

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini merupakan eksperimental laboratories in vivo dengan menggunakan hewan uji. Hewan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih *Rattus norvegicus* galur *Wistar* sebanyak 39 ekor yang berumur sekitar tiga bulan dengan berat badan 200-250 gram. Tikus dipelihara dalam kandang pada ruang hewan uji Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UMY dengan pertukaran udara yang baik serta suhu ruangan tanpa pendingin. Tikus rutin diberikan minum dan makan standar BR-2. Setiap kandang diisi 6 ekor tikus dan diberi nama sesuai dengan kelompoknya, kecuali kelompok pembanding sebanyak tiga ekor tikus.

Semua tikus diberikan anestesi lidokain 5 % untuk mengurangi rasa sakit yang ditimbulkan pada saat penginduksian luka menggunakan H₂O₂ 10%. Lidokain merupakan salah satu anestesi lokal yang berbentuk salep 5 %. Lidokain mempunyai mekanisme kerja dengan menghambat hantaran impuls saraf dengan cara depolarisasi pada membran saraf (Katzung, 2006). Pertama-tama gingiva tikus ditusuk menggunakan lanset sedalam 2 mm. Hal ini mengevaluasi pada penelitian sebelumnya (Sholichah, 2011) bahwa pada penelitian menggunakan ekstrak etanol daun *P. acuminata* ait jaringan gingiva tikus yang diamati tidak mengalami kerusakan. Setelah itu penginduksian luka menggunakan H₂O₂ 10 % sebanyak 3 kali sehari masing-masing 10 menit selama 3 hari sampai terjadinya radang. Hal ini

... menggunakan H₂O₂ 10% sebanyak 3 kali

masing-masing 10 menit selama 3 hari dapat mengakibatkan peradangan pada mukosa mulut (Marissa, 2001).

Setelah induksi luka selesai, maka dilanjutkan dengan perlakuan kelompok tikus sesuai dengan kelompok perlakuannya. Penelitian ini menggunakan krim ekstrak etanol daun *Plumeria acuminata Ait* sebagai obat alternatif untuk penyembuhan gingivitis. Krim ekstrak etanol daun *P. acuminata Ait* (KEEPA) dibuat di laboratorium Farmasetika Universitas Gadjah Mada dengan bahan asam stearat, gliserin, metil paraben, propil paraben, dan air. Asam stearat berfungsi sebagai pelumas untuk mengurangi gesekan selama kompresi. Gliserin berfungsi sebagai pelembab, digunakan untuk mencegah keringnya preparat. Metil paraben dan propil paraben berfungsi sebagai pengawet, digunakan dalam preparat cair dan setengah padat untuk mencegah pertumbuhan mikroorganisme (Ansel, 2008).

Untuk kelompok pembanding, 3 ekor tikus dikorbankan setelah induksi gingivitis, dan dimasukkan menjadi perlakuan hari ke-0. Kelompok perlakuan krim ekstrak etanol daun *P. acuminata Ait* (KEEPA) 1,25 %, 2,5 %, dan 5 %, base, dan kenalog® diberikan perlakuan sesuai dengan kelompoknya selama 3 kali sehari masing-masing 10 menit selama 3 hari. Kecuali kelompok tanpa perlakuan pengobatan, tikus dipantau dengan pemberian makan dan minum secara rutin. Setelah itu pada hari ke-4 diambil 3 tikus dari masing-masing kelompok untuk dikorbankan. Kemudian sisa tikus dari masing-masing kelompok dilanjutkan perlakuan pengobatannya selama 3 hari. Kemudian sisa tikus tersebut dikorbankan pada hari ke-

ke-7 setelah terjadinya radang. Tikus yang dikorbankan pada hari ke-4 dan ke-7 bertujuan untuk melihat penurunan jumlah sel PMN pada daerah radang.

Sel PMN aktif pada peradangan akut dan merupakan pertahanan pertama. Reaksi akut peradangan gingiva terjadinya 2-4 hari setelah bakteri berakumulasi dan berkontak dengan epitel gingiva. Sel PMN bermigrasi dari kapiler dan meningkat jumlahnya dalam jaringan ikat junctional epithelium gingiva dan sulcus gingiva. Sel PMN bergerak cepat dan sudah berada pada daerah radang dalam 2-4 jam. Selanjutnya, sel PMN akan berdegenerasi dan tidak dikerahkan lagi setelah terjadi radang kronis (Carranza, 2006).

