

BAB 6

PEMBAHASAN

Ekstrak propolis yang dikombinasikan dengan kalsium hidroksida sebagai bahan *pulp capping* memiliki kemampuan sebagai *anti-inflamasi*, *antibakteri*, dan *antioksidan*. Bahan kombinasi kalsium hidroksida dengan ekstrak propolis sebagai bahan *pulp capping* diharapkan dapat memperbaiki kekurangan dari bahan *pulp capping* kalsium hidroksida saja melalui parameter ekspresi Bcl-2 dan Caspase 9 pada aktivitas *mitokondria* sehingga dapat menunjukkan tingkat apoptosis sel fibroblas lebih rendah terhadap paparan kedua bahan *pulp capping* tersebut disebabkan kemampuan antioksidan yang dapat menurunkan (*Reactive Oxygen Species*) ROS sehingga menghambat apoptosis (Parolia et al, 2010).

Waktu paparan yang digunakan pada penelitian ini adalah 24 dan 36 jam berdasarkan penelitian wang *et al* (2013) yang menyebutkan awal dan proses lambat terjadinya apoptosis dimulai dari 6 jam setelah rangsangan dan 24 jam setelah rangsangan, dan penelitian Ghazemi *et al* (2018) mengenai ekspresi Bcl-2 dengan cara pemberian dosis tinggi prednisolon pada kultur sel CCRF-CEM dengan waktu 12, 24, dan 48 jam didapatkan peningkatan ekspresi Bcl-2 pada 24 dan 48 jam, sedangkan pada 12 jam tidak ada perubahan signifikan pada tingkat ekspresi Bcl-2, maka pada penelitian ini dapat disimpulkan puncak ekspresi Bcl-2 ada pada waktu 24 hingga 48 jam.

Penelitian lainnya oleh Haryanto (2019) mengenai ekspresi caspase 9 dengan cara menginduksi terjadinya sepsis yang disebabkan induksi LPS

menggunakan sel Balb/C tikus dengan waktu yang digunakan 12, 24, 36, dan 48 jam terjadi peningkatan jumlah caspase 9 dibandingkan dengan kelompok kontrol, ekspresi caspase 9 menunjukkan penurunan pola dalam serial waktu 12,24,36,dan 48 jam, hingga yang terendah 48 jam menunjukkan tidak ada perbedaan antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol.

Berdasarkan penelitian yang sudah ada sebelumnya, waktu yang sudah digunakan, namun dengan sel yang berbeda, maka untuk menetapkan waktu terbaik untuk melihat ekspresi Bcl-2 dan caspase 9 dilakukan penelitian pendahuluan dengan menggunakan obyek penelitian menggunakan sel pulpa pada gigi tikus wistar yang diperforasi dan diberi aplikasi bahan pulp capping kalsium hidroksida pada 12, 24, dan 36 jam. Hasil penelitian pendahuluan didapatkan puncak peningkatan ekspresi caspase 9 secara signifikan pada 24 dan 36 jam dibanding kelompok kontrol, dan puncak penurunan signifikan Bcl-2 pada 24 dan 36 jam dibanding kelompok kontrol.

Kalsium hidroksida dan ekstrak propolis dikombinasikan dengan perbandingan 1:1,5 hal ini berdasarkan penelitian pendahuluan tentang *viabilitas* oleh Mieke (2018) dimana perbandingan kalsium hidroksida dengan propolis 1:1,5 memiliki *viabilitas* yang lebih baik dibandingkan perbandingan 1:2. Penelitian ini menggunakan tikus jantan galur wistar (*Rattus Novergicus*) berumur 20-28 minggu dengan berat 250-300 gram, dikarenakan gigi molar tikus telah tumbuh sempurna dan memiliki ukuran yang tidak terlalu kecil untuk dilakukan tindakan perforasi pada penelitian ini. Tikus wistar ini digunakan karena pulpanya memiliki bentukan anatomis, histologis, biologis, dan fisiologis yang serupa

dengan gigi manusia. Gigi molar tikus juga menunjukkan kemiripan karakteristik struktur ruang pulpa, jaringan pulpa, akar, dan *apical delta* dengan *foramen apical minor* (Damaschke,2010).

