

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil penelitian

Penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui efek Astaxanthin terhadap gambaran histologi nekrosis, ekspresi *Caspase-3*, ekspresi NLRP3, dan ekspresi gasdermin serta gambaran pembentukan kolagen pada tikus Wistar jantan model periodontitis (diinduksi bakteri *A. actinomycetemcomitans*). Sebelum sampai pada pengujian hipotesis penelitian itu, maka terlebih dahulu dilakukan penjelasan deskripsi variabel penelitian yaitu gambaran histologi nekrosis, ekspresi *Caspase-3*, ekspresi NLRP3, dan ekspresi gasdermin serta gambaran pembentukan kolagen tikus Wistar jantan pada kelompok kontrol, perlakuan (tikus dengan induksi bakteri *A. actinomycetemcomitans*, sehingga menjadi tikus model periodontitis) dan terapi (tikus model periodontitis yang mendapatkan Astaxanthin).

Penjelasan deskriptif subjek penelitian dimaksudkan untuk mendapatkan gambaran yang lebih lengkap terhadap karakteristik subjek yang diteliti. Penelitian ini dilakukan terhadap 24 ekor tikus Wistar jantan yang dikelompokkan menjadi tiga kelompok, yang masing-masing terdiri dari 8 ekor sebagai subjek penelitian. Kelompok pertama adalah kelompok kontrol, yang tidak diberikan perlakuan. Kelompok kedua adalah kelompok perlakuan, yaitu: subjek tikus Wistar jantan dibuat model periodontitis dengan induksi bakteri *A. Actinomycetemcomitan*. Kemudian kelompok ketiga adalah kelompok terapi, yaitu: subjek tikus Wistar jantan model periodontitis yang mendapatkan terapi Astaxanthin.

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan uji alternatif nonparametrik yaitu *Kruskal Wallis*. Apabila uji *Kruskal Wallis* menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$) maka dilanjutkan dengan *Post Hoc Test* menggunakan uji *Mann Whitney*. Data variabel penelitian yaitu meliputi: gambaran histologi nekrosis, ekspresi *Caspase-3*, NLRP3, dan gasdermin serta gambaran pembentukan kolagen menggunakan skala ordinal, maka uji beda yang digunakan

adalah uji statistik non parametrik *Kruskal Wallis*. Apabila uji *Kruskal Wallis* menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$) maka dilanjutkan dengan *Post Hoc Test* menggunakan uji *Mann Whitney*.

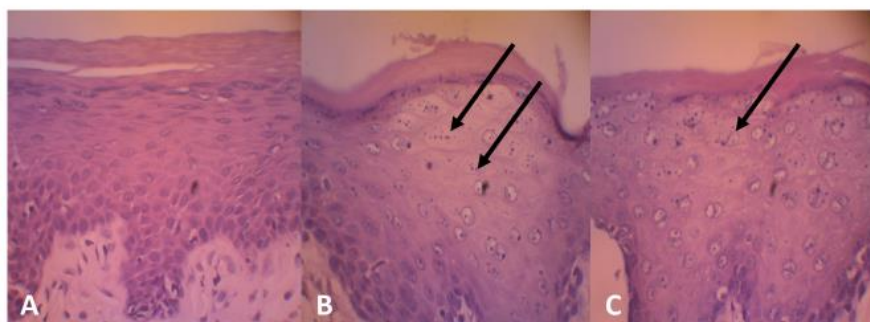
Analisis penelitian ini diharapkan dapat mengidentifikasi terjadinya variasi atau perbedaan tiga mean masing-masing variabel yaitu gambaran histologi nekrosis, ekspresi *Caspase-3*, *NLRP3*, dan gasdermin serta gambaran pembentukan kolagen tikus Wistar jantan pada kelompok kontrol, perlakuan dan terapi.

Tabel 5.1 Deskripsi data sampel penelitian

	N	Mean	Std Deviasi	Minimum	Maksimum
Nekrosis	8	0.7917	0.77903	0	2
<i>Caspase-3</i>	8	2.4583	0.77903	1	3
Gasdermin	8	3.4583	0.58823	2	4
<i>NLRP3</i>	8	3.7500	0.60792	2	4
Kolagen	8	1.3333	1.12932	0	3

1. Analisis Pengaruh Astaxanthin terhadap gambaran histologi nekrosis, ekspresi *Caspase-3*, *NLRP3*, gasdermin dan gambaran pembentukan kolagen tikus Wistar jantan model periodontitis

1) Histologi Nekrosis



Gambar 5.1 Pengecatan hematoksilin-eosin dengan pembesaran 400x
Keterangan:

- A. Sampel kontrol : tanda panah menunjukkan Nekrosis tidak ditemukan pada sel- sel epitel (skor 0)

- B. Sampel perlakuan : tanda panah menunjukkan Nekrosis ditemukan pada 25%-49% sel-sel epitel (skor 2)
- C. Sampel terapi : tanda panah menunjukkan Nekrosis ditemukan pada < 25% sel-sel epitel (skor 1)

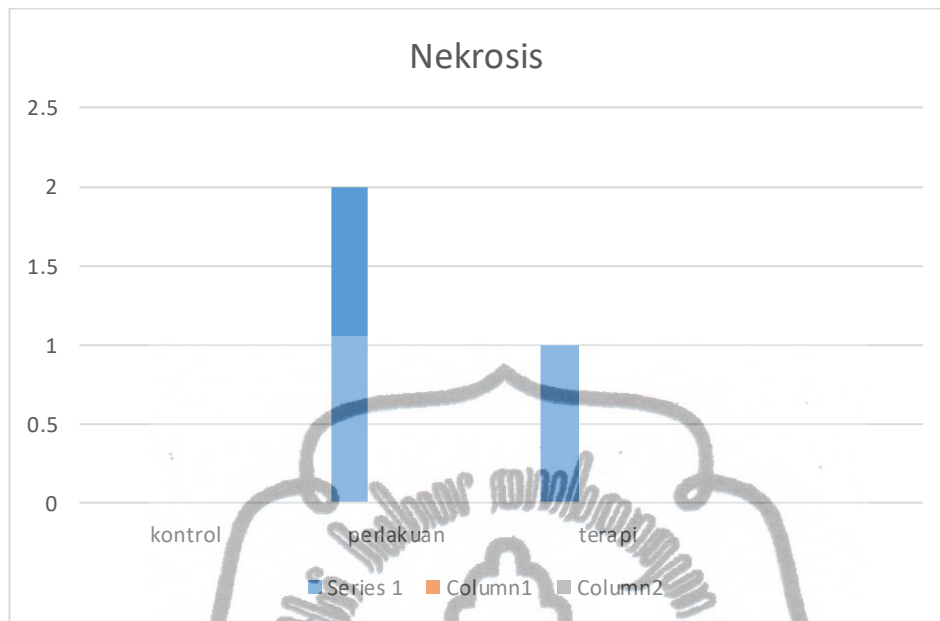
Pada data median sampel penelitian untuk gambaran nekrosis terlihat nilai median pada sampel kontrol : 0 yang artinya pada sampel sehat tidak ditemukan gambaran nekrosis. Setelah perlakuan dengan induksi bakteri *A. actinomycetemcomitans*, nilai median : 2 yang artinya ada kenaikan gambaran nekrosis pada sampel periodontitis. Pada sampel terapi, yaitu sampel periodontitis yang diberi Astaxanthin terdapat nilai median : 1 yang artinya ada penurunan gambaran nekrosis dibandingkan dengan sampel periodontitis. Dari data yang diperoleh, dilakukan uji *Kruskal-Wallis* terhadap masing-masing kelompok. Dari hasil dari uji *Kruskal-Wallis* diperoleh hasil $p = 0,001$. Oleh karena nilai $p < 0,05$, maka dapat diambil kesimpulan terdapat perbedaan pada kelompok kontrol, perlakuan dan terapi secara meyakinkan. Ringkasan hasil uji *Kruskal Wallis* disajikan pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2 Ringkasan hasil uji *Kruskal Wallis* pada nekrosis

Kontrol	Perlakuan	Terapi	Hasil <i>Kruskal Wallis</i>
Median	Median	Median	p
0	2	1	0,001*

Sumber: Data Primer 2020, diolah.

Keterangan : *Signifikan pada derajat signifikansi 5 persen.



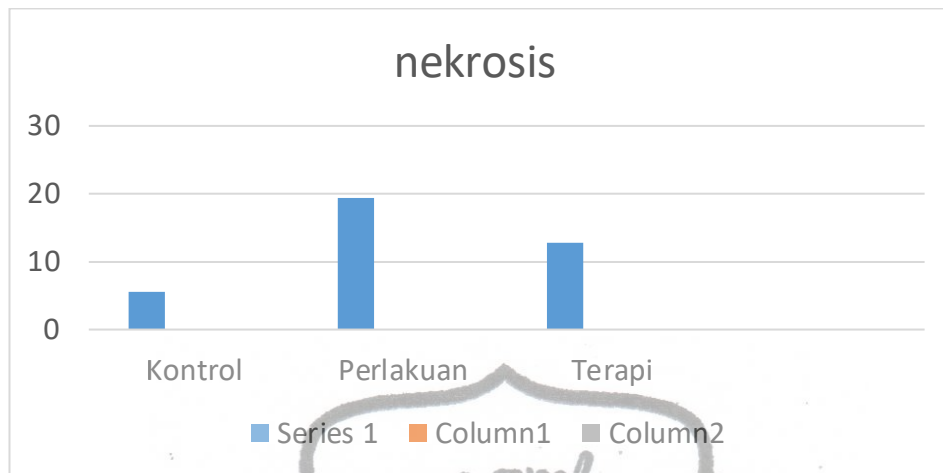
Gambar 5.2 Diagram median gambaran nekrosis masing-masing kelompok

Pada data *mean rank* gambaran nekrosis masing-masing kelompok sampel penelitian didapatkan nilai *mean rank* kelompok sampel kontrol adalah 5,50. Data *mean rank* kelompok perlakuan adalah 19,38 dan data *mean rank* kelompok terapi adalah 12,63. Deskripsi data *mean rank* sampel penelitian disajikan pada Tabel 5.3

Tabel 5.3 Deskripsi data *mean rank* sampel penelitian nekrosis

Kontrol	Perlakuan	Terapi
<i>Mean Rank</i>	<i>Mean Rank</i>	<i>Mean Rank</i>
5,50	19,38	12,63

Sumber: Data Primer 2020, diolah.



