogen/antigen) yang mempunyai aktivitas biologis yaitu berperan dalam respon imun, menstimulasi aktivitas fungsional makrofag, memodulasi fungsi sel-NK, dan menginduksi proliferasi sel-NK. Jumlah IL-2 meningkat pada kondisi Periodontitis yang disekresi oleh sel-TH dan sel-NK.
- c. IL-4 dulu dinamakan *T-cell derived B-cell growth factor/BCGF-1*, yang mempunyai aktivitas berupa aktivasi, proliferasi, dan diferensiasi sel-B, pertumbuhan sel-T, fungsi makrofag, pertumbuhan sel mast, dan menginduksi sintesa IgE oleh sel-B. Jumlah IL-4 meningkat pada periodontitis yang disekresi oleh: sel-TH
- d. IL- 6 mempunyai aktivitas menstimulasi sel plasma memproduksi Ig, bersama dengan IL-1 mengaktifkan produksi sel TH dan berperan dalam resorpsi tulang. IL-6 disekresi oleh sel-sel Th , makrofag, monosit, fibroblas dan sel-sel endotel. Kadarnya meningkat pada gingivitis dan periodontitis.
- e. IL- 8 mempunyai aktivitas berupa kemotaksis bagi netrofil, meningkatkan adhesi netrofil ke sel-sel endotel, dan menstimulasi aktivitas *matrix metalloprotease* dari netrofil sehingga berperan dalam penghancuran kolagen pada periodontitis. Di dalam GCF, kadar IL-8 akan meningkat pada penderita periodontitis yang disekresikan oleh monosit sbg respon terhadap LOS dan TNF- α .

- f. IL- 10 mempunyai aktivitas: menghambat kemampuan pengenalan antigen dari monosit yang disekresi oleh sel TH.
- g. IFN terdiri atas $\text{INF-}\alpha$, $\text{INF-}\beta$ dan $\text{INF-}\gamma$, yang merupakan glikoprotein yang diproduksi oleh lekosit, fibroblas, dan limfosit-T. Aktivitas pada IFN berupa antivirus, meningkatkan aktivitas makrofag, sel-T dan sel-NK, dan berperan dalam resorpsi tulang dengan jalan menghambat proliferasi dan diferensiasi progenitor osteoklas.
- h. TNF terdiri atas $\text{TNF-}\alpha$ yang diproduksi oleh makrofag setelah distimulasi oleh komponen bakteri gram negatif termasuk LPS dan $\text{TNF-}\beta$ (dulu dinamakan *lymphotoxin/LT*) diproduksi oleh sel-TH. TNF mempunyai aktivitas berupa aktivasi osteoklas dan menstimulasinya sehingga meresorpsi tulang dan membantu adhesi lekosit ke sel-sel endotel dan meningkatkan fagositosis dan kemotaksis lekosit.
- i. PGE_2 merupakan eikosanoid vasoaktif yang diproduksi oleh monosit dan fibroblas. Aktivitas PGE_2 adalah menginduksi resorpsi tulang, sekresi *matrix metalloprotease* dan kadarnya meningkat pada periodontitis.

Penyakit periodontal salah satunya gingivitis yang disebabkan infeksi bakteri, secara langsung melalui aliran darah (*hematogen*), maupun tidak langsung dari respon imun sistemik infeksi melalui peningkatan mediator infeksi (PGE_2 , IL1, IL6 dan $\text{TNF}\alpha$) oleh pertahanan tubuh (Retnoningrum, 2006).

2.2.5 Interaksi *Host* Dan Bakteri Pada Penyakit Periodontal

Keterpaparan terhadap antigen bakteri pada daerah sulkus gingiva dan jaringan gingiva menginduksi respon *host* secara sistemik maupun secara lokal. Pada gingivitis dan periodontitis respon imunitas tersebut mempunyai fungsi protektif maupun destruktif (Teng, 2003).

Didalam rongga mulut ada jutaan bakteri yang dibutuhkan (flora normal), bakteri khas yang terdapat pada jaringan periodontal adalah bakteri gram negatif yang anaerob. Dapat diperkirakan didalam gusi terdapat kantong yang makin kedasar makin tidak ada oksigennya, sehingga bakteri anaerob makin tumbuh subur (Syaify, 2008).

Neutrofil memiliki peranan penting dalam mengontrol mikrobiota periodontal. Neutrofil merupakan leukosit pertama yang sampai ke daerah inflamasi dan selalu tipe sel dominan dalam *epithelium junctional* dan celah gingiva. Dalam melakukan fungsinya sebagai pengontrol bakteri yang efektif, neutrofil harus secara utuh berfungsi sebagai berikut yaitu; fungsinya sebagai migrasi transendotelial, kemotaksis, migrasi transepitalial, opsonisasi, fagositosis dan pembunuhan intra fagolisosomal. Gangguan neutrofil berhubungan dengan infeksi periodontal invasif dan Periodontitis agresif (Kumar, 2012).

Penghancuran atau kerusakan periodontal yang parah yang melibatkan gigi geligi. Merupakan akibat dari kerusakan neutrofil, kemotaksis, dan fagositosis. Pada individu yang tidak memiliki komplikasi secara sistemik dengan masalah periodontal yang parah dapat memiliki kecacatan ringan pada fungsi neutrofilnya. $\text{TNF-}\alpha$ memainkan peranan utama dalam perkembangan inflamasi dengan stimulasi yang dihasilkan oleh sitokin, termasuk $\text{IL-1}\beta$ dari neutrofil. *Lipoxin A4* adalah mediator regulasi sitokin yang penting yang dapat mengurangi inflamasi

yang disebabkan oleh $\text{TNF-}\alpha$. Aplikasi topikal *lipoxin* dapat mengurangi kehilangan tulang alveolar yang diinfeksi oleh *P.Gingivalis* sekitar satu sampai dua persen dari seluruh migrasi neutrofil ke seluruh *epithelium junction*. (Borgeson, 2011). Transepithelial migrasi ini memerlukan gradien kemotaksin. *Junctional epithelium* mengekspresikan (kemokin) IL-8 dan ICAM-1. Suatu gradien dari ikatan ICAM-1 dan molekul IL-8 yang larut terbentuk, dengan meningkatkan ekspresi ke arah terluar permukaan jaringan. Distribusi ini tepat untuk migrasi neutrofil ke sulkus gingiva. Neutrofil dapat menggunakan fungsi adhesi leukositnya terkait dengan antigen-1 (LFA-1), Mac-1 atau keduanya untuk mengikat ICAM-1 ke sel epitelial dalam proses transepitel migrasi (Tonneti, 1998; Zemans *et al.*, 2009).

Pada studi *in vitro* telah menunjukkan bahwa *Porphyromonas gingivalis* menghambat migrasi transpethelial dari neutrofil dan mencegah sel epitelial dari mengeluarkan IL-8 dalam merespon bakteri. *Porphyromonas gingivalis* juga mempunyai faktor virulensi potensial melalui produksi α 1-protease inhibitor dari *Neutrofil Elastase host* (manusia). Dan hal ini dapat berkontribusi terhadap virulensi *P.Gingivalis* dengan mengganggu respon imun *host* (Zhang, 1999; Galicia, 2009).

Opsonisasi adalah pelapisan antigen oleh antibodi, komplemen, fibronectin, yang berfungsi untuk memudahkan fagositosis. Opsonisasi ada dua yaitu opsonisasi yang tidak tergantung antibodi dan yang ditingkatkan oleh antibodi. Opsonisasi yang ditujukan ke lapisan partikel, seperti bakteri dengan *host-protein* yang memfasilitasi fagositosis. Suatu sel bakteri dapat dilapisi oleh molekul yang berasal dari komponen komplemen (misalnya iC3b) dimana

neutrofil memiliki reseptor (CR3). Sama halnya dengan sel bakteri yang dapat dilapisi dengan antibodi spesifik dimana komponen tetap dan hasil deposisi permukaan dari C3b telah dikenali oleh CR3 reseptor neutrofil ketika dikonversi/dirubah oleh iC3b. Antibodi spesifik dari IgG isotype juga memfasilitasi fagositosis secara langsung dengan mengikatnya ke neutrofil Fc reseptor dan tampak esensial untuk fagositosis dari patogen periodontal (Ehrnthaller, 2010).

Pasien dengan kondisi peridontitis biasanya akan menunjukkan serum titers dari IgG yang sangat tinggi kepada patogen periodontal spesifik. Walaupun sel B bertanggung jawab secara langsung untuk memproduksi antibodi, sel T juga diperlukan untuk meregulasi isotype yang berganti dari IgM ke IgG. *Antigen Presenting Cell* (APC) seperti sel periperal dendritik (contoh : sel langerhans, makrofag, sel B) banyak terdapat di dalam jaringan gingiva dan bisa memindahkan antigen ke regional nodul limfe, dengan demikian meningkatkan produksi dari serum antibodi IgG. Produksi immunoglobulin lokal juga telah didapatkan di dalam gingiva dan jaringan gingiva yang mengandung immunoglobulin dengan kadar yang sangat tinggi (Anil, 2006).

Scaling dan *root planning* akan menstimulasi produksi antibodi dalam melawan mikroorganisme *Porphyromonas Gingivalis* dan *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* (Mestecky et al ., 2005). Variabilitas dalam kadar, tipe, dan kekuatan dari ikatan antibodi berbeda di setiap pasien dan antibodi yang signifikan tergantung pada fungsinya. Antibodi dapat berfungsi untuk memfasilitasi pembersihan *host* dari patogen periodontal. Antibodi yang muncul akan menjadi esensial untuk opsonisasi dan fagositosis dari *A.*

Actinomycetemcomitans dan ketegangan virulensi dari *P.Gingivalis*. antibodi juga bisa berfungsi untuk menetralkan komponen bakteri yang penting dalam kolonisasi atau interaksi sel *host* (Ebersole, 2000). Suatu antibodi monoclonal preparasi spesifik untuk sebuah hemagglutinin *P.Gingivalis* telah menunjukkan untuk mencegah rekolonisasi dari poket periodontal yang dalam pada pasien periodontitis (Kozarov, 2000). Sangat penting bahwa LAP akan hadir sebagai respon antibodi *host* yang telah berkontribusi pada proses peradangan. Sekali sel bakteri terikat pada neutrofil, proses fagositosis atau penelanan hasil dalam jebakan sel bakteri menjadi *membrane-delimited structure* yang biasanya disebut *phagosome*/fagosom. Bakteri dalam fagosom dan fagolisosom dapat dibunuh melalui mekanisme oksidatif atau non oksidatif. Sulkus gingiva dengan karakteristik kadar oksigen yang berkurang dan mereduksi oksidasi potensial dari poket periodontal lebih kurang daripada sulkus gingiva. Ini diindikasikan dengan pengukuran kadar oksigen krevikular dan potensial redoks dan direfleksikan dengan pertumbuhan bakteri anaerobik seperti *P.gingivalis* dan oral *Spirochetes* (Waddington, 2000).

Mekanisme pembunuhan oksidatif dari krevikular neutrofil bisa sembuh seutuhnya tetapi akan mengalami kerusakan pada poket periodontalnya. Penutupan pembunuhan oksidatif dapat menjadi faktor penting dalam progres Periodontitis. Mekanisme pembunuh non oksidatif melibatkan fungsi fagosom, lisosom, dan menghasilkan pengeluaran substansi bakteri seperti lisozim, *cathepsin G*, dan α -defensins menjadi fagolisosom. Beberapa patogen periodontal menghindari dari sel fagositik sebagai mekanisme virulensi, sebagai contoh leukotoksin A. *Actinomycetemcomitans* membunuh fagosit dengan meningkatnya

ke adhesi LFA-1 dan kemudian melisis sel eukariotik. Penelitian secara *in vitro* menunjukkan bahwa antibodi spesifik terhadap *A. Actinomycetemcomitansi* atau *antileukotoxin* serum melindungi neutrofil dari kerusakan *leukotoxin-mediated* dan memungkinkan kelanjutan fagositosis (Permpnich, 2006).

2.3 Crevicular Gingival Fluid Sebagai Salah Satu Spesimen Dalam Mendeteksi Tingkat Inflamasi

Saidina Hamzah (2006), Keberadaan *Crevicular Gingival Fluid* yang merupakan cairan sulcus gingiva berupa suatu transudat yang secara kontiniu diproduksi, atau eksudat inflamasi masih dipertanyakan oleh para peneliti. Cairan krevikular (sulkular) 10-100µl/jam untuk volume seluruh saliva.

Crevicular Gingival Fluid (GCF) adalah inflamasi eksudat dari mikrosirkulasi gingiva yang melintasi jaringan periodontal yang meradang dan dalam perjalanan menghimpun molekul kepentingan yang potensial dari reaksi inflamasi lokal. GCF berperan sebagai mekanisme pertahanan yaitu aksi membilas, kandungan sel protektif, memproduksi enzim. *Cytokines* pro-inflamasi dan anti-inflamasi ini diidentifikasi dalam GCF.

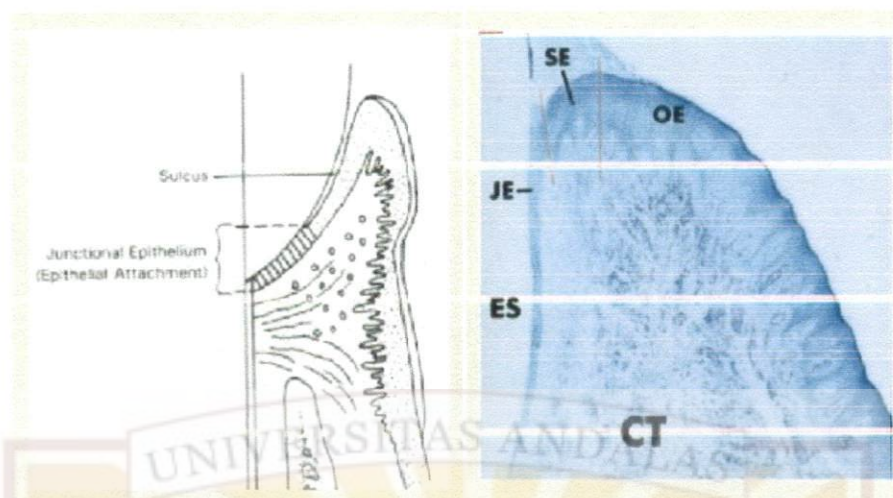
Crevicular Gingival Fluid yang diambil pada jaringan periodontal dimana penyakit periodontal dimulai, memberikan gambaran informasi lebih dari marker yang digunakan pada saliva. Molekul dalam saliva dapat juga berasal dari kelenjar ludah yang seluler dan mediator biokimia dalam saliva dapat mencerminkan penyakit dan status metabolisme dari kelenjar bukannya penyakit periodontal. Sebaliknya GCF konstituen mencerminkan respon *host* terhadap antigen periodontopathogenic bakteri dan perkembangan penyakit pada dasarnya

tergantung pada respon *host*, evaluasi penanda dalam GCF dianggap metode yang baik dalam penentuan risiko seseorang untuk penyakit periodontal.

Mediator *biochemical* di cairan mulut seperti air ludah dan gingival crevicular fluid (GCF) sangat berguna dalam penentuan status periodontal saat ini. GCF diketahui sebagai pembantu biomarker dalam penentu kadar inflamasi mediator, sama bagusnya sebagai indikator aktivitas inflamasi. Para peneliti menjelaskan kemajuan saat ini dalam penggunaan GCF sebagai diagnosis penyakit berdasarkan pertanda yang terfokus dalam identifikasi keaktifan penyakit periodontal.

Menurut Kharbanda (2010), GCF terdapat di dalam sulkus gingiva. Sulkus gingiva adalah celah dangkal atau ruang disekeliling gigi yang dibatasi oleh permukaan gigi di satu sisi dan lapisan *epithel free gingiva margin* disisi lainnya. Berbentuk V dan dalam gusi manusia yang secara klinis dinyatakan sehat, beberapa sulkus kedalamannya 1,8mm yang diukur secara histologis, kedalaman *probing* dari sulkus gingiva klinis normalnya adalah 2-3mm. Pada gambar 1, ada tiga tipe *epithelium* yaitu;

1. Oral atau *epithelium* keratinisasi yang menutup jaringan ikat gingiva.
2. *Epithelium* sulkular tidak terkeratinisasi membentuk dinding jaringan lunak dari sulkus gingiva
3. *Epithelium junction*, merupakan perpanjangan atau kelanjutan antara oral dan sulkular *epithelium*. Terbentuk oleh beberapa strata sel, dengan lapisan basal datar panjang dan sedikit deskuamasi permukaan yang berbentuk dasar dari sulkus gingiva.



Gambar 2.8. Anatomi gingival *crevicular* (Carranza *et al.*, 2012)

Crevicular Gingival Fluid telah ditemukan sejak abad 19, Brill dan Krause memperkenalkan pemakaian kertas filter kedalam sulkus gingiva pada penelitian yang menggunakan anjing sebagai sampel. Pada langkah pertama disuntikkan *intramuscular* dengan *fluorescen*, selama 3 menit *paper strip* akan menyerap bahan *fluorescent* yang menunjukkan bahwa bagian dari aliran darah melalui jaringan dan keluar melalui sulkus gingiva. Pada studi lebih lanjut Brill mengkonfirmasi adanya GCF pada manusia awalnya merupakan suatu transudat. Tetapi kemudian, dinyatakan bahwa GCF merupakan eksudat inflamasi dan tidak selalu menjadi transudat seperti yang terdapat pada gingiva normal yang jumlahnya sangat sedikit dan tidak bisa dikumpulkan sebagai spesimen.

Menurut Jablonski (1982) GCF adalah suatu cairan yang terjadi dalam hitungan menit didalam krevikular gingiva yang merupakan suatu eksudat inflamasi dan juga sebagai bahan pembersih krevikular yang terdiri dari plasmaprotein yang lengket dan meningkatkan adhesi dari *epithel junction* yang mengandung antimikrobal dan memicu aktifitas antibodi.

Elberg menyatakan bahwa terbentuknya GCF berkaitan dengan peningkatan permeabilitas dari *vessels underlying junction* dan *epithelium* sulkular. Dengan adanya inflamasi, lebar dan panjang dari kapiler dan post kapiler venule meningkat, terlihat pada twisting, kroying, dan subsequent dari vessel ini pada lapisan datar. *Epithelium* ini tidak memasuki *ridges prosecting* ke jaringan ikat, maka jaringan pembuluh darah tersebut terletak pada lokasi yang sangat superfisial, dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 2.9 Vaskular gingiva dan carian krevikular (Carranza *et al.*, 2012)

Gingival crevicular fluid (GCF) telah digunakan untuk mendeteksi atau mendiagnosa penyakit aktif atau untuk memprediksi pasien dengan resiko penyakit periodontal. Sumber kolagenase yang mungkin didapat dari fibroblas atau PMN, atau yang berasal dari sekresi bakteri bisa didapatkan di dalam GCF (Carranza *et al.*, 2000). Konsentrasi tetrasiklin dalam GCF lebih tinggi ketika dibandingkan dalam serum (Bader and Goldhaber, 1996)

Menurut Armitage, lebih dari 65 unsur GCF telah dievaluasi sebagai penanda diagnostic potensi perkembangan penyakit periodontal. Penanda inidapat

dibagi menjadi tiga kelompok: *host* yang diturunkan enzim dan inhibitor mereka, inflamasi mediator dan *host-respon modifiers*, dan produk sampingan dari kerusakan tissue.

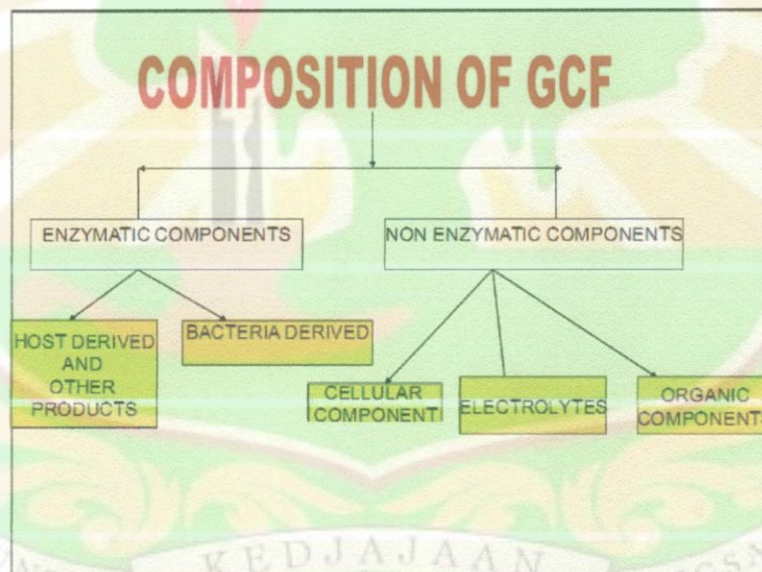
Pengumpulan dan analisis sampel GCF memberikan non-invasif sarana untuk menilai status *pathophysiological* dari periodonsium dengan cara spesifik lokasi. GCF dapat dengan mudah dikumpulkan dengan cara *paper strip*, poin penyerap dan *micropipettes* dari celah-celah gingiva gigi.

Cairan krevikular gingiva (GCF) pertanda yang memberikan status perkembangan penyakit periodontal, sebagai tes diagnostic. Keterbatasan GCF jelas ada. Pengambilan GCF dapat menantang secara teknis dan memakan waktu. di samping itu, pemilihan gigi dan lokasi yang beresiko untuk perkembangan penyakit seringkali sulit. Selain itu, tes laboratorium untuk mendiagnosa penyakit periodontal tidak secara rutin dan tidak lazim digunakan untuk penyakit gigi.

Crevicular Gingival Fluid merupakan faktor respon dari *host* yang mengandung campuran molekul dari darah, jaringan, plak, berupa elektrolit, molekul kecil, protein, sitokin, antibodi, antigen bakteri, dan enzim. (Soder *et al.*, 2004; Lamster *et al.*, 2003). *Host* yang mengeluarkan enzim seperti *Matrix Metalloprotease* (MMPs) merupakan kelompok penting dari protease netral yang terlibat pada destruktif penyakit periodontal yang dapat diukur dalam GCF (Gapski *et al.*, 2004; Figueredo *et al.*, 2004). Neutrofil adalah sel utama yang menghasilkan MMP pada infeksi, khususnya MMP-8 (kolagenase-2) dan MMP-9 (gelatinase-B) MMP-8 akan mendegradasi kolagen itertisial, MMP-9 mendegradasi beberapa protein matriks ekstraselular (Mantyla, 2003).

Pashley memprediksi bahwa produksi GCF diatur oleh bagian cairan dari kapiler ke jaringan (filtrat kapiler) dan perpindahan GCF dilakukan oleh sistem limfatik. Ketika tingkat filtrat kapiler berlebih dari sistem limfatik, cairan akan diakumulasi sebagai edema dan atau keluar area sebagai GCF. Fungsi dari GCF antara lain adalah untuk membersihkan material yang ada di sulkus, terdiri dari plasma protein yang dapat meningkatkan adhesi antara epitelium terhadap gigi, memiliki properti antimicrobial dan mengarahkan aktivitas antibodi dalam mempertahankan gingiva.

2.3.1 Komposisi GCF



Gambar 2.10 Komposisi GCF (Kharbanda, 2010)

Komposisi GCF:

1. Enzim.

- a. yang berasal dari *host* yaitu; *Acid Phosphatase*, *Alkaline Phosphatase*, $\alpha 1$ *Antitrypsin*, *Arylsulphatase*, *Aspartate Aminotransferase*, *Chondroitin Sulphate*, *Citric Acid*,

Cytatins, B-glucuronidase, Chatepsin, Matrix Metalloproteins, Elastase.

- b. Enzim yang berasal dari bakteri yaitu; *Acid Phosphatase, Alkaline Phosphatase, Collagenase, Hyaluronidase, Phospolipse-A, Phospolipase-C.*

2. Non Enzim.

- a. Elemen selular yang mengandung bakteri, sel *epithelial desquamted*, Leukosit (PMN, Monosit, Makrofag).
- b. Elektrolit yang mengandung *Potassium, Calcium*, dan *Sodium*.
- c. *Organic Compound* yang mengandung karbohidrat (glucosehexosamine dan hesuronic acid), dan protein.

Crevicular Gingival Fluid juga mengandung hasil akhir metabolik yang terdiri dari *Lactic Acid, Urea, Hydroxypoline, Endotoxins, Cytotoxic Substance, Hydrogen Sulphyde* (Neeharika 2010).

Neeharika (2010) dan Carranza (2011) GCF mengandung zat dari *host* maupun dari mikroorganisme dalam plak subgingiva dan supragingiva. Unsur dari *host* termasuk molekul dari darah, dan kontribusi dari sel dan jaringan periodontium. Yang kedua meliputi pembuluh darah, epitel, jaringan konektivitas non mineralized dan mineral, serta sel-sel inflamasi dan kekebalan tubuh yang telah menyusup ke dalam jaringan periodontal. Komponen seluler GCF adalah granulosit 70-80%, 10-20% monosit / makrofag, sel mast 5% dan limfosit 5%.

Komposisi GCF mengandung :

- Elemen seluler dari cairan sulkular adalah bakteri, sel epitel yang deskuamasi, limfosit yang bermigrasi menembus epitel sulkular.

- Elektrolit, berupa kalium, natrium dan kalsium. Penelitian menunjukkan korelasi konsentrasi dan ratio kalium, natrium dengan inflamasi pada gingiva.
- Komponen organiknya adalah karbohidrat dan protein. Karbohidrat yang sering dijumpai berupa heksosamin glukosa dan asam heksuronat.
- Produk metabolik dan produk bakterial berupa asam laktat, urea, hidroksiprolin, endotoksin, substansi sitotoksik, hidrogen sulfida dan faktor antibakterial.
- Beberapa enzim yang terdapat didalam cairan sulkular yaitu enzim Beta Glukuronidase yang merupakan enzim lisosomal. Dehidrogenase asam laktat yang merupakan enzim sitoplasmik. Enzim Kolagenase yang diproduksi oleh fibroblas atau PMN atau disekresikan oleh bakteri. Enzim Fosfolipase berupa enzim lisosomal yang juga bisa diproduksi oleh bakteri.

2.3.2 Aktivitas Seluler dan Humoral Didalam Cairan Sulkus

Analisa dari GCF telah memperlihatkan respon sel dan humoral pada individu sehat dan yang mempunyai radang periodontal. Respon sel imun melibatkan munculnya sitokin didalam GCF. Sitolin tersebut adalah IL1 α dan IL1 β yang meningkatkan ikatan dari PMN dan monosit ke sel endotel, kemudian menstimulasi produksi dari PGE2 dan pengeluaran enzim lisosom, maka hal ini akan menstimulasi resorpsi tulang yang mana keberadaan interferon α pada GCF memiliki peran protektif pada kasus Periodontitis karena kemampuannya untuk menghalangi resorpsi tulang. Karena jumlah dari cairan GCF yang didapat di dalam sulkus sedikit, maka penggunaan immunoassays yang sangat sensitif memungkinkan analisis pada

kekhususan dari antibodi. Peran antibodi dalam mekanisme pertahanan gingiva sulit untuk dipastikan. Ditemukan bahwa IgG lebih merata terdapat dalam GCF.

Myriam *et al* (2009) Cairan sulkus gingiva merupakan eksudat yang mengalir ke dalam rongga mulut dari poket periodontal. Komposisi cairan ini menyerupai serum, dan intensitas aliran yang telah terbukti bervariasi sebagai fungsi dari inflamasi gingiva. Parameter biokimia yang terdapat di dalam GCF bisa dijadikan sebagai detektor atau prediktor penyakit periodontal activity (Embery, 1994; Elley, 1998; Koss 2009)

Crevicular Gingival Fluid yang merupakan eksudat inflamasi, kehadirannya dalam sulkus normal secara klinis pada gingiva tampaknya normal, tetapi apabila diperiksa secara mikroskopis akan menunjukkan peradangan. Jumlah dari GCF lebih besar ketika terjadi inflamasi dan sebanding dengan tingkat keparahan inflamasinya. Jumlah GCF dapat dipengaruhi:

1. *Circadian Periodicity* yaitu adanya peningkatan sedikit demi sedikit pada jumlah GCF dari jam 6 pagi sampai 10 malam dan akan menurun setelahnya.
2. Hormon seks pada perempuan dapat meningkatkan GCF karena dapat mempertinggi permeabilitas pembuluh darah pada masa kehamilan, ovulasi, hormonal kontrasepsi yang meningkatkan produksi GCF
3. Secara klinis, stimulasi mekanikal seperti mengunyah dan menggosok gusi yang terlalu kuat dapat menstimulasi aliran GCF.
4. Merokok dapat memproduksi respon *immediate-transient* pada kondisi ini sel endotel berkontraksi memperlebar jarak *interendothelial cell* yang akan meningkatkan aliran GCF.

5. Terapi periodontal.

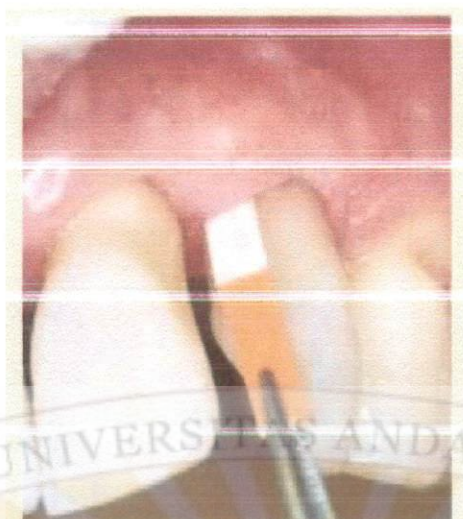
- a. Profilaksis oral dapat menurunkan aliran GCF selama satu minggu setelahnya, dan perlahan akan kembali seperti sebelum terapi dilakukan.
- b. Setelah prosedur operasi Periodontitis dilakukan, terjadi peningkatan GCF selama proses penyembuhan.

Didalam cairan sulkular dapat dianalisa adanya respon seluler dan humoral baik pada individu sehat maupun penderita penyakit periodontal. Adanya respon seluler ditandai dengan ditemuinya sitokin dari cairan sulkus diantaranya Interlukin-1 α , Interlukin 1 β yang menggambarkan peningkatan pengikatan PMN dan monosit ke sel –sel endotel,menstimulasi produksi *prostaglandin* PGE2 dan pelepasan enzim lisosomal, menstimulasi resopsi tulang. Interferon γ juga berperan protektif karena kemampuannya menghambat aktivitas resopsi tulang oleh Interlukin 1- β (Tonneti,1998; Zemans *et al.*, 2009).

2.3.3 Metode Pengumpulan GCF

Terdapat 4 metode dalam pengumpulan GCF yaitu *Twisted Threads*, *Micropipettes*, *Crevicular Washing* dan *Absorbing Paper Strip*. Dalam penelitian ini, akan menggunakan metode *Absorbing Paper Strip* yang merupakan penyerapan GCF dengan menggunakan *paper strip*.

Metode intra sulkular method yang mana ketika sulkus dimasukkan kedalam sulkus. Menurut Brill teknik memasukkan *paper strip* dari dalam poket sampai batas sulkus. Metode ini memperkenalkan derajat iritasi dari *epithelium* sulkular yang bisa memicu aliran cairan sulkular dengan sendirinya.



Gambar 2.11 Teknik Absorbing Paper, Intrасulcular Method (Brill, 1962 ; Shermin, 2011).

Cairan GCF yang terkumpul harus dievaluasi kembali dengan melalui tiga cara, yaitu;

- a. Penilaian langsung dan pewarnaan. Menurut Egelberg dan attstrom strip diwarnai dengan solusi alkohol dari ninhydrin dengan konsentrasi 0,2%. Area yang berwarna dapat diukur dengan kaliper skala.
- b. Dengan berat strip. Strip ditimbang sebelum pengumpulan dalam tabung plastik *microcentrifugation* yang disegel dan kemudian ditimbang lagi segera setelah pengumpulan sample.
- c. Menggunakan periotron. Merupakan perangkat elektronik untuk menghitung jumlah dari cairan yang terkumpul pada kertas filter, dikembangkan oleh Harco Electronics, HAR600. Keuntungan metode periotro ini yaitu; prosedurnya mudah, hasilnya dapat dilihat langsung, penilaiannya kuantitatif, cocok dengan analisa subsequent kimia, dan evaporasi atau penguapannya minimum. Kerugian metode ini yaitu kontaminasi dapat terjadi, dislokasi *paper strip* dapat mengganggu integritas dari jaringan tepi, ketika menggunakan periotron, harus berhati-hati saat memasukkan *paper strip* ke

dalam mesin pada posisi standar untuk mendapat hasil pembacaan yang benar.

Jumlah *Gingival Crevicular Fluid* yang dikumpulkan adalah :

- a. Menurut Cimasoni (1975) menyatakan bahwa suatu kertas strip dengan lebar 1,5mm dan 1mm ke dalam sulkus dari gingiva yang sedikit meradang menyerap cairan GCF sebanyak 0.1mg selama 3 menit.
- b. Challacombe (1980) menyatakan dengan menggunakan metode isotop dilution bahwa jumlah GCF yang ada pada manusia dengan indeks gingiva rata-rata kurang dari satu. Volume GCF dari permukaan proksimal gigi molar adalah 0,43 sampai 1,56ul.
- c. Western *et al* menjelaskan benang diletakkan pada krevikular gingiva disekeliling gigi dan jumlah GCF yang dikumpulkan telah diestimasi dengan menimbang benang sampel.

Crevicular Gingival Fluid merupakan eksudat inflamasi yang dapat dikumpulkan pada gingival margin atau ke dalam crevikular gingiva. Analisis *biochemical* dari GCF menawarkan cara yang noninvasif (tanpa operasi) dalam menilai respon *host* pada peradangan periodontal. Fase aktif dari proses peradangan periodontal dapat diukur dan dinilai berdasarkan konstituent cairan gingiva. Enzim bakteri, produk degradasi bakteri, produk degradasi jaringan ikat, enzim mediated *host*, *mediator inflammatory*, protein matirks ekstraseluler baik secara bersama atau individual dapat dideteksi pada kadar yang lebih tinggi didalam GCF selama fase aktif dari penyakit periodontal.

