

PROSPEK PROBIOTIK DALAM PENCEGAHAN AGRESIVITAS RESORBSI OSTEOKLASTIK TULANG ALVEOLAR YANG DIINDUKSI LIPOPOLISAKARIDA PADA PENYAKIT PERIODONTAL

(PROBIOTIC PROSPECT IN THE PREVENTION OF AGGRESSIVENESS OSTEOCLASTIC
ALVEOLAR BONE RESORPTION INDUCED BY LIPOPOLYSACCHARIDE ON PERIODONTAL
DISEASE)

Muhammad Nurul Amin*, Zahara Meilawaty*, Desi Sandrasari**

*Departemen Biomedik

**Departemen Periodonsia

Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember
Jl. Kalimantan 37 Jember, Jawa Timur 68121
email: mna_07_06@yahoo.co.id

Abstract

This study was an experimental laboratory. The purpose of this study was to determine the role of probiotics in inhibiting the activity of pathogenic bacterial oral cavity. The result of study is expected to be used for prevention and treatment of periodontal disease which is still complex and derived products with high quality probiotics. The main product is the development potential of probiotics in maintaining oral health, especially periodontal disease is effectively and efficiently. This study used rats and divided into 4 groups: Group I, control without treatment; group II, induction of LPS *E. coli* for 5 days, Group III, LPS induction of *E. coli* + Probiotic Bacterial *Lactobacillus casei* injection for 5 days together, and group IV, induction of LPS *E. coli* for 5 days + 5 days injection of *Lactobacillus casei*. Immunohistochemical examination was done to evaluate the activity of osteoclasts in alveolar bone resorption to detect TRAP (tartarate-resistant acid phosphatase) and Carboxyterminal Telopeptide of Type 1 Collagen (1CTP) and subsequently analyzed the data collected statistically. The results of this study showed that induction of LPS could trigger the occurrence of alveolar bone resorption mediated by osteoclast and *Lactobacillus casei* administration both at the same time with the LPS induction or after LPS induction can inhibit osteoclastic alveolar bone resorption. In conclusion, clinically it can be interpreted that the administration of probiotic can be given at the beginning of periodontal disease occurs before or at the time of periodontal disease is underway.

Key words: lipopolysaccharide, *Lactobacillus casei*, osteoclast, alveolar bone resorption

PENDAHULUAN

Probiotik adalah mikroba golongan bakteri asam laktat yang bekerja mempertahankan kesehatan host. Terdapat lebih dari 100 spesies dan lebih dari 10 milyar bakteri dalam usus manusia. Bakteri pada saluran cerna manusia dapat dibagi menjadi 2 kelompok yaitu bakteri yang berguna (*useful*) dan yang berbahaya (*harmful*). Probiotik adalah bakteri yang berguna (*useful*) dari golongan bakteri asam laktat. Pengertian probiotik yang lebih luas lagi adalah bakteri hidup atau bakteri campuran yang memiliki efek menguntungkan pada saluran cerna dan saluran nafas host melalui kemampuannya memper-

baiki keseimbangan mikroflora usus. Peneliti lain mendefinisikan probiotik sebagai bakteri yang bekerja mempertahankan kesehatan host.^{1,2}

Kelainan periodontal sering disebabkan oleh beberapa kuman dari golongan bakteri gram negatif anaerob. Bakteri tersebut akan mengeluarkan toksin Lipopolisakarida (LPS), yang selanjutnya toksin ini dapat menginduksi kejadian-kejadian seluler di jaringan periodontal khususnya pada tulang alveolar. Rangsangan ini menjadi sebuah induksi pengaktifan fungsi dan aktivitas osteoklas, pada waktu osteoklas berfungsi dan beraktivitas dan selanjutnya akan menyebabkan rusaknya mineral anorganik dari tulang alveolar dan terjadilah resorpsi tulang alveolar. Apa-

