

COMPARISON OF THE NUMBER OF MACROPHAGES IN THE RAT REVERSIBLE PULPITIS AFTER APPLICATION OF BIODENTIN AND SIWAK EXTRACT

Andina Rizkia Putri Kusuma*, Rahmawati Sri Praptiningsih**, Arlina Nurhapsari ***, Hafizhah Athif Aisyah***

* Departemen Konservasi Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Islam Sultan Agung

** Departemen Biologi Oral Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Islam Sultan Agung

*** Program Pendidikan Dokter Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Islam Sultan Agung

Korespondensi : Andina Rizkia Putri Kusuma, Departemen Konservasi Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Islam Sultan Agung, Jln. Kaligawe KM 4 Semarang 50012 ph. (024) 6583584 fax. (024) 6594366. andina@unissula.ac.id

Keywords:

macrophages, reversible pulpitis, direct pulp capping, biodentin, siwak extract.

ABSTRACT

Background: Oral disease still need special attention, especially in dentistry. Inflammation of the pulp is caused by the presence of irritants. One of the mechanical irritants is iatrogenic factors caused by operator error during preparation so that roof of pulp chamber is exposed. This condition is called reversible pulpitis/inflammation of the pulp. Cells that play a role during inflammation are macrophages which are the second defense cell after neutrophil apoptosis. A direct pulp capping procedure is indicated for this condition. The material commonly used is biodentin, but because the price tends to be expensive, alternative materials are needed. Siwak contains flavonoids which are known to play an important anti-inflammatory role in the healing of exposed pulp. The purpose of this study was to compare the number of macrophages in the dental pulp of rats with reversible pulpitis after administration of biodentin and siwak extract.

Method: This research is a true experimental with a post test only group design, consisting of 2 treatment groups, namely the 75% siwak extract group and the biodentin group. The material is applied after the tooth has been prepared. The research sample used male wistar rats and sacrificed on the 3rd day. Samples were stained with Hematoxylin Eosin to see macrophage cells.

Result: The data obtained were analyzed using the independent T-test. The test results showed a significant difference, with a value of $p = 0.008$ ($p < 0.05$).

Conclusion: The conclusion of this study that the siwak extract group showed a lower mean number of macrophage cells than the biodentin group.

PENDAHULUAN

Menurut survei dari Kemenkes RI tahun 2011 menjelaskan bahwa penyakit pulpa dan periapikal menempati urutan ke – 7 dari daftar penyakit yang termasuk rawat jalan di rumah sakit pada tahun 2010¹. Pulpa gigi meliputi lebih dari satu lapisan yaitu lapisan odontoblas, lapisan *cell-free zone*, *cell-rich zone*, dan inti pulpa dengan macam-macam komponen di dalamnya seperti pembuluh darah, saraf, sel fibroblast, sel

mesenkim, dan sel imun (makrofag dan limfosit)².

Pulpa mempunyai beberapa fungsi yaitu fungsi induktif, fungsi formatif, fungsi reparatif, fungsi nutritif, dan fungsi protektif³.

Apabila ada stimulus atau substansi asing, pulpa gigi akan mengeluarkan respon imun sebagai perlawanan yaitu pulpitis atau peradangan pulpa⁴. Peradangan pulpa yang ringan atau sering disebut sebagai pulpitis reversible dapat kembali sembuh jika rangsangan dihilangkan⁵. Sel yang berperan pada saat terjadi

inflamasi yaitu makrofrag yang merupakan sel pertahanan kedua setelah neutrofil apoptosis⁶.

Salah satu teknik perawatan pulpitis reversible yang digunakan adalah kaping pulpa. Tujuan kaping pulpa adalah mempertahankan pulpa agar tetap vital dengan mengurangi proses inflamasi yang ditandai dengan menurunnya jumlah sel makrofag. Sel makrofag yang berjumlah tinggi berakibat pada sebuah kerusakan jaringan sehat pada sekitar peradangan⁷.

