

LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PDUPT)



**MEKANISME IMMUNOMODUSI, ANTIOKSIDAN DAN HAMBATAN KONDUKSI NYERI APLIKASI TOPIKAL *EPIGALLOCATECHIN-3-GALLATE* PADA KAVITAS GIGI TIKUS MODEL PULPITIS AKUT
(KAJIAN RESPONS IMMUNONEUROPATHOLOGI TERHADAP EKSPRESI TLR4, TNF- α , IL-10, SOD, MDA, TRPV1 DAN CGRP JARINGAN PULPA GIGI)**

TAHUN KE I DARI RENCANA 3 (TIGA) TAHUN

Dr. KUN ISMIYATIN, drg.MKes, SpKG(K)	0002046001)
Prof. Dr. ADIORO SOETOJO, drg.MS, SpKG(K)	0010085102)
Dr. RETNO PUDJI RAHAYU, drg. MS	0014115906)

DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018

UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018

LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PDUPT)



KFA
KK
UP.39/19
ISM
M

MEKANISME IMMUNOMODUSI, ANTIOKSIDAN DAN HAMBATAN KONDUKSI
NYERI APLIKASI TOPIKAL *EPIGALLOCATECHIN-3-GALLATE* PADA KAVITAS
GIGI TIKUS MODEL PULPITIS AKUT
(KAJIAN RESPONS IMMUNONEUROPATHOLOGI TERHADAP EKSPRESI
TLR4, TNF- α , IL-10, SOD, MDA, TRPV1 DAN CGRP JARINGAN PULPA GIGI)

TAHUN KE I DARI RENCANA 3 (TIGA) TAHUN

Dr. KUN ISMIYATIN, drg.MKes, SpKG(K)	0002046001
Prof. Dr. ADIORO SOETOJO, drg.MS, SpKG(K)	0010085102
Dr. RETNO PUDJI RAHAYU, drg. MS	0014115906

DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018

UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : MEKANISME IMMUNOMODUSI, ANTIOKSIDAN DAN HAMBATAN KONDUKSI NYERI APLIKASI TOPIKAL EPIGALLOCATECHIN-3-GALLATE PADA KAVITAS GIGI TIKUS MODEL PULPITIS AKUT

Peneliti/Pelaksana

Nama Lengkap : Dr KUN ISMIYATIN, S.KG, M.Kes
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
 NIDN : 0002046001
 Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
 Program Studi : Kedokteran Gigi
 Nomor HP : 085733205778
 Alamat surel (e-mail) : kun-is@fkg.unair.ac.id

Anggota (1)

Nama Lengkap : Dr. drg ADIORO SOETOJO S.KG, Sp.K.G, M.S
 NIDN : 0010085102
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Anggota (2)

Nama Lengkap : Dr A RETNO PUDJI RAHAYU S.KG, M.Kes
 NIDN : 0014115906
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Institusi Mitra (jika ada)

Nama Institusi Mitra : -
 Alamat : -
 Penanggung Jawab : -
 Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 3 tahun
 Biaya Tahun Berjalan : Rp 100,000,000
 Biaya Keseluruhan : Rp 480,000,000

Mengetahui,
 Dekan HKG Unair



(Dr. Heri Purnobasuki, drg.Mkes)
 NIP/NIK 1967050719910210

Kota Surabaya, 8 - 11 - 2018
 Ketua,

(Dr KUN ISMIYATIN, S.KG, M.Kes)
 NIP/NIK 196004021986012001

Menyetujui,
 Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi UNAIR



(Prof.H Heri Purnobasuki, Drs.M.Si.PhD)
 NIP/NIK 1967050719910210



RINGKASAN

Latar belakang : Pulpitis akut terjadi segera, dini, berlangsung singkat (dalam waktu menit hingga 48 jam), kerusakan terbatas pada tempat jejas (Chandra *and* Gopikkrishna, 2014). Secara immunopatologis, pulpitis akut melibatkan sel makrofag jaringan pulpa gigi yang berperan pada respons imun *innate*. Salah satu penyebab pulpitis akut adalah Lipopolisakarida (LPS) yang bersifat imunogenik dan virulensinya tinggi (Chung *et al.*, 2011; Mileer *et al.*, 2006). LPS mengaktivasi sel makrofag melalui *Toll like receptor 4* (TLR4) dan *Cluster of differentiation 14* (CD14) (Mc.Dermot *and* O'Neill, 2004; Mileer *et al.*, 2006; Fitzgerald *et al.*, 2004). Menurut Chang *et al.*, (2005), peningkatan ekspresi TLR4, dimulai pada satu jam setelah stimulasi LPS, meningkat pada 6 jam, dan mencapai puncak pada 24 jam. Hasil penelitian Ji *et al.*,(2015), membuktikan bahwa hari pertama pulpitis, terjadi peningkatan sel inflamasi, dan setelah hari ke 1-3 dapat terjadi perdarahan, dan pada hari ke-5, hampir semua jaringan dapat mengalami nekrotik.

Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) dapat berasal dari teh hijau, memiliki lebih dari satu gugus fenol (polifenol) dengan inti flavon sehingga menunjang aktivitas *scavenging* terhadap radikal bebas (Kurogi *et al.*, 2011). Menurut Kim *et al.*,(2009); Zhang *et al.*, (2013), EGCG dapat berperan sebagai anti inflamasi, antibakteri, anti nyeri serta antioksidan oleh karena kandungan gallo (OH), katekin/tanin (COH), gallat/asam karboksilat (COOH) dan flavanoid. Menurut Carmenet *et al.*, (2006), serta Dickinson (2014), EGCG dapat menyebabkan peningkatan ekspresi SOD dan katalase. Menurut Kurogi *et al.*, (2011), SOD, katalase, meredam radikal bebas dan mencegah terbentuknya radikal bebas baru. Hambatan EGCG terhadap proses inflamasi dimulai pada 1-2 jam pemaparan (Xiu-zu *et al.*,2006). Berdasarkan hal diatas maka dalam penelitian ini dikaji mekanisme immunomodulasi, antioksidan dan hambatan konduksi nyeri aplikasi EGCG topikal pada kavitas gigi tikus model pulpitis akut terhadap ekspresi TNF- α , IL-10, SOD, MDA, TRPV1 dan CGRP dari jaringan pulpa gigi.

Tujuan Penelitian :

Tahun II :

Penelitian tahun kedua direncanakan untuk membuktikan potensi EGCG hidrogel topikal dengan menggunakan konsentrasi yang berperan dari hasil penelitian tahun pertama sebagai immunomodulator, antioksidan dan hambatan konduksi nyeri pada tikus model pulpitis akut akibat aplikasi LPS 6 jam, dan kurun waktu aplikasi EGCG lebih dari 2 kali aplikasi. Dilakukan penelitian ekspresi TLR4, TNF- α , IL-10, SOD, MDA, PG-E2, TRPV1, CGRP, proliferasi sel fibroblast, dan angiogenesis.

Tahun III :

Penelitian tahun ketiga direncanakan untuk menentukan dosis optimum dan kurun waktu aplikasi EGCG hidrogel topikal yang berperan sebagai immunomodulator, antioksidan dan hambatan konduksi nyeri pada tikus model pulpitis akut 6 jam. Penelitian tentang ekspresi TLR4, TNF- α , IL-10, SOD, MDA, PG-E2, TRPV1, CGRP, *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) dan *Fibroblast Growth factor* (FGF) yang terkait dengan *angiogenesis* yang dapat terjadi setelah 7 hari, untuk mengetahui adanya perbaikan jaringan.

Urgensi Penelitian

Pada Profil Kesehatan Indonesia 2010, pengobatan pulpa gigi menduduki peringkat yang tertinggi dibanding perawatan gigi lainnya. Data tersebut membuktikan bahwa penyakit pulpa

1. Merupakan penyakit gigi dan mulut yang utama dan terbanyak diderita oleh masyarakat Indonesia (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2011). Data dari Ram *et al.*, (2009), stimulasi nyeri pada regio *orofacial*, sebesar 45% disebabkan pulpitis akut. Hasil penelitian Ji *et al.*, (2015), membuktikan hari pertama pulpitis, terjadi peningkatan sel inflamasi, dan setelah hari ke 1-3 dapat terjadi perdarahan, dan pada hari ke-5, hampir semua jaringan dapat mengalami nekrotik. Proses peningkatan inflamasi dan kematian jaringan pulpa berlangsung cepat, sehingga perlu penanganan secara dini untuk menghambat peningkatan inflamasi, nyeri, mencegah nekrosis pulpa dan kelainan periapikal.
2. Penatalaksanaan pulpitis akut sejak tahun 1905 sampai sekarang, salah satunya menggunakan eugenol topikal. Struktur kimia eugenol memiliki inti benzen dan satu gugus fenol, maka kemampuannya terbatas dalam menangkap radikal bebas (Guinette *et al.*, 2007). Penelitian Park *et al.*, (2010), membuktikan kemampuan eugenol untuk meredakan nyeri berlangsung selama ± 30 menit. Menurut Kim *et al.*, (2003), eugenol bekerja menghambat *cyclooxygenase-2* (COX2). Eugenol memiliki efek yang merugikan antara lain menyebabkan peningkatan inflamasi, memperlambat penyembuhan, dan pada 2 bulan kemudian dapat berlanjut menjadi nekrosis pulpa (Sarrami *et al.*, 2002; Barceloux, 2008). Eugenol memiliki rasa pedas, panas, bau, menyebabkan iritasi lokal, ulser, dan eritema (Sarrami *et al.*, 2002). Perlu dikembangkan bahan alami yang bersifat antiinflamasi, antioksidan dan anti nyeri terhadap inflamasi pulpa gigi dan untuk meningkatkan keberhasilan perawatan nyeri gigi dan mempertahankan vitalitas pulpa gigi.

PRAKATA

Segala puji dan syukur peneliti panjatkan ke hadirat Tuhan YME, atas segala rahmat dan karuniaNya, sehingga peneliti dapat menyelesaikan penelitian ini dengan harapan dapat memberikan sumbangan pengetahuan tentang aplikasi EGCG topikal sebagai immunomodulator, antioksidan dan menghambat konduksi nyeri sehingga dapat memodulasi dan meredakan nyeri pada inflamasi pulpa gigi akut yang berbasis natural yang ramah lingkungan sehingga dinyeri gigi. Penelitian ini juga ditujukan untuk menekan angka ketergantungan terhadap produk impor dalam pelayanan kesehatan gigi sehingga dapat menekan biaya pelayanan kesehatan gigi. Harapannya masyarakat Indonesia mendapatkan pelayanan kesehatan gigi dengan biaya yang lebih terjangkau.