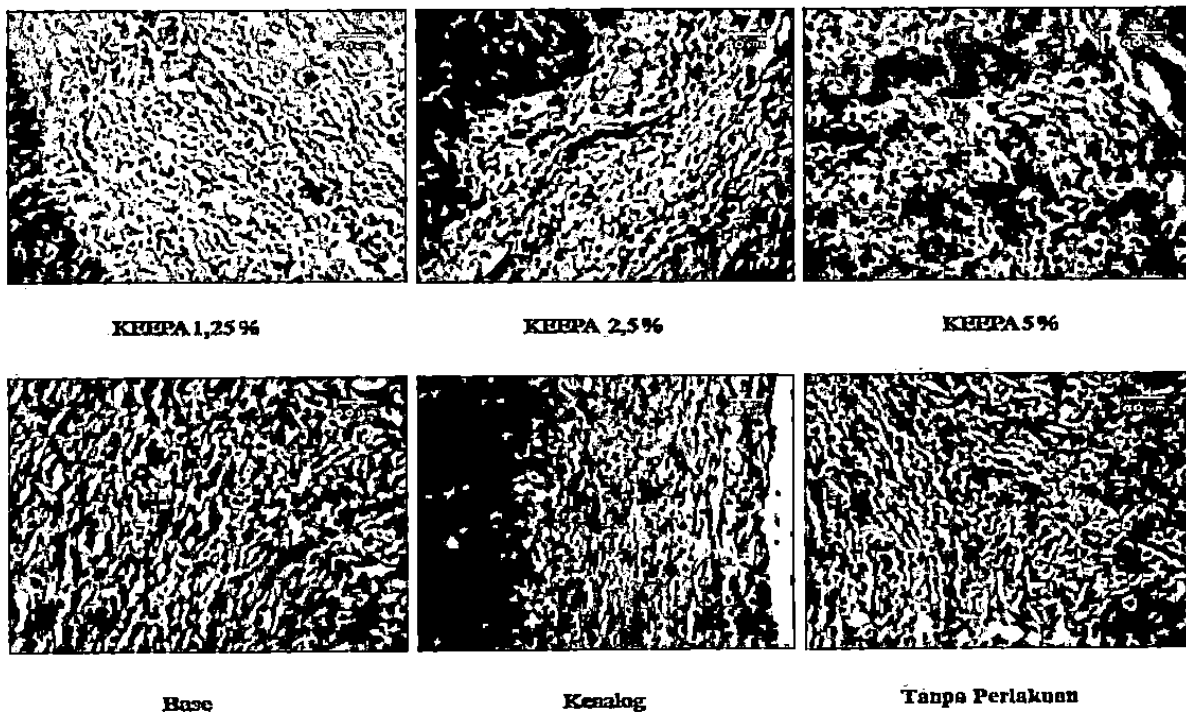
Tikus dikorbankan dengan cara dimasukkan ke dalam toples yang berisi anestesi eter, lalu jaringan gingiva tikus dipotong dan difiksasi dalam larutan formalin 10 %, kemudian dibuat preparat histologi untuk melihat secara mikroskopis jumlah sel PMN pada daerah gingiva. Pembuatan preparat histologi tersebut dengan menggunakan pewarnaan *Hematoksilin Eosin*. *Hematoksilin* bekerja sebagai pewarna basa, artinya zat ini mewarnai unsur basofilik jaringan. *Hematoksilin* memulas inti dan struktur asam lainnya dari sel, seperti bagian sitoplasma yang kaya RNA dan matriks tulang rawan sehingga warna menjadi biru. Sedangkan *Eosin* bersifat asam yang akan memulas komponen asidofilik jaringan seperti mitokondria, granula sekretoris dan kolagen sehingga menghasilkan warna merah muda (Junquera, 2007).

Gambaran hasil preparat histologi sel PMN pada jaringan gingiva tikus yang

lingkungan anaerobik, maka dari itu neutrofil mampu mematikan bakteri dan membersihkan debris pada daerah yang kurang mendapat oksigen, seperti jaringan nekrotik (Junquera, 2007).