Salah satu bahan kaping pulpa yang biasa digunakan dalam kedokteran gigi adalah Biodentine⁸. Biodentine adalah bahan berbasis biologis aktif yang mempunyai kemampuan hampir setara dengan dentin dan bisa digunakan sebagai pengganti dentin pada mahkota maupun akar gigi. Biodentine telah dikonfirmasi memiliki sifat biokompatibilitas yang baik, *impermeable* dalam jangka waktu yang lama, stabil, tidak mudah larut, waktu *setting* cepat dan mudah dimanipulasi⁹. Akan tetapi, kekurangan dari Biodentine adalah harganya yang cenderung mahal dibanding bahan lainnya. Selain harganya yang cenderung mahal dibanding bahan lainnya, pemberian Biodentine juga bersifat sensitif. Hal ini dapat menyebabkan inflamasi yang terus berlanjut dan mencegah perbaikan jaringan¹⁰.

Biodentine memiliki beberapa kekurangan yang menyebabkan kembalinya perhatian terhadap bahan herbal alternatif yang menjadi sunnah Rasul, mempunyai kandungan yang berkhasiat, dan aman dengan sedikit atau tanpa efek samping yang dapat merugikan yaitu siwak (*Salvadora Persica*). Kandungan dalam siwak mengandung berbagai aktivitas farmakologis, diantaranya anti inflamasi yang diperantarai oleh flavonoid¹¹.

Berdasarkan teori ilmiah tersebut maka tujuan penelitian berikut guna meneliti atau mengetahui perbandingan dari jumlah makrofag pada pulpa gigi hewan tikus yang mengalami

pulpitis reversible setelah pemberian biodentin dan ekstrak siwak.

METODE PENELITIAN

Penelitian berikut ialah penelitian *true eksperimental* menggunakan rancangan *post test only control group*. Diperoleh sampel sejumlah 10 ekor tikus, dihitung menggunakan rumus WHO. Lalu sampel tersebut dibagi menjadi 2 kelompok (kelompok biodentin dan kelompok ekstrak siwak).

Alat serta bahan yang dipergunakan dalam penelitian berikut terbagi menjadi beberapa bagian: alat untuk persiapan hewan coba, alat serta bahan guna pembuatan pasta siwak, alat serta bahan guna pembuatan kavitas pada gigi molar tikus, alat serta bahan guna aplikasi perlakuan, alat serta bahan pengambilan sampel, alat serta bahan guna pembuatan dan pengamatan preparat.

Batang kayu siwak dibersihkan, dipotong, dan dikeringkan. Setelah itu, dihaluskan dan diayak untuk mendapatkan serbuk siwak. Serbuk siwak dicampur dengan pelarut etanol 96% 1000ml. Lalu dihomogenkan dengan suhu 40^o selama 3x24 jam. Kemudian disaring, diremaserasi, dan dievaporasi pada suhu 45^o. Hasil ekstrak siwak ditimbang hingga 15 gram dan dicampurkan dengan placebo sebagai basis pasta dengan perbandingan 3:1, lalu didapatkan pasta ekstrak siwak 20 gram.

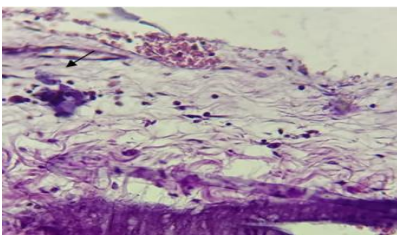
Hewan coba dilakukan pemeliharaan serta perlakuan di laboratorium hewan coba Fakultas Kedokteran Unissula. Tikus wistar jantan dianestesi *intramuscular* ketamine HCl 10% 0,1ml/100 gram BB. Kemudian dilkaukan sebuah preparasi dari kavitas kelas I di permukaan oklusal gigi molar rahang atas. Kedalaman dari preparasi kavitas sampai terlihat kemerahan sebagai atap pulpa telah terbuka. Lalu kavitas disterilkan dan dikeringkan dengan kapas. Kemudian diaplikasikan bahan yaitu biodentin dan pasta siwak pada masing-masing

kelompok. Kavitas ditumpat dengan *semen zinc fosfat*. Tikus dipelihara selama 3 hari.