Selama menyelesaikan penelitian ini, peneliti telah banyak memperoleh bimbingan, pengarahan dan bantuan, baik berupa ilmu pengetahuan maupun dukungan moril dari pemerintah Republik Indonesia melalui pemberian dana hibah PDUPT. Dalam kesempatan ini, peneliti ingin menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar besarnya kepada :

1. Bapak Ir. Joko Widodo selaku Presiden Republik Indonesia
2. Prof. H. Mohamad Nasir, Ph.D., Ak sebagai Menteri di Kementerian Riset Teknologi Dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia yang telah memberi kesempatan kepada peneliti dalam menyelesaikan penelitian ini
3. Prof. Dr. Mohammad Nasih, SE., Mt., Ak., CMA sebagai Rektor Universitas Airlangga yang telah memberi kesempatan kepada peneliti untuk berkarya.
4. Prof. Hery Purnobasuki, Drs.,MSi., PhD, sebagai Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi, Universitas Airlangga yang bertindak dan atas nama Universitas Airlangga.
5. Dr. R. Darmawan Setijanto, drg., M.Kes., sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, beserta Wakil Dekan yang telah memberi kesempatan kepada saya untuk melakukan penelitian dan menyelesaikan penelitian ini.
6. Dr. Ira Widjiastuti, drg., MKes., SpKG (K), sebagai Ketua Departemen Konservasi Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, yang telah memberi kesempatan kepada saya untuk melakukan hingga menyelesaikan penelitian ini.

Peneliti menyadari bahwa penelitian ini masih banyak kekurangannya, namun mudah-mudahan penelitian ini bermanfaat bagi masyarakat Indonesia.

Surabaya, 10 November 2018

Tim Peneliti :

Dr. Kun Ismiyatin, drg.MKes, SpKG(K)
 Prof. Dr. Adioro Soetojo, drg.MS, SpKG(K)
 Dr. Retno Pudji Rahayu, drg. MS

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL

HALAMAN PENGESAHAN i

RINGKASAN ii

PRAKATA iv

DAFTAR ISI v

BAB 1. PENDAHULUAN 1

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA 4

 2.1. Pulpitis Akut 4

 2.2. Khasiat *Epigallocatechin-3-Gallate* (EGCG) Teh Hijau terhadap
 Respons Imun 5

BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN 7

BAB 4. METODE PENELITIAN 9

 4.1. Desain penelitian 9

 4.2. Unit eksperimen 9

 4.3. Replikasi 9

 4.4. Bahan dan Alat Penelitian 9

 4.5. Alat Penelitian 9

 4.6. Cara Kerja 9

 4.6.1. Prosedur LPS 9

 4.6.2. Prosedur aplikasi EGCG 10

BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI 12

 5.1. Hasil 12

 5.1.1 Analisis ekspresi protein TLR4, TNF- α , IL-10, SOD, MDA
 sel makrofag pulpa gigi 13

 5.1.2 Analisis ekspresi protein TRPV1, dan CGRP sel aferen pulpa gigi 13

BAB 6. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA 15

BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN 16

DAFTAR PUSTAKA 18

LAMPIRAN 20



BAB 1 : PENDAHULUAN

Inflamasi pulpa gigi merupakan penyakit infeksi yang melibatkan pulpa gigi, merupakan respons protektif jaringan pulpa untuk mengembalikan pulpa pada kondisi perbaikan apabila jaringan pulpa berhasil mempertahankan homeostasis dari pengaruh luar yang merugikan. Namun inflamasi dapat berlanjut menjadi kronis, apoptosis, piroptosis atau nekrosis bila iritan tidak dapat dieliminasi (Grossman *et al.*, 2014; Robbins dan Cotran, 2010).

Pada Profil Kesehatan Indonesia 2010, pengobatan pulpa gigi menduduki peringkat yang tertinggi dibanding perawatan gigi lainnya, berarti penyakit pulpa merupakan penyakit gigi dan mulut yang utama dan terbanyak diderita oleh masyarakat di Indonesia (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2011). Tahap awal inflamasi jaringan pulpa merupakan respons fase akut yang terjadi segera, dini, berlangsung singkat (dalam waktu menit hingga 48 jam), kerusakan terbatas pada tempat jejas, dan disertai gambaran klinis yang akut (Chandra *and* Gopikrishna, 2014). Pulpitis akut terjadi perubahan vaskuler, vasodilatasi pembuluh darah yang memfasilitasi makrofag bergerak menuju ketempat inflamasi, agar terjadi eliminasi komponen yang mengiritasi (Pääkkonen, 2009).

Secara immunopatologis, pulpitis akut melibatkan sel makrofag jaringan pulpa gigi yang berperan pada respons imun *innate*. Proses peningkatan inflamasi dan kematian jaringan pulpa berlangsung cepat, sehingga perlu penanganan secara dini untuk menghambat peningkatan inflamasi, nyeri, mencegah nekrosis pulpa dan kelainan periapikal, sehingga dapat mencegah perawatan saluran akar.

Salah satu penyebab terjadinya pulpitis akut adalah Lipopolisakarida (LPS) (Chung *et al.*, 2011). LPS mengaktivasi sel makrofag melalui *Toll like receptor 4* (TLR4) sehingga menyebabkan transkripsi gen *Tumor Nekrosis Faktor- α* (TNF- α) (Ghosh, 2007; Zhan *et al.*, 2007). Menurut Chang *et al.*, (2005), peningkatan ekspresi TLR4, dimulai pada satu jam setelah stimulasi LPS, meningkat pada 6 jam, dan mencapai puncak pada 24 jam. Hasil penelitian Ji *et al.*, (2015), membuktikan bahwa hari pertama pulpitis, terjadi peningkatan sel inflamasi, dan setelah hari ke 1-3 dapat terjadi perdarahan, dan pada hari ke-5, hampir semua jaringan dapat mengalami nekrotik, terjadi peningkatan ekspresi TLR4 dan TNF- α , pada 6 jam setelah induksi LPS, dan mencapai puncak pada 24 jam. Stimulasi TNF- α juga memicu produksi radikal bebas intraseluler yang berlebihan, sehingga dapat menyebabkan reaksi berantai dan menghasilkan senyawa radikal bebas baru dalam jumlah besar yang bersifat toksik. Proses metabolisme sel memicu produksi *reactive oxygen species* (ROS) intraseluler yang bersifat radikal antara lain hidrogen peroksida (H₂O₂), radikal superoksida (O₂^{*}), radikal

hidroksil (OH^\bullet) (Burdan *et al.*, 2006). Radikal bebas yang terbentuk dalam jumlah yang berlebihan akan memicu stres oksidatif (Finkel and Holbrook, 2000; Banerjee *et al.*, 2008), dan memicu peningkatan inflamasi (Pantano *et al.*, 2006). Stres oksidatif adalah ketidakseimbangan antara pembentukan radikal bebas dan ROS dengan sistem pertahanan antioksidan endogen (Vermerris and Nicholson, 2006; Banerjee *et al.*, 2008). Tingginya stress oksidatif ditunjukkan dengan rendahnya status antioksidan seluler, didukung oleh tingginya produk peroksidasi lipid. Penumpukan ROS akan merusak *poly unsaturated lipid* A(PUFA) melalui oksidasi lipid membran, menghasilkan senyawa karbonil Malondialdehid (MDA) yang merupakan marker kerusakan dinding sel (Lin *et al.*, 2002; Banerjee *et al.*, 2008; Porth *et al.*, 2009). Namun ROS berperan di dalam mediasi proses sinyal dari sel penghasil informasi ke-sel sasaran, merupakan pertahanan penting terhadap serangan mikroorganisme, tetapi juga dapat merusak jaringan sekitarnya (Vaziri, 2004).

Sistem imun berperan pada mekanisme patofisiologi pulpitis akut, dan sampai saat ini modulasi respons imun menarik untuk diteliti. Sitokin berperan pada homeostasis untuk mempersiapkan perbaikan jaringan, menghentikan kerusakan dan untuk pemulihan jaringan (Abbas *et al.*, 2014). Namun respons imun pulpa bersifat spesifik, karena jaringan pulpa berada di dalam ruang pulpa yang dibatasi dinding yang keras, suplai darah melalui foramen apical yang sempit, sehingga adaptasi dan suplai darah terbatas, akibatnya respons imun dapat kurang adekuat dalam mengkompensasi inflamasi dan nyeri (Chandra and Gopikrishna, 2014).

Keseimbangan antara antioksidan eksogen dan endogen dapat memperbaiki kondisi stress oksidatif. Penelitian Marinho *et al.*, (2014), membuktikan bahwa proses metabolisme sel akan mengaktifkan antioksidan endogen seperti *superoxide dismutase* (SOD) dan katalase. Peningkatan SOD akan mengkatalisis $2\text{O}_2^\bullet + 2\text{H}^+$ menjadi H_2O_2 dan O_2 . Peningkatan katalase akan mengkatalisis H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 (Abbas *et al.*, 2014; Wong *et al.*, 2008). Radikal superoksida (O_2^\bullet) yang dapat diredam, akan mempertahankan keseimbangan redoks jaringan, meregulasi sinyaling molekuler, sehingga terjadi keseimbangan proses fisiologis (Nies and Simon, 2007).

Penelitian tentang *Epigallocatechin-3-gallate* (EGCG) teh hijau telah banyak dilakukan oleh karena EGCG memiliki lebih dari satu gugus fenol (polifenol) dengan inti flavon yang menunjang aktivitas *scavenging* terhadap radikal bebas (Banerjee *et al.*, 2008; Kurogi *et al.*, 2011). Menurut Barceloux, (2008); Banerjee *et al.*, (2008); Kim *et al.*, (2009); Zhang *et al.*, (2013), EGCG dapat berperan sebagai anti inflamasi, antibakteri, anti nyeri serta antioksidan oleh karena kandungan gallo (OH), katekin/tanin (COH), gallat/asam karboksilat

(COOH) dan flavanoid. EGCG bersifat non polar, sehingga mudah masuk sitoplasma dan inti sel melalui saluran pori protein pada membran sel secara difusi sederhana (Guyton *and* Hall; 2011). Disamping itu, flavanoid dari EGCG dapat terikat pada reseptor laminin 67-kDa (LR), yang merupakan reseptor membran sel makrofag (Kim *et al.*, 2014; Ren *et al.*, 2014). Menurut Carmen *et al.*, (2006), serta Dickinson (2014), masuknya EGCG kedalam sel, dapat menyebabkan peningkatan ekspresi SOD dan katalase. Menurut Banerjee *et al.*, (2008); Kurogi *et al.*, (2011), SOD, katalase dan GPx dapat meredam radikal bebas dan mencegah terbentuknya radikal bebas baru. Hambatan EGCG terhadap proses inflamasi dimulai pada 1-2 jam pemaparan (Xiu-zu *et al.*, 2006). Hasil penelitian Altavilla *et al.*, (2009); Ishida *et al.*, (2007); Zhang *et al.*, (2013), polifenol dapat menghambat aktivitas radikal bebas, sehingga menghambat peroksidasi lipid membran, menghambat pelepasan TNF- α .