Gambar 5.3 Diagram *mean rank* gambaran nekrosis masing-masing kelompok

Setelah dilakukan uji *Kruskal Wallis* dilanjutkan uji *Post Hoc* menggunakan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui letak perbedaan antara ketiga kelompok perlakuan. Dari hasil uji *Mann-Whitney* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dengan perlakuan ($p=0,001$) dan antara kelompok perlakuan dengan kelompok terapi ($p=0,007$). Kelompok kontrol dan kelompok terapi juga terdapat perbedaan yang bermakna ($p=0,003$). Ringkasan hasil uji *Mann-Whitney* disajikan pada Tabel 5.4.

Tabel 5.4 Ringkasan hasil uji *Mann-Whitney* pada nekrosis

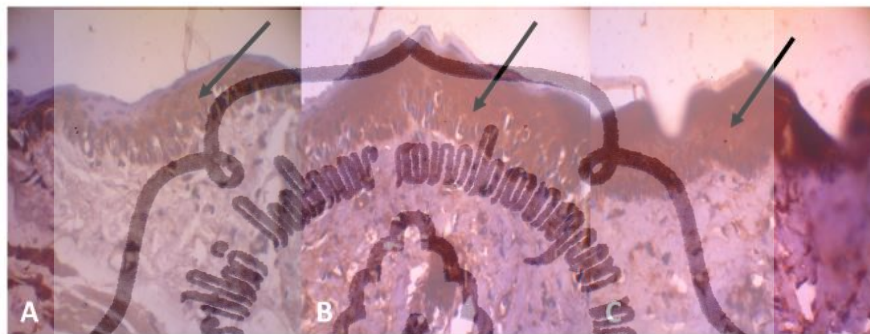
Kelompok	p	Keterangan
Kontrol – Perlakuan	0,001*	Signifikan
Kontrol – Terapi	0.003*	Signifikan
Perlakuan – Terapi	0,007*	Signifikan

Sumber: Data Primer 2020, diolah.

Keterangan : *Signifikan pada derajat signifikansi 5 persen.

Hasil analisis di atas dapat disimpulkan bahwa hipotesis pertama yang menyatakan bahwa: “pemberian Astaxanthin dapat menurunkan nekrosis pada tikus Wistar jantan model periodontitis” benar-benar dapat terbukti secara signifikan.

2) Ekspresi *Caspase-3* (Apoptosis)



Gambar 5.4 Pengecatan imunohistokimia *Caspase-3* dengan pembesaran 400x

Keterangan:

- A. Sampel kontrol : tanda panah menunjukkan *Caspase-3* terekspresi sedang pada sel-sel epitel (skor 2);
- B. Sampel perlakuan : tanda panah menunjukkan *Caspase-3* terekspresi kuat pada sel-sel epitel (skor 3)
- C. Sampel terapi : tanda panah menunjukkan *Caspase-3* terekspresi kuat pada sel-sel epitel (skor 3)

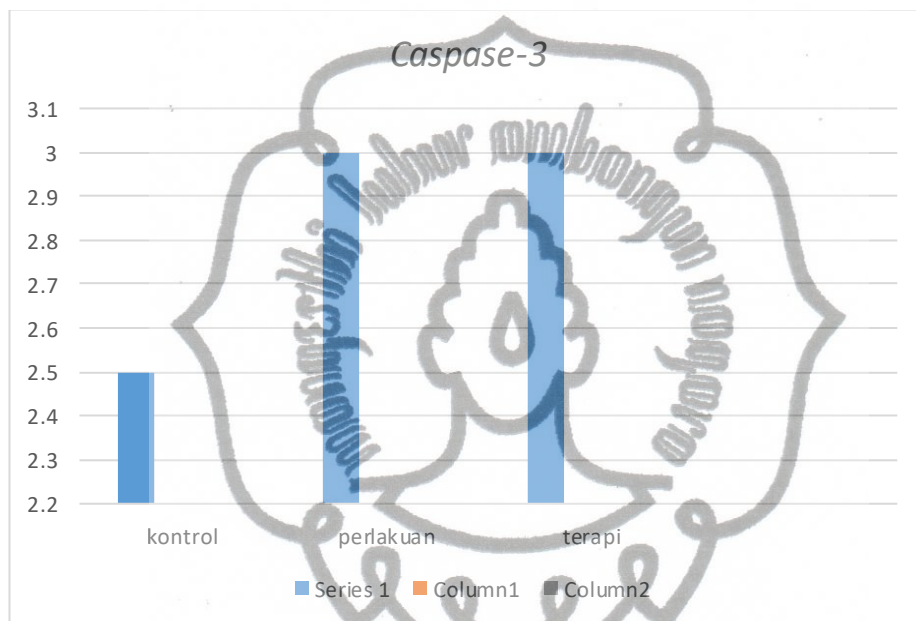
Pada data median sampel penelitian untuk ekspresi *Caspase-3* terlihat nilai median pada sampel kontrol : 2,5 yang artinya pada sampel sehat sudah ditemukan ekspresi *Caspase-3*. Setelah perlakuan dengan induksi bakteri *A. actinomycetemcomitans*, nilai median : 3 yang artinya ada kenaikan ekspresi *Caspase-3* pada sampel periodontitis. Pada sampel terapi, yaitu sampel periodontitis yang diberi Astaxanthin terdapat nilai median : 3 yang artinya tidak ada penurunan ekspresi *Caspase-3*. Dari data yang diperoleh, dilakukan uji *Kruskal-Wallis* terhadap masing-masing kelompok. Dari hasil dari uji *Kruskal-Wallis* diperoleh hasil $p = 0,482$. Oleh karena nilai $p > 0,05$, maka dapat diambil kesimpulan tidak terdapat perbedaan pada kelompok kontrol, perlakuan dan terapi secara signifikan. Ringkasan hasil uji *Kruskal Wallis* disajikan pada Tabel 5.5.

Tabel 5.5 Ringkasan hasil uji *Kruskal Wallis* ekspresi *Caspase-3*

Kontrol	Perlakuan	Terapi	Hasil <i>Kruskal Wallis</i>
Median	Median	Median	p
2,5	3	3	0,482*

Sumber: Data Primer 2020, diolah.

Keterangan : *Signifikan pada derajat signifikansi 5 persen.

**Gambar 5.5** Diagram median ekspresi *Caspase-3* masing-masing kelompok

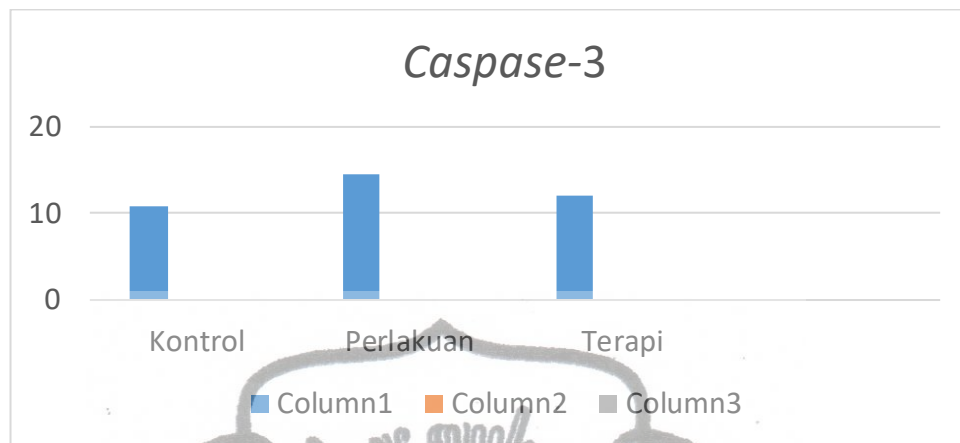
Pada data *mean rank* ekspresi *Caspase-3* masing-masing kelompok sampel penelitian didapatkan nilai *mean rank* kelompok sampel kontrol adalah 10,88. Data *mean rank* kelompok perlakuan adalah 14,50 dan data *mean rank* kelompok terapi adalah 12,13. Deskripsi data *mean rank* sampel penelitian disajikan pada Tabel 5.6

Tabel 5.6 Deskripsi data *mean rank* sampel penelitian ekspresi *Caspase-3*

Kontrol	Perlakuan	Terapi
<i>Mean Rank</i>	<i>Mean Rank</i>	<i>Mean Rank</i>
10.88	14.50	12.13

Sumber: Data Primer 2020, diolah.

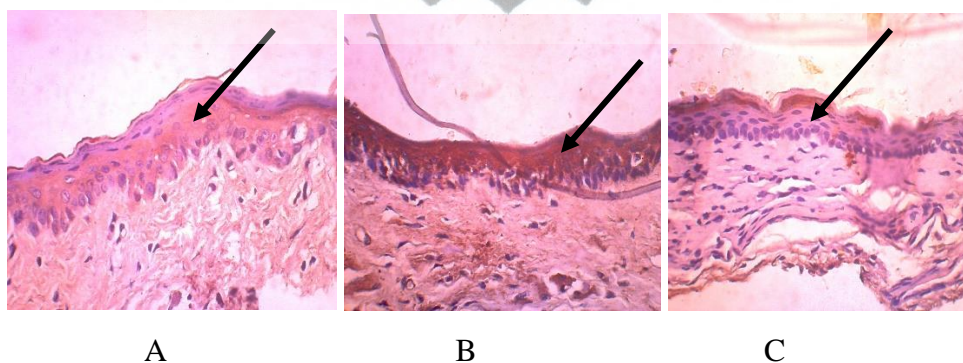
commit to user



Gambar 5.6 Diagram *mean rank* ekspresi *Caspase-3* masing-masing kelompok

Hasil analisis di atas dapat disimpulkan bahwa hipotesis pertama yang menyatakan bahwa: “pemberian Astaxanthin dapat menurunkan ekspresi *Caspase-3* pada tikus Wistar jantan model periodontitis” tidak terbukti secara signifikan.