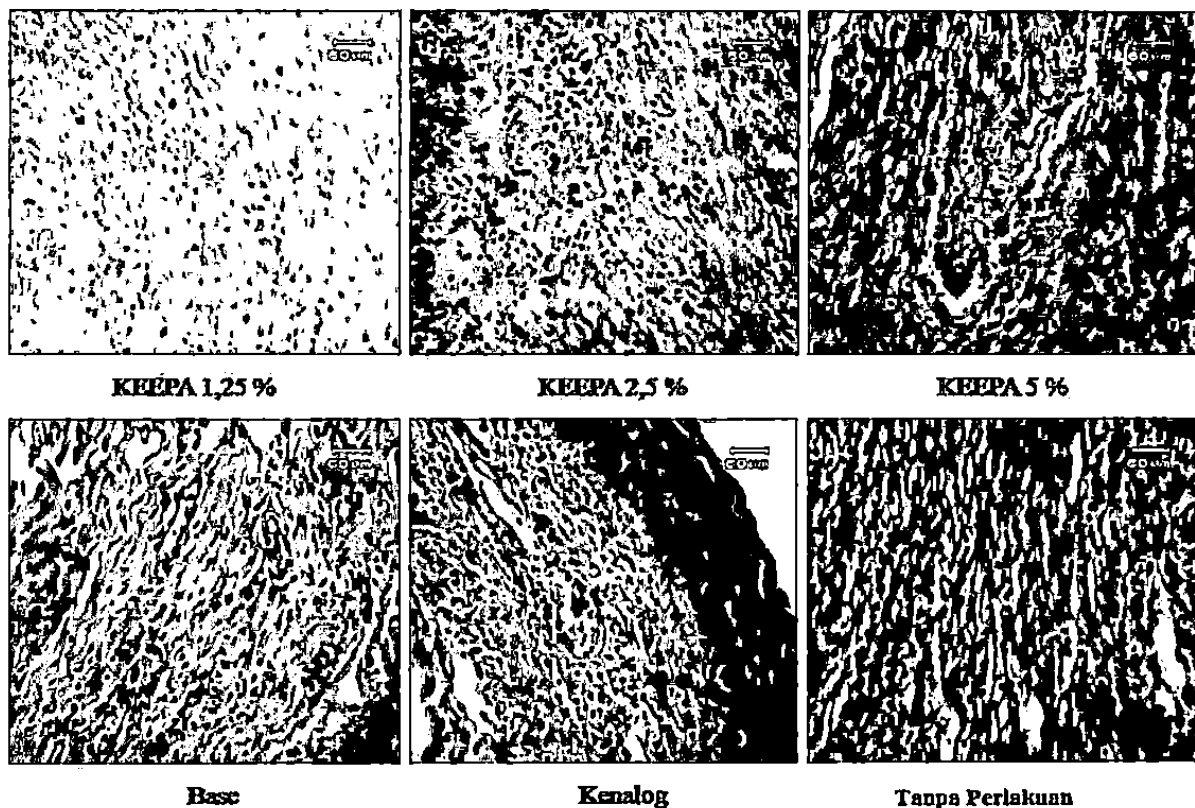
Eusinofil jumlahnya jauh lebih sedikit dari neutrofil hanya 2-4% dari leukosit dalam darah normal. Namun peningkatan jumlah absolut eosinofil tidak memfagosit bakteri melainkan berhubungan dengan reaksi alergi. Eusinofil banyak ditemukan didalam jaringan ikat di bawah sel epitel (Junquera, 2007).

Gambaran hasil preparat histologi sel PMN pada jaringan gingiva tikus pada hari ke-4 dapat dilihat pada Gambar 7.



Pada Gambar 7 terlihat gambaran histologi untuk masing-masing kelompok pada hari ke-4. Tidak terlihat perbedaan yang signifikan untuk setiap kelompoknya, masih terlihat sel PMN yang bermigrasi pada daerah radang. Namun, gambaran tersebut sudah menunjukkan penurunan jumlah skor sel PMN dari hari ke-0 menuju hari ke-4. Hal ini menunjukkan bahwa proses peradangan pada gingiva tikus sudah mulai menurun dikarenakan pemberian perlakuan pengobatan untuk setiap kelompoknya.

Gambaran histologi sel PMN jaringan gingiva tikus pada hari ke-7 dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Gambaran histologi sel PMN hari ke 7 (pemeriksaan HE dengan

Pada gambaran histologi hari ke-7 tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan juga pada setiap kelompoknya, masih ada terlihat sel PMN yang bermigrasi pada masing-masing kelompok. Pada pewarnaan HE tersebut neutrofil terlihat berwarna merah muda dan biru.