Dari hasil penelitian terdahulu dapat digunakan sebagai landasan untuk melakukan penelitian dengan menggunakan EGCG topikal pada kavitas gigi, tetapi sampai saat ini fungsi biologis EGCG topikal pada pulpitis akut belum diungkapkan. Berdasarkan hal diatas maka dalam penelitian ini dikaji pengaruh aplikasi EGCG topikal pada kavitas gigi dari gigi tikus model pulpitis akut terhadap ekspresi TLR4, TNF- α , IL-10, SOD, MDA, TRPV1, dan CGRP dari jaringan pulpa gigi.

Konsentrasi EGCG yang digunakan adalah 25 ppm dan 75 ppm berdasarkan penelitian pendahuluan yang belum dipublikasi. Penentuan waktu pemberian EGCG pada 6 jam setelah stimulasi LPS berdasarkan penelitian Ji *et al.*, (2015), dan Chang *et al.*, (2005), yang mengatakan pada pulpitis akut terjadi pada 6 jam setelah induksi LPS. Menurut Yang *et al.*, (2010), fase ini adalah fase yang paling sensitif untuk pemberian anti inflamasi, oleh karena dapat memediasi inhibisi mediator inflamasi.

Target yang akan dicapai dalam penelitian ini membuktikan bahwa aplikasi EGCG dari the hijau secara topikal dapat memodulasi inflamasi, antioksidan, mengaktivasi antioksidan endogen, menghambat konduksi nyeri (secara *invivo*) pada pulpitis akut dengan parameter dari ekspresi TLR4, TNF- α , IL-10, SOD, MDA, TRPV1 dan CGRP jaringan pulpa gigi.

BAB 2 : TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Pulpitis Akut

Pada karies yang dalam dan adanya inflamasi pulpa ditemukan bakteri gram negatif seperti *Fusobacterium*, *Porphyromonas endodontalis* (Pe), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *E.coli*, *Prevotella intermedia* (Bergenholtz, 2003; Ercan *et al.*, 2006). Pada proses inflamasi akut, terjadi aktivasi makrofag jaringan (Robbins dan Cotran, 2010; Lundy dan Linden, 2004). Inflamasi pulpa gigi merupakan respons protektif jaringan pulpa untuk mengembalikan pulpa pada kondisi perbaikan apabila jaringan pulpa berhasil mempertahankan homeostasis dari pengaruh luar yang merugikan, dan inflamasi akan berlanjut bila iritan tidak dapat dieliminasi (Avery *et al.*, 2000; Robbins dan Cotran, 2010; Abbas *et al.*, 2010).

Stimulus LPS dari *E.coli* akan menyebabkan respons pulpitis akut oleh karena LPS dapat terikat dengan TLR4 pada makrofag, sehingga melepaskan TNF- α (Mc.Dermot and O'Neill, 2004; Mileer *et al.*, 2006; Fitzgerald *et al.*, 2004). Induksi LPS pada pulpa gigi, menyebabkan inflamasi pulpa fase akut, dan 1 jam setelah induksi menyebabkan ekspresi COX2 (Chang *et al.*, 2003). Stimulasi TLR4 menginisiasi hantaran sinyal yang mengaktifasi *I kappa B kinase* (IKK), sehingga *Nuclear Factor-kappa-B* (NF- κ B) translokasi ke inti sel dan menyebabkan transkripsi gen TNF- α (Ghosh, 2007; Zhanet *al.*, 2007). Stimulasi TNF- α memicu produksi ROS intraseluler yang berlebihan, seperti hidrogen peroksida (H_2O_2), radikal superoksida (O_2^*) dan radikal hidroksil (OH^*). yang dapat menyebabkan reaksi berantai dan menghasilkan senyawa radikal bebas baru dalam jumlah besar dan bersifat toksik sehingga menyebabkan kerusakan sel (Yang *et al.*, (2010) dan Wong *et al.*, (2008). Penumpukan ROS akan merusak *poly unsaturated fatty acid* (PUFA) melalui peroksidasi lipid membran, menghasilkan senyawa karbonil seperti malondialdehid (MDA) dan asam arakidonat (AA) (Porth *et al.*, 2009). TNF- α mengaktifasi TNFR sel makrofag, sehingga menyebabkan amplifikasi untuk mengekspresikan TNF- α terus menerus, meningkatkan produksi ROS, sehingga memperparah peradangan, nyeri serta kerusakan sel (Vardeh *et al.*, 2009).

Jaringan pulpa memiliki kemampuan untuk melakukan reaksi pertahanan, mempertahankan homeostasis atau mengeliminasi iritan, sehingga pulpa dapat mengalami perbaikan (pulpitis reversibel), tetapi bila berlanjut, maka inflamasi menjadi kronis atau kematian pulpa (Baumgartner *et al.*, 2002; Chandra and Gopikrishna, 2014). Respons imun pada pulpitis bersifat spesifik, karena jaringan pulpa terletak di dalam ruang pulpa yang dibatasi dentin, sehingga eksudat radang sulit mendapatkan ruangan, drainase melalui foramen apikal terbatas, karena foramen apikal sempit, dan pembuluh darah masuk ke pulpa

melalui foramen apikal, sehingga bila terjadi inflamasi, sirkulasi darah terbatas, efek protektif respon imunologik terbatas. Tekanan di dalam pulpa akan menekan vena, sehingga sebagian vena mengalami kolaps lokal, menghalangi aliran darah arteri, menekan saraf dan jaringan sekitarnya, sehingga menimbulkan nyeri, hipoksia, dan anoksia jaringan, akibatnya pulpa dapat mengalami nekrosis (Hahn *and* Liewhr, 2007; Paakkonen, 2009; Chandra *and* Gopikrishna, 2014). Penyakit pulpitis dapat dikategorikan berdasarkan waktu terjadinya inflamasi yaitu pulpitis akut, terjadi beberapa jam sampai \pm 48-72 jam setelah stimulasi, menjelang hari ke-4, inflamasi dapat berhenti atau berlanjut menjadi kronis atau nekrosis (Chung *et al.*, 2011).

Induksi LPS menghasilkan IL-10 dari sel makrofag, ditentukan oleh aktivasi ERK 1 MAPK, mengaktivasi gen IL-10, dan mengekspresikan IL-10 yang merupakan sitokin anti-inflamatori yang berfungsi sebagai imunoregulator untuk mengendalikan inflamasi dengan cara menghambat ekspresi sitokin pro-inflamatori, kemokin, dan molekul adesi (Asadulah *et al.*, 2003).

2.2 Khasiat *Epigallocatechin-3-Gallate* (EGCG) Teh Hijau Terhadap Respons Imun

Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) dapat diekstrak dari teh hijau. Teh hijau dapat berasal dari Indonesia. Komponen aktif EGCG berasal dari katekin yang mengikat OH menjadi gallo, mengandung 3 gugus OH, dan mengikat gallat yang berasal dari gugus karboksilat (asam karboksilat/(COOH), inti flavon yang merupakan gabungan inti siklik dan inti aromatis/cincin benzena, 3 inti benzena, 1 inti siklik, dan 8 gugus OH. Gugusan OH yang banyak akan mendorong elektron ke cincin benzena semakin banyak, dan ikatan rangkap terkonjugasi, terjadi resonansi yang lebih besar karena didapatkan 3 cincin benzene, ikatan rangkap berfungsi mengendalikan elektron sehingga yang teroksidasi hanya gugus fenol (Kurogi *et al.*, 2011). Kandungan gugus fenol dari EGCG yang lebih dari satu menyebabkan degradasi fenol terjadi secara bertahap, dan hasil akhirnya adalah karbon dioksida(CO₂), dan air, sehingga tidak terjadi radikal oksidan lagi (Kurogi *et al.*, 2011; Banerjee, 2008).

Radikal bebas yang bermuatan negatif ditangkap cincin benzena, sehingga tidak terjadi radikal oksidan lagi (Barceloux, 2008; Singh *et al.*, 2011). EGCG merupakan sumber antioksidan yang paling potensial dalam menangkal radikal bebas sehingga sel terlindungi, bersifat anti inflamasi dan anti bakteri (Banerjee *et al.*, 2008; Jeong dan Kong, 2004; Barceloux, 2008). Hasil penelitian Zhang *et al.*,(2013), konsentrasi EGCG 1 μ M menghambat ROS, menghambat aktivitas COX₂ sehingga oksidasi AA terhambat, akibatnya sekresi PG-E₂ menurun. Menurut Altavilla *et al.*, (2009), polifenol menghambat putusnya

ikatan pada proses peroksidasi membran sel. Penelitian Magalhaes *et al.*, (2010), membuktikan bahwa polifenol bersifat antioksidan dengan menghambat aktivasi NF- κ B, dan memblok COX₂ (Magalhaes *et al.*, 2010). Injeksi EGCG intratekalmemblok TLR4, NF- κ B, TNF- α , IL-1 β , dan meningkatkan IL-10 (Kuang *et al.*, 2012). Menurut penelitian Hirao *et al.*, (2010), katekin dapat menurunkan inflamasi melalui hambatan NF- κ B *human dental pulp fibroblast* (HDPF). EGCG dapat menghambat produksi mediator noksius melalui jalur transduksi sinyal iKK/NF- κ B yaitu menghambat aktivitas fosforilasi iKK sehingga membuka inhibisi I κ B, menurunkan aktivitas NF κ B, menurunkan TNF- α , NO, ROS, menghambat COX2 oleh karena menghambat fosforilasi dan degradasi I κ B(Ahmed *et al.*, 2002; Sing *et al.*,2002).Semakin banyak gugus galloil yang dikandung katekin, maka semakin kuat kemampuannya untuk mengikat radikal bebas (Cai *et al.*, 2002). Radikal bebas yang bermuatan negatif ditangkap cincin benzena, sehingga tidak terjadi radikal bebas lagi (Barceloux, 2008; Singh *et al.*, 2011). Polifenol memicu sintesis enzim antioksidan seperti *glutathione-s-transferases*, SOD, menangkap radikal peroksil, dan mencegah peroksidasi lipid membran (Carmen *et al.*,2006). Menurut Guyton *and* Hall, (2011) dan Lee *et al.*, (2002) difusi EGCG pada membran sel secara difusi sederhana melalui saluran pori protein (*aqua porine channel*). Penelitian Byun *et al.*, (2010), reseptor EGCG adalah LR 67-kDa pada permukaan sel. Flavanoid dari EGCGyang masuk ke sitoplasma, akan ditangkap oleh reseptor ER (Keller *et al.*, 2000). Pemberian EGCG akan menyebabkan kompleks EGCG-ER mengaktifasi gen IL-10 sehingga mengekspresikan IL-10 (Kuang *et al.*, 2012; Wheeler, 2015). Kompleks EGCG-ER dan EGCG-LR akan mengaktifkan gen SOD1 dan katalase, sehingga mengekspresikan SOD dan katalase (Chang *et al.*, 1999; Levites *et al.*, 2001).

BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

Bidang penelitian mengenai kesehatan dan obat merupakan salah satu unggulan di Universitas Airlangga. Bahan herbal sejak lama telah digunakan dalam pengobatan tradisional di seluruh dunia dan secara turun menurun dilestarikan dari generasi ke generasi. Pengobatan tradisional digunakan sekitar 60% dari populasi dunia dan di beberapa Negara tergabung dengan system kesehatan nasional. Bahan herbal ini dipilih karena mudah didapat, hampir tidak memiliki efek samping yang merugikan dan mempunyai toksisitas yang rendah dibanding bahan kimia sintetis.

Bahan herbal *Epigallocatechin-gallate* (EGCG) dari teh hijau memiliki kandungan bioaktif seperti polifenol dan flavanoid, memiliki kandungan gallo, katekin, dan gallat yang terbukti memiliki potensi sebagai anti oksidan, anti inflamasi, dan anti nyeri yang mengeluarkan efek farmakologis pada sel dan jaringan manusia. Indonesia memiliki keaneka ragaman hayati terbesar kedua setelah brazil. Terdapat sekitar 7000 tanaman yang diperkirakan memiliki khasiat sebagai obat.

Teknologi modern terus berkembang serta penelitian bahan herbal yang semakin meluas dapat mendukung kebijakan pemerintah pada Keputusan Menteri Kesehatan RI, Nomor 381/MENKES/ SK/III/2007, tentang kebijakan obat tradisional dalam rangka pemanfaatan sumber daya alam Indonesia untuk meningkatkan pelayanan kesehatan yang teruji secara ilmiah sehingga ketersediaannya dapat digunakan secara luas untuk pelayanan kesehatan formal. Untuk mendukung keputusan ini, maka pada penelitian ini peneliti memilih untuk memanfaatkan EGCG dari teh hijau untuk memodulasi inflamasi dan menghambat konduksi nyeri. EGCG dari daun teh hijau yang memiliki kemampuan antioksidan 100 kali lebih besar dibanding vitamin E dan 25 kali lebih besar dibanding vitamin C, antiinflamasi, anti nyeri, anti kanker, antibakteri dan sitotoksitasnya yang relatif lebih kecil bila dibanding ekstrak cengkeh, bahan kimia sintetis yang sampai saat ini rutin digunakan pada perawatan inflamasi dan nyeri gigi, dan sterilisasi saluran akar pada perawatan saluran akar gigi.

Tujuan Penelitian :

Menentukan konsentrasi yang efektif, menguraikan dan menjelaskan mekanisme aplikasi EGCG hidrogel topikal sebagai immunomodulator, antioksidan dan menghambat konduksi nyeri sehingga dapat memodulasi dan meredakan nyeri pada inflamasi pulpa gigi akut.

Manfaat Penelitian

Hasil penelitian merupakan temuan mengenai mekanisme immunomodulasi, antioksidan dan hambatan konduksi nyeri penggunaan EGCG hidrogel topikal pada kavitas gigi tikus model pulpitis akut. Penelitian ini diharapkan sebagai modal ilmiah yang dalam jangka panjang dapat bermanfaat untuk dikembangkan sehingga diharapkan bertambahnya pilihan bahan obat yang berasal dari bahan alam yang dapat digunakan dalam perawatan di bidang kedokteran gigi sebagai bahan antiinflamasi, antioksidan dan antinyeri, sehingga dapat mengurangi ketergantungan produk import bahan kedokteran gigi.



BAB 4. METODE PENELITIAN

4.1 Desain penelitian

Jenis penelitian ini adalah true eksperimental, dengan rancangan *Post test only control group design* pengukuran variabel hanya dilakukan setelah pemberian perlakuan dan memiliki kriteria :

1. Pengambilan sampel dilakukan secara acak
2. Ada replikasi
3. Ada kontrol atau pembanding

4.2 Unit eksperimen

Unit eksperimen adalah tikus Wistar (*Rattus Norvegicus*), jantan, dewasa umur 10 minggu, berat badan antara 220-300 gram. Spesimen penelitian adalah jaringan pulpa gigi molar pertama rahang bawah kanan.

4.3 Replikasi

Untuk menentukan jumlah replikasi digunakan rumus Higgins (Wingo, 1994; Lemeshow *et al.*, 2000).

4.4 Bahan dan Alat Penelitian

Akuades steril, *fine paper point* 0,5 mm steril, *cotton pellet steril*, bahan tumpatan semen ionomer gelas berwarna *pink*, *ketamine*, *xylazine base*, sukrosa 30%, *phosphat buffer saline* (PBS), pH 7,4, PEG 400, PEG 4000, alkohol 70%, bahan untuk proses preparasi kavitas, LPS dari *E.coli*, EGCG, anti TLR4 antibodi monoklonal, anti TNF- α antibodi monoklonal, anti MDA antibodi monoklonal, anti SOD antibodi monoklonal, anti IL-10 antibodi monoclonal, anti TRPV1 antibodi monoklonal, anti CGRP antibodi monoklonal

4.5 Alat Penelitian

Mikroskop cahaya (Nikon), *Graticulae* berukuran 125x125 μm , *Micropipette*

4.6 Cara Kerja

4.6.1 Prosedur induksi LPS

Penelitian dilakukan pada 28 tikus Wistar, dibagi dalam 4 kelompok yaitu kelompok normal (N), kelompok control (K) dan kelompok perlakuan (P1 dan P2). Setiap tikus dianestesi secara intra muskular sebanyak 0,2 cc. Preparasi gigi molar kanan bawah, diameter 2 mm, pada daerah disto-servikal, kedalaman preparasi 1,5 mm, tanpa menyebabkan perforasi pulpa (Chung *et al.*, 2011). Pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol, pada kavitas gigi dilakukan induksi LPS sebanyak 0,5 μl , konsentrasi 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, dan dimasukkan ke

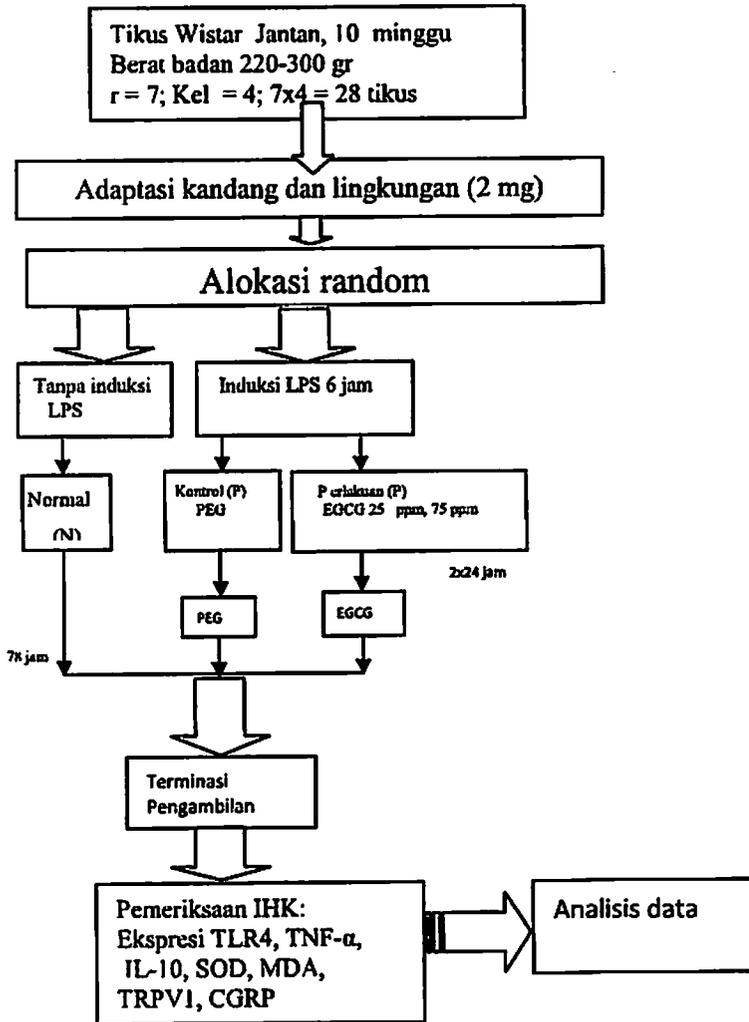
dalam kavitas, kemudian kavitas ditutup dengan menggunakan tumpatan semen ionomer gelas. Setelah 6 jam akan menginduksi pulpitis akut (Chung *et al.*, 2011; Guo Li *et al.*, 2015).

4.6.2 Prosedur aplikasi EGCG

Dilakukan pembongkaran tumpatan pada kelompok pulpitis akut 6 jam setelah induksi LPS selama 6 jam. Pada kelompok perlakuan, EGCG hidrogel dengan konsentrasi 25 ppm dan 75 diambil dengan menggunakan *microsyringe* sebanyak 0,5 μ l, dimasukkan ke dalam kavitas, dan kavitas ditumpat semen ionomer gelas, dibiarkan selama 1 x 24 jam. Prosedur pemberian EGCG diulangi setiap 24 jam. Aplikasi EGCG hidrogel selama 2 hari berturut-turut (kelompok perlakuan). Pada kelompok kontrol (pulpitis akut 6 jam), sediaan gel PEG dimasukkan ke dalam kavitas, kavitas ditumpat semen ionomer gelas, dibiarkan selama 1 x 24 jam. Prosedur pemberian krim PEG diulangi setiap 24 jam selama 2 hari berturut-turut. Setelah 54 jam untuk kelompok N, K, dan P1 dan P2, tikus dikorbankan, dilakukan pembedahan untuk mengambil gigi molar rahang bawah kanan beserta rahang (± 12 mm) sebagai spesimen analisis. Sebagai unit analisis digunakan jaringan pulpa gigi tikus. Selanjutnya tikus dibungkus kertas dan plastik, selanjutnya dibakar di tempat pembakaran RS UNAIR. Dilakukan pengecatan peroksidase untuk pemeriksaan IHK, menghitung ekspresi TLR4, TNF- α , IL-10, SOD, MDA, TRPV1 dan CGRP.