3) Ekspresi Gasdermin (Piroptosis)



Gambar 5.7 Pemeriksaan gambaran imunohistokimia ekspresi gasdermin dengan pembesaran 400x

Keterangan:

- Sampel kontrol : tanda panah menunjukkan gasdermin terekspresi kuat pada sel-sel epitel (skor 3)
- Sampel perlakuan : tanda panah menunjukkan gasdermin terekspresi sedang pada sel-sel epitel (skor 2)

- C. Sampel terapi : tanda panah menunjukkan gasdermin terekspresi kuat pada sel-sel epitel (skor 3)

Pada data median sampel penelitian untuk ekspresi gasdermin terlihat nilai median pada sampel kontrol:4 yang artinya pada sampel sehat sudah ditemukan ekspresi gasdermin. Setelah perlakuan dengan induksi bakteri

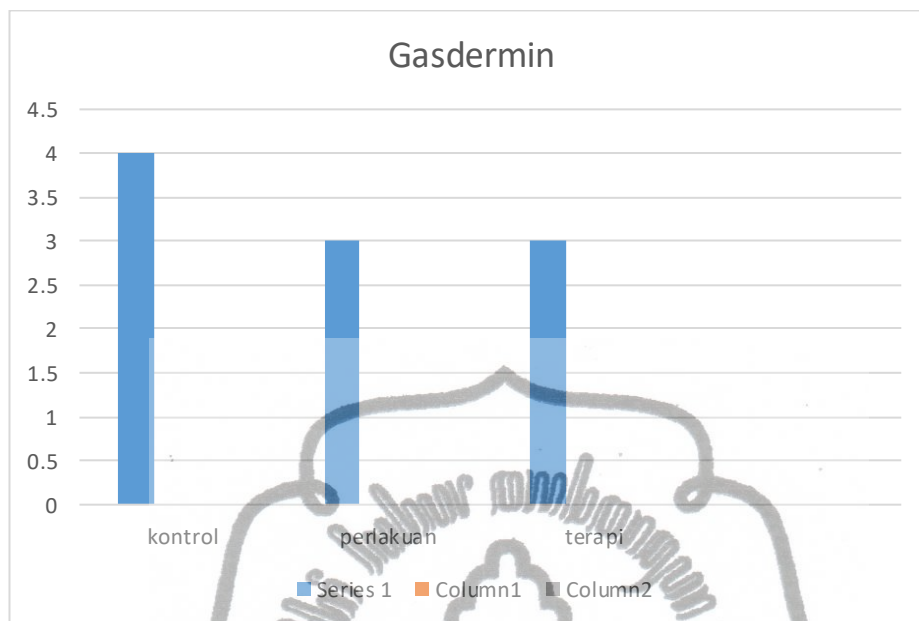
A. actinomycetemcomitans, nilai median : 3 yang artinya tidak ada kenaikan ekspresi gasdermin pada sampel periodontitis. Pada sampel terapi, yaitu sampel periodontitis yang diberi Astaxanthin terdapat nilai median : 3,5 yang artinya tidak ada penurunan ekspresi gasdermin. Dari data yang diperoleh, dilakukan uji *Kruskal-Wallis* terhadap masing-masing kelompok. Dari hasil dari uji *Kruskal-Wallis* diperoleh hasil $p = 0,113$. Oleh karena nilai $p > 0,05$, maka dapat diambil kesimpulan tidak terdapat perbedaan pada kelompok kontrol, perlakuan dan terapi secara signifikan. Ringkasan hasil uji *Kruskal Wallis* disajikan pada Tabel 5.7.

Tabel 5.7 Ringkasan hasil uji *Kruskal Wallis* pada ekspresi gasdermin

Kontrol	Perlakuan	Terapi	Hasil <i>Kruskal Wallis</i>
Median	Median	Median	p
4	3	3,5	0,113*

Sumber: Data Primer 2020, diolah.

Keterangan : *)Signifikan pada derajat signifikansi 5 persen.



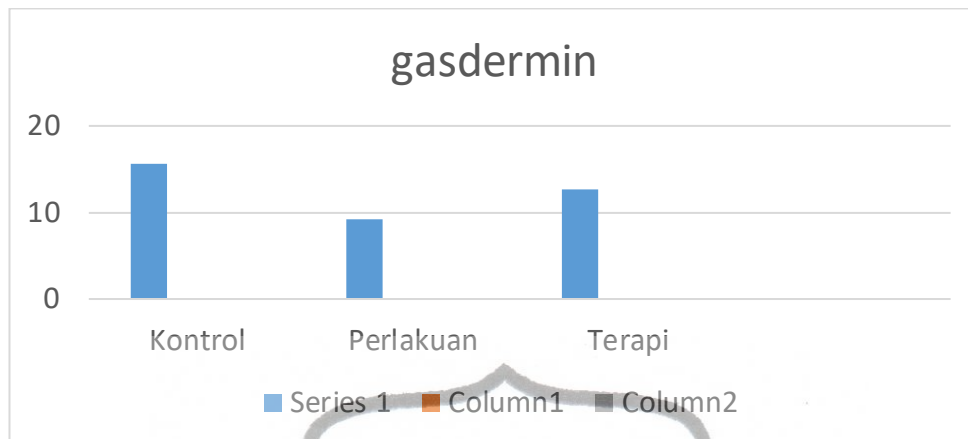
Gambar 5.8 Diagram median ekspresi gasdermin masing-masing kelompok

Pada data *mean rank* ekspresi gasdermin masing-masing kelompok sampel penelitian didapatkan nilai *mean rank* kelompok sampel kontrol adalah 15,63. Data *mean rank* kelompok perlakuan adalah 9,13 dan data *mean rank* kelompok terapi adalah 12,75. Deskripsi data *mean rank* sampel penelitian disajikan pada Tabel 5.8

Tabel 5.8 Deskripsi data *mean rank* sampel penelitian ekspresi gasdermin

Kontrol	Perlakuan	Terapi
<i>Mean Rank</i>	<i>Mean Rank</i>	<i>Mean Rank</i>
15.63	9.13	12.75

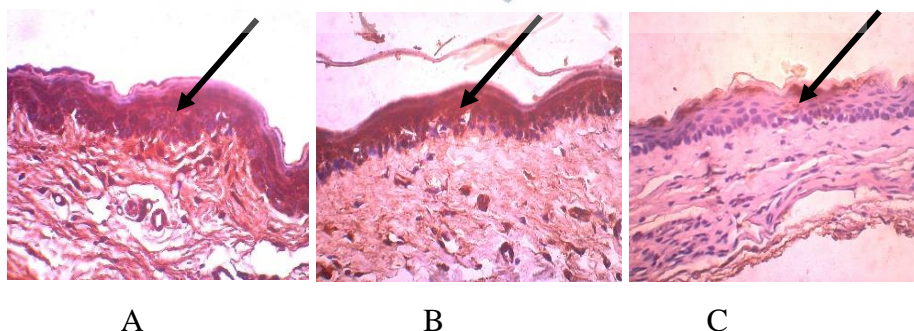
Sumber: Data Primer 2020, diolah.



Gambar 5.9 Diagram *mean rank* ekspresi gasdermin masing-masing kelompok

Hasil analisis di atas dapat disimpulkan bahwa hipotesis pertama yang menyatakan bahwa: “pemberian Astaxanthin dapat menurunkan ekspresi gasdermin pada tikus Wistar jantan model periodontitis” tidak terbukti secara signifikan.

4) Ekspresi NLRP3 (Piroptosis)



Gambar 5.10 Pemeriksaan gambaran imunohistokimia ekspresi NLRP3 dengan pembesaran 400x

Keterangan:

- A. Sampel kontrol : tanda panah menunjukkan NLRP3 terekspresi kuat pada sel-sel epitel (skor 3).
- B. Sampel perlakuan: tanda panah menunjukkan NLRP3 terekspresi sedang pada sel-sel epitel (skor 2).

C. Sampel terapi : tanda panah menunjukkan NLRP3 terekspresi sedang pada sel-sel epitel (skor 2)

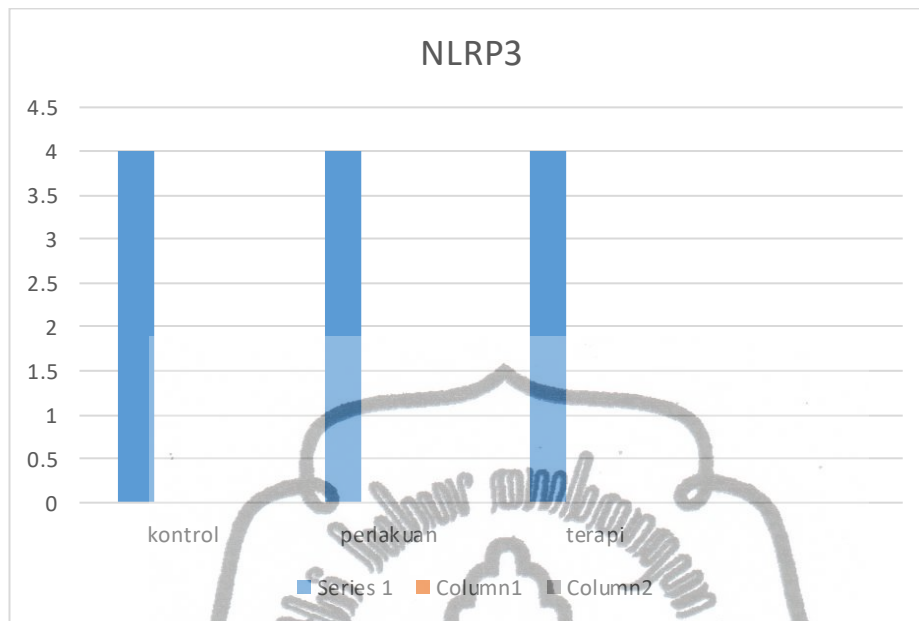
Pada data median sampel penelitian untuk ekspresi NLRP3 terlihat nilai median pada sampel kontrol:4 yang artinya pada sampel sehat sudah ditemukan ekspresi gasdermin. Setelah perlakuan dengan induksi bakteri *A. actinomycetemcomitans*, nilai median : 4 yang artinya tidak ada kenaikan ekspresi NLRP3 pada sampel periodontitis. Pada sampel terapi, yaitu sampel periodontitis yang diberi Astaxanthin terdapat nilai median : 4 yang artinya tidak ada penurunan ekspresi NLRP3. Dari data yang diperoleh, dilakukan uji *Kruskal-Wallis* terhadap masing-masing kelompok. Dari hasil dari uji *Kruskal-Wallis* diperoleh hasil $p = 0,320$. Oleh karena nilai $p > 0,05$, maka dapat diambil kesimpulan tidak terdapat perbedaan pada kelompok kontrol, perlakuan dan terapi secara signifikan. Ringkasan hasil uji *Kruskal Wallis* disajikan pada Tabel 5.9.

Tabel 5.9 Ringkasan hasil uji *Kruskal Wallis* pada ekspresi NLRP3

Kontrol	Perlakuan	Terapi	Hasil <i>Kruskal Wallis</i>
Median	Median	Median	p
4	4	4	0,320*

Sumber: Data Primer 2020, diolah.