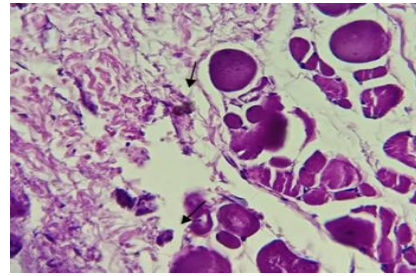
Hewan dari masing-masing kelompok dikorbkan dengan menggunakan inhalasi *chloroform* pada hari ke-3. Selanjutnya, dilakukan dislokasi servikal dan pemotongan rahang tikus. Pemotongan jaringan dimulai dari mesial gigi molar 1 hingga distal gigi molar 3. Sampel jaringan ditempatkan dalam larutan formalin buffered netral 10% serta diberi label yang jelas berisi jenis organ jaringan, tanggal pengambilan, spesies hewan dan bahan pengawetnya. Sampel dibuat blok paraffin kemudian dipotong menjadi irisan setebal 5 μm pada mikrotom. Sampel diwarnai dengan metode pewarnaan *hematoxylin-eosin* (HE). Semua bagian dipasang pada *object glass* yang ditutup dengan *deck glass*. Pengamatan sediaan histologis dilaksanakan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x. Perhitungan jumlah sel makrofag dilakukan pada 1 preparat dengan 3 lapang pandang yang berbeda dan hasilnya di rata-rata. Penelitian yang dilakukan ini atas dasar dari persetujuan Komite Etik Penelitian dengan Nomor Layak Etik 314/ B.1 – KEPK/SA – FKG / X/2021.

HASIL PENELITIAN

Hasil penelitian mengenai jumlah sel makrofag pada gigi tikus yang mengalami pulpitis reversible setelah pemberian biodentin dan ekstrak siwak menunjukkan gambaran histopatologi dan rerata jumlah sel makrofag sebagai berikut:

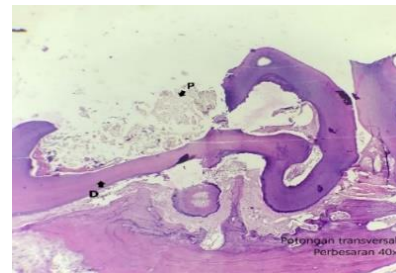


Gambar 1. Sel makrofag pada kelompok ekstrak siwak perbesaran 400x



B

Gambar 2. Sel makrofag pada kelompok biodentin perbesaran 400x



C

Gambar 3. Potongan transversal perbesaran 40x, P= pulpa, D= dentin

Tabel 1. Hasil rata-rata jumlah sel makrofag

No	Kelompok	Rata-rata	Standard Deviasi
1	Ekstrak siwak 75%	2.60	± 0.30
2	Biodentin	3.26	± 0.28

Berdasarkan gambaran dan rata-rata yang tertera di atas, terlihat jumlah sel makrofag lebih sedikit pada kelompok ekstrak siwak daripada kelompok biodentin.

Tabel 2. Hasil dari uji normalitas dan uji homogenitas

Kelompok	Shaphiro-Wilk	Levene test
Ekstrak siwak 75%	0.295	0.750*
Biodentin	0.269	

Data yang didapatkan dari hasil penelitian yang kemudian dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas. Terlihat pada tabel 2 bahwa uji

normalitas dengan *Shapiro wilk test* pada kedua kelompok dihasilkan nilai yang signifikan yaitu ($p > 0,05$) dan hasil dari uji homogenitas dengan *Levene test* dihasilkan nilai signifikan yaitu ($p > 0,05$) yang menunjukkan data terdistribusikan dengan normal dan homogen sehingga syarat dari uji parametrik *Independent T-Test* terpenuhi.

Selanjutnya setelah syarat dari uji parametrik, diteruskan dengan uji hipotesis *Independent T-Test* sebagai uji komparatif variable numerik dua kelompok yang hasil ujinya terlihat pada tabel berikut ini :

Tabel 3. Uji *Independent T-Test*

Kelompok	<i>Independent T-Test</i>
Ekstrak siwak 75%	0.008
Biodentin	

Dapat dilihat pada tabel di atas, hasil nilai signifikansi adalah 0,008 ($p < 0,05$) maka dapat dihasilkan kesimpulan jika terdapat perbedaan yang signifikan diantara kelompok ekstrak siwak dan biodentin.

DISKUSI

Berdasarkan hasil pengamatan yang di dapat, menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dalam jumlah sel makrofag pada pulpa gigi tikus yang mengalami pulpitis reversible. Jumlah sel makrofag lebih kecil pada kelompok ekstrak siwak dibanding biodentine.

