

**Efektivitas Ekstrak Ikan Haruan (*Channa striata*) Terhadap
Kadar Alkalin Fosfatase pada *Odontoblast Cell Line***

**The Effectivity Of Haruan Extract (*Channa striata*) On The
Level Of Alkaline Phosphatase In Odontoblast Cell Line**



TESIS

ANDI WISDA MARTIANI MAYASARI

J102216102

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER GIGI SPESIALIS
PROGRAM STUDI KONSERVASI GIGI
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2018**

**Efektivitas Ekstrak Ikan Haruan (*Channa striata*) Terhadap
Kadar Alkalin Fosfatase pada *Odontoblast Cell Line***

TESIS

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Profesi Spesialis
Bidang Ilmu Konservasi Gigi**

Disusun dan Diajukan Oleh

ANDI WISDA MARTIANTI MAYASARI

J102216102

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER GIGI SPESIALIS
PROGRAM STUDI KONSERVASI GIGI
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2018**

PENGESAHAN TESIS

**EFEKTIVITAS EKSTRAK IKAN HARUAN (*Channa striata*) TERHADAP
KADAR ALKALIN FOSFATASE
PADA ODONTOBLAST CELL LINE**

Diajukan oleh

Andi Wisda Martianti Mayasari

J102216 102

Telah disetujui

Makassar, 13 Agustus 2018

Pembimbing I




Dr.drg. Juni Jekti Nugroho, Sp.KG(K)
NIP.19710625-200501 2 001

Pembimbing II




Dr.drg. Andi Sumidarti A., M.Kes
NIP.19571128-198603 2 001

**Ketua Program Studi
Pendidikan Dokter Gigi Spesialis
Konservasi Gigi**



Dr.drg. Juni Jekti Nugroho, Sp.KG(K)
NIP.19710625 200501 2 001

**Dekan
Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Hasanuddin**



Prof. Dr.drg. Bahruddin Thalib, M.Kes, Sp.Prof(K)
NIP.19640814 199103 1 002

TELAH DIUJI OLEH PANITIA PENGUJI TESIS

PADA TANGGAL 13 AGUSTUS 2018

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Dr. drg. Juni Jekti Nugroho, Sp.KG(K)
Anggota : Dr. drg. Andi Sumidarti, M.Kes
: Dr. drg. Aries Chandra Trilaksana, Sp.KG(K)
: drg. Nurhayaty Natsir, Ph.D., Sp.KG
: drg. Christine A. Rovani, Sp.KG

Mengetahui,

Ketua Program Studi

Pendidikan Dokter Gigi Spesialis Konservasi Gigi



Dr. drg. Juni Jekti Nugroho, Sp.KG(K)

NIP. 19710625 200501 2 001

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Andi Wisda Martianti Mayasari

Nomor Mahasiswa : J102216 102

Program Studi : Program Pendidikan Dokter Gigi Spesialis

Program Studi Konservasi Gigi.

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tesis atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 13 Agustus 2018

Yang menyatakan



Andi Wisda Martianti Mayasari

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim

Assalamu alaikum wr.wb

Dengan mengucapkan puji dan syukur kehadiran Allah SWT, karena atas berkah, rahmat, dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini dengan judul “Efektivitas ekstrak ikan haruan (*Channa striata*) terhadap kadar alkalin fosfatase pada *odontoblast cell line*”.

Pada kesempatan ini, penulis menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada yang terhormat :

1. Prof. Dr.drg. Bahruddin Thalib, M.Kes, Sp.Pros (K), sebagai dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hasanuddin periode 2015-2019 atas kesempatan yang diberikan untuk mengikuti Pendidikan Dokter Gigi Spesialis Konservasi Gigi Universitas Hasanuddin Makassar.
2. Dr.drg. Juni Jekti Nugroho, Sp.KG(K) sebagai Ketua Program Studi Konservasi Gigi dan sekaligus sebagai Pembimbing I, yang telah meluangkan waktu, pikiran dan tenaga memberikan arahan, masukan serta dukungan kepada penulis untuk menyelesaikan penelitian ini.
3. Dr. drg. Andi Sumidarti, M.Kes sebagai Pembimbing II yang telah meluangkan waktu, pikiran dan tenaga, dalam memberikan arahan,

masukan serta dukungan kepada penulis untuk menyelesaikan penelitian ini.