Keterangan : *)Signifikan pada derajat signifikansi 5 persen.



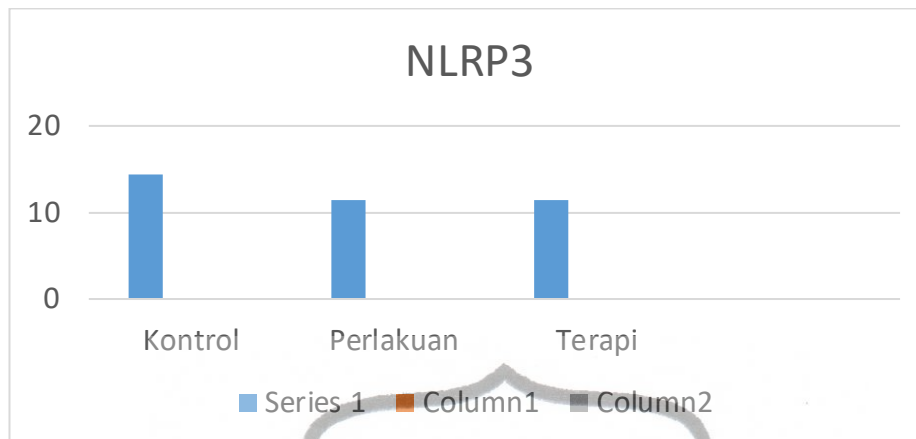
Gambar 5.11 Diagram median ekspresi NLRP3 masing-masing kelompok

Pada data *mean rank* ekspresi NLRP3 masing-masing kelompok sampel penelitian didapatkan nilai *mean rank* kelompok sampel kontrol adalah 14,50. Data mean rank kelompok perlakuan adalah 11,50 dan data *mean rank* kelompok terapi adalah 11,50. Deskripsi data *mean rank* sampel penelitian disajikan pada Tabel 5.10

Tabel 5.10 Deskripsi data *mean rank* sampel penelitian ekspresi NLRP3

Kontrol	Perlakuan	Terapi
<i>Mean Rank</i>	<i>Mean Rank</i>	<i>Mean Rank</i>
14.50	11.50	11.50

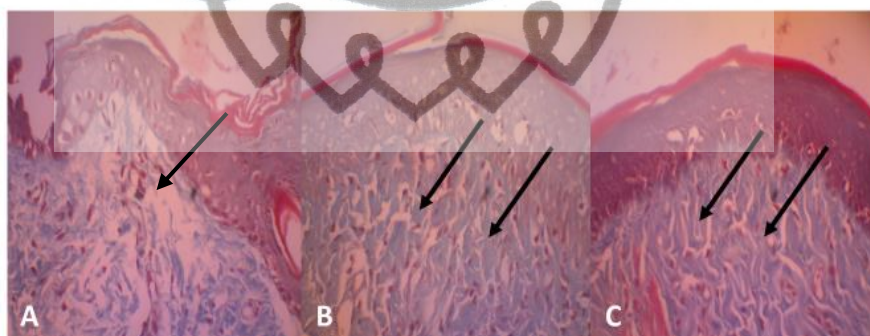
Sumber: Data Primer 2020, diolah.



Gambar 5.12 Diagram *mean rank* ekspresi NLRP3 masing-masing kelompok

Hasil analisis di atas dapat disimpulkan bahwa hipotesis pertama yang menyatakan bahwa: “pemberian Astaxanthin dapat menurunkan ekspresi NLRP3 pada tikus Wistar jantan model periodontitis” tidak terbukti secara signifikan.

5) Pembentukan Kolagen



Gambar 5.13 Pengecatan trichome-masson dengan pembesaran 400x

Keterangan:

- Sampel kontrol : tanda panah menunjukkan Fibrosis tidak ditemukan pada stroma (skor 0)
- Sampel perlakuan : tanda panah menunjukkan Fibrosis ditemukan pada <25 % stroma (skor 1)
- Sampel terapi : tanda panah menunjukkan Fibrosis ditemukan pada 25-49% stroma (skor 2)

Pada data median sampel penelitian untuk pembentukan kolagen terlihat pada sampel kontrol, nilai median : 0 yang artinya pada sampel sehat tidak

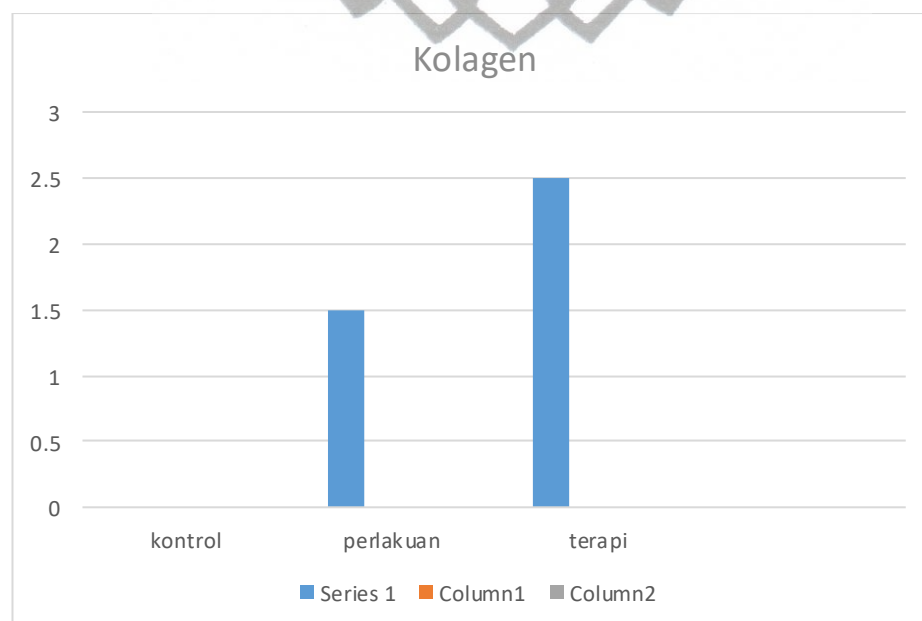
ada pembentukan kolagen baru. Setelah perlakuan dengan induksi bakteri *A. actinomycetemcomitans* nilai median : 1,5 yang artinya ada kenaikan pembentukan kolagen baru pada sampel periodontitis. Pada sampel terapi, yaitu sampel periodontitis yang diberi Astaxanthin nilai median : 2,5 yang artinya ada kenaikan pembentukan kolagen baru setelah pemberian Astaxanthin. Dari data yang diperoleh, dilakukan uji *Kruskal-Wallis* terhadap masing-masing kelompok. Dari hasil dari uji *Kruskal-Wallis* diperoleh hasil $p = 0,001$. Oleh karena nilai $p < 0,05$, maka dapat diambil kesimpulan terdapat perbedaan pada kelompok kontrol, perlakuan dan terapi secara meyakinkan. Ringkasan hasil uji *Kruskal Wallis* disajikan pada Tabel 5.11.

Tabel 5.11 Ringkasan hasil uji *Kruskal Wallis* pada pembentukan kolagen

Kontrol	Perlakuan	Terapi	Hasil <i>Kruskal Wallis</i>
Median	Median	Median	p
0	1,5	2,5	0,001*

Sumber: Data Primer 2020, diolah.

Keterangan : *Signifikan pada derajat signifikansi 5 persen.



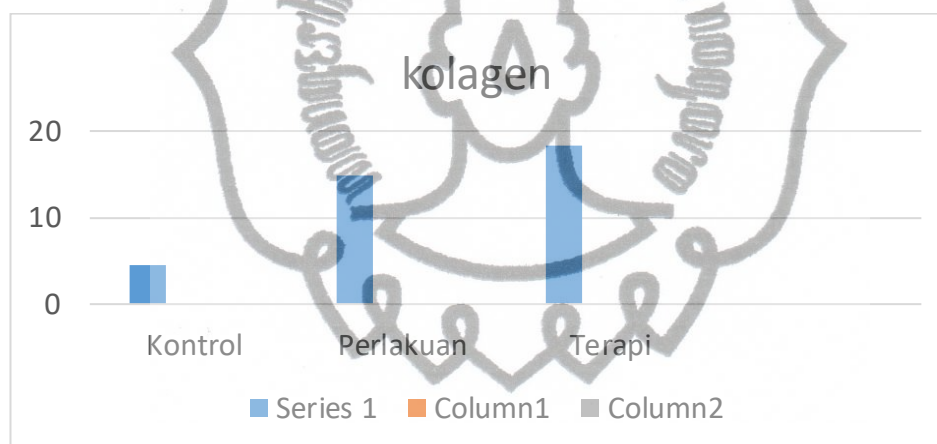
Gambar 5.14 Diagram median pembentukan kolagen masing-masing kelompok

Pada data *mean rank* pembentukan kolagen masing-masing kelompok sampel penelitian didapatkan nilai *mean rank* kelompok sampel kontrol adalah 4,50. Data *mean rank* kelompok perlakuan adalah 14,75 dan data *mean rank* kelompok terapi adalah 18,25. Deskripsi data *mean rank* sampel penelitian disajikan pada Tabel 5.12

Tabel 5.12 Deskripsi data *mean rank* sampel penelitian pembentukan kolagen

Kontrol	Perlakuan	Terapi
<i>Mean Rank</i>	<i>Mean Rank</i>	<i>Mean Rank</i>
4.50	14.75	18.25

Sumber: Data Primer 2020, diolah.



Gambar 5.15 Diagram *mean rank* pembentukan kolagen masing-masing kelompok

Setelah dilakukan uji *Kruskal Wallis* dilanjutkan uji *Post Hoc* menggunakan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui letak perbedaan antara ketiga kelompok perlakuan. Dari hasil uji *Mann-Whitney* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dengan perlakuan ($p=0,001$) dan antara kelompok kontrol dan kelompok terapi ($p=0,001$) serta kelompok perlakuan dengan kelompok terapi ($p=0,040$). Ringkasan hasil uji *Mann Whitney* disajikan pada Tabel 5.13.

Tabel 5.13 Ringkasan hasil uji *Mann Whitney* pada pembentukan kolagen

Kelompok	p	Keterangan
Kontrol – Perlakuan	0,001*	Signifikan
Kontrol – Terapi	0.001*	Signifikan
Perlakuan – Terapi	0.001*	Signifikan

Sumber: Data Primer 2020, diolah.

Keterangan : *)Signifikan pada derajat signifikansi 5 persen.