2.4. Penegakan Diagnosa Pada Penyakit Periodontal

2.3.4 Konvensional

Pemeriksaan pada gusi atau jaringan periodontal secara konvensional menggunakan alat yang disebut *periodontal probe*. Alat ini digunakan untuk mengukur kedalaman sulkus gusi (celah berbentuk V yang berada di antara gigi dan gusi). Kedalaman sulkus gusi yang normal berkisar antara 0-3 mm. Gingivitis atau periodontitis akan menyebabkan kedalaman sulkus bertambah dan membentuk poket. Semakin tinggi derajat keparahan penyakit, semakin dalam poket yang terbentuk. *Periodontal probe* juga dapat digunakan dalam menentukan derajat keparahan perdarahan pada gusi.

Periodontal Disease Index (PDI) menurut Russel, pengukuran krevikular ada 2 cara :

- a. Bila tepi gingiva berada pada enamel ukur jarak dari tepi gingiva ke batas semeto enamel (BSE). Bila epitel penyatu berada pada akar gigi dan BSE tidak teraba dengan *probe*, catat kedalaman sulkus gingiva pada mahkota. Kemudian ukur jarak dari tepi gingiva ke dasar saku, apabila *probe* dapat digeser ke apikal ke BSE tanpa hambatan atau menimbulkan rasa nyeri. Jarak BSE ke dasar saku dapat dihitung dengan mengurangi hasil pengukuran kedua (jarak tepi gingiva ke dasar saku) dengan hasil pertama (kedalaman sulkus pada mahkota gigi).
- b. Bila tepi gingiva berada pada sementum, ukur jarak dari BSE ke tepi gingiva. Kemudian, ukur jarak dari BSE ke dasar sulkus, besarnya kehilangan perlekatan adalah sebesar hasil

perhitungan kedua, sedangkan kedalaman saku dihitung dengan menjumlahkan hasil pengukuran pertama dengan hasil pengukuran kedua.

- 0 = Tidak ada tanda inflamasi.
- 1 = Perubahan inflamasi ringan sampai sedang.
- 2 = Gingivitis ringan sampai sedang, gingiva berwarna merah, oedema, dan berkilat, pada palpasi terjadi pendarahan.
- 3 = Gingivitis parah dengan warna merah menyala, pembesaran, kecenderungan mudah berdarah dan ulserasi.
- 4 = Bila salah satu dari dua sisi yang diukur, sulkus gingiva meluas 3mm, apikal dari BSE.
- 5 = Bila salah satu dari dua sisi yang diukur, sulkus gingiva meluas 3-6mm, apikal dari BSE.
- 6 = Bila sulkus gingiva pada salah satu sisi yang diukur lebih dari 6mm apikal dari BSE

Kriteria pengukuran 6 regio gigi (16, 21, 24, 36, 41 dan 44) mewakili indeks penyakit periodontal menurut Russel, apabila salah satu dari 6 regio gigi *missing* dapat diganti dengan gigi yang berada disebelahnya. Bila skor 0 berarti gingiva normal dan skor 1, 2, 3 menyatakan tingkat penyakit Gingivitis, serta untuk skor 4, 5, 6 menyatakan tingkat penyakit Periodontitis.

2.4.2 Pemeriksaan enzimatik sebagai pertanda dalam mendiagnosa penyakit Periodontal

Pemeriksaan enzimatik di dalam GCF diharapkan dapat menjadi pertanda dalam mendiagnosa tingkat keparahan penyakit Periodontal, dengan mengukur

secara obyektif dan dievaluasi sebagai indikator proses biologis normal, proses patogen, dan respon farmakologik pada intervensi terapi. Pengukuran enzimatik di dalam GCF menghasilkan pertanda yang menggambarkan orang sehat atau individu yang terkena penyakit Periodontal tertentu. Pertanda ini merupakan molekul yang dapat digunakan untuk memonitor status kesehatan, perjalanan penyakit, respon pengobatan dan hasil terapi. Pertanda yang informatif dapat lebih berfungsi sebagai penanda awal penyakit. Pertanda penyakit secara berurutan memainkan peran penting dalam ilmu kesehatan dalam menegakkan diagnosis, memonitor dan menilai keberhasilan terapi obat.

Pengukuran enzim sebagai pertanda dapat dilakukan pada bakteri dan produknya, inflamasi, enzim yang dilepaskan dari host, produk dari degradasi jaringan ikat, dan produk dari resorpsi tulang. Sumber spesimen dalam pemeriksaan pertanda dapat berupa seluruh saliva, GCF, plak dan serum dapat digunakan. Enzim yang dilepaskan dari host dapat dengan mudah diperoleh di dalam rongga mulut baik dari GCF atau dari saliva secara keseluruhan. Saliva terdiri dari sekresi kelenjar ludah dan cairan sulkus gingiva, deskuamasi sel epitel, mikroorganisme, serta *leucocytes* (Dawes, 1978).

Pemeriksaan saliva telah dilakukan oleh Todorovic (2006), menyatakan enzim yang berperan utama dalam degradasi jaringan, adalah: elastase, kolagenase, gelatinase, protease. Enzim intraseluler dilepaskan dari sel-sel yang rusak pada jaringan periodontal ke dalam GCF dan saliva, yaitu: *Aspartat* dan *Alanin Aminotransferase* (AST dan ALT), *Lactate Dehydrogenase* (LDH), *Gamma-Glutamil Transferase* (GGT), *Creatine Kinase* (CK) *Alkaline Phosphatase* (ALP), *Acid Phosphatase* (ACP).

Lactate Dehydrogenase dan *Aspartat Aminotransferase* dapat membantu memantau perkembangan penyakit periodontal. Enzim ini berguna untuk menguji aktivitas penyakit periodontal atau untuk mengukur efektivitas terapi periodontal (Kaufman *et al.*, 2000; Numabe, 2004 ; Ozmeric *et al.*, 2004). Meryam *et al* 2009 menemukan didalam penelitiannya bahwa tingkat *Aspartat Aminotransferase* tinggi pada periodontitis. Dan juga ditemukan tingkat *Lactate Dehydrogenase* yang tinggi pada pasien penyakit periodontal yang membandingkan subjek sehat dengan subjek Gingivitis.

Alkaline Phosphatase dan *Acid Phosphatase* adalah enzim intraseluler yang ada di sebagian besar jaringan dan organ, terutama di tulang. Aktivitas mereka meningkat dalam air liur adalah konsekuensi dari proses destruktif dalam tulang alveolar dalam stadium lanjut perkembangan penyakit periodontal sesuai dengan yang telah dibuktikan oleh beberapa penelitian sebelumnya yang menunjukkan korelasi positif antara aktivitas ALP dan persentase hilangnya tulang alveolar (Kaufman *et al.*, 2000; Ozmeric *et al.*, 2004). Data aktivitas *Acid Phosphatase* dalam cairan sulkus gingiva dan air liur pada penyakit periodontal belum ditemukan dalam literatur yang tersedia.

Peningkatan *Creatine Kinase*, *Lactate Dehydrogenase* , *Aspartat Aminotransferase* , *Alanin Aminotransferase* dan *Gamma-Glutamil Transferase* menunjukkan perubahan patologis yang terletak di jaringan lunak saja, terutama di gingiva yang merupakan tahap awal dari penyakit periodontal. Namun, meningkatnya aktivitas *Acid Phosphatase*, terutama *Alkaline Phosphatase*, menunjukkan bahwa proses patologis destruktif telah mempengaruhi tulang alveolar yang berarti penyakit periodontal telah tahap lebih lanjut dengan

prognosis lebih buruk. Aktivitas enzim-enzim dalam air liur dapat menjadi berguna untuk penilaian efisiensi mengubah terapi dalam menyembuhkan penyakit periodontal (Kaufman *et al.*, 2000, Numabe *et al.*, 2004; Ozmeric *et al.*, 2004).

Loss dan Tjoa (2005) meneliti potensial diagnostik markers Periodontitis yang ada dalam GCF. Penelitiannya mengidentifikasi delapan penanda berharga yang potensial, termasuk *Alkaline Phosphatase*, *Glukuronidase β* , *Cathepsin B*, *Kolagenase-2 (Matrix Metalloprotease, MMP-8)*, *Gelatinase (MMP-9)*, *Protease Dipeptidyl (DPP) II dan III*, dan *Elastase*. Menurut Scot *et al* 2008, di dalam GCF menunjukkan bahwa kadar *Substance P*, *cathepsin G*, *interleukin1- β* dan *Neutrofil Elastase* berpotensi sebagai penanda awal inflamasi gingiva.

Delapan jenis enzim yang dihasilkan oleh Host pada gingivitis dan periodontitis adalah *Aspartat*, *Acid Phosphatase*, *Alkaline Phosphatase*, *Alpha 1 Antitrypsin*, *Arylsulfate*, *Cathepsin B*, *Elastase Neutrofil*, *Matrix Metalloprotease*. *Aspartat Aminotransferase* adalah enzim sitoplasmik yang dikeluarkan jika sel mati. Peningkatan kadar *Aspartat Aminotransferase* pada periodontitis tidak dapat menunjukkan perjalanan penyakit. Pengukuran *Aspartat Aminotransferase* saja tidak cukup untuk dapat membedakan lokasi yang secara progresif terinflamasi dengan lokasi yang stabil tapi terinflamasi (Oringer, 2001).

Acid Phosphatase adalah enzim lisosomal yang berperan sebagai lisosomal marker. Jumlahnya 10-20 kali lebih banyak pada GCF dibandingkan serum. Sumber ACP adalah PMN, sel epitel yang terdeskuamasi, dan bakteri. Kadar *Acid Phosphatase* tidak menunjukkan hubungan dengan pengukuran keparahan dan aktivitas penyakit periodontal (Gupta, 2012).

Cathepsin B adalah enzim dari kelas proteinase sistein . Di GCF penghasil utama *cathepsin B* adalah makrofag. Konsentrasi *cathepsin B* meningkat pada penyakit periodontal ,tapi lebih rendah pada gingivitis .Pengukuran *Cathepsin* menunjukkan hubungan terhadap keparahan inflamasi namun tidak menunjukkan hubungan dengan aktivitas penyakit (Page,1992 ; Gupta,2012).

α 1-antitrypsin adalah enzim yang menginhibitor protease dan melindungi jaringan dari enzim yang dikeluarkan oleh sel-sel inflamasi terutama *Neutrophil Elastase*. Kadar *α 2-Macroglobulin*, *α 1-Antitrypsin*, *C-Reactive Protein*, *Cathepsin G*, *Elastase* yang terdapat dalam saliva dapat menunjukkan hubungan dengan status periodontal kecuali *antitrypsin* (Pederson,1995). Sedangkan aktivitas Arylsulfatase meningkat pada dua minggu pertama gingivitis, konstan setelahnya (Lamster,1985, Silva *et al.*, 2003) dan di GCF pada gingivitis dan periodontitis (Gupta,2012). Enzim β - Glucoronidase dinyatakan tidak berpengaruh terhadap penyakit periodontal (Totan *et al.*, 2006). *Citric acid* ditemukan tetapi tidak menunjukkan angka yang signifikan dengan tingkat keparahan penyakit periodontal (Caffese *et al.*, 1991). *Chondroitin sulphate* memiliki kadar yang berbeda di tiap jaringan, contohnya kadar *Chondroitin Sulphate* pada tulang alveolar , sementum rendah sedangkan pada ligamen periodontal dan gingiva lebih tinggi (William *et al.*, 2003). Enzim *Cystatin* ditemukan pada jaringan dan cairan tubuh termasuk saliva dan GCF, tetapi jumlahnya paling sedikit diantara enzim lainnya (Patil,2011).

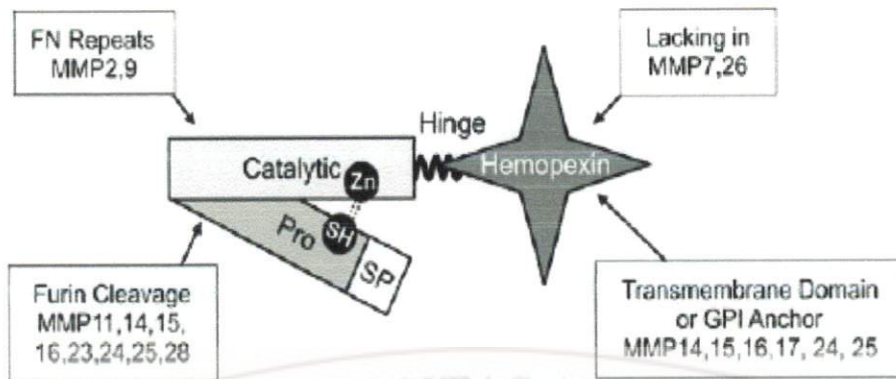
Produk enzim yang dihasilkan oleh Host, diambil tiga jenis enzim yang ikut meningkat dengan bertambah parahnya inflamasi penyakit periodontal adalah sebagai berikut

2.4.2.1 MMP-8

Matriks Metalloprotease pertama kali diidentifikasi pada vertebra oleh Jerome Gross dan Charles M. Lapiere pada tahun 1962 yang meneliti degradasi kolagen *triple-helical* selama metamorfosis kecebong (Krizkova *et al.*,2011). Matriks Metalloprotease(MMP), *Cysteine Proteases*, *Aspartic Proteases* dan *Serine Protease* merupakan enzim proteolisis yang terlibat dalam degradasi matriks ekstraseluler (Amalinei *et al.*,2010).

Terdapat lebih dari 26 famili MMP dan semuanya dapat dikelompokkan berdasarkan strukturnya (Amalinei *et.al.*,2010). Struktur MMP secara garis besar terdiri dari:

- a. sinyal *peptide* yang mengarahkan MMP untuk mensekresi atau jalur insersi membran plasma
- b. prodomain
- c. katalitik domain berikatan dengan zinc
- d. *domain hemopexin* yang menjadi perantara interaksi dengan substrat dan enzim spesifik
- e. region *hinge* yang berhubungan dengan katalitik dan *domain hemopexin* (Cao dan Zucker, 2007).



Gambar 2.12 Struktur MMP (Gill dan Parks, 2011)

MMP terbagi berdasarkan spesifisitas substrat, persamaan rangkaian dan organisasi domain, dibagi menjadi enam grup, yaitu: Kolagenase Gelatinase, Stromelysin, Matrilysin, *Membrane-type MMPs Transmembrane*, MMP lainnya (Amalinei, Caruntu dan Balan, 2007).

Tabel 2.3 Grup MMP

Kolagenase	• Kolagenase-1	MMP-1
	• Kolagenase-2	MMP-8
	• Kolagenase-3	MMP-13
Gelatinase	• Gelatinase-A	MMP-2
	• Gelatinase-B	MMP-9
Stromelysin	• Stromelysin-1 (progelatinase)	MMP-3
	• Stromelysin-2	MMP-10
	• Stromelysin-3	MMP-11
Matrylisin	• Matrylisin-1 (Uterine Matrylisin)	MMP-7
	• Matrylisin-2 (Endometase)	MMP-26
Membrane-type MMPs Transmembrane	• MT1-MMP	MMP-14
	• MT2-MMP	MMP-15
	• MT3-MMP	MMP-16
	• MT5-MMP	MMP-24
	• MT4-MMP	MMP-17
	• MT6-MMP (Leukolysin)	MMP-25
Lainnya :		MMP 14
	• Macrophage elastase	MMP – 12
	RASI-1	MMP – 19
	• Enamelysi	(MMP – 18)
XMMP (Xenopus)/Cy– MMP (Cynops)	• Femalysin	MMP – 21
	• CA-MMP	(MMP –23A)
	• CMMP (Gallus)	MMP – 22
	• Epilysin	MMP –23
		MMP –27
		MMP –28

MMP family, MMP-1 – MMP-28 (Amalinei, Caruntu dan Balan, 2007).

MMP disekresikan oleh bermacam *Connective Tissue* dan sel pro-inflamasi termasuk fibroblast, osteoblas, sel endotelial, makrofag, neutrophil dan limfosit (Verma and Hansch, 2007). Ekspresi aktivasi MMP dapat dikontrol pada

tingkat transkripsi gen oleh aktivasi proenzim dan inhibitor spesifik dan non spesifik. Kebanyakan MMP disekresi sebagai proenzim laten (*inactive zymogen*) yang mengalami pemecahan proteolysis di *amino-terminal domain* saat aktivasi (Charoenrat, Rhys-Evans dan Eccles, 2001; Amalinei, Caruntu dan Balan, 2007). *Matrix Metalloprotease* (MMP) dianggap sebagai protease primer yang terlibat dalam destruksi jaringan periodontal oleh degradasi sel matriks molekul ekstraseluler. MMP adalah famili dari Proteolitik Enzim yang ditemukan dalam netrofil, makrofag, fibroblas, sel epitel, osteoblas dan osteoklas yang mendegradasi matriks molekul ekstraseluler. Proteinase dapat mengaktivasi MMP, diinaktifkan oleh α -*macroglobulin* yang ditemukan dalam serum, GCF, saliva dan juga oleh inhibitor jaringan dari MMP (TIMP) yang ditemukan pada jaringan *host* dan cairan tubuh (Nagase *et al.*, 2006).

MMP merupakan family *zinc dependent endoprotease*, kumpulan besar enzim yang bertanggung jawab terhadap *remodelling* jaringan dan degradasi berbagai komponen dari matriks ekstraseluler, termasuk kolagen, elastin, gelatin, matriks glikoprotein dan proteoglikan (Surlin, 2000 ; Verma and Hansch, 2007; Angulo *et al.*, 2011). Antara kondisi fisiologis dan patologis, ekspresi MMP akan cepat terangsang ketika *remodeling* jaringan diperlukan (Decock *et al.*, 2008). MMP mempunyai peranan pada embriogenesis dan kondisi fisiologis lainnya seperti proliferasi, mortalitas sel, *remodeling*, penyembuhan luka dan proses reproduksi seperti ovulasi, implantasi embrio, proliferasi endometrium, involusi uterus, payudara serta prostat (Amalinei, Caruntu dan Balan, 2007).

Matriks ekstraseluler adalah sekumpulan protein fibrosa yang melekat

pada gel polisakarida terhidrasi. Untuk matriks yang lebih khusus, seperti kartilago dan tulang, maka matriks ekstraseluler disekresi oleh sel-sel yang berdeferensiasi lebih tinggi yaitu osteoblast, yang membentuk tulang (Lopes,2007) dan kondroisit yang membentuk kartilago (Dorland,2007). Komponen matriks ekstraseluler berupa protein jaringan, antara lain kolagen, fibronektin dan glikosaminoglikan yang berkaitan dengan protein membentuk proteoglikan. Protein-protein ini yang bertanggung jawab atas integritas struktural dari jaringan pendukung gigi, kerusakan dari jaringan pendukung ini ditandai dengan degradasi matriks ekstraseluler yang dapat menyebabkan kerusakan permanen dari jaringan lunak (Kerrigan, 2000).

Secara kolektif, kesemua famili MMP dapat mendegradasi semua komponen matriks ekstraseluler dan membran basalis epitel. Masing-masing komponen matriks ekstraseluler dapat dipecah oleh kelompok MMP atau MMP yang spesifik (Ahmed dan Mohammed, 2011). MMP berperan pada beberapa proses patofisiologi yang kompleks, antara lain:

- destruksi jaringan, misalnya pada invasi dan metastasis kanker, reumatoid artritis, osteoartritis, ulkus dekubitus, ulser gastrikus, ulserasi kornea, penyakit periodontal, kerusakan otak dan penyakit neuroinflamasi.
- fibrosis, misalnya pada sirosis hepatitis, fibrosis paru, otosklerosis, aterosklerosis, dan *multiple sclerosis*.

MMP disekresikan dalam bentuk inaktif (laten). Aktivitas enzim dalam jaringan dikontrol oleh kadar enzim inhibitor yang ada. Suatu mekanisme dari aktivasi MMP melibatkan pembelahan proteolitik dari satu porsi MMP. Protease

disebut juga proteinase

atau peptidase, merupakan enzim golongan hidrolase yang akan memecah protein menjadi molekul yang lebih sederhana, terdapat enam jenis aktivitas katalitik spesifik dari enzim protease, yaitu serina-, treonina-, sisteina-, aspartat-, glutamat-, dan metalo-peptidase. Dalam kompetisi pada area hydroxamic acid MMP inhibitor, ada bagian yang penting yaitu *zinc binding group (ZBGs)*. Yang paling mempengaruhi adalah *carboxylic acid* dan *thiol ZBGs*. Walaupun carboxylate group adalah grup yang kurang efektif dalam berikatan dengan zinc, banyak *carboxylate* yang menjadi inhibitor MMP dan beberapa merupakan kandidat klinis yang paling memungkinkan. (Imanschi *et al* ,2000).

Aktivitas MMP diatur pada tiga tahap yaitu transkripsi, aktivasi *zimogen precursor* dan inhibisi oleh inhibitor terutama *Tissue Inhibitors of Metalloproteases (TIMPs)* dan protease inhibitor non spesifik. Enzim yang dapat memecah kolagen yang merupakan komponen terbesar dari matriks ekstraseluler yaitu kolagenase (Matriks Metaloprotease/ MMP), misalnya MMP-1, -8, dan -13 (Ingman T, *et al* ., 2005). MMP merupakan enzim proteolitik didalam proses proteasanya dengan memecah proteolitik dari gugus-amino pada rantai propeptida yang terdapat pada patogen periodontal yang terinfeksi, hal ini akan mengaktifkan MMPs inaktif. MMPs aktif ini akan terlibat di dalam degradasi ligamentum periodontal dan degradasi matriks kolagen interstitial ekstraseluler, yaitu kolagen interstitial dan kolagen membrana basalis, fibronectin, laminin dan proteoglikan. (Hansen, 1995, Ingman *et al.*, 1996, Kusukawa *et al.*, 1995, Wahyukundari 2009).

Aksi dari MMP diatur oleh inhibitor spesifik yaitu *Tissue Inhibitor Metalloprotease* (TIMP). Dikenal ada 4 TIMP dan berperan kuat dalam mengatur mekanisme aktivasi dan fungsi MMP, yaitu: TIMP-1, -2, -3, dan -4. Yang paling banyak diteliti adalah TIMP-1, suatu glikoprotein yang disintesis oleh kebanyakan sel jaringan ikat. TIMP menghambat aksi dari MMP dengan cara mengikat sisi aktifnya. TIMP-1 dapat menghambat kolagenase MMP-8 dan gelatinase. TIMP-2 mengikat MMP-2 dan juga menghambat aktivitas MMP-1, MMP-3, MMP-7 dan MMP-9. Keseimbangan local antara enzim MMP dan inhibitorynya merupakan factor yang sangat penting dalam invasi penyakit periodontal (Hayakawa, 1998; Nagase *et al.*, 2006; Wang, 2011).

TIMP-1 menghambat semua jenis MMP kecuali MMP-14. Pada jaringan periodontal yang sehat, kadar TIMP biasanya lebih tinggi dibanding jaringan periodontal yang mengalami inflamasi. Telah diyakini oleh beberapa peneliti bahwa TIMP berguna untuk membatasi resorpsi tulang. Apabila kadar TIMP-1 di daerah resorpsi menurun, resorpsi tulang akan meningkat. Pada sisi aposisi, kadar TIMP-1 meningkat sehingga resorpsi akan menurun. Tetapi pada umumnya kadar MMP dan TIMP pada daerah resorpsi tulang alveolar lebih tinggi dibanding dengan kontrol pada jaringan pendukung gigi yang sehat (Bildt *et al.*, 2009).

Menurut Verstappen dan Ejeil (2006), aktivitas dari MMP dikontrol oleh TIMP, memainkan peran yang sangat penting dalam remodeling fisiologis dari periodontium. TIMP-1 merupakan protein yang dikode oleh familia gen TIMP yang menjadi inhibitor alami untuk Matriks Metalloprotease (MMP).

Matrix Metalloprotease (MMP) terlibat pada penyakit periodontal dimulai dari oral patogen yang menyerang jaringan pendukung, akan menyebabkan

perkembangan penyakit periodontal yang tergantung respon inflamasi individu sebagai faktor utama. Pada patogenesis penyakit Periodontal, sel kekebalan yang bertanggung jawab adalah *CD+ T cells*, yang dipengaruhi faktor eksogennya dominan oleh *P. Gingivalis* yang terdapat dalam plak gigi. Selanjutnya monosit, makrofag, dan fibroblas akan menghasilkan sitokin berupa $\text{TNF-}\alpha$ dan $\text{IL-1}\beta$ yang terdapat pada jaringan periodontal dan saliva di penyakit periodontal. Sitokin merupakan reaksi biokimia (protein regulator) pada peradangan yang akan memicu produksi MMP, *prostaglandin*, dan osteoklas yang mempunyai hasil akhir berupa kerusakan permanen pada gigi, jaringan lunak pendukung, dan tulang alveolar. (Caranza, ed 10th p.265-266,2011).

Matrix Metalloprotease (MMPs) adalah bagian yang paling penting dari protease yang berpartisipasi dalam pergantian normal jaringan periodontal serta aspek degradatif selama penyakit periodontal. Beberapa bagian matriks metaloprotease (MMPs) dan *tissue inhibitor* juga diidentifikasi pada saliva. (Zia A *et al.*, 2011).

Matriks Metalloproteinase (MMP) tidak hanya mendegradasi hampir semua matriks ekstraselular dan komponen membrane basal tapi juga *growth factor*, reseptor permukaan sel, sitokin proinflamasi sehingga mengakibatkan pengaturan sel dan penghantaran sinyal. Sebagai tambahan, MMP terlibat erat pada kondisi patologik seperti *Rheumatoid Arthritis*, invasi tumor dan metastasis, infeksi pernapasan kronis, penyakit periodontal dan penyakit mata (dirangkum oleh Apajalahti, 2004). Berdasarkan strukturnya, MMP dapat dibagi menjadi kolagenase, gelatinase, stomelisin, matrilisin. Salah satu jenis Matriks metalloproteinase yaitu kolagenase merupakan subfamilia MMP terdiri atas

kolagenase-1 (MMP-1) kolagenase-2 (MMP-8) dan Kolagenase-3 (MMP-13). Kolagenase mempunyai kemampuan dalam memecah kolagen tipe I, II dan III (Muphy, 1992, Herman *et al* 2001)

Chen *et al* (2000) melaporkan peningkatan tingkat kolagenase neutrophil aktif dalam saliva pasien Periodontitis. Bentuk aktif MMP-8 dan MMP-13 di dalam saliva dinyatakan memberikan dampak untuk aktivitas kolagenase. Surlin (2010) menyatakan MMP-8 adalah bagian dari famili *Zinc-dependent endopeptidase* yang berperan dalam pengrusakan kolagen tipe I. Enzim MMP-8 ini dihasilkan pada penyakit periodontal yang berpotensi merusak jaringan penyangga gigi dengan cara merusak kolagen tipe I (Rams, 2000; Apajahlati, 2004). *Cathepsin G* adalah protease bakteri yang juga dapat berfungsi mengaktifasi MMP-8. MMP-8 disebut juga enzim kolagenase yaitu enzim yang dapat memecah kolagen pada peristiwa remodeling jaringan dengan *cofactor zinc*.

Secara fisiologis, MMP- 8 dan TIMP-1 (sebagai pengontrol) telah ada dalam jaringan periodontal, namun bila tak ada keseimbangan antara MMP-8 dengan TIMP-1 maka akan terjadi peristiwa patogen pada jaringan periodontal, dimana jumlah MMP-8 akan meningkat dan terjadi degradasi matriks ekstraseluler (Hayakawa, 1998; Borboulia 2010). Seperti kolagen, gelatin dan elastin, MMP-8 diproduksi oleh infiltrasi netrofil, MMP-8 juga diproduksi oleh patogen periodontal *P.Gingivalis* dan *A.Actinomycetemcomitans* walaupun tidak dianggap sebagai faktor mayor dalam proses peradangan. Kolagenase meningkat dalam jaringan, saliva, dan GCF terkait dengan Periodontitis .

Kinae *et al* 2003 dan Mantyla *et al* 2003 menyatakan peningkatan MMP-8 di dalam saliva dapat membantu mendiagnosa dan diharapkan memantau

keberhasilan terapi. Kadar MMP-8 yang ditemukan, menunjukkan MMP-8 mempunyai nilai sensitivitas 0,83 dan spesifisitas 0,96 untuk membedakan periodontitis dari gingivitis dan gingiva sehat. Kadar MMP-8 menurut penelitian Mantyla *et al* (2003) menunjukkan pada kondisi Periodontitis sekitar 2500 μ g/L, pada gingivitis sekitar 750 μ g/L dan pada kondisi sehat sekitar 100 μ g/L.

Pada lingkungan pH netral MMP-8 diaktifkan ketika dipecah oleh protein ekstraseluler. Enzim ini disimpan dalam granuler sekunder dari netrofil yang diaktivasi dengan pemecahan autolitik. MMP-8 berfungsi mendegradasi kolagen I, II dan III (Nagase, 2006). Jaringan periodontal pada gingiva salah satunya tersusun atas jaringan ikat kolagen yang padat. Fungsi utama serat kolagen adalah menambah kekuatan pada jaringan ikat. (Geneser, 2000). Jaringan ikat dari gingiva tepi dipadati dengan kolagen, mengandung bundel serat kolagen yang mencolok yaitu serat gingival. Serat gingival terdiri dari kolagen tipe I, fungsinya antara lain untuk:

1. Mengencangkan gingiva tepi dengan kuat melawan terhadap gigi
2. Menyediakan kekakuan yang diperlukan untuk menahan kekuatan mastikasi tanpa perlu dihindari dari permukaan gigi
3. Menyatukan free marginal gingiva dengan sementum dari akar dan berdekatan attached gingiva. (Newman *et al.*, 2002)

Kolagenase adalah peristiwa untuk memecah kolagen yang berasal dari jaringan fibroblas. Proses kolagenase yang diperankan oleh produk bakteri patogen yang hasilnya berupa enzim-enzim kolagenase dan produk-produk inflamasi antara lain PMN, sehingga dapat meningkatkan MMP-8 yang tidak diimbangi dengan aktifitas TIMP-1 sebagai pengontrol. Hal ini merupakan proses

terjadinya penyakit periodontal dengan mengaktifkan MMPs sebagai awal dipecah menjadi MMP-8 yang akan mempercepat degradasi kolagen tipe I pada jaringan periodontal (DeCarlo *et al.*, 1997; Wahyukundari 2009).

Chung *et al* (2004) meneliti mekanisme kolagenase dalam mendegradasi jaringan kolagen. Pada penelitiannya secara *in vitro*, digunakan dua substrat, yaitu kolagen tipe I (kolagen fibril dari kulit dan tulang hewan) dan gelatin. Grup yang termasuk kolagenase adalah MMP-1, MMP-8, MMP-13 dan MMP-18 dan yang termasuk Gelatinase adalah MMP-2 dan MMP-9 (Sternlicht and Werb, 2001). Pada perbedaan substrat ini MMP-8 mempunyai aktifitas yang tinggi pada kolagen 1 dibandingkan dengan Gelatin, sehingga ini membuktikan bahwa MMP-8 lebih efektif bekerja pada kolagen.

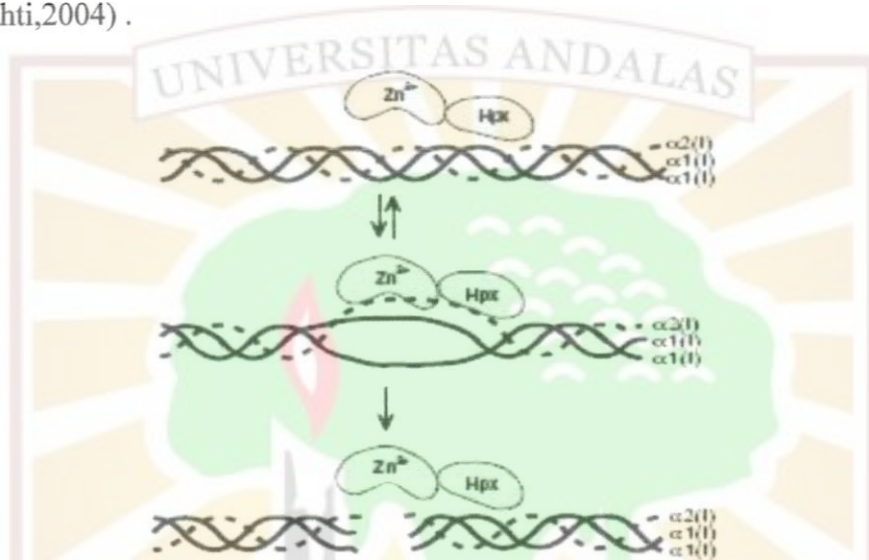
MMP-8 disekresi dari sel sebagai proenzim laten dan diaktivasi *in vivo* secara ekstraseluler. Pada pengsekresian proenzim laten, residu cysteine pada domain propeptida berikatan secara kovalen terhadap Zn^{2+} pada domain katalitik. Pada aktivasi proteolitik, ikatan kovalen tersebut terganggu dan domain propeptida dipotong. MMP-8 dapat memecah tripoliptida pada suhu tubuh $37^{\circ}C$ bahkan $10^{\circ}C$ dan $4^{\circ}C$ lebih sedikit kolagen yang terpecah (Apajalahti, 2004).

Menurut Chung *et al* (2004) MMP-8 mempunyai tiga domain penting pada struktur primernya yaitu:

- a. domain propeptida yang hilang pada saat aktivasi
- b. domain katalitik mengandung Zn^{2+} binding site
- c. C-terminal domain *hemopexin*.

Saat aktivasi MMP-8 domain propeptida akan hilang sedangkan domain katalitik yang mengandung Zn pada sisi aktifnya berikatan dengan substrat kolagen.

Kemudian MMP-8 pada bagian ini akan menggerakkan substrat kolagen *triple helix* (3 rantai polipeptida) yang kaku, akibatnya terputuslah untuk pertama kali ikatan residu asam amino Gly775-Ile776 pada $\alpha 1$ dan selanjutnya ikatan antar dan Gly775-Leu776 pada $\alpha 2(I)$ terhidrolisa dan terputus, sehingga rantai terpecah menjadi dua fragmen, C terminal $\frac{1}{4}$ fragmen dan $\frac{3}{4}$ fragmen pada N terminal (Apajalahti,2004) .