Hal itu sesuai dengan penelitian terdahulu bahwa kandungan utama pada siwak yang mampu berfungsi sebagai antiinflamasi adalah flavonoid yang memiliki peran dalam meningkatkan regenerasi pulpa dengan cara menginduksi terbentuknya jembatan dari dentin pada perawatan kaping pulpa direk¹². Kandungan flavonoid pada ekstrak siwak sangat berperan dalam mempercepat proses inflamasi, hal ini disebabkan

oleh (1) kemampuan flavonoid dalam menghambat enzim siklooksigenase dan lipooksigenase yang membuat produksi prostaglandin dan leukotrien berkurang yang menyebabkan leukotrien B4 yang berfungsi sebagai kemotaksis dari neutrofil serta adhesi neutrofil ke dalam endotel menjadi berkurang dan prostaglandin yang menurun mengurangi terjadinya vasodilatasi pembuluh darah, (2) kemampuan flavonoid pada siwak dalam meningkatkan resistensi dan menjaga permeabilitas pembuluh darah terhadap adanya iritan, (3) kemampuan flavonoid meningkatkan interaksi sel dan adhesi molekul yang sangat penting untuk proses proliferasi sel¹²⁻¹⁴. Hasil penelitian oleh Kim¹³ menyatakan bahwa flavonoid menjadikan percepatan dari proses penyembuhan luka dengan cara meningkatkan dan mempercepat proliferasi sel fibroblas serta produksi dari kolagen.

Flavonoid pada ekstrak siwak tidak hanya berperan dalam antiinflamasi, namun berfungsi sebagai anti bakteri dan antioksidan. Flavonoid sebagai anti bakteri bekerja dengan melakukan penghambatan fungsi dari membran sel dan metabolisme energi dari bakteri. Saat penghambatan membran sel terjadi, flavonoid akan membentuk senyawa yang cukup kompleks dengan protein ekstraseluler yang merusak membran sel bakteri^{15, 16}. Flavonoid akan menghambat proses metabolisme energi yang dilakukan dengan cara menghambat dari penggunaan oksigen yang dilakukan oleh bakteri. Energi yang dibutuhkan bakteri dalam biosintesis makromolekul, akan menjadikan metabolisme bakteri tidak berkembang^{16, 17}. Efek antioksidan flavonoid secara tidak langsung akan mendukung efek anti inflamasi flavonoid. Dengan adanya radikal bebas dapat menarik mediator inflamasi. Flavonoid akan menyeimbangkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) ketika melakukan reaksi dengan radikal bebas¹⁸. Masing-masing pengaruh mekanisme anti bakteri

dan anti oksidan pada ekstrak siwak ini mendukung efek anti inflamasi pada ekstrak siwak. Ketiga mekanisme ekstrak siwak akan bekerja secara bersamaan dalam menghambat fase inflamasi pada pulpa gigi tikus yang dilakukan kaping pulpa direk sehingga dapat menurunkan jumlah sel makrofag.

Berbeda dengan siwak, biodentine merupakan material berbasis *bioactive calcium silicate* sebagai bahan dengan kemampuan yang sama dengan dentin sehingga dapat digunakan sebagai pengganti dentin⁹. Mekanisme kerja dari biodentine melalui kandungan utamanya yaitu trikalsium silikat yang dapat memodulasi sel pulpa untuk mensekresi TGF- β , yang merupakan sitokin untuk diferensiasi odontoblast yang bertanggung jawab untuk dentinogenesis reparative¹⁹. Trikalsium silikat menghasilkan ion *silicon* yang berfungsi untuk memicu proliferasi dari sel fibroblast dalam menghasilkan kolagen yang diikuti dengan penurunan sel makrofag²⁰. Studi lain menyebutkan bahwa trikalsium silikat dapat menginduksi pertumbuhan serta diferensiasi sel dan mengendapkan kristal hidroksiapatit. Trikalsium silikat yang dicampur dengan air dapat menginduksi lapisan mineralisasi yang memiliki ikatan yang kuat pada matrik dentin dan struktur dari gigi. Kandungan kalsium hidroksida menciptakan suasana basa yang menyebabkan bakteri tidak berkembang²¹.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan terdapat keterbatasan yaitu belum dapat mengidentifikasi jenis makrofag yang diamati. Terdapat dua tipe makrofag yaitu makrofag M1 (pro inflamasi) serta makrofag M2 (anti inflamasi). Kelompok makrofag M1 diaktifkan oleh *lipopolysaccharides* (LPS) dan *Interferon gamma* (IFN- γ) sehingga mengeluarkan sitokin proinflamasi yaitu IL-1, IL-6, TNF- α . Sebaliknya,

