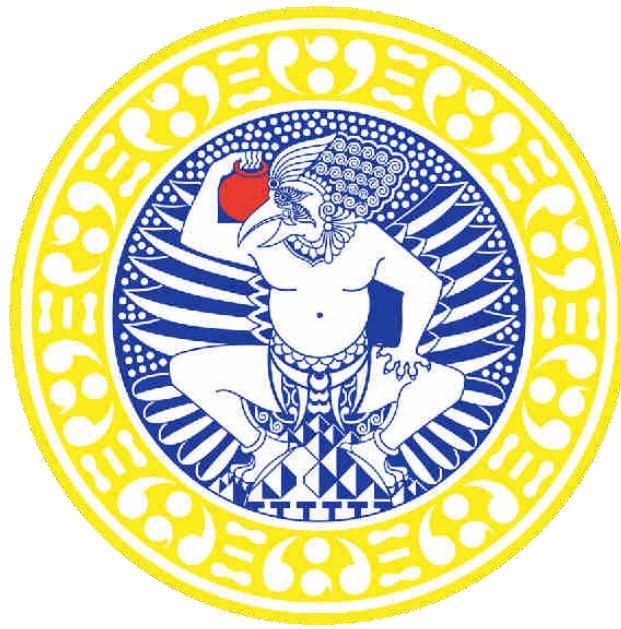


**KARYA TULIS AKHIR**

**EFEK KOMBINASI EKSTRAK TEH HIJAU DENGAN KALSIUM  
HIDROKSIDA SERTA EKSTRAK KULIT BUAH COKLAT DENGAN  
KALSIUM HIDROKSIDA TERHADAP AKTIVASI MAPK P38  
DAN LUAS DENTIN REPARATIF**



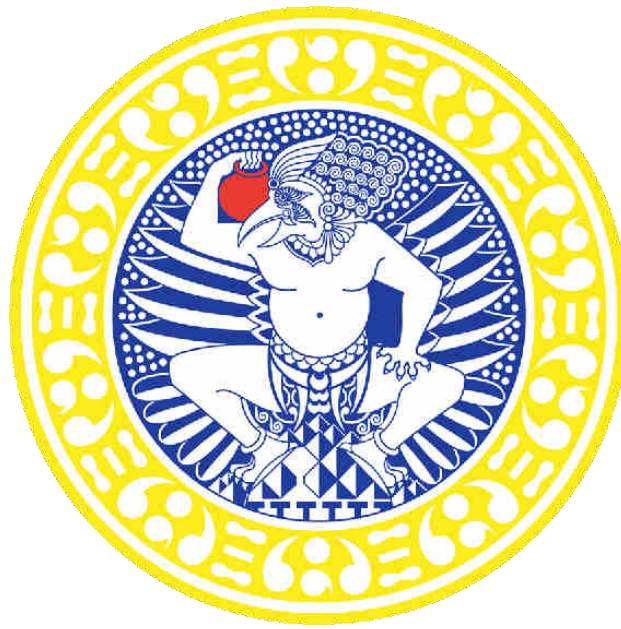
**DEAVITA DINARI**

**021718036302**

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER GIGI SPESIALIS  
DEPARTEMEN ILMU KONSERVASI GIGI  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
2019**

**KARYA TULIS AKHIR**

**EFEK KOMBINASI EKSTRAK TEH HIJAU DENGAN KALSIUM  
HIDROKSIDA SERTA EKSTRAK KULIT BUAH COKLAT DENGAN  
KALSIUM HIDROKSIDA TERHADAP AKTIVASI MAPK P38  
DAN LUAS DENTIN REPARATIF**



**DEAVITA DINARI**

**021718036302**

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER GIGI SPESIALIS  
DEPARTEMEN ILMU KONSERVASI GIGI  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
2019**

**LEMBAR PENGESAHAN**

**EFEK KOMBINASI EKSTRAK TEH HIJAU DENGAN KALSIUM  
HIDROKSIDA SERTA KOMBINASI EKSTRAK KULIT BUAH  
COKLAT DENGAN KALSIUM HIDROKSIDA TERHADAP AKTIVASI  
MAPK P38 DAN LUAS DENTIN REPARATIF**

**KARYA TULIS AKHIR**

Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Menyelesaikan  
Pendidikan Dokter Gigi Spesialis Program Studi Ilmu Konservasi Gigi  
di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya

Oleh:

**Deavita Dinari**  
**NIM. 021718036302**

Menyetujui

Pembimbing Utama

**Prof. Dr. Tamara Yuanita, drg., MS., Sp.KG(K)**  
NIP. 196006251986012002

Pembimbing Serta

**Edhie Arief Prasetyo, drg., M.Kes., Sp.KG(K)**  
NIP. 195504061981031004

Mengetahui

Koordinator Program Studi Ilmu Konservasi Gigi

**Dr. Kun Ismiyatin, drg., M.Kes., Sp.KG(K)**  
NIP. 196004021986012001

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER GIGI SPESIALIS  
PROGRAM STUDI ILMU KONSERVASI GIGI  
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2019**

**PENETAPAN PANITIA PENGUJI  
KARYA TULIS AKHIR**

**Karya tulis akhir ini telah diuji**

Hari : Kamis

Tanggal : 12 Desember 2019

**PANITIA PENGUJI KARYA TULIS AKHIR:**

1. Prof. Dr. Tamara Yuanita drg., M.Kes., SpKG(K) ( Pembimbing Utama)
2. Edhie Arif P.drg., M.Kes., SpKG(K) ( Pembimbing Serta)
3. Prof. Dr. Sri Kunarti P., drg., M.Sc., SpKG(K) ( Ketua Penguji)
4. Prof. Dr. Latief Mooduto, drg., MS., SpKG ( Anggota Penguji)
5. Nanik Zubaidah, drg., M.Kes., SpKG(K) ( Anggota Penguji)

## SURAT PERNYATAAN ORISINALITAS

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Deavita Dinari

NIM : 021718036302

Program Studi : Pendidikan Dokter Gigi Spesialis Ilmu Konservasi Gigi

Fakultas : Kedokteran Gigi

Universitas : Airlangga

Jenjang : Spesialis (Sp)

Menyatakan bahwa saya tidak melakukan plagiat dalam penelitian tugas akhir saya yang berjudul:

**APLIKASI KOMBINASI KALSIUM HIDROKSIDA DENGAN EKSTRAK KULIT  
BUAH COKLAT SERTA KALSIUM HIDROKSIDA DENGAN EKSTRAK TEH  
HIJAU TERHADAP AKTIVASI MAPK P38 DAN  
LUAS DENTIN REPARATIF**

Demikian surat pernyataan ini saya buat dengan sebenar- benarnya.

Surabaya, 12 Desember 2019  
Yang membuat surat pernyataan



Deavita Dinari  
NIM. 02171803630

## UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama saya panjatkan puji syukur ke hadirat Allah subhanahuwataala atas segala rahmat dan karunia-Nya, sehingga karya tulis akhir ini dapat terselesaikan. Penyelesaian karya tulis akhir ini tidak lepas dari bantuan dan dorongan dari berbagai pihak, maka dari itu dengan hati yang tulus dan penuh rasa syukur, terima kasih dan penghargaan saya ucapkan kepada yang terhormat:

1. Rektor Universitas Airlangga, Prof.Dr. Mohammad Nasih, SE., MT., Ak., CMA, atas kesempatan untuk menyelesaikan karya tulis akhir pada Program Pendidikan Dokter Gigi Spesialis Konservasi Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga

2. Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Dr.R. Darmawan Setijanto, drg., MKes atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti program pendidikan dokter gigi spesialis Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga

3. Dr. Ira Widjiastuti drg., MKes., SpKG (K) selaku Ketua Departemen Konservasi Gigi dan seluruh staf Departemen Konservasi Gigi atas bimbingan dan bantuan selama masa pendidikan saya.

4. Prof. Dr. Tamara Yuanita drg., M.Kes., SpKG (K) selaku pembimbing utama serta drg. Edhie Arif P.M.Kes., SpKG(K) selaku pembimbing serta sekaligus dosen wali, yang telah dengan sabar membimbing dan memotivasi selama proses pengerjaan karya tulis akhir ini.

5. Prof. Dr. Sri Kunarti P., drg., M.Sc., SpKG(K), Prof. Dr. Latief Mooduto, drg., MS., SpKG, dan Nanik Zubaidah, drg., M.Kes., SpKG(K) selaku penguji karya tulis akhir ini atas segala kritik dan masukan serta bimbingan yang diberikan.

6. Dra.Ec. Dyah Ratnawati H. MM dan Dr.Sukatun, drg., M.Kes., SpKG(K) selaku orang tua saya yang telah menyemangati dan senantiasa sabar menemani saya serta mendukung dalam menjalani pendidikan spesialis saya

7. Pak Wibi Riawan, S,Si selaku staf departemen Biokimia dan Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah membimbing dan membantu dalam proses pembacaan preperat serta imunohistokimia dalam penelitian karya tulis akhir ini

8. Bapak Heri, Bapak Udin, serta Mbak dyah yang telah membantu pemeliharaan tikus serta pembuatan preperat.

9. Teman-teman peserta didik program pendidikan spesialis Konservasi Gigi Universitas Airlangga angkatan tahun 2017, saya sampaikan terima kasih atas segala kerjasama dan bantuan selama bersama-sama menjalani pendidikan.

Terima kasih saya sampaikan kepada semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu yang telah memotivasi dan membantu sehingga karya tulis akhir ini dapat saya selesaikan.

Semoga hasil penelitian ini dapat bermanfaat untuk kemajuan dunia kedokteran gigi, umat manusia dan ilmu pengetahuan. Aamiin.

Surabaya,10 Februari 2020

Deavita Dinari

***Combination Effect of Calcium Hydroxide with Green Tea Extract and Calcium Hydroxide with Cocoa Pod Husk Extract to MAPK P38 Activation and Reparative Dentin Wide***

***Abstract***

***Background:*** Dental pulp could be affected by external factors such as caries or trauma. The treatment of choice to this condition for vital pulp is to clean the cavity from the infected tissue and the pulp capping. Calcium hydroxide as a gold standard of the pulp capping treatment has several weakness: lack of dentin adaptation, not increasing odontoblast differentiation consistently, and also show cytotoxic reaction on cell culture which cause tunnel defect in the formed reparative dentin matrix. Green tea and cocoa pod husk have been widely researched because of the polifenol content for its anti-inflammation and antioxidant properties. ***Purpose:*** the purpose of this research is to compare the combination effect of calcium hydroxide with green tea extract and calcium hydroxide with cocoa pod husk extract to mapk p38 activation and formed of reparative dentin wide. ***Methods:*** thirty six male wistar rats were dividing to six groups, anesthetized and perforated on the first upper molar. The first and fourth groups were given the combination of calcium hydroxide and distilled water then filled with cention. The second and fifth groups were given the combination of cocoa pod husk extract and calcium hydroxide then filled with cention. the third and sixth groups were given the combination of green tea extract and calcium hydroxide then filled with cention. The first to third groups were observed at the 7<sup>th</sup> day, the fourth to sixth groups was given the same application as first to third groups then observed at the 28<sup>th</sup> day. All the samples were coloured with hematoxilin-aeosin to see the reparative dentin wide area on the day 28<sup>th</sup> and also immunohistochemistry to count the activated p38 cells on the day 7<sup>th</sup> and 28<sup>th</sup> then observed under the 400x magnification microscope. ***Conclusion:*** The green tea extract and calcium hydroxide combination group is better than cocoa pod husk extract and calcium hydroxide combination group towards MAPK p38 activation and the reparative dentin wide.

***Keywords:*** pulp capping, green tea extract, cocoa pod husk extra



**DAFTAR ISI**

<b>Sampul Depan</b> .....	i
<b>Lembar Pengesahan</b> .....	ii
<b>PENETAPAN PANITIA PENGUJI</b> .....	iii
<b>SURAT KETERANGAN ORISINALITAS</b> .....	iv
<b>UCAPAN TERIMA KASIH</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	viii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xii
<b>DAFTAR TABEL DAN GRAFIK</b> .....	xiii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xiv
<b>DAFTAR SINGKATAN</b> .....	xv
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b> .....	i
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	4
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1. Tujuan umum .....	4
1.3.2. Tujuan khusus.....	5
1.4. Manfaat Penelitian.....	5
1.4.1. Manfaat Teoritis .....	5
1.4.2. Manfaat Praktis.....	5
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	6

2.1. Histologi dan Fisiologi Jaringan Pulpa .....	6
2.2. Inflamasi Pulpa .....	7
2.3. Proses Penyembuhan Pulpa .....	8
2.3.1. Dentin reparatif.....	8
2.4. <i>Mitogen- Activated Protein Kinase</i> (MAPK) P38 .....	9
2.5 Pulp Capping .....	11
2.5.1 <i>Indirect pulp capping</i> .....	11
2.4.2. <i>Direct pulp capping</i> .....	12
2.6. Kalsium hidroksida.....	12
2.7. Buah Kakao .....	14
2.8. Teh hijau.....	16
2.9. Gigi Molar Tikus Sebagai Model Studi Penelitian Kedokteran Gigi.....	17
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL &amp; HIPOTESIS PENELITIAN.....</b>	<b>20</b>
3.1. Kerangka Konseptual.....	20
3.2. Penjelasan Kerangka Konseptual.....	21
3.3. Hipotesis Penelitian.....	23
<b>BAB 4 METODE PENELITIAN.....</b>	<b>24</b>
4.1. Jenis Penelitian.....	24
4.2. Rancangan Penelitian.....	24
4.3. Tempat dan Waktu Penelitian.....	25
4.3.1. Tempat Penelitian .....	25
4.3.2. Waktu Penelitian.....	25
4.4. Sampel Penelitian.....	26

4.4.1. Sampel Penelitian.....	26
4.4.2. Kriteria Sampel Penelitian.....	26
4.4.3. Jumlah Sampel.....	26
4.5. Variabel Penelitian.....	27
4.5.1. Variabel Bebas.....	27
4.5.2. Variabel Terikat.....	27
4.5.3. Variabel Terkendali .....	28
4.6. Definisi Operasional.....	28
4.7. Alat dan Bahan Penelitian.....	29
4.7.1. Alat Penelitian.....	29
4.7.2. Bahan Penelitian.....	29
4.8. Prosedur Pelaksanaan Penelitian.....	30
4.8.1. Sterilisasi Alat dan Bahan.....	30
4.8.2. Pembuatan Ekstrak Kulit Teh Hijau,.....	31
4.8.3. Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Coklat.....	31
4.8.4. Tahap Persiapan.....	32
4.8.5. Tahap Pengelompokan Subyek.....	32
4.8.6. Tindakan Pada Kelompok Perlakuan.....	33
4.8.7. Pengamatan Pada Hewan Coba.....	34
4.8.7.1. Pembuatan Sediaan Preparat Histologis.....	34
4.8.7.2. Pengamatan Preparat Histologis.....	35
4.9. Analisis Data.....	36
4.10. Alur Penelitian.....	37

<b>BAB 5 HASIL PENELITIAN.....</b>	<b>38</b>
5.1. Pemeriksaan Histopatologi Anatomi .....	38
5.2. Pemeriksaan Imunohistokimia.....	41
<b>BAB 6 PEMBAHASAN.....</b>	<b>48</b>
<b>BAB 7 PENUTUP.....</b>	<b>51</b>
7.1. Kesimpulan.....	51
7.2. Saran.....	51
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>52</b>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Buah Kakao.....	12
Gambar 2.2. Tanaman Teh Hijau.....	13
Gambar 2.3. a. Tampak inferior ranium dan maksila tikus, b. Gigi molar rahang atas tikus dilihat dengan mikroskop cahaya perbesaran 40x.....	16
Gambar 5.1. Hasil pewarnaan HE pada hari ke-7.....	40
Gambar 5.2. Hasil pewarnaan HE pada hari ke-28.....	40
Gambar 5.3. Hasil pemeriksaan IHC pada hari ke-7.....	41
Gambar 5.4. Hasil pemeriksaan IHC pada hari ke- 28.....	41

## DAFTAR TABEL DAN GRAFIK

Tabel 5.1. Hasil perhitungan nilai rerata dan standar deviasi daerah <i>dentin bridge</i> pada hari ke- 28.....	42
Grafik 5.1 Grafik nilai rerata perhitungan <i>dentin bridge</i> .....	43
Tabel 5.2 Uji beda antar kelompok perlakuan menggunakan <i>Multiple Comparison</i> Tukey pada perhitungan <i>dentin bridge</i> hari ke- 28.....	43
Tabel 5.3 Hasil nilai rerata dan standar deviasi aktivasi MAPK P38 pada hari ke-7 dan 28.....	44
Grafik 5.2 Grafik nilai rerata 3 kelompok perlakuan terhadap P38 pada hari ke-7 dan ke-28 .....	45
Tabel 5. 4 Uji beda antar kelompok menggunakan <i>Multiple Comparison</i> Tukey HSD pada aktivasi P38 hari ke- 7.....	46
Tabel 5. 5 Uji beda antar kelompok menggunakan <i>Multiple Comparison</i> Tukey HSD pada aktivasi P38 hari ke- 28.....	46
Tabel 5.6 Uji beda antar waktu pengamatan menggunakan independent t-test pada aktivasi MAPK P38.....	47

**DAFTAR LAMPIRAN**

LAMPIRAN 1.....	57
LAMPIRAN 2.....	58
LAMPIRAN 3.....	59

## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1. Latar Belakang

Pulpa adalah jaringan lunak yang dikelilingi oleh dentin. Jaringan pulpa gigi terdiri dari beberapa jenis sel seperti odontoblas, fibroblas, makrofag, sel-sel dendritik, juga sel-sel mesenkimal lain yang tidak berdiferensiasi yang mengatur sistem homeostasis dari kompleks dentin-pulpa (Hosoya & Nakamura, 2015). Adanya sel seperti *stem cell* serta fibroblas, membuat pulpa dapat membentuk dentin sepanjang hidupnya (Garg & Garg, 2014).