bila proses resorpsi ini tidak terkendali maka tulang alveolar yang mendukung gigi akan berkurang dan menyebabkan gigi goyang dan akibat yang lebih fatal lagi adalah rasa sakit dan lepasnya gigi dari soketnya. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui seberapa besar peran bakteri probiotik dalam menghambat agresivitas resorpsi osteoklastik pada tulang alveolar.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedik Universitas Jember dan Laboratorium Ilmu Fisiologi Molekular, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. *Ethical clearance* diperoleh dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Penelitian ini dilakukan pada hewan coba tikus (*ratus*) jenis wistar jantan, umur 3 bulan dan berat badan 170 – 200 gram, kondisi fisik sehat dan tidak mengalami kelainan serta diberi pakan yang sesuai dan seragam. Hewan coba yang sudah diadaptasikan dikelompokkan menjadi 4 kelompok yaitu Kelompok I merupakan kelompok kontrol yang tidak diberi perlakuan, Kelompok II merupakan kelompok perlakuan yang diberi induksi LPS, Kelompok III merupakan kelompok perlakuan yang diberi induksi LPS dan diberikan suntikan bakteri probiotik bersama-sama mulai awal selama 5 hari, Kelompok IV merupakan kelompok perlakuan yang diberi induksi LPS dan suntikan bakteri probiotik setelah 5 hari diinduksi LPS selama 5 hari. Bahan perlakuan menggunakan LPS *E. coli* (Sigma) dan bakteri probiotik *Lactobacillus casei* strain ATCC 4224. Sebelum diberi perlakuan, dilakukan pembiusan pada hewan coba dengan menggunakan Ketamin (KTM 100). Dosis yang diberikan adalah 80 mg/kg berat badan yang disuntikkan pada daerah kaki belakang sebelah kanan di *muskulus quadriceps/tricep*.

Induksi Infeksi pada jaringan periodontal dilakukan berdasarkan pada penelitian sebelumnya⁴ dengan dilakukan modifikasi. LPS disuntikkan pada *Junctional epithelium* sulkus gingiva gigi insisivus pertama kanan rahang kanan bagian labial, dengan dosis 5 µg, diberikan 1 kali sehari selama 5 hari.

Pemberian bakteri probiotik dilakukan dengan penyuntikan pada daerah yang sama pada waktu induksi LPS. Dosis yang dipakai adalah 2×10^8 , diberikan 1 kali sehari selama 5 hari. Pemberian bakteri probiotik ini dilakukan dengan 2 cara yaitu untuk kelompok III diberikan secara bersamaan dengan LPS selama 5 hari dan untuk kelompok IV di-

berikan 5 hari kemudian setelah induksi LPS selama 5 hari sebelumnya.

Hewan coba baik dari kelompok kontrol maupun perlakuan akan didekaputasi dengan cara dislokasi dan diambil tulang alveolar, gingiva dan gigi pada regio insisivus pertama rahang bawah kanan sebelah labial. Pada sampel yang sudah diambil, dilakukan fiksasi dengan menggunakan formalin 10% selama 5 hari.

Pada sampel yang telah difiksasi dengan formalin 10% dilakukan dekalsifikasi dengan tujuan untuk melepaskan bahan anorganik dalam tulang tanpa merusak protein yang ada memakai larutan EDTA 10% (pH 7,4) pada suhu 4°C. Setelah proses dekalsifikasi selesai, dilakukan *embedding paraffin* rutin dan pemotongan dengan mikrotom dengan arah buko palatal, yang ketebalan pemotongannya 6 µm.

Untuk melihat aktivitas resorpsi oleh osteoklas yang terjadi akibat infeksi periodontal, dilakukan deteksi TRAP (*tartrate-resistant acid phosphatase*) yang merupakan marker sitokimiawi dan fungsi osteoklas serta *Carboxyterminal Telopeptide of Type 1 Collagen* (ICTP) yang merupakan indikator dan marker resorpsi oleh osteoklas dengan metode imunohistokimia. Sampel penelitian yang sudah menjalani metode imunohistokimia diperiksa menggunakan mikroskop binokuler lapang pandang terang dengan pembesaran 400X.

Untuk melihat perbedaan ekspresi TRAP dan ICTP pada masing-masing kelompok dilakukan uji *One Way Analysis of Variance* (ANOVA) dengan derajat kemaknaan 95% ($p < 0,05$). Sebelumnya dilakukan uji normalitas menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov*, kemudian dilakukan uji homogenitas varian dengan uji *Levene*. Apabila terdapat perbedaan yang signifikan, maka pengujian dilanjutkan dengan menggunakan uji *Least Significant Difference* (LS-D).

HASIL

Nilai ekspresi baik TRAP dan ICTP pada kelompok III dan IV yang merupakan kelompok perlakuan induksi LPS dan pemberian bakteri probiotik mengalami penurunan nilai ekspresi, dan secara statistik mempunyai perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$), bila dibandingkan dengan kelompok II yang merupakan kelompok induksi LPS saja.

Nilai ekspresi baik pada TRAP ataupun ICTP jika dibandingkan antara kelompok III dan IV mempunyai nilai yang berbeda, namun setelah diuji secara statistik tidak ada perbedaan bermakna

($p>0,05$) (Tabel 1).