Alur Penelitian

Kerangka Operasional Penelitian



BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

Telah melakukan penelitian terhadap ekspresi TLR4, TNF- α , IL-10, SOD, MDA, TRPV1 dan CGRP jaringan pulpa gigi.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental pada hewan coba tikus Wistar yang menyelidiki tentang mekanisme immunomodulasi dan hambatan konduksi nyeri pada pulpitis akut akibat aplikasi EGCG topikal pada konsentrasi 25 ppm, dan 75 ppm. Pemeriksaan dilakukan terhadap 175 jaringan pulpa gigi tikus yang terdiri dari 7 kelompok yang dibagi dalam kelompok normal, kelompok K1 (induksi LPS selama 6 jam), kelompok P1 (induksi LPS selama 6 jam, selanjutnya aplikasi EGCG topikal 25 ppm); P2 (induksi LPS selama 6 jam, selanjutnya aplikasi EGCG topikal 75 ppm). Aplikasi EGCG topikal selama 2x24 jam berturut-turut. Pada kelompok K1, P1, P2, didapatkan kegagalan sebanyak 1 ekor tikus setiap kelompok, tumpatan lepas sebanyak 3 ekor tikus, kegagalan proses pembuatan unit analisis dalam blok parafin sebanyak 3 unit analisis. Analisis dilakukan pada jaringan pulpa gigi untuk menghitung ekspresi TLR4, TNF- α , IL-10, SOD, MDA, TRPV1 dan CGRP.

Hasil penelitian diuraikan berupa data dan analisis yang berkaitan dengan tujuan dan hipotesis penelitian. Hasil penelitian menyajikan karakteristik data subyek selama perlakuan, data pengukuran setiap variabel dan tahapan analisis komparasi antar kelompok waktu induksi LPS dan konsentrasi EGCG. Penyajian data hasil penelitian ditampilkan dalam bentuk tabel dan foto.

5.1 Hasil

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan uji *One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test* untuk mengetahui apakah data tersebut berdistribusi normal atau tidak normal. Hasil analisis menunjukkan data berdistribusi normal ($p > 0,05$). Uji homogenitas varian menggunakan *Levene test* menunjukkan bahwa hampir seluruh variabel mempunyai varians yang homogen dengan nilai $p > 0,05$, kecuali pada variabel SOD dan IL-10 varian tidak homogen ($p < 0,05$). Dihitung rerata dan standar deviasi, selanjutnya dilakukan analisis varians untuk ekspresi TLR4, TNF- α , MDA, TRPV1 dan CGRP, sedangkan uji Brown-Forsythe, dan uji Games Howell untuk SOD dan IL-10. Hasil analisis dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

Uji Anova pada seluruh kelompok menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p < 0,001$), selanjutnya dilakukan analisis komparasi LSD untuk menganalisis perbedaan jumlah sel pengeksresi TLR4 antar kelompok, didapatkan perbedaan bermakna antara kelompok

normal dan kelompok lainnya. Ekspresi TLR4 pada P2 lebih rendah bermakna dibanding P1, tetapi masih lebih tinggi bermakna dibanding kelompok normal, dan lebih rendah bermakna dibanding K1. Berdasarkan analisis diatas dapat disimpulkan bahwa aplikasi EGCG 25 ppm, maupun 75 ppm setelah induksi LPS 6 jam, menghambat ekspresi TLR4 secara bermakna dibanding kelompok induksi LPS 6 jam.

5.1.1 Analisis ekspresi protein TLR4, TNF- α , IL-10, SOD, MDA sel makrofag pulpa gigi

Hasil rerata dan simpangan baku jumlah sel makrofag pulpa yang mengekspresikan TLR4, TNF- α , IL-10, SOD, MDA dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

Tabel 5.1 Rerata dan simpangan baku jumlah sel makrofag pulpa yang mengekspresikan TLR4, TNF- α , IL-10, SOD, MDA sel makrofag setelah aplikasi EGCG hydrogels 25 ppm, 75ppm, Anova dan uji LSD

Kelompok	TLR4	TNF- α	IL-1-0	SOD	MDA
	Rerata \pm Simpangan baku	Rerata \pm Simpangan baku	Rerata \pm Simpangan baku	Rerata \pm Simpangan baku	Rerata \pm Simpangan baku
N	0.80 \pm 0.20 ^a	3.17 \pm 0.75 ^a	2,50 \pm 0,55 ^a	2.20 \pm 0.52 ^a	3.17 (0.75) ^a
K	3.20 \pm 0.55 ^b	8.00 \pm 0.89 ^c	3,83 \pm 0,75 ^a	3.80 \pm 0.11 ^b	3.37 (0.82) ^a
P1	1.73 \pm 0.43 ^c	5.50 \pm 1.52 ^b	12,83 \pm 2,23 ^b	6.40 \pm 1.78 ^c	3.40 (0.79) ^a
P2	2.60 \pm 1.12 ^b	3.83 \pm 1.32 ^b	14,00 \pm 2,53 ^c	8.45 \pm 1.98 ^c	3.39 \pm 1.78 ^b

Keterangan: *Superscript* yang berbeda menunjukkan perbedaan bermakna menggunakan LSD
 N : Normal : tanpa induksi LPS
 K : induksi LPS selama 6 jam
 P1 : induksi LPS 6 jam + EGCG 25 ppm
 P2 : induksi LPS 6 jam + EGCG 75 ppm

5.1.2 Analisis ekspresi protein TRPV1, dn CGRP sel aferen pulpa gigi

Hasil rerata dan simpangan baku jumlah sel aferen pulpa yang mengekspresikan TRPV1 dan CGRP dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

Tabel 5.2 Rerata dan simpangan baku jumlah sel aferen pulpa gigi yang mengekspresikan TRPV1 dan CGRP sel aferen setelah aplikasi EGCG hydrogels 25 ppm dan 75 ppm, Anova dan uji LSD

Kelompok	TRPV1	CGRP
	Rerata \pm SD	Rerata \pm SD
N	1.20 \pm 0.53 ^a	2.33 \pm 0.52 ^a
K	3.20 \pm 1.08 ^c	6.17 \pm 1.17 ^b
P1	2.00 \pm 0.71 ^b	3.00 \pm 0.89 ^a
P2	2.20 \pm 1.04 ^c	2.67 \pm 0.82 ^a

Keterangan: *Superscript* yang berbeda menunjukkan perbedaan bermakna menggunakan LSD ($p < 0.05$)
 N : Normal : tanpa induksi LPS
 K : induksi LPS selama 6 jam
 P1 : induksi LPS 6 jam + EGCG 25 ppm
 P2 : induksi LPS 6 jam + EGCG 75 ppm

Luaran yang dicapai

Luaran hasil penelitian ini adalah publikasi pada Iranian Endodontic Journal (IEJ) 2018; 13 (4): 528-533; <http://journals.sbm.ac.ir/iej/article/view/21226/15920>.

Judul: Effect of Topical Epigallocatechin-gallate on Lipopolysaccharide-Induced Pulpal Inflammation in Rat Models.

BAB 6. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

Penelitian tahun kedua direncanakan untuk membuktikan potensi EGCG topikal dengan menggunakan konsentrasi yang berperan dari hasil penelitian tahun pertama sebagai immunomodulator, antioksidan dan hambatan konduksi nyeri pada tikus model pulpitis akut 6 jam dan kurun waktu aplikasi EGCG ditetapkan dari hasil penelitian tahun pertama. Dilakukan penelitian ekspresi TLR4, TNF- α , IL-10, SOD, MDA, TRPV1, CGRP, proliferasi sel fibroblast, dan angiogenesis..

Penelitian tahun ketiga direncanakan untuk menentukan dosis optimum dan kurun waktu aplikasi EGCG topikal yang berperan sebagai immunomodulator, antioksidan dan hambatan konduksi nyeri pada tikus model pulpitis akut 6 jam Dilakukan penelitian tentang ekspresi TLR4, TNF- α , IL-10, SOD, MDA, PG-E2, TRPV1, CGRP, *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) dan *Fibroblast Growth factor* (FGF) yang terkait dengan *angiogenesis* yang dapat terjadi setelah 7 hari, untuk mengetahui adanya perbaikan jaringan.

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini meliputi fakta dan mekanisme kerja EGCG, maka kesimpulan penelitian ini adalah :

1. Didapatkan hambatan ekspresi TLR4 akibat aplikasi EGCG hidrogel topikal pada pulpitis akut 6 jam.
2. Didapatkan hambatan ekspresi TNF- α akibat aplikasi EGCG hidrogel topikal pada pulpitis akut 6 jam.
3. Didapatkan peningkatan ekspresi SOD akibat aplikasi EGCG hidrogel topikal pada pulpitis akut 6 jam.
4. Tidak didapatkan peningkatan ekspresi MDA pada pulpitis akut, dan tidak ada peningkatan ekspresi MDA akibat aplikasi EGCG hidrogel topikal pada pulpitis akut 6 jam.
5. Didapatkan peningkatan ekspresi IL-10 akibat aplikasi EGCG hidrogel topikal pada pulpitis akut 6 jam.
6. Didapatkan hambatan ekspresi TRPV1 akibat aplikasi EGCG hidrogel topikal pada pulpitis akut 6 jam dan 24 jam.
7. Didapatkan hambatan ekspresi CGRP akibat aplikasi EGCG hidrogel topikal pada pulpitis akut 6 jam dan 24 jam.

Dari hasil penelitian ini terbukti bahwa aplikasi EGCG hidrogel topikal pada konsentrasi 75 ppm berperan sebagai immunomodulator dan hambatan konduksi nyeri pada pulpitis akut 6 jam.