Pembentukan jaringan keras oleh odontoblas, fibroblas, dan sel-sel pulpa merupakan respon perlindungan yang penting terhadap stimuli dari luar (Hosoya & Nakamura, 2015). Respon selular karena adanya rangsangan ekstraselular diperantarai melalui jalur penanda seperti jalur *mitogen-activated protein* (MAP) kinase. MAP kinase adalah bagian dari kaskade penanda yang berlainan dan berperan sebagai titik fokus dalam respon terhadap berbagai rangsangan ekstraseluler. Aktivasi p38 telah diamati pada respon terhadap berbagai rangsangan ekstraseluler pada berbagai organisme. P38 dari mamalia menunjukkan peran yang serupa dan aktivasi telah menunjukkan kemunculannya dalam respon terhadap rangsangan ekstraseluler seperti sinar UV, panas, syok osmotik, sitokin inflamasi (TNF- $\alpha$  & IL-1), dan *growth factors* (CSF-1) (Zarubin and Han, 2005). Stimulasi dari *odontoblast-like cells* oleh beberapa *growth factors*, sebagai model *in vitro* dari dentinogenesis tersier, atau dengan *Streptococcus mutans*, sebagai model *in vitro* dari karies, menyebabkan



peningkatan fosforilasi p38 dan translokasi produknya mulai hari pertama hingga hari ke-7 puncaknya (Simon *et al.* 2010).

Respon dari intensitas kerusakan jaringan yang lebih tinggi seperti lesi karies yang dalam dapat menyebabkan kematian sel odontoblas dan hilangnya jaringan dentin di bawah lesi tersebut sehingga berujung pada tereksposnya jaringan pulpa dan terbentuknya dentin reparatif. Pada keadaan tertentu, apabila kondisi kondusif tercapai untuk perbaikan, sel-sel progenitor/stem sel akan direkrut ke daerah yang mengalami kerusakan di mana sel-sel tersebut akan berdiferensiasi untuk membentuk *odontoblast-like cells* (Cooper *et al.*, 2014).

Pulpa gigi dapat terkena rangsangan dari luar seperti karies ataupun trauma. Perawatan yang dapat menjadi pilihan apabila ditemukan pulpa masih dalam keadaan vital atau reversibel adalah pembersihan kavitas gigi dari jaringan yang terinfeksi kemudian dilakukan *pulp capping* (Octiara, 2015). *Direct pulp capping* adalah perawatan di bidang konservasi gigi yang melibatkan peletakan bahan biokompatibel pada jaringan pulpa yang secara tidak sengaja terekspos oleh karena trauma ataupun faktor iatrogenik. Beberapa tujuan dari perawatan tersebut adalah untuk melindungi pulpa dari masuknya bakteri, untuk merangsang pulpa memulai pembentukan dentin reparatif serta mempertahankan jaringan pulpa yang sehat (Parolia *et al.*, 2010). Setelah terbukanya pulpa dilanjutkan dengan aplikasi material yang sesuai (material *pulp capping*), dentin reparatif dapat diamati dalam beberapa minggu oleh *odontoblast-like cells* yang baru (Larjaya, 2012) serta terbentuknya *dentin bridge* pada minggu ke -4 setelah aplikasi kalsium hidroksida (Njeh *et al.*, 2016).

Kalsium hidroksida telah menjadi standard terapi sebagai bahan *pulp capping* sejak lama, namun seiring berjalannya waktu ditemukan adanya kekurangan dari kalsium hidroksida, antara lain tidak adanya adaptasi dengan dentin, tidak meningkatkan diferensiasi odontoblas secara konsisten, dan telah menunjukkan reaksi sitotoksik pada kultur sel, yang berakibat adanya *tunnel defect* pada matriks dentin reparatif yang terbentuk (Koike *et al.*, 2014). Berdasarkan kelemahan-kelemahan yang telah disebutkan, sejumlah bahan diajukan sebagai kandidat untuk digunakan dalam perawatan *direct pulp capping*. (Parolia *et al.*, 2010)

Tanaman teh (*Camelia sinensis*) diduga berasal dari Asia Tenggara. Pada tahun 2737 SM teh sudah dikenal di Cina, bahkan sejak abad ke-4 telah dimanfaatkan sebagai salah satu komponen ramuan obat (Ghani, 2002). Teh hijau dapat dikategorikan tidak toksik serta mengandung senyawa polifenol yang termasuk di dalamnya adalah flavonoid terutama flavanols dan flavonols yang setara 30% dari berat daun kering (Pambudi, 2000, Sundari *et al.*, 2009). Polifenol ialah antioksidan yang kekuatannya 100 kali lebih efektif dibanding dengan vitamin C dan 25 kali lebih tinggi dibanding dengan vitamin E. Selain itu, diduga polifenol teh hijau juga mempunyai aktivitas sebagai antiinflamasi dan antialergi. Salah satu kandungan polifenol adalah *epigallocatechingallate* (EGCG) yang berperan dalam merangsang pembentukan interleukin-1 alpha (IL-1 $\alpha$ ), interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), *tumor necrosis factor* alpha (TNF-  $\alpha$ ) (Maeda T, 2007; Tachibana, 2011). Pada uji toksisitas akut (LD<sub>50</sub>) menunjukkan bahwa ekstrak teh hijau pada konsentrasi 100% secara per oral pada mencit termasuk kategori *practically non toxic* (PNT) (Sundari *et al.*, 2009)

Selain teh hijau, bahan lain yang dapat digali potensinya adalah kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*). Kulit buah kakao mempunyai komposisi kimia yang cukup kompleks, antara lain berupa senyawa fenolik, alkaloid, flavonoid, tanin, saponin dan triterpenoid. (Nursal, 2006; Lawalata, 2012). Kulit buah kakao memiliki potensial sebagai anti inflamasi, antioksidan dan antimikroba alami karena memiliki kandungan polifenol dalam bentuk flavonoid atau tannin yang terkondensasi (Izzudin, 2015). Berdasarkan penelitian Fajriani (2016), obat kumur berbahan dasar biji kakao, dengan kandungan utama polifenol, dapat menurunkan jumlah koloni *Streptococcus Mutans* pada saliva anak-anak. Kulit buah coklat pada konsentrasi 750µg/ml terbukti toksik pada sel fibroblas ligamen periodontal manusia (Heriawan, 2018).

Berdasarkan kekurangan dari bahan-bahan *pulp capping* sebelumnya serta potensi dari teh hijau dan kulit buah kakao sebagai bahan alami yang telah disebutkan, maka penulis tertarik untuk mengkombinasikan bahan-bahan tersebut sebagai bahan alternatif *pulp capping* dengan indikator p38 serta luas dentin reparatif.

## **1.2. Rumusan Masalah**

- Apakah ada perbedaan pada aktivasi mapk p38 setelah aplikasi kombinasi ekstrak teh hijau dengan kalsium hidroksida dibandingkan dengan kombinasi ekstrak kulit buah coklat dengan kalsium hidroksida?
- Apakah ada perbedaan pada luas dentin reparatif setelah aplikasi kombinasi ekstrak teh hijau dengan kalsium hidroksida dibandingkan

dengan kombinasi ekstrak kulit buah coklat dengan kalsium hidroksida?

### **1.3. Tujuan**

#### **1.3.1. Tujuan Umum**

Untuk mengetahui perbedaan terhadap aktivasi mapk p38 serta luas dentin reparatif dengan aplikasi kombinasi ekstrak teh hijau dengan kalsium hidroksida dan kombinasi ekstrak kulit buah coklat dengan kalsium hidroksida.

#### **1.3.2 Tujuan Khusus**

Untuk membandingkan aktivasi mapk p38 serta luas dentin reparatif antara aplikasi kombinasi ekstrak teh hijau dengan kalsium hidroksida dan kombinasi ekstrak kulit buah coklat dengan kalsium hidroksida.

### **1.4. Manfaat**

#### **1.4.1. Manfaat Teoritis**

Memberikan kontribusi keilmuan mengenai perbedaan aktivasi mapk p38 serta luas dentin reparatif antara aplikasi kombinasi ekstrak teh hijau dengan kalsium hidroksida dan kombinasi ekstrak kulit buah coklat dengan kalsium hidroksida.

#### **1.4.2. Manfaat Praktis**

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar upaya pengembangan kombinasi kalsium hidroksida dengan ekstrak bahan alami sebagai alternatif material pada perawatan *pulp capping*

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Histologi dan Fisiologi Jaringan Pulpa

Pulpa adalah jaringan lunak yang berasal dari sel-sel ektomesenkimal dental papilla yang berada di dalam rongga gigi dan dilapisi oleh enamel dan dentin. Jaringan pulpa gigi terdiri dari beberapa jenis sel seperti odontoblas, fibroblas, makrofag, sel-sel dendritik, juga sel-sel mesenkimal lain yang tidak berdiferensiasi yang mengatur sistem homeostasis dari kompleks dentin-pulpa (Hosoya & Nakamura, 2015). Karena adanya sel-sel seperti fibroblas dan stem sel, yaitu sel yang dapat berdiferensiasi menjadi sel-sel yang dapat menghasilkan jaringan keras, pulpa memiliki kemampuan untuk membentuk dentin sepanjang hidupnya. Hal ini memungkinkan pulpa vital untuk secara parsial mengkompensasi kehilangan enamel dan dentin (Garg & Garg, 2014).

Jaringan pulpa terdiri dari sel-sel progenitor atau disebut *stem cell*, yang dapat berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi *odontoblast-like cell* sehingga dapat membentuk dentin. Odontoblas yang rusak dapat digantikan oleh populasi baru dari *stem cell* dari pulpa. Stimulasi fisiologis atau trauma, seperti karies dan prosedur operatif, dapat menyebabkan adanya pergerakan, proliferasi, dan diferensiasi *stem cell* menjadi *odontoblast-like cell* yang dipengaruhi oleh adanya morfogen yang dikeluarkan dari matriks dentin di sekitarnya (Iohara *et al.*, 2004).

Sel-sel progenitor atau *stem cells* terdapat di dalam pulpa dalam keadaan dormant atau laten, dan jarang terdapat pada pulpa yang sehat, sedangkan dalam keadaan inflamasi, secara umum terdapat peningkatan jumlah sel-sel pulpa, namun tidak diketahui, apakah peningkatan ini berhubungan dengan proliferasi

fibroblast, atau menandakan adanya migrasi yang besar dari sel-sel inflamasi, atau proliferasi dari *stem cell* (Goldberg *et al.*, 2008).

Beberapa sel pulpa mengekspresikan MHC *class II* yang berperan pada reaksi imun. Sel-sel imun terdapat pada pulpa baik dalam keadaan normal maupun patologis. Pada pulpa normal, sel-sel imun meregulasi jumlah dari populasi sel, dan memegang peran penting dalam kontrol proliferasi dan apoptosis sel. Sel-sel imun juga berkontribusi pada pulpa yang terbuka. Sel-sel ini utamanya adalah sel dendritik dan makrofag yang dapat mengaktivasi limfosit-T (Goldberg *et al.*, 2008).

## **2.2. Inflamasi Pulpa**

Penetrasi bakteri dari lapisan paling luar enamel sampai perbatasan pulpa-dentin merangsang proses inflamasi dan imun pada jaringan pulpa di bawahnya dengan cara difusi produk-produk bakteri melalui tubulus dentin. Kejadian ini dapat dicegah keberlanjutannya, jika odontoblas membentuk dentin reaksioner atau dentin reparatif, sehingga serangan bakteri dapat dihilangkan dan memblokir rute infeksi. Invasi bakteri yang terjadi tanpa diikuti reaksi odontoblas, atau pada kasus kematian sel-sel odontoblas, dapat berlanjut dan menyebabkan pulpitis irreversible, nekrosis pulpa, dan terbentuknya lesi periapikal.

Inflamasi pada gigi, selama bertahun-tahun dianggap sebagai faktor negatif yang mengarah pada destruksi pulpa melalui proses nekrosis maupun apoptosis, namun studi-studi terkini menyatakan bahwa reaksi inflamasi merupakan penanda awal keluarnya sel-sel progenitor yang berhubungan dengan proses penyembuhan pulpa (Goldberg *et al.*, 2008).

## 2.3. Proses Penyembuhan Pulpa

### 2.3.1. Dentin Reparatif

Dentin reparatif terbentuk lokal dalam rangka respon terhadap rangsangan seperti karies, atrisi, abrasi, dan prosedur operatif. Setelah kerusakan lapisan odontoblas, sel-sel pulpa dentin bermigrasi pada daerah nekrosis dari daerah pulpa yang lebih dalam dan berdiferensiasi menjadi odontoblas. Selanjutnya, terbentuklah post mitotic odontoblas dan mensekresi matrik ekstra seluler, yang termineralisasi dan memberikan struktur yang unik pada dentin. Namun, basis molekuler dari diferensiasi odontoblas tidak terlalu jelas, kecuali hanya pada bagian molekul penanda, khususnya bagian dari *superfamily transforming growth factor- beta* (TGF- $\beta$ ) yang memiliki peran penting dalam meregulasi perkembangan sel, diferensiasi dan fungsinya, seperti TGF- $\beta$  dan BMP, yang telah terbukti dalam mengontrol aspek-aspek dari perkembangan gigi dan perbaikan jaringan. (Nie *et al.*, 2006)

Ketika dentin terdemineralisasi oleh karies, *dendritic cell* di dalam pulpa bertindak sebagai *antigen presenting cell* (APC). *Dendritic cell* ini kemudian bermigrasi ke lapisan odontoblast yang berhadapan langsung dengan lesi dan dekat dengan antigen. Sel limfosit-T, makrofag, neutrophil, dan limfosit-B kemudian terakumulasi di dalam pulpa, seiring dengan peningkatan serangan bakteri dan perkembangan proses inflamasi pulpa. Oleh karena itu, diasumsikan terdapat hubungan dekat antara sel-sel imun, khususnya *dendritic cell*, yang terlibat dalam tahap awal respon imun pulpa, dan odontoblast yang dapat meregulasi migrasi *dendritic cell* dan aktifitas dentinogenesis (Goldberg *et al.*, 2008).