Hasil analisis antar kelompok dapat disimpulkan bahwa hipotesis pertama yang menyatakan bahwa: “pemberian Astaxanthin dapat meningkatkan pembentukan kolagen pada tikus Wistar jantan model periodontitis”, benar- benar terbukti.

B. Pembahasan

Pada penelitian ini terbukti bahwa Astaxanthin berpengaruh terhadap kematian sel nekrosis dan perbaikan jaringan periodontal pada tikus Wistar jantan model periodontitis. Keadaan dari mulai masuknya bakteri *A. actinomycetemcomitans* sampai terjadinya perbaikan jaringan periodontal pada tikus Wistar jantan model periodontitis merupakan suatu rangkaian atau tahapan. Rangkaian atau tahapan tersebut adalah input kemudian proses dan terakhir adalah output. Input dimulai ketika bakteri menginduksi sel *host*. Kemudian terjadi proses, yaitu melalui beberapa modalitas yang berbeda, termasuk apoptosis, nekrosis, dan piroptosis. Tahapan terakhir adalah output, yaitu terjadinya perbaikan yang dibuktikan dengan peningkatan pembentukan kolagen secara signifikan di jaringan periodontal pada tikus Wistar jantan model periodontitis. Pada tahapan input terjadi induksi bakteri *A. actinomycetemcomitans* ke jaringan periodontal yang ditangkap oleh reseptor TLRs dan merangsang aktivasi jalur *signalling* intraseluler yaitu jalur NF- κ B dan MAPK. Pengaktifan jalur ini akan menghasilkan ekspresi gen yang terdiri dari sitokin dan kemokin pro-inflamasi yang menstimulasi leukosit untuk ekstrasvasi keluar dari sel endotel ke matriks provisional. Peran makrofag dalam

penyembuhan luka pada fase awal adalah perbaikan luka, setelah terpapar sitokin pro-inflamasi, IFN- γ , PAMP atau DAMP, maka akan terjadi infiltrasi monosit dan makrofag segera diaktifkan. Makrofag melakukan fagositosis mikroba, membersihkan sisa-sisa sel dan menghasilkan mediator proinflamasi. Makrofag juga mengeluarkan neutrofil selama terjadi cedera yang berfungsi untuk fagositosis. Makrofag dan AGF akan mempercepat proses penyembuhan luka (Landén *et al.*, 2016). Pada patogenesis penyakit periodontal terdapat suatu keadaan stres oksidatif, yaitu ketika produksi ROS meningkat, maka kontrol protektif tidak akan mencukupi sehingga memicu kerusakan oksidatif. Stres oksidatif memicu kerusakan jaringan periodontal yang dihasilkan dari interaksi antara *host* dengan mikroba, baik sebagai akibat langsung dari kelebihan aktivitas ROS (defisiensi antioksidan) atau secara tidak langsung sebagai akibat dari aktivasi faktor transkripsi peka-redoks dan penciptaan suatu keadaan proinflamasi. Terbukti bahwa ada hubungan yang signifikan antara status oksidan dan status periodontal, dan stres oksidatif dapat memainkan peran penting dalam patologi periodontitis dan kerusakan jaringan terkait (Pendyala *et al.*, 2008).

Selanjutnya pada tahapan proses, terjadi apoptosis, nekrosis dan piroptosis. Apoptosis merupakan jenis kematian sel terprogram non inflamasi yang dipicu oleh dua jalur yang berbeda, jalur intrinsik (dimediasi mitokondria) dan lintasan ekstrinsik (dimediasi reseptor). Apoptosis secara morfologi ditandai dengan *blebbing* membran, penyusutan sel, fragmentasi DNA, permeabilitas mitokondria, dan aktivasi *caspase* (kecuali untuk *Caspase-1*). Dalam apoptosis, bakteri dipertahankan dalam tubuh apoptotik dan difagosit oleh sel fagosit. Nekrosis ditandai dengan pecahnya membran, pembengkakan sel, dan pelepasan isi sel dan disertai dengan inflamasi. Nekrosis dipicu oleh produksi ROS atau sinyal bahaya, seperti destabilisasi lisosomal, pelepasan calpain, dan penipisan *Adenosina Trifosfat* (ATP), yang disebabkan oleh infeksi bakteri atau kerusakan fisik. Piroptosis adalah jenis kematian sel terprogram yang dikoordinasikan oleh aktivasi *Caspase-1 inflamosome* dan disertai dengan membran lisis, fragmentasi DNA, dan pelepasan sitokin pro-inflamasi, termasuk IL-1 dan IL-18. Infeksi bakteri memunculkan berbagai macam respons pelindung dan stres *host*, termasuk

kematian sel dan proliferasi, respons inflamasi, dan respons imun bawaan. Kematian sel yang dipicu oleh bakteri dalam berbagai model kematian sel sangat dipengaruhi oleh jenis sel *host*, tahap infeksi, tingkat infeksi, kondisi fisiologis sel, faktor bakteri, dan pengaturan eksperimental. Mekanisme molekuler bakteri patogen memanipulasi jalur kematian sel akan memberikan wawasan pendekatan terapeutik baru yang dapat digunakan untuk mengontrol infeksi bakteri dan perkembangan penyakit inflamasi (Ashida *et al.*, 2011). Astaxanthin mempunyai sifat sebagai antioksidan dan antiinflamasi. Astaxanthin tidak hanya memberikan aksi antioksidan langsung tetapi juga mengatur enzim antioksidan. Astaxanthin merupakan antioksidan kuat dan dapat melindungi terhadap kerusakan oksidatif pada jaringan tubuh. Adanya ujung hidroksil dan keto pada Astaxanthin menjelaskan aktivitas anti oksidan yang lebih tinggi daripada karotenoid beta-karoten yang lain. Aktivitas Astaxanthin dalam menangkul radikal bebas dengan melindungi lipid dari peroksidasi dan mengurangi kerusakan oksidatif kolesterol LDL, DNA, protein, membran sel, membran mitokondria. Salah satu titik tangkap utama dari Astaxanthin adalah menetralkan reaksi oksigen bermuatan tunggal dan menekan peroksidasi lipid jauh lebih efektif dibandingkan dengan antioksidan lainnya sehingga dapat mengontrol keberadaan ROS (Lee *et al.*, 2003). Pada mitokondria dengan respon antioksidan yang tidak adekuat, TNF α merusak aliran elektron sehingga melepaskan radikal bebas oksigen dan lipid peroksida. Salah satu radikal bebas oksigen adalah ROS yang mempunyai tiga tipe mayor antara lain O₂, H₂O₂ dan OH. Radikal superoksida dibentuk saat elektron keluar dari rantai transport elektron. Superoksida dismutase menghasilkan H₂O₂. Beberapa enzim peroksidase dapat langsung membentuk radikal hidrogen peroksida. Ion hidroksil sangat reaktif sehingga dapat mengubah purin dan pirimidin, yang menyebabkan kerusakan DNA. Pada tingkat sel, Astaxanthin terkumpul dalam membran sel dan membran mitokondria. Astaxanthin mempunyai struktur yang unik dengan kemampuan molekulnya untuk menjangkau dua lapisan membran, sehingga dapat berpengaruh kuat baik di luar maupun di dalam sel atau mitokondria. Astaxanthin bekerja sebagai antioksidan dengan cara mencari radikal bebas (ROS) dan menghambat pembentukannya dengan mendetoksifikasi peroksidasi lipid (H₂O₂)

mitokondria melalui pengikatan O_2 . Selanjutnya akan terjadi penurunan xanthin oksidase dan NADP(H) oksidase dan peningkatan generasi O_2 , sehingga stress oksidatif pada keadaan inflamasi akan berkurang dan terjadi penurunan proses apoptosis dan nekrosis (Odeberg *et al.*, 2003). Jang *et al.* (2010) dalam penelitiannya tentang efek Astaxanthin terhadap stress oksidatif yang diinduksi nitrat pada viabilitas sel menyimpulkan bahwa astaxanthin memiliki efek antioksidan pada viabilitas sel dan peroksidasi lipid. Wolf *et al.* (2010) menunjukkan bahwa dalam kondisi stres oksidatif, Astaxanthin mampu secara efektif melindungi mitokondria, dengan cara meningkatkan fungsi mitokondria dengan mempertahankan mitokondria pada saat keadaannya menurun. Astaxanthin mempunyai kemampuan paling kuat untuk menetralkan reaksi oksigen bermuatan tunggal. Keunggulan Astaxanthin karena Astaxanthin banyak ditemukan di organisme laut, antara lain ikan, kerang, krustasea, phyto plankton dan sebagainya. Secara biologis aktivitas Astaxanthin berasal dari poten O_2 . Astaxanthin bersifat hidrofilik dan lipofilik dan juga menekan aktivitas peroksidasi lipid. Astaxanthin mempunyai peran penting dalam usaha menjaga kesehatan, kualitas hidup, dan mencegah terjadinya penyakit, berperan penting dalam mempromosikan kualitas hidup untuk mencegah penyakit (Nishida, *et al.*, 2007). Astaxanthin mempunyai kemampuan menetralkan radikal bebas dan antioksidan dengan memberikan atau mengambil elektron, namun tidak menjadi pro-oksidan (Kidd, 2011). Pada saat radikal bebas dinetralkan, maka akan terjadi perlindungan pada kerusakan dan membantu perbaikan jaringan kolagen (Tweed, 2011). Efek antiinflamasi dari astaxanthin tampak dari kemampuannya menghambat sitokin dan kemokin, seperti $TNF-\alpha$, prostaglandin E-2 (PGE-2), IL-6 dan NO (Hussein *et al.*, 2006). Astaxanthin bersifat melapisi seluruh sel, karena mampu masuk memenuhi setiap sel di tubuh. Secara molekular antioksidan ini bersifat lipofilik dan hidrofilik, sehingga memungkinkan untuk menjangkau seluruh bagian sel di tubuh. Astaxanthin menghambat peroksidasi lipid, menekan sintesis mediator inflamasi seperti $TNF-\alpha$, prostaglandin, *leukotriens* dan *interleukin*, oksida nitrat, enzim COX-1 dan COX-2 dan IL1 β yang mengakibatkan jumlah sel inflamasi yang menuju ke jaringan yang mengalami jejas akan dibatasi, sehingga proses inflamasi