Selain melihat skor sel PMN pada masing-masing kelompoknya melalui gambar diatas, maka perlu menampilkan data dalam tabel untuk melihat perbedaan skor sel PMN secara jelas. Skor sel PMN untuk masing-masing kelompok dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Skor Sel PMN

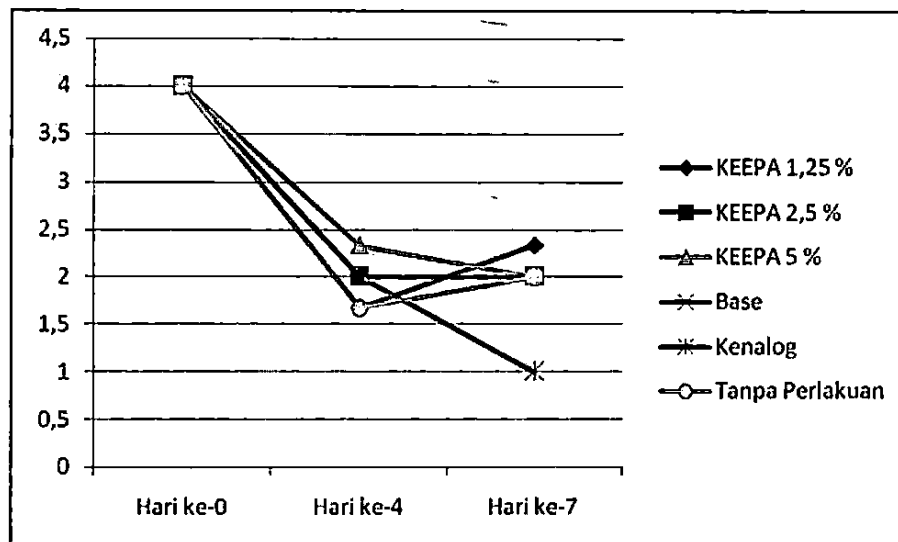
Kelompok	Skor Sel PMN <i>Mean ± Standar Deviation</i>		
	Hari ke-0	Hari ke-4	Hari ke-7
KEEPA 1,25 %	4,00 ± 0,00	1,67 ± 0,57	2,33 ± 0,57
KEEPA 2,5 %	4,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00
KEEPA 5 %	4,00 ± 0,00	2,33 ± 0,57	2,00 ± 1,00
Base	4,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,00 ± 1,00
Kenalog	4,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
Tanpa perlakuan	4,00 ± 0,00	1,67 ± 0,57	2,00 ± 1,00

Pada Tabel 3 menunjukkan skor sel PMN untuk setiap kelompoknya pada hari ke-0, ke-4, dan ke-7. Berdasarkan data pada tabel, tidak terlihat perbedaan yang

... ..

sel PMN antar waktu, terdapat penurunan yang cukup signifikan pada jumlah skor sel PMN pada hari ke-0 menuju hari ke-4. Kemudian untuk melihat signifikansi penurunan skor sel PMN antar kelompok dan antar waktunya dilakukan uji non parametrik dengan uji *Kruskal Wallis*.

Pada hasil uji *Kruskal Wallis* hari ke-4 untuk masing-masing kelompok didapatkan nilai signifikansi 0,367 dan pada hari ke-7 nilai signifikansi 0,332. Hasil tersebut menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan antar kelompoknya karena nilai $p > 0,05$. Karena hasil data penurunan jumlah skor sel PMN antar kelompoknya tidak signifikan, maka perlu menampilkan hasil data melalui grafik untuk melihat penurunan skor sel PMN pada masing-masing kelompok. Gambaran grafik penurunan skor sel PMN dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Grafik Penurunan skor sel PMN

Pada Gambar 9 menunjukkan tingkat penurunan skor sel PMN pada kelompok KEEPA 1,25 %, KEEPA 2,5 %, KEEPA 5%, Base, Kenalog, dan tanpa perlakuan pada hari ke-0, ke-4, dan ke-7. Hasil gambar grafik terlihat penurunan skor sel PMN dari hari ke-0 menuju hari ke-4 untuk setiap kelompoknya. Namun pada pengamatan hari ke-4 menuju hari ke-7 hanya pada kelompok kenalog® dan KEEPA 5 % saja yang mengalami penurunan.

↳ Untuk mengetahui nilai signifikansi antar waktu masing-masing kelompok dilakukan uji *Kruskal Wallis*. Hasil uji *Kruskal Wallis* antar waktu untuk masing-masing kelompoknya menunjukkan nilai signifikansi untuk kelompok KEEPA 1,25% nilai signifikansinya yaitu 0,034, KEEPA 2,5 % yaitu 0,018, KEEPA 5 % yaitu 0,051, Base yaitu 0,047, Kenalog yaitu 0,018, tanpa perlakuan yaitu 0,051. Karena nilai signifikansi diatas menunjukkan nilai ($p < 0,05$) berarti terdapat perbedaan yang signifikan antar waktunya, sehingga dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk melihat perbedaan antar variabel.