Tabel 1. Parameter aktivitas osteoklas (Ekspresi TRAP dan ICTP)

Kelompok*	Ekspresi TRAP**	Ekspresi ICTP***
I	4,01 ± 1,38	5,86 ± 1,09
II	6,38 ± 1,78	8,61 ± 1,76
III	3,10 ± 1,24	6,15 ± 1,50
IV	3,37 ± 0,66	6,06 ± 1,71

* Kelompok I (kontrol), Kelompok II (Induksi LPS), Kelompok III (Induksi LPS dan Probiotik secara bersama selama 5 hari), Kelompok IV (Induksi LPS selama 5 hari lalu probiotik pada 5 hari selanjutnya)

** TRAP (*tartrate-resistant acid phosphatase*)

*** ICTP (*Carboxyterminal Telopeptide of Type 1 Collagen*)

PEMBAHASAN

Penurunan nilai ekspresi yang secara statistik berbeda bermakna pada kelompok III dan IV ($p<0,05$), bila dibandingkan dengan kelompok II menunjukkan bahwa Induksi LPS mampu memicu terjadinya resorpsi tulang alveolar yang dimediasi oleh osteoklas. Hasil beberapa penelitian menyebutkan bahwa LPS dan senyawa lain yang dikeluarkan oleh bakteri patogen meningkatkan akses ke jaringan gingiva, mengawali dan menimbulkan imunoinflamasi yang menyebabkan produksi sitokin pro inflamatori dengan kadar tinggi yang kemudian akan menginduksi produksi matriks metaloproteinase sehingga terjadi destruksi jaringan ikat, ligamen periodontal dan resorpsi tulang alveolar.⁵ Selain itu, LPS dapat meningkatkan aktivitas matriks metaloproteinase-13 (MMP-13) melalui induksi dari sitokin *proinflammatory* dan ekspresi MMP-13 meningkat pada penyakit periodontal. Mekanisme peningkatan MMP-13 yang diinduksi oleh LPS pada penyakit periodontal diregulasi oleh *p38 signaling* melalui mekanisme transkripsional.⁶

Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa pemberian bakteri probiotik strain *Lactobacillus casei* dapat menghambat terjadinya resorpsi tulang alveolar yang dilakukan oleh osteoklas. Probiotik yang digunakan dalam rongga mulut akan menolong dokter gigi dalam mengontrol bakteri patogen yang menyebabkan penyakit di dalam rongga mulut. Salah satu penyebab peradangan pada gingiva adalah pembusukan makanan oleh bakteri patogen. Probiotik mengontrol pertumbuhan bakteri patogen untuk mencegah gingivitis. Probiotik memiliki pH yang rendah sehingga bakteri plak tidak dapat membentuk plak dan kalkulus yang menyebabkan penyakit periodontal. Probiotik juga memproduksi

antioksidan, yang mencegah stain dan pembentukan plak dengan cara *neutralizing* elektron bebas yang dibutuhkan untuk pembentukan mineral atau kalkulus.¹ Selain itu, probiotik dapat merusak *putrescence odors* dengan memfiksasi gas toksik dan merubahnya menjadi gas yang diperlukan untuk metabolisme.⁷

Nilai ekspresi baik pada TRAP ataupun ICTP jika dibandingkan antara kelompok III dan IV mempunyai nilai yang berbeda meskipun tidak bermakna secara statistik ($p>0,05$). Hasil ini didukung oleh penelitian yang menyatakan bahwa *Lactobacillus* dapat menghambat perlekatan dan pertumbuhan bakteri gram negatif.⁸ Hal ini disebabkan karena *Lactobacillus* dalam metabolisme yang memproduksi asam laktat dapat menurunkan pertumbuhan bakteri patogen, asam laktat bekerja melalui membran sel dengan cara merubah laju pertukaran ion H^+ dan Ion Na^+ , aktivitas $H^+ /ATPase$ di membran plasma dan komposisi asam lemak membran, yang membawa keasaman sitoplasma. Selain itu, *Lactobacillus* mampu meningkatkan sekresi Ig A yang merupakan anti bodi yang dapat mendeaktivasi benda-benda asing termasuk toksin bakteri patogen diantaranya adalah LPS.⁹ Selain itu, penggunaan salah satu spesies *Lactobacillus* dapat menghambat produksi sitokin *pro-inflammatory* IL- 1β dan TNF- α dan menurunkan ekspresi protein COX-2 pada infeksi yang diinduksi oleh LPS.¹⁰

Penelitian lain menyebutkan bahwa pada infeksi yang diinduksi LPS *H. Pylori*, *Lactobacillus* dapat menghambat produksi IL-8 yang merupakan sitokin *proinflammatory* melalui penghambatan aktivasi *signal* transduksi dari *Toll-Like Receptor4 (TLR4)*, dimana terjadi penghambatan *p38 mitogen-activated protein kinase* dan *stress-activated protein kinase/c-Jun amino-terminal kinase signaling*. Beberapa penelitian lain juga menunjukkan bahwa pemberian *Lactobacillus casei BL23* memberikan efek protektif dengan peningkatan produksi sitokin *anti inflammatory* pada infeksi usus¹¹ dan *L. casei* pada infeksi *streptococcus* pada paru dapat menghambat aktivitas fibrinolitik dan meningkatkan konsentrasi interleukin anti inflammatory.¹²