7.2 Saran

Penelitian ini mencatat keterbatasan dan potensi pengembangan hasil penelitian kedepan, sehingga disarankan untuk :

1. Melakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui proliferasi sel fibroblast, angiogenesis, ekspresi VEGF dan FGF yang terkait dengan *angiogenesis* pada pulpitis akut akibat induksi EGCG topikal.
2. Melakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui ekspresi reseptor EGCG yaitu ER atau LR, untuk mengetahui reseptor yang lebih berperan pada hambatan inflamasi dan konduksi nyeri akibat induksi EGCG topikal.

3. Perlu penelitian secara periodik dengan mengaplikasikan EGCG hidrogel dalam kurun waktu lebih lama agar didapatkan informasi tentang perbaikan jaringan pulpa gigi sampai didapatkan kesembuhan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichtman AH, and Pillai S, 2010. Cellular and molecular immunology 7th ed. Philadelphia Saunders.
- Altavilla D, Squadrito F, Bitto A, Polito F, Burnett BP, Stefano VD, and Minutoli, 2009. Flavocoxid, a dual inhibitor of Cyclooxygenase and 5-Lipoxygenase, blunts pro-inflammatory phenotype activation in endotoxin-stimulated macrophages. *British J of Pharmacology*. 157 : 1410-18.
- Banerjee R, Becker D, Dickman M, Gladyshev V, and Ragsdale S, 2008. Redox Biochemistry. Wiley Interscience. A John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, Canada.
- Barceloux DG, 2008. Medical Toxicology of Natural Substances. Food, Fungi, Medicinal Herbs, Plants and Venemous Animals, Wiley : Hoboken, NJ, USA.
- Byun EB, Choi HG, Sung NY, and Byun EH, 2012. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibit TLR4 signaling through the 67-kDa laminin receptor on lipopolysaccharide-stimulated dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun*. Oct 5; 426(4):480-5.
- Chung MK, Lee J, Duraes G, and Ro JY, 2011. Lipopolysaccharide-induced Pulpitis Up-regulates TRPV1 in Trigeminal Ganglia. *J Dent Res* 90(9): 1103-7.
- Gomes BO, Montagner F, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, and Souza-Filho FJ, 2007. Polymerase chain reaction of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* in primary endodontic infections. *J Endod* 33:1049-52.
- Hirao K, Yumoto H, Takahashi K, Mukai K, Nakanishi T, and Matsuo T, 2009. Roles of TLR2, TLR4, NOD2 and NOD1 in pulp fibroblasts. *Jof Dent Res* 88(8) : 762-7.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2011. Profil Kesehatan Indonesia tahun 2010, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Ishida I, Kohda C, Yanagawa Y, Miyaoka H, and Shimamura T, 2007. Epigallo catechins gallate supresses expression of receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) in *Staphylococcus aureus* infection in osteoblast-like NRG cells. *J. Of Medical Microbiology*. 56: 1042-46.
- Kim TH, Lim JM, Kim SS, Kim J, Park M, and Song JH, 2009. Effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on Na (+) currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Eur.J. Pharmacol* 604 : 20-6.
- Kuang X, Huang Y, Gu HF, Zu XY, Zou WY, Song ZB, and Guo QL, 2012. Effect of intrathecal epigallocatechin gallate, an inhibitor of Toll-like receptor 4, on chronic neuropathic pain in rats. *Eur J Pharmacol* 15; 676 (1-3): 51-6.

Lundy W and Linden R, 2004. Neuropeptides and neurogenic mechanism in oral and periodontal inflammation. *Crit Rev Oral Biol* 15 (2): 82-98.

McLachlan JL, Sloan AJ, Smith AJ, Landini G, and Cooper PR, 2004. S 100 and cytokine expression in caries. *Infect immune*. 72 : 4102-8.

Pääkkönen V, 2009. Expression profiling of human pulp tissue and odontoblasts in vivo and in vitro, Faculty of Medicine, Institute of Dentistry, University of Oulu, University of Helsinki.

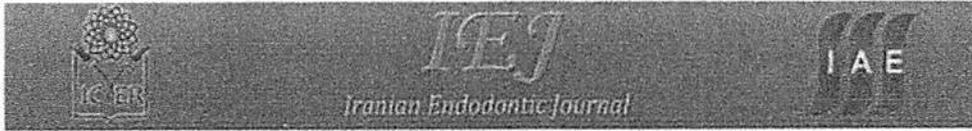
Zhang Y, Jia YY, Guo JL, Liu PQ, and Jiang JM, 2013. Effect of (-) Gallic acid on Tetrodotoxin-Resistant Voltage-gated Sodium Channels in Rat Dorsal Root Ganglion neurons. *Int J Mol Sci* 14 : 9779-89.

LAMPIRAN

Publikasi pada Iranian Endodontic Journal (IEJ) 2018; 13 (4): 528-533; <http://journals.sbm.ac.ir/iej/article/view/21226/15920>.

Judul : Effect of Topical Epigallocatechin-gallate on Lipopolysaccharide-Induced Pulpal Inflammation in Rat Models





Effect of Topical Epigallocatechin-Gallate on Lipopolysaccharide-induced Pulpal Inflammation in Rat Models

Kun Ismiyatin^{a*}, Soegeng Wahlyuo^b, Djoko Agus Purwanto^c, Retno Pudji Rahayu^d,
Adioro Soetojo^e, Indri Safitri Mukono^f

^a Department of Conservative Dentistry, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia; ^b Department of Pediatric Dentistry, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia; ^c Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia; ^d Department of Oral Pathology and Maxillofacial, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia; ^e Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Article Type: Original Article</p> <p>Received: 17 Jun 2018 Revised: 05 Sep 2018 Accepted: 15 Sep 2018 DOI: 10.22037/iej.v13i4.21226</p> <p>*Corresponding author: Kun Ismiyatin, Department of Conservative Dentistry, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Mayjen. Prof. Dr Moestopo street 47, Surabaya, Indonesia, 60132. Tel: +62 31 5030255 E-mail: kun.is@fkg.unair.ac.id</p> <p> © The Author(s). 2018 Open Access This work is licensed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International.</p>	<p>Introduction: Pulpal inflammation can be marked by an increase in tumor necrosis factor-α (TNF-α), malondialdehyde (MDA) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) level. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) demonstrates the ability to reduce cytokine expression, influence immune receptors, reduce inflammation, neutralize reactive oxygen species (ROS) and to inhibit pain conduction. The present research aimed to determine the anti-inflammatory, antioxidant and pain conduction inhibition of topical EGCG hydrogels in Lipopolysaccharide (LPS)-induced pulpal inflammation in rats. Methods and Materials: A total of 28 male Wistar rats were divided equally into four groups. The negative control group (N) received no treatment while the positive control group (C) and the other two treatment groups (T1, T2) were induced with LPS for 6 h, followed by the application of topical polyethylene glycol (PEG) hydrogels for C group, 25 ppm EGCG hydrogels for T1 group and 75 ppm EGCG hydrogels for T2 group, before being filled with glass ionomer cement (GIC). After 24 h, PEG and EGCG were reapplied and refilled with GIC for 24 h. The pulp tissue samples were examined by means of immunohistochemistry (IHC) to identify TNF-α, MDA and CGRP expression. All the data obtained was analyzed with one-way analyses of variance (ANOVA) test. Results: The T1 and T2 groups showed a significant decrease in TNF-α and CGRP expression compared to the control group, but there was no significant decrease in MDA in either group ($P < 0.05$). Conclusion: Based on the results of this study, topical application of 75 ppm EGCG hydrogels to the tooth cavities with six hours of pulpal inflammation has the optimal result in reducing the expression of TNF-α and CGRP, but not of MDA.</p> <p>Keywords: Calcitonin Gene-related Peptide; Epigallocatechin-3-Gallate; Malondialdehyde; Pulpal Inflammation; Tumor Necrosis Factor-α</p>

Introduction

The most frequent case for patients to visit a dental clinic often involves pulpal inflammation with the manifestation of sharp tooth ache. The accumulation of *Escherichia coli* (*E. coli*) lipopolysaccharide (LPS) induces pulpal inflammation and an up-regulated transient receptor potential vanilloid (TRPV1) could contribute to hyperalgesia [1]. LPS can infiltrate exposed dentin to the pulpal chamber through the

fluid movement in the dentin tubules and pulpal chamber causing pathologic changes in the pulp [2]. During inflammation, the release of tumor necrosis factor- α (TNF- α) was up-regulated, producing an excessive intracellular reactive oxygen species (ROS) [3, 4]. TNF- α expressions are known to increase 6 h after LPS induction and will reach a peak 24 h later [5]. ROS can damage cellular lipids, causing polyunsaturated fatty acid (PUFA) peroxidation, which results in malondialdehyde (MDA) [6]. On the first three days, acute

pulpitis displays a broad hemorrhagic necrosis and significant accumulation of inflammatory cells, while, after 5 days, almost all of the tissue becomes necrotic [5]. TNF- α is able to activate TNF- α receptors (TNFR) located on the surface of neuron cells and stimulate substance P (SP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) release [7, 8]. Pulpal nerve fibers contain neuropeptide SP and CGRP, which are released an hour after injury which resulted in the conduction of pain impulses throughout the sensory neuron membrane [9-11].

The escalation of inflammation, which can lead to necrotic pulp conditions, are usually found in non-immediate treated patients with pulpal inflammation. Hence, early intervention, as vital pulp therapy (direct pulp capping, partial pulpotomy and pulpotomy), and pulp sedative, is necessary in order to prevent an increase in inflammation, more extensive pain and a worsening condition [12-15]. Generally, the most commonly used pain relief consists of eugenol (clove oil), crocote, procaine, phenol and chloroform and several corticosteroids combined with polyantibiotics. However, they are known to have a high level of toxicity, especially eugenol [15, 16].

Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a catechin group of polyphenolic substances which represents one of the four major green tea flavonoids, has the ability in scavenging ROS directly and indirectly reducing inflammation, stimulating the expression of antioxidant co-factors and possesses antibacterial and analgesic properties [17-19]. Flavonoid, in general, was known for its antioxidant, anticarcinogenic, antitumorigenic and anti-inflammatory properties [20]. EGCG has a non-polar or hydrophilic characteristic which helps to infiltrate cytoplasm and the cell nucleus by diffusing through the protein pore channel in the cell membrane and interacting with intracellular molecules [21]. Previous studies have confirmed that EGCG could block toll-like receptor 4 (TLR4), thus inhibiting TNF- α expression and free radical activities which will prevent lipid membrane oxidation, membrane damage and a decrease of prostaglandin-E2 (PG-E2) production [22, 23]. It also could reduce pain by preventing the opening of a voltage-gated sodium (Na⁺) ion channel [18]. This indicates that inflammation can be reduced after the administration of EGCG which could act as an antioxidant and analgesic.