Ketika pulpa terbuka, proses inflamasi akan menyebabkan pelepasan sitokin yang dibutuhkan untuk menginduksi pembelahan sel untuk mengganti

sel-sel pulpa yang hilang, yaitu odontoblas dan sel-sel pada *Hoehl layer* yang terkena jejas tidak dapat lagi memperbaiki jaringan, sehingga sel-sel progenitor atau *stem cell* pada pulpa dikerahkan ke daerah jejas. Sel-sel ini kemudian berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi *odontoblast-like-cell*. Faktor transkripsi juga dibutuhkan untuk memicu ekspresi gen yang dapat meningkatkan pembentukan matriks ekstraseluler oleh *odontoblast-like cell*, yang selanjutnya akan mengalami mineralisasi. Runtutan kejadian-kejadian ini akan mengarah pada terbentuknya dentin reparatif (Hu *et al.*, 1998; Goldberg *et al.*, 2008).

#### **2.4 Mitogen- Activated Protein Kinase (MAPK) P38**

Respon selular karena adanya rangsangan ekstraseluler diperantarai melalui jalur penanda seperti jalur *mitogen-activated protein* (MAP) kinase. MAP kinase adalah bagian dari kaskade penanda yang berlainan dan berperan sebagai titik fokus dalam respon terhadap berbagai rangsangan ekstraseluler. Empat subkelompok yang berbeda dalam keluarga MAP kinase yaitu: (1) *extracellular signal-regulated* kinase (ERK), (2) c-jun N-terminal atau *stress-activated protein* kinase (JNK/SAPK), (3) ERK/ big MAP kinase 1 (BMK1), dan (4) kelompok p38 dari protein kinase (Zarubin dan Han, 2005).

P38 (juga dikenal sebagai CSBP, mHOG1, RK, dan SAPK2) adalah anggota pola dasar dari jalur terkait MAPK kedua dalam sel mamalia. Modul p38 terdiri dari beberapa MAPKKK, termasuk MEKK 1 sampai 4, (MEKK1-4), MLK2 dan -3, DLK, ASK1, Tpl2 (disebut juga Cot), dan Tak1, MAPKK MEK3 dan MEK6 (masing-masing disebut juga MKK3 dan MKK6), dan empat isoform yang diketahui p38 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , dan  $\delta$ ) (Roux dan Blenis, 2004).



Aktivasi p38 telah diamati dalam respon terhadap berbagai rangsangan ekstraselular pada berbagai organisme dan homolog dari p38 telah diidentifikasi dan diklon pada ragi (Hog1 & Spc/Sty1), cacing (pmk-2), lalat (p38a, b, c), dan katak (p38). Pada ragi, jalur Hog1 & Spc/Sty1 telah terlibat dalam osmoregulasi, respon terhadap rangsangan stres ekstraselular, dan perputaran sel. P38 dari mamalia menunjukkan peran yang serupa dan aktivasi telah menunjukkan kemunculannya dalam respon terhadap rangsangan ekstraselular seperti sinar UV, panas, syok osmotik, sitokin inflamasi (TNF- $\alpha$  & IL-1), dan *growth factors* (CSF-1) (Zarubin and Han, 2005).

Semakin banyak penelitian yang menunjukkan jalur aktivasi MAPK p38 berperan penting dalam proliferasi sel, migrasi sel, dan odontogenesis (Vandomme et al. 2014, Kim et al. 2015b, Yun et al. 2015, Lin et al. 2016). Telah diketahui bahwa jalur pensinyalan MAPK p38 terlibat dalam sejumlah proses seluler penting termasuk proliferasi, diferensiasi, motilitas, apoptosis, dan pertahanan. Studi sebelumnya menunjukkan bahwa jalur pensinyalan MAPK p38 adalah salah satu jalur utama yang berperan dalam mendukung migrasi mesenkimal stem sel dan diferensiasi osteogenik saat distimulasi oleh HMGB1 protein (Lin et al. 2016). Lebih jauh lagi, beberapa studi telah melaporkan bahwa jalur pensinyalan MAPK p38 sangat penting dalam migrasi *dental pulp cell* manusia dan dentinogenesis. Vandomme et al. (2014) menemukan bahwa MAPK p38 menstimulasi baik ekspresi fosfoglukoprotein matriks ekstraseluler dan diferensiasi *dental pulp cell*. Kim et al. (2015b) menunjukkan bahwa stimulasi terhadap dental pulp cell manusia dengan *fibroblast growth factor 2* meningkatkan dentinogenesis melalui jalur transduksi p38/ERK/JNK/PI3K-Akt/NF- $\kappa$ B.

## **2.5. Pulp Capping**

Menurut *American Association of Endodontists*, *pulp capping* adalah perawatan pada pulpa terbuka dengan menutup pulpa yang terkena jejas dengan suatu bahan pelindung seperti kalsium hidroksida atau MTA untuk merangsang pembentukan dentin reparatif dan mempertahankan vitalitas pulpa (AAE.org, 2019).

Tujuan *pulp capping* adalah untuk menghilangkan iritasi ke jaringan pulpa dan melindungi pulpa sehingga jaringan pulpa dapat mempertahankan vitalitasnya, dengan demikian terbukanya jaringan pulpa dapat dihindarkan. Banyak faktor yang mempengaruhi prognosis dari perawatan *pulp capping*; kurangnya inflamasi, kontrol infeksi dan biokompatibilitas bahan yang digunakan adalah beberapa hal yang dilaporkan menjadi kunci dalam memperbaiki hasil klinis perawatan ini (Larjaya, 2012). *Pulp capping* dibagi menjadi 2, yaitu *indirect pulp capping* dan *direct pulp capping* (Walton & Torabinejad, 2012).

### **2.5.1. Indirect Pulp Capping**

*Indirect pulp capping* didefinisikan sebagai suatu prosedur dimana pulpa ditutup dengan dressing atau semen protektif yang ditempatkan di atas selapis tipis dentin yang jika dihilangkan dapat menyebabkan terbukanya pulpa. Indikasi *indirect pulp capping* yaitu pada gigi tanpa nyeri spontan atau tanpa adanya tanda pulpitis irreversible (Walton & Torabinejad, 2012).

Pada perawatan *indirect pulp capping* dua tahap, biasanya dilakukan pembersihan jaringan yang terkena karies pada dinding dan daerah *dentino enamel junction* di sekitar kavitas gigi. Daerah dengan karies dentin yang dalam, yang berwarna kecoklatan namun keras, biasanya tetap dipertahankan

karena apabila dihilangkan dapat menyebabkan tereksposnya pulpa. Selanjutnya kavitas ditutup dengan restorasi provisional dan ditunggu selama beberapa bulan (Alex, 2018).

### **2.5.2. Direct Pulp Capping**

*Direct pulp capping* adalah perawatan pada injuri pulpa yang reversible akibat terbukanya pulpa karena karies, iatrogenik, atau karena trauma. Keberhasilan *direct pulp capping* ditandai dengan terpeliharanya vitalitas pulpa dan terbentuknya dentin di bawah daerah injuri. Kalsium hidroksida merupakan *gold standart* bahan yang digunakan dalam perawatan *pulp capping* (Walton & Torabinejad, 2012).

Prosedur ini biasanya melibatkan penghentian daerah perdarahan akibat pulpa yang terbuka, dilanjutkan dengan isolasi dan penutupan daerah tersebut dengan bahan *pulp capping* untuk mempertahankan pulpa yang sehat, fungsinya dan keberlangsungannya (Alex, 2018).

## **2.6. Kalsium Hidroksida**

Kalsium hidroksida pertama kali diperkenalkan dalam bidang kedokteran gigi pada taun 1920-an dan telah lama menjadi *gold standard* dalam material *pulp capping*. Studi klinis awal menunjukkan lebih dari 2300 kasus *pulp capping* direk dengan bahan ini menunjukkan 80-90% keberhasilan. Namun, dalam studi literatur terkini, angka keberhasilan penggunaan kalsium hidroksida pada gigi asimptomatik tanpa adanya lesi radiografik, turun hingga 68,5-80.1% dalam jangka waktu 2 tahun dan mengalami penurunan lebih banyak lagi dalam jangka waktu 10 tahun hingga 58.7-76.3% (Song et al., 2017)

Kalsium hidroksida memiliki fungsi klinis yang paling relevan yaitu memfasilitasi pembentukan dentin reparatif. Studi histologi pada gigi-gigi yang

telah dilakukan pulp-capping menunjukkan adanya lapisan tipis nekrosis koagulasi pada pulpa akibat iritasi oleh karena pH yang tinggi. Dikatakan juga bahwa kalsium hidroksida memfasilitasi pembentukan dentin reparatif melalui adanya lingkungan yang bersifat alkali dan peningkatan ion kalsium (Song *et al.*, 2015).

Kelemahan dari struktur ini, adalah sifatnya yang tidak homogen, adanya *tunnel defect* pada osteodentin yang baru terbentuk, sehingga barrier ini menjadi *permeable* dan tidak dapat menahan rekolonisasi bakteri (Goldberg *et al.*, 2008). Produksi dentin di bawah kondisi inflamasi seringkali menghasilkan dentin reparatif yang kurang berkualitas, biasanya terdiri dari deposisi kolagen matriks yang ireguler, tubulus dentin yang lebih sedikit dan lebih lebar, serta hipomineralisasi (Goldberg *et al.*, 2008).

### **2.7. Buah Kakao (*Theobroma Cacao L.*)**

Buah kakao atau kakao adalah tanaman yang menumbuhkan bunga dari batang atau cabangnya, oleh karena itu digolongkan sebagai tanaman *caulifloris*. Pohon tanaman ini pendek, yaitu 5-10 m. Batang utamanya pendek, batang berulir 5, dimorfik. Percabangan pada batang yang tumbuh secara vertical biasanya terbagi menjadi 5/8 *phyllotaxy*, sedangkan yang tumbuh ke arah lateral (berbentuk seperti kipas) terbagi menjadi 1/2 *phyllotaxy* (Orwa *et al.*, 2009).



Gambar 2.1 buah kakao (Erlita,2016)

Kakao memiliki nama ilmiah *Theobroma cacao* Linnaeus atau *Theobroma cacao* L., Klasifikasi ilmiah dari *Theobroma cacao* adalah:

Kingdom : Plantae - Plants  
Subkingdom : Tracheobionta – Vascular plants  
Superdivision : Spermathophyta – Seed plants  
Division : Magnoliophyta – Flowering plants  
Class : Magnoliopsida – Dicotyledons  
Subclass : Dilleniidae  
Order : Malvales  
Family : Sterculiaceae – Cacao family  
Genus : Theobroma L – Theobroma  
Species : Theobroma cacao L. – Cacao ( Briz, 2015)

Kulit buah (pod) kakao adalah bagian mesokarp atau bagian dinding buah kakao, yang mencakup kulit terluar sampai daging buah sebelum kumpulan biji. Kulit buah kakao merupakan bagian terbesar dari buah kakao (75,52 % dari buah kakao segar). Setiap tahun produksi biji kakao meningkat, ini mengakibatkan semakin meningkatnya kulit buah kakao yang terbuang (Pusat Penelitian Kopi dan Kakao). Kulit buah kakao belum dimanfaatkan secara optimal, sampai saat ini, beberapa penelitian dalam pemanfaatan kulit buah kakao antara lain adalah sebagai kompos, sebagai pakan ternak (silase),

produksi enzim pektinase, produksi gum xanthan, produksi gula cair, sebagai produksi biogas, sebagai antifungi (Saleh, 1998), sebagai antimikroba (Rachmawati *et al.*, 2017).

Konsumsi coklat menurut penelitian telah terbukti meningkatkan kadar kapasitas total antioksidan dalam plasma darah. Polifenol dalam coklat menunjukkan aktivitas pengangkutan radikal bebas secara kuat. Ekstrak biji coklat juga kaya akan polifenol sehingga menetralkan jumlah peningkatan lipid peroksidase pada tikus yang dengan diet rendah vitamin E (Yamagishi *et al.*, 2002). Kulit buah coklat mengandung campuran flavonoid atau tanin yang terkondensasi atau terpolimerisasi, seperti antosianidin, katekin, dan leukoantosianidin yang terkadang melekat pada glukosa (Sartini *et al.*, 2009).

Monomer coklat berupa katekin dan oligomerik prosianidin memiliki efek anti inflamasi yang signifikan, menghambat ledakan neutrofil oksidatif, dan mengurangi ekspresi molekul adesif. Dosis tinggi dari flavanol coklat menekan jumlah plasma leukotrien, yang berkontribusi terhadap terjadinya inflamasi pada asma dan bronkitis. Flavanol dari coklat dapat memodulasi sintesis dan efek *eicosanoids*, dan memperantarai kaskade inflamasi akut. Bukti penelitian komprehensif telah menunjukkan bahwa flavanol dari coklat menurunkan aktivasi *nuclear factor*  $\kappa\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ), sehingga berakibat menurunnya produksi tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Selmi *et al.*, 2006). Hasil daripada penghambatan coklat terhadap aktivasi NF- $\kappa\beta$  dapat menggambarkan mekanisme umum dari seluruh efek anti inflamasi dari coklat (Kim *et al.*, 2011).

Teobromin dalam kulit buah coklat diketahui mempunyai kemampuan untuk meningkatkan kekerasan enamel melalui reaksi interstisial, dengan cara

menjadi substitusi untuk kristal hidroksi apatit yang hilang pada proses demineralisasi. Ukuran kristal teobromin yang lebih kecil dari pada kristal hidroksi apatit, memungkinkan untuk dengan mudah masuk ke dalam microtunnel dan mengganti ion dalam komposisi hidroksiapatit. Perpindahan ion ini akan merubah properti fisik dari apatit (Sulistianingsih, et al. 2017)

## 2.8 Teh Hijau

Teh hijau (*Camelia sinensis* (L.) O. Kuntze) var. *assamica* mengandung polifenol, flavonoid, dan tanin. Polifenol dalam teh hijau dikenal sebagai katekin. Dibandingkan dengan jenis teh lain seperti teh hitam dan teh oolong maka kandungan polifenol pada teh hijau jauh lebih tinggi (Chu and Juneja, 1997).



Gambar 2.2 tanaman teh hijau (<http://kinimall.co.id>)

Menurut Graham (1984), Van Steenis (1987), dan Tjitrosoepomo (1989), tanaman teh dapat diklasifikasikan sebagai berikut (Xu et al, 2011):

- Divisi : Spermatophyta (tumbuhan biji)
- Sub divisi : Angiospermae (tumbuhan biji tertutup)
- Kelas : Dicotyledoneae (tumbuhan biji belah)
- Sub Kelas : Dialypetalae
- Ordo(bangsa): Guttiferales (Clusiales)

Familia(suku): Camelliaceae (Theaceae)

Genus(marga): Camellia

Spesies : Camellia sinensis

Varietas : Assamica

Teh hijau mengandung 10 – 50% katekin berupa *epigallocatechin gallat* (EGCG) yang merupakan sumber dari sebagian besar manfaat positif daun teh (Toruon et al, 2008). Selain itu, teh hijau memiliki toksisitas yang rendah (Gunawiyaya, 1996). Berbagai penelitian menunjukkan teh hijau bermanfaat untuk mencegah kanker, osteoporosis, penyakit kardiovaskuler, dan aterosklerosis. Sementara itu, untuk perawatan kecantikan, teh hijau berperan sebagai antioksidan, menghilangkan bau mulut, mencegah karies gigi, dan meningkatkan pembakaran lemak (Hidayati *et al*, 2012).