Gambar 2.13 Langkah-langkah pemecahan kolagen oleh kolagenase. Kolagenase mengikat pada kolagen sebelum memecah triple-helix kolagen (Chung *et al.*2004)

MMP-8 awalnya dianggap terbatas pada netrofil, tetapi dapat juga dideteksi pada kondroisit dari kartilago osteoarthritis, fibroblas sinovial dan sel endotel, sel odontoblas dan sel pulpa gigi. (Sasano, 2002). Fungsi dari MMP-8 antara lain adalah berhubungan dalam proses proteolisis, proses katabolik kolagen, metabolisme peptidoglikan (merupakan metabolisme dari dinding sel pada bakteri gram positif dan gram negatif yang mengaktifkan komplemen, aktivitas immunosupresif, menstimulasi resorpsi tulang, dan menstimulasi makrofag menghasilkan *prostaglandin* dan kolagenase). MMP-8 adalah protein yang diharapkan mempunyai fungsi molekuler aktivitas kolagenase netrofil, ikatan ion

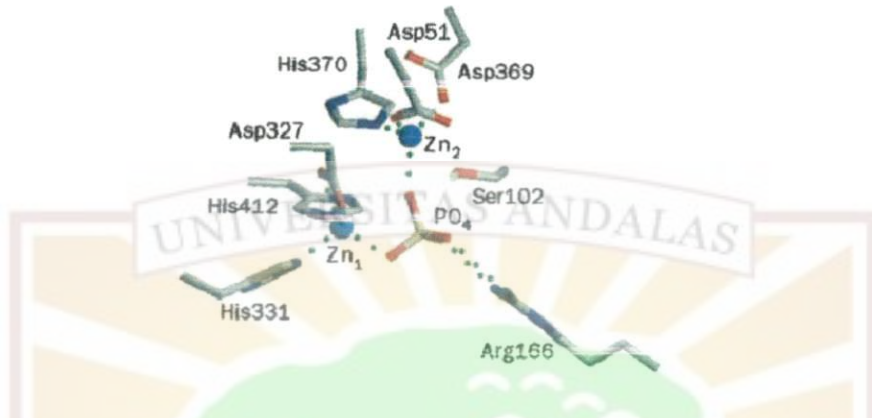
zinc, ikatan ion kalsium, aktivitas kolagenasi interstisial, aktivitas metalloendopeptase, terlokalisasi di ruang ekstraseluler, matriks ekstraseluler proteinaseus dan matriks ekstraseluler (Palosaari, 2000).

Penggunaan MMP-8 penting dalam bidang biomedis adalah dalam perbaikan radang pada jaringan, transplantasi klinis, fungsi seluler dalam penggumpalan darah, fibrinolisis dan fertilisasi. Kolagenase dari neutrofil darah perifer digunakan sebagai kontrol positif untuk MMP-8. Aktivitas MMP-8 di dalam saliva sebanyak 18 kali lebih tinggi pada tingkat Periodontitis yang parah dibandingkan penyakit periodontal awal. Prognosa diharapkan setelah perawatan periodontal, aktivitas kolagenase berkurang secara drastis yang sebanding dengan peningkatan kesehatan periodontal yang ditandai dengan penurunan kedalaman poket. Ambang batas yang disarankan adalah 80 *nano units* aktivitas MMP-8 pada pasien dengan Periodontitis parah, yang bisa membantu untuk *screening* atau tujuan diagnosis. MMP-8 aktif bisa di deteksi dalam dengan SBA (*Soluble Biotinylated-Collagen Assays*). Dan pemeriksaan ini bersifat spesifik, simple, cepat, direproduksi dan dapat digunakan dalam diagnosa, rencana perawatan dari pasien dengan Periodontitis tahap lanjut. (Mantyla *et al.*, 2003).

2.4.2.2 Alkaline Phosphatase

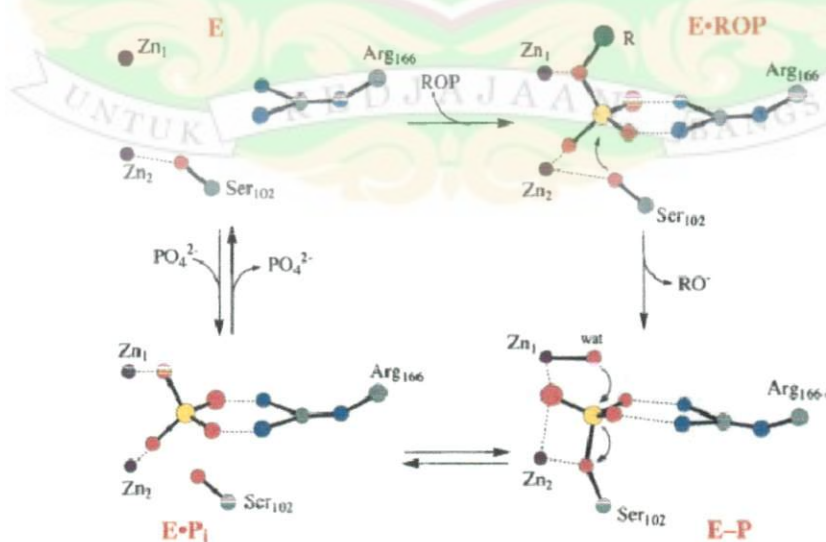
Alkaline Phosphatase (ALP) adalah *homodimeric metalloenzyme* yang mengkatalis hidrolisis fosfat monoester nonspesifik menjadi fosfat inorganik dan alkohol. Strukturnya berdimensi 100 Å x 50 Å x 50 Å dengan situs aktif berjarak 30Å dari masing-masing sisi berlawanan dari molekul . Setiap situs aktif memiliki 2 ikatan ion Zn (Zn1 dan Zn2) dan satu ion Mg. Tiga ikatan logam membentuk segitiga dengan dua ion zinc 4 Å jaraknya dan ikatan magnesium

berada 5 Å dari Zn₂ dan 7 Å dari Zn₁. Situs aktif dengan ikatan fosfat inorganik dangkal dan tiga ion logam dibatasi oleh Arg-166 dan Ser-102 (Holtz *et al*.,1999).



Gambar 2.14 struktur *Alkaline Phosphatase* (Holtz *et al*.,1999)

Menurut Kim dan Wyckhoff (1991) , Malhotra (2010) berdasarkan struktur enzim dengan ikatan fosfat, merumuskan reaksi mekanisme kerja ALP. Enzim ini berinteraksi dengan *Phosphomonoester* (ROP) untuk membentuk *Michaelis enzyme – substrat complex* (E- ROP). Kemudian dipecah karena benturan *nucleophilic* dari Serine-102 pada gugus fosfat substrat membentuk *phospho-enzyme intermediat* yang kovalen(E-P). Kompleks kovalen ini berubah menjadi kompleks *non covalent phosphate complex* (E-Pi).



Gambar 2.15 Mekanisme Kerja ALP (Kim and Wyckhoff, 1991)

Manusia memiliki 4 jenis ALP yang berespon terhadap ALP yang berasal dari *intestinal, placental, placental like* dan hati, tulang, ginjal (Mess DW, 1992). Millan 2006, menyatakan ada empat jenis ALP dalam tubuh manusia yaitu *Tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP)*, *Placental Alkaline Phosphatase (PLAP)*, *Germ Cell Alkaline Phosphatase (GCAP)*, dan *Intestinal Alkaline Phosphatase (IAP)* seperti yang dirangkum dalam tabel dibawah ini :

Tabel. 2.4 Jenis ALP pada Manusia

	Accession numbers	Protein names	Common names, synonyms	Tissue distribution	Function
Human genes					
ALPL	NM_000478	TNAP	Tissue-nonspecific alkaline phosphatase; TNSALP; "Bliver-bone-kidney type" AP	Developing nervous system, skeletal tissues, liver, kidney	Bone mineralization
ALPP	NM_001032	PLAP	Placental alkaline phosphatase; PLALP	Syncytiotrophoblast, a variety of tumors	Unknown
ALPP2	NM_031313	GCAP	Germ cell alkaline phosphatase, GCALP	Testis, malignant trophoblasts, testicular cancer	Unknown
ALPI	NM_001631	IAP	Intestinal alkaline phosphatase, IALP	gut, influenced by fat feeding and ABO status	Intestinal absorption?

Tipe ALP pada Tubuh Manusia (Millan, 2006)

Sumber utama ALP adalah neutrofil. Osteoblast, fibroblast, dan bakteri anaerob negatif juga menghasilkan ALP. Keberadaan ALP yang berasal dari bakteri mengindikasikan lokasi infeksi bakteri (Baggiolini, 1972). Chapple *et al* (1996) dan Carranza (2006) mengatakan bahwa ALP berkontribusi lebih dari 80% daripada enzim-enzim yang ada pada GCF. Chapple *et al* (1996) dan Dabra (2012) meneliti kadar ALP di dalam GCF meningkat signifikan pada pasien gingivitis diawali dengan pemeriksaan Gingival Indeks (GI). Ada 5 spesies yang

terdeteksi di dalam ALP *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *Dentin P. gingivalis* and *C. ochracea*. Diantara enzim yang ada di GCF, *alkaline phosphatase* atau *ortofosfat monoester phosphohydrolase* adalah salah satu yang pertama teridentifikasi yang merupakan glikoprotein membran-terikat diproduksi oleh sel sel dalam periodensium dan selah gingiva. Sel sel tersebut yaitu Neutrofil polimorfonuklear selama peradangan, osteoblas selama pembentukan tulang dan fibroblas ligamen periodental selama regenerasi periodental. Maka terjadi keterlibatan ganda dalam proses inflamasi periodontal dan penyembuhan / regenerasi. (Perinetti *et al*, 2009)

Gao *et al* (1999) menyatakan bahwa aktivitas ALP paling tinggi di osteoblast, sedang di periodental ligament fibroblast, rendah di gingival osteoblast. Hasil penelitian Dabra (2012) menunjukkan bahwa rata-rata pada orang sehat adalah 24.95 IU/L. Peningkatan aktivitas pada penyakit periodontal adalah karena meningkatnya inflamasi dan *bone turn over rate* (Al-Rawi *et al*, 2011). *Bone turn over* adalah proses sirkulasi tulang dimana osteoklas bekerja menghancurkan tulang dan osteoblas membangun kembali tulang. Pada periodontitis, terjadinya peningkatan *bone turn over* merupakan peningkatan kerja osteoklas dalam menghancurkan tulang (Seibel, 2005).

Fosfatase alkali (*Alkaline Phosphatase*, ALP) merupakan enzim yang diproduksi terutama oleh epitel hati dan osteoblas (sel-sel pembentuk tulang baru); enzim ini juga berasal dari usus, tubulus proksimalis ginjal, plasenta dan kelenjar susu yang sedang membuat air susu. Jika ditemukan kadar ALP yang tinggi pada anak, baik sebelum maupun sesudah pubertas, hal ini adalah normal karena pertumbuhan tulang (fisiologis).

Alkaline Phosphatase adalah membrane glikoprotein terikat yang terlibat dalam pemeliharaan tulang alveolar dan pembaharuan dari ligament periodontal. Pada GCF, diyakini berpangkal utamanya dari leukosit polimorfonuklear (PMN), dengan *cofactor* magnesium. Tingkat yang sama *alkaline phosphatase* pada GCF telah ditemukan dalam kesehatan gingiva dan eksperimental gingivitis, namun sebuah studi longitudinal menunjukkan bahwa peningkatan kadar *alkaline phosphatase* diawali kehilangan perlekatan klinis dan jumlah total *Alkaline Phosphatase* pada GCF secara signifikan lebih tinggi pada situs aktif (Nakashima 1996; Ranjan *et al.*, 2010).

GCF terbentuk dari mikrosirkulasi dari jaringan periodontal dan masuk ke sulkus atau poket. Sebagai cairan yang ada pada proses peradangan jaringan, memicu enzim dan molekul lain berperan dalam proses destruktif dan degradasi sel. Selain itu juga ditemukan beberapa produk dari PMN, makrofag dan sel plasma (Zappa, 2000).

ALP disimpan dalam granula spesifik dan vesikula sekretori neutrofil dan paling banyak dilepaskan selama migrasi mereka ke tempat infeksi. ALP menyebabkan mineralisasi tulang dengan melepaskan fosfat organik dan dengan hidrolisis pirofosfat anorganik, sebagai penghambat yang ampuh dalam pembentukan kristal apatit hidroksi dan terapatnya (Daltabon *et al.*, 2006).

ALP mengatur proses mineralisasi, ALP meningkatkan konsentrasi fosfor, hal ini akan menghambat kerja inhibitor pertumbuhan hidroksi apatit dan *phosphoprotein* (Bart, 2008). ALP mengikat dan mengatur pengendapan kalsium dan fosfat dengan mengatur jumlah dari hidroksiapatit yang terbentuk (Paggat, 2010). Fungsi ALP, pertama teridentifikasi untuk menunjukkan lokasi

peradangan. Tahap selanjutnya adalah sewaktu Osteoblas membentuk tulang, dan fibroblas meregenerasi ligamen periodontal, produksi ALP semakin meningkat.

ALP adalah enzim yang sensitif pada pH tinggi. Brunnel (1973) menyatakan bahwa pH optimum ALP adalah 10. Menurut Dean (2006), laju hidrolisis substrat oleh ALP meningkat enam kali lebih tinggi dari pH 7 ke pH 9. Produk hidrolisisnya berupa *p* nitrophenil phosphate terdiri dari inorganic phosphate (Pi) dan *p* nitrophenol yang merupakan inhibitor kompetitif ALP. Molekul inhibitor melekat secara reversible pada substrate binding site pada enzim yang mencegah perlekatan substrat. Inhibitor ALP adalah L-isomer asam amino *phenylalanine* (Dean, 2006). Belle (1976) dan Scheibe (2000) menyatakan *levamisole* adalah inhibitor ALP. Sedangkan Rufo *et al* (1972) dan Kozlenkov (2004) berpendapat bahwa *L-Homocysteine* juga merupakan inhibitor. Dean (2006) juga menyatakan bahwa cofactor ALP adalah Mg^{2+} dan Zn^{2+} . ALP adalah dimer yang identik di setiap subunitnya. Setiap sub unit memiliki atom Zn yang berikatan rapat yang berkontribusi dalam integritas structural polipeptida dan ikatan Zn yang kurang rapat digunakan untuk katalisis. Setiap subunit juga memiliki binding site yang berbeda untuk ion Mg^{2+} yang menstimulasi aktivitas enzimatik (Bretaudiere *et al.*, 1994). Substrat ALP adalah *p* nitrophenyl phosphate (Nakashima 1994; Dean 2006), dan diaktivasi oleh Mg^{2+} (Brunnel, 1973; Farah 2012).

Aktifitas ALP sangat penting bagi klinisi karena modifikasi enzimatik yang terjadi pada GCF lebih awal terdeteksi dibandingkan modifikasi secara klinis terlihat pada kerusakan jaringan. ALP di GCF diukur dengan menggunakan metode kolorimetri pNPP yang dapat menunjukkan bahwa tingkat enzim dalam

GCF tiga kali lebih besar daripada didalam serum. ALP juga menunjukkan hubungan yang signifikan antara konsentrasi ALP di GCF dan poket gusi . Hal ini menunjukkan bahwa ALP sangat aktif dalam jaringan (Ichikawa,1970;Usal *et al.*, 2008;Malhotra *et al.*, 2010).

GCF yang dikumpulkan dari jaringan yang terinflamasi menunjukkan kadar enzim yang tinggi seperti; *Neutrofil Elastase* (NE), *Alkaline Phosphatase* (AP), dan *Aspartat Aminotransferase* (AST) . *Alkaline Phosphatase* telah diukur kadarnya di dalam GCF untuk menguji hubungan antara kondisi penyakit periodontal dan aktivitasnya (Myriam, 2009).

Pada penelitian Myriam *et al* (2009) menyatakan *Alkaline Phosphatase* tidak bisa dibedakan antara pasien dengan gingivitis dan pasien sehat sebagai kontrol,tetapi dipenelitian sebelumnya Nakashima *et al* (1994), Usal *et al* (2008) dan Koss (2009) dilaporkan bahwa lebih tinggi kadar *Alkaline Phosphatase* di gingiva yang terinflamasi daripada gingiva sehat.

Kumar and Sharma (2011) telah melakukan penelitian dengan membandingkan sample sehat, gingivitis, dan peridontitis yang menyatakan bahwa peningkatan *Alkaline Phosphatase* dapat digunakan sebagai penanda dalam memantau penyakit periodontal.

2.4.2.3 Neutrofil Elastase

Neutrophyl Elastase (NE) adalah enzim hidrolitik yang berfungsi dalam degradasi material asing yang ditelan dalam proses fagositik. NE adalah protein serin dan mengandung rantai tunggal polipeptida dasar dari 218 residu asam amino yang disatukan oleh empat ikatan disulfide. NE juga memiliki dua rantai asparagines yang terikat dengan karbohidrat (Barret, 1981).

Neutrofil Elastase juga dikenal sebagai ELA2 (elastase 2, neutrofil) merupakan asam amino protease yang sama seperti *chymotrypsin* yang memiliki substrat spesifik yang luas. *Neutrofil Elastase* di sekresikan oleh neutrofil dan makrofag selama peradangan, menghancurkan bakteri dan jaringan gingiva, yang mempunyai *cofactor* zinc dan magnesium. (Belaaouaj, 2000)

Neutrofil Elastase merupakan grup enzim serine proteinase. Tempat aktifnya pada asam amino, yaitu Asparagin, Histidin dan Serin. Substrat NE adalah elastin, collagen tipe III, IV, VI, dan VIII, *fibronectin*, *laminin I*, *Thrombospondin*, *proteoglicans* (Uitto *et al.*, 2003). Aktivitas NE juga diinhibisi secara *irreversible* jika membentuk kompleks dengan α -1 antitrypsin. α -1 antitrypsin merupakan protein darah yang dihasilkan oleh liver/hati . juga diproduksi oleh monosit (Freonese, 2008).

Neutrofil Elastase adalah proteinase yang dikeluarkan dari granula *azurophilic* yang merupakan indikator aktivitas *neutrophyl* (Loss, 2000). Gingiva yang inflamasi adalah sumber utama dimana *Neutrofil Elastase* terdeteksi di rongga mulut (Cox, 2006). Bekerja optimum pada pH 7-9. NE bekerja pada elastin, *proteoglycans*, *haemoglobin*, fibrinogen, and kolagen. NE mendegradasi serat-serat kolagen. Elastin adalah komponen protein jaringan yang memberikan elastisitas pada arteri , paru paru, kandung kemih, kulit, ligament, dan kartilago . Elastin memberikan kemampuan jaringan untuk meregang dan mendukung kesehatan sel (Daamen 2007; Almine *et al.*, 2010).

Neutrofil Elastase diinhibisi oleh *Serine Leucocyte Protease Inhibitor* (SLPI) yang ditemukan pada sekresi mucus dan glandula saliva. sumber utama SLPI sebagai inhibitor utama di GCF dihasilkan dan dilepaskan oleh sel *epithelial*

(Cox,2000). SLPI mempengaruhi aktivitas *Neutrofil Elastase* di sub dan supragingiva (Nakamura,2003).

Aktivitas NE dipengaruhi oleh aktivitas *cystein protease Cathepsin B* pada GCF yang meningkat pada penyakit periodontal. *Cathepsin B* mendegradasi SLPI pada cairan pelapis mukosa (Taggart,2001). Degradasi inhibitor oleh *Cathepsin B* menurunkan kemampuan SLPI untuk meregulasi aktivitas elastase di GCF (Booth,2007). Hal lain yang mempengaruhi aktivitas NE adalah stimulasi oleh *lipopolisacarida* , TNFa, IL-8 yang meningkat 20 kali lebih tinggi *Neutrofil Elastase* (Owen,1999).

NE menguntungkan untuk di analisa karena pada *early stage inflammation*, *neutrophyl* adalah sel mayer yang bermigrasi dari sirkulasi darah ke tempat inflamasi. NE dapat mengaktifasi sel epitel untuk menghasilkan IL-8 , IL-6, PGE 2 yang dapat meningkatkan kemotaksis, proliferasi sel imun, dan degradasi jaringan lunak (Allan, 1995)

Tabel 2.5 Enzim Proteolitik pada Neutrofil Manusia :

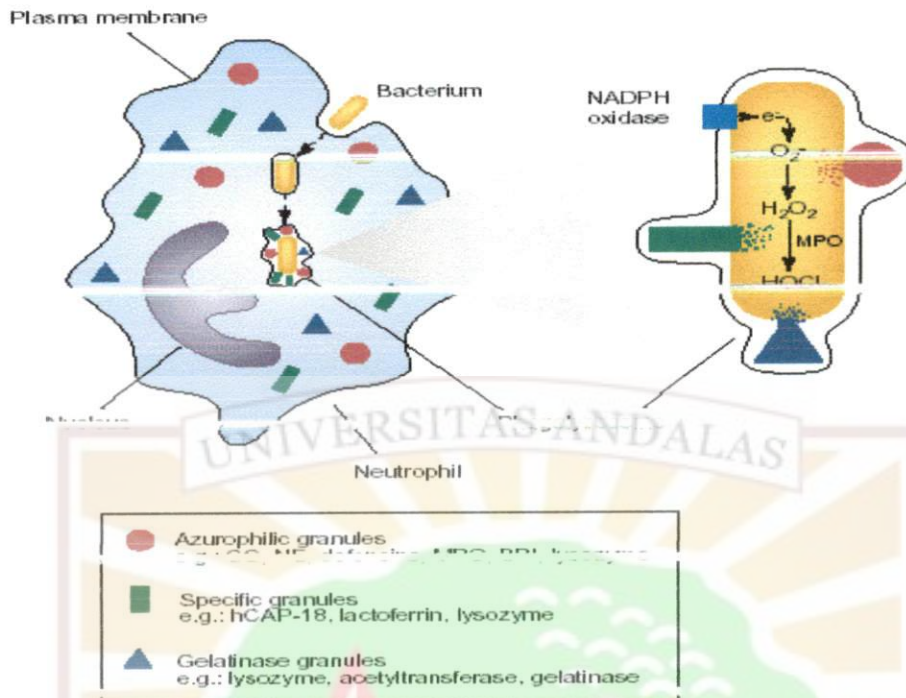


Enzyme group	Active site	pH Optimum	Natural inhibitors	Proteinase	Substrates
Serine proteinases	Asp, His, Ser	7-9	Serpins	Leukocyte elastase	Elastin, collagen types III, IV, VI and VIII, fibronectin, laminin 1, thrombospondin proteoglycans
				Cathepsin G	Fibronectin, laminin 1, proteoglycans, collagen type IV, elastin, thrombospondin, complement, immunoglobulin, lymphocyte surface antigens, angiotensin I
				Proteinase 3	Fibronectin, laminin 1, proteoglycans, collagen type IV, elastin, vitronectin
				Plasminogen activator (uPA)	Plasminogen (plasmin degrades fibrin, fibronectin, laminin 1, thrombospondin, proteoglycans, and activates pro-matrix metalloproteinases and complement)

Enzim Proteolitik pada Neutrofil Manusia (Daamen 2007; Almine *et al.*, 2010).

Inhibitor dari *Neutrofil Elastase* dan *Cathepsin G* adalah serpins α_1 -protease inhibitor, α_1 -antichymotrypsin, yang ditemukan dalam plasma, saliva dan GCF. Protease lainnya adalah α_2 macroglobulin sebagai competitive inhibitor. NE diinhibisi secara reversibel oleh asam lemak rantai panjang, polysacaride sulfates dan elastinal. (Bough and Travis, 1976).

Kadar yang tinggi dari *Netrofil Elastase* pada saliva dikaitkan dengan kehilangan perlekatan periodontal aktif, dan *Netrofil Elastase* dapat memberikan tanda klinis yang jelas dari progres peradangan/penyakit (Carranza, ed 10 hal 238-239, 2011).

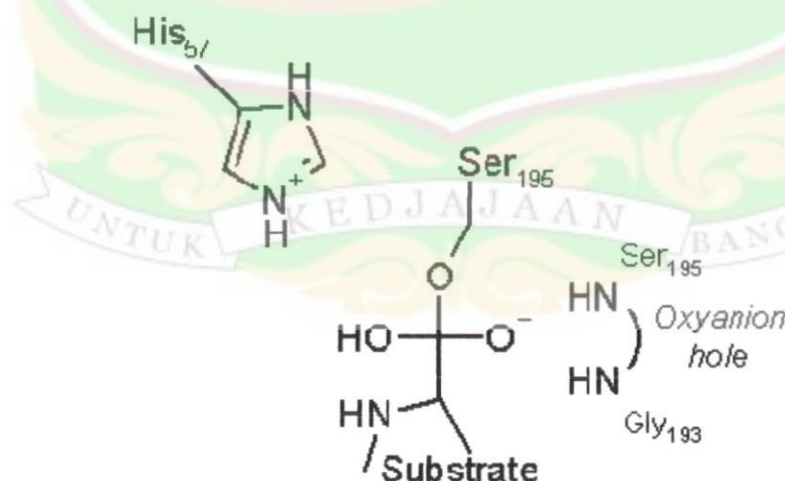


Gambar 2.16 NE dihasilkan oleh granula azurophilic. (Mayer 2004)

Elastase adalah enzim lain dalam pemecahan elastin, yang merupakan salah satu komponen penting dari penyakit periodontal. Studi *cohort* yang dilakukan selama 2 tahun yang dilakukan oleh Eley and Cox (1996) yang mendeteksi adanya relasi positif antara aktivitas *Neutrofil Elastase* pada GCF, konsentrasi dan perlekatan periodontal selanjutnya kehilangan tulang setelah dua tahun.

Asam amino protease berisi sistem 2 katalitik dari residu Histidin, Aspartat, dan asam amino yang tersebar diseluruh urutan utama polipeptida, tetapi dibawa bersama-sama dalam penyusunan berdimensi tiga dari *folded protein* (protein yang terlipat). Bentuk *Neutrofil Elastase* dari adalah 218 asam amino yang panjang, dengan dua rantai karbohidrat yang terkait dengan asparagin. Enzim ini terdapat dalam butiran *azurophil* dalam sitoplasma neutrofil (Belacauaj,2000).

Zia *et al* 2002, menyatakan bahwa *Neutrofil Elastase* (atau elastase) adalah enzim proteolitik poten yang ditemukan di dalam butiran lisosomal. Dalam studi longitudinal, Eley dan Cox (1996) menunjukkan bahwa peningkatan *Neutrofil Elastase* di dalam GCF adalah prediksi dari kehilangan perlekatan periodontal. Menurut Meyle (1992) *Neutrofil Elastase* merupakan sebuah asam amino protease netral pada granula primer, yang memecah elastin dan beberapa komponen lainnya dari jaringan. Biokimia markers lainnya yang ada di dalam GCF yaitu enzim *Intracytoplasmic, particularly lactate dehydrogenase (LDH)* dan *AST*. Kadar NE akan meningkat pada gingivitis, sedangkan pada kronik Peridontitis kadar *Neutrofil Elastase* and *Intracytoplasmic enzymes* seperti *PA (Protective Ag)*, *LDH (Lactate Dehidrogenase)*, dan *AST (Aspartate Aminotransferase)* lebih tinggi. Artinya NE dapat membedakan dan mendiagnosa sesuai kondisi klinis gingivitis. *Lactate dehydrogenase* dapat memberikan gambaran ringan, sedang, dan berat pada peridontitis, sedangkan *AST* hanya terdapat pada kondisi *advanced*.



Gambar 2.17 Mekanisme Kerja Neutrofil Elastase
RC Wilmouth *et al.*, (2002)

Mekanisme pemecahan elastin merupakan triad katalitik asam amino Serin , Histidin,dan Asparagin. Pada mekanisme pemecahan elastin, Serin , Histidin,dan Asparagin, serta molekul air juga ikut terlibat. Bentuk struktural enzim neutrofil elastase terdiri dari orientasi dari gugus amida atom hidrogen yang mengarahkan atom oksigen yang bermuatan negatif dari substrat, sehingga substrat dipindahkan ke posisi yang tepat untuk mengalami pemecahan. Bagian dari elastase ini disebut *oxyanion hole*. Peptida yang akan dipecah diikat oleh enzim secara nonkovalen di cekungan yang berdekatan dengan triad katalitik. Reaksi tahap pertama, gugus hidroksil dari Ser melakukan *neutrophilic attack* pada ikatan amida substrat untuk membentuk ester. Bagian ujung gugus karboksil dari *peptide* substrat dilepaskan melalui mekanisme ini (Wilmouth *et al.*,2001).

Ujung gugus amino substrat berikatan dengan enzim. Pada reaksi tahap kedua,Hist melepaskan proton dari molekul air yang akan terikat pada carbon ester sehingga oxyanion intermediate meningkat.Struktur gugus tiga oksigen yang terikat dengan karbon akan menjadi tidak stabil dan akan berdisintegrasi untuk membentuk satu asam dan satu alkohol meregenerasi enzim dan melepas bagian aminoterminal substrat. Sementara itu Asp tidak berikatan jauh dari substrat dan tidak mempunyai peran penting dalam pengaturan ikatan hidrogen yang terjadi pada Histidin dan Serin (Katona *et al.*,2002).

Kadar NE akan meningkat pada kondisi peradangan dan kehilangan perlekatan, enzim ini bisa berfungsi sebagai prediktor kehilangan perlekatan (Cox,1992; Gustafsson,1992; Palcanis,1992; Wood 2006). Kadar NE pada GCF lebih tinggi pada pasien Periodontitis dibandingkan pasien sehat dan gingivitis (Ohlsson *et al.*, 1973 ; Gupta 2012). Di dalam penelitian Meryam *et al* (2009)

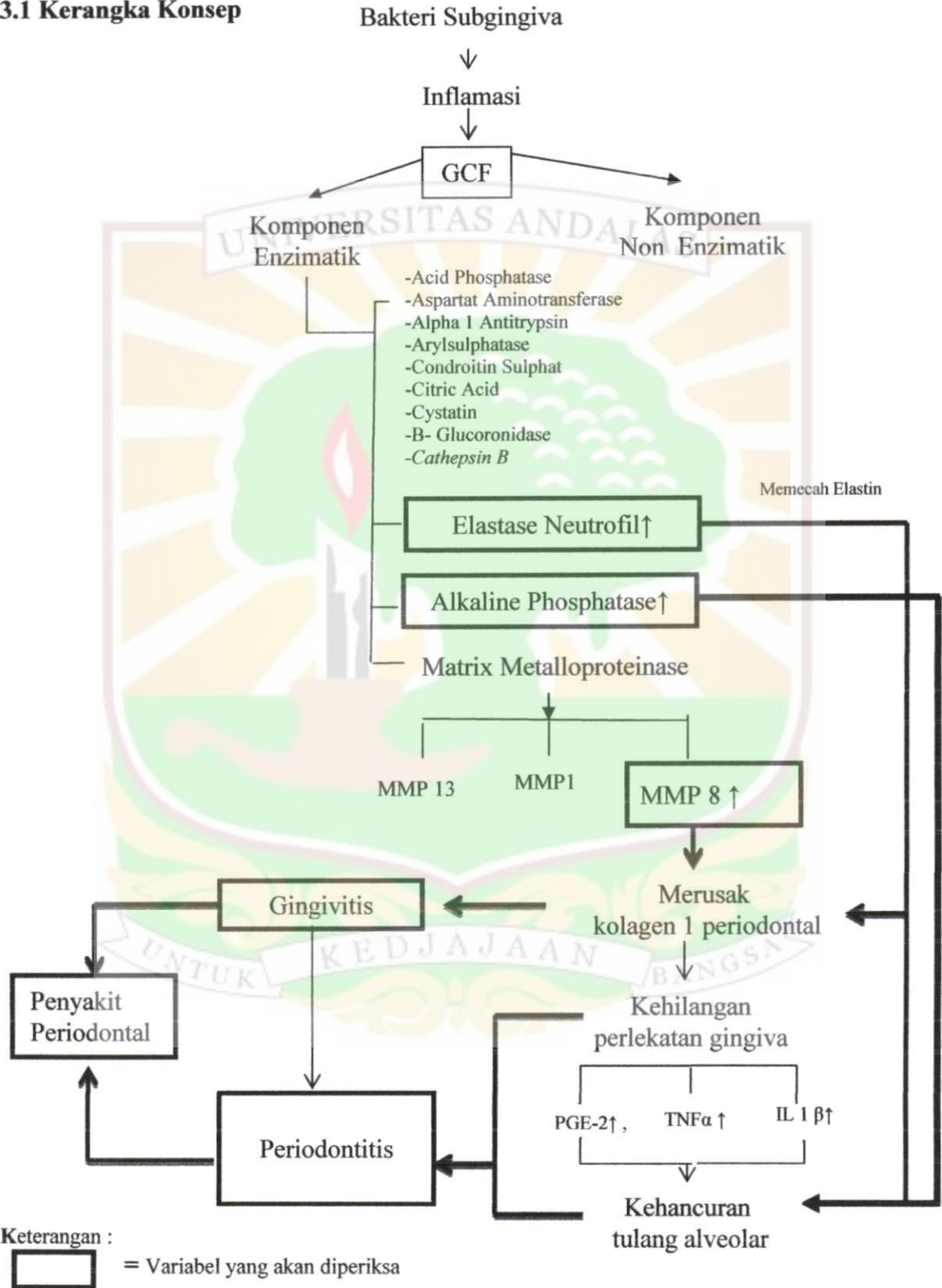
menunjukkan kadar NE meningkat pada inflamasi gingiva berupa satu-satunya enzim yang meningkat pada kondisi gingivitis.



BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Gambaran Skematis Enzimatis pada penyakit Periodontal

Keterangan Kerangka Konsep :

Bakteri subgingiva pada jaringan pendukung gigi akan mengeluarkan produknya LPS, FMLP, fatty acid, yang akan mengakibatkan terjadi inflamasi pada jaringan pendukung gigi. Pengambilan GCF sebagai spesimen dan dilakukan pengukuran kadar enzim yang terkandung didalam GCF untuk dapat dijadikan pertanda pada gingivitis dan periodontitis. Jenis enzim-enzim yang terdapat dalam GCF terbagi atas 2 komponen yaitu

a. Komponen enzimatik

Komponen enzimatik yang dihasilkan Host pada penyakit periodontal adalah Aspartat Aminotransferase, Acid phosphatase, Alkaline Phosphatase, Alpha 1 antitrypsin, Beta-Glunoridase, Arylsufate, Chondrotin Sulpat, Citric acid, Cystatin, Cathepsin B, Elastase Neutrofil, Matrix metalloprotease.

b. Komponen non enzimatik

Pertanda yang sering menjadi indikator antara lain :

- a *Matrix Metaloprotease* (MMP). MMP adalah protease (famili zincdependet endopeptidase) yang disekresikan dalam bentuk laten, setelah aktivasi akan menghasilkan kolagenase (MMP1,8 dan 13). Di dalam proses inflamasi penyakit periodontal tipe MMP yang sering terlibat adalah MMP-8. MMP – 8 dihasilkan lewat infiltrasi neutrophil dan jika bertemu dengan Cathepsin G yang dihasilkan bakteri maka dapat mengaktifkan MMP 8 untuk menghancurkan kolagen tipe 1 di jaringan pendukung periodontal yang mengakibatkan lepasnya perlekatan gingiva.