The research conducted by Weisburg *et al.* [24] confirmed that EGCG was toxic at a concentration of 50 μ M to human gingival epithelial (S-G) cells and 150 μ M to normal human gingival 56 (GNS6) fibroblasts. The absorption of drugs in liquid form was greater and more rapid, but was effective for shorter durations compared to paste, cream or gels [25]. The gel form preparation could be used as a drug delivery system due to its ability to control drug release and to protect the drug from a harsh

environment [26]. The most widely-used gel basis is Polyethylene Glycol (PEG) as it provides a controlled, continuous, stable and widespread drug release with low toxicity [27].

This research was intended to determine the anti-inflammatory, antioxidant, and pain conduction inhibition of the 25 ppm and 75 ppm topical EGCG hydrogels in *E. coli* LPS-induced pulpal inflammation in rats.

Materials and Methods

Experimental design

Ethical clearance was approved by the Health Research Ethical Clearance Commission, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, No. 018/HRECC.FODM/ III/2018. This study was an experimental laboratory study using 28 healthy male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) with approximately 10 weeks of age, and weighing 220-300 gr as animal subjects. The samples were equally divided into four groups ($n=7$): a negative control group (N) which received no treatment; a positive control group (C) which received cavity preparation and 6 h LPS application followed by administration of PEG hydrogel for 2x24 h; and two treatment groups, which received cavity preparation and 6 h LPS application prior to being treated with 25 ppm (T1) and 75 ppm (T2) of EGCG hydrogels for 2x24 h.

Cavity preparation

In group C, 21 rats, T1 and T2 were anesthetized by means of a 0.2 cc intra-muscular injection of a mixture of Ketalar[®] ketumir (Warner Lambert, Dublin, Ireland) and Xylis[®] xylazine base (PT Tekad Mandiri Citra, Bandung, Indonesia) with ratio 1:1.

Cavity preparation was performed on the lower right first molar tooth using a high-speed drill with a 0.3 mm fissurotomy bur (SS White bur Inc., Lakewood, USA) under water cooling. The preparation was carried out to create open dentinal tubules with minimal damage to the pulp and avoid exposure of the pulp horn. To dry the cavity and confirm the absence of bleeding, which is a sign of pulp horn exposure, a fine paper point was used [1].

Induction of pulpal inflammation

Pulpal inflammation induction in groups C, T1 and T2 was performed using topical LPS (derived from *Escherichia coli* serotype O111: B4, Sigma Chemical Co, St. Louis, USA; product number L2630) for 6 h. Irrigation of the cavities was carried out by means of sterile saline solution prior to drying with a sterile cotton pellet. The application of 0.5 μ L LPS at a concentration of 10 μ g/ μ L was completed, without overfilling the cavity, using a fine, flattened, 0.5 mm diameter micro-brush (Microbrush, Grafton, USA) before being allowed to dry. This wet and dry

procedure was repeated 6 times [1], before the cavity was finally covered with Glass Ionomer Cement (GIC) (Fuji 7, GC Corp, Tokyo, Japan).

Application of topical EGCG

PEG hydrogel was produced by mixing 80% PEG 400 with 20% PEG 4000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA; CAS Number: 25322-68-3). EGCG hydrogel was produced by mixing EGCG (XtAn Rongsheng Biotechnology Co., Ltd., Shaanxi, China, batch number 2013101512 RS) with 80% PEG 400 and 20% PEG 4000.

In C group, only PEG hydrogel was applied, while 25 ppm and 75 ppm of EGCG hydrogels were consecutively applied to T1 and T2 groups. After the application, the cavities were filled with GIC. After 24 h, PEG hydrogels as well as 25 ppm and 75 ppm EGCG hydrogels were re-applied to each group before being re-covered with GIC.

Immunohistochemistry staining

The Wistar rats were sacrificed 24 h after completion of the treatment, in order to obtain analysis specimens, by surgically removing the lower right first molar tooth along with the jaw. The mandibula were decalcified with 10% ethylen diamine tetraacetic acid (EDTA) at pH 7.4, with the solution being replaced every 3 days during the 30 days of immersion at room temperature. The samples were taken from the dental pulp of the teeth. Immunohistochemistry (IHC) staining was performed by means of anti-rat TNF- α monoclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA; catalog number: sc 52746), anti-rat MDA monoclonal antibodies (Abcam, Cambridge, USA; catalog number: ab 6463), and anti-rat CGRP monoclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA; catalog number: sc-8857).

Each specimen was observed by two experts. Observers examined blank specimens without any grouping and interventional information data was provided. Specimens were observed by a light microscope E 100 under 400 \times magnification from five perspective points. The image was used to calculate the surface area of the cells. The presence of TNF- α , MDA macrophage cells and CGRP sensory nerve cell expressions in each group were noted. A digital camera (A7; Sony, Tokyo, Japan) was used to capture the images (Figure 1).

Statistical analysis

All the data obtained was analyzed with a Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 23 (IBM, New York, USA), using one-way analyses of variance (ANOVA) test and Least Significance Different (LSD). Significant differences were considered to be present if $P < 0.05$.

Results

Table 1 shows the mean and standard deviation (SD) of TNF- α , MDA in macrophage cells, and CGRP in sensory nerve cells expressions. Six h of LPS induction in group C resulted in a significantly increased expression of TNF- α and CGRP compared to group N, while the application of 25 ppm of topical EGCG hydrogels (T1) and 75 ppm EGCG hydrogels (T2) to the tooth cavities significantly inhibited the TNF- α and CGRP expressions compared to group C ($P < 0.05$). While TNF- α expression in T2 group was significantly lower than in T1 group, there was no significant difference in the decrease of CGRP expression between groups T1 and T2. MDA expression showed no significant difference in groups N, C, T1, and T2. The expression of TNF- α , MDA and CGRP can be seen in Figure 1.

Discussion

This study found that 6 h of dentinal application of LPS to the tooth cavities of Wistar rats (C group) caused an increase of TNF- α and CGRP expressions compared to normal teeth with healthy pulps (group N), while there was no significant increase in MDA expression. The results showed that application of LPS to cavity preparation for 6 h caused a pulpal inflammation with 2.5-fold increase of TNF- α expressions and 2.6-fold increase of CGRP expression compared to normal teeth with healthy pulps. The increase in TNF- α expression was caused by the ability of LPS to diffuse through the fluid movement of open dentinal tubules to reach the pulp chamber, triggering a cascade of pathological changes [2, 5].

Table 1. The mean (SD) of expression of TNF- α , MDA in macrophage cells and CGRP in sensory nerve cells after the application of 25 ppm and 75 ppm topical EGCG hydrogels

Groups	TNF- α	MDA	CGRP
N	3.17 (0.75) ^a	3.17 (0.75) ^a	2.33 (0.52) ^a
C	8.00 (0.89) ^b	3.37 (0.82) ^a	6.17 (1.17) ^b
T1	5.50 (1.52) ^b	3.00 (0.79) ^a	3.00 (0.89) ^b
T2	3.83 (0.75) ^b	3.39 (0.86) ^a	2.67 (0.82) ^b

Different superscript denotes a significant difference ($P < 0.05$)

procedure was repeated 6 times [1], before the cavity was finally covered with Glass Ionomer Cement (GIC) (Fuji 7, GC Corp, Tokyo, Japan).

Application of topical EGCG

PEG hydrogel was produced by mixing 80% PEG-400 with 20% PEG-4000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA; CAS Number: 25322-68-3). EGCG hydrogel was produced by mixing EGCG (Xi'an Rongsheng Biotechnology Co., Ltd., Shaanxi, China, batch number 2013101512 RS) with 80% PEG-400 and 20% PEG-4000.

In C group, only PEG hydrogel was applied, while 25 ppm and 75 ppm of EGCG hydrogels were consecutively applied to T1 and T2 groups. After the application, the cavities were filled with GIC. After 24 h, PEG hydrogels as well as 25 ppm and 75 ppm EGCG hydrogels were re-applied to each group before being re-covered with GIC.

Immunohistochemistry staining

The Wistar rats were sacrificed 24 h after completion of the treatment, in order to obtain analysis specimens, by surgically removing the lower right first molar tooth along with the jaw. The mandibula were decalcified with 10% ethylen diamine tetraacetic acid (EDTA) at pH 7.4, with the solution being replaced every 3 days during the 30 days of immersion at room temperature. The samples were taken from the dental pulp of the teeth. Immunohistochemistry (IHC) staining was performed by means of anti-rat TNF- α monoclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA; catalog number: sc 52746), anti-rat MDA monoclonal antibodies (Abcam, Cambridge, USA; catalog number: ab 6463), and anti-rat CGRP monoclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA; catalog number: sc-8857).

Each specimen was observed by two experts. Observers examined blank specimens without any grouping and interventional information data was provided. Specimens were observed by a light microscope E 100 under 400 \times magnification from five perspective points. The image was used to calculate the surface area of the cells. The presence of TNF- α , MDA macrophage cells and CGRP sensory nerve cell expressions in each group were noted. A digital camera (A7; Sony, Tokyo, Japan) was used to capture the images (Figure 1).

Statistical analysis

All the data obtained was analyzed with a Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 23 (IBM, New York, USA), using one-way analyses of variance (Anova) test and Least Significance Different (LSD). Significant differences were considered to be present if $P < 0.05$.

Results

Table 1 shows the mean and standard deviation (SD) of TNF- α , MDA in macrophage cells, and CGRP in sensory nerve cells expressions. Six h of LPS induction in group C resulted in a significantly increased expression of TNF- α and CGRP compared to group N, while the application of 25 ppm of topical EGCG hydrogels (T1) and 75 ppm EGCG hydrogels (T2) to the tooth cavities significantly inhibited the TNF- α and CGRP expressions compared to group C ($P < 0.05$). While TNF- α expression in T2 group was significantly lower than in T1 group, there was no significant difference in the decrease of CGRP expression between groups T1 and T2. MDA expression showed no significant difference in groups N, C, T1, and T2. The expression of TNF- α , MDA and CGRP can be seen in Figure 1.