Bahan *pulp capping* kalsium hidroksida yang digunakan dalam kedokteran gigi memiliki kemampuan untuk menstimulasi terjadinya mineralisasi, tetapi memiliki kekurangan yaitu mengiritasi pulpa dan menyebabkan inflamasi. Kalsium hidroksida tidak memberikan adaptasi yang baik terhadap dentin, tidak menunjang *differensiasi odontoblas* dengan konsisten dan terbukti *sitotoksik* pada kultur sel (Bogen et al, 2008). Kalsium hidroksida sebagai bahan *pulp capping* akan terurai dan melepaskan kandungan ion OH⁻ dalam sel fibroblas yang akan menyebabkan terjadinya lipid peroksidase, denaturasi protein, dan gangguan pada DNA oleh karena ion OH⁻ merupakan radikal bebas yang sangat reaktif, aktivitas ini menyebabkan kerusakan membran sel, penguraian protein, dan kerusakan DNA yang bisa menyebabkan kematian sel (Kumar et al, 2015).

Bahan kalsium hidroksida akan dikombinasikan dengan ekstrak propolis karena propolis memiliki sifat *sitotoksik* sepuluh kali lebih rendah daripada kalsium hidroksida dan memiliki kemampuan *antibakteri*, *antioksidan*, dan *antiinflamasi* yang baik (Shrivastava et al., 2016). Kombinasi kalsium hidroksida dan ekstrak propolis yang akan digunakan sebagai bahan *pulp capping* diharapkan memiliki *biokompatibilitas* yang baik, lebih dapat diterima oleh tubuh dan tidak membahayakan jaringan pulpa dan penggunaannya. Bahan kedokteran gigi yang baru harus lolos uji keselamatan (*safety*) dan kemanjuran (*efficacy*) sebelum dipakai (Ronald, 2012). Selain itu dapat merangsang pembentukan dentin

reparatif, dapat mempertahankan vitalitas pulpa, bersifat *bakterisida* atau *bakteriostatik*, *adhesif* pada dentin dan bahan restoratif, steril, bersifat *radiopaque* dan memberikan perlindungan terhadap bakteri (Qureshi, 2014).

Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Dewi (2018) tentang viabilitas secara *in vitro* dari kombinasi kalsium hidroksida dan ekstrak propolis ini, pada konsentrasi perbandingan 1:1,5 (1 untuk kalsium hidroksida dan 1,5 untuk ekstrak propolis) memiliki konsentrasi yang tepat untuk terjadinya proliferasi sel fibroblas dan memiliki *viabilitas* yang tinggi dibandingkan dengan konsentrasi 1:2 (1 untuk kalsium hidroksida dan 2 untuk ekstrak propolis).

Respon biologis sel fibroblas pada pulpa terbuka yang disebabkan oleh jejas mekanik (perforasi pulpa) dan jejas kimia (bahan *pulp capping*) melalui produksi dan ekspresi protein, respons fibroblas terhadap bahan pulp capping merupakan salah satu aspek mendasar dari perawatan jaringan lunak (pulpa) karena bentuk dan fungsi jaringan yang akan dihasilkan sangat tergantung pada interaksi matriks-sel dalam hal ini pembentukan *Odontoblas like cell*. Respon sel fibroblas dilihat melalui parameter apoptosis melalui aktivitas mitokondria Bcl-2 dan caspase 9 pada bahan kombinasi kalsium hidroksida dan ekstrak propolis. Semakin banyak apoptosis dari sel tersebut maka potensi sitotoksitasnya akan semakin besar juga (Rovani et al, 2008).