Tanin memiliki sifat antiinflamasi dan antibakteri. Tanin memiliki sifat antiinflamasi karena tanin dapat menghambat produksi asam arakidonat. Tanin bekerja sebagai anti-bakteri dengan mengkoagulasi protoplasma dari bakteri sehingga berikatan dengan protein bakteri sehingga menyebabkan kerusakan dinding sel dan metabolisme bakteri terganggu. Hal tersebut mengakibatkan pertumbuhan bakteri terhambat (Ashok et al., 2012)

## **2.9 Gigi Molar Tikus Sebagai Model Studi Penelitian Kedokteran Gigi**

Geligi tikus terdiri dari 2 gigi insisif dan 3 gigi molar yang terpisah oleh diastema yang besar pada kedua rahang atas dan bawah. Gigi insisif memiliki bentuk yang khas dari golongan rodensia, yang dapat tumbuh secara permanen dengan apeks yang terbuka lebar, sehingga tidak dapat dibandingkan dengan gigi manusia. Sebaliknya, gigi molar tikus, termasuk jaringan pulpanya, dapat



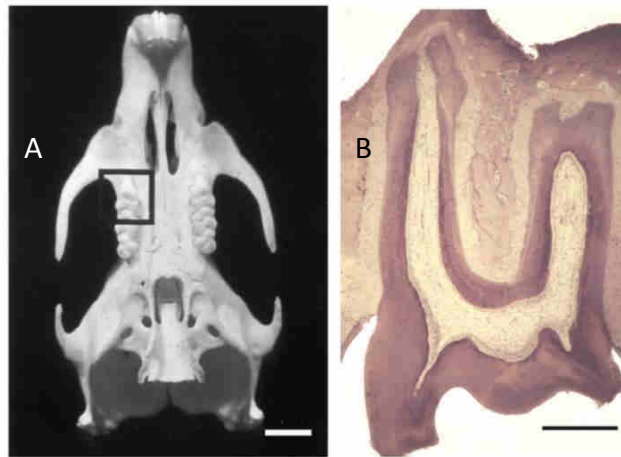
dilihat sebagai bentuk kecil dari gigi molar manusia, dengan fitur-fitur anatomis, histologis, biologis, dan fisiologis yang serupa. Gigi molar tikus menunjukkan karakteristik struktur ruang pulpa, jaringan pulpa, akar, dan apikal delta dengan foramen apikal minor. Tidak terdapat perbedaan pada proses penyembuhan setelah prosedur *direct pulp capping* dengan kalsium hidroksida antara babi, tikus, dan anjing pada periode observasi 21 hari sampai 4 bulan. Pada perbandingan pembentukan jaringan keras setelah prosedur *direct pulp capping* dengan kalsium hidroksida pada tikus dan anjing pada minggu ke-6, 83% gigi tikus menunjukkan pembentukan jaringan keras, sedangkan hanya 60% gigi anjing yang menunjukkan hasil yang serupa. Perbedaan hasil antara gigi tikus dan anjing disebabkan karena lebih banyaknya bahan *pulp capping* yang bermigrasi ke dalam jaringan pulpa pada anjing dibandingkan dengan tikus. Migrasi dari bahan *pulp capping* ini dapat menyebabkan reaksi inflamasi *foreign body* pada jaringan pulpa. Dapat disimpulkan bahwa dibandingkan dengan gigi molar anjing, gigi molar tikus lebih dapat dibandingkan (*comparable*) dengan gigi molar manusia.

Hewan coba lain yang umum digunakan dalam penelitian adalah monyet. Pembentukan dentin reparatif pada gigi monyet, yang merupakan tanda proses penyembuhan setelah injuri pulpa, ditemukan berbeda dengan gigi manusia. Meskipun secara evolusioner monyet lebih dekat dengan manusia, hal tersebut menyebabkan gigi monyet tidak dapat digunakan untuk melihat reaksi pulpa.

Setelah pulpa terbuka, terdapat *odontoblast-like cell* yang dapat menghasilkan dentin reparatif pada gigi tikus, dimana hal ini serupa dengan yang terjadi pada gigi manusia. Jika atap pulpa dibuka dan pulpa vital pada gigi tikus kontak dengan rongga mulut, maka akan terjadi proses inflamasi

yang serupa dengan yang terjadi pada manusia, dengan laju yang lebih cepat dibandingkan dengan manusia, dimana 1 bulan pada tikus setara dengan 30 bulan pada manusia.

Hal lain yang perlu diwaspadai pada jaringan pulpa setelah prosedur *direct pulp capping* adalah infeksi bakteri dan/atau infiltrasi toksinnya. Flora bakteri oral tikus lebih *comparable* dengan flora bakteri oral manusia, dibandingkan dengan spesies lain yang digunakan dalam penelitian, seperti anjing (Dammaschke, 2010).

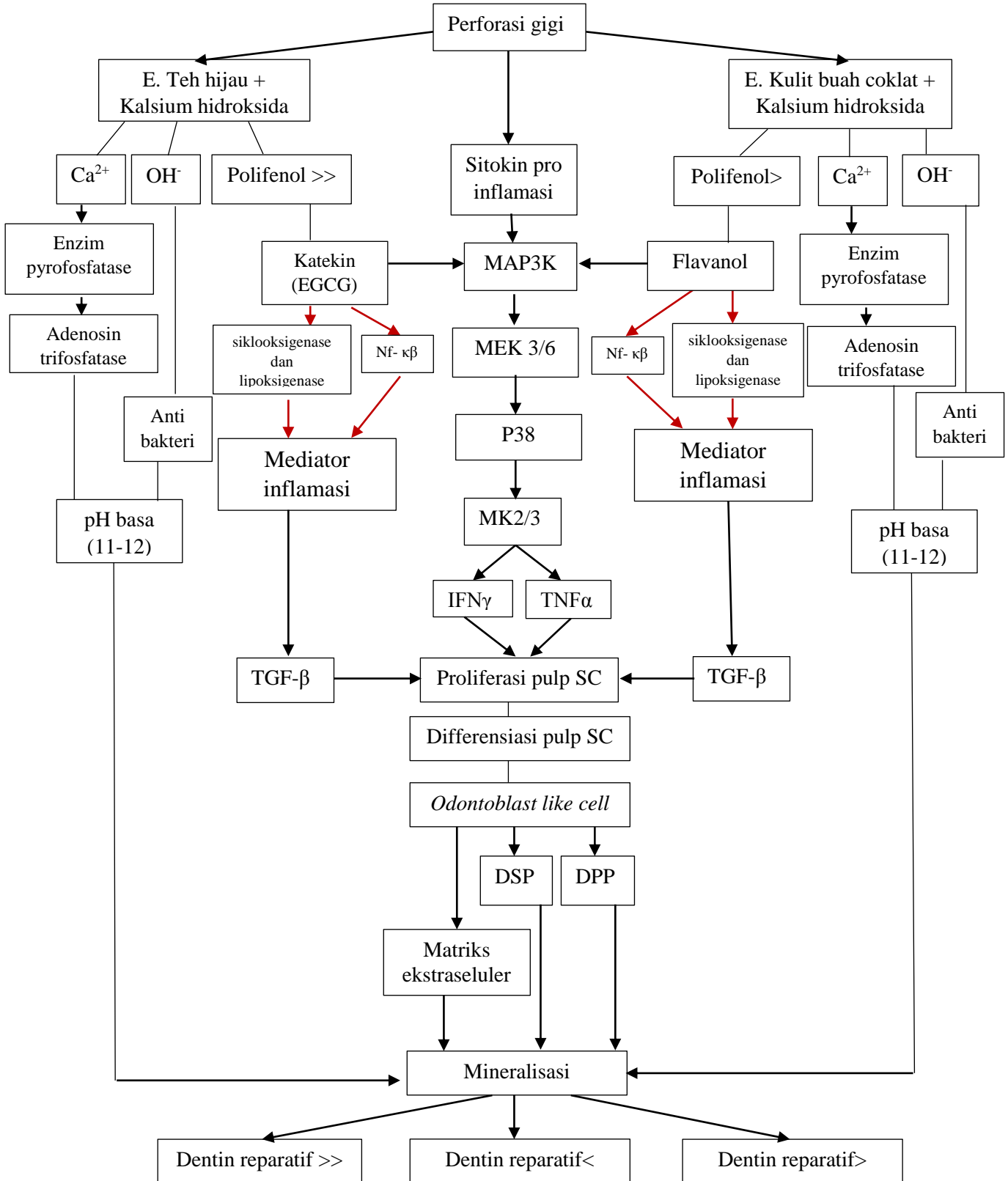


**Gambar 2.3** a. Tampak inferior ranium dan maksila tikus, b. Gigi molar rahang atas tikus dilihat dengan mikroskop cahaya perbesaran 40x (Dammaschke, 2010).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Keterangan:  
 Menginduksi →  
 Menghambat ←

### 3.2 Penjelasan Kerangka Konseptual

Perforasi pada gigi tikus akan menyebabkan terjadinya inflamasi sehingga mengaktifkan sitokin pro inflamasi. *Mitogen-activated protein kinase (MAPK)/ Extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinase (MEK) 3* dan *MEK6* teraktivasi oleh sejumlah besar *MAPKK kinase (MAPKKK)* yang menjadi aktif karena merespon terhadap berbagai stres kimia dan fisik, Aktivasi isoform p38 merupakan hasil dari fosforilasi *MEK3/6*. P38 kemudian akan mengaktifasi *MAPK-activated protein kinase (MK) 2* dan *3* sehingga meningkatkan produksi *tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ )* serta membantu terbentuknya *interferon gamma (IFN $\gamma$ )*. *TNF- $\alpha$*  dan *IFN- $\gamma$*  memiliki peran yang sinergis dan interaktif dalam meregulasi regenerasi dentin. Pada fase awal inflamasi, *IFN- $\gamma$*  pada konsentrasi rendah dapat meningkatkan proliferasi dari *pulp stem cell (SC)* dan migrasinya pada daerah injuri, selanjutnya *TNF- $\alpha$*  menyebabkan diferensiasi odonto/osteogenik dari *pulp SC* pada daerah injuri. Seiring dengan meningkatnya keparahan dari inflamasi, akumulasi *IFN- $\gamma$*  lebih lanjut akan berkontribusi terhadap diferensiasi odonto/osteogenik dari *pulp SC*. Adanya *TNF- $\alpha$*  akan mengaktifasi jalur p38 pada *pulp SC* melalui fosforilasi p38 dan penghambatan dari p38 akan menghilangkan ekspresi daripada *Dentin sialoprotein (DSP)* dan *Dentin phosphoprotein (DPP)*. Selanjutnya proses diferensiasi *stem cell* dari pulpa akan berlanjut membentuk *odontoblast-like cell* yang mengakibatkan terjadinya mineralisasi dan terbentuknya dentin reparatif.

Polifenol yang terkandung dalam ekstrak teh hijau serta ekstrak kulit buah coklat terdiri dari berbagai macam jenis, kandungan utamanya antara lain adalah flavonoid. Flavonoid utama dalam teh hijau adalah catechin, epigallocatechin-3-gallat (EGCG), dan epigallocatechin (EGC), sedangkan

pada coklat senyawa flavanol yang banyak ditemukan adalah epicatechin, catechin, dan prosianidin. Adanya flavonoid berfungsi untuk membatasi pelepasan mediator inflamasi. Aktivitas antiinflamasi flavonoid pada teh hijau serta kulit buah coklat dilakukan melalui tiga jalur, yang pertama melalui penghambatan siklooksigenase dan lipooksigenase sehingga terjadi pembatasan jumlah sel inflamasi yang bermigrasi ke jaringan yang diperlukan, sehingga reaksi inflamasi akan berlangsung lebih singkat dan kemampuan proliferasi dari *Transforming growth factor* (TGF)- $\beta$  tidak terhambat. Proses ini mengakibatkan fase proliferasi dapat segera terjadi, yang kedua dan ketiga adalah melalui regulasi jalur pensinyalan MAPK serta penghambatan Nf- $\kappa$  $\beta$  sehingga akan menyebabkan terhambatnya pelepasan dari TNF $\alpha$  sehingga menyebabkan meningkatnya produksi TGF- $\beta$  dan mempercepat terjadinya proses proliferasi.

Flavonoid memiliki kemampuan imunomodulator yang dapat meningkatkan produksi IL-2 (Interleukin 2). IL-2 merangsang proliferasi dan diferensiasi sel T. Kemudian sel T berdiferensiasi menjadi Th1 (T helper 1). Sel Th 1 mensekresi berbagai macam produk antara lain IFN- $\gamma$  (interferon gamma) yang potensial mengaktivasi makrofag. Flavonoid dapat meningkatkan aktivitas IL-2 dan proliferasi limfosit akan mempengaruhi sel CD4+, yang kemudian menyebabkan sel Th1 teraktivasi.

Sel- sel Th1 teraktivasi akan mempengaruhi SMAF (*Specific Makrofag Activating Factor*), yaitu molekul-molekul multipel termasuk IFN- $\gamma$  yang dapat mengaktifkan makrofag. Makrofag yang aktif berfungsi untuk melakukan fagositosis, memperbaiki sitokin, perbaikan jaringan (*fibroblast stimulating factor*, *fibronectin*, kolagenase), dan memproduksi hormon pertumbuhan

(*growth factor*). *Growth factor* ini bertanggung jawab atas terjadinya inflamasi dan proses mitogen fibroblas yang penting dalam proses penyembuhan luka.

Pada sisi lain, kalsium hidroksida dapat pecah menjadi ion  $\text{Ca}^{2+}$  dan ion  $\text{OH}^-$  yang aktivitas terapinya bergantung pada pelepasan ion-ion tersebut. Oleh karena itu, bila berkontak dengan air akan melepas ion  $\text{Ca}^{2+}$ , ion  $\text{OH}^-$ , dan salisilat, sehingga kalsium hidroksida cenderung hancur dan menghilang dari dentin. Kalsium hidroksida menguntungkan karena pelepasan ion  $\text{Ca}^{2+}$  dalam jumlah yang relatif banyak dapat meningkatkan lingkungan alkali yang mendorong terjadinya sterilisasi dan kalsifikasi. Ion  $\text{Ca}^{2+}$  dalam konsentrasi tinggi dapat meningkatkan peran enzim pyrofosfatase mengaktifasi adenosin trifosfatase (ATP) sehingga dapat mendorong terjadinya mekanisme pertahanan dengan adanya *repair* serta mineralisasi. Efek anti bakteri kalsium hidroksida secara langsung dipengaruhi oleh jumlah ion  $\text{OH}^-$  yang dilepaskan menyebabkan terjadinya hidrolisa lipid lipopolisakarida dari bakteri, meningkatkan permeabilitas membran sel, denaturasi protein, inaktivasi enzim, dan kerusakan DNA sehingga mengakibatkan kematian bakteri.

### 3.3. Hipotesis Penelitian

- Kombinasi kalsium hidroksida dan ekstrak teh hijau lebih baik terhadap aktivasi MAPK P38 dibandingkan dengan kombinasi kalsium hidroksida dan ekstrak kulit buah coklat
- Kombinasi kalsium hidroksida dan ekstrak teh hijau lebih baik terhadap luas dentin reparatif dibandingkan dengan kombinasi kalsium hidroksida dan ekstrak kulit buah coklat

## BAB 4

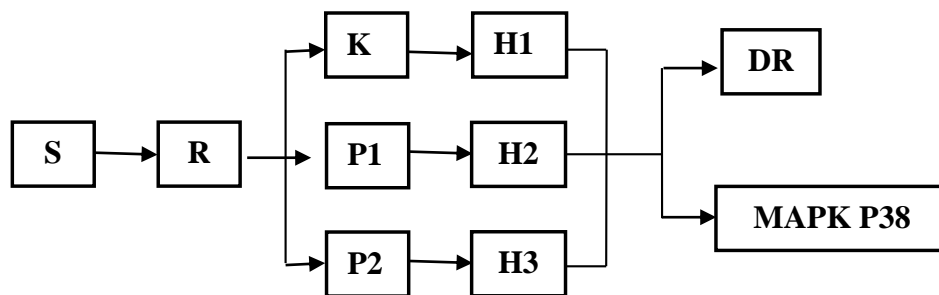
### METODE PENELITIAN

#### 4.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimental laboratoris.

#### 4.2. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan *post test control group design* oleh karena diasumsikan bahwa tiap unit sampel homogen, yang artinya semua karakteristik antar unit sampel adalah sama untuk semua kelompok karena berasal dari sampel yang sama. Pengukuran variabel hanya dilakukan setelah pemberian perlakuan.