- b Neutrofil Elastase: merupakan sebuah asam amino protease netral pada granul primer, yang memecah elastin dan kolagen dari jaringan lunak pendukung gigi sehingga terjadi degradasi jaringan.
- c Alkaline Phosphatase : setelah terjadi kehilangan perlekatan dan banyaknya jumlah PGE2 dari makrofag, fibroblast dan hasil aktivasi IL -1 β , TNF $-\alpha$, maka terjadilah kehancuran jaringan tulang pendukung gigi. Pada kondisi ini, jumlah Alkaline Phosphatase akan sangat banyak terdapat di GCF.

3.2 Hipotesis Penelitian

1. Ada perbedaan kadar *Matrix Metaloprotease -8* dalam Gingival Crevicular Fluid pada penyakit periodontal.
2. Ada perbedaan kadar *Alkaline phosphatase* dalam Gingival Crevicular Fluid pada penyakit periodontal.
3. Ada perbedaan kadar Neutrofil Elastase dalam Gingival Crevicular Fluid pada penyakit periodontal.
4. Diantara ketiga enzim didalam Gingival Crevicular Fluid terdapat hubungan yang paling kuat dengan penyakit periodontal .

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian Observasional dengan pendekatan *Cross Sectional Comparative Study* dimana variabel dependen dan independen diperiksa dalam waktu bersamaan.

4.2 Lokasi Dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di Poliklinik Gigi RSUD Rasidin Kotamadya Padang dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Unand. Waktu penelitian dilakukan selama satu tahun.

4.3 Populasi dan Sampel

4.3.1 Populasi

Seluruh pasien yang menderita gingivitis ringan, periodontitis ringan dan sehat sebagai kontrol berdasarkan PDI berkunjung ke poliklinik gigi RSUD Rasidin Kotamadya Padang.

4.3.2 Sample

Bagian dari populasi yang memenuhi kriteria inklusi dan eklusi diambil secara consecutive sample.

4.3.3 Besar Sampel

Besar sampel diambil dengan menggunakan rumus:

$$n_1 = n_2 = 2 \left[\frac{(z\alpha + z\beta)s}{(x_1 - x_2)} \right]^2$$

Keterangan :

n_1 = besar sampel

s = penyimpangan baku kedua kelompok

$x_1 - x_2$ = perbedaan klinis yang diinginkan

α = tingkat kemaknaan (0,05)

$z\beta$ = power (0,842)

$$n_1 = n_2 = n_3 = 2 \left[\frac{(z\alpha + z\beta)s}{(x_1 - x_2)} \right]^2$$

$$n_1 = n_2 = n_3 = 2 \left[\frac{(1,96 + 0,842)5,07}{(23,50 - 18,50)} \right]^2$$

$$n_1 = n_2 = n_3 = 2 \left[\frac{14,207}{(5)} \right]^2$$

$$n_1 = n_2 = n_3 = 16,154$$

$$n_1 = n_2 = n_3 = 16, \text{ angka dibulatkan menjadi } 16$$

Jumlah sampel minimal untuk gingivitis ringan, periodontiti ringans, dan sehat sebagai kontrol adalah

16 orang pada tiap kelompok.

4.4 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

4.4.1 Kriteria Inklusi

- Bersedia ikut menjadi responden dalam penelitian.
- Umur 17 sampai dengan 30 tahun

4.4.2 Kriteria Eksklusi

- Mengonsumsi antibiotik dan antiinflamasi selama 3 bulan terakhir.
- Pasien perokok.

- Pasien hamil, menstruasi.
- Memiliki kelainan sistemik : DM
- Mendapat riwayat treatment periodontal selama 3 bulan terakhir
- Gingivitis sedang gingiva berwarna merah, oedema, dan berkilat, pada palpasi terjadi pendarahan.
- Gingivitis parah gingiva warna merah menyala, pembesaran, kecenderungan mudah berdarah dan ulserasi.
- Periodontitis sedang bila salah satu dari dua sisi yang diukur, sulkus gingiva meluas 3-6mm, apikal dari BSE.
- Periodontitis berat bila sulkus gingiva pada salah satu sisi yang diukur lebih dari 6mm apikal dari BSE

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Independen

- a. MMP-8
- b. Alkaline Phosphatase
- c. Neutrofil Elastase

4.5.2 Variabel Dependen

Penyakit periodontal

4.6 Bahan Dan Instrumen Penelitian

4.6.1 Bahan Penelitian :

1. MMP-8 :

Metode sandwich ELISA dengan bahan reagen/KIT MMP-8

RPN2619, Human Biotrak System by Amersham Biosciences

2. ALP : Elisa Kit for ALP, homo sapiens (Human), sE91472Hu, detection range 3.12-200 ng/ml, sensitivity 1.36 ng/ml. USCN product
3. Neutrofil Elastase :
Elastase, Human, Kit, HK319-02, Product assays, quantity 2x96 det, standard range 0.4-25 ng/ml, detection kadar 0.4ng/ml, working volume 100 µl/well.
4. Gingival Crevicular Fluid

4.6.2 Instrumen Penelitian

1. Variant hemoglobin testing-in2it analyzer – Bio rad
2. Sentrifuge
3. Hitachi's clinical automatic analyzer
4. Dento Analyzer
5. Pipet takar
6. *Paper stripe*
7. Ice bath
8. Kaca Mulut
9. Pinset
10. Probe Periodontal
11. Sonde

4.7 Defenisi Operasional

4.7.1 Penyakit Periodontal

Penyakit periodontal adalah penyakit yang mengenai jaringan pendukung gigi yaitu gingiva/gusi serta jaringan periodontal, yaitu jaringan

yang menghubungkan antara gigi dan tulang penyangga gigi yaitu tulang alveolar. Penyakit yang paling sering mengenai jaringan periodontal adalah gingivitis dan periodontitis.

Penyakit periodontal terdiri dari :

- Gingivitis ringan : Inflamasi ringan pada gingiva ditandai dengan perubahan warna, sedikit oedema, pada palpasi perdarahan berupa titik kecil.
- Periodontitis ringan : Bila salah satu dari dua sisi yang diperiksa ada sulkus gingiva yang sudah berada 1-3 mm.

Alat Ukur : Probe Periodontal

Skala ukur : Nominal

Hasil Ukur :

- 0 = gingiva sehat
- 1 = gingivitis ringan
- 2 = gingivitis berat
- 4 = periodontitis ringan

Kriteria pengukuran 6 regio gigi (16, 21, 24, 36, 41 dan 44) mewakili indeks penyakit periodontal menurut Russel, apabila salah satu dari 6 regio gigi *missing* dapat diganti dengan gigi yang berada disebelahnya.

4.7.2 MMP-8

MMP-8 bagian dari famili Zinc-dependent endopeptidase yang berperan dalam pengrusakan kolagen tipe I. Belum ada harga normal yang baku ditemukan. Karena itu diambil sebagai patokan adalah nilai rata rata

mean dari kontrol. Dinyatakan kadarnya rendah apabila nilainya $\leq mean$, dan tinggi apabila nilainya $> mean$.

Alat ukur : Elisa

Skala ukur : Rasio

Hasil ukur : pg/ml

4.7.3 Alkaline Phosphatase

Alkaline Phosphatase adalah glikoprotein membrane terikat yang terlibat dalam pemeliharaan tulang alveolar dan pembaharuan dari ligament periodontal. Belum ada harga normal yang baku ditemukan. Karena itu diambil sebagai patokan adalah nilai rata rata *mean* dari kontrol. Dinyatakan kadarnya rendah apabila nilainya $\leq mean$, dan tinggi apabila nilainya $> mean$.

Alat ukur : Elisa

Skala ukur : Rasio

Hasil ukur : pg/ml

4.7.4 Neutrofil Elastase

Neutrofil Elastase merupakan grup enzim serine proteinase yang berguna untuk mendegradasi elastin. Belum ada harga normal yang baku ditemukan. Karena itu diambil sebagai patokan adalah nilai rata rata *mean* dari kontrol. Dinyatakan kadarnya rendah apabila nilainya $\leq mean$, dan tinggi apabila nilainya $> mean$.

Alat ukur : Elisa

Skala ukur : Rasio

Hasil ukur : pg/ml

4.8 Persyaratan Etik Penelitian

Sebelum melakukan penelitian akan diminta persetujuan etik kepada komite etik Fakultas kedokteran Universitas Andalas dengan melampirkan proposal penelitian, informasi yang diberikan kepada subjek penelitian yang meliputi alasan penderita diperlukan, imbalan yang didapat, pemberitahuan hasil penelitian, resiko penelitian, dan mamfaat langsung.

Implikasi etik pada penelitian ini mengikuti ketentuan “Deklarasi Helsinki” (Oemijati, Setyabudy, Zbudijanto, 1987; deronzo and noss, 2006).Peneliti melaksanakan penelitian ini dengan penuh tanggung jawab melalui organisasi penelitian penelitian, antara lain:

Semua tenaga yang terlibat dalam penelitian ini diberikan pembekalan terlebih dahulu dengan :

- a. Memberikan informasi yang lengkap dan jelas alasan tujuan penelitian.
- b. Memberikan pelatihan sesuai dengan kegiatan (*task*) yang akan dilakukannya.
- c. Kemampuan dan ketepatan melakukan pencatatan dan meverifikasikannya.
- d. Mempersiapkan hasil penelitian dengan baik.
- e. Peneliti menjamin kerahasiaan dokumen yang berkaitan dengan data subyek.
- f. Penelitian ini dilakukan dan diawasi oleh dokter yang mempunyai kompetensi didalam bidangnya.

- g. Peneliti sangat menghormati kepentingan subyek dan selalu menutamakan ketimbang kepentingan ilmiah nya sendiri.
- h. Peneliti akan memberikan informasi yang akurat kepada pihak yang berkepentingan apabila diperlukan.
- i. Segala akibat yang ditimbulkan pada pelaksanaan penelitian ini menyangkut tindakan inteivensi 'terhadap pasien adalah menjadi tanggung jawab peneliti.

4.9 Pemantapan Mutu (*Quality Assurance*)

Pada penelitian ini dilakukan pemantapan mutu untuk menjamin ketelitian dan ketepatan hasil pemeriksaan laboratorium. Cakupan pemantapan mutu meliputi tahap pra analitik, analitik, dan paska analitik. Dalam penelitian ini upaya pemantapan mutu telah mulai dari persiapan subjek, pengambilan sampel, pengiriman dan penyimpanan sampel, pemeriksaan dan pencatatan hasil.

4.9.1 Persyaratan Subyek

Pasien yang akan diambil sampel *Gingival Crevicular Fluid* nya sesuai persyaratan. Ada beberapa hal yang diperhatikan yaitu :

- Waktu pengambilan sampel, *Cicardian Periodicty* yaitu adanya peningkatan sedikit demi sedikit pada jumlah GCF dari jam 6 pagi sampai 10 malam dan akan menurun setelahnya.
- Pantangan obat tertentu seperti antidepresan, antihistamin, antipsikotik, antihipertensi, antikonvulsan, agen sitotoksik, *muscle relaxant*.
- Tidak sedang menstruasi, Hormon seks pada perempuan dapat meningkatkan GCF karena dapat mempertinggi permeabilitas

pembuluh darah pada masa kehamilan, ovulasi, hormonal kontrasepsi yang meningkatkan produksi GCF

- Tidak melakukan stimulasi mekanis seperti mengunyah dan menggosok gigi,. Secara klinis, stimulasi mekanikal seperti mengunyah dan menggosok gusi yang terlalu kuat dapat menstimulasi aliran gcf.
- Tidak merokok, karena merokok dapat memproduksi respon *immediate-transient* pada kondisi ini sel endotel berkontraksi memperlebar jarak *interendothelial cell* yang akan meningkatkan aliran gcf.
- Tidak ada riwayat treatment periodontal selama 1 minggu. Profilaksis oral dapat menurunkan aliran gcf selama satu minggu setelahnya, dan perlahan akan kembali seperti sebelum terapi dilakukan.
- Tidak paska bedah periodontal. Setelah prosedur operasi periodontitis dilakukan, terjadi peningkatan gcf selama proses penyembuhan.

4.9.2 Pengambilan Sampel

- a. Pasien duduk di dental unit dengan posisi ergonomis
- b. Diinstruksikan untuk berkumur dengan larutan khlorheksidin 2%, untuk menyamakan kondisi dan meminimalisir keterlibatan bakteri oral
- c. Bersihkan plak pada daerah yang akan diambil GCF, dan keringkan
- d. Dipasangkan lip retractor
- e. Isolasi dengan menggunakan cotton roll.
- f. Paper point diinsersikan dengan menggunakan teknik intracrevicular superficial

- g. Dibiarkan selama 3 menit (stopwatch)
- h. Ambil paper point, dan dimasukkan dalam tabung eppendorf yang telah berisi larutan buffer PBS.
- i. Pemberian label pada tabung spesimen harus jelas.

4.9.3 Penyimpanan Sampel

- a. Sampel yang telah diambil akan di ELISA dalam waktu 90' pada suhu kamar atau sampel dapat disimpan pada suhu -20°C sampai jumlah sampel mencukupi sesuai petunjuk yang ada dalam kit.
- b. Boks penyimpanan sampel dikhususkan hanya untuk satu penelitian.
- c. Setiap penyimpanan sampel dilakukan rekapitulasi data penelitian.
- d. Suhu freezer dipantau setiap hari dan freezer dipastikan selalu tersambung dengan listrik genset

4.9.4 Pengiriman Sampel

- a. Sebelum dikirim label sampel dipastikan masih terpasang dengan baik, disusun sesuai urutan daftar nama.
- b. Dibungkus beserta raknya plastik *zip lock* atau plastik yang cukup tebal dan ditutup rapat, dalam *cool box*.
- c. Pengiriman dilakukan dalam suhu yang sesuai dengan *dry ice*

4.9.5 Pemeriksaan Sampel

Pemeriksaan MMP-8, ALP, NE.

- a. Setelah penghentian reaksi saat pemeriksaan ELISA, segera dilakukan pemeriksaan ELISA Reader dengan panjang gelombang 450 nm maksimal selama 30 menit (jika waktu lebih dari 30 menit, akan

mengakibatkan perubahan warna pada sample sehingga mempengaruhi hasil akhir pembacaan ELISA Reader).

- b. Angka-angka yang keluar dari ELISA Reader adalah angka-angka absorbent yang harus disetarakan dengan bantuan grafik standar yang dibuat setelah dilakukan pemeriksaan dengan ELISA Reader sehingga menjadi angka-angka dalam bentuk kadar MMP-8, ALP, NE (ng/ml).

- c. Pemeriksaan Laboratorium

Pemeriksaan laboratorium dilakukan pada laboratorium biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas dan dikerjakan dengan jaminan mutu terbaik dan sumber daya yang berkompeten di bidangnya. Alat tersebut' sebelum digunakan dilakukan kalibrasi terlebih dahulu dengan mengikuti prosedur standar laboratorium secara periodik menurut *Quality Control System*, dengan menentukan harga *coefficient of variation* (CV) .

4.9.6 Pemeriksaan Laboratorium

4.9.6.1 Uji ELISA MMP-8

Tahapan Persiapan Reagen :

1. Wash Buffer

Pindahkan wash buffer concentrate ke temperatur ruang sebelum digunakan, vortex hingga semua kristal larut ke dalam buffer. Larutkan 20mL wash buffer concentrate ke dalam 480 mL ddH₂O sehingga wash buffer total menjadi 500mL.

2. Substrate Solution

Campurkan kedua pewarna reagen A dan B dengan perbandingan jumlah volume yang seimbang. Campurkan kedua reagen 15 menit sebelum digunakan. Hindari dari cahaya.

3. MMP-8 Standard

Encerkan MMP-8 Standard dengan 1 mL ddH₂O untuk membuat standard dengan konsentrasi 100ng/mL. Vortex dan lanjutkan membuat pengenceran standard lainnya.

Pengenceran standar :

$$- 10\text{ng/mL} : V_1.n_1 = V_2.n_2$$

$$100 = 500 \cdot 200$$

$$V_1 = 5000/100$$

$$V_1 = 50 + (450 \text{ standard diluent})$$

$$- 5\text{ng/mL} : V_1.n_1 = V_2.n_2$$

$$10 = 200 \cdot 5$$

$$V_1 = 1000/10$$

$$V_1 = 100 (+ 100 \text{ standard diluent})$$

$$- 2,5\text{ng/mL} : V_1.n_1 = V_2.n_2$$

$$10 = 200 \cdot 2,5$$

$$V_1 = 500/10$$

$$V_1 = 50 (+ 150 \text{ standard diluent})$$

$$- 1,25\text{ng/mL} : V_1.n_1 = V_2.n_2$$

$$10 = 600 \cdot 1,25$$

$$V_1 = 750/10$$

$$V_1 = 75 (+ 525 \text{ standard diluent})$$

- $0,625\text{ng/mL}$: $V1.n1 = V2.n2$

$$1,25 = 200 \cdot 0,625$$

$$V1 = 125/1,25$$

$$V1 = 100 (+ 100 \text{ standard diluent})$$

- $0,3125\text{ng/mL}$: $V1.n1 = V2.n2$

$$12,5 = 200 \cdot 0,3125$$

$$V1 = 62,5/12,5$$

$$V1 = 50 (+ 150 \text{ standard diluent})$$

- $0,15625\text{ng/mL}$: $V1.n1 = V2.n2$

$$12,5 = 400 \cdot 0,15635$$

$$V1 = 62,5/12,5$$

$$V1 = 50 (+ 350 \text{ standard diluent})$$

5. Preparasi sampel

1. Serum/plasma/cell culture: encerkan 20x, yaitu $10\mu\text{l}$ sampel + $190\mu\text{l}$ Calibrator diluent RD5-10
2. Saliva: Encerkan 40x, yaitu $10\mu\text{l}$ sampel + $390\mu\text{l}$ calibrator diluent.

6. Prosedur Pengerjaan

1. Siapkan semua reagen, standard dan sample.
2. Persiapkan jumlah well yang akan digunakan, (sisa yang tidak dipakai simpan kembali di suhu 4°C)
3. Masukkan $150\mu\text{l}$ Assay Diluent ke dalam masing-masing well.

4. Masukkan 50 µl standard, dan sampel ke tiap-tiap well yang telah di tentukan. Tutup plat dengan plastic cover. Inkubasi selama 2 jam di suhu ruang dengan shaker 50-500 rpm.
5. Buang seluruh cairan pada well, tambahkan 400µl wash buffer, diamkan beberapa saat dan buang kembali seluruh cairan pada well.

Ulangi proses pencucian tersebut sebanyak 3x

6. Tambahkan 200 µl MMP-8 Conjugate pada masing-masing well. Inkubasi selama 2 jam di suhu ruang.
7. Ulangi proses pencucian seperti step 5
8. Tambahkan 200µl substrate solution ke masing-masing well. Inkubasi selama 30 menit di suhu ruang.
9. Tambahkan 50 µl stop solution ke masing-masing well. Warna cairan akan berubah dari biru menjadi kuning.
10. Baca plate dengan elisa reader pada panjang gelombang 450 nm.

4.9.6.2 Uji ELISA Alkaline Phosphatase

Tahapan Persiapan Reagen

1. Standard

Larutkan Standard dengan 1 mL Standard diluent, biarkan selama 10 menit di suhu ruang dan vortex. Nilai standard yang terbentuk adalah 400ng/mL. Selanjutnya encerkan standard dengan nilai konsentrasi lainnya.

Pengenceran standar :

$$- \quad 200\text{ng/mL} : V1.n1 = V2.n2$$

$$400 = 600 \cdot 200$$

$$V1 = 120000/400$$

$$V1 = 300 + (300 \text{ standard diluent})$$

- 100ng/mL: $V1 \cdot n1 = V2 \cdot n2$

$$200 = 200 \cdot 100$$

$$V1 = 20000/200$$

$$V1 = 100 (+ 100 \text{ standard diluent})$$

- 50ng/mL: $V1 \cdot n1 = V2 \cdot n2$

$$200 = 200 \cdot 50$$

$$V1 = 10000/200$$

$$V1 = 50 (+ 150 \text{ standard diluent})$$

- 25ng/mL: $V1 \cdot n1 = V2 \cdot n2$

$$200 = 200 \cdot 25$$

$$V1 = 5000/200$$

$$V1 = 25 (+ 175 \text{ standard diluent})$$

- 12,5ng/mL: $V1 \cdot n1 = V2 \cdot n2$

$$200 = 600 \cdot 12,5$$

$$V1 = 62,5/200$$

$$V1 = 37,5 (+ 562,5 \text{ standard diluent})$$

- 6,25ng/mL : $V1 \cdot n1 = V2 \cdot n2$

$$12,5 = 200 \cdot 6,25$$

$$V1 = 1250/12,5$$

$$V1 = 100 (+ 100 \text{ standard diluent})$$

- 3,125ng/mL : $V1 \cdot n1 = V2 \cdot n2$

$$12,5 = 200 \cdot 3,125$$

$$V1 = 625/12,5$$

$$V1 = 50 (+ 150 \text{ standard diluent})$$

2. Detection reagent A dan detection reagent B

Encerkan masing-masing reagent A dan B dengan Essay dilluent A dan B dengn perbandingan 1:100

3. Wash Solution

Larutkan 20 mL Wash solution concentrate (30x) dengan 580 mL ddH₂O sehingga volume total menjadi 600mL wash solution (1x).

A. Prosedur Kerja

1. Masukkan 100µl masing-masing standard dan sample ke dalam well yang telah di tentukan. Tutup dengan plastic cover dan inkubasi selama 2 jam di suhu 37°C
2. Buang cairan dalam well. JANGAN DICUCI.
3. Masukkan 100µl detection reagent A yang telah diencerkan ke tiap-tiap well. Inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C
4. Buang cairan yang ada di dalam well dan cuci well dengan 350µl wash solution. Ulangi sebanya 3x
5. Tambahkan 100µl detection reagent B yang telah diencerkan .
inkubasi selama 30 menit suhu 37°C
6. Ulangi prosedur washing pada step 4
7. Masukkan 90 µl substrat solution ke masing-masing well. Inkubasi 15-25 menit pada suhu 37°C. Hindari dari cahaya.
8. Masukkan 50µl stop solution, mix

9. Baca dengan elisa reader pada panjang gelombang 450nm.

4.9.6.3 Uji ELISA Neutrophyl Elastase

Tahapan Persiapan Reagen

1. Wash Buffer

Encerkan wash buffer concentrate (10x) dengan ddH₂O.

- 25 mL Wash buffer Concentrate (10x) + 225 mL ddH₂O

2. Human Neutrophyl Elastase Standard

tambahkan mL sample diluent kedalam tube standard 30 menit sebelum digunakan, Mix dengan kecepatan sedang. standard yang terbentuk setelah proses mixing adalah 10 ng/mL

Pengenceran standar :

a. 5ng/mL : $V_1.n_1 = V_2.n_2$

$$10 = 400 \cdot 5$$

$$V_1 = 2000/10$$

$$V_1 = 200 \text{ (+ 200 standard diluent)}$$

b. 2,5ng/mL: $V_1.n_1 = V_2.n_2$

$$5 = 200 \cdot 2,5$$

$$V_1 = 500/5$$

$$V_1 = 100 \text{ (+ 100 standard diluent)}$$

c. 1,25ng/mL: $V_1.n_1 = V_2.n_2$

$$5 = 200 \cdot 1,25$$

$$V_1 = 250/5$$

$$V1=50 (+ 150 \text{ standard diluent})$$

d. $0,625\text{ng/mL}: V1.n1 = V2.n2$

$$5 = 400 \cdot 0,625$$

$$V1 = 250/5$$

$$V1=50 (+ 350 \text{ standard diluent})$$

e. $0,3125\text{ng/mL}: V1.n1 = V2.n2$

$$0,625 = 200 \cdot 0,3125$$

$$V1 = 62,5/0,625$$

$$V1=100 (+ 100 \text{ standard diluent})$$

f. $0,15625\text{ng/mL} : V1.n1 = V2.n2$

$$0,62 = 200 \cdot 0,15625$$

$$V1 = 31,25/0,625$$

$$V1=200 (+ 200 \text{ standard diluent})$$

A. Prosedur Kerja

1. Encerkan sampel 1:100 dengan sampel diluent
2. Siapkan well yang akan digunakan, tandai bagian yang akan diisi standard, sample dan blanko
3. Tambahkan masing-masing larutan standard kedalam well yang telah ditentukan.
4. Tambahkan 100µl sampel yang telah diencerkan kedalam masing-masing well.
5. Tutup dengan plastic cover dan inkubasi di suhu ruang selama 1 jam. mix pada microplate shaker pada 400 rpm

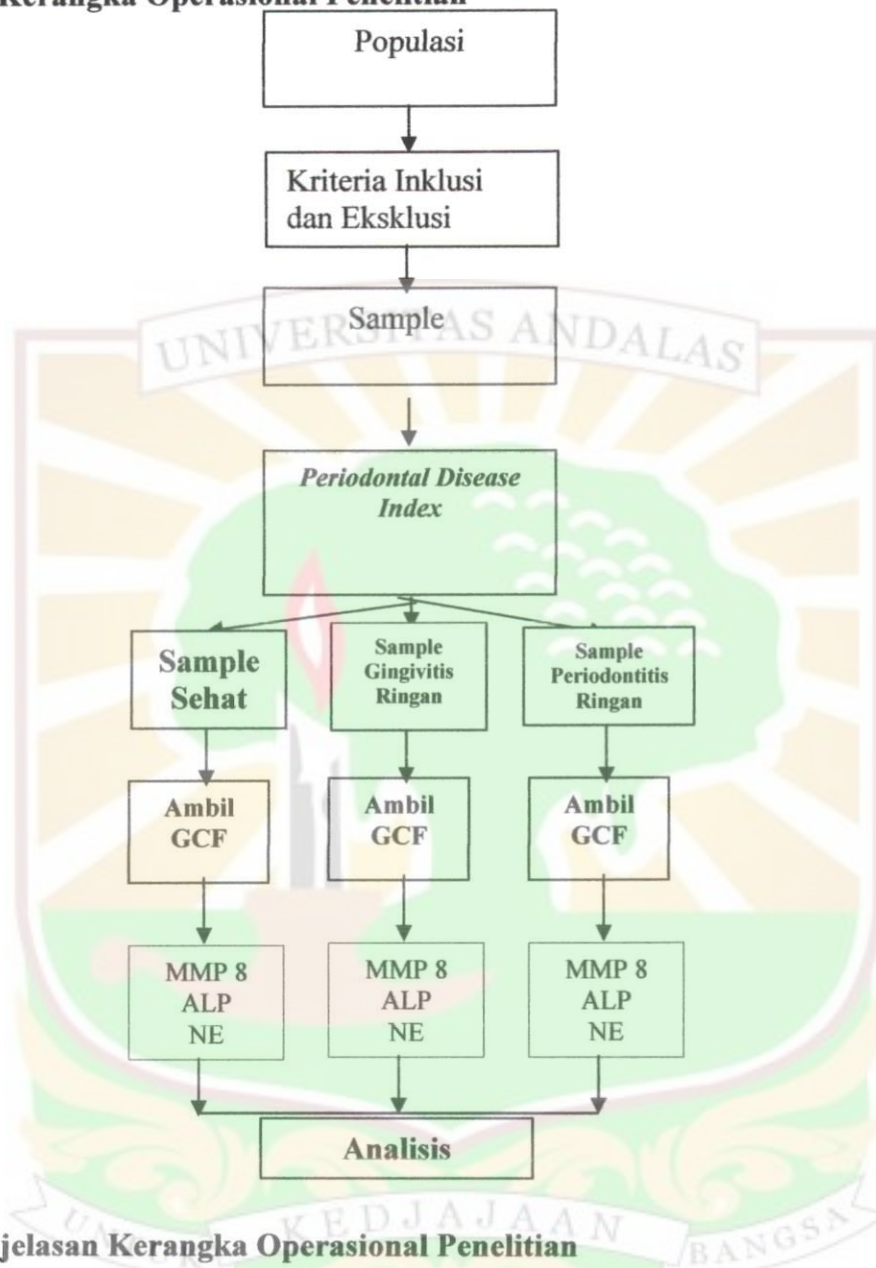
6. Buang seluruh cairan dalam well, cuci well dengan 400 μ l wash buffer. Ulangi proses sebanyak 3x
7. Tambahkan 150 HRP-Conjugate
8. Tutup dengan plastic cover, inkubasi selama 1 jam di suhu ruang dan mix dengan plate shaker 400rpm
9. Ulangi proses washing seperti langkah 7
10. Tambahkan 200 μ l TMB Substrate Solution ke masing-masing well.
11. Inkubasi di suhu ruang selama 20 menit, hindari dari cahaya.
12. Tambahkan stop solution 50 μ l
13. Baca hasil dengan elisa reader dengan panjang gelombang 450 nm.

4.9.7 Pencatatan Hasil

Sistem pencatatan dan pelaporan dilakukan dengan benar dan terdokumentasi. Semua prosedur pemantapan mutu quality assurance pada penelitian ini akan mengacu pada protap yang dikeluarkan oleh Pusat Laboratorium Kesehatan Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

4.10 Prosedur Pengumpulan Data

4.10.1 Kerangka Operasional Penelitian



4.10.2 Penjelasan Kerangka Operasional Penelitian

Populasi penelitian adalah pasien yang menderita gingivitis dan periodontitis yang berobat ke poliklinik gigi RSUD Rasidin Kotamadya Padang. Sampel yang diambil yang memenuhi kriteria inklusi dan sampel sehat sebagai kontrol. Kemudian tiap kelompok sampel diambil GCF nya dan disimpan pada suhu -20°C . Setelah semua spesimen saliva lengkap, akan dilakukan analisis laboratorium pemeriksaan

ELISA untuk Matriks Metalloproteinase-8, Alkaline Phosphatase dan Neutrophil Elastase. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan statistik.

4.10.3. Prosedur Penelitian

Semua sample yang memenuhi kriteria inklusi dan eklusi, kemudian diukur *Periodontal Disease Index* dijadikan sebagai populasi atau calon objek penelitian sehat dan penderita gingivitis dan periodontitis. Pada ketiga kelompok dilakukan wawancara untuk menjelaskan tujuan penelitian. Setelah penjelasan dan menyatakan persetujuan untuk ikut serta berpartisipasi dalam penelitian ini, maka penderita diberi formulir *informed consent* untuk dibaca dan dipahami. Kemudian menanda tangani *informed consent*. Pengambilan sampel dilakukan secara *consecutive sample* terhadap sehat, penderita gingivitis dan periodontitis. Setelah sample didapat, maka diambil Gingival Crevicular Fluid dengan *washing method* kemudian dianalisis kadar MMP-8, *Alkaline Phosphatase*, *Neutrofil Elastase*.

4.11. Analisis data

Pada penelitian ini terdapat 5 buah pengujian dilakukan pada data hasil penelitian. Analisis data dilakukan dengan cara univariat untuk mendidkripsikan masing-masing *variable*. Untuk melihat data distribusi normal dilakukan Kolmogorov Smirnof Test. Data terdistribusi normal dilakukan uji ANOVA untuk mengetahui perbedaan rata rata kadar MMP-8, *Alkaline Phosphatase*, *Neutrofil Elastase* jika didapatkan hasil yang signifikan kemudian dilanjutkan dengan Post Hoc Bonferroni.

Untuk melihat enzim yang paling kuat hubungannya antara MMP-8, *Alkaline Phosphatase*, *Neutrofil Elastase* terhadap sample sehat, penderita

gingivitis dan periodontitis dengan derajat kepercayaan 95 %, dilakukan uji homogenitas ($p > 0.05$) dan dapat dilanjutkan dengan uji MANOVA.



BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1 Karakteristik Sampel Penelitian

Sampel penelitian diambil dari pasien yang berkunjung ke poliklinik gigi RSUD Rasidin Kotamadya Padang selama 5 bulan mulai dari bulan Juni sampai bulan Desember 2013. Hasil pemeriksaan terhadap 200 calon subjek penelitian dari 1200 orang pengunjung ke poliklinik gigi RSUD Rasidin Kotamadya Padang, telah terjaring sebanyak 60 subjek yang terdiri dari 20 subjek sehat, 20 subjek dengan gingivitis ringan dan 20 subjek dengan periodontitis ringan yang memenuhi kriteria inklusi melalui cara konsekutif sampling.

Tabel 5.1 Rata-Rata Umur Subjek Penelitian Berdasarkan Jenis Kelamin

Umur	Jenis Kelamin	n	Rata-rata	SD	p
	Laki-laki	14	21,50	3,18	0,14
	Perempuan	46	23,39	4,39	

Pada tabel 5.1. Rata-rata umur perempuan lebih tinggi daripada laki-laki yaitu $23,39 \pm 4,39$ berbanding $21,15 \pm 31,18$. Perbedaan ini secara statistik tidak bermakna yang berarti umur pada laki-laki dan perempuan setara.

Tabel 5.2 Hasil Uji Normalitas Kolmogorov-Smirnov pada Enzim *Matrix Mettalloproteinase-8* (ng/dl), *Alkaline Phosphatase* (ng/dl) dan *Neutrophyl Elastase* (ng/dl) Berdasarkan PDI

	MMP8	ALP	Elastase
n	60	60	60
Rata-rata	22,02	134,81	6,05
Standar deviasi	15,25	86,85	3,06
P	,092	,199	,536

Berdasarkan setelah uji normalitas Kolmogrov-Smirnov (tabel 5.2) pada enzim *Matrix Mettalloproteinase-8*, *Alkaline Phosphatase* dan *Neutrophyl*

Elastase terdistribusi normal $p>0.05$. Dengan demikian, uji One Way-ANOVA dapat dilakukan.