Apoptosis sendiri adalah suatu proses kematian sel yang terprogram, diatur secara *genetik*, bersifat aktif, ditandai dengan adanya *kondensasi kromatin*, *fragmentasi* sel dan *fagositosis* sel. Apoptosis merupakan proses penting dalam pengaturan *homeostasis* normal, proses ini menghasilkan keseimbangan dalam

jumlah sel jaringan tertentu melalui sel yang rusak dan *proliferasi fisiologis* dan dengan demikian memelihara agar fungsi jaringan normal (Kar, 2015). Apoptosis memiliki 2 jalur yaitu jalur *ekstrinsik* dan jalur *intrinsik*. Jalur *ekstrinsik* melibatkan *Fas*, sedangkan jalur *intrinsik* melibatkan *sitokrom c* yang dirilis dari mitokondria. Mitokondria memegang peran kunci dalam proses regulasi kematian sel. Hal ini karena adanya *sitokrom c* yang berada di daerah membran mitokondria. *Sitokrom c* ini dalam keadaan normal tidak boleh keluar dari mitokondria. Perannya penting pada *foforilasi oksidatif* dari reaksi berantai dalam produksi ATP (Bratton, 2010).

Hasil penelitian ekspresi Bcl-2 pada perlakuan 24 jam dan 36 jam didapatkan nilai ekspresi Bcl-2 paling tinggi yaitu pada kelompok kombinasi kalsium hidroksida dengan ekstrak propolis. Ekspresi Bcl-2 tertinggi pada kombinasi kalsium hidroksida dan ekstrak propolis ada pada waktu 36 jam dibandingkan dengan 24 jam, hal ini sesuai dengan penelitian oleh Ghazemi (2018) dimana terjadi peningkatan ekspresi Bcl-2 seiring dengan semakin lamanya waktu paparan. Pada jalur mitokondria, protein kelompok Bcl-2 berperan penting dalam mengatur apoptosis. Protein kelompok Bcl-2 terdiri atas dua kelompok, yaitu protein antiapoptosis (*Bcl-2* dan *Bcl-XL*), dan protein proapoptosis yaitu *Bax*, *Bok*, *Bak*, *Bid*, *Bim*, *Bik*, *Bad*, *Bmf*, *Hrk*, *Noxa*, dan PUMA. Ekspresi berlebih dari Bcl-2 dapat mencegah pelepasan *sitokrom-c* dari mitokondria, aktivasi kaspase, dan fragmentasi DNA (Kim, 2006). Tingginya ekspresi Bcl-2 pada kelompok kombinasi kalsium hidroksida dengan propolis, dapat menunjukkan tingkat kematian sel secara apoptosis atau terprogram yang

disebabkan oleh bahan *pulp capping* kombinasi kalsium hidroksida dengan propolis ini rendah, karena Bcl-2 merupakan regulator apoptosis yang berfungsi sebagai anti apoptosis atau menghambat terjadinya apoptosis (Roufayel, 2016). Bila dibandingkan dengan kelompok kontrol dan kelompok kalsium hidroksida dengan air deionisasi terdapat perbedaan yang signifikan, Rendahnya ekspresi Bcl-2 pada kelompok kontrol dan kelompok kalsium hidroksida dengan air deionisasi dapat disebabkan oleh karena tidak adanya kandungan ekstrak propolis yang memiliki kemampuan *antibakteri*, *antioksidan* dan *anti-inflamasi*, serta tidak adanya kandungan senyawa *flavonoid*, asam amino, *terpen*, serta *derivate asam sinamat* pada propolis (Segueni *et al.*, 2016). *Flavonoid* pada ekstrak propolis mempunyai kandungan *antioksidan* yang sangat kuat. *Flavonoid* mampu menurunkan tingkat ROS (Reactive Oxygen Species) sehingga protein proapoptosis tidak meningkat. *Flavonoid* juga dapat berpengaruh langsung dan menstabilkan membran biologis, sehingga lebih tahan terhadap oksidasi serta mampu mengikat *Hidroksil radikal* (OH[•]) sehingga mencegah terjadinya kerusakan sel dengan menghalangi pelepasan *sitokrom c* dari mitokondria, dan juga mengikat *apaf-1* dan menghalangi pengaktifan inisiasi caspase 9 (Kurek *et al.*, 2014).