Discussion

This study found that 6 h of dentinal application of LPS to the tooth cavities of Wistar rats (C group) caused an increase of TNF- α and CGRP expressions compared to normal teeth with healthy pulps (group N), while there was no significant increase in MDA expression. The results showed that application of LPS to cavity preparation for 6 h caused a pulpal inflammation with 2.5-fold increase of TNF- α expressions and 2.6-fold increase of CGRP expression compared to normal teeth with healthy pulps. The increase in TNF- α expression was caused by the ability of LPS to diffuse through the fluid movement of open dentinal tubules to reach the pulp chamber, triggering a cascade of pathological changes [2, 5].

Table 1. The mean (SD) of expression of TNF- α , MDA in macrophage cells and CGRP in sensory nerve cells after the application of 25 ppm and 75 ppm topical EGCG hydrogels

Groups	TNF- α	MDA	CGRP
N	3.17 (0.75) ^a	3.17 (0.75) ^a	2.33 (0.52) ^a
C	8.00 (0.89) ^b	3.37 (0.82) ^a	6.17 (1.17) ^b
T1	5.50 (1.52) ^b	3.90 (0.79) ^a	3.00 (0.89) ^b
T2	3.83 (0.75) ^a	3.39 (0.86) ^a	2.67 (0.82) ^b

Different superscript denotes a significant difference ($P < 0.05$)

study were consistent with Khan *et al.* [34], which confirmed that galloyl and hydroxyl group of EGCG would inhibit gene transcription to release TNF- α . Higher number of galloyl groups in catechin caused a stronger ability in binding free radicals, resulting in higher inhibition of TNF- α [35].

The application of both 25 ppm and 75 ppm topical EGCG hydrogels significantly inhibited the expression of CGRP, compared to control group, but have no significant difference compared to normal teeth with healthy pulp group. This was possibly due to the application of EGCG which inhibits TNF- α expression [18, 29]. CGRP has little effect on the inflammatory changes of the dental pulps, but it is involved in reparative inflammatory process of pulp [11].

In contrast, there was no significant difference in MDA expression in normal teeth, in teeth with 6-h inflammation and in teeth treated with 25 and 75 ppm of EGCG hydrogels for 2x24 h. MDA expression is a marker of cell membrane damage. It is possibly due to the limited duration of the inflammation, which caused no damage in cell membrane resulting in minimal MDA expression. The minimal MDA expression was also showed in C group after 6 h pulpal inflammation. There was a significant decrease in TNF- α expression between treatment groups, which suggested that the applications of 75 ppm topical EGCG hydrogels produced a superior anti-inflammatory effect by inhibiting TNF- α expression, compared to those of 25 ppm. However, there was no significant difference in expression of CGRP and MDA MDA between 25 ppm and 75 ppm of EGCG hydrogels groups.

Conclusion

The application of 75 ppm topical EGCG hydrogels to the tooth cavities of Wistar rats with 6 h of pulpal inflammation has the optimal result in reducing the expression of TNF- α and CGRP, but could not inhibit MDA. Considering the EGCG components like polyphenolic substances can be used for various purposes in endodontics and would have a promising role in future medicine as well as dentistry.

Acknowledgement

The author would like to thank the Ministry of Research, Technology and Higher Education for an Excellence in Higher Education Institution Basic Research grant of 2018 which represented the funding for this research.

Conflict of Interest: 'None declared'.

References

1. Chung MK, Lee J, Duraes G, Ito JY. Lipopolysaccharide-induced pulpitis up-regulates TRPV1 in trigeminal ganglia. *J Dent Res*. 2011;90(9):1103-7.
2. Nair P. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15(6):348-81.
3. Rueda-Chontal M, Zarzeta C. Redox activation of Nrf2 & NF- κ B: a double-edged sword? *Cell Signal*. 2013;25(12):2548-57.
4. Naik E, Dixit VM. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *J Exp Med*. 2011;208(3):417-20.
5. Li JG, Lin J, Wang ZL, Cai WK, Wang PX, Jia Q, Zhang AS, Wu GY, Zhu GX, Ni LX. Melatonin attenuates inflammation of acute pulpitis subjected to dental pulp injury. *Am J Transl Res*. 2015;7(1):66.
6. Yadav U, Ramana KV. Regulation of NF- κ B-induced inflammatory signaling by lipid peroxidation-derived aldehydes. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013.
7. Vardeh D, Wang D, Costigan M, Lazarus M, Soper CB, Woolf CJ, FitzGerald GA, Samad TA. COX2 in CNS neural cells mediates mechanical inflammatory pain hypersensitivity in mice. *J Clin Invest*. 2009;119(2):287-94.
8. Yaprak M. The axon reflex. *Neuroanatomy*. 2008;7(17):19-22.
9. Chung G, Oh SB. TRP channels in dental pain. *Open Pain J*. 2013;6(1):31-6.
10. Ebenezar AR, Mary AV, Kumar RA, Srinivasan M, Indra R, Ramachandran S. Role of Neuropeptides in Pulpal Pathosis-An Overview. *Inter J Dent Sci*. 2009;8(2):1-4.
11. Haghghi AK, Nafarzadeh S, Shantiae Y, Naseri M, Ahangari Z. Relation between pulpal neuropeptides and dental caries. *Iran Endod J*. 2010;5(3):113.
12. Mousavi SA, Ghodusi J, Mohtasham N, Shahnasari S, Paymanpour F, Kinoshita JI. Human pulp response to direct pulp capping and miniature pulpotomy with MTA after application of topical desamethasone: A Randomized clinical trial. *Iran Endod J*. 2016;11(2):85.
13. Zand V, Lutfi M, Aghbol A, Mesgariabassi M, Janani M, Mokhtari H, Tehranchi P, Pakdel SMV. Tissue reaction and biocompatibility of implanted mineral trioxide aggregate with silver nanoparticles in a rat model. *Iran Endod J*. 2016;11(1):13.
14. Haghgoo R, Abbasi F. A histopathological comparison of pulpotomy with sodium hypochlorite and formocresol. *Iranian endodontic journal*. 2012;7(2):40.
15. Escobar-García M, Rodríguez-Cotreras K, Rutz-Rodríguez S, Pierdant-Pérez M, Cerda-Cristerna B, Pisos-Guillen A. Eugenol toxicity in human dental pulp fibroblasts of primary teeth. *J Clin Pediatr Dent*. 2016;40(4):312-8.
16. Prashar A, Locke IC, Evans CS. Cytotoxicity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil and its major components to human skin cells. *Cell Prolif*. 2006;39(4):243-8.

17. Shay I, Hbar HA, Lee I, Zielske SP, Malek MH, Huttenmann M. Molecular mechanisms and therapeutic effects of (-)-epicatechin and other polyphenols in cancer, inflammation, diabetes, and neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015.
18. Kim TH, Lim JM, Kim SS, Kim J, Park M, Song JH. Effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on Na⁺ currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Eur J Pharmacol*. 2009;604(1-3):20-6.
19. Ren X, Guo X, Chen L, Guo M, Peng N, Li R. Attenuated migration by green tea extract (-)-epigallocatechin gallate (EGCG): involvement of 67 kDa laminin receptor internalization in macrophagic cells. *Food Funct*. 2014;5(8):1915-9.
20. Abangari Z, Naseri M, Vatandoost F. Propolis: Chemical Composition and Its Applications in Endodontics. *Iran Endod J*. 2018;13(3):285.
21. Guyton HC, Hall JE. *Textbook of medical physiology*. 11th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011.
22. Kuang X, Huang Y, Gu HF, Zu XY, Zou WY, Song ZB, Guo QL. Effects of intrathecal epigallocatechin gallate, an inhibitor of Toll-like receptor 4, on chronic neuropathic pain in rats. *Eur J Pharmacol*. 2012;676(1):51-6.
23. Zhang Y, Jia YY, Guo JL, Liu PQ, Jiang JM. Effects of (-)-gallocatechin-3-gallate on tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channels in rat dorsal root ganglion neurons. *Int J Mol Sci*. 2013;14(5):9779-89.
24. Weisburg JH, Weissman DB, Sedaghat T, Babich H. In vitro cytotoxicity of epigallocatechin gallate and tea extracts to cancerous and normal cells from the human oral cavity. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2004;95(4):191-200.
25. Knop K, Hoogerboom R, Fischer D, Schubert US. Poly (ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2010;49(36):6288-308.
26. Bishri N, Goswami L, Kothiyal P. Preparation and evaluation of in-situ oral topical gel of levofloxacin by using combination of polymers. *Indian J Drugs*. 2014;2(4):142-51.
27. Allen LV, Popovich NG, Ansel HC. *Ansel's pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems*. 9th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
28. St-Jacques B, Ma W. Role of prostaglandin F2 in the synthesis of the pro-inflammatory cytokine interleukin-6 in primary sensory neurons: an in vivo and in vitro study. *J Neurochem*. 2011;118(5):841-54.
29. Caviades-Buchdi J, Muñoz HR, Azuero-Holgúin MM, Ulate E. Neuropeptides in dental pulp: the silent protagonists. *J Endod*. 2008;34(7):773-88.
30. Meng J, Orseppan SV, Wang J, Pickering M, Sasse A, Aoki KR, Lawrence GW, Dally JR. Activation of TRPV1 mediates calcitonin gene-related peptide release, which excites trigeminal sensory neurons and is attenuated by a retargeted botulinum toxin with anti-nociceptive potential. *J Neurosci*. 2009;29(15):4981-92.
31. Burden F, Chakras A, Szumilo J. Cyclooxygenase and prostanooids-biological implications. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2006;60:129-41.
32. Kim HS, Quon MJ, Kim JA. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties: lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. *Redox Biol*. 2014;2:187-95.
33. Jung HH, Lee DE, Yun JH, Cho AR, Kim CS, You YI, Kim SJ, Choi SH. Anti-inflammatory effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-stimulated fibroblasts and stem cells derived from human periodontal ligament. *J Periodontol Implant Sci*. 2012;42(6):185-95.
34. Khan N, Afaq F, Saleem M, Ahmad N, Mukhtar H. Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Res*. 2006;66(5):2500-5.
35. Cai YI, Ma LP, Hou JF, Zhou B, Yang L, Liu ZL. Antioxidant effects of green tea polyphenols on free radical initiated peroxidation of rat liver microsomes. *Chem Phys Lipids*. 2002;120(1):109-17.

Please cite this paper as Ismiyatin K, Wahjono S, Purwanto DA, Pahayu RP, Sostoto A, Muknos IS. Effect of Topical Epigallocatechin Gallate on Lipopolysaccharide-induced Pulpal Inflammation in Rat Models. *Iran Endod J*. 2018;13(4):528-33. Doi: 10.22037/iej.v13i4.21226