#### Keterangan:

- S : Sampel
- R : Random alokasi
- DR : Dentin reparatif diamati pada hari ke 28
- MAPK P38 : Aktivasi jalur MAPK p38 diamati pada hari ke- 7 dan 28
- K : Kelompok kontrol dengan aplikasi kalsium hidroksida dengan akuades dan Cention
- P1 : Kelompok perlakuan dengan aplikasi kombinasi kalsium hidroksida dan ekstrak teh hijau perbandingan 1:2 dan Cention
- P2 : Kelompok perlakuan dengan aplikasi kombinasi kalsium hidroksida dan ekstrak kulit buah coklat perbandingan 1:2 dan Cention
- H1-H3 : Kelompok pengamatan

### **4.3. Tempat dan Waktu Penelitian**

#### **4.3.1. Tempat Penelitian**

1. Persiapan sampel dibagi menjadi 2 tahapan:
  - a. Fase adaptasi selama 2 minggu di kandang hewan coba laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
  - b. Fase perlakuan pada hari pertama dan pengamatan pada hari ke-7 dan ke-28 di kandang hewan coba laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
  
2. Pelaksanaan penelitian
  - a. Pelaksanaan preparasi gigi hewan coba dan pemotongan jaringan rahang dilakukan di laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
  - c. Pembuatan preparat jaringan pulpa serta pewarnaan Hematosilin-Eosin (HE) dilakukan di laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
  - d. Pemeriksaan aktivasi MAPK p38 dan pembentukan dentin reparatif menggunakan pemeriksaan imunohistokimia dan mikroskop pembesaran 400x di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

#### **4.3.2. Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan setelah mendapatkan surat ijin layak etik dari tim etik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya. Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari-Maret 2019.



#### 4.4. Sampel Penelitian

##### 4.4.1. Sampel Penelitian

Pada penelitian ini menggunakan hewan coba tikus putih (*Rattus novergicus*) strain wistar jantan yang berada di kandang hewan coba laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

##### 4.4.2. Kriteria Sampel Penelitian

Tikus putih (*Rattus novergicus*) strain wistar jantan:

- a. Usia 12 minggu
- b. Berat badan 250 gram
- c. Diberi pakan standar dan air minum ad libitum
- d. Pakan tikus terdiri dari makanan ayam jenis BR1 lalu dicampur dengan satu bagian tepung terigu yang kemudian dibuat pellet. Setiap harinya tikus diberi makan sebanyak 15- 40 gram pellet
- e. Gigi molar sudah tumbuh sempurna

##### 4.4.3. Jumlah Sampel

Estimasi jumlah pengulangan atau besar sampel pada penelitian ini dihitung dengan rumus Federer dengan pertimbangan karena jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dimana unit analisisnya adalah hewan dengan variabel eksternalnya dikendalikan secara ketat melalui teknik pengambilan sampel *random sampling*.

$$(k - 1) (n - 1) \geq 15$$

**Keterangan:**

k = Jumlah kelompok

n = besarnya replikasi per kelompok

Penelitian ini membagi subyek menjadi 6 kelompok perlakuan, sehingga berdasarkan rumus Federer didapatkan jumlah sampel masing-masing kelompok sebagai berikut:

$$(6 - 1) (n - 1) \geq 15$$

$$5 (n - 1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$n \geq 4$$

Menurut hasil penghitungan n (jumlah sampel tiap kelompok perlakuan) adalah minimal 4. Pada penelitian ini ditambahkan 50% dari hasil perhitungan, maka jumlah sampel yang diperlukan adalah 6 dengan 6 kelompok perlakuan serta dua waktu pengamatan sehingga berjumlah 36 ekor.

**4.5. Variabel Penelitian****4.5.1. Variabel Bebas**

Bahan pembawa pasta kalsium hidroksida

- a. Kombinasi kalsium hidroksida dan ekstrak teh hijau
- b. Kombinasi kalsium hidroksida dan ekstrak kulit buah coklat

**4.5.2. Variabel Terikat**

- a. Aktivasi MAPK p38
- b. Pembentukan dentin reparatif

**4.5.3. Variabel Terkendali**

- a. Tikus wistar jantan
- b. Kandang tikus (40x60 cm) per 6 ekor tikus

- c. Umur hewan coba 12 minggu
- d. Berat badan 250 gram
- e. Makanan tikus yaitu Hi-pro-vite jenis 524-2 yang diproduksi oleh Charoen Phokpand Indonesia
- f. Minuman tikus yaitu akuades
- g. Gigi molar sudah tumbuh sempurna dan kondisi fisik sehat
- h. Jenis teh hijau dan buah coklat
- i. Konsentrasi ekstrak teh hijau, kulit buah coklat dan kalsium hidroksida
- j. Cara pengukuran

#### 4.6. Definisi Operasional

- a. **Kalsium hidroksida** digunakan dalam bentuk sediaan bubuk hidroxido calcio *pro-analysis* (P.A.)
- b. **Ekstrak kulit buah coklat** adalah ekstrak yang didapat dari kulit buah coklat yang telah dikeringkan dan dilakukan maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70% selama 48 jam lalu diencerkan menjadi konsentrasi 74%.
- c. **Ekstrak teh hijau** adalah ekstrak yang didapat dari daun teh hijau yang telah dikeringkan dan dilakukan maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70% selama 48 jam pada konsentrasi 100%.
- d. **Aktivasi MAPK p38** adalah aktivasi MAPK p38 yang dapat diamati dengan reagen p38 *antibody* dengan pemeriksaan imunohistokimia (IHC). Sel yang dihitung adalah sel dengan p38 yang teraktivasi dan masuk ke dalam nukleus.

- e. **Pembentukan dentin reparatif** adalah luas daerah *dentin bridge* yang baru terbentuk setelah perlakuan, di bawah daerah perforasi, dan dilihat dengan mikroskop pada pembesaran 400x.

## **4.7. Alat dan Bahan Penelitian**

### **4.7.1. Alat Penelitian**

Kandang tikus, botol untuk menyimpan ekstrak, *syringe* 3 cc, toples tempat tikus mengalami anestesi umum, mikromotor, *low speed handpiece*, *round tapered diamond bur* diameter 0,5 mm, sonde dengan diameter ujung tip 0,46 mm, jarum k-file no.8, pinset, *glass plate*, papan pembiusan, peralatan untuk membuat sediaan, kamera digital (Fujifilm XT20, Tokyo, Jepang).

### **4.7.2. Bahan Penelitian**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak teh hijau (perkebunan teh Wonosari, Lawang), ekstrak kulit buah coklat (perkebunan PTP Kalikelatak Banyuwangi), kalsium hidroksida (hidroxio calico P.A.), *cotton pellet*, larutan formalin 10%, alkohol 70% dan 95%, ketamine 100 mg (Ketalar, Warner Lambert, Irlandia), xylazine HCl (Rompun, Bayer, Leverkusen, Jerman), *phosphate buffered saline* (PBS) steril, bahan tumpat Cention (Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein), lilin paraffin, dan hematoxilen & eosin *staining* (HE).

#### **4.8. Prosedur Pelaksanaan Penelitian**

Seluruh prosedur yang dilakukan pada penelitian ini laik etik, maka sebelum penelitian ini dilaksanakan, proposal penelitian akan diajukan lebih dahulu pada Komisi etik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya aktivasi MAPK p38 serta pembentukan dentin reparatif setelah aplikasi kombinasi kalsium hidroksida dan ekstrak teh hijau serta kombinasi kalsium hidroksida dan ekstrak kulit buah coklat. Penelitian dibagi menjadi 3 kelompok. Kelompok 1 diberi perlakuan dengan kalsium hidroksida ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) yang dikombinasi dengan ekstrak teh hijau dengan perbandingan 1:2 (0,125 gram bubuk  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ : 0,25 cc cairan ekstrak) dan kemudian ditumpat Cention. Kelompok 2 diberi perlakuan dengan kalsium hidroksida yang dikombinasi dengan ekstrak kulit buah coklat dengan perbandingan 1:2 (0,125 gram bubuk  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ : 0,25 cc cairan ekstrak) dan kemudian ditumpat Cention. Kelompok 3 diberi perlakuan dengan kalsium hidroksida dan akuades (0,1 gram bubuk  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ : 0,1 cc cairan akuades) dan ditumpat Cention. Selanjutnya pada setiap kelompok akan diamati pada hari ke- 7 dan 28. Setelah itu akan dilakukan pemotongan jaringan, dan persiapan preparat untuk pewarnaan haematoxilin- eosin (HE) dan pemeriksaan imunohistokimia dengan mikroskop pembesaran 400x untuk melihat adanya aktivasi MAPK p38 serta pembentukan dentin reparatif pada masing-masing kelompok.

##### **4.8.1. Sterilisasi Alat dan Bahan**

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini disterilkan dalam *autoclave* dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit.

#### **4.8.2 Pembuatan Ekstrak Teh Hijau**

Pembuatan ekstrak teh hijau dilakukan dengan teknik maserasi. Daun teh kering dihaluskan sampai menjadi serbuk. Serbuk daun teh hijau dimasukkan dalam maserator, etanol 70 % ditambahkan sebagai pelarut dengan perbandingan 1:10 kali (40 gr simplisia terhadap 400mL cairan), kemudian dilakukan pengadukan sampai homogen. Campuran tersebut dibiarkan termaserasi selama 48 jam dalam maserator tertutup dengan pengadukan setiap hari. Maserat disaring dari ampasnya dengan menggunakan kertas saring. Kemudian diuapkan menggunakan *rotary* evaporator pada suhu 70° C dan tekanan 80 mBar sampai didapatkan ekstrak kental (konsentrasi 100 %) (Kurnia, 2015).

#### **4.8.3. Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Coklat**

Pemilihan buah coklat yang matang selanjutnya diambil kulitnya, kemudian dicuci, dipotong kecil-kecil dan dikeringkan dengan diangin-anginkan pada udara terbuka didalam ruangan. Setelah sampel kering dilanjutkan dengan pemotongan (perajangan) dan ditimbang simplisia kulit buah kakao. Sebanyak 40 gr serbuk kulit buah kakao direndam dengan 400 mL etanol 96% di dalam Erlenmeyer. Perendaman dilakukan dalam suhu ruang pada shaker dengan kecepatan 120 rpm secara kontinyu selama 24 jam. Penyaringan dilakukan dengan kertas saring Whatman no.41, sehingga diperoleh maserat. Pelarut (etanol) dalam maserat diuapkan menggunakan *rotary* evaporator sampai diperoleh ekstrak pekat dengan bobot konstan (Mulyatni *et al.*, 2012).

#### 4.8.4 Tahap Persiapan

Penelitian ini menggunakan 36 ekor tikus putih (*Rattus novergicus*) strain wistar jantan, usia 12 minggu, sehat, memiliki berat badan 250 gram, diberi pakan standar (makanan ayam dicampur tepung terigu) 20 gram/hari/ekor, dan diberi minum *ad libitium*, serta diadaptasikan pada tempat penelitian selama 2 minggu. Hewan coba diletakkan dalam kandang plastik yang jauh dari kebisingan dan setiap kandang berisikan 6 ekor.

#### 4.8.5 Tahap Pengelompokan Subyek

Jumlah subyek penelitian sebanyak 36 ekor tikus. Tikus dibagi menjadi 3 kelompok secara random, yaitu:

- Kelompok 1, terdiri dari 6 ekor tikus, dengan aplikasi kalsium hidroksida yang dikombinasi dengan ekstrak teh hijau pada konsentrasi 100% dengan perbandingan 1:2 (0,125 gram bubuk CaOH: 0,25 cc cairan ekstrak) dan kemudian ditumpat Cention, dianalisis pada hari ke-7 dan ke-28
- Kelompok 2, terdiri dari 6 ekor tikus, dengan aplikasi kalsium hidroksida yang dikombinasi dengan ekstrak kulit buah coklat pada konsentrasi 74% dengan perbandingan 1:2 (0,125 gram bubuk CaOH: 0,25 cc cairan ekstrak) dan kemudian ditumpat Cention, dianalisis pada hari ke-7 dan ke-28
- Kelompok 3, terdiri dari 6 ekor tikus, dengan aplikasi kalsium hidroksida yang dikombinasi dengan akuades pada perbandingan 1:1 (0,1 gram bubuk CaOH: 0,1 cc cairan akuades) dan kemudian ditumpat Cention, dianalisis pada hari ke-7 dan ke-28

#### 4.8.6. Tindakan Pada Kelompok Perlakuan

1. Alat yang digunakan terlebih dahulu didisinfeksi dengan alkohol 95%
2. Semua tikus dianestesi dengan ketamine 100 mg (Ketalar, Warner Lambert, Irlandia) (65 mg/kg berat badan) dan xylazine HCl (Rompun, Bayer, Leverkusen, Jerman) yang dilarutkan dalam *phosphate buffered saline* (PBS) steril
3. Tikus ditempatkan di atas wadah
4. Permukaan oklusal gigi yang akan dipreparasi didisinfeksi dan dibersihkan dengan *cotton pellet* yang sebelumnya dicelup ke dalam larutan alkohol 95%
5. Preparasi kavitas kelas I (klasifikasi Black) dibuat pada permukaan oklusal gigi molar pertama kanan rahang atas menggunakan *low speed handpiece* dengan *round tapered diamond bur* (diameter 0,5 mm) hingga mencapai ruang pulpa. Kedalaman preparasi diperkirakan sebesar kepala bur. Tindakan perforasi terhadap ruang pulpa dilakukan menggunakan jarum k-file no.8
6. Setelah perforasi, kavitas ditetesi dengan larutan saline steril dan dikeringkan dengan *cotton pellet*.
7. Pada kelompok 1 diaplikasikan kalsium hidroksida yang dikombinasi dengan ekstrak teh hijau dengan perbandingan 1:2, pada kelompok 2 diaplikasikan kalsium hidroksida yang dikombinasi dengan ekstrak kulit buah coklat dengan perbandingan 1:2, pada kelompok 3 diaplikasikan kalsium hidroksida dan akuades. Aplikasi bahan pada permukaan pulpa dilakukan dengan



sonde. Setelah diaplikasikan, kavitas direstorasi dengan bahan tumpatan Cention (Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein).

8. Tikus ditempatkan di dalam kandang dan diberi pakan standar dan diberi minum air.

#### **4.8.7 Pengamatan Pada Hewan Coba**

##### **4.8.7.1. Pembuatan Sediaan Preparat Histologis**

Hewan coba dari setiap kelompok perlakuan dikorbankan secara injeksi peritoneal sesuai waktu yang ditentukan setelah perlakuan (hari ke-7 dan ke-28). Setelah pengambilan atau pemotongan/dekapitasi, tulang rahang di daerah interdental gigi molar pertama kanan rahang atas diambil.

Proses pembuatan preparat histopatologi terdiri dari fiksasi, dehidrasi & infiltrasi, penjernihan, infiltrasi paraffin, *embedding*, *sectioning*, dan penempelan di gelas obyek:

1. Potongan jaringan dimasukkan ke dalam larutan fiksasi (formalin 10%) selama 4 hari pada temperatur kamar
2. Proses dekalsifikasi dengan menggunakan larutan EDTA 10% pada temperatur kamar yang diganti setiap hari selama 21-30 hari hingga jaringan lunak
3. Jaringan dipotong pada ukuran yang tepat kemudian dilanjutkan dengan fiksasi sekunder dengan NaSO<sub>4</sub> 2% selama 24 jam, pembersihan jaringan dengan dicuci air mengalir selama 12 jam
4. Proses dehidrasi terhadap spesimen menggunakan alkohol secara bertingkat (70%, 80%, dan 95%) masing-masing selama 1 jam. Spesimen kemudian dimasukkan ke dalam larutan alkohol toluol (1:1)

5. Proses penjernihan menggunakan toluol murni, kemudian spesimen dimasukkan ke dalam larutan toluol paraffin jenuh
6. Proses infiltrasi dilakukan dengan memasukkan spesimen ke dalam paraffin cair yang kemudian dimasukkan ke dalam oven
7. Proses *embedding* dilakukan terhadap spesimen dan kemudian diberi label/kode
8. Jaringan kemudian diiris (*sectioning*) secara seri menggunakan mikrotom dengan ketebalan  $\pm 6 \mu\text{m}$  parallel terhadap sumbu panjang gigi, diusahakan di daerah pulpa tempat dilakukan aplikasi bahan penelitian. Kemudian dilakukan waterbath dengan suhu  $40\text{-}50^{\circ}\text{C}$  selama 30 detik.

#### **4.8.7.2. Pengamatan Preparat Histologi dan Perhitungan Luas Dentin**

##### **Reparatif**

Preparat histopatologi jaringan pulpa diamati menggunakan mikroskop cahaya Olympus BX51 perbesaran 400x dengan pembagian 10x lapang pandang untuk melihat luas dentin reparatif yang terbentuk.