Hasil data uji statistik *Mann Whitney* didapatkan nilai signifikansi ($p < 0,05$) pada hari ke-0 menuju hari ke-4 dan hari ke-0 menuju hari ke-7. Namun pada hari ke-4 menuju hari ke-7 hanya pada kelompok Kenalog® dan kelompok tanpa perlakuan dengan nilai signifikansi ($p < 0,05$) yaitu 0,025.

Hasil tersebut menunjukkan hasil penurunan skor sel PMN pada hari ke-0 dengan hari ke-4 dan hari ke-0 dengan hari ke-7 untuk semua kelompok. Namun pada hari ke-4 dengan hari ke-7 tidak terdapat penurunan skor sel PMN yang signifikan

Penurunan skor sel PMN pada hari ke-0 dengan hari ke-4 dan hari ke-0 dengan hari ke-7 pada kelompok KEEPA 1,25 %, KEEPA 2,5 %, KEEPA 5 % disebabkan oleh kandungan flavonoid dan saponin daun *P. acuminata Ait* memiliki efek antiinflamasi yang dapat menghambat dehidrogenase jalur prostaglandin. Flavonoid menghambat fosfodiesterase, aldoreduktase, monoamina, protein kinase, DNA polimerase, siklooksigenase, dan lipooksigenase. Terhambatnya kerja enzim siklooksigenase, maka terhambat pula reaksi asam arakhidonat menjadi senyawa endoperoksidase. Enzim siklooksigenase berperan dalam produksi prostaglandin, sehingga terhambatnya enzim siklooksigenase menurunkan produksi prostaglandin dan akan mempercepat reaksi radang dan menyebabkan mediator peradangan seperti sel PMN mengalami penurunan dan terhenti (Robinson, 1995). Namun penurunan skor sel PMN tersebut tidak signifikan, hal ini mungkin disebabkan oleh keadaan tikus yang tidak terlalu baik sehingga tidak membantu proses penyembuhan.

Pada kelompok Base juga mengalami penurunan pada hari ke-0 dengan hari ke-4 dan hari ke-0 dengan hari ke-7 tetapi pada hari ke-4 menuju hari ke-7 tidak terjadi penurunan yang signifikan. Penurunan skor sel PMN pada kelompok Base ini disebabkan oleh bahan dasar pembuat krim seperti asam stearat, gliserin, metil paraben, dan profil paraben tidak mengganggu atau memperparah peradangan, sehingga proses penyembuhan tidak terganggu.

Pada kelompok KEEPA 1,25 %, KEEPA 2,5 %, KEEPA 5%, serta kelompok Base tidak terjadi penurunan skor sel PMN yang signifikan pada hari ke-4 dengan

saat perlakuan pengobatan sehingga proses penyembuhan tidak berjalan sempurna. Sehingga tidak terjadi penurunan sel PMN pada hari ke-7.

Pada kelompok Kenalog® terjadi penurunan skor sel PMN pada hari ke-0 sampai hari ke-7 mengandung triamcinolone acetonide 0,1 % merupakan obat kortikosteroid yang dapat menekan inflamasi. Kortikosteroid meningkatkan konsentrasi lipokortin, protein anggota famili aneksin yang mengurangi sediaan substrat fosfolipid A_2 . Akhirnya glukokortikoid dapat mengurangi ekspresi siklooksigenase, sehingga mengurangi jumlah enzim yang tersedia untuk memproduksi prostaglandin. Glikokortikoid juga bekerja singkat dengan meningkatkan konsentrasi neutrofil yang menyebabkan pengurangan jumlah sel pada daerah radang (Katzung, 1998).

Pada kelompok tanpa perlakuan juga mengalami penurunan skor sel PMN. Penurunan skor sel PMN ini menunjukkan bahwa tikus mempunyai sistem imun yang baik sehingga dapat merespon benda asing didalam tubuhnya. Proses penyembuhan luka merupakan proses penggantian dan perbaikan fungsi jaringan yang rusak yang melibatkan integrasi proses fisiologis. Proses penyembuhan luka ini berjalan terus menerus dari peradangan dan perbaikan, dimana sel-sel inflamasi, epitel, endotel, trombosit, dan fibroblas yang keluar secara bersamaan dan berinteraksi untuk mengembalikan kerusakan (Cotran *et al*, 1999). Pada proses peradangan akan terjadi

1. 1. 1. PMN 1. 1. 1. sel PMN ke jaringan yang mengalami radang