Tabel 5.3 Perbedaan Rata-rata Kadar *Matrix Metalloproteinase-8* (ng/dl) dalam *Gingival Crevicular Fluid* dengan Penyakit Periodontal Berdasarkan PDI

Jenis Enzim	PDI	f	Rata-rata	Standar Deviasi	p
MMP8	Sehat	20	4,21	4,41	0,00
	Gingivitis ringan	20	21,69	3,94	
	Periodontitis ringan	20	40,16	2,64	
	Total	60	22,02	15,25	

Berdasarkan tabel 5.3 terdapat perbedaan rata-rata kadar *Matrix Metalloproteinase-8* berdasarkan kelompok PDI, yang tertinggi terdapat pada Periodontitis ringan dengan rata-rata = $40,16 \pm 2,64$ ng/dl dan bermakna. Tabel diatas menunjukkan pada penderita gingivitis ringan berpeluang mengalami peningkatan kadar MMP-8 sebanyak 5,2 kali lipat dibanding kondisi sehat, sedangkan pada kondisi periodontitis ringan naik 9,5 kali lipat dibanding kondisi sehat. Untuk melihat perbedaan antar kelompok maka dilanjutkan dengan uji Post-hoc Bonferroni pada tabel 5.4.

Tabel 5.4 Hasil Uji Post-Hoc Bonferroni Kadar Enzim *Matrix Metalloproteinase -8* Antar Kelompok PDI

PDI	Kadar MMP-8		
	Sehat	Gingivitis ringan	Periodontitis ringan
Sehat	-	0,00	0,00
Gingivitis ringan	0,00	-	0,00
Periodontitis ringan	0,00	0,00	-

Berdasarkan tabel 5.4 terdapat perbedaan rata-rata *Matrix Metalloproteinase-8* yang signifikan antara kelompok sehat dengan gingivitis ringan, kelompok sehat dengan periodontitis ringan, dan juga antara kelompok gingivitis ringan dengan periodontitis ringan ($p<0,05$).

Tabel 5.5 Perbedaan Rata-rata Kadar *Alkaline Phosphatase* (ng/dl) dalam *Gingival Crevicular* dengan Penyakit Periodontal Fluid Berdasarkan PDI

Jenis Enzim	PDI	f	Rata-rata	Standar Deviasi	p
ALP	Sehat	20	35,78	29,69	0,00
	Gingivitis ringan	20	132,92	29,33	
	Periodontitis ringan	20	235,74	25,08	
	Total	60	134,81	86,85	

Berdasarkan tabel 5.5 terdapat perbedaan rata-rata kadar *Alkaline Phosphatase* berdasarkan kelompok PDI, yang tertinggi terdapat pada Periodontitis ringan dengan rata-rata = $235,74 \pm 25,08$ ng/dl dan bermakna. Tabel diatas menunjukkan pada penderita gingivitis ringan berpeluang mengalami peningkatan kadar ALP sebanyak 3,7 kali lipat dibanding kondisi sehat, sedangkan pada kondisi periodontitis ringan naik 6,5 kali lipat dibanding kondisi sehat. Untuk melihat perbedaan antar kelompok maka dilanjutkan dengan uji Post-hoc Bonferroni pada tabel 5.6.

Tabel 5.6 Hasil Uji Post-Hoc Bonferroni Kadar Enzim *Alkaline Phosphatase* Antar Kelompok PDI

Kadar ALP			
PDI	Sehat	Gingivitis ringan	Periodontitis ringan
Sehat	-	0,00	0,00
Gingivitis ringan	0,00	-	0,00
Periodontitis ringan	0,00	0,00	-

Berdasarkan tabel 5.6 terdapat perbedaan rata-rata *Alkaline Phosphatase* yang signifikan antara kelompok sehat dengan gingivitis ringan, kelompok sehat dengan periodontitis ringan, dan juga antara kelompok gingivitis ringan dengan periodontitis ringan ($p < 0,05$).

Tabel 5.7 Perbedaan Rata-rata Kadar *Neutrophyl Elastase* (ng/dl) dalam *Gingival Crevicular Fluid* dengan Penyakit Periodontal Berdasarkan PDI

Jenis enzim	PDI	f	Rata-rata	Standar deviasi	p
Elastase	Sehat	20	2,50	1,26	0,00
	Gingivitis ringan	20	6,23	1,11	
	Periodontitis ringan	20	9,42	1,04	
	Total	60	6,05	3,06	

Berdasarkan tabel 5.7 terdapat perbedaan rata-rata kadar *Neutrophyl Elastase* berdasarkan kelompok PDI, yang tertinggi terdapat pada Periodontitis ringan dengan rata-rata = $9,42 \pm 1,04$ ng/dl dan bermakna. Tabel diatas menunjukkan pada penderita gingivitis ringan berpeluang mengalami peningkatan kadar NE sebanyak 2,5 kali lipat dibanding kondisi sehat, sedangkan pada kondisi periodontitis ringan naik 3,7 kali lipat dibanding kondisi sehat. Untuk melihat perbedaan antar kelompok maka dilanjutkan dengan uji Post-hoc Bonferroni pada tabel 5.8.

Tabel 5.8 Hasil Uji Post-Hoc Bonferroni Kadar Enzim *Neutrophyl Elastase* Antar Kelompok PDI

PDI	Kadar NE		
	Sehat	Gingivitis ringan	Periodontitis ringan
Sehat	-	0,000	0,000
Gingivitis ringan	0,000	-	0,000
Periodontitis ringan	0,000	0,000	-

Berdasarkan tabel 5.8 terdapat perbedaan rata-rata *Neutrophyl Elastase* yang signifikan antara kelompok sehat dengan gingivitis ringan, kelompok sehat dengan periodontitis ringan, dan juga antara kelompok gingivitis ringan dengan periodontitis ringan ($p < 0,05$).

Tabel 5.9 Hasil Uji Homogenitas pada Enzim *Matrix Metalloproteinase-8* (ng/dl), *Alkaline Phosphatase* (ng/dl) dan *Neutrophyl Elastase* (ng/dl) Berdasarkan PDI

Jenis Enzim	<i>p</i>
MMP8	,05
ALP	,40
Elastase	,15

Berdasarkan tabel 5.9 menunjukkan bahwa hasil uji statistik dengan uji homogenitas menunjukkan bahwa enzim MMP-8, ALP dan NE $p > 0,05$, dan data dapat diteruskan dengan uji MANOVA.

Tabel 5.10 Hasil Uji MANOVA Menunjukkan Enzim yang Paling Kuat Hubungannya dalam *Gingival Crevicular Fluid* dengan Penyakit Periodontal

Jenis Enzim	Type III Sum of Squares	<i>p</i>
MMP8	12929,696(a)	0,00
ALP	399956,831(b)	0,00
Elastase	480,025(c)	0,00

- a. MMP-8 $r^2 = 0,942$
 b. ALP $r^2 = 0,899$
 c. NE $r^2 = 0,866$

Berdasarkan tabel 5.10 menunjukkan bahwa hasil uji statistik dengan uji MANOVA ketiga enzim menunjukkan hubungan yang signifikan $p < 0,05$ pada tiap kelompok sampel. Kadar MMP-8 mempunyai kontribusi paling besar pada penyakit periodontal dengan $r^2 = 94,2\%$ dibanding Alkaline Phospat $r^2 = 89,9\%$ dan Neutrofil Elastase $r^2 = 86,6\%$.

BAB VI

PEMBAHASAN

6.1 Karakteristik Penderita

Penelitian dilakukan terhadap pasien rawat jalan poli gigi RSUD Padang dari 200 pasien yang diambil sebagai subjek penelitian telah dilakukan anamnesa dan pemeriksaan fisik maka diambil 60 orang yang dijadikan sampel. Sebanyak 140 tidak memenuhi syarat inklusi dengan berbagai alasan seperti merokok, mengkonsumsi obat-obatan, memakai alat kontrasepsi atau sedang menstruasi. Kemudian pengambilan pasien sehat, gingivitis ringan dan periodontitis ringan yang memenuhi kriteria inklusi sebanyak 20 orang tiap kelompok. Pada pengambilan sampel dipermudah oleh karena keingintahuan pasien akan keadaan dan kondisi kesehatan rongga mulutnya.

6.2 Perbedaan kadar *Matrix Metalloproteinase-8* dalam *Gingival Crevicular Fluid* dengan penyakit periodontal

Hasil uji statistik pada penelitian ini didapatkan perbedaan yang bermakna antara kadar *Matrix Metalloproteinase-8* dalam *Gingival Crevicular Fluid* dengan penyakit periodontal berdasarkan PDI ($p < 0,05$).

Perubahan patologis pada gingivitis berhubungan dengan jumlah mikroorganisme yang terdapat di dalam sulkus gusi. Gingivitis ringan yang ditandai dengan tertariknya netrofil secara kemotaksis oleh kandungan bakteri (LPS, FMLP, fatty acid), terjadi perubahan vaskuler berupa dilatasi pembuluh darah perifer disertai dengan naiknya aliran darah, perubahan sel-sel epitel, dan degradasi kolagen yang diakibat oleh produk bakteri.

Kolagen disintesis oleh fibroblas dan disekresikan dalam bentuk inaktif yaitu prokolagen, kemudian diubah menjadi tropokolagen. Pada rongga ekstraselular, tropokolagen dipolimerisasi menjadi benang-benang kolagen yang kemudian beragregasi ke dalam bundel kolagen dengan membentuk ikatan silang atau triple helix (Elley *et al.*, 2010). MMP 8 dengan proses kolagenase bekerja dengan memecah kolagen tipe 1 melalui pemecahan triple helix. (Apajalahti, 2004). Enzim MMP8 mempunyai peranan penting dalam pengrusakan jaringan selama proses inflamasi (Apajalahti, 2004). MMP-8 juga berperan pada metabolisme peptidoglikan merupakan metabolisme dari dinding sel pada bakteri gram positif dan gram negatif yang mengaktifkan komplemen, aktivitas immunosupresif, menstimulasi resorpsi tulang, dan menstimulasi makrofag menghasilkan *prostaglandin* dan kolagenase (Chung *et al.*, 2004).

Penelitian cross sectional yang dilakukan oleh Leppilahi *et al* (2010) di Helsinki dengan Elissa Amersham pada 214 sampel, pengukuran kadar MMP-8 pada pasien dengan inflamasi periodontal yang parah. Rata-rata kadar MMP-8 pada periodontal sehat adalah 35,7 ng/ml, periodontitis ringan adalah 32,5 ng/ml, periodontitis sedang 39,2 ng/dl dan severe berat adalah 28,8 ng/ml. Hasil yang tidak signifikan pada pemeriksaan kadar MMP8 pada periodontitis ringan, periodontitis sedang, periodontitis parah karena pada kondisi periodontitis telah terjadi kehilangan tulang dimana saat *boneturn over*, osteoclast menghancurkan tulang dan osteoblast membangun tulang maka produksi enzim ALP berada pd tingkat maksimal.

Menurut Uitto *et al* (2003) MMP-8 berperan dalam proses fisiologis termasuk morfogenesis, penyembuhan luka, remodeling jaringan, angiogenesis dan respon imun normal terhadap infeksi. Aktivitas MMP-8 rendah pada jaringan normal dan ekspresi MMP-8 dapat dideteksi pada proses repair dan remodeling pada jaringan inflamasi (Parks *et al*, 2004).

Penelitian kohort yang dilakukan oleh Alfant (2009) di Florida dengan menggunakan sampel sebanyak 44 orang berumur 7-19 tahun, didapatkan bahwa MMP-8 adalah mediator utama pada destruksi jaringan yang berhubungan dengan penyakit periodontal termasuk perkembangan dari gingivitis ke periodontitis. Pada kondisi non-patologis (remodeling normal) , jaringan fagositosis dan pencernaan intraseluler kolagen fibril normal pada gingival dan ligament periodontal. Pada keadaan patologis, keseimbangan sintesis kolagen dan degradasi terganggu menyebabkan destruksi jaringan karena pemecahan kolagen yang berlebihan.

Kedalaman poket terdiri dari 3 kelompok yaitu deep (7-11mm), moderate (4-6 mm) dan shallow (< 2mm). Pada poket yang dalam , terdapat peningkatan enzim MMPs kecuali MMP 8. MMP 8 meningkat pada poket yang moderat daripada poket yang dalam. Peningkatan kadar MMP8 dimulai pada gingivitis ringan, selanjutnya menjadi kronis, periodontitis terjadi ditandai dengan rusaknya ligament periodontal bahkan tulang alveolar. Pada perubahan dari periodonsium sehat menjadi inflamasi , terjadi pemecahan kolagen berganti dari jalur intraseluler yang terkontrol ke jalur yang dimediasi oleh Metalloproteinase (Kinane, 2000).

Norppa (2012) melakukan penelitian cross sectional pada 61 pasien dengan periodontitis kronis di Finlandia tentang hubungan periodontal dengan inflamasi

sistemik, metode Ellisa Quantiqin RD sistem. Menyatakan konsentrasi rata-rata MMP-8 di GCF pada gingiva normal adalah $\bar{x} \pm SD = 11,8 \text{ ng/ml} \pm 12,8 \text{ ng/ml}$ dan pada kelompok periodontitis $\bar{x} \pm SD = 150,1 \text{ ng/ml} \pm 91,8 \text{ ng/ml}$. Dinyatakan bahwa hubungan antara MMP-8 pada sulkus gingiva yang dangkal dan subjek dengan penyakit periodontal tingkat lanjut adalah signifikan. Tidak ada hubungan antara konsentrasi MMP-8 dengan rokok. Kadar MMP-8 juga terdeteksi di tempat yang sehat dan berkorelasi dengan status kesehatan periodontal. Semakin tinggi kadar MMP-8 di sulkus gingiva, maka akan semakin tinggi juga tingkat kerusakan jaringan periodontal. Kadar MMP-8 lokal pada sulkus yang sehat berhubungan dengan kadar inflamasi periodontal. Pada studi cross sectional tidak dapat ditemukan hubungan antara konsentrasi MMP-8 pada periodontitis kronis dan attachment loss sebagai indikasi peningkatan resiko periodontitis.

Berdasarkan penelitian Uitto, Norppa sejalan dengan penelitian ini terbukti adanya hubungan yang bermakna antara kadar MMP-8 dengan penyakit periodontal. MMP-8 berperan dalam proses proteolitis, proses katabolik kolagen, MMP-8 berfungsi untuk mendegradasi kolagen khususnya kolagen tipe I yang paling banyak ditemui pada jaringan periodontal.

Pada penelitian ini didapatkan rata-rata kadar MMP-8 berdasarkan kelompok PDI pada kelompok sehat dengan $\bar{x} \pm SD 4,21 \text{ ng/dl} \pm 4,41$ dan pada gingivitis ringan naik 5,2 kali dibanding kondisi sehat dengan $\bar{x} \pm SD 21,69 \text{ ng/dl} \pm 3,94$, sedangkan pada kondisi periodontitis ringan naik 9,5 kali $\bar{x} \pm SD 40,16 \text{ ng/dl} \pm 2,64$ dibanding kondisi sehat. Perbedaan kadar MMP-8 pada kondisi sehat, gingivitis ringan dan periodontitis berat ini dapat disarankan digunakan

sebagai parameter dalam menegakkan diagnosa, sehingga pemilihan treatment lebih tepat dan dapat mencegah komplikasi secara sistemik

6.3 Perbedaan kadar *Alkaline phosphatase* dalam *Gingival Crevicular Fluid* dengan penyakit periodontal

Hasil uji statistik pada penelitian ini didapatkan perbedaan yang bermakna antara kadar *Alkaline phosphatase* dalam *Gingival Crevicular Fluid* dengan penyakit periodontal berdasarkan PDI ($p < 0,05$).

Alkaline phosphatase diproduksi oleh banyak sel. Sumber utama ALP adalah PMN, bakteri di plak supragingival dan subgingiva dan aktivitas osteoblas dan fibroblas, dan sedikit kontribusi serum. ALP dominan terdapat pada epitelium poket. Jika sumber utama ALP pada penyakit periodontal adalah PMN, maka ALP adalah penanda yang potensial untuk inflamasi. Terdapat korelasi yang non-signifikan antara periodontal indeks, gingival indeks dan bleeding indeks, dengan aktivitas ALP dan periodontitis kronis (Malhotra, 2010).

Peningkatan akumulasi plak dan inflamasi akan meningkatkan inflamasi dari patologis jaringan periodontal, Hal ini memicu endotoksin bakteri yang akan mengaktifkan prostaglandin, yang nantinya mengaktivasi osteoclast. Pada kondisi ini sel B terpicu untuk menghasilkan IL-1b dan TNFa serta menghancurkan tulang (*bone loss*). Jensen (2010) menyatakan bahwa aktivitas ALP paling tinggi di osteoblast, sedang di periodontal ligament fibroblast, dan aktivitasnya rendah di gingival osteoblast. Peningkatan aktivitas pada penyakit periodontal adalah karena meningkatnya inflamasi dan *bone turn over rate* (Al-Rawi et al, 2011).

Fungsi ALP adalah sebagai identifikasi daerah inflamasi dan mengatur mineralisasi dengan meningkatkan konsentrasi fosfor yang akan menghambat

kerja inhibitor hidroksi apatit dan phosphoprotein serta mengikat dan mengatur pengendapan kalsium dan fosfat dengan mengatur jumlah hidroksi apatit yang terbentuk. Saat terjadi kehancuran tulang terjadi peningkatan jumlah ALP oleh fibroblast, neutrofil dan osteoblas (Bart, 2008).

Unsall (2008) melakukan penelitian cross sectional di Turki pada 41 pasien metode Ellisa Biomervex-Franc. Menyatakan konsentrasi ALP di GCF secara signifikan lebih tinggi pada periodontitis dibandingkan sampel sehat dan gingivitis, juga lebih tinggi kedalaman probingnya dibandingkan kelompok sehat dan gingivitis. Rata-rata konsentrasi ALP GCF pada kelompok kontrol adalah $\bar{x} \pm SD = 139,25 \text{ U}/\mu\text{L} \pm 22,09 \text{ U}/\mu\text{L}$, dan pada periodontitis $\bar{x} \pm SD = 35,78 \text{ U}/\mu\text{L} \pm 7,92 \text{ U}/\mu\text{L}$. Selanjutnya Unsall memakai metode Ellisa Biotek instrumen-USA, didapatkan hasil kadar ALP pada sampel gingivitis 16,46 ng/dl dan periodontitis 45,71 ng/dl.

Penelitian cross sectional yang dilakukan oleh Malhotra (2010) di Punjab-India dengan sampel 18 orang periodontitis, mendapatkan bahwa tidak menemukan korelasi positif antara GI dan ALP, penelitian ini berbeda dengan studi yang dilakukan Unsall (2008), menyatakan bahwa dengan meningkatnya GI, total ALP meningkat dan signifikan pada gingivitis ringan. Hal ini disebabkan karena perbedaan ukuran sampel, cara pengumpulan dan metode analisis. Kadar ALP berkurang pada gingiva yang sehat sedangkan peningkatan jumlah aktivitas GCF pada gingivitis dibandingkan dengan gingiva sehat, hasilnya tidak signifikan. Rata-rata Aktivitas total ALP pada pasien sehat adalah $\bar{x} \pm SD = 4264,58 \mu\text{U} \pm 724,06 \text{ U}/\mu\text{L}$, gingivitis $\bar{x} \pm SD = 5797,92 \mu\text{U} \pm 85,43 \mu\text{U}$, dan periodontitis kronis adalah $\bar{x} \pm SD = 8473,33 \mu\text{U} \pm 72,06 \mu\text{U}$.

Alkaline phosphatase di dalam GCF berkorelasi dengan kedalaman probing . Aktivitas ALP meningkat pada periodontitis kronis. Ada korelasi signifikan antara konsentrasi ALP di GCF dan kedalaman poket. Hal ini mengindikasikan bahwa tulang jaringan periodontal juga merupakan sumber enzim ALP aktif di jaringan. (Malhotra, 2010). Namun, menurut Dabra dan Singh (2012) yang melakukan penelitian kohort pada 20 pasien gingivitis, 20 pasien periodontitis dan 20 kontrol, kadar ALP lebih tinggi pada periodontitis daripada gingivitis namun perbedaannya tidak signifikan. Rata-rata aktivitas ALP (IU/l) pada saliva pada kelompok sehat adalah $\bar{x} \pm SD = 24,85 \text{ (IU/L)} \pm 12,14 \text{ (IU/L)}$, pada pasien gingivitis $\bar{x} \pm SD = 43,20 \text{ (IU/L)} \pm 16,57 \text{ (IU/L)}$, pada pasien periodontitis $\bar{x} \pm SD = 44,55 \text{ (IU/L)} \pm 19,14 \text{ (IU/L)}$.

Berdasarkan penelitian Dabra dan Singh, Unsall, Malhotra sejalan dengan penelitian ini. Rata-rata kadar ALP berdasarkan kelompok PDI pada kelompok sehat dengan $\bar{x} \pm SD 35,78 \text{ ng/dl} \pm 26,69$ dan pada gingivitis ringan naik 3,7 kali dibanding kondisi sehat dengan $\bar{x} \pm SD 132,92 \text{ ng/dl} \pm 29,33$, sedangkan pada kondisi periodontitis ringan naik 6,5 kali $\bar{x} \pm SD 235,74 \text{ ng/dl} \pm 25,08$ dibanding kondisi sehat. Terbukti ada hubungan yang bermakna antara kadar Alkaline Phosphatase dengan penyakit periodontal dan terdapat peningkatan aktivitas ALP pada penyakit periodontal. Pemeriksaan kadar ALP dapat disarankan sebagai salah satu parameter pada penyakit periodontal.

6.4 Perbedaan kadar *Neutrofil Elastase* dalam *Gingival Crevicular Fluid* dengan penyakit periodontal

Hasil uji statistik pada penelitian ini didapatkan hubungan yang bermakna antara kadar *Neutrofil Elastase* dalam *Gingival Crevicular Fluid* dengan pada penyakit periodontal ($p < 0,05$).

Pada penelitian cross sectional yang dilakukan oleh Alpagot (2001) di San Fransisco dengan sampel 60 orang menyatakan adanya peningkatan kadar neutrofil elastase pada lokasi inflamasi dibandingkan dengan subjek yang sehat. Ini mengindikasikan bahwa kadar neutrofil elastase pada GCF merupakan faktor resiko periodontitis.

Pada saat inflamasi periodontal kadar NE meningkat karena banyak neutrophil bermigrasi ke lokasi inflamasi. Peningkatan NE terjadi karena peningkatan Cathepsin B yang mendegradasi inhibitor NE Serine Leukosit Protease Inhibitor (SLPI) ditambah dengan produksi dari fibroblast dan epithelial. Peningkatan NE pada sel-sel epithelial diaktivasi oleh IL 8, IL 6 dan PGE sehingga terjadi peningkatan kemotaksis, proliferasi sel imun, dan degradasi jaringan lunak karena hancurnya elastin (Geragehty,2007). Hasil yang sama juga diperoleh oleh Armitage *et al* (1994) yang menyatakan bahwa tempat dengan kadar elastase yang tinggi mengindikasikan resiko peningkatan alveolar bone loss yang progresif.

Jin *et al* (1995) dan Malgorzata *et al* (2011) mengobservasi tingginya kadar NE di GCF pada pasien dengan periodontitis berulang daripada pasien yang mendapat perawatan periodontal. Jin juga menyatakan aktivitas elastase granulocytic pada GCF berkorelasi dengan respon terhadap treatment periodontitis. Rescala *et al* (2010) menunjukkan kadar NE yang tinggi pada sulcus dalam daripada sulkus yang dangkal. Poket dengan PD > 4 mm adalah sumber utama peningkatan NE di saliva.

Menurut Loss (2000), kadar NE menguntungkan untuk di analisa karena pada early stage inflammation, neutrophyl adalah sel mayor yang bermigrasi dari sirkulasi darah ke tempat inflamasi. Elastase adalah proteinase yang dikeluarkan dari granula azurophilic yang merupakan indicator aktivitas neutrophyl. Gingiva yang inflamasi adalah sumber utama dimana elastase terdeteksi di rongga mulut (Cox,2006).

Penelitian cross sectional yang dilakukan oleh Cosgarea (2012) di Rumania melakukan penelitian secara crossectional pada 24 orang sample sehat dan periodontitis. Dinyatakan hasil yang tidak signifikan,karena tinggi konsentrasi SLPI yang menyebabkan rendahnya kadar Neutrofil Elastase.

Booth (2007) pada 19 pasien dengan periodontitis kronis didapatkan bahwa Aktivitas NE secara signifikan berhubungan dengan kedalaman probing dan bleeding. Kadar NE meningkat sejalan dengan peningkatan inflamasi. Hubungan antara kadar NE dengan kedalaman poket, dinyatakan bahwa volume GCF yang banyak dikumpulkan dari poket yang dalam. Rata-rata kadar NE adalah 0,008 nmol/l pada periodontitis kronis.

Aktivitas NE dipengaruhi oleh aktivitas cystein protease Cathepsin B pada GCF yang meningkat pada penyakit periodontal. Cathepsin B mendegradasi SLPI pada cairan pelapis mukosa (Taggart,2001). Degradasi inhibitor oleh Cathepsin B menurunkan kemampuan SLPI untuk meregulasi aktivitas elastase di GCF (Booth,2007). Hal lain yang mempengaruhi aktivitas NE adalah stimulasi oleh lipopolisacarida , $TNF\alpha$, IL-8 yang meningkat 20 kali lipat elastase (Owen,1999).

Penelitian cross sectional yang dilakukan oleh Malgorzata (2011) di Polandia pada 32 orang pasien periodontitis yang berumur rata-rata 41 tahun, didapatkan

bahwa kadar elastase lebih tinggi secara signifikan pada lokasi dengan penyakit periodontal berdasarkan pengukuran *Clinical Attachment Loss* dan *Alveolar Bone Loss*. Konsentrasi NE dalam GCF pada pasien periodontitis adalah $\bar{x} \pm SD = 11204,44 \text{ ng/ml} \pm 9365,738 \text{ ng/ml}$,pada kelompok kontrol $\bar{x} \pm SD = 2849,38 \text{ ng/ml} \pm 2418,146 \text{ ng/ml}$. Pada penelitian Paderson didapatkan kadar NE pada sample periodontitis 164 ng/ml.

Berdasarkan penelitian Malgorzata, sejalan dengan penelitian ini. Rata-rata kadar NE berdasarkan kelompok PDI pada kelompok sehat dengan $\bar{x} \pm SD 2,50 \text{ ng/dl} \pm 1,26$ dan pada gingivitis ringan naik 2,5 kali dibanding kondisi sehat dengan $\bar{x} \pm SD 6,23 \text{ ng/dl} \pm 1,11$, sedangkan pada periodontitis ringan naik 3,7 kali $\bar{x} \pm SD 9,42 \text{ ng/dl} \pm 1,04$ dibanding kondisi sehat. Terbukti ada hubungan yang bermakna antara kadar Neutrophyl Elastase dengan penyakit periodontal. Peningkatan NE ini dapat disarankan sebagai salah satu parameter pada penyakit periodontal.

6.5 Enzim yang paling kuat hubungannya diantara MMP-8, ALP dan NE dalam *Gingival Crevicular Fluid* dengan penyakit periodontal.

Hasil uji statistik pada MMP-8, ALP dan NE pada penelitian ini didapatkan enzim yang paling kuat hubungannya pada penyakit periodontal adalah *Matrix Metalloproteinase-8* $r^2 = 94,2 \%$ dibanding ALP dan NE pada penyakit periodontal dalam *Gingival Crevicular Fluid*.

Initial Lesion yang merupakan tahap pertama pada gingivitis berupa terlihatnya perubahan odema pada gingiva, selanjutnya bila terdapat pendarahan saat probing maka telah terjadi kerusakan serabut kolagen mencapai 70%. Pada inflamasi penyakit periodontal terjadi peningkatan jumlah mikroorganisme,

dimana kandungannya berupa endotoksin (LPS) yang dapat mengakibatkan kerusakan pada epethelial dan jaringan ikat. Selanjutnya terjadi perluasan ruang antara sel-sel *epithelial junction* yang terjadi selama gingivitis ringan. Kondisi ini mengakibatkan bakteri mendapat jalan masuk ke dalam jaringan ikat. Dengan bertambah parahnya inflamasi pada periodontal maka kadar MMP-8 meningkat dibanding ALP dan NE. Hal ini berhubungan dengan struktur gingiva, dimana jaringan ikat gingiva terdiri dari rangkaian bundel serat kolagen dengan komponen utama terdiri dari serat kolagen 60%, fibroblas 5%, pembuluh darah, saraf dan matriks 35% (Graber *et al.*, 2005). Menurut Lee *et al* (2012) MMP-8 juga dihasilkan oleh fibroblast. Fibroblast adalah tipe sel yang paling banyak di jaringan periodontal yang berperan di saat inflamasi dan perbaikan jaringan periodontal.

Periodontitis adalah reaksi inflamasi kronis yang dipicu oleh mikroorganisme patogen. Pada periodontitis parah, epitel yang ulserasi menyebabkan invasi bakteri. Oleh karena itu banyak sel imunokompeten yang direkrut ke lamina propria di sulcus epithelium. Neutrofil adalah sel yang dominan, namun menurun di saat transisi ke periodontitis dimana limfosit dan plasma sel adalah yang dominan (Bosca *et al*, 2012). Enzim yang paling potensial yang dihasilkan neutrofil dari serat-serat kolagen adalah MMP-8 (Sorsa *et al*, 2006).

MMP-8 meningkat pada inflamasi . Secara patologis, MMP-8 yang berlebihan adalah enzim utama dalam destruksi periodontal dengan degradasi kolagen tipe I. MMP-8 disimpan di granula sekunder neutrofil . MMP-8 dapat mengeluarkan efek antiinflamasi pada respon imun dengan memproses *anti – inflammatory*

sitokin dan *chemokin*. MMP-8 mengatur apoptosis dan respon imun (Kuula, 2008).

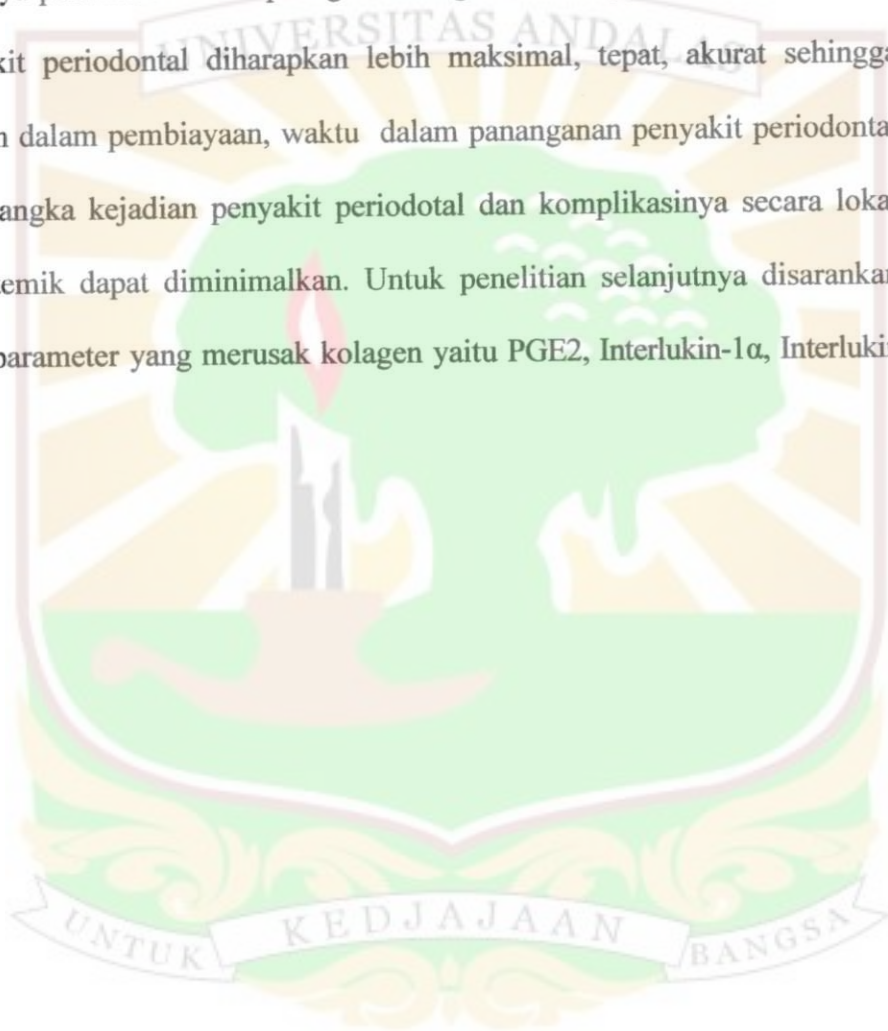
MMP-8 juga meningkat dengan bertambahnya kadar bakteri periodontitis. Bakteri *Treponema denticola* adalah bakteri yang terbanyak setelah *P.Gingivalis* yang berkoloni di plak subgingival dan berpotensi untuk mengidentifikasi lokasi perkembangan periodontitis. Semakin parah inflamasi periodontal maka akan semakin banyak koloni *T.denticola* (Byrne *et al*, 2009). Penelitian cross sectional yang dilakukan oleh Yakob *et al* tahun 2012 pada 56 orang pasien periodontitis dan 43 orang control tentang *T. denticola* pada inflamasi periodontal menyatakan bahwa keberadaan *T. denticola* berhubungan dengan peningkatan kadar MMP-8 di lokasi inflamasi. Semakin banyak *T.denticola*, maka akan semakin meningkat kadar MMP-8 pada GCF.

Tujuan akhir dari penelitian ini adalah mendapatkan penanda yang paling kuat hubungannya pada penyakit periodontal dalam *Gingival Crevicular Fluid*. Setelah dilakukan hasil uji statistik pada penelitian ini didapatkan hubungan yang bermakna antara kadar *Matrix Metalloproteinase-8*, *Alkaline Phosphatase* dan *Neutrophyl Elastase* pada penyakit periodontal dalam *Gingival Crevicular Fluid*. Hasil uji analisis multivariat dengan Uji MANOVA, akhirnya didapatkanlah penanda yang paling kuat hubungannya dengan penyakit periodontal adalah *Matrix Metalloproteinase-8*. karena MMP-8 bekerja menghancurkan kolagen tipe 1 dan struktur gingiva, dimana jaringan ikat gingiva terdiri dari rangkaian bundel serat kolagen dengan komponen utama terdiri dari serat kolagen 60%.