akan berlangsung cepat dan kemampuan proliferasi dari TGF- β tidak terhambat, sehingga proses proliferasi dapat segera terjadi. Penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Lee *et al.* (2003) yang menunjukkan bahwa Astaxanthin mempunyai efek antioksidan dan antiinflamasi, dengan cara menghambat jalur aktivasi NF- κ B, sehingga produksi mediator inflamasi akan dihambat. Penelitian lain yang dilakukan oleh Bangsawan (2012) juga mendapatkan hasil bahwa Astaxanthin mempunyai kemampuan antiinflamasi dengan memblokir aktivitas NF- κ B, kemudian menekan produksi ROS, dan menekan produksi sitokin inflamasi sehingga kadar neutrofil dan limfosit menurun. Penelitian lain oleh Speranza *et al.* (2012) menyimpulkan bahwa Astaxanthin menekan jalur NF- κ B, sehingga akan menghambat produksi TNF- α dan IL-1, kemudian terjadi penekanan produksi ROS dan menghambat produksi NO dan COX-2 (Kumar *et al.*, 2007; Underwood, 2007). Sitokin yang disekresi sel trombosit juga berfungsi untuk mensekresi faktor-faktor inflamasi dan melepaskan berbagai faktor pertumbuhan yang potensial seperti TGF- β , PDGF, IL-1, IGF-1, EGF, dan VEGF, sitokin dan kemokin. Mediator ini sangat dibutuhkan pada penyembuhan luka untuk memicu penyembuhan sel, diferensiasi dan mengawali pemulihan jaringan yang rusak (Werner, 2003). Astaxanthin mampu menghalangi peroksidasi lipid dan kadar dari spesies reaktif total, superoksida, dan nitrat oksida (molekul-molekul yang menyebabkan kerusakan sel yang luas) serta menghambat peningkatan faktor pertumbuhan pada sel endotel pembuluh darah adhesi molekul, yang seluruhnya berhubungan dengan patogenesis periodontitis.

1. Pendekatan Prinsip Ontologi

Penyebab utama penyakit periodontal adalah akumulasi bakteri plak pada permukaan gigi (Lumentut *et al.*, 2013). Jumlah bakteri anaerob yang berlebih akan menyebabkan periodontitis (Nield-Gehrig dan Wilman, 2011). Salah satu bakteri anaerob gram negatif yang berperan dalam penyebab periodontitis adalah bakteri *A. actinomycetemcomitans* (Newman *et al.*, 2006). Periodontitis merupakan suatu inflamasi yang diakibatkan oleh infeksi pada jaringan pendukung gigi, terjadi kerusakan secara progresif pada ligamen periodontal dan tulang alveolar (Lamont

dan Jenkinson, 2010). Injeksi bakteri *A. actinomycetemcomitans* pada tikus Wistar jantan sehat akan menyebabkan terjadinya periodontitis. Sebanyak 300-400 spesies bakteri berbeda yang terdapat rongga mulut manusia. Sulit untuk menentukan satu dari spesies tersebut sebagai agen etiologi dalam penyakit periodontal. Namun, data yang berasal dari studi mikrobiologis, imunologis, histopatologis, dan sebagainya menunjukkan bahwa bakteri *A. actinomycetemcomitans* penting dalam etiologi periodontitis. Bakteri *A. actinomycetemcomitans* adalah bakteri dengan beragam karakteristik virulensi potensial, termasuk beberapa mekanisme untuk menghindari kekebalan tubuh, yang salah satunya mungkin memainkan peran penting dalam patologi penyakit periodontitis. Bakteri *A. actinomycetemcomitans* telah terbukti memiliki banyak faktor virulensi yang membuatnya dapat bertahan di rongga mulut dan memungkinkannya untuk menghindari dari pertahanan *host*. Faktor virulensi tersebut adalah, faktor kolonisasi dan adhesif dalam rongga mulut, yaitu adhesin, invasi, bakteriosin, dan resistensi antibiotik. Faktor yang mengganggu pertahanan *host*, yaitu *leukotoxin*, LPS, inhibitor kemotaksis, *Cytolethal Distending Toxin* (CDT), protein immunosupresif, protein pengikat Fc dan faktor yang merusak jaringan *host* yaitu sitotoksin, *heat shock protein* (HSPs), collagenase, agen resorpsi tulang (Malik *et al.*, 2015). *Lipopolysacharide* dari bakteri *A. actinomycetemcomitans* merupakan toksik bagi sel-sel *natural killer cell* (NK) manusia. *Lipopolysacharide* akan memicu produksi sitokin proinflamasi sehingga menyebabkan terjadinya inflamasi, selanjutnya dapat mempengaruhi perkembangan penyakit periodontitis dan merusak jaringan pendukung gigi dengan memicu jalur yang mengarah ke stimulasi matriks metaloproteinase dan aktivator plasminogen (Mythireyi dan Krishnababa, 2012).

Pada hasil penelitian ini, ekspresi *Caspase-3* (apoptosis) pada tikus kontrol sudah terekspresi. Hal ini dikarenakan apoptosis merupakan kematian sel terprogram yang terjadi selama hidup, karena mempunyai sifat yang menguntungkan bagi tubuh. Apoptosis merupakan program kematian sel terprogram non inflamasi yang mempunyai peran agar terjaga keadaan homeostasis. Apoptosis dapat dipicu oleh kondisi fisiologis maupun kondisi

patologis. Apoptosis juga berperan dalam patogenesis beberapa penyakit. Apoptosis dipicu oleh dua jalur yang berbeda, jalur intrinsik (dimediasi mitokondria) dan lintasan ekstrinsik (dimediasi reseptor). Pada jaringan periodontal, pergantian epitel junctional gingiva yang cepat, dan sel-sel matang superfisial dari epitel gingiva *junctional* diperkirakan diatur oleh apoptosis fisiologis. Temuan ini menunjukkan bahwa percepatan pensinyalan TGF- β R / smad2 yang berlebihan oleh mikroba patogen dapat mengganggu homeostasis pergantian pada epitel gingiva, sehingga memicu timbulnya periodontitis. (Ohgushi *et al.*, 2005). Pada keadaan periodontitis, ekspresi *Caspase-3* meningkat, walaupun tidak signifikan, dan setelah pemberian Astaxanthin, ekspresi *Caspase-3* menurun, walaupun tidak signifikan. Hal tersebut kemungkinan terjadi karena proses periodontitis masih dalam tahap ringan, belum ke tahap yang parah, sehingga peningkatan ekspresi *Caspase-3* tidak signifikan. artinya apoptosis masih bisa menghadapi keadaan periodontitis tersebut sehingga pemberian Astaxanthin tidak berpengaruh secara signifikan terhadap keadaan apoptosis.. Hal tersebut sesuai dengan penelitian dari Dabiri *et al.* (2016), yang menunjukkan ada perubahan minimal dalam ekspresi apoptosis pada kelompok periodontitis dibandingkan dengan kelompok sehat selama interval waktu 3 bulan. Namun fragmentasi DNA dan protein apoptosis menunjukkan peningkatan yang signifikan sejalan dengan peningkatan keparahan periodontitis. Begitu juga dengan hasil penelitian Pradeep (2016) yang menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi *Caspase-3* pada cairan *crevicular* gingiva sejalan dengan perkembangan penyakit periodontal, yaitu peradangan gingiva, *probing depth*, dan *clinical attachment*.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekspresi gasdermin dan NLRP3 sampel kontrol terlihat sudah terekspresi. Hal tersebut kemungkinan dikarenakan adanya proses piroptosis pada keadaan fisiologis. Seperti pada penelitian Russo *et al.* (2016) yang menyebutkan bahwa kardioprotein merekrut dan mengaktifkan *inflammasome* NLRP3 yang memicu kematian sel piroptosis. Kardioprotein terletak di dalam membran mitokondria dan berbentuk lipid (Aglietti *et al.*, 2016). Kardioprotein mempunyai peran penting dalam fosforilasi oksidatif mitokondria dan inisiasi apoptosis. Selain itu, mitokondria yang rusak dapat memfasilitasi

pembentukan aktivasi NLRP3 *inflammasom*, menghasilkan sekresi IL-1 β dan IL-18 yang tergantung pada *Caspase-1*, yang pada akhirnya mengarah terjadinya piroptosis (Chen *et al.*, 2019; Russo *et al.*, 2016; Sborgi *et al.*, 2016; Wimmer *et al.*, 2019; Guo *et al.*, 2015). Pada saat periodontitis, ekspresi gasdermin dan NLRP3 menurun. Hal ini kemungkinan terjadi karena adanya beberapa patogen mengambil langkah-langkah untuk menghindari piroptosis. *Yersinia species* menghindari peradangan dengan secara langsung menghambat piroptosis (LaRock dan Cookson, 2012) dan menginduksi kematian dengan apoptosis non-inflamasi (Bergsbagen dan Cookson, 2007). Poxvirus, juga menghambat piroptosis dan juga menekan pensinyalan IL-18 dan IL-1 β dengan antagonis reseptor (Bergsbagen *et al.*, 2009). Sebaliknya, makrofag yang terinfeksi *Salmonella typhimurium* dengan cepat mengaktifkan caspase-1 dan memicu terjadinya piroptosis (Miao *et al.*, 2010). Kemungkinan bakteri *A. actinomyetemcomitans* juga menghindari piroptosis dan menginduksi kematian sel melalui jalur apoptosis. Namun hal ini belum diketahui dengan jelas dan perlu penelitian yang lebih lanjut.

Pada penelitian Schindler (1990) disebutkan bahwa *leukotoxin* membuat lebih banyak pro-IL-1 β untuk aktivasi dan juga bertindak sebagai stimulus sekunder yang diperlukan untuk aktivasi dan sekresi IL-1 β . Tetapi pada tingkat mRNA tidak ditemukan produksi IL-1 β yang diinduksi *leukotoxin* sehingga tidak ada peningkatan protein IL-1 β ini. Mekanisme di balik fenomena ini tidak sepenuhnya dipahami. Dapat dilihat bahwa peran *leukotoxin* adalah di tingkat transkripsi, bukan di tingkat translasi. sehingga pada pada tingkat mRNA tidak ada peningkatan IL-1 β (Schindler, 1990). Makrofag yang terpapar *leukotoxin* menunjukkan peningkatan p38 terfosforilasi, tetapi aktivasi ini tidak berkorelasi dengan lisis sel atau aktivasi dan sekresi IL-1 β . Selain itu, kurangnya aktivasi NF- κ B, p65 (Ser536), I κ B α dan tingkat mRNA untuk IL-1 β dalam makrofag yang terpapar *leukotoxin* menunjukkan bahwa toksin tersebut terutama bertindak pada tingkat pasca-transkripsi. Temuan ini berbeda dengan jalur yang diinduksi LPS di mana aktivasi p38 terlibat dalam produksi IL-1 β . Selain itu, fosforilasi dan degradasi I κ B α yang diinduksi LPS memungkinkan translokasi NF- κ B ke nukleus, yang dapat menginduksi produksi sitokin pro-inflamasi, termasuk IL-1 β (Guha dan Mackman,

2001; Hsu dan Wen, 2002). *Adenosina Trifosfat* tidak hanya berfungsi sebagai penghasil energi, namun juga berperan dalam proses inflamasi. *Adenosina Trifosfat* dapat disekresikan oleh sel-sel apoptosis atau sel autofagi melalui hemikanal connexin (Cauwles *et al.*, 2014). Sebuah penelitian dari Kelk *et al.* (2011) menunjukkan bahwa piroptosis dihambat oleh ATP teroksidasi.