4. Dr.drg. Aries Chandra Trilaksana,SP.KG (K) sebagai dosen dan penguji yang telah bersedia memberikan bimbingan, saran dan koreksi terhadap hasil penelitian ini.
5. Dr.drg. Nurhayaty Natsir, Ph.D,SP.KG sebagai dosen dan penguji yang telah bersedia memberikan bimbingan, saran dan koreksi terhadap hasil penelitian ini.
6. drg. Christine A.Rovani,Sp.KG sebagai dosen dan penguji yang telah bersedia memberikan bimbingan, saran dan koreksi terhadap hasil penelitian ini.
7. Drg. Indrya Kirana Mattulada, MS sebagai dosen dan penguji yang telah bersedia memberikan bimbingan, saran dan koreksi terhadap hasil penelitian ini.
8. drg. Wahyuni Suci Dwi Andhany, Sp.KG, sebagai dosen yang selalu memberikan bimbingan dan masukan selama pendidikan Dokter gigi spesialis Konservasi.
9. Lukman, S.Si, sebagai Laboran yang selalu memberikan bimbingan dan masukan selama proses penelitian berlangsung.
10. Teman seperjuangan penelitianku, Sulistiya Hastuti. Suka dan duka penelitian dilalui bersama.

11. Sahabat angkatan 2016 (Aidasriwaty Gasma, Asrianti, Farida Rahim, Ilda Budiwati, Nurtiara Oktaviana, Uci Ernawati, Afniati R, Arisandi, Yonathan)

12. Teman-teman angkatan 2017

13. Terkhusus kepada :

- a. Suami tercinta, dr. Safriadi, terima kasih atas segala doa, dukungan dan kesabaran selama penulis menuntut ilmu.
- b. Almarhum ayah dan ibu tercinta, Alm (A. Syamsuddin) dan almh (Hj.A.Addawiah).
- c. Ibu mertua tercinta, Fatimah Machmud terima kasih atas segala dan dukungan kepada ananda selama ini.
- d. Anak-anakku tercinta Syifa dan Aya. Kalian penyemangat dan selalu menghibur. Semoga kalian bisa melebihi cita-cita orang tuamu.

Akhirnya dengan penuh kesadaran dan kerendahan hati penulis mengucapkan terima kasih yang setulus-setulusnya serta penghargaan kepada semua pihak yang tidak sempat kami sebutkan satu persatu dan semoga Allah SWT selalu melimpahkan rahmat, ridha dan karunia-Nya kepada kita semua dan berkenan menjadikan tesis ini bermanfaat. Amin...

Makassar, Agustus 2018

Andi Wisda Martianti Mayasari

ABSTRAK

ANDI WISDA MARTIANTI MAYASARI. Efektivitas Ekstrak Ikan Haruan (*Channa striata*) Terhadap Kadar Alkalin Fosfatase Pada *Odontoblast Cell Line* (dibimbing oleh Juni Jekti Nugroho dan Andi Sumidarti).

Penelitian ini bertujuan Mengetahui efektivitas pemberian ekstrak ikan haruan (*Channa striata*) terhadap kadar alkalin fosfatase pada *odontoblast cell line*.