Pada perlakuan 24 jam dan 36 jam pada ekspresi caspase 9 didapatkan nilai ekspresi Caspase 9 paling tinggi pada kelompok kontrol, dan terdapat perbedaan yang signifikan dibandingkan dengan kelompok kalsium hidroksida dengan air deionisasi dan kelompok kombinasi kalsium hidroksida dengan ekstrak propolis artinya perlakuan perforasi pada pulpa memberikan efek peningkatan

ekspresi caspase 9. Ekspresi Caspase 9 tertinggi pada kelompok kontrol dengan waktu 24 jam dibandingkan dengan 36 jam, hal ini sesuai dengan penelitian oleh Haryanto (2019) dimana ekspresi caspase 9 menunjukkan penurunan pola seiring dengan semakin lamanya waktu paparan yang menunjukkan pemulihan dan hilangnya fenomena gejala klinis yang ada. Tingginya caspase 9 dikarenakan pada kelompok kontrol tidak ada bahan aktif yang bersifat antibakteri maupun anti inflamasi yang memicu terjadinya penyembuhan seperti pada kelompok perlakuan. Caspase-9 yang merupakan *caspase* hulu yang diaktifkan bila *sitokrom c* dilepaskan dari *mitokondria* dalam merespon berbagai bentuk sinyal stress atau kematian sel termasuk karena adanya jejas, caspase 9 merupakan inisiator dalam proses kematian sel secara apoptosis, aktivasi *caspase-9* tergantung hasil dari ikatan antara *cytochrome c* – *Apaf-1* (Bratton, 2010). Perforasi pada ruang pulpa menyebabkan terjadinya inflamasi akut merupakan respon terhadap jejas yang berlangsung relatif singkat dari beberapa menit sampai beberapa hari ditandai dengan perubahan *vascular*, perubahan pembuluh darah yang mengakibatkan peningkatan aliran darah (*vasodilatasi*) dan perubahan struktural yang memungkinkan protein plasma untuk meninggalkan sirkulasi (peningkatan *permeabilitas vascular*) (Kumar, 2012). Penelitian yang dilakukan secara *in vitro* dan *in vivo* pada jaringan pulpa yang mengalami inflamasi menunjukkan adanya respon imun pada *pulpitis reversibel* dan *ireversibel* antara lain melalui beberapa ekspresi sitokin (Mooduto, 2012). Sitokin ini diproduksi oleh *limfosit* T dan B maupun sel-sel lain yang berfungsi sebagai respon terhadap mikroba dan antigen lain yang memperantarai dan mengatur reaksi imunologik dan reaksi inflamasi

seperti *Tumor Necrosis Alfa* (TNF- α), *Interleukin 1* (IL-1) dan *Interleukin 6* (IL-6). TNF- α dan IL-1 yang memiliki peran penting pada reaksi inflamasi akut. Sitokin ini sebagai *imunomodulator* akan memacu apoptosis karena menyebabkan peningkatan ROS (*Reaktif Oxygen Species*) dan menghambat Bcl-2 sebagai protein antiapoptosis (Kresno, 2011).

Ekspresi Caspase 9 pada waktu 24 jam dan 36 jam antara kelompok kalsium hidroksida dengan air deionisasi dan kelompok kombinasi kalsium hidroksida dan ekstrak propolis adalah lebih tinggi pada kelompok kalsium hidroksida dengan air deionisasi namun tidak berbeda secara signifikan antara keduanya. Caspase berperan penting dalam mengatur dan mengeksekusi kematian sel secara apoptosis. Caspase mempunyai tiga domain yaitu ujung *amino terminal*, domain besar dan domain kecil. Ujung amino terminal berperan dalam mengatur aktivitas enzim, domain besar atau caspase hulu (caspase-2, 8, 9, dan 10) berperan sebagai *inisiator* (pemicu) apoptosis yang terdiri lebih dari 100 asam amino. Domain kecil atau caspase hilir (caspase-3, 6, dan 7) yang berperan sebagai *efektor* atau *eksekutor* apoptosis, adalah bagian yang terlibat langsung dalam penghancuran sel (Ashkenazi, 2002). Rendahnya ekspresi Caspase 9 pada kelompok kalsium hidroksida dengan air deionisasi dan kelompok kombinasi kalsium hidroksida dengan ekstrak propolis, dapat menunjukkan tingkat kematian sel secara apoptosis atau terprogram lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol. Hal ini dapat disebabkan pada kelompok kalsium hidroksida dengan air deionisasi memiliki pH yang tinggi yaitu 12 (basa) dan dapat mengurangi inflamasi yang disebabkan oleh jejas mekanik perforasi pulpa, sehingga mengurangi sitokin dan