Pengukuran luas dentrin reparatif (*dentin bridge*) dilakukan menggunakan software image raster 4.1 (OptiLab). Sediaan diwarnai menggunakan teknik Hematoxilen-Eosin dilakukan foto sediaan pada 200x perbesaran mikroskop, sebanyak 10x lapang pandang. Gambar dalam format JPG dibuka pada *image raster*.



Gambar 4.1 Tampilan awal dari *image raster*

Pilih (klik) menu pilihan pada “*measure*” (pada bagian kiri) dan pilih (klik) menu pilihan pada “*multi line*” (pada bagian kanan tampilan).



Gambar 4.2 Tanda panah di kiri menunjukkan *icon arrow* sedangkan pada kanan atas menunjukkan *icon multi line*

Ukur bagian *dentin bridge*, menggunakan mode “*multi line*”, sesuai alur dari *dentin bridge* - mengelilingi sampai bertemunya dua titik (dan kemudian lakukan klik kanan pada titik terakhir dan klik *Finish*).



Gambar 4. 3 Tampilan akhir daerah *dentin bridge* yang akan dihitung

Hasil pengukuran akan tampak pada gambar dan bagian *communication box* (kanan). Salin hasil pengukuran dan lakukan tabulasi. Hasil pengukuran kemudian dianalisis menggunakan uji beda (rata-rata) menggunakan uji ragam Anova pada software SPSS ver. 21. (Pizem, J., Cor,A., 2003)

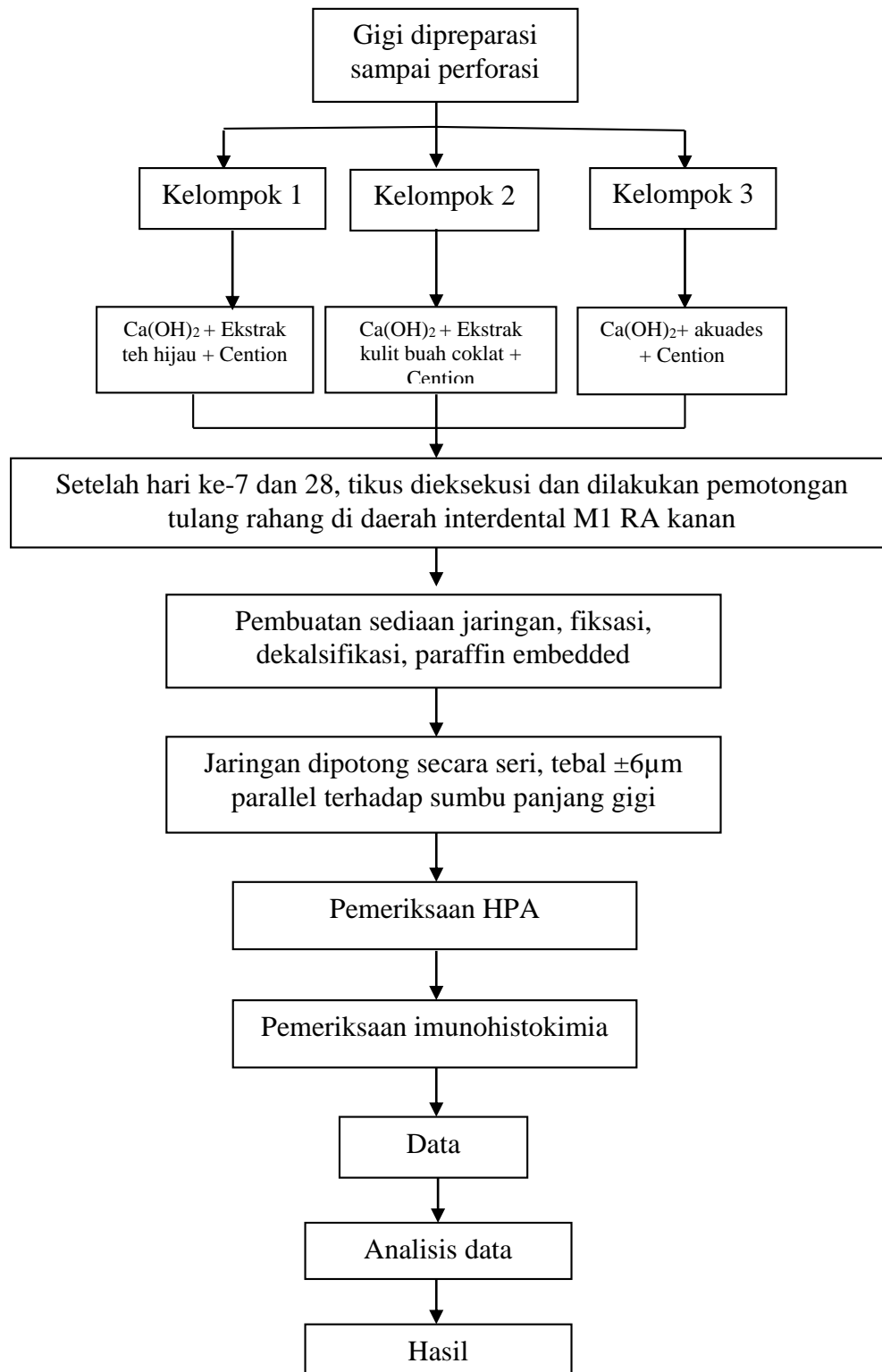
#### 4.8.7.3. Pengamatan Imunohistokimia dan Perhitungan Aktivasi MAPK P38

Imunohistokimia (IHC) merupakan suatu teknik yang digunakan untuk menentukan keberadaan protein target dalam jaringan atau sel dengan memanfaatkan prinsip antara protein target (antigen) dan antibodi. Teknik ini diawali dengan pembuatan preparat histologi agar dapat diamati di bawah mikroskop. Preparat yang telah disiapkan kemudian akan dapat memasuki proses IHC. Pada prosedur ini digunakan antibodi yang dilabeli enzim sehingga ikatan protein dan antibodi dapat terlihat. Enzim selanjutnya direaksikan dengan substrat kromogen yang dapat diamati dengan mikroskop cahaya (Fatchiyah dkk., 2009)

#### 4.9. Analisis Data

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental. *Randomized post test only control group design* merupakan rancangan penelitian yang dipilih, karena pengukuran awal tidak mungkin dilakukan. Hasil penelitian dihitung rerata dan standar deviasi. Dilakukan pengujian *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui distribusi data yang berjumlah kurang dari 50, dan dilanjutkan dengan uji homogenitas. Untuk menguji perbedaan digunakan uji one way ANNOVA dengan taraf kemaknaan  $\alpha$  sebesar 0,05 yang kemudian dilanjutkan dengan uji Tukey.

#### 4.10 Alur Penelitian



## BAB 5

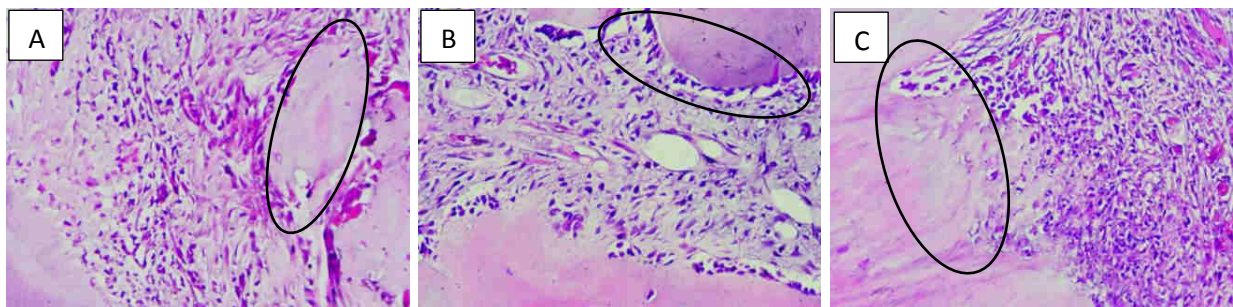
### HASIL PENELITIAN

#### 5.1. Hasil Pengamatan dengan Pewarnaan Hematoxilen- Eosin

Pemeriksaan histopatologi anatomi dengan menggunakan pewarnaan Hematoxilen- Eosin (HE) untuk pengamatan dentin reparatif (*dentin bridge*) yang terbentuk. Hasil yang terlihat pada tiga perlakuan pada model tikus perforasi adalah kelompok kontrol ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$  dan akuades)), kelompok perlakuan yaitu dengan aplikasi ekstrak kulit buah coklat dan ekstrak teh hijau yang diamati pada hari ke-7 dan 28.



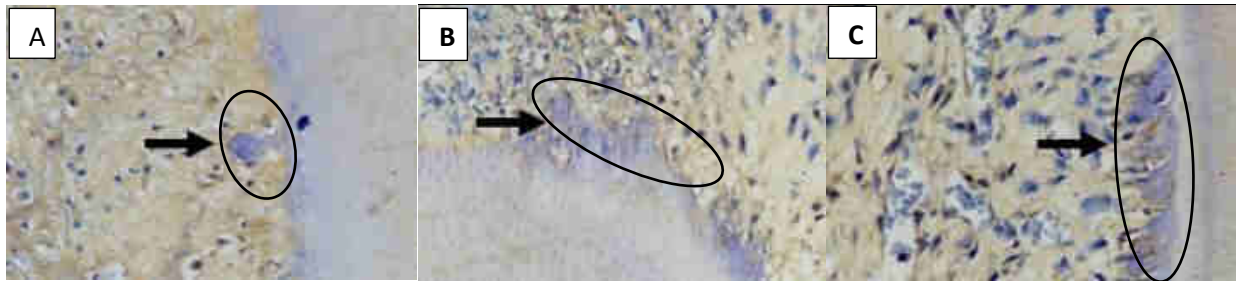
Gambar 5.1 Tanda panah menunjukkan gambaran sisa dentin pada hari ke- 7 pada mikroskop pembesaran 400x: (A) pada kelompok kontrol dengan aplikasi  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ; (B) pada kelompok dengan aplikasi kombinasi  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ - ekstrak kulit buah coklat; (C) pada kelompok dengan aplikasi kombinasi  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ - ekstrak teh hijau



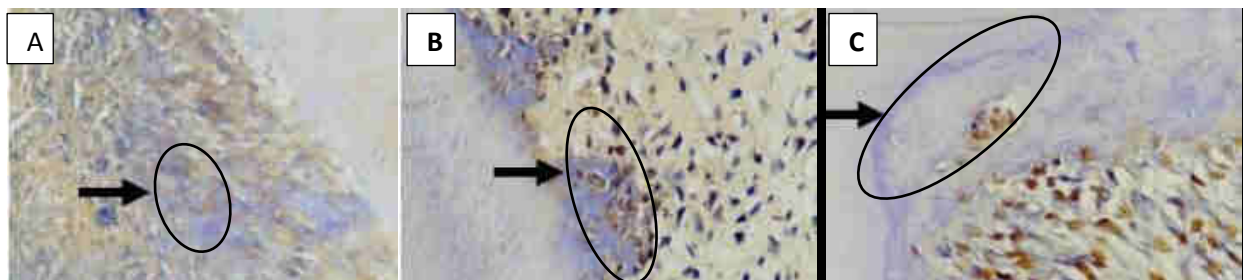
Gambar 5.2 Tanda panah menunjukkan *dentin bridge* yang terbentuk pada hari ke- 28 pada mikroskop pembesaran 400x:(A) pada kelompok kontrol dengan aplikasi  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ; (B) pada kelompok dengan aplikasi kombinasi  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ - ekstrak kulit buah coklat; (C) pada kelompok dengan aplikasi kombinasi  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ - ekstrak teh hijau

## 5.2. Hasil Pemeriksaan Imunohistokimia

Pada hasil pengamatan imunohistokimia (IHC) untuk perhitungan aktivasi MAPK p38 dengan menggunakan reagen anti-p38 menunjukkan hasil sebagai berikut:



Gambar 5.3 Panah pada gambar menunjukkan bentukan *pre-dentin bridge* (warna biru menjorok ke dalam) pada hari ke-7. Titik-titik berwarna coklat menggambarkan P38 yang teraktivasi dan masuk ke dalam nukleus. Gambar (A) pada kelompok kontrol  $\text{Ca(OH)}_2$  dan akuades; gambar (B) menunjukkan pada kelompok perlakuan kombinasi  $\text{Ca(OH)}_2$  -ekstrak kulit buah coklat; gambar (C) menunjukkan pada kelompok perlakuan kombinasi  $\text{Ca(OH)}_2$  -ekstrak teh hijau



Gambar 5.4 Panah pada gambar menunjukkan bentukan *dentin bridge* (warna biru menjorok ke dalam) pada hari ke-28. Titik-titik berwarna coklat menggambarkan P38 yang teraktivasi dan masuk ke dalam nukleus. Gambar (A) pada kelompok kontrol  $\text{Ca(OH)}_2$  dan akuades; gambar (B) menunjukkan pada kelompok perlakuan kombinasi  $\text{Ca(OH)}_2$  -ekstrak kulit buah coklat; gambar (C) menunjukkan pada kelompok perlakuan kombinasi  $\text{Ca(OH)}_2$  -ekstrak teh hijau

Apabila dibandingkan maka pada hari ke-7 yang terlihat pada pemeriksaan IHC adalah bakal/calon *dentin bridge*, sedangkan pada hari ke-28 luas daerah *dentin bridge* dapat diamati dengan lebih jelas. Di sini dapat terlihat juga bahwa semakin luas daerah *dentin bridge* yang terbentuk, maka semakin terlihat juga



kontras pada warna coklat dari P38 yang teraktivasi. Hal ini juga membuktikan bahwa P38 akan terus ada hingga proses penyembuhan dari pulpa berakhir.

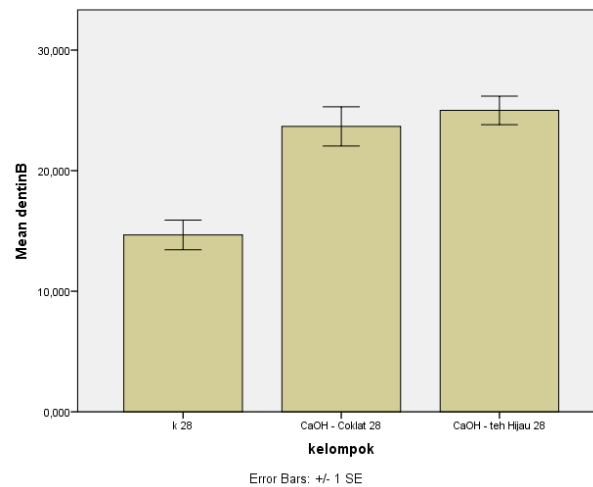
## 5.2 Analisa Statistik Perhitungan *Dentin Bridge*

Sebelum dilakukan analisis data, dilakukan uji normalitas Shapiro-Wilk dan uji homogenitas Levene. Pada uji Shapiro- Wilk didapatkan nilai berturut-turut untuk kelompok kontrol, kelompok kombinasi  $\text{Ca(OH)}_2$  + ekstrak kulit buah coklat, dan kelompok kombinasi  $\text{Ca(OH)}_2$  + ekstrak teh hijau pada hari ke- 28 sebesar 0,030, 0, 978, dan 0,985. Sedangkan pada kelompok kontrol kelompok kombinasi  $\text{Ca(OH)}_2$  + ekstrak kulit buah coklat, dan kelompok kombinasi  $\text{Ca(OH)}_2$  + ekstrak teh hijau pada hari ke- 7 tidak dilakukan perhitungan karena belum terlihat adanya pembentukan *dentin bridge*. Karena p-value sebesar  $> 0,05$ , maka pada kelompok kontrol data tidak terdistribusi normal sehingga akan dilanjutkan dengan uji Kruskal Wallis untuk membandingkan tiap kelompok. Uji Levene dilakukan untuk mengetahui homogenitas data, pada kelompok sampel hari ke- 28 dan hasil yang didapat adalah 0,000 di mana p- value sebesar  $< 0,05$  yang berarti data yang didapat tersebut homogen.