Dengan terbuktinya hubungan paling kuat antara kadar *Matrix Metalloprotease-8* dengan penyakit periodontal, maka terjadi kadar MMP-8 yang

tinggi dapat dijadikan indikator tingginya inflamasi pada penyakit periodontal. Saat ini pengukuran kadar MMP-8 hanya digunakan untuk kepentingan penelitian. Untuk itu disarankan agar pemeriksaan kadar MMP-8 dapat direkomendasikan untuk digunakan dalam menegakkan diagnostik yang tepat dan selanjutnya dapat menentukan prognosa dan mengevaluasi treatment yang mempunyai parameter.

Pentingnya parameter dalam penegakan diagnosa sehingga pemberian terapi pada penyakit periodontal diharapkan lebih maksimal, tepat, akurat sehingga penghematan dalam pembiayaan, waktu dalam penanganan penyakit periodontal selanjutnya angka kejadian penyakit periodontal dan komplikasinya secara lokal maupun sistemik dapat diminimalkan. Untuk penelitian selanjutnya disarankan memeriksa parameter yang merusak kolagen yaitu PGE2, Interlukin-1 α , Interlukin 1 β , TNF- α .



BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Terbukti perbedaan yang bermakna antara kadar *Matrix Metaloprotease-8* dalam Gingival Crevicular Fluid pada penyakit periodontal.
2. Terbukti perbedaan yang bermakna antara kadar *Alkaline phosphatase* dalam Gingival Crevicular Fluid pada penyakit periodontal.
3. Terbukti perbedaan yang bermakna antara kadar Neutrofil Elastase dalam Gingival Crevicular Fluid pada penyakit periodontal.
4. Terbukti penanda yang paling kuat hubungannya dengan penyakit periodontal adalah *Matrix Metalloproteinase-8*.

7.2 Saran

1. Disarankan dalam aplikasi terapi penyakit periodontal selanjutnya menggunakan cairan fisiologis tubuh seperti GCF sebagai salah satu specimen dalam menentukan parameter yang menyatakan kondisi kesehatan pasien.
2. Dalam mendiagnosa, menegakkan prognosa, dan mengevaluasi treatment sangat penting berdasarkan parameter. Dengan didapat hubungan yang paling kuat antara MMP-8 dengan penyakit periodontal maka pengukuran kadar enzim MMP-8 dalam GCF disarankan untuk dijadikan parameter dalam menegakkan diagnostik yang tepat dan selanjutnya dapat menentukan prognosa dan mengevaluasi treatment.

3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dalam pemeriksaan untuk melihat korelasi *Periodontal Disease Index* dengan kadar *Matrix Metalloproteinase 8* dalam *Gingiva Crevicular Fluid*.
4. Perlu dilakukan pemeriksaan lebih lanjut untuk parameter yang merusak kolagen yaitu PGE2, Interlukin-1 α , Interlukin 1 β , TNF- α .



DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed & Mohammed. 2011. Matrix metalloproteases 2 and 9 in situ mRNA expression in colorectal tumors from Iraqi patients. *Indian Journal Pathology & Microbiology* 54 (1) : 7-14.
- Ahlfors J. E., Billiar K. L. Biomechanical and biochemical characteristics of a human fibroblast-produced and remodel matrix Biomaterials. 2007;28:2183-2191.
- Al-Rawi ,Nadia *et al.* Salivary *Alkaline Phosphatase* And Periodontal Disease. MDJ. Vol 8 No.2 2011
- Amaleinei C, Irina Droga Caruntu, Raluca Anca Balan. Biology Of Metalloproteases and remodelling. *Romanian Journal of Morphology and embryology*. 2007, 48(4):323-334
- Amit Acharya, Jeffrey J. VanWormer, Stephen C. Waring, Aaron W. Miller, Jay T. Fuehrer, and Gregory R. Nycz. Practice of Epidemiology Regional Epidemiologic Assessment of Prevalent Periodontitis Using an Electronic Health Record System. *American Journal of Epidemiology Advance Access* published March 4, 2013.
- Anna Norppa. Association Between Periodontal and Systemic Inflammation A Study of Pro- and Anti- Inflammatory Mediators. *Acta Universitatis Oulensis D Medica* 1180 ,2012
- Alfant, Barnett Logan. Matrix Metalloproteinase Kadars and Microflora Associated with Aggressive Periodontitis in Children. A Thesis Presented to the Graduate School of the University of Florida, 2009.
- Alptekin, M. Gursel, Long Term Evaluation of GCF Elastase Kadars in Periodontitis Patients. August 2004:0449.
- Angulo et. al. 2011. Detection and molecular staging of bladder cancer using real-time RT-PCR for gelatinases (MMP-2, MMP-9) and TIMP-2 in peripheral blood. *Acta Urologica Espanolas* 35(3) : 127-36.
- Apajalahti S. 2004. Short Root Anomaly (SRA) prevalence and phenotypic features in families-with emphasis on matrix metalloproteinase in gingival crevicular fluid of SRA and orthodontic Patients. Academic dissertation. Institute of dentistry department of Pedodontics and Orthodontics, University of Helsinki, Finland.
- Bader HJ, Goldhaber P. The passage of intravenously administered tetracycline in the gingival sulcus of dog. *J Oral Ther.* 1996;2:324 In: Carranza FA, Newman MG. *Clinical Periodontology*, 9th ed Philadelphia: WB. Saunders Co. 2000; 256-257.
- Baker Paul, Len D'Cruz, Koray Feran, et.al. British Society of Periodontology Revised 2nd version, November 2012:9-11.
- Baugh, RJ dan Travis J. Human leukocyte granule elastase: rapid isolation and characterization. 1976. *Biochemistry* 15, 836-41.
- Belaouaj A, Kim KS, Shapiro SD (August 2000). "Degradation of outer membrane protein A in *Escherichia coli* killing by neutrophil elastase". *Science* 289 (5482):1185-8.
- Belle VH. Alkaline Phosphatase, Kinetics and Inhibition by cefamandole of purified isoenzymes from human. 1976. *Clinical chemistry* Vol 22 No 7. 972-976.

- Berrin Üsal, Işıl Saygun, Özlem Daltaban, Belgin Bal, and Erol Bolu. The Relationship between Periodontal Status and *Alkaline Phosphatase* Kadars in Gingival Crevicular Fluid in Men with Hypergonadotropic Hypogonadism. *Yonsei Med J*. 2008 February 29; 49(1): 71–78.
- Bildt MM, Bloemen M, Kuijpers-Jagtman AM. Matrix metalloproteases and tissue inhibitor of metalloproteases in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement. *European J of Orthod* 2009; 31:529-35.
- Carranza FA, Newman MG. *Clinical Periodontology*. 9th ed Philadelphia: WB. Saunders Co 2000; pp. 36-73, 254-260, 500, 682.
- Booth, Veronica *et al*. Elastase Activity in GCF and Saliva Relates to Both Clinical Parameters and Protease Inhibitor Kadars in Patient with Severe Periodontitis. *Perio* 2007; 4 (2):129-138.
- Bretaudiere JP, Spilman T. 1984. *Methods of enzymatic analysis*. Vol 4 Verlag Chemil, weinheim, germany. PP. 75-92.
- Burt, B. A. (1993). "The role of epidemiology in the study of periodontal diseases." *Periodontology* 2000 2: 26-33.
- Byrne SJ, Dashper SG, Darby IB, Adams GG, Hoffmann B, Reynolds EC. Progression of chronic periodontitis can be predicted by the kadars of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in subgingival plaque. *Oral Microbiol Immunol*. 2009 Dec;24(6):469-77. doi: 10.1111/j.1399-302X.2009.00544.x.
- Caffesse RG, Nasjleti CE, Anderson GB, Lopatin DE, Smith BA, Morrison EC. Periodontal healing following guided tissue regeneration with citric acid and fibronectin application. *J Periodontol*. 1991 Jan;62(1):21-9.
- Cao & Zucker. 2007. Biology and chemistry of matrix metalloproteases (MMPs).
- Carlo Cafiero and Sergio Matarasso .Predictive, preventive, personalised and participatory periodontology: 'the 5Ps age' has already started. *EPMA Journal* 2013, 4:16 doi:10.1186/1878-5085-4-16
- Carranza FA. 2006. *The periodontal pocket*, In: Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA (eds), *Clinical Periodontology*, 10th edition, St. Louis, Saunders-Elsevier, p: 434-51.
- Carrel RW, Jeppsson J-O, Laurell CB, Structure and variation of human α -1-antitrypsin. *Nature*. 1982;298:329-334.
- Cooley J, Takayama TK, Shapiro SD, the serpin MN/EI inhibits elastase-like and chymotrypsin-like serine proteases through efficient reactions at two active sites. *Biochemistry*. 2011;40:15762-15770.
- Chapple I, Garner, *et al* " Prediction And Diagnosis Of Attachment Loss By Enhanced Chemiluminescent Assay Of Crevicular Fluid Alkaline Phosphatase Kadar. *J Clin Periodontol*. 1999; 26:190-8
- Chapple ILC, Sokransky SS, Dibart S, Glenwright HD, Matthews JB. Chemiluminescent assay of *Alkaline Phosphatase* in human gingival crevicular fluid: investigations with an experimental Gingivitis model and studies on the source of the enzyme within crevicular fluid, *J Clin Periodontol* 1996; 23: 587-594.
- Charoenrat P, Rhys-Evans and Eccles SA. 2001. Expression of Matrix Metalloproteases and Their Inhibitors correlates with Invasion and Metastasis in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surgery* 127 : 813-20.

- Chung et.al. 2004.Collagenase unwinds triple-helical collagen prior to peptide bond hydrolysis.The EMBO Journal. 23:3020–3030
- Corbet, E. F.; Smales, Roger Joseph. Oral diagnosis and treatment planning: Part 6. Preventive and treatment planning for periodontal Disease.British Dental Journal, 2012; 213(6):277-284
- CoxSW, EleyBM. *Cathepsin B/L-, elastase-, tryptase-, trypsin- and dipeptidyl protease IV-like activities in gingival crevicular fluid. A comparison of kadars before and after basis periodontal treatment of chronic Periodontitis patients.*J Clin Periodontol.1992;16:1–11
- Cox SW And Eley BM *et al*, Elastase Inhibitors From Gingival; Homogenates, Gingival Epithelial Cells And Saliva, J Dent Res. 2001: 80: 1153.
- Dabra Sarita, Preetinder Singh, Evaluating the kadars of salivary alkaline and acid phosphatase activities as biochemical markers for periodontal disease: A case series. Dent Res 9(1): 41–45. January 2012.
- Dabra Sarita, Kamalpreet China, Alka Kaushik. Salivary enzymes as diagnostic markers for detection of gingival/periodontal disease and their correlation with the severity of the disease.J Indian Soc Periodontol ;16(3): 358–364 September 2012.
- Daltaban O, Saygun I, Bal B, Balol K, Serdar M. Gingival crevicular fluid *Alkaline Phosphatase* kadars in postmenopausal women: Effects of phase I periodontal treatment. J Periodontol 2006;77:67-72
- Dean,Rob L. Kinetic studies with *Alkaline Phosphatase* in the presence and absence of inhibitors and divalent cations.Biochemistry and Molecular Biology Education Volume 30, Issue 6, pages 401–407, November 2002
- Dean RL. Kinetic studies with alkaline Phosphatase in presence and absence of inhibitors and divalent cations. biochemistry and molecular biology education. 2006. 401-407.
- DeCarlo A Jr, Windsor L, Bodden M.K., Activation and Novel processing of Matrix Metalloprotease by a Thiol-protease from the oral anaerob porphyromonas gingivalis. J Dent Res 76(6): 1260-1270, June 1997.
- Decock J *et al*. 2008. Plasma MMP1 and MMP8 Expression in Breast Cancer: Proactive Role of MMP8 against Lymph Node Metastasis. BMC Cancer 8:77
- De Pinho, Aline Mendes Silva,Carolina Marques Borges,Mauro Henrique Nogueira Guimarães de Abreu,I Efigênia Ferreira e Ferreira,and Andréa Maria Duarte Vargas. Impact of Periodontal Disease on the Quality of Life of Diabetics Based on Different Clinical Diagnostic Criteria. International Journal of Dentistry. Volume 2012 (2012), Article ID 986412, pages 8.
- Dimitra Bourboulia and William G. Stetler-Stevenson. Matrix MetalloProteinases (MMPs) andTissue Inhibitors of MetalloProteinases (TIMPs): positive and negative regulators intumor cell adhesion. Semin Cancer Biol .2010 June .20(3) :161-168
- EmberyG, WaddingtonR. *Gingival crevicular fluid: Biomarkers of periodontal tissue activity.* Adv Dent Res. 1994;8:329–336
- Ejeil A, Igondjo TS.Expression of MMPs and TIMPs in healthy and diseased human gingival.J of Periodontol. 2006. 74:188-95.
- EleyBM, CoxSW. *Advances in periodontal diagnosis. 2. New clinical methods of diagnosis.* Br Dent J. 1998;184:71–74.

- Eley, B. M., Cox, S. W. (1996). A 2-year longitudinal study of elastase in human gingival crevicular fluid and periodontal attachment loss. *Journal of Clinical Periodontology*, 23(7), 681-692.
- Figueredo CM, Areas A, Miranda LA, *et al.* The short-term effectiveness of non-surgical treatment in reducing protease activity in gingival crevicular fluid from chronic Periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 2004;31(8):615-9. [PubMed: 15257737]
- Fiorelli JP, Kim DM, Ishikawa SO. *Clinical features of Gingivitis*, In: Newman MG, Takei HH, Klokkevoold PR, Carranza FA (eds), *Clinical Periodontology*, 10th edition, St. Louis, Saunders-Elsevier, 2006, p:362-72
- G Katona *et al.*, X-ray structure of a serine protease acyl-enzyme complex at 0.95-Å resolution, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 21962-21970
- Gao J, Symons A, Should Cementoblast Express *Alkaline Phosphatase* Activity? Preliminary Study Of Rat Cementoblast In Vitro . *J Periodontol* .1999 ; 70 (9): 95 1-9
- Gapski R, Barr JL, Sarment DP, Effect of systemic matrix metalloprotease inhibition on periodontal wound repair: a proof of concept trial. *J Periodontol* 2004;75(3):441-52. [PubMed:15088883]
- Geraghty,Patrick, Mark P.Rogan, Catherine M. Greene. Rachel MM Boxio, Tiphine Poiriert. Neutrophil Elastase Up-Regulate Cathepsin B and Matrix Metalloproteinase –Expression.e-publicational @RCSI : <http://epubs.rsci.ie/medart/12>.
- Ghousia Akbari, MLV Prabhuji, Bangalore Varadhan Karthikeyan, Sandip G Chorghade. MMP-8 Analysis In Gingival Crevicular Fluid Using ELISA And Novel Chair-Side Test. *World J Stomatol* 2013 February 20; 2(1): 24-29
- Gunter Schneider, Ylva lindquist dan Pirkko Vihko. 1993. *The embo journal* vol 12.no 7. Pp.2609-2615.
- Gupta,G. Gingival crevicular fluid as a periodontal diagnostic indikator- I: Host derived enzymes and tissue breakdown products. *J Med Life*. 2012 December 15; 5(4): 390-397.
- GustafssonA, AsmanB, BegstromK, *Granulocyte elastase in gingival crevicular fluid. A possible discriminator between Gingivitis and Periodontitis.**J Clin Periodontol.*1992;19:535-540.
- Golub LM, Lee HM, Greenwald RA, A matrix metalloprotease inhibitor reduces bone-type collagen degradation fragments and specific collagenases in gingival crevicular fluid during adult Periodontitis. *Inflamm Res* 1997;46(8):310-9. [PubMed: 9297576]
- Hayakawa, Taro. Matrix Metalloproteases (MMPs) and Tissue Inhibitors of Metalloproteases (TIMPs) in the development and disease of oral tissues: Special article:Dentistry in Japan 1998: 34:167-173.
- Hansen HB. Proteolytic remodelling of extracellular matrix. Current opinion of cell biology. Jun (5) 1995:728-735.
- Herman, Michael P *et al.* Expression of Neutrophil Collagenase (Matrix Metalloproteinase-8) in Human Atheroma A Novel Collagenolytic Pathway Suggested by Transcriptional Profiling *Circulation*. 2001; 104: 1899-1904

- Holtz KM, Boguslawstec dan Evan R Kantrowitz. A model of the transition state in the alkaline phosphatase reaction. The journal of biological chemistry. March 26.1999.
- Husni S.Farah, Ali A.Al Atoom and Gaber M Shehab.Explanation of the Decrease in *Alkaline Phosphatase* (ALP) Activity in Hemolysed Blood Samples from the Clinical Point of View:In vitro study .Jordan Journal of Biological Sciences Volume 5 , Number 2, June 2012 Pages 125-128.
- Imanschi, V. *et al.* 2000.Human Pathology 31, 895-904.
- Ingman T., Ding, Matrix metalloprotease and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. Journal of Clinical Periodontology 1996; 23:1127-1132.
- Ingman T, Apajalahti S, Mantyla P, Sorsa T. Matrix metalloprotease-1 and -8 in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement: a pilot study during 1 month of follow-up after fixed appliance activation. European J of Orthod 2005; 27: 202-7.
- Ishikawa I, Cimasoni G. *Alkaline Phosphatase* in humal gingival fluid and its relation to Periodontitis. Arch Oral Biol 1970;15:1401-4.
- Janott, A. 1985. Annu.rev.med.36,207-216.
- Jensen Eric D, Rajaram Gopkrishnan, and Jennifer J Westendorf. Regulation Of Gene Expression In Osteoblasts. Biofactors. Oxford,England. Jan-Feb 2010. 36(1):25-32.
- Jeffrey A. Rossman.Reactive Lesion of the Gingiva Diagnosis and Treatment Options. The open Pathology Journal 2011.3.23-32
- J Highfield Diagnosis and classification of periodontal disease Volume 54, Issue Supplement s1, pages S11–S26, September 2009
- Johnah C. Galicia, Manjunatha R. Benakanakere, Panagiota G. Stathopoulou, Denis F. Kinane. Neutrophils rescue gingival epithelial cells from bacterial-induced apoptosis. July 2009 *Journal of Leukocyte Biology* vol. 86 no. 1 181-186
- Joyle, B.K, dan Grisolia,S. Purification and properties of a nonspecific acid phosphatase from white germ. 1960. J Biol Chem. 235,2278-80
- Jung-Chul Park, Yoo-Jung Um, Ui-Won Jung, Chang-Sung Kim, Seong-Ho Choi, Chong-Kwan Kim Histological characteristics of newly formed cementum in surgically created one-wall intrabony defects in a canine model.J Periodontal Implant Sci. 2010 February; 40(1): 3–10.
- Kardum, Marija Ivie,Igor Jurak2, Koraljka Gall-Tropej2 *et al* . “The Effect of Scaling and Root Planing on the Clinical and Microbiological Parameters of Periodontal Diseases” Acta Stomat Croat 2001; 39-42.
- Kaufman E, Lamster IB. Analysis of saliva for periodontal diagnosis. J Clin Periodontol 2000;27:453-65.
- Kidd, E.A.M. Essentials of Dental Gingiva. 2005. Oxford: Oxford University Press
- Kim EE, Wyckoff HW. Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures. Two metal ion catalysis. J Mol Biol March 20, 218(2) : 449-64.1991
- Kinane DF, Darby IB, Said S, Changes in gingival crevicular fluid matrix metalloprotease-8 levels during periodontal treatment and maintenance. J Periodontal Res 2003;38(4):400–4. [PubMed: 12828657]

- Kozlenkov A, Le Du MH, Cuniassé P, Ny T, Hoylaerts MF, Millán JLJ Bone Miner Res. 2004 Nov;19(11):1862-72. Epub 2004 Jun 28. Residues determining the binding specificity of uncompetitive inhibitors to tissue-nonspecific *Alkaline Phosphatase*.
- Krizkova S. 2011. Clinical importance of matrix metalloproteases. Bratisl Lek Listy 112 (8) : 435-40.
- Kusukawa J, Sasaguri Y, Kameyama T. Expression of Matrix Metalloprotease-3 in stage I and II Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. J Oral maxillofac Surg 1995; 53:530-534.
- Lamster IB, Kaufman E, Grbic JT, *et al*. Beta-glucuronidase activity in saliva: relationship to clinical periodontal parameters. J Periodontol 2003;74(3):353-9. [PubMed: 12710755]
- Lang, N.P., Cumming, B.R., and Loe, H. Toothbrushing frequency as it relates to plaque development and gingival health. Journal of Periodontology 44, 1973; 396.
- Lang NP, Schatzle MA, Loe H. Gingivitis as a risk factor in periodontal disease. J Clin Periodontol 2009; 36 (Suppl. 10) 3-8
- Leonardi R, Talic NF, Loreto C. MMP-13 (collagenase 3) immunolocalisation during orthodontic tooth movement in rats. Acta Histochemica. 2007; 109:215-20.
- Leppilähti Jussi M, Ahonen Minna-Maija, Hernández Marcela, Munjal Sarvan, Netuschil Lutz, Uitto Veli-Jukka, Sorsa Timo, Mäntylä Päivi. Oral Rinse MMP-8 Point-Of-Care Test Identifies Patients With Strong Periodontal Inflammatory Burden, Oral Diseases 17, 1 (2010) 115"
- Lestienne, P dan Bieth, J.G. Activation of human leukocyte elastase activity by excess substrate, hydrophobic solvents and ionic strength. 1980. J. Biochemistry. 255.
- Loss BG, Tjoa S. Host Derived Diagnostic Markers For Periodontitis ,Do They Exist In Gingival Crevice Fluid? Periodontol 2000. 2005;39:53-72
- M Yakob, JH Meurman, T Sorsa, B Söder. *Treponema denticola* associates with increased levels of MMP-8 and MMP-9 in gingival crevicular fluid. Oral Diseases. Volume 19, Issue 7, pages 694-701, October 2013.
- Madianos PN, Bobetsis YA, Kinane DF. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set-up inflammatory responses in gingiva. J Clin Periodontol 2005; 32:57-71.
- Malhotra R, Grover V, Kapoor A, Kapur R. *Alkaline Phosphatase* as a periodontal disease marker. Indian J Dent Res [serial online] 2010 [cited 2013 Jun 29];21:531-6
- Małgorzata Nędzi-Góra, Renata Gorska. Elastase Concentration in Saliva in Patients with Chronic Periodontitis. Dent. Med. Probl. 2011, 48, 4, 474-480
- Mantyla P, Stenman M, Kinane DF. Gingival crevicular fluid collagenase-2 (MMP-8) test stick for chair-side monitoring of Periodontitis. J Periodontol Res 2003;38(4):436-9. [PubMed: 12828663]
- Meyle J, Zells S, Brex M. Influence of oral hygiene on elastase concentration of gingival crevicular fluid. J Periodont Res. 1992;27:226-231.
- Mos DW. Perspectives in alkaline phosphatase research. Clin Chem. 1992;38:2486-2492.

- Myriam A. Koss, Cecilia E. Castro, Karina M. Salúm, María E. López Enzymatic Profile of Gingival Crevicular Fluid in Association With Periodontal Status. 2009 *Lab Medicine*, 40, 277-280.
- Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloprotease and TIMP. *Cardiovascular Research* 2006; 69(3):562-7. Novaes AB, Junior, Souza SL, Taba M, Jr, *et al.* Control of gingival inflammation in a teenager population using ultrasonic prophylaxis. *Braz Dent J*. 2004;15(1):41-5.
- Nagase H, Visse R, Murphy G. 2006. Structure and function of matrix metalloproteinase and TIMP. *Cardiovascular Res.* 69(3):562-70
- Nakamura, Minami *et al.* Changes In A1 Protease Inhibitor And Secretory Leucocyte protease Inhibitor Kadars In Gingival Crevicular Fluid Before And After Non-Surgical Periodontal Treatment. *Oral Dis*. 2003;9:249-234
- Nedbal W, Tomakidi P, Lehmann MJ. Antisense mediated inhibition of ICAM-1 expression: a therapeutic strategy against inflammation of human periodontal tissue. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2002; 12:71-8.
- Numabe Y, Hisano A, Kamoi K, Yoshie H, Ito K, Kurihara H. Analysis of saliva for periodontal diagnosis and monitoring. *Periodontology* 2004;40:115-9.
- Oringer RJ, Howell TH, Nevins ML, Reasner DS, Davis GH, Sekler J, Fiorellini JP. Relationship between crevicular aspartate aminotransferase kadars and periodontal disease progression. *J Periodontol*. 2001 Jan;72(1):17-24.
- Ozmeric N. Advances in periodontal disease markers. *Clin Chim Acta* 2004;343:1-16.
- P.I. Eke, B.A. Dye, L. Wei, G.O. Thornton-Evans, and R.J. Genco. Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: 2009 and 2010. *J DENT RES* 0022034512457373, first published on August 30, 2012
- Palcanis KG, Larjava IK, Wells BR, *et al.* Elastase as an indikator of periodontal disease progression. *J Periodontol*. 1992;63:237-242.
- Palosaari H, walgren J, Larmas M, ronka H. 2000. The expresiion of MMP-8 in human odontoblast and dental pulp cells is down regulated by TGF-beta 1. *J Dent Rest*;79:77-84.
- Page, P.C. and Schroeder, H.E. Pathogenesis of imflammatory periodontal disease. A summary ot current work. *Laboratory Investigation* 1976; 33, 235.
- Page RC. Host response tests for diagnosing periodontal diseases. *J Periodontol*. 1992 Apr;63(4 Suppl):356-66.
- Pashley DH. A mechanistic analysis of gingival fluid pro-duction. *J Periodontal Res*. 1976;11:121-34.
- Patil PB, Patil BR. Saliva: A diagnostic biomarker of periodontal diseases. *J Indian Soc Periodontol* [serial online] 2011 [cited 2013 Jul 17];15:310-7. Available from: <http://www.jisponline.com/text.asp?2011/15/4/310/92560>
- Pederson ED, Stanke SR, Whitener SJ, Sebastiani PT, Lamberts BL, Turner DW. Salivary kadars of alpha 2-macroglobulin, alpha 1-antitrypsin, C-reactive protein, cathepsin G and elastase in humans with or without destructive periodontal disease. *Arch Oral Biol*. 1995 Dec;40(12):1151-5.
- Pejicic, Ana, Vesna Zivkovic. Histological Examination of Gingiva Treated with Low-kadar Laser in Periodontal Therapy. 2007. *JOLA Volume 7*, Issue 1, 37-43.

- Pere Gjermo & J Ostein G Ryten. Cost-effectiveness of various treatment modalities for adult chronic Periodontitis. *Periodontology* 2000, Vol. 51, 2009, 269–275
- Perinetti G, Paolantonio M, Femminella B, Serra E, Spoto G. Gingival crevicular fluid *Alkaline Phosphatase* activity reflects periodontal healing / recurrent inflammation phases in chronic Periodontitis patients. *J Periodontol* 2008;79:1200
- Pozo P, Melej C, Javier P, Martinez B. Longitudinal analysis of metalloproteases, tissue inhibitors of metalloproteases and clinical parameters in gingival crevicular fluid from Periodontitis-affects patients. *J of Period Res* 2008; <<http://hdl.handle.net/2250/2434>> (January 2009). Rai B, Kharb S, Jain R, Anand SC. Biomarkers of Periodontitis in oral health. *J of Oral Sci* 2008; 50(1): 53-6.
- Rachel L. Zemans, Sean P. Colgan, and Gregory P. Downey. Trans epithelial Migration of Neutrophils Mechanisms and Implications for Acute Lung Injury *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009 May; 40(5): 519–535.
- Rams ET, Slots J. Systemic and antimicrobial therapy in periodontics, *Periodontol* 2000 1996; 10:139-154.
- Rai, Balwant , Simmi Kharb, Rajnish Jain, And Suresh C Anand, Biomarkers Of Periodontitis In Oral Fluids, *Journal Of Oral Science* , Vol 50. No 1, 53-56, 2008
- RC Wilmoth *et al*, X-ray snapshots of serine protease catalysis reveal a tetrahedral intermediate, *Nature Struct. Biol.* 8 (2001) 689-694
- RC Wilmoth *et al*, X-ray snapshots of serine protease catalysis reveal a tetrahedral intermediate, *Nature Struct. Biol.* 8 (2001) 689-694
- G Katona *et al*, X-ray structure of a serine protease acyl-enzyme complex at 0.95-Å resolution, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 21962-21970
- Rufo MB dan William HF. 1972. I-Homoarginine, a specific inhibitor of liver-type alkaline phosphatase, applied to the recognition of liver-type enzyme activity in rat intestine. *J Histochem Cytochem.* 1972. 20:336.
- Robertson, P.B., Lantz, P.T. Marucha, K.S. Collagenolytic activity associated with *Bacteroides* species and actinomycetes. *Journal of Periodontal Research* 1982; 17, 275.
- Saroeh, Nitin. Periobasic. 2013. <http://periobasics.com/>. Diakses pada Juni 2013.
- Scheid, Rickne C. Woelfel's Dental Anatomy. 2012. Lippincott Williams Wilkins.
- Scheibe RJ, Kuehl H, Krautwald S, Meissner JD, Mueller WH. Ecto-*Alkaline Phosphatase* activity identified at physiological pH range on intact P19 and HL-60 cells is induced by retinoic acid. *J Cell Biochem.* 2000 Jan; 76(3):420-36.
- Seibel, Markus J . Biochemical Markers of Bone Turnover Part I: Biochemistry and Variability. *Clin Biochem Rev.* 2005 November; 26(4): 97–122.
- Shermin Karim, P. K. Pratibha, Shobha Kamath, G. Subraya Bhat, Ullas Kamath, Babi Dutta, Naveen Sharma, B. Archana, K. Mahalinga Bhat, and Vasudev Guddattu . Superoxide dismutase enzyme and thiol antioxidants in gingival crevicular fluid and saliva . *Dent Res J (Isfahan).* 2012 May-Jun; 9(3): 266–272.
- Soder B, Jin LJ, Wickholm S. Granulocyte elastase, matrix metalloprotease-8 and *prostaglandin E2* in gingival crevicular fluid in matched clinical sites in

- smokers and non-smokers with persistent Periodontitis. *J Clin Periodontol* 2002;29(5):384-91. [PubMed: 12060420]
- Solanki, Gaurav. A General Overview of Gingiva. *International Journal of Biomedical Research IJBR* 3 [02] [2012]79-82 79
- Stephen Wood, Albert Frydman, Stephen Cox, Rollin Brant, Sheila Needoba, Barry Eley and Reg Sauve. Periodontal disease and spontaneous preterm birth: a case control study. *BMC Pregnancy and Childbirth* 2006, 6:24 doi:10.1186/1471-2393-6-24
- Stenlicht, Mark D and Zena Werb. How Matrix Metalloproteases Regulate Cell Behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001; 17: 463-516.
- Sugiura, Y. Purification, enzymatic properties and active site environment of a novel manganese-containing acid phosphatase. 1981. *J Biol Chem* 256, 10664-70
- Surlin. 2010. Correlation between the gingival crevicular fluid mmp-8 kadar and gingival overgrowth in patients with fix orthodontic device. *Romanian Journal of morphology and embryology* 2010;51(3):515-519
- Taggart CC, Lowe GJ, *et al.* Cathepsin B, L, and S Cleave and Inactivate Secretory Leukoprotease Inhibitor. *J Biol Chem* 2001; 276:33345-33352
- Teronen, YT. Konttinen, C. Lindqvist, *et al.* Human neutrophil collagenase MMP-8 in peri-implant sulcus fluid and its inhibition by clodronate. *J Dent Res*, 76(9) 1997; 1529-1537.
- Thomson RC, Ohlsson K. Isolation, properties and complete amino acid sequence of human secretory leukocyte protease inhibitor: a potent inhibitor of leukocyte elastase. 1986. *Proc Natl Acad Sci USA*. 83:6692-6696.
- Todorovic T, Dozic I, Vicente-Barrero M, Ljuskovic B, Pejovic J, Marjanovic M, *et al.* Salivary enzymes and periodontal disease. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006;11:E115-9.
- Uitto *et al.* . Proteolytic Host Cell Enzymes In Gingival Crevice Fluid .*Periodontology* 2000. 2003, Vol 31, 77-104
- Verma RP & Hansch C. 2007. Matrix metalloproteases (MMPs) : chemical-biological functions and (Q) SARs. *Bioorg Med Chem* 15(6) : 2223-68.
- Verstappen J, Von den Hoff JW. Tissue inhibitor of metalloproteases (TIMPs): their biological functions and involvement in oral disease. *J of Dent Res* 2006; 85:1074-84.
- Vincent J.B, Crowder MW, dan averill BA. 1992. *Trends Biochem Sci*. 17, 105-110.
- Wahyukundari. Perbedaan Kadar Matriks Metalloproteinase-8 setelah scalling dan pemberian tetracilin pada penderita Periodontitis kronis. *Jurnal PDGI* Vol:58 No.1. Jan-Apr 2010.
- Wang , Bo-Liang. Unbalanced MMP/TIMP-1 expression during the development of experimental pulmonary fibrosis with acute paraquat poisoning .*Molecular Medicine Reports* March-April 2011 Volume 4 Number 2
- Wiedow O, Schorder J-M, Grefory H, *et al.* Elafin: an elastase-specific inhibitor of human skin. *J Biol Chem*. 1990;265:14791-14795.
- Wiedow O, Lideman J, Utecht B. Elafin is a potent inhibitor of protease 3. *Biochem Biophys Res Comm*. 1991;174:6-10.
- William V. Gianobile , Khalaf F. Al-Shammari, David P. Sarment. Matrix Molecules And Growth Factors As Indicators Of Periodontal Disease

Activity. *Periodontology 2000*, Vol. 31, 2003, 125–134, Blackwell Munksgaard 2003.

Yan F, Cao C, Li X. *Alkaline Phosphatase* kadar in gingival crevical fluid of Periodontitis before and after periodontal treatment. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 1995;30:255–66.

Yoshie H, Tai H, Kobayashi T, Oda-Gou E, Nomura Y, Numabe Y. Salivary enzyme kadars after *Scaling* and Interleukin 1 genotypes in Japanese patients with chronic Periodontitis. *J Periodontol*. 2007;78:498–503.