Pada pemeriksaan pembentukan kolagen, pada tikus normal tidak terlihat adanya pembentukan kolagen baru, karena pada tikus yang normal tidak terjadi lesi di jaringan periodontal. Artinya koalgen yang ada adalah kolagen lama. Pembentukan kolagen baru terlihat pada pewarnaan Trichrom Masson yang ditandai dengan serabut kolagen yang baru terbentuk akan terlihat berwarna lebih muda. Pada tikus dengan periodontitis terlihat adanya pembentukan kolagen, karena merupakan reaksi dari adanya lesi akibat periodontitis dan hal tersebut sesuai dengan pernyataan Nanci (2005) bahwa pada hari ke-3 setelah perlukaan sudah terbentuk serabut kolagen baru di area lesi. Pada tikus terapi, terlihat pembentukan kolagen yang meningkat, karena setelah perlakuan dengan pemberian Astaxanthin, kolagen akan terdeposisi secara berlanjut, cepat, dan diikuti dengan peningkatan tensile strength jaringan. Hal tersebut sesuai dengan teori Kiani *et al.* (2014) yang mengatakan bahwa peningkatan sintesis kolagen terus berlanjut hingga minggu ke-2 setelah terjadinya lesi. Pada hari ke 18 dilakukan pengamatan mikroskopis menunjukkan bahwa serabut kolagen terbentuk setelah perlukaan memiliki warna yang semakin pekat dan padat dengan pengecatan Trichrom Masson. Hal ini dapat disebabkan karena fibril-fibril kolagen yang terbentuk sebelumnya telah mengalami cross-linking ke bentuk yang lebih tebal sehingga terjadi peningkatan serabut kolagen dan sintesis kolagen mencapai puncak sekitar hari ke-14.

2. Pendekatan Prinsip Epistemologi

a. Membuktikan dan menganalisis pengaruh Astaxanthin terhadap nekrosis di jaringan periodontal pada tikus model periodontitis yang dipicu oleh bakteri.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa Astaxanthin berpengaruh secara signifikan terhadap penurunan nekrosis jaringan periodontal pada tikus Wistar jantan model periodontitis. Nekrosis adalah kematian sel yang disebabkan oleh kerusakan sel secara akut sehingga memicu respon inflamasi di jaringan sekitar, menarik leukosit serta fagosit sel-sel mati dengan fagositosis. Namun, zat-zat perusak mikroba yang difagosit oleh leukosit akan membuat kerusakan tambahan pada jaringan di sekitarnya (Rock dan Kenneth, 2008). Kerusakan tambahan yang berlebihan ini menghambat proses penyembuhan, sehingga nekrosis yang tidak ditangani akan menghasilkan timbunan jaringan dan debris sel mati yang membusuk pada atau dekat lokasi kematian sel. Astaxanthin bekerja sebagai antioksidan dengan cara mencari radikal bebas (ROS) dan menghambat pembentukannya dengan mendetoksifikasi peroksidasi lipid (H_2O_2) mitokondria melalui pengikatan O_2 . Selanjutnya akan terjadi penurunan xanthin oksidase dan NADP(H) oksidase dan peningkatan generasi O_2 , sehingga stress oksidatif pada keadaan periodontitis akan berkurang dan terjadi penurunan proses apoptosis dan nekrosis (Odeberg *et al.*, 2003), sehingga inflamasi yang ditimbulkan dapat diminimalkan, dan proses penyembuhan dapat berjalan dengan baik. Hasil penelitian di atas sesuai dengan penelitian Yuce *et al.* (2018) yang menyimpulkan bahwa Astaxanthin adalah antioksidan kuat dan memiliki potensi besar dalam mencegah penyakit yang terkait dengan stres oksidatif dan menemukan bahwa Astaxanthin meningkatkan aktivitas osteoblastik dan mengurangi aktivitas osteoklastik, sehingga mengurangi kehilangan tulang alveolar pada periodontitis. Hasil penelitian di atas juga sesuai dengan penelitian dari Mena (2009) yang mengungkapkan bahwa antioksidan merupakan terapi tambahan yang dapat meminimalkan efek samping dari terapi konvensional dan menghambat perkembangan penyakit yang ditandai dengan keadaan hiper-inflamasi.

b. Membuktikan dan menganalisis pengaruh Astaxanthin terhadap *Caspase-3* di jaringan periodontal pada tikus model periodontitis yang dipicu oleh bakteri.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa Astaxanthin tidak terbukti secara signifikan menurunkan ekspresi *Caspase-3* pada tikus Wistar jantan model periodontitis. Ada beberapa kemungkinan yang bisa menjadi penyebabnya. Kemungkinan tersebut dapat disebabkan karena kondisi periodontitis belum ke tahap yang parah, artinya apoptosis masih bisa menghadapi keadaan periodontitis tersebut sehingga pemberian Astaxanthin tidak berpengaruh secara signifikan terhadap keadaan apoptosis. Apoptosis pada umumnya berlangsung seumur hidup dan bersifat menguntungkan bagi tubuh. Hal tersebut sesuai dengan penelitian dari Dabiri *et al.* (2016) yang menunjukkan ada perubahan minimal dalam ekspresi apoptosis pada kelompok periodontitis dibandingkan dengan kelompok sehat selama interval waktu 3 bulan. Namun fragmentasi DNA dan protein apoptosis menunjukkan peningkatan yang signifikan sejalan dengan peningkatan keparahan periodontitis. Begitu juga dengan hasil penelitian Pradeep (2016) yang menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi *Caspase-3* pada cairan *crevicular* gingiva sejalan dengan perkembangan penyakit periodontal, yaitu peradangan gingiva, *probing depth*, dan *clinical attachment level*.

Penelitian yang dilakukan oleh Bantel *et al.* (2005); Abuhussein *et al.* (2013) menunjukkan bahwa apoptosis dan nekrosis memainkan peran penting dalam perkembangan proses inflamasi kronis dan berhubungan dengan kerusakan jaringan pada periodontitis. Beberapa apoptosis dapat ditemukan di gingiva yang sehat secara klinis, terutama di epitel *junctional*, yang memainkan peran dalam regulasi peradangan mukosa untuk pemeliharaan homeostasis, namun peningkatan apoptosis mungkin merupakan faktor penting dalam perkembangan periodontitis (Tonetti *et al.*, 2017; Jarnbring *et al.*, 2002).

Kemungkinan yang lain dapat disebabkan karena faktor dosis terapi yang diberikan kurang tinggi. Dosis harian pemberian Astaxanthin yang direkomendasikan antara 4-8 mg per hari. Penelitian menunjukkan pemberian

astaxanthin 4 mg per hari dapat meningkatkan sistem imunitas akibat efek antioksidan yang dimilikinya. Penelitian lainnya menunjukkan pemberian astaxanthin 6-8 mg per hari dapat menurunkan oksidasi kolesterol LDL. Penelitian yang dilakukan Satoh *et al.* (2009) terhadap toksisitas dan efikasi astaxanthin dengan memberikan astaxanthin dosis tunggal 4, 8 dan 12 mg selama 4 minggu terhadap 127 individu sehat, menemukan tidak terdapat efek samping pada semua kelompok subjek (Fasset dan Coombes, 2011; Satoh *et al.*, 2009). Apabila pemberian astaxanthin diberikan dengan dosis yang lebih tinggi dan dalam waktu yang lebih lama dari 11 hari, kemungkinan akan memberikan efek yang bermakna secara statistik. Kemanjuran terapi tergantung pada diagnosis yang benar dan pilihan obat yang tepat. Respons terapeutik dan efek samping terhadap suatu obat tergantung pada dosis. Terapi akan berhasil jika pemberian obat sesuai dengan rancangan dosis yang tepat. Namun rancangan dosis yang tepat tidak sama untuk setiap orang, karena pada keadaan tertentu akan menunjukkan adanya perubahan parameter farmakokinetika tertentu. Oleh karena itu dibutuhkan penyesuaian pemberian dosis yang tepat supaya efek terapeutik berhasil, dengan meminimalkan adanya efek samping yang tidak diinginkan (Shargel, 2005).

c. Membuktikan dan menganalisis pengaruh Astaxanthin terhadap gasdermin jaringan periodontal pada tikus model periodontitis yang dipicu oleh bakteri.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa Astaxanthin tidak terbukti secara signifikan menurunkan ekspresi gasdermin pada tikus Wistar jantan model periodontitis. Ada beberapa kemungkinan yang menyebabkan hal tersebut dapat terjadi. Kemungkinan tersebut dapat disebabkan karena kondisi periodontitis belum ke tahap yang parah, artinya piroptosis masih bisa menghadapi keadaan periodontitis tersebut sehingga pemberian Astaxanthin tidak berpengaruh secara signifikan terhadap keadaan piroptosis. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Cheng *et al.* (2018) yang menunjukkan bahwa *Caspase-1* dan piroptosis berkontribusi terhadap peradangan dan lesi apikal periodontitis serta tingkat

piroptosis sejalan dengan perkembangan periodontitis. Kemungkinan yang lain bisa disebabkan karena dosis terapi yang diberikan kurang tinggi. Apabila pemberian Astaxanthin diberikan dengan dosis yang lebih tinggi dan dalam waktu yang lebih lama dari 11 hari, kemungkinan akan memberikan efek yang bermakna secara statistik. Efek farmakologis dihasilkan setelah terjadinya interaksi antara molekul obat dengan reseptor. Keberhasilan suatu efek terapi tergantung pada pemilihan jenis obat dan dosis obat yang diberikan. Terapi obat dimaksudkan untuk menghasilkan respons farmakologis tertentu dengan intensitas dan durasi yang diinginkan dan juga menghindari reaksi obat yang merugikan. Hubungan antara dosis yang diberikan dan respons klinis menggunakan pendekatan farmakokinetik dan farmakodinamik yang umumnya didasarkan pada hubungan respons-konsentrasi plasma. Variasi profil farmakokinetik dan farmakodinamik pada tiap individu mengakibatkan pengaturan dalam pemberian dosis yang sesuai sulit untuk dilakukan. Farmakokinetik merupakan perjalanan obat mulai dari penyerapan, distribusi, metabolisme, dan ekskresi obat. Farmakokinetik klinis merupakan penerapan prinsip farmakokinetik untuk manajemen terapi obat yang efektif untuk pasien. Tujuan utama farmakokinetik klinis untuk meningkatkan kemanjuran dan mengurangi toksisitas obat. Farmakodinamik obat merupakan efek atau tindakan molekul, biokimia, dan fisiologi obat. Semua obat menghasilkan efek dengan berinteraksi dengan struktur biologis atau target pada tingkat molekuler untuk mendorong perubahan dalam bagaimana fungsi molekul target sehubungan dengan interaksi antar molekul berikutnya. Interaksi ini termasuk pengikatan reseptor, efek post-reseptor, dan interaksi kimia. Setelah interaksi target obat yang terjadi, maka akan dapat diukur dengan cara biokimia atau klinis (Shargel, 2005).