makrofag M2 yang berfungsi dalam proses konstruktif seperti penyembuhan luka dan perbaikan jaringan, dan mematikan aktivasi system kekebalan yang merusak dengan cara memproduksi sitokin anti inflamasi seperti IL-4, IL-10 dan TGF- β ²²⁻²⁵. Makrofag M1 diamati menggunakan metode pewarnaan imunohistokimia dengan antibodi anti iNOS serta makrofag M2 diamati menggunakan metode pewarnaan imunohistokimia dengan antibodi anti arginase-1²⁶.

KESIMPULAN

Berdasarkan pada penelitian yang sudah dilakukan, dapat disimpulkan bahwasanya ada perbedaan jumlah sel makrofag setelah aplikasi bahan kaping pulpa dengan ekstrak siwak dan biodentine pada pulpa gigi tikus wistar jantan yang mengalami pulpitis reversible. Kelompok yang diaplikasikan ekstrak siwak memiliki jumlah sel makrofag lebih sedikit dibandingkan kelompok biodentine.

UCAPAN TERIMAKASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada banyak pihak yang telah membantu jalannya penelitian ini, terutama institusi yaitu Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Sultan Islam Agung.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kemenkes RI, *Profil Kesehatan Indonesia 2016*. 2011.
2. J. Ingle, Leif K. Bakland, H. C, and B. J. Craig, "modern endodontic therapy: past, present and future," in *modern endodontology*, 2019, p. 368.
3. S. Puspita, "Fungsi Jaringan Pulpa dalam Menjaga Vitalitas Gigi," no. 4, 2010.
4. E. W. Bachtiar, M. Yuniastuty, A. Monica, and B. M. Bachtiar, "Pengaruh Pemberian Kombinasi Sel Punca Pulpa Gigi dan Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 terhadap Kadar Fosfatase Alkali pada Pulpa Gigi Tikus Terinflamasi," *dentika Dent. J.*, vol. 16, no. 1, pp. 36-40, 2011.
5. Grossman, "Grossman's Endodontics Practice 13th Edition," India: Wolters Kluwer, 2014, p. 576.