Lactobacillus juga mampu mengaktifkan *Migratory Dendritic cells* untuk menginduksi peningkatan respon imun sel T, melalui perubahan respon T helper 2 (Th2) menjadi respon Th1 dan ini mengaktifkan *humoral and cell mediated immunity*.¹³ Hal ini menunjukkan bahwa pemberian *Lactobacillus casei* sebaiknya secara bersamaan dengan induksi LPS (kelompok III) atau diberikan setelah induksi LPS yang sama-sama dapat menghambat kerja osteoklas dalam meresorpsi tulang alveolar. Ini berarti bahwa secara klinis dapat diartikan bahwa pemberian bak-

teri probiotik *Lactobacillus casei* dapat diberikan pada waktu awal sebelum penyakit periodontal terjadi ataupun pada waktu penyakit periodontal tersebut sedang berjalan. Dapat disimpulkan bahwa pemberian bakteri probiotik *Lactobacillus casei* dapat menghambat resorpsi osteoklastik tulang alveolar dan pemberian bakteri probiotik *Lactobacillus casei* dapat diberikan pada awal ataupun sesudah terjadi penyakit periodontal.

UCAPAN TERIMA KASIH

1. Kementrian Pendidikan Nasional Republik Indonesia yang dalam hal ini melalui DIPA Penelitian Universitas Jember yang telah membiayai penelitian ini.
2. Lembaga Penelitian Universitas Jember yang memediasi dan memfasilitasi penelitian ini.

Daftar Pustaka

1. Endayanto A, Harsono A. Prospek probiotik dalam pencegahan alergi melalui induksi aktif toleransi imunologis. <<http://www.pediatrik.com/buletin/06224114001-0ijf1q.pdf>> (30 Mei 2007).
2. Soebijanto R. Konsep dasar penggunaan probiotik-probiotik di dalam susu formula bayi dan susu formula khusus alergi. <<http://www.pediatrik.com/pkb/20060220-exhdkp-pkb.pdf>> (30 Mei 2007).
3. Arnett T. Bone structure and bone remodelling. London: University College London, 2003; 3-6.
4. Indahyani DI, Al-Supartinah S, Totok U, Marsetyawan HNE. Pengaruh induksi lipopolisakarida (LPS) terhadap osteopontin tulang alveolar tikus pada masa erupsi gigi. Indonesian J Dent 2007; 14(1): 2-7.
5. Roelan BO. Aspek imunologik hubungan beberapa Penyakit periodntal dan penyakit sistemik. Majalah Kedokteran Gigi Edisi Khusus Foril 2002; 15-21.
6. Rossa CJR, Min L, Paul B, Keith LK. Transcriptional activation of MMP-13 by periodontal pathogenic LPS requires p38 MAP kinase. Innate Immunity 2007; 13(2): 85-93.
7. Sugano N, Matsuoka T, Koga Y, Ito K. Effects of probiotics on periodontal disease. Dentistry in Japan 2007; 43: 123-6.
8. Reid G. The scientific basis for probiotic strains of lactobacillus. Applied and Environmental Microbiology, 1999; 65(9): 3763-6.
9. Esther van Praag. E. coli and the protective role of lactobacillus casei in newborn rabbits. Probiotics 2003; February:1-4.
10. Yeganegi M, Chiashan GL, Andrew M, Sung OK, Gregor R, John RGC, et al. Lactobacillus rhamnosus GR-1 stimulates colony-stimulating factor 3 (granulocyte) (CSF3) output in placental trophoblast cells in a fetal sex-dependant manner. Biolreprod 2010; Sept: 1
11. Rochat T, Luis Bermúdez-Humarán, Jean-Jacques G, Christel F, Christine H, GCP Langella. Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus casei* BL23 producing or not a manganese-dependant catalase on DSS-induced colitis in mice. Microbial Cell Factories 2007; 6: 22.
12. Haro C, Julio V, Hortensia Z, Agüero SAG. *Lactobacillus casei* modulates the inflammation-coagulation interaction in a pneumococcal pneumonia experimental model Inflammation 2009; 6: 28.
13. Mohamadzadeh M, Scott O, Warren VK, Gordon RI, Gretchen LD, Kelly LW, et al. Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. PNAS 2005; 102(8): 2880-5.