Zaidi, et.al. inhibition of osteoclastic acid phosphatase abolishes bone resorption, *Biochemical and Biophysical research communication* vol.159 issue 1, 28 february 1989. Pages 68-71.

Zambon JJ, Nakamura M, Slots J. Effect of periodontal therapy on salivary enzymatic activity. *J Periodontal Res*. 1985;20:652–9.

Zappa U. Histology of the periodontal lesion: implications for diagnosis. *Periodontol 2000* 1995;7:22-38.



Lampiran 1. Surat Keterangan Lolos Kaji Etik



KOMITE ETIKA PENELITIAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS ANDALAS
 Jl. Perintis Kemerdekaan Padang 25127
 Telepon: 0751 31746 Fax : 0751 32838 No. Reg : 036/KNEP/2008
 e-mail: fk2unand@pdg.vision.net.id

No: 247/KEP/FK/2013

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK
ETHICAL CLEARANCE

Tim Komite Etika Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang, dalam upaya melindungi hak azasi dan kesejahteraan subjek penelitian kedokteran/kesehatan, telah mengkaji dengan teliti protokol penelitian dengan judul:

The Committee of the Research Ethics of the Faculty of Medicine, Andalas University, with regards of the protection of human rights and welfare in medical/health research, has carefully reviewed the research protocol entitled:

"Enzim Matrix Metalloproteinase-8, Alakline Phosphatase, Neutrofil Elastase dalam Gingival Crevicular Fluid pada Penyakit Periodontal"

Nama Peneliti Utama : drg. Nila Kasuma, M. Biomed
Name of the Investigator

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Andalas
Name of Institution

dan telah menyetujui protokol penelitian tersebut diatas.
and recommended the above research protocol.

Padang, 16 Oktober 2013

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Andalas
Dean of Faculty of Medicine Andalas University

Ketua
Chairperson

Dr. dr.H. Masrul, MSc, Sp.GK
 NIP. 1956 1226 1987 101 001

Prof. Dr. dr. Eryati Darwin, PA(K)
 NIP. 1953 1109 1982 112 001



Lampiran 2. Surat Keterangan Melakukan Penelitian dari Kepala Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas

**Biomedical Laboratory
University of Andalas
Medical Faculty**

Jl. Perintis Kemerdekaan, PO.Box 49, Padang 25127
West Sumatera - Indonesia
Phone : +62 751 31746 Fax : +62 751 39844
e-mail : fkunand@pdg.vision.net.id



**Laboratorium Biomedik
Universitas Andalas
Fakultas Kedokteran**

Jl. Perintis Kemerdekaan, PO.Box 49, Padang 25127
Sumatera Barat - Indonesia
Phone : +62 751 31746 Fax : +62 751 39844
e-mail : fkunand@pdg.vision.net.id

SURAT KETERANGAN BEBAS LABORATORIUM

No: 078/H16.2/Lab.Biomedik/2013

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Prof.Dr.dr.Hj. Yanwirasti, PA
Jabatan : Ketua Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran
Universitas Andalas Padang

Menerangkan bahwa :

Nama : drg. Nila Kasuma
Pekerjaan : S3 Biomedik

Telah melakukan penelitian dengan judul "Analisis Enzimatis MMP8, ALP dan NE dalam GCF Pada Penyakit Periodental" dengan menggunakan metoda Kultur Limfosit sesuai dengan sampel yang telah kami terima dan telah menyelesaikan semua administrasi terkait di Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang.

Demikian surat keterangan ini saya buat dan dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Padang, 27 November 2013
Ketua Laboratorium Biomedik
Fakultas Kedokteran Unand

(Prof.Dr.dr.Hj. Yanwirasti, PA)
NIP. 194309101917012001



Lampiran 3. Protokol Penelitian

PROTOKOL PENELITIAN

Identitas diri

Nama

Umur/Tgl lahir :/...../.....
 Jenis Kelamin : Laki-laki/Perempuan
 Pekerjaan : Pegawai negri (sipil/ABRI/BUMN/BUMD/Pensiunan)
 Swasta (sebagai.....)
 Lain lain.....
 Pendidikan : SD/SMP/SMU/SMK/.....
 Perguruan Tinggi (Akademi/ Universitas/Pascasarjana)
 Asal : Kota Padang
 Kecamatan.....
 Luar Kota Padang
 - Kodya :
 - Kabupaten :

Anamnesa :

- Apa keluhan Anda ? (sebutkan)
- Sudah pernahkah melakukan perawatan gigi ?.....bulan
- Apakah Anda mengkonsumsi obat-obatan dalam 3 bulan terakhir ?
- Apakah Anda sedang menstruasi/hamil/memakai kontrasepsi ?
- Apakah Anda merokok ?
- Apakah Anda menderita penyakit sistemik ?
- Apakah Anda sering merasa haus dan lapar, sering buang air kecil pada malam hari (polidipsi, poliuri ,polifagi) ?

Pemeriksaan Klinis

Rongga Mulut

- Melakukan pemeriksaan PDI (Periodontal Disease Index)
- Melakukan pengambilan GCF

Pemeriksaan Labor

- Pemeriksaan kadar MMP8
- Pemeriksaan kadar ALP
- Pemeriksaan kadar NE

Padang.....

Observer



Lampiran 4. Penjelasan Sebelum Persetujuan

PENJELASAN SEBELUM PERSETUJUAN

Judul Protokol : Penelitian Hubungan Kadar Matriks Metalloproteinase-8, Alkaline Phosphatase, Neutrofil Elastase dengan Gingivitis dan Periodontitis dalam Gingival Crevicular Fluid

Alamat tempat penelitian : Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas

Nomor Telp (jam kerja) : 0751- 31746

Tujuan Informasi dan Persetujuan bagi Subjek

Informasi yang terapat dalam ‘persetujuan setelah penjelasan’ ini menjelaskan tentang penelitian dan peran bapak / ibu sebagai subjek dalam penelitian. Sebelum bapak / ibu memutuskan untuk berpartisipasi , bapak/ibu harus memahami tujuan penelitian , resiko yang mungkin terjadi serta manfaat yang didapat . Proses ini disebut “ Persetujuan Setelah Penjelasan”.

Formulir ini member informasi bagi bapak/ibu mengenai manfaat dan resiko dari penelitian ini. Jika bapak/ibu memutuskan untuk berpartisipasi dalam penelitian ini , maka kami akan meminta bapak/ibu agar kami dapat mempublikasikan informasi kesehatan diri bapak/ibu selama dan setelah penelitian ini berlangsung.

Dokter peneliti dan tim peneliti lainnya akan menjawab pertanyaan bapak/ibu tentang formulir persetujuan dan penelitian ini. Silahkan membaca formulir ini dengan seksama dan bapak/ibu dapat menanyakan mengenai informasi yang tersedia atau kata-kata yang tidak jelas bapak/ibu pahami, bapak/ibu dapat menolak untuk berpartisipasi dalam penelitian ini atau mundur dari penelitian

kapan pun tanpa adanya penalti atau kehilangan keuntungan yang berhak bapak/ibu dapatkan. Jika bapak/ibu mempertimbangkan untuk berpartisipasi dalam penelitian ini dan bapak/ibu memenuhi seluruh pertanyaan , maka penting untuk diingat bahwa bapak/ibu coba untuk berpartisipasi dalam penelitian ini dan bapak/ibu memenuhi seluruh pernyataan, maka sebaiknya bapak/ibu tetap berpartisipasi dalam penelitian ini hingga selesai. Namun demikian, partisipasi bapak/ibu tetap bersifat sukarela dan bapak/ibu dapat berhenti dengan alasan apapun dan tanpa diberikan penalti atau kehilangan keuntungan yang berhak bapak/ibu dapatkan.

Tujuan Penelitian

Penelitian ini adalah memeriksa sampel yang sehat, gingivitis ringan, periodontitis ringan, untuk melihat kadar MMP8, ALP, dan NE yang ada dalam GCF (cairan celah gusi).

Subjek Penelitian

Subjek penelitian yaitu sekitar 200 orang yang dipilih berpartisipasi dalam penelitian ini.

Jangka Waktu

Jika sampel memenuhi syarat dalam penelitian ini maka akan diperiksa 2 kali kunjungan. Kunjungan pertama adalah pemeriksaan PDI dan kunjungan kedua untuk pengambilan sampel GCF.

Tanggung Jawab Subjek

Jika bapak/ibu memenuhi persyaratan dan ingin berpartisipasi dalam penelitian ini, maka harus setuju untuk dilakukan pemeriksaan seperti yang disebutkan diatas dan mengikuti seluruh prosedur yang dibuat oleh peneliti.

Prosedur Penelitian

Jika bapak/ibu sudah setuju untuk berpartisipasi dalam penelitian ini, maka bapak/ibu harus menanda tangani formulir persetujuan (informed consent) sebelum dilakukan pemeriksaan.

Sebagai syaratnya adalah bahwa bapak/ibu sudah didiagnosa sebagai sampel sehat, sampel gingivitis ringan, sampel periodontitis ringan, sesuai kriteria yang sudah ditetapkan dan usia pada saat direkrut sebagai subjek penelitian adalah antara 17-30 tahun.

Potensi Resiko dan Kejadian Tidak Diinginkan

1. **Pemeriksaan PDI.** Pemeriksaan ini memakan waktu lebih kurang 15 menit dan selama pemeriksaan berlangsung bapak/ibu harus bersabar dan memang sudah menyediakan waktu untuk pemeriksaan ini. Mungkin dirasakan sedikit lelah karena diperiksa dalam waktu yang cukup lama dan adanya antrian, maka tim peneliti akan menyediakan snack ringan .
2. **Pengambilan GCF .** Pengambilan GCF akan diambil oleh peneliti langsung (Dokter gigi) yang sudah berpengalaman dan selanjutnya dilakukan pemeriksaan di laboratorium biomedik FK UNAND, dengan memperhatikan faktor sterilitas. Pada saat pengambilan GCF mungkin dirasakan sedikit tusukan ringan atau pada proses penekanan paper point ke dalam celah gusi .

Potensi Keuntungan dan Manfaat bagi Subjek.

Sebagaimana diketahui bahwa penyakit periodontal adalah merupakan faktor resiko untuk terjadinya penyakit sistemik seperti jantung, infeksi saluran pencernaan dan lain-lain. Khusus pada penelitian ini ingin diketahui kadar

enzimMMP8, ALP, dan NE pada tiap sampel sehat, sampel gingivitis ringan, dan periodontitis ringan.

Biaya Subjek Penelitian. Selama penelitian ini tidak dipungut biaya apapun terhadap subjek dan biaya pemeriksaan yang dilakukan adalah menjadi tanggung jawab peneliti.

Kerahasiaan Medis dan Catatan Penelitian. Informasi penelitian ini akan disimpan oleh peneliti dan diperlakukan sebagai data rekam medis yang kerahasiaannya menurut peraturan terkait dengan rekam medis dan tunduk kepada peraturan kearsipan Negara.

Partisipasi Subjek Bersifat Sukarela . Partisipasi bapak/ibu dalam penelitian ini bersifat sukarela. Jika bapak/ibu menolak berpartisipasi atau menghentikan partisipasi , hal ini tidak akan mengganggu atau merugikan hubungan bapak/ibu dengan dokter yang meneliti dimasa datang.

Pertanyaan yang berkaitan dengan Penelitian. Bapak/Ibu berhak mengajukan pertanyaan yang berkaitan dengan partisipasi dalam penelitian ini kapanpun. Bapak / ibu dapat menghubungi dokter yang memeriksa atau melalui nomor telepon yang tercantum dalam lembaran informasi ini.

Demikianlah keterangan ini diuraikan untuk dapat dipahami oleh bapak/ibu sebelum bapak/ibu menanda tangani Pernyataan Persetujuan.

Padang,.....2013

Lampiran 5. Pernyataan Persetujuan Subjek

PERNYATAAN PERSETUJUAN SUBJEK**(Informed Consent)**

**Penelitian Penelitian Hubungan Kadar Matriks Metalloproteinase-8,
Alkaline Phospatase,
Neutrofil Elastase dengan Gingivitis dan Periodontitis dalam Gingival
Crevicular Fluid**

Saya telah membaca risalah 'Persetujuan Setelah Penjelasan' dan telah menerima salinannya. Penelitian ini telah dijelaskan kepada saya secara detil dan seluruh pertanyaan saya , sejauh ini telah dijawab dengan baik. Saya juga sudah diberi tahu tentang tujuan penelitian ,prosedur yang akan dilakukan dan kegunaan serta risikonya. Atas dasar itu saya bersedia secara sukarela berpartisipasi dalam penelitian ini.

Dengan menandatangani formulir ini , Saya tidak melepaskan hak hokum yang saya miliki sebagai subjek dalam penelitian ini. Saya juga telah diberitahu bahwa saya akan memperoleh salinan formulir persetujuan yang telah ditandatangani dan dibubuhi tanggal untuk catatan saya.

.....
Nama Subjek

.....
Tanda Tangan Subjek

.....
Tanggal

Saya menyatakan bahwa informasi diberikan dalam bahasa yang saya pahami

.....

Tanda Tangan Pihak yang memberikan Penjelasan

.....

Tanggal



Lampiran 6. Surat Pernyataan Kesediaan Menjadi Subjek Penelitian

**SURAT PERNYATAAN KESEDIAAN MENJADI
SUBJEK PENELITIAN**

Setelah membaca dan mendengar semua keterangan tentang ketidaknyamanan, keuntungan dan hak-hak saya sebagai subjek penelitian yang berjudul “Analisis Enzim Matriks Metalloproteinase-8, Alkaline Phosphatase, Neutrofil Elastase dalam Gingival Crevicular Fluid Pada Penyakit Periodontal”

Atas nama :

Alamat :

No.Hp :

Saya dengan sadar dan tanpa paksaan bersedia berpartisipasi dalam penelitian tersebut dia atas.

Padang.....

(.....)



Lampiran 7. Nilai Absorban Dari MMP8 Standar Pada Panjang Gelombang 450nm

Std #	Conc	Well	Replicates	absorban	SD	%CV
1	0.15625	G1	0,011	0,011	(*)	(*)
2	0.3125	F1	-0,002	-0,002	(*)	(*)
3	0.625	E1	0,074	0,074	(*)	(*)
4	1.25	D1	0,013	0,011	0,003	25,713
		H11	0,009			
5	2.5	C1	0,058	0,068	0,015	21,678
		G11	0,079			
6	5	B1	0,250	0,246	0,006	2,592
		F11	0,241			
7	10	A1	0,828	0,801	0,038	4,767
		E11	0,774			

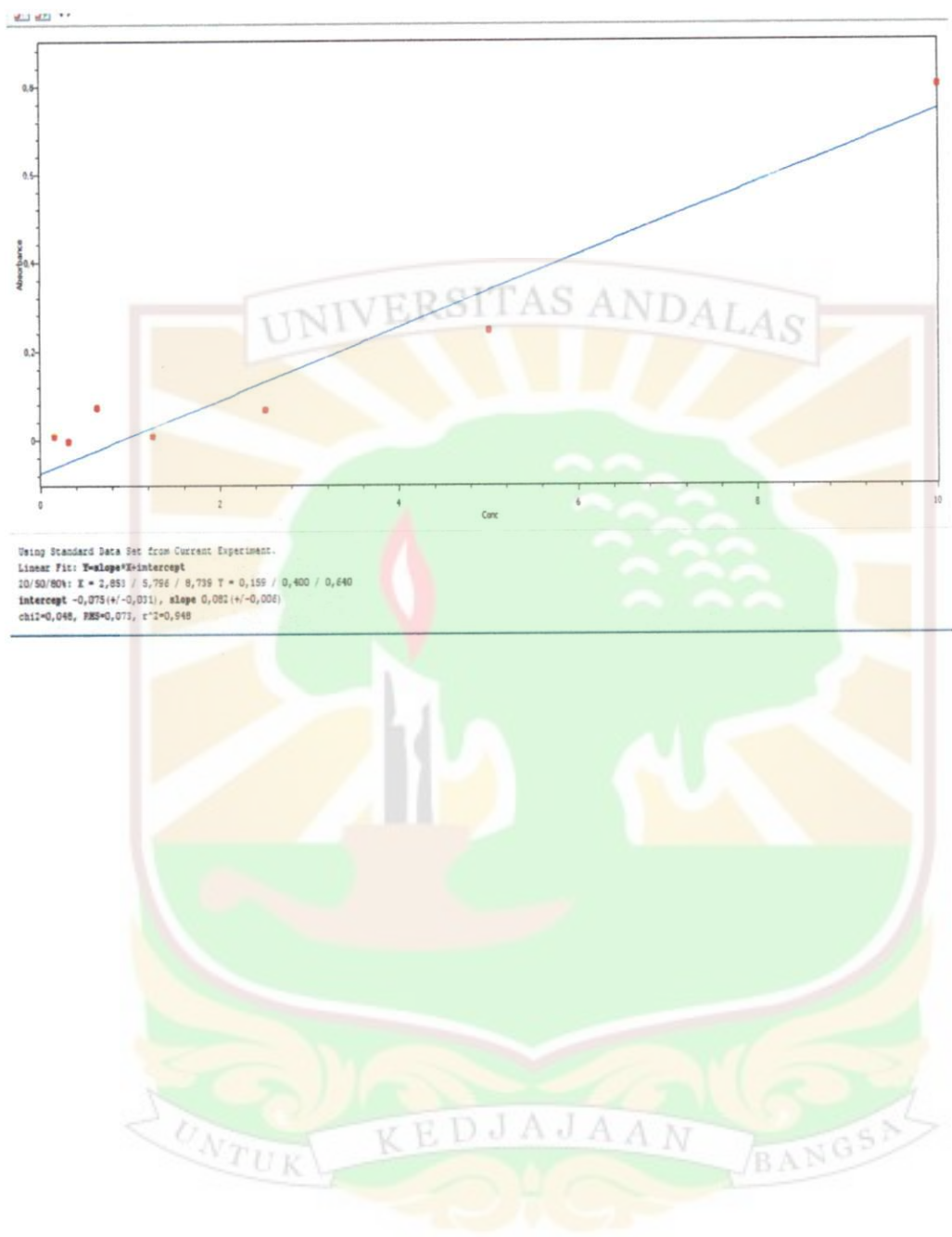


Lampiran 8. Analisis Data Enzim MMP-8 dengan BioRAD X marktm

Sample ID	Well	Replicates	absorban	Conc	SD (Conc)
G01	G6	2,112	2,112	26,719	(*)
G02	H6	1,280	1,280	16,554	(*)
G03	C7	1,431	1,431	18,399	(*)
G04	F3	1,145	1,145	14,904	(*)
G05	H8	1,953	1,953	24,777	(*)
G06	H9	1,605	1,605	20,525	(*)
G07	B8	1,439	1,439	18,511	(*)
G08	C8	1,864	1,864	24,329	(*)
G09	D8	1,155	1,155	14,992	(*)
G10	E8	1,657	1,657	20,622	(*)
G11	A2	1,711	1,711	20,850	(*)
G12	B2	1,282	1,282	16,563	(*)
G13	C2	2,103	2,103	26,612	(*)
G14	D2	1,344	1,344	16,619	(*)
G15	E2	1,389	1,389	16,733	(*)
G16	G2	1,456	1,456	18,490	(*)
G17	H2	1,850	1,850	24,314	(*)
G18	A3	1,137	1,137	14,868	(*)
G19	B3	1,701	1,701	20,791	(*)
G20	C3	1,559	1,559	20,440	(*)
P01	H4	3,077	3,077	38,509	(*)
P02	A5	3,164	3,164	39,572	(*)
P03	B5	3,125	3,125	39,096	(*)
P04	C5	3,142	3,501	47,211	(*)
P05	D5	3,080	3,378	43,201	(*)
P06	E5	3,153	3,153	39,438	(*)
P07	F5	3,150	3,150	39,401	(*)
P08	G5	3,109	3,109	38,900	(*)
P09	H5	3,084	3,270	42,799	(*)
P10	B6	3,138	3,138	39,255	(*)
P11	C6	3,095	3,249	40,702	(*)
P12	D6	3,114	3,114	38,961	(*)
P13	E6	2,860	2,860	35,858	(*)
P14	A7	3,145	3,145	39,340	(*)
P15	D7	3,127	3,248	41,652	(*)
P16	E7	3,137	3,137	39,242	(*)
P17	F7	2,919	2,919	36,579	(*)
P18	G7	3,167	3,167	39,609	(*)
P19	H7	3,063	3,452	44,702	(*)
P20	A8	3,137	3,137	39,242	(*)
P21	F8	2,854	2,854	35,785	(*)
P22	G8	3,112	3,112	38,937	(*)
P23	A9	3,035	3,035	37,996	(*)
P24	B9	3,130	3,130	39,157	(*)
P25	D9	3,131	3,131	39,169	(*)

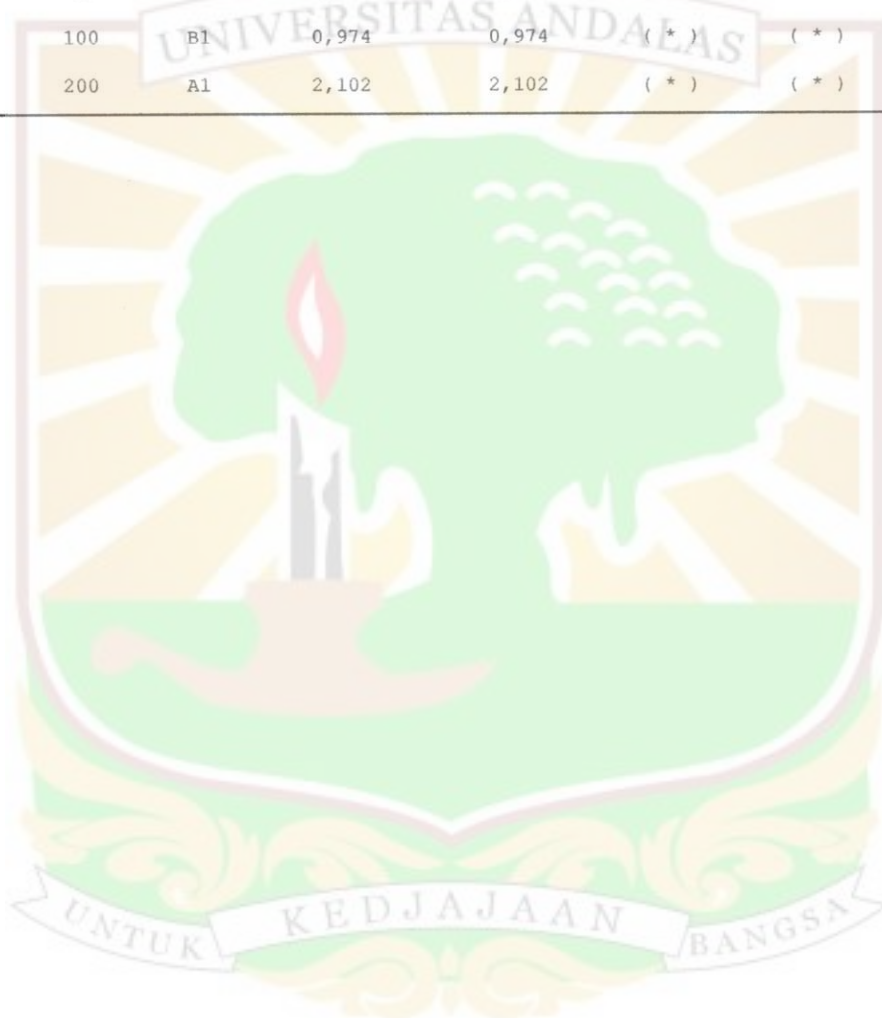
P26	E9	3,049	3,049	38,167	(*)
P27	G9	3,095	3,095	38,729	(*)
P28	A10	3,148	3,148	39,377	(*)
P29	B10	3,134	3,134	39,206	(*)
P30	C10	3,122	3,122	39,059	(*)
P31	D10	3,106	3,106	38,864	(*)
P32	E10	3,144	3,144	39,328	(*)
P33	G10	3,148	3,148	39,377	(*)
P34	H10	3,158	3,158	39,499	(*)
P35	A11	3,077	3,077	38,509	(*)
S01	A6	1,029	1,029	13,487	(*)
S02	F6	0,052	0,052	1,550	(*)
S03	B7	0,307	0,307	4,666	(*)
S04	F2	0,218	0,218	3,578	(*)
S05	D3	0,001	0,001	0,927	(*)
S06	H3	0,117	0,117	2,344	(*)
S07	A4	0,138	0,138	2,601	(*)
S08	B4	1,014	1,014	13,304	(*)
S09	E4	-0,007	-0,007	0,829	(*)
S10	F4	0,133	0,133	2,540	(*)
S11	G4	0,859	0,859	11,410	(*)
S12	C9	0,017	0,017	1,123	(*)
S13	F9	0,019	0,019	1,147	(*)
S14	F10	0,900	0,900	11,911	(*)
S15	B11	0,265	0,265	4,153	(*)
S16	C11	0,115	0,115	2,301	(*)
S17	E3	0,003	0,003	0,991	(*)
S18	G3	0,061	0,061	1,633	(*)
S19	C4	0,056	0,056	1,269	(*)
S20	D4	0,121	0,121	2,441	(*)

Lampiran 9. Gambar Kurva Standar MMP8 pada Panjang Gelombang 450nm



Lampiran 10. Nilai Absorban ALP Standar Panjang Gelombang 450nm

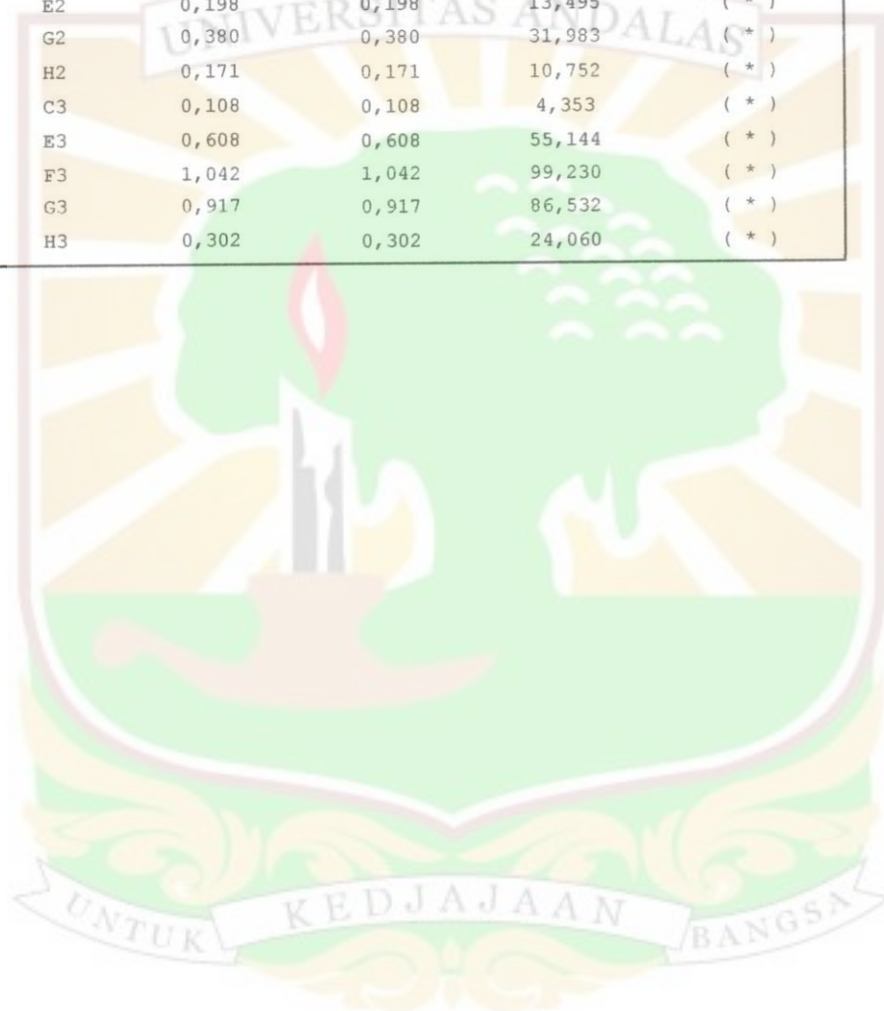
Std #	Conc	Well	Replicates	absorban	SD	%CV
1	3.125	G1	0,111	0,111	(*)	(*)
2	6.25	F1	0,209	0,209	(*)	(*)
3	12.5	E1	0,308	0,308	(*)	(*)
4	25	D1	0,216	0,216	(*)	(*)
5	50	C1	0,443	0,443	(*)	(*)
6	100	B1	0,974	0,974	(*)	(*)
7	200	A1	2,102	2,102	(*)	(*)



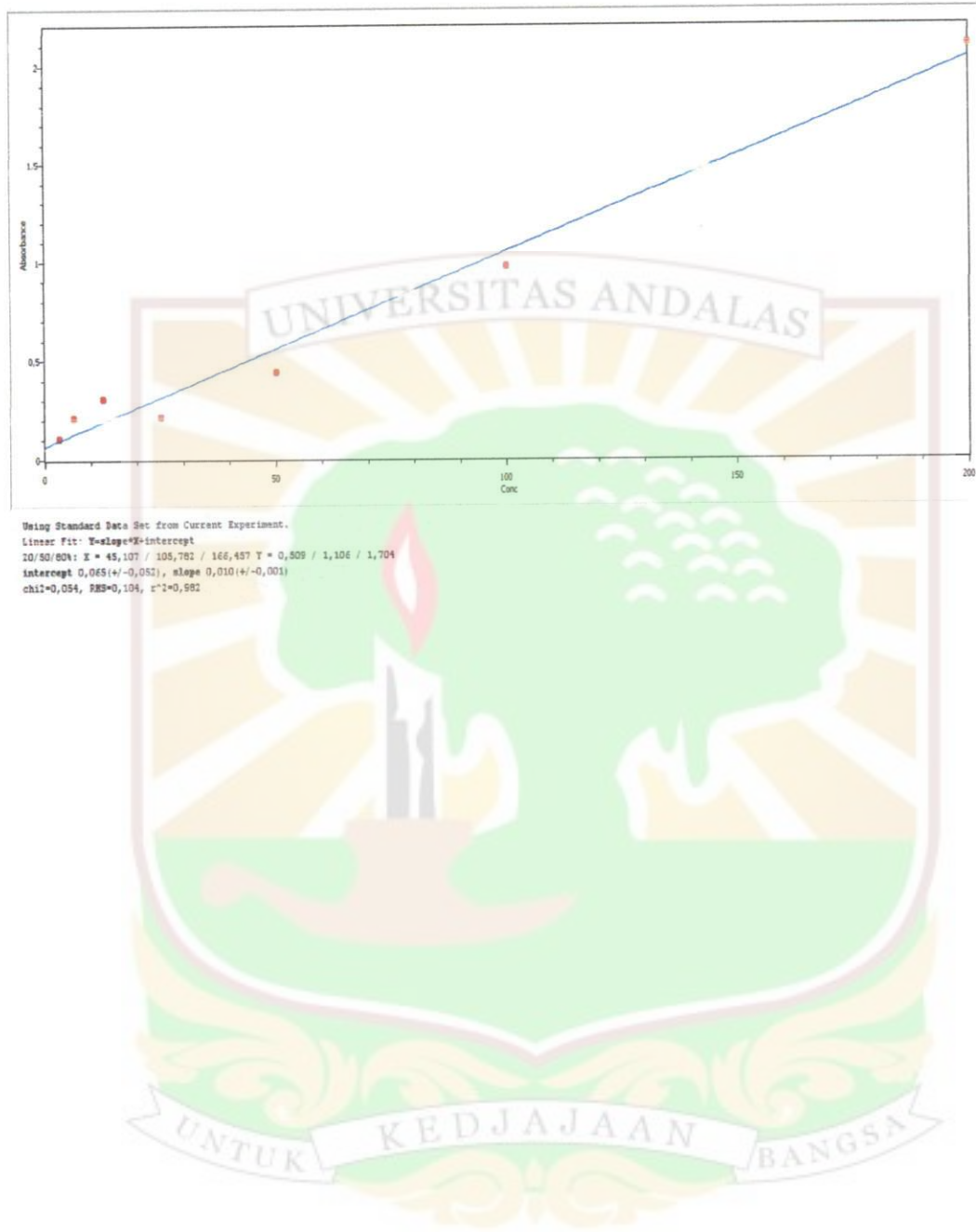
Lampiran 11. Analisis Data Enzim ALP dengan BioRAD X marktm

Sample ID	Well	Replicates	absorban	Conc	SD (Conc)
G01	G5	1,314	1,314	126,860	(*)
G02	B6	1,485	1,485	144,231	(*)
G03	E6	1,105	1,105	105,630	(*)
G04	B7	1,325	1,325	127,978	(*)
G05	F7	1,704	1,704	166,477	(*)
G07	G8	1,973	1,973	193,803	(*)
G08	C9	1,428	1,428	138,441	(*)
G09	G9	1,702	1,702	166,274	(*)
G10	H9	1,306	1,306	126,048	(*)
G11	A10	1,316	1,316	127,064	(*)
G12	A11	1,925	1,925	188,927	(*)
G13	D4	1,331	1,331	128,587	(*)
G14	G4	1,065	1,065	101,567	(*)
G15	D8	2,345	2,345	231,591	(*)
G16	A4	1,715	1,715	116,691	(*)
G17	B4	1,062	1,062	101,673	(*)
G18	C4	1,059	1,059	101,092	(*)
G19	H4	1,705	1,705	166,472	(*)
G20	A5	1,112	1,112	105,733	(*)
P01	F5	2,133	2,133	210,056	(*)
P02	E7	2,316	2,316	228,645	(*)
P03	C8	1,283	2,483	231,591	(*)
P04	F8	2,276	2,276	224,582	(*)
P05	H8	3,002	3,002	298,330	(*)
P06	C10	2,308	2,308	227,833	(*)
P07	G10	2,202	2,202	217,065	(*)
P08	D2	2,696	2,696	267,246	(*)
P09	A3	2,214	2,214	218,284	(*)
P10	D3	2,128	2,128	209,548	(*)
P11	E4	2,936	2,936	291,626	(*)
P12	F10	2,489	2,489	231,609	(*)
P13	E11	2,310	2,310	227,872	(*)
P14	G11	2,171	2,171	218,313	(*)
P15	F9	2,312	2,312	227,909	(*)
P16	B10	2,270	2,270	224,671	(*)
P17	D10	2,319	2,319	228,692	(*)
P18	E10	2,490	2,490	231,620	(*)
P19	B11	2,497	2,497	231,692	(*)
P20	C11	2,701	2,701	267,584	(*)
S01	E5	0,070	0,070	0,493	(*)
S02	H5	0,439	0,439	37,976	(*)
S03	A6	0,733	0,733	67,841	(*)
S04	C6	0,303	0,303	24,161	(*)
S05	D6	0,907	0,907	85,517	(*)
S06	F6	0,311	0,311	24,974	(*)
S07	G6	0,245	0,245	18,270	(*)
S08	H6	0,175	0,175	11,159	(*)
S09	A7	0,166	0,166	10,245	(*)