6. N. Fatimatuzzahro, T. Haniastuti, and J. Handajani, "Respon Inflamasi Pulpa Gigi Tikus Sprague Dawley Setelah Aplikasi Bahan Etsa Ethylene Diamine Tetraacetic Acid 19% dan Asam Fosfat 37%," *Dent. J. (Majalah Kedokt. Gigi)*, vol. 46, no. 4, p. 190, 2013, doi: 10.20473/j.djmg.v46.i4.p190-195.
7. Soepribadi, "Regenerasi dan Penyembuhan," Jakarta: EGC, 2013, p. 12.
8. I. A. Soedjono, P. Pendidikan, D. Gigi, I. K. Gigi, F. K. Gigi, and U. Indonesia, "Perbandingan Pengelepasan Ion Kalsium," *Univ. Indones.*, 2014.
9. T. Annisa and A. S. P. Pertiwi, "Biodentine pada Pulpotomi Vital Gigi Sulung," *Indones. J. Paediatr.*, vol. 1, no. 2, pp. 197–203, 2018.
10. G. Nayak and M. F. Hasan, "Biodentine- a Novel Dentinal Substitute for Single Visit Apexification," *Restor. Dent. Endod.*, vol. 39, no. 2, p. 120, 2014, doi: 10.5395/rde.2014.39.2.120.
11. F. Fatkhurrohman and A. Medawati, "Efektifitas Ekstrak Etanol Kayu Siwak (*Salvadora Persica* L.) Dengan Metode Perkolasi Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus Aureus* Isolat 248 Yang Resisten Multiantibiotik," *Insisiva Dent. J. Maj. Kedokt. Gigi Insisiva*, vol. 2, no. 2, pp. 35–42, 2013.
12. A. Sabir, "THE USES OF FLAVONOIDS IN DENTISTRY." pp. 81–87, 2013.
13. S.-J. Kim, M.-H. Lim, I.-K. Chun, and Y.-H. Won, "Effect of Flavonoids of Ginkgo biloba on Proliferation of Human Skin Fibroblast," *Ski. Pharmacol*, vol. 10, pp. 200–205, 1997.
14. F. I. Putri, "Respons Antiinflamasi Ekstrak Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* Linn) Terhadap Jumlah Sel Neutrofil Pada Gingiva Tikus Wistar Jantan Pasca Diinduksi Oleh *Porphyromonas gingivalis*," *Univ. Jember*, 2015.
15. M. C. Nuria, "Maulita Cut Nuria, dkk Uji Aktivitas Antibakteri", vol. 5, no. 2, pp. 26–37, 2009.
16. T. U. Sapara and O. Waworuntu, "Efektivitas Antibakteri Ekstrak Daun Pacar Air (*Impatiens Balsamina* L.) Terhadap Pertumbuhan *Porphyromonas Gingivalis*," *Pharmacon*, vol. 5, no. 4, pp. 10–17, 2016, doi: 10.35799/pha.5.2016.13968.
17. T. P. T. Cushnie and A. J. Lamb, "Antimicrobial activity of flavonoids," *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 26, no. 5, pp. 343–356, 2005, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002.
18. Murray, "Bahan Ajar Uji Bioaktivitas : Antioksidan," *Univ. Udayana*, no. April, pp. 1–51, 2009, [Online]. Available: https://simdos.unud.ac.id/uploads/file_pondidikan_1_dir/75b8895f814f85fe9ae5ce91dc5411b1.pdf.
19. S. H. Narváez and A. L. V. Rodriguez, "Biodentine: Un nuevo material en terapia pulpar / Biodentine: A New Material for Pulp Therapy," *Univ. Odontol.*, vol. 34, no. 73, pp. 69–76, 2015, doi: 10.11144/javeriana.uo34-73.bmtp.
20. A. Marapita, A. Rizkia, P. Kusuma, and M. Muhtar, "Perbandingan Jumlah Sel Makrofag Pulpa Gigi Tikus Wistar Setelah Aplikasi Tiga Jenis Medikamen Kaping Pulpa," *Konf. Ilm. Mhs. Unissula* 3, pp. 21–28, 2020.
21. S. Deviyanti, "SEMEN TRIKALSIMUM SILIKAT SEBAGAI BAHAN ALTERNATIF UNTUK PENATALAKSANAAN HIPERSENSITIF DENTIN (Kajian Pustaka)," *J. Ilm. dan Teknol. Kedokt. Gigi*, vol. 13, no. 1, p. 12, 2017, doi: 10.32509/jitekgi.v13i1.852.
22. D. Mukhtar, "Makrofag Pada Jaringan Adiposa Obes Sebagai Penanda Terjadinya Resistensi Insulin," *Maj. Ilm. Widya*, vol. 3, no. 317, pp. 30–31, 2013, [Online]. Available: <https://e-journal.jurwidyakop3.com/index.php/majalah-ilmiah/article/view/52>.
23. K. G. Baratawidjaja and I. Rengganis, *Imunologi Dasar*, XI (cetaka. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 2016.
24. I. D. Sarihati, "Makrofag Dan Aterosklerosis," *Meditory J. Med. Lab.*, vol. 5, no. 1, pp. 61–67, 2017, doi: 10.33992/m.v5i1.113.
25. F. M. Siregar, "Immunosenescence : Penuaan Pada Sel Makrofag," *J. Ilmu Kedokt.*, vol. 13, no. 1, p. 14, 2019, doi: 10.26891/jik.v13i1.2019.14-22.
26. H. Taurina, "Jumlah Makrofag M1 dan M2 Dan Derajat Histologi Tumor Pada Model Karsinoma Payudara Tikus Sprague Dawley Yang Diinduksi 7,12 Dimethylbenz Anthracene (DMBA)," *Dr. Diss. Univ. Gajah Mada*, 2016.