Hasil analisis data pada luas *dentin bridge* dengan satuan  $\mu\text{m}^2$  yang didapat pada 3 kelompok perlakuan dengan N masing-masing 6 dapat dilihat melalui nilai rerata dan standar deviasi pada tabel 5.1. dan ditampilkan pada grafik sebagai berikut:

Tabel 5.1 Hasil perhitungan nilai rerata dan standar deviasi luas daerah *dentin bridge* (dalam  $\mu\text{m}^2$ ) pada hari ke- 28

Kelompok	Mean	Standar Deviasi	p-value
Kontrol	14,66667	3,011091	0.05
Ca(OH) <sub>2</sub> + Coklat	23,66667	3,983298	
Ca(OH) <sub>2</sub> + Teh hijau	25,00000	2,898275	

Grafik 5.1. Grafik nilai rerata perhitungan *dentin bridge*

Selanjutnya dilakukan uji Kruskal Wallis pada masing- masing kelompok untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang bermakna di antara kelompok perlakuan. Didapatkan nilai kemaknaan data sebesar 0,005 di mana  $0,005 < 0,05$  sehingga terdapat perbedaan signifikan antara kelompok perlakuan. Analisis dilanjutkan dengan uji Tukey untuk melihat perbedaan pada masing- masing kelompok terhadap nilai rerata *dentin bridge* pada hari ke- 28.

Tabel.5.2 Uji beda antar kelompok perlakuan menggunakan *Multiple Comparison* Tukey pada perhitungan *dentin bridge* hari ke- 28 (\* *p-value* < 0,05)

Kelompok Perlakuan	Kontrol	Ca(OH) <sub>2</sub> - Coklat	Ca(OH) <sub>2</sub> - Teh hijau
Kontrol	-	-	-
Ca(OH) <sub>2</sub> - Coklat	0,000*	-	-
Ca(OH) <sub>2</sub> - Teh hijau	0,000*	0,921	-

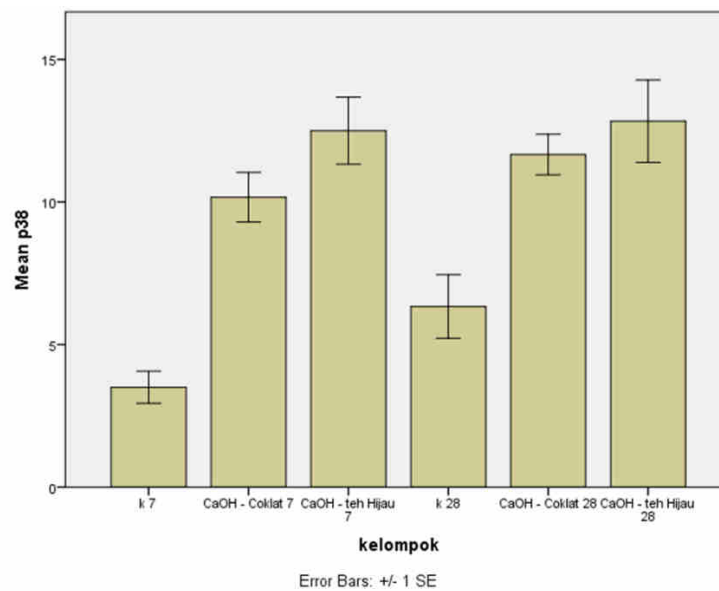
Berdasarkan pada tabel 5.2, dapat dilihat bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dengan kedua kelompok perlakuan kombinasi Ca(OH)<sub>2</sub> + ekstrak kulit buah coklat dan kelompok perlakuan kombinasi Ca(OH)<sub>2</sub> + ekstrak teh hijau dengan nilai sebesar 0,000, di mana *p-value* < 0,05. Sedangkan pada kelompok perlakuan kombinasi Ca(OH)<sub>2</sub> + ekstrak kulit buah coklat dan Ca(OH)<sub>2</sub> + ekstrak teh hijau tidak didapatkan perbedaan yang bermakna dengan nilai yang didapat yaitu 0,921.

### 5.3 Analisa Statistik Perhitungan MAPK P38

Untuk dapat mengamati jumlah sel yang teraktivasi oleh p38 maka dilakukan analisis data dan didapatkan nilai rerata (mean) dan standar deviasi dari pemeriksaan imunohistokimia p38 dapat dilihat pada tabel 5.3 dan disajikan pada grafik 5.2.

Tabel 5.3 Hasil nilai rerata dan standar deviasi aktivasi MAPK P38 pada hari ke-7 dan 28

Kelompok Perlakuan	Hari ke-7		Hari Ke-28	
	Mean	Standar Deviasi	Mean	Standar Deviasi
Kontrol	3,50	1,378	6,33	2,733
Ca(OH) <sub>2</sub> + Coklat	10,17	2,137	11,67	1,751
Ca(OH) <sub>2</sub> + Teh hijau	12,50	2,881	12,83	3,545



Grafik 5.2 Grafik nilai rerata 3 kelompok perlakuan terhadap P38 pada hari ke-7 dan ke-28

Uji normalitas Shapiro-Wilk pada pengamatan IHC MAPK P38 berturut-turut pada kelompok kontrol, kelompok kombinasi Ca(OH)<sub>2</sub> + ekstrak kulit buah coklat, dan kelompok kombinasi Ca(OH)<sub>2</sub> + ekstrak teh hijau pada hari ke- 7 didapatkan nilai sebesar 0,178, 0,331, dan 0,913, sedangkan pada kelompok kontrol, kelompok kombinasi Ca(OH)<sub>2</sub> + ekstrak kulit buah coklat, dan kelompok kombinasi Ca(OH)<sub>2</sub> + ekstrak teh hijau pada hari ke- 28 didapatkan nilai sebesar 0,242, 0,918, dan 0,574 di mana *p-value* > 0,05 yang berarti semua data

berdistribusi normal. Uji Levene untuk mengetahui homogenitas data dilakukan setelahnya dan didapatkan nilai sebesar 0,413 di mana  $p\text{-value} > 0,05$  yang menunjukkan data homogen, sehingga 2 syarat untuk melakukan uji Anova terpenuhi.

Kemudian uji Anova dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan yang bermakna pada tiap- tiap kelompok perlakuan. Pada uji Anova didapatkan nilai kemaknaan data 0,000 di mana  $0,000 < 0,05$  sehingga menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok perlakuan. Analisa dilanjutkan dengan post hoc test untuk mengetahui perbedaan pada tiap-tiap kelompok dengan menggunakan Tukey. Hasil dari Uji Tukey dapat dilihat pada tabel 5.4 dan tabel 5.5.

Tabel 5. 4 Uji beda antar kelompok menggunakan *Multiple Comparison* Tukey HSD pada aktivasi P38 hari ke- 7

Kelompok	Kontrol	Ca(OH) <sub>2</sub> - Coklat	Ca(OH) <sub>2</sub> - Teh hijau
Kontrol	-	-	-
Ca(OH) <sub>2</sub> - Coklat	0,011*	-	-
Ca(OH) <sub>2</sub> - Teh hijau	0,001*	0,964	-

\*terdapat perbedaan yang signifikan ( $p\text{-value} < 0,05$ )

Berdasarkan pada tabel 5.4, dapat dilihat bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dengan kedua kelompok perlakuan kombinasi Ca(OH)<sub>2</sub> + ekstrak kulit buah coklat dan kelompok perlakuan kombinasi Ca(OH)<sub>2</sub> + ekstrak teh hijau dengan nilai sebesar 0,011 dan 0,001, di mana  $p\text{-value} < 0,05$ . Sedangkan pada kelompok perlakuan kombinasi Ca(OH)<sub>2</sub> + ekstrak kulit buah

coklat dan  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  + ekstrak teh hijau tidak didapatkan perbedaan yang bermakna dengan nilai yang didapat yaitu 0,964.

Tabel 5. 5 Uji beda antar kelompok menggunakan *Multiple Comparison* Tukey HSD pada aktivasi P38 hari ke- 28

Kelompok	Kontrol	$\text{Ca}(\text{OH})_2$ - Coklat	$\text{Ca}(\text{OH})_2$ - Teh hijau
Kontrol	-	-	-
$\text{Ca}(\text{OH})_2$ - Coklat	0,000*	-	-
$\text{Ca}(\text{OH})_2$ - Teh hijau	0,000*	0,118	-

\*terdapat perbedaan yang signifikan ( $p$ -value < 0,05)

Selanjutnya pada tabel 5.5, juga dapat dilihat bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dengan kedua kelompok perlakuan kombinasi  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  + ekstrak kulit buah coklat dan kelompok perlakuan kombinasi  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  + ekstrak teh hijau dengan nilai sebesar 0,000, di mana  $p$ -value < 0,05. Sedangkan pada kelompok perlakuan kombinasi  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  + ekstrak kulit buah coklat dan  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  + ekstrak teh hijau tidak didapatkan perbedaan yang bermakna dengan nilai yang didapat yaitu 0,118.

#### 5.4 Efek Durasi pada Aktivasi MAPK P38

Selanjutnya akan dilakukan *independent t-test* untuk mengamati ada atau tidaknya pengaruh lamanya waktu aplikasi bahan pada kelompok perlakuan terhadap luas daerah *dentin bridge* serta jumlah sel yang teraktivasi p38. Hasil dari *independent t-test* terhadap aktivasi p38 dapat dilihat pada tabel 5.6.

Tabel 5.6 Uji beda antar waktu pengamatan menggunakan independent t-test pada aktivasi MAPK P38

Waktu Pengamatan	Kontrol	Ca(OH) <sub>2</sub> + Ekstrak Kulit buah Coklat	Ca(OH) <sub>2</sub> + Ekstrak Teh Hijau
Hari ke-7	0,073	0,336	0,775
Hari ke- 28			

Berdasarkan tabel 5.6, tidak didapatkan perbedaan yang bermakna pada kelompok kontrol serta kedua kelompok perlakuan kombinasi Ca(OH)<sub>2</sub> + ekstrak kulit buah coklat dan kelompok perlakuan kombinasi Ca(OH)<sub>2</sub> + ekstrak teh hijau terhadap aktivasi MAPK P38 dengan hasil berturut-turut 0,073, 0,336, dan 0,775 di mana *p-value* < 0,05.

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Pada penelitian ini kalsium hidroksida ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) dikombinasikan dengan ekstrak kulit buah coklat serta dikombinasikan dengan ekstrak teh hijau sebagai bahan *pulp capping* dengan harapan terjadinya proses penyembuhan dari jaringan pulpa yang perforasi yang lebih baik, dibandingkan apabila  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  yang dikombinasikan dengan aquades, yang ditandai dengan pembentukan dentin reparatif. Pembentukan dentin reparatif diawali dengan proses inflamasi yang dapat terjadi salah satunya melalui jalur aktivasi dari MAPK p38. Pada penelitian ini pengamatan dentin reparatif dilakukan pada hari ke- 28 berdasarkan penelitian Njeh *et al.*, 2016 di mana dentin reparatif akan mulai terbentuk sebagian pada minggu ke-4 setelah aplikasi pasta berbahan dasar  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  dan aktivasi MAPK p38 diamati pada hari ke- 7 dan serta 28 di mana jalur aktivasi p38 memainkan peran penting untuk dalam memproduksi sitokin pro inflamasi (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6) dimulai dari proses inflamasi hingga proses *repair* selesai (Zarubin dan Han, 2005).

Berdasarkan tabel nilai rerata luas daerah dentin reparatif pada hari ke- 28 menunjukkan pada kelompok kontrol menunjukkan nilai rerata yang paling rendah dibandingkan dengan kelompok perlakuan kalsium hidroksida dengan ekstrak kulit buah coklat dan kalsium hidroksida dengan ekstrak teh hijau. Hal ini terjadi karena kalsium hidroksida memiliki kekurangan sebagai bahan *pulp capping* antara karena pengaplikasian langsung kalsium hidroksida pada pulpa terbuka akan menyebabkan nekrosis koagulasi superfisial sehingga menyebabkan terjadinya iritasi ringan pada



jaringan di bawahnya sehingga menyebabkan *tunnel defect* yang berakibat kurang berkualitaskan dentin yang terbentuk.

Pada hari ke- 7, tidak dilakukan pengamatan dentin reparatif yang terbentuk, karena menurut Njeh *et al.*, 2016 dentin reparatif baru akan mulai terlihat pada minggu ke- 2 dan 3 dari daerah perifer pulpa model tikus, sedangkan pada hari ke- 28 didapatkan perbedaan bermakna antara nilai rerata luas daerah dentin reparatif pada kelompok kontrol dengan kombinasi kalsium hidroksida dengan ekstrak kulit buah coklat serta kombinasi kalsium hidroksida dengan ekstrak teh hijau, namun tidak ditemukan perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan kombinasi kalsium hidroksida dengan ekstrak kulit buah coklat dan kombinasi kalsium hidroksida dengan ekstrak teh hijau. Pada aktivasi MAPK p38 juga terlihat hasil yang serupa yaitu terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol  $\text{Ca(OH)}_2$  dan kedua kelompok perlakuan, yaitu pada kombinasi  $\text{Ca(OH)}_2$  dengan ekstrak kulit buah coklat juga pada kelompok kombinasi  $\text{Ca(OH)}_2$  dan ekstrak teh hijau, namun tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kedua kelompok perlakuan tersebut.

Hal ini dapat terjadi karena ekstrak kulit buah coklat dan ekstrak teh hijau memiliki kandungan utama polifenol, pada teh hijau yaitu EGCG dan pada coklat adalah flavanol, yang memiliki efek anti-inflamasi, di mana keduanya akan melakukannya melalui tiga jalur yaitu melalui regulasi MAPK, penghambatan jalur  $\text{Nf}\kappa\beta$ , dan penghambatan melalui siklooksigenase dan lipoksigenase, namun hasil yang didapat tidak ada perbedaan yang signifikan pada penelitian ini.

Perbedaan yang tidak signifikan dapat disebabkan oleh perbedaan konsentrasi pada kedua ekstrak yang digunakan pada penelitian kali ini. Ekstrak teh hijau yang digunakan pada konsentrasi 100%, berdasarkan penelitian sebelumnya (Sundari *et al.*, 2009) yang mengindikasikan bahwa teh hijau dalam konsentrasi tersebut terbukti tidak toksik, sedangkan ekstrak kulit buah coklat yang digunakan adalah 74%, sesuai dengan penelitian Heriawan, 2018 di mana *optical density* pada fibroblas sel ligamen periodontal akan mengalami 50% kematian pada konsentrasi 75% kulit coklat, sehingga ekstrak teh hijau memiliki luas dentin reparatif yang sedikit lebih baik dikarenakan konsentrasinya yang lebih tinggi. Hal lain yang juga dapat berpengaruh adalah besarnya kandungan polifenol yang ada pada ekstrak kulit buah coklat dan ekstrak teh hijau, berdasarkan analisa dari laboratorium Balai Penelitian dan Konsultasi Industri, kandungan polifenol pada ekstrak teh hijau sebanyak 23,10%, sedangkan pada ekstrak kulit buah coklat sebesar 6,12%.