S10	B3	0,026	0,011	0,092	(*)
S11	D7	0,515	0,515	45,697	(*)
S12	G7	0,124	0,124	5,978	(*)
S13	H7	0,168	0,168	10,448	(*)
S14	A8	0,422	0,102	6,249	(*)
S15	B8	0,466	0,466	40,719	(*)
S16	E8	0,936	0,936	88,462	(*)
S17	A9	0,900	0,900	84,806	(*)
S18	H10	0,708	0,708	65,302	(*)
S19	B9	0,595	0,595	53,823	(*)
S20	E9	0,393	0,393	33,304	(*)
S21	C2	0,951	0,951	89,986	(*)
S22	E2	0,198	0,198	13,495	(*)
S23	G2	0,380	0,380	31,983	(*)
S24	H2	0,171	0,171	10,752	(*)
S25	C3	0,108	0,108	4,353	(*)
S26	E3	0,608	0,608	55,144	(*)
S27	F3	1,042	1,042	99,230	(*)
S28	G3	0,917	0,917	86,532	(*)
S29	H3	0,302	0,302	24,060	(*)

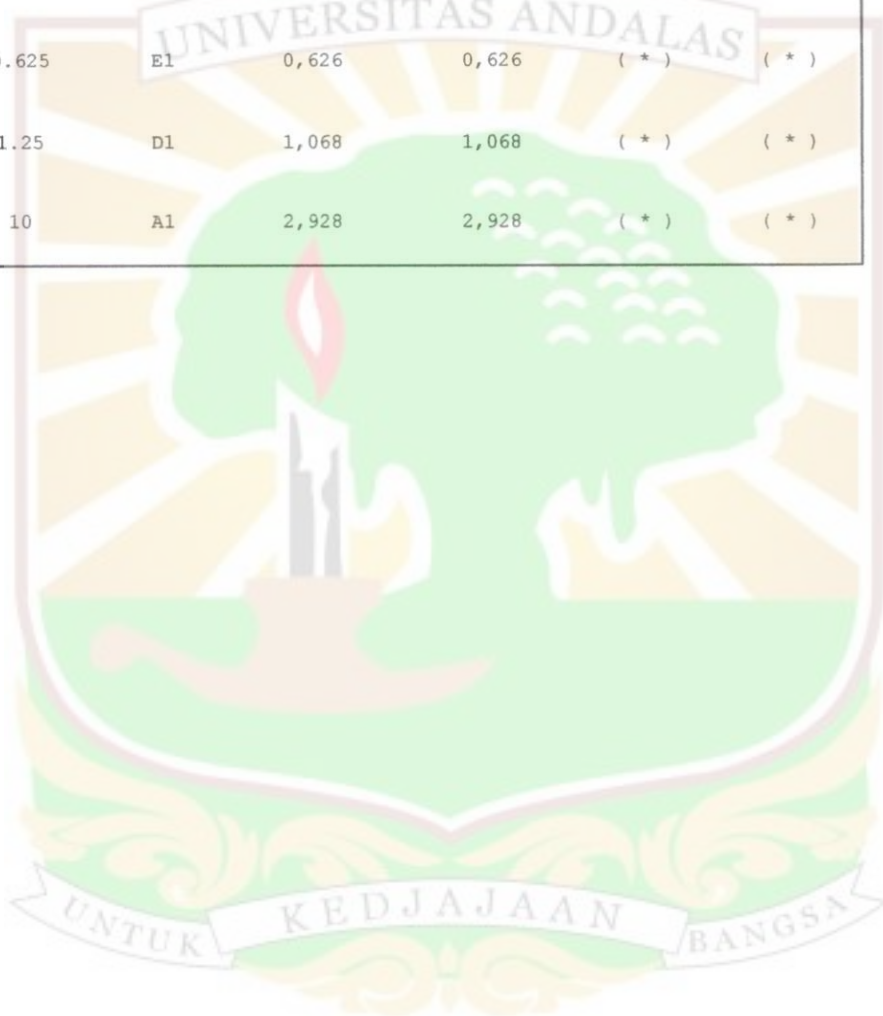


Lampiran 12. Gambar kurva standar ALP pada panjang gelombang 450nm



Lampiran 13. Nilai Absorban NE Standar Panjang Gelombang 450nm

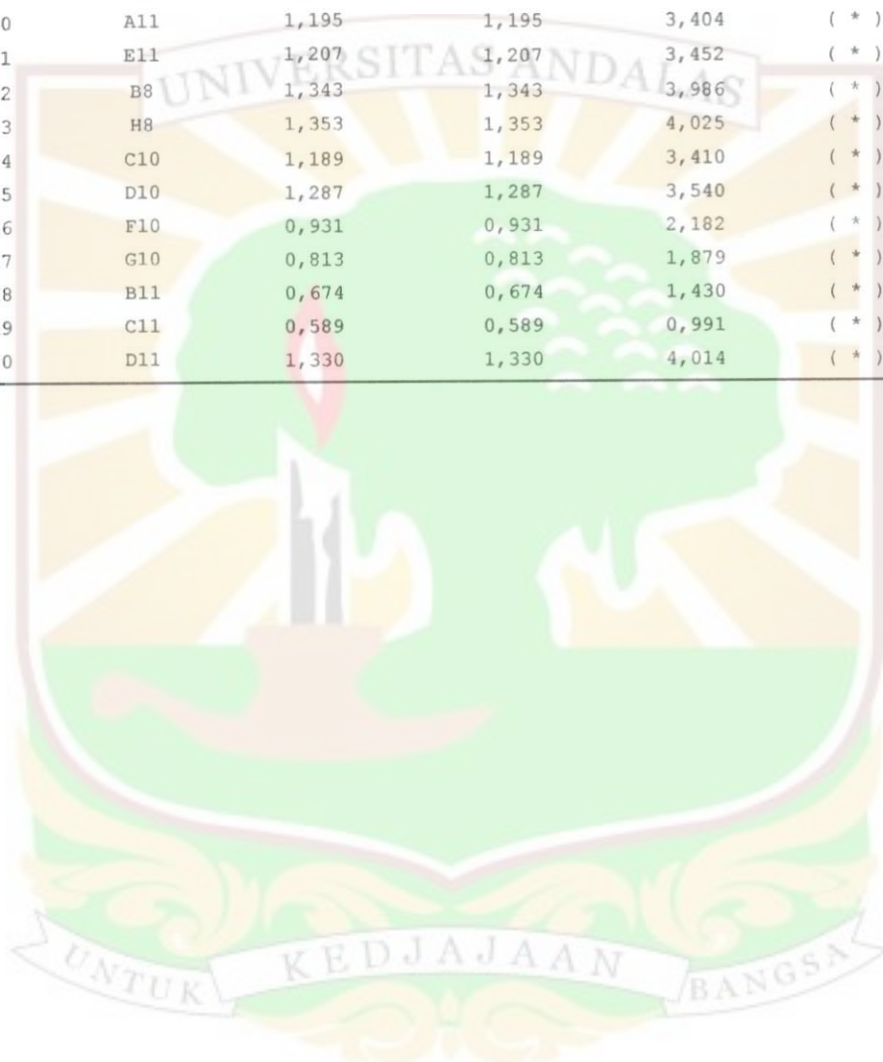
Std #	Conc	Well	Replicates	Mean	SD	%CV
1	0	H1	0,091	0,091	(*)	(*)
2	0.15625	G1	0,242	0,242	(*)	(*)
3	0.3125	F1	0,375	0,375	(*)	(*)
4	0.625	E1	0,626	0,626	(*)	(*)
5	1.25	D1	1,068	1,068	(*)	(*)
6	10	A1	2,928	2,928	(*)	(*)



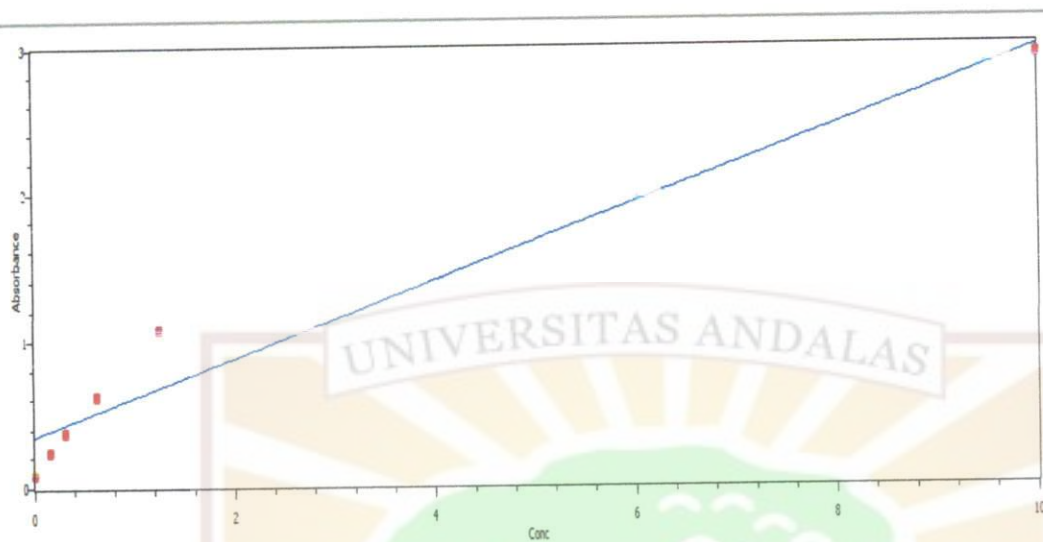
Lampiran 14. Analisis Data Enzim NE dengan BioRAD X marktm

Sample ID	Well	Replicates	absorban	Conc	SD (Conc)
G01	H2	2,066	2,066	6,826	(*)
G02	E3	1,457	1,457	4,434	(*)
G03	F3	1,492	1,492	4,571	(*)
G04	E4	1,857	1,857	6,005	(*)
G05	B5	2,225	2,225	7,451	(*)
G06	F5	1,914	1,914	6,229	(*)
G07	G5	2,246	2,246	7,533	(*)
G08	B6	1,327	1,327	3,923	(*)
G09	C6	1,716	1,716	5,451	(*)
G10	E6	1,811	1,811	5,824	(*)
G11	F6	2,213	2,213	7,403	(*)
G12	A7	1,722	1,722	5,475	(*)
G13	C7	1,814	1,814	5,836	(*)
G14	E7	2,147	2,147	7,144	(*)
G15	F7	2,198	2,198	7,344	(*)
G16	A8	2,054	2,054	6,779	(*)
G17	G8	2,208	2,208	7,384	(*)
G18	F9	1,866	1,866	6,040	(*)
G19	H9	1,719	1,719	5,463	(*)
G20	B10	2,210	2,210	7,392	(*)
G21	G11	1,783	1,783	5,714	(*)
G22	H11	2,107	2,107	6,987	(*)
P01	A2	3,161	3,161	11,127	(*)
P02	B2	3,046	3,046	10,676	(*)
P03	C2	2,460	2,460	8,374	(*)
P04	D2	2,598	2,598	8,916	(*)
P05	E2	2,800	2,800	9,709	(*)
P06	F2	2,792	2,792	9,678	(*)
P07	G2	2,871	2,871	9,988	(*)
P08	A3	2,627	2,627	9,030	(*)
P09	B3	2,719	2,719	9,391	(*)
P10	C3	2,989	2,989	10,452	(*)
P11	D3	2,584	2,584	8,861	(*)
P12	G3	3,131	3,131	11,009	(*)
P13	H3	2,613	2,613	8,975	(*)
P14	A4	2,428	2,428	8,248	(*)
P15	B4	2,815	2,815	9,768	(*)
P16	C4	2,762	2,762	9,560	(*)
P17	D4	2,909	2,909	10,137	(*)
P18	G4	2,668	2,668	9,191	(*)
P19	H4	2,726	2,726	9,419	(*)
P20	A5	2,603	2,603	8,935	(*)
P21	C5	2,739	2,739	9,470	(*)
P22	D5	3,073	3,073	10,782	(*)
P23	E5	2,427	2,427	8,244	(*)
P24	H5	2,529	2,529	8,645	(*)
P25	A6	2,729	2,729	9,430	(*)
P26	G6	2,733	2,733	9,446	(*)
P27	H6	2,539	2,539	8,684	(*)
P28	B9	2,973	2,973	10,389	(*)
P29	D9	2,548	2,548	8,719	(*)
P30	E9	2,330	2,330	7,863	(*)
P31	G9	2,452	2,452	8,342	(*)

P32	A10	2,687	2,687	9,265	(*)
P33	H10	2,319	2,319	7,820	(*)
S01	D6	0,354	0,354	0,101	(*)
S02	B7	0,577	0,577	0,977	(*)
S03	D7	0,797	0,797	1,841	(*)
S04	G7	1,145	1,145	3,208	(*)
S05	H7	0,695	0,695	1,440	(*)
S06	D8	1,293	1,293	3,789	(*)
S07	F8	1,217	1,217	3,491	(*)
S08	C9	0,524	0,524	0,769	(*)
S09	E10	0,854	0,854	2,065	(*)
S10	A11	1,195	1,195	3,404	(*)
S11	E11	1,207	1,207	3,452	(*)
S12	B8	1,343	1,343	3,986	(*)
S13	H8	1,353	1,353	4,025	(*)
S14	C10	1,189	1,189	3,410	(*)
S15	D10	1,287	1,287	3,540	(*)
S16	F10	0,931	0,931	2,182	(*)
S17	G10	0,813	0,813	1,879	(*)
S18	B11	0,674	0,674	1,430	(*)
S19	C11	0,589	0,589	0,991	(*)
S20	D11	1,330	1,330	4,014	(*)



Lampiran 15. Gambar Kurva Standar NE pada Panjang Gelombang 450nm



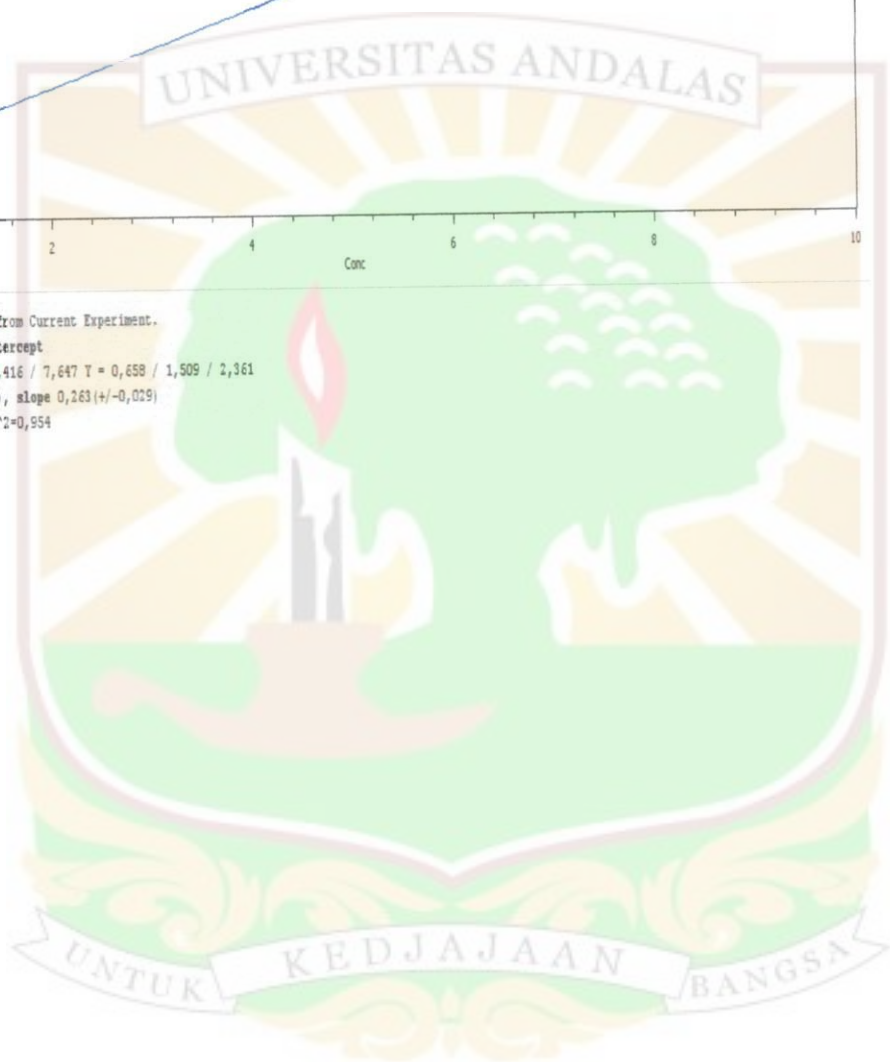
Using Standard Data Set from Current Experiment.

Linear Fit: $Y = \text{slope} \cdot X + \text{intercept}$

20/50/804: $X = 1,184 / 4,416 / 7,647$ $Y = 0,658 / 1,509 / 2,361$

intercept $0,346 (+/-0,120)$, slope $0,263 (+/-0,029)$

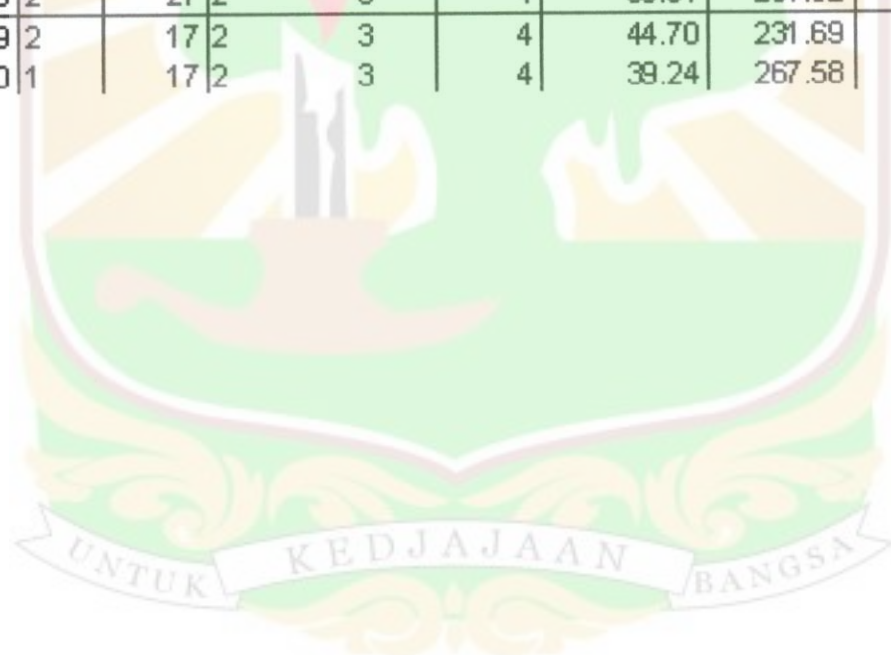
chi2=0,255, RMS=0,255, $r^2=0,954$



Lampiran 16. Data Dasar Penelitian

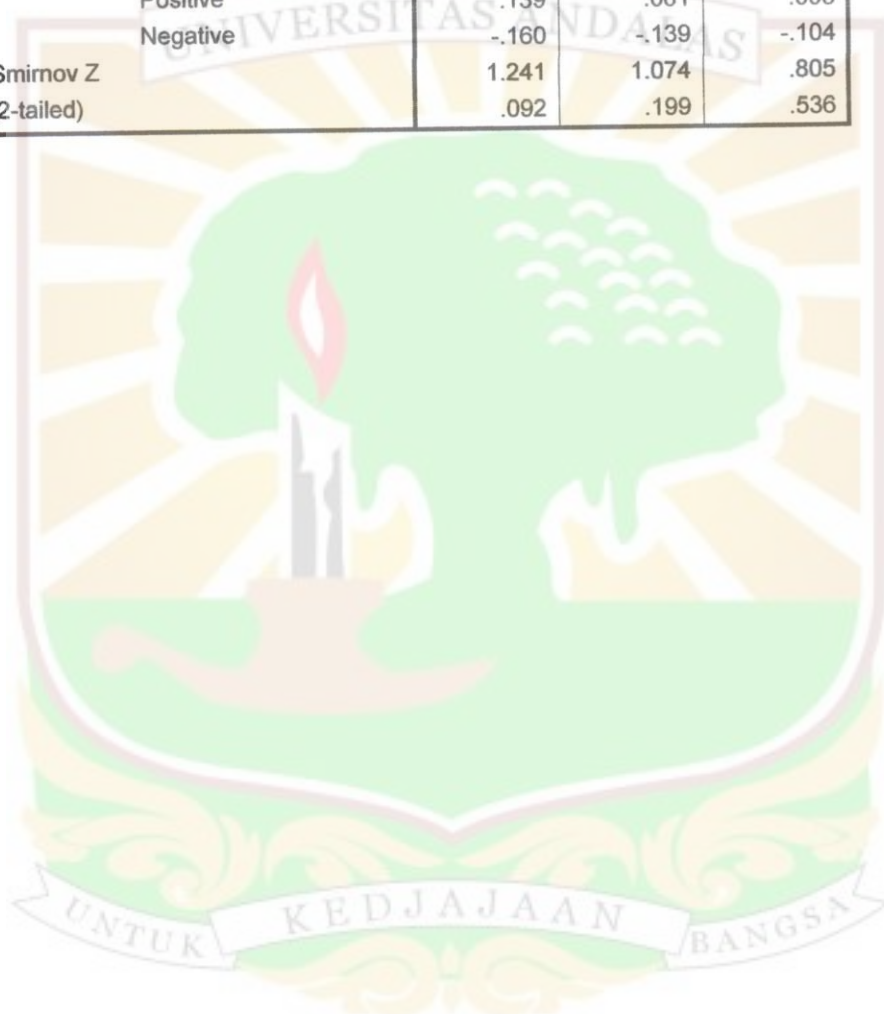
	sex	umur	GI	CAL	PDI	MMP8	ALP	Elastase
1	1	24	0	0	0	13.49	.49	.10
2	1	21	0	0	0	1.55	37.98	.98
3	2	19	0	0	0	4.67	67.84	1.84
4	1	22	0	0	0	3.58	24.16	3.20
5	2	24	0	0	0	.93	85.52	1.44
6	2	19	0	0	0	2.34	24.97	3.79
7	2	20	0	0	0	2.60	18.27	3.49
8	2	30	0	0	0	13.30	11.16	.77
9	2	30	0	0	0	.83	10.25	2.07
10	2	30	0	0	0	2.54	.09	3.40
11	2	25	0	0	0	11.41	45.70	3.45
12	1	20	0	0	0	1.12	5.98	3.99
13	1	23	0	0	0	1.15	10.45	4.03
14	2	25	0	0	0	11.91	6.25	3.41
15	2	23	0	0	0	4.15	40.72	3.54
16	2	23	0	0	0	2.30	88.46	2.18
17	2	22	0	0	0	.99	84.81	1.88
18	2	21	0	0	0	1.63	65.30	1.43
19	2	22	0	0	0	1.27	53.82	.99
20	2	21	0	0	0	2.44	33.30	4.01
21	2	24	1	0	1	26.72	126.86	6.83
22	1	21	1	0	1	16.55	144.23	4.43
23	2	17	1	0	1	18.40	105.63	4.57
24	2	30	1	0	1	14.90	127.98	6.01
25	2	23	1	0	1	24.28	166.48	7.45
26	2	21	1	0	1	20.53	123.71	6.23
27	2	25	1	0	1	18.51	193.80	7.53
28	2	30	1	0	1	24.10	138.44	3.92
29	1	30	1	0	1	24.99	166.27	5.45
30	2	20	1	0	1	20.62	126.05	5.82
31	1	22	1	0	1	20.85	127.06	7.40
32	2	30	1	0	1	24.56	188.93	5.48
33	2	17	1	0	1	26.61	128.59	5.84
34	2	17	1	0	1	16.62	101.57	7.14
35	2	17	1	0	1	26.73	101.06	7.34
36	2	30	1	0	1	26.49	116.69	6.78
37	2	30	1	0	1	16.17	101.67	7.38
38	2	30	1	0	1	24.87	101.09	6.04
39	1	23	1	0	1	20.79	166.47	5.46
40	2	24	1	0	1	20.44	105.73	7.39

	sex	umur	GI	CAL	PDI	MMP8	ALP	Elastase
41	2	19	2	3	4	38.51	210.06	11.13
42	2	21	2	3	4	39.57	228.65	10.68
43	2	21	2	3	4	39.10	231.59	8.37
44	2	20	2	3	4	47.21	224.58	8.92
45	1	20	2	3	4	43.20	298.33	9.71
46	2	20	2	3	4	39.44	227.83	6.68
47	2	22	2	4	4	39.40	217.07	9.99
48	2	24	2	4	4	38.90	267.25	9.00
49	1	21	2	3	4	42.80	218.28	9.39
50	2	23	2	3	4	39.26	209.55	10.45
51	2	20	2	4	4	40.70	291.63	8.86
52	2	23	2	4	4	38.96	231.61	11.01
53	2	20	2	4	4	35.86	227.87	8.98
54	1	20	2	4	4	39.34	218.31	8.25
55	2	30	2	4	4	41.65	227.91	9.77
56	2	30	2	4	4	39.24	224.67	9.56
57	1	17	2	3	4	36.58	228.69	10.14
58	2	27	2	3	4	39.61	231.62	9.19
59	2	17	2	3	4	44.70	231.69	9.42
60	1	17	2	3	4	39.24	267.58	8.94



Lampiran 17. Uji Normalitas Kolmogorov-Smirnov pada Enzim *Matrix Metalloproteinase-8* (ng/dl), *Alkaline Phosphatase* (ng/dl), dan *Neutrophyl Elastase* (ng/dl)

		MMP8	ALP	Elastase
N		60	60	60
Normal Parameters(a,b)	Mean	22.0198	134.8096	6.0484
	Std. Deviation	15.25307	86.84722	3.06469
Most Extreme Differences	Absolute	.160	.139	.104
	Positive	.139	.081	.095
	Negative	-.160	-.139	-.104
Kolmogorov-Smirnov Z		1.241	1.074	.805
Asymp. Sig. (2-tailed)		.092	.199	.536



Lampiran 18. Uji One-Way ANOVA pada Enzim *Matrix Metalloproteinase-8* (ng/dl), *Alkaline Phosphatase* (ng/dl), dan *Neutrophyl Elastase* (ng/dl) berdasarkan PDI

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
MMP8	Between Groups	12929.696	2	6464.848	462.345	.000
	Within Groups	797.016	57	13.983		
	Total	13726.712	59			
ALP	Between Groups	399956.831	2	199978.416	253.041	.000
	Within Groups	45047.155	57	790.301		
	Total	445003.986	59			
Elastase	Between Groups	480.025	2	240.012	184.568	.000
	Within Groups	74.123	57	1.300		
	Total	554.148	59			



Lampiran 19. Hasil Uji Post-Hoc Bonferroni pada Enzim *Matrix Metalloproteinase-8* (ng/dl), *Alkaline Phosphatase* (ng/dl), dan *Neutrophyl Elastase* (ng/dl) berdasarkan PDI

Multiple Comparisons

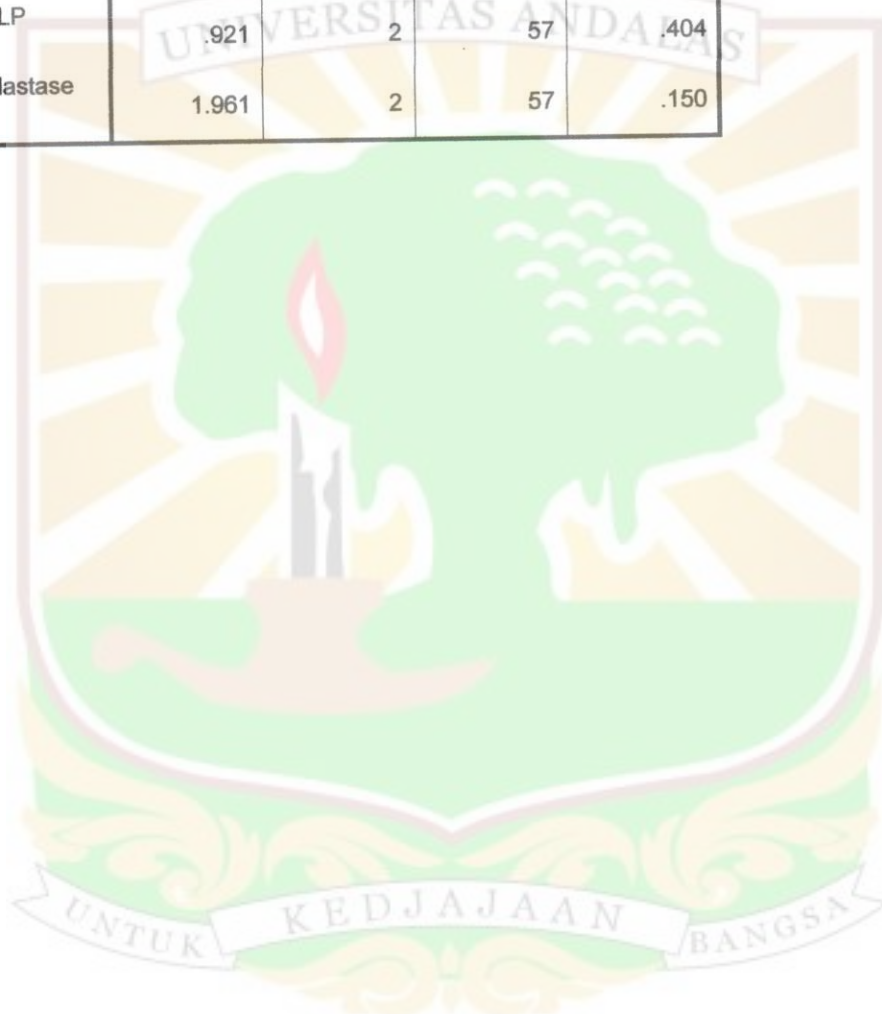
			Bonferroni				
Dependent Variable	(I) PDI	(J) PDI	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound
MMP8	Sehat	Gingivitis ringan	-17.47655(*)	1.18249	.000	-20.3934	-14.5597
		Periodontitis ringan	-35.95325(*)	1.18249	.000	-38.8701	-33.0364
	Gingivitis ringan	Sehat	17.47655(*)	1.18249	.000	14.5597	20.3934
		Periodontitis ringan	-18.47670(*)	1.18249	.000	-21.3935	-15.5599
	Periodontitis ringan	Sehat	35.95325(*)	1.18249	.000	33.0364	38.8701
		Gingivitis ringan	18.47670(*)	1.18249	.000	15.5599	21.3935
ALP	Sehat	Gingivitis ringan	-97.14015(*)	8.88989	.000	119.0687	-75.2116
		Periodontitis ringan	199.96230(*)	8.88989	.000	221.8909	178.0337
	Gingivitis ringan	Sehat	97.14015(*)	8.88989	.000	75.2116	119.0687
		Periodontitis ringan	102.82215(*)	8.88989	.000	124.7507	-80.8936
	Periodontitis ringan	Sehat	199.96230(*)	8.88989	.000	178.0337	221.8909
		Gingivitis ringan	102.82215(*)	8.88989	.000	80.8936	124.7507
Elastase	Sehat	Gingivitis ringan	-3.72625(*)	.36061	.000	-4.6158	-2.8367
		Periodontitis ringan	-6.92160(*)	.36061	.000	-7.8111	-6.0321
	Gingivitis ringan	Sehat	3.72625(*)	.36061	.000	2.8367	4.6158
		Periodontitis ringan	-3.19535(*)	.36061	.000	-4.0849	-2.3058
	Periodontitis ringan	Sehat	6.92160(*)	.36061	.000	6.0321	7.8111
		Gingivitis ringan	3.19535(*)	.36061	.000	2.3058	4.0849

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

Lampiran 20. Hasil Uji Homogenitas pada Enzim *Matrix Metalloproteinase-8* (ng/dl), *Alkaline Phosphatase* (ng/dl), dan *Neutrophyl Elastase* (ng/dl) berdasarkan PDI

Levene's Test of Equality of Error Variances(a)

	F	df1	df2	Sig.
MMP8	3.127	2	57	.051
ALP	.921	2	57	.404
Elastase	1.961	2	57	.150



Lampiran 21. Hasil Uji MANOVA pada Enzim *Matrix Metalloproteinase-8* (ng/dl), *Alkaline Phosphatase* (ng/dl), dan *Neutrophyl Elastase* (ng/dl) berdasarkan PDI

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta ²
Corrected Model	MMP8	12929.696(a)	2	6464.848	462.345	.000	.942
	ALP	399956.831(b)	2	199978.416	253.041	.000	.899
	Elastase	480.025(c)	2	240.012	184.568	.000	.866
Intercept	MMP8	29092.251	1	29092.251	2080.583	.000	.973
	ALP	1090418.504	1	1090418.504	1379.751	.000	.960
	Elastase	2194.976	1	2194.976	1687.926	.000	.967
PDI	MMP8	12929.696	2	6464.848	462.345	.000	.942
	ALP	399956.831	2	199978.416	253.041	.000	.899
	Elastase	480.025	2	240.012	184.568	.000	.866
Error	MMP8	797.016	57	13.983			
	ALP	45047.155	57	790.301			
	Elastase	74.123	57	1.300			
Total	MMP8	42818.964	60				
	ALP	1535422.490	60				
	Elastase	2749.124	60				
Corrected Total	MMP8	13726.712	59				
	ALP	445003.986	59				
	Elastase	554.148	59				

a $r^2 = .942$ (Adjusted $r^2 = .940$) – MMP-8

b $r^2 = .899$ (Adjusted $r^2 = .895$) – ALP

c $r^2 = .866$ (Adjusted $r^2 = .862$) – Elastase