mengurangi terjadinya ROS (*Reactive Oxygen Species*). Pengurangan produksi ROS oleh mitokondria dapat mengurangi kerusakan oksidatif terhadap protein, membrane dan DNA dari mitokondria itu sendiri, mengurangi gangguan kemampuan sintesa ATP dan fungsi metabolik lainnya. Pengurangan kerusakan oksidatif mitokondria juga dapat menurunkan kecenderungan mitokondria untuk melepaskan protein dari *intermembrane space* seperti *cytochrome c* ke sitosol oleh *Mitochondrial Outer Membran Permeabilization* (MOMP) dan kemudian mengakibatkan peningkatan Bcl-2 sebagai anti apoptosis dan mengurangi caspase 9 (Murphy MP, 2009). Sedangkan pada kombinasi kalsium hidroksida dan ekstrak propolis memiliki ekspresi caspase 9 rendah dapat dikarenakan kandungan ekstrak propolis yang dikombinasikan dengan kalsium hidroksida yaitu *flavonoid* ini berikatan dengan *Hydroxyl radikal* kemudian diubah menjadi air dan *fenyl oxide radikal* sehingga mampu menghambat radikal bebas dan menyebabkan penurunan ROS dan memberikan stimulus dengan merangsang anggota famili anti-apoptosis Bcl-2 (Wong, 2011) dan juga kandungan CAPE yang merupakan oksidan kuat dan dapat mengikat radikal bebas dan menekan ROS dapat mencegah kematian sel serta dosis yang tepat pada konsentrasi 1:1,5 juga mampu meningkatkan proliferasi sel fibroblas (Dewi, 2018).

Ekspresi Bcl-2 dan Caspase 9 yang saling berhubungan diuji melalui pengujian korelasi Pearson dan seluruh kelompok perlakuan dengan waktu 24 jam didapatkan nilai signifikansi atau p-value sebesar 0,037 dimana nilai ini $< 0,05$ sehingga dapat disimpulkan bahwa ada korelasi yang signifikan antara ekspresi Bcl-2 dan ekspresi Caspase 9 pada waktu 24 jam, dan juga didapatkan nilai

korelasi pearson $-0,457$ yang menunjukkan tingkatan korelasi dalam tingkat sedang, dan tanda minus menunjukkan hubungan yang terbentuk antara ekspresi Bcl-2 dan ekspresi Caspase 9 adalah negatif, artinya semakin tinggi ekspresi Bcl-2 maka ekspresi Caspase 9 semakin rendah demikian pula sebaliknya (Kar, 2015).

Hal ini sesuai dengan peran Bcl-2 yang merupakan gen spesifik yang menghambat apoptosis sel dan memainkan peran penting dalam pengaturan apoptosis sel dalam melawan berbagai bentuk kematian sel, dan memperpanjang rentang hidup sel, yang mengarah ke peningkatan jumlah sel (Roufayel, 2016). Caspase 9 yang merupakan inisiator dalam proses apoptosis sel melalui pembebasan sitokrom-c dari ruang intermembran mitokondria ke dalam sitosol, merupakan kunci untuk mengaktifkan caspase-9. Sitokrom-c akan berinteraksi dengan *apoptotic protease-activating factor-1 (Apaf-1)*, ATP/dATP, dan caspase-9, dengan membentuk badan yang disebut *apoptosom*. *Apoptosom* ini bertindak sebagai *aktivator* pada *inisiator* caspase. Caspase-9 bentuk aktif ini kemudian mengaktifkan caspase-3, caspase-6, dan caspase-7 yang menyebabkan program kematian sel (apoptosis) (Bratton, 2010).