Sedangkan pada lamanya durasi aplikasi pada tiap kelompok perlakuan terhadap aktivasi MAPK P38 didapatkan hasil berupa tidak adanya perbedaan yang bermakna dari pengamatan tiap kelompok baik kontrol maupun perlakuan pada hari ke-7 dibandingkan dengan hari ke- 28. Hal ini dapat terjadi dikarenakan jalur pensinyalan p38 memainkan peran penting dalam respon repair daripada *dentin-like complexes* pada selama proses dentinogenesis tersier (dalam hal ini dentin reparatif) (He *et al.*, 2017)

## **BAB 7**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **7.1 Kesimpulan**

1. Pembentukan dentin reparatif yang terbentuk pada hari ke-28 yang lebih luas ditemukan pada kombinasi kalsium hidroksida dan ekstrak teh hijau dibandingkan dengan kombinasi kalsium hidroksida dan ekstrak kulit buah coklat.
2. Aktivasi MAPK P38 yang terlihat pada hari ke-7 dan hari ke- 28 lebih tinggi pada kelompok kombinasi kalsium hidroksida dan teh hijau dibandingkan dengan kelompok kombinasi kalsium hidroksida dan ekstrak kulit buah coklat

#### **7.2 Saran**

1. Diperlukan penelitian lebih lanjut tentang konsentrasi toksik ekstrak kulit buah coklat dan ekstrak teh hijau pada jaringan pulpa secara spesifik.
2. Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai reaksi kimia kombinasi bahan kalsium hidroksida dengan ekstrak teh hijau serta kombinasi bahan kalsium hidroksida dengan ekstrak kulit buah coklat.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alex, Gary. (2018). Direct and Indirect Pulp Capping: A Brief History, Material Innovations, and Clinical Case Report. *The Compendium of continuing education in dentistry*.p. 39
- Cabrera C, Artacho R, Gimenez R. Beneficial effect of green tea. *J Am Coll Nutr* 2006;25(2):79–99
- Chu DC, Juneja LR. *General chemical composition of green tea and its infusion. Chemistry and applications of green tea*. New York: CRC Press New York; 1997. pp. 25-29
- Dammaschke, T.2010. *Rat Molar Teeth as a study model for direct pulp capping research in dentistry. Laboratoy animals*, 44(1), pp. 1-6
- Fajriani, Mustamin AW, Asmawati. The role of cacao extract in reduction of the number of mutans streptococci colonies in the saliva of 12-14 year-old-children. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 2016;34:120-3
- Garg, N. and Garg, A., 2013. *Textbook of operative dentistry*. Jaypee Brothers medical publishers (P) Ltd.p. 77,90
- Garg, N. and Garg, A., 2014. *Textbook of operative dentistry*. Jaypee Brothers medical publishers (P) Ltd. p. 56,68
- Goldberg, M., Farges, JC., Lacerda-Pinheiro, S., Six, N., Jegat, N., Decup, F., Septier D., Carrouel, F., Durrand, S., Chaussain-Miller, C. and DenBesten, P., 2008. Inflammation and immunological aspects of dental pulp repair. *Pharmacological research*, 58(2), pp. 137-147.
- Goldberg, M., Kulkarni

- , AB., Young, M., and Boskey, A., 2011. Dentin: Structure, Composition and Mineralization. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, 3, p. 711
- Ghani, A.M. 2002. *Dasar-Dasar Budidaya Teh*. Penebar Swadaya, Jakarta. p. 15
- Gunawiyaya FA. Penentuan LD-50 ekstrak teh hijau 8. pada mencit strain C3H. *Majalah Ilmu Kedokteran USAKTI* 1996;15(4):1645–50.
- Heriawan, ADP. 2018. Uji sitotoksitas ekstrak kulit buah coklat (*Theobroma Cacao L.*) pada sel human periodontal ligament fibroblast (HPdlf). *Repository Universitas Airlangga*. pp. 8-10
- Hidayati AO, Lestariana W, Huriyati E. *Efek ekstrak teh hijau (Camellia sinensis (L.) O. Kuntze var. assamica) Terhadap Berat Badan Dan Kadar Malondialdehid Wanita Overweight*. *Jurnal Gizi Klinik Indonesia* Vol. 9, No. 1, Juli 2012: 41-48.
- Hilton, TJ., 2009. *Keys To Clinical Success With Pulp Capping: A Review Of The Literature*. *Operative dentistry*, 34 (5), pp. 615-625.
- Hosoya A, Nakamura H. *Ability of Stem and Progenitor Cells in the Dental Pulp to Form Hard Tissue*. *Japanese Dental Science Review* (2015) 51, 75-83.
- Hu, CC., Zhang, C., Qian, Q., and Tatum NB., 1998. Reparative dentin formation in rat molars after direct pulp capping with growth factors. *Journal of endodontics*, 24(11), pp. 744-751.
- Iohara, K., Nakashima, M., Ito, M., Ishikawa, M., Nakashima, A., and Akamine, A., 2004. Dentin Regeneration By Dental Pulp Stem Cell Therapy With Recombinant Human Bone Morphogenic Protein 2. *Journal of dental research*, 83(8), pp.590-595.

Izzuddin, Ahmad Faris Adli and Anisa Nurkesuma. "The Potential Of Cocoa ( *Theobroma Cacao L .* ) Pods Extract in Periodontal Dressing To Rabbit Gingival Wound Healing." (2015).pp. 10, 24-25

<https://kinimall.co.id/daily-beauty/manfaat-teh-hijau-untuk-kulit-wajah/> (diakses pada 9-8-2018; 08.34)

Koike, Toshiyuki *et al.* "Induction of reparative dentin formation on exposed dental pulp by dentin phosphophoryn/collagen composite." *BioMed research international* vol. 2014 (2014): 745139. doi:10.1155/2014/745139. pp. 40-49

Kurnia PA, Ardhiyanto HB, Suhartini. *Potensi Ekstrak Teh Hijau (Camellia sinensis) Terhadap Peningkatan Jumlah Sel Fibroblas Soket Pasca Pencabutan Gigi pada Tikus Wistar.* e-Jurnal Pustaka Kesehatan, vol. 3(no.1), Januari, 2015, pp. 20-24

Larjava H. 2012. *Oral wound healing: cell biology and clinical management.* Oxford: John Wiley & Sons, p.101

Lawalata V N. 2012. *Rekayasa Proses Ekstraksi Kulit Buah Langsung (Lansium domesticum var. langsung) sebagai Bahan Antibakteri dan Antioksidan.* [disertasi]. Bogor (ID): Program pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, p. 15

Maeda-Yamamoto M, Ema K, Shibuichi I. *In vitro and in vivo anti-allergic effects of 'benifuuki' green tea containing 0-methylated catechin and ginger extract enhancement.* *Cytotechnology.* 2007;55:135–42.

Mulyatni Agustin Sri, Budiani Asmini, dan Taniwiryo Darmono. *Aktivitas antibakteri ekstrak kulit buah kakao (Theobroma cacao L.) terhadap Escherichia coli, Bacillus subtilis, dan Staphylococcus aureus.* Menara Perkebunan 2012 80(2), 77-84

- Nanci, A., 2007. *Ten cate's oral histology-pageburst on vital source: development, structure, and function*. Elsevier Health Science, pp. 45-47
- Njeh, A., Uzunoğlu, E., Ardila-Osorio, H. *et al.* Reactionary and reparative dentin formation after pulp capping: Hydrogel vs. Dycal. *Evid.-based endod* 1, 3 (2016) doi:10.1186/s41121-016-0003-9, pp. 70-78
- Nursal W, Sri, Wilda S. Bioaktifitas Ekstrak Jahe (*Zingiber officinale* Roxb.) dalam Menghambat Pertumbuhan Koloni Bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*. *Jurnal Biogenesis* Vol. 2(2) 2006 pp 64-66
- Octiara, Essie. Dentin Reparatif dan Growth Factor yang Berperan dalam Dentinogenesis Reparatif. *dentika Dental Journal* Vol. 18, No. 3; 2015: 294-299
- Pambudi, J. 2000. Potensi Teh sebagai Sumber Zat Gizi dan Perannya dalam Kesehatan. Di dalam Prosiding Seminar "Teh untuk Kesehatan". Pusat Penelitian Teh dan Kina Gambung. Bandung, pp. 35-38
- Parolia, A., Kundabala, M., Rao, NN., Acharya, SR., Agrawal., P., Mohan, M., and Thomas, M., 2010. *A comparative histological analysis of human pulp following direct pulp capping with propolis mineral trioxide aggregate and Dycal*. *Australian dental Journal*, 55(1), pp. 59-64.
- Qureshi A, Soujanya E, Nandakumar, Pratapkumar, Sambashivarao. *Recent Advances in Pulp Capping Material: An Overview*. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2014, Vol. 8 (1): 316-321.
- Rachmawaty, A. Mu'nisa, Hasri. 2017. Identifikasi Senyawa Aktif Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) Sebagai Kandidat Fungisida Nabati. Makassar: UNM, pp. 25-28

- Rojas A, Padidam M, Cress D, Grady WM. *TGF- $\beta$  Receptor Levels Regulate the Specificity of Signaling Pathway Activation and Biological Effects of TGF- $\beta$* . *Biochimica et Biophysica Acta* 1793 (2009) p.1165-1173.
- Roux, PP and Blenis John. ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiology and Molecular Biology reviews*, June 2004, p. 320–344 Vol. 68, No. 2
- Saleh, ERM. 1998. Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.). Bogor: IPB
- Song M, Yu B, Kim S, Hayashi M, Smith C, Sohn S, Kim E, Lim J, Stevenson RG, Kim RH. *Clinical and Molecular Perspective of Reparative Dentin Formation: Lessons Learned from Pulp Capping Materials and the Emerging Roles of Calcium*. *Dent Clin North Am* 2017;61(1):93-110
- Sundari, D, Nuratmi, B, Winarno, MW. "Toksisitas Akut (Ld50) Dan Uji Gelagat Ekstrak Daun Teh Hijau (*Camellia Sinensis* (Linn.) Kunze) Pada Mencit" *Media Penelitian dan Pengembangan Kesehatan*, vol. 19, no. 4, Dec. 2009, doi:<https://dx.doi.org/10.22435/mpk.v19i4.Des.774>. pp.200
- Suprihatini, R. 2007. Teh Hitam untuk Pengendalian Diabetes. Pusat Penelitian Teh dan Kina. <http://www.ritc.or.id/berita/tehhitam-untuk-pengendalian-diabetes.html>.
- Tachibana H. Green tea polyphenol sensing. *Japan Academy*. 2011;87(3):66–80.
- Torabinejad, M., Walton, RE., and Fouad, A., 2012. *Endodontics: Principles And Practice*. Elsevier Health Science. pp. 23-25
- Toruon PL, Lukman G, Bony O. *Performance nutrition*. 6. Jakarta: Prima Diet Catering; 2008. pp. 50



- Wahyudi, T., Panggabean, T.R. dan Pujiyanto. Panduan Kakao Lengkap, Manajemen Agribisnis dari Hulu hingga Hilir. Penebar Swadaya, Jakarta. 2008; p. 5-6
- Yuni Erlita. 2016. Kulit Buah Kakao untuk Pakan Ternak. Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan. <http://www.sumbarprov.go.id/details/news/9171> (diakses pada 9-8-2018; 08.21)
- Xu X, Zhou DX, Wu CD. *The tea catechin epigallocatechin gallate suppresses cariogenic virulence factor of streptococcus mutans*. ASM [serial online]. 2011 Maret ;3(55): 200-3[internet]. Available from: URL: <http://aac.asm.org>.
- Zarubin T dan Han J. *Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway*. *Cell Research*, 15(1):11-18, Jan 2005

LAMPIRAN 1

SERTIFIKAT KELAIKAN ETIK



**BALAI PENELITIAN DAN KONSULTASI INDUSTRI**  
**LABORATORIUM**  
**PENELITIAN DAN KONSULTASI INDUSTRI**  
**SURABAYA – JAWA TIMUR**


**REPORT**

**Certificate of Analysis**

No : 07329/KI/X-2010  
Code : Penelitian  
Sample Sender : Mhs. PKG UNWAT Surabaya  
Sample Name : Ekstr.K Coklat  
Test : Senar aktif  
Sample Brand :  
Sample Identity : Cairan kental keoklatan  
Sample Accepted : 10 Okt. 2010

Chemical laboratory test result is :

1. Philip Hanel , S : 5,12  
2. Flavonoid , S : 3,22  
3. Tanin , S : 3,02  
4. Alk. eloid , S : 10,11

  
Surabaya, 10 Okt. 2010  
Head of Chemical Laboratory Researcher  
  
Drs M. Fatoni, M.S.

Laboratory Office Jl. Ketintang Baru XVII no 14  
Telp 08155151337, Bank BCA – Bank Jatim  
Surabaya

LAMPIRAN 2

SERTIFIKAT ANALISIS EKSTRAK TEH HIJAU DAN EKSTRAK KULIT BUAH COKLAT

BALAI PENELITIAN DAN KONSULTASI INDUSTRI  
LABORATORIUM  
PENELITIAN DAN KONSULTASI INDUSTRI  
SURABAYA – JAWA TIMUR



REPORT

Certificate of Analysis

No : 073/28/KI/X-2018  
Code : Penelitian  
Sample Sender : Pns. Pns. DWAIN  
Sample Name : ekstrak teh hijau  
Test : Bahan Aktif  
Sample Brand :  
Sample Identity : Cairan kental keoklatan  
Sample Accepted : 16 Okt 2018

Chemical laboratory test result is:

1. Polyphenol	%	:	23,18
2. Flavonoid	%	:	5,11
3. Tanin	%	:	6,56
4. Kafein	%	:	5,80



Surabaya, 17 Okt 2018

Head of Chemical Laboratory Researcher

Drs M. Fatoni, M.S.

Laboratory Office Jl. Ketintang Baru XVII no 14  
Telp 08155151337, Bank BCA – Bank Jatim  
Surabaya

**LAMPIRAN 3****HASIL UJI STATISTIK****Descriptives**

p38

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					k 7	6		
CaOH - Coklat 7	6	10,17	2,137	,872	7,92	12,41	8	13
CaOH - teh Hijau 7	6	12,50	2,881	1,176	9,48	15,52	9	17
k 28	6	6,33	2,733	1,116	3,47	9,20	2	9
CaOH - Coklat 28	6	11,67	1,751	,715	9,83	13,50	9	14
CaOH - teh Hijau 28	6	12,83	3,545	1,447	9,11	16,55	9	19
Total	36	9,50	4,199	,700	8,08	10,92	2	19

**Test of Homogeneity of Variances**

p38

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,039	5	30	,413

**ANOVA**

p38

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	427,667	5	85,533	13,553	,000
Within Groups	189,333	30	6,311		
Total	617,000	35			

Tukey HSD<sup>a</sup> P38

kelompok	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
k 7	6	3,50		
k 28	6	6,33	6,33	
CaOH - Coklat 7	6		10,17	10,17
CaOH - Coklat 28	6			11,67
CaOH - teh Hijau 7	6			12,50
CaOH - teh Hijau 28	6			12,83
Sig.		,391	,118	,458

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

**Tests of Normality**

kelompok	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
p38 k 7	.308	6	.077	.857	6	.178
CaOH - Coklat 7	.207	6	.200*	.892	6	.331
CaOH - teh Hijau 7	.141	6	.200*	.973	6	.913
k 28	.263	6	.200*	.874	6	.242
CaOH - Coklat 28	.185	6	.200*	.974	6	.918
CaOH - teh Hijau 28	.204	6	.200*	.929	6	.574

a. Lilliefors Significance Correction

\*. This is a lower bound of the true significance.

**Descriptives**

dentinB

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
k 7	6	,00000	,000000	,000000	,00000	,00000	,000	,000
CaOH - Coklat 7	6	,00000	,000000	,000000	,00000	,00000	,000	,000
CaOH - teh Hijau 7	6	,00000	,000000	,000000	,00000	,00000	,000	,000
k 28	6	14,66667	3,011091	1,229273	11,50672	17,82661	12,000	19,000
CaOH - Coklat 28	6	23,66667	3,983298	1,626175	19,48645	27,84688	18,000	29,000
CaOH - teh Hijau 28	6	25,00000	2,898275	1,183216	21,95845	28,04155	21,000	29,000
Total	36	10,55556	11,410382	1,901730	6,69484	14,41627	,000	29,000

**Test of Homogeneity of Variances**

dentinB

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
9,352	5	30	,000

**ANOVA**

dentinB

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4390,222	5	878,044	158,048	,000
Within Groups	166,667	30	5,556		
Total	4556,889	35			

**dentinB**Tukey HSD<sup>a</sup>

kelompok	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
k 7	6	,00000		
CaOH - Coklat 7	6	,00000		
CaOH - teh Hijau 7	6	,00000		
k 28	6		14,66667	
CaOH - Coklat 28	6			23,66667
CaOH - teh Hijau 28	6			25,00000
Sig.		1,000	1,000	,921

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

**Tests of Normality<sup>b,c,d</sup>**

kelompok	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
dentinB k 28	.377	6	.008	.769	6	.030
CaOH - Coklat 28	.133	6	.200*	.986	6	.978
CaOH - teh Hijau 28	.135	6	.200*	.988	6	.985

a. Lilliefors Significance Correction

\*. This is a lower bound of the true significance.

b. dentinB is constant when kelompok = k 7. It has been omitted.

c. dentinB is constant when kelompok = CaOH - Coklat 7. It has been omitted.

d. dentinB is constant when kelompok = CaOH - teh Hijau 7. It has been omitted.