d. Membuktikan dan menganalisis pengaruh Astaxanthin terhadap NLRP3 di jaringan periodontal pada tikus model periodontitis yang dipicu oleh bakteri.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa Astaxanthin tidak terbukti secara signifikan menurunkan ekspresi NLRP3 pada tikus Wistar jantan model periodontitis. Ada beberapa kemungkinan yang menyebabkan hal tersebut dapat terjadi. Kemungkinan tersebut dapat disebabkan karena kondisi periodontitis belum ke tahap yang parah, artinya piroptosis masih bisa menghadapi keadaan periodontitis tersebut sehingga pemberian Astaxanthin tidak berpengaruh secara signifikan terhadap keadaan piroptosis. Seperti pada penelitian yang menunjukkan bahwa ROS hanya memberikan sinyal *priming* untuk *inflammasome* NLRP3 dan tidak kritis untuk aktivasinya (Bauernfeind *et al.*, 2011; Won *et al.*, 2015). Namun mekanisme terperinci dimana ROS memediasi aktivasi *inflammasome* dan piroptosis pada sumbu NLRP3-caspase-1-Gasdermin (GSDM D) belum sepenuhnya diketahui. Hal tersebut juga sesuai dengan penelitian Garcia *et al.* (2019) yang mengatakan bahwa tingkat ekspresi *inflammasome* NLRP3 pada pasien periodontitis dengan DM tipe 2 yang tidak terkontrol, yang menunjukkan periodontitis yang parah, lebih tinggi dibandingkan dengan pasien dengan periodontitis saja. Kemungkinan yang lain adalah dosis terapi yang diberikan kurang tinggi. Apabila pemberian Astaxanthin diberikan dengan dosis yang lebih tinggi dan dalam waktu yang lebih lama dari 11 hari, kemungkinan akan memberikan efek yang bermakna secara statistik. Suatu obat harus diserap oleh tubuh agar dapat diangkut ke jaringan target supaya menghasilkan efek farmakologis. Oleh karena itu penyerapan memainkan peran penting dalam menentukan apakah suatu obat menghasilkan efek klinis dan seberapa cepat hal tersebut terjadi. Tingkat dan sejauh mana obat diserap secara sistemik terkait dengan konsentrasi waktu-ke-puncaknya (*Tmax*) dan bioavailabilitas fraksional. Pada pemberian per oral, jumlah obat yang diserap ditentukan oleh bioavailabilitas. Pemberian obat secara oral biasanya mempunyai bioavailabilitas kurang dari 100% karena penyerapan yang tidak lengkap dan/atau proses eliminasi. Untuk mengatasi bioavailabilitas

yang kurang baik, maka dapat dilakukan dengan cara meningkatkan dosis yang diberikan, mengubah formulasi farmasi, atau menggunakan rute pemberian yang berbeda (Sim, 2014).

e. Membuktikan dan menganalisis pengaruh Astaxanthin terhadap pembentukan kolagen di jaringan periodontal pada tikus model periodontitis yang dipicu oleh bakteri.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa Astaxanthin meningkatkan secara signifikan pembentukan kolagen jaringan periodontal pada tikus Wistar jantan model periodontitis. Hal tersebut sesuai dengan penelitian yang menyebutkan bahwa Astaxanthin sebagai antioksidan mampu menetralkan radikal bebas dan oksidan secara baik dengan menerima atau menyumbangkan elektron tanpa menjadi pro-oksidan (Kidd, 2011). Ketika antioksidan menetralkan radikal bebas, terjadi perlindungan terhadap kerusakan dan juga dapat membantu memperbaiki jaringan kolagen (Tweed, 2011). Astaxanthin mempunyai kekuatan 550 kali lebih kuat dibandingkan vitamin E dan 40 kali lebih kuat dibandingkan dengan β -karoten sebagai pendingin oksigen singlet, dan mempunyai peran pada membran sel karena kemampuannya untuk mencegah peroksidasi lipid 1000 kali lebih kuat dibandingkan vitamin E. Dalam ini dapat menunjukkan bahwa Astaxanthin mempunyai manfaat sebagai antioksidan, antiinflamasi dan sifat immuno (Tjokroprawiro, 2008).

Pada penelitian ini, perbaikan jaringan periodontal terjadi setelah pemberian Astaxanthin selama 11 hari. Pada proses penyembuhan luka pada hari ke-11, terjadi fase proliferasi yaitu fase dimana terdapat proliferasi sel fibroblas yang selanjutnya akan membentuk serabut kolagen jaringan ikat (Anindjayati *et al.*, 2013). Fase tersebut akan berlangsung mulai hari ke-5 sampai hari ke-21 setelah ada cedera atau luka. Fibroblas akan berpindah ke daerah luka setelah terjadi 24 jam munculnya cedera atau luka. Fibroblas akan mensintesis kolagen dan substansi dasar kira kira 5 hari setelah terjadi cedera. Kolagen merupakan substansi protein yang akan mempertautkan permukaan luka. Kolagen yang semakin meningkat akan memperkecil adanya luka yang terbuka. Fibroblas akan

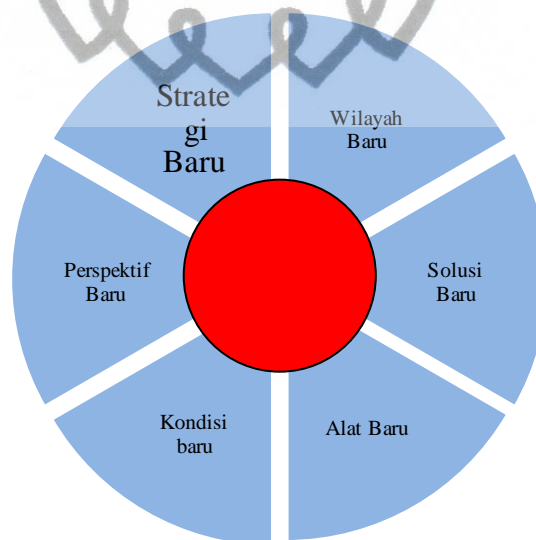
berpindah ke jaringan luka dengan membawa benang fibrin dan jaringan granulasi yang lunak serta mudah pecah. Fase proliferasi bertujuan untuk membangun keseimbangan antara pembentukan jaringan parut dan regenerasi jaringan (Landén *et al.*, 2016; Gutner, 2007).

3. Pendekatan Prinsip *Axiology*

Berdasarkan prinsip *axiology*, secara keseluruhan manfaat hasil penelitian ini adalah pemberian Astaxanthin dapat memperbaiki keadaan jaringan periodontal pada tikus Wistar jantan model periodontitis. Astaxanthin dapat digunakan sebagai terapi tambahan, untuk meminimalkan efek samping dari terapi konvensional dan mengurangi perkembangan penyakit. Hasil penelitian ini lebih mendukung protokol pemberian Astaxanthin untuk terapi tambahan pada penyakit periodontitis

4. Nilai Kebaruan Penelitian

Nilai-nilai kebaruan suatu penelitian meliputi berbagai aspek, yang secara lengkap disajikan pada Gambar 5.11



Gambar 5.11 Aspek Nilai-nilai Kebaruan (Bambang, 2010)

Nilai-nilai kebaruan dari penelitian ini adalah:

a. **Solusi baru.**

Kerangka konsep dan hasil penelitian ini merupakan solusi baru dengan pemberian Astaxanthin pada penyakit periodontitis. Penurunan derajat aktivitas nekrosis ini dapat menurunkan mortalitas dan morbiditas penyakit periodontitis dan memperbaiki prognosis penyakit periodontitis.

b. **Strategi baru.**

Hasil penelitian ini memberikan suatu informasi dan dilanjutkan protokol baru bahwa Astaxanthin dapat digunakan sebagai terapi tambahan pada penyakit periodontitis, sehingga meminimalkan efek samping dari terapi konvensional dan menghambat perkembangan penyakit.

c. **Perspektif baru.**

Hasil penelitian ini dapat dikembangkan lebih lanjut dengan penelitian lanjutan dalam usaha mengurangi ataupun mengontrol progresivitas periodontitis berdasarkan patogenesis biomolekuler periodontitis.

d. **Kondisi baru.**

Hasil penelitian ini menginformasikan kondisi penderita menjadi lebih baik, bila dalam terapi tambahan penyakit periodontitis menggunakan Astaxanthin sehingga progresivitas dan kualitas hidup penderita menjadi lebih baik.

5. Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini masih ada keterbatasannya, yaitu

- a. Penelitian ini masih dilakukan dengan pemberian Astaxanthin *single dose* saja, sehingga efektivitas pemberian Astaxanthin belum maksimal.
- b. Penelitian ini masih dilakukan dengan pemberian Astaxanthin oral, belum digunakan Astaxanthin topikal atau Astaxanthin *mouth wash*.
- c. Penelitian ini masih dilakukan dengan pemberian Astaxanthin saja, sehingga belum diketahui pada pemberian antioksidan yang lain.
- d. Penelitian ini hanya meneliti 5 variabel saja, sehingga hasilnya belum maksimal.

- e. Penelitian ini masih dilakukan pada tikus jantan dewasa saja, sehingga hasilnya belum maksimal.
- f. Penelitian ini hanya menggunakan metode penelitian pemeriksaan histologi dan imunohistokimia, sehingga hasilnya belum maksimal.