Penelitian ini dilakukan di bagian Mikrobiologi, Rumah sakit Pendidikan, Universitas Hasanuddin. Metode yang digunakan dalam penelitian adalah desain penelitian *post test only control group design*. Sampel penelitian adalah *odontoblast MDPC-23 cell line* yang diinkubasi selama 24 jam sebelum perlakuan. Data dianalisis dengan menggunakan analisis statistik Anova dan dilanjutkan dengan *multiple comparison* metode *bonferroni*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi ekstrak ikan haruan (*Channa striata*) 100 µg/mL dan kalsium hidroksida dapat meningkatkan kadar ALP, karena kandungan albumin dalam ekstrak ikan haruan dapat mempersingkat fase inflamasi pada *odontoblast cell line*. Selain itu, ekstrak ikan haruan (*Channa striata*) berpotensi sebagai *carrier* molekul bioaktif dan dapat meningkatkan proliferasi *odontoblast cell line*.

Kata Kunci : Alkalin fosfatase, *Channa striata*, ekstrak ikan haruan, *odontoblast cell line*.

ABSTRACT

ANDI WISDA MARTIANTI MAYASARI. Effectiveness of Haruan Extract (*Channa striata*) on the Level of Alkaline Phosphatase in Odontoblast Cell Line (supervised by Juni Jekti Nugroho and Andi Sumidarti).

This research aimed to find out the effectiveness of haruan extract (*Channa striata*) on the level of alkaline phosphatase in odontoblast cell line.

This research was carried out in the Microbiology Division, Hasanuddin University Hospital. The method used was post test only control group design. The sample was MDPC-23 odontoblast cell line and incubated for 24 hours before treatment. Data were analyzed using Anova statistical analysis and continued by bonferroni multiple comparison method.

The results shows that a combination of 100g / mL of *Channa striata* extract and calcium hydroxide could increase the level of alkaline phosphatase, because the albumin content in haruan extract could shorten the inflammatory phase of odontoblast cell line. In addition, the extract of haruan extract (*Channa striata*) has the potential as a carrier of bioactive molecules and can increase the proliferation of odontoblast cell line.

Keywords : Alkaline phosphatase, *Channa striata*, haruan fish extract, odontoblast cell line.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
PRASYARAT GELAR	ii
PENGESAHAN UJIAN TESIS	iii
PENETAPAN PANITIA PENGUJI	iv
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS	v
KATA PENGANTAR	vi
ABSTRAK	ix
ABSTRACT.....	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian	4
D. Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
A. Pulpa Gigi.....	6
B. Fungsi dan Elemen Pulpa	7
C. Alkalin Fosfatase	15
D. Kolagen	20
E. Inflamasi Pulpa	24
F. Fase Proliferasi.....	26
G. Ikan Haruan (<i>Channa striata</i>)	28

H. Albumin	30
I. Kerangka Teori	35
J. Kerangka Konsep	36
K. Hipotesis Penelitian	37
BAB III METODOLOGI PENELITIAN.....	38
A. Rancangan Penelitian	38
B. Waktu dan Lokasi Penelitian	38
C. Sampel Penelitian	39
D. Variabel Penelitian.....	40
E. Definisi Operasional	41
F. Alat dan Bahan Penelitian	41
G. Prosedur Penelitian	43
H. Analisis Data	49
I. Alur Penelitian	50
BAB IV HASIL PENELITIAN	51
BAB V PEMBAHASAN	54
BAB III KESIMPULAN DAN SARAN.....	60
DAFTAR PUSTAKA.....	61

DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
1. Nomenklatur isoenzim ALP dan lokasi kromosom, ukuran gen, dan nomer aksesnya	19
2. Komposisi nutrisi ikan haruan (<i>Channa striata</i>)	30
3. Perbandingan kadar ALP pada kelompok perlakuan ekstrak ikan haruan(<i>Channa striata</i>)	51
4. Perbandingan ALP pada kelompok kontrol negatif dan kontrol positif	52

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Halaman
1. Gambaran histologi jaringan pulpa	7
2. Diferensiasi sel odontoblas	11
3. Ilustrasi hubungan evolusi isoenzim ALP gen liver/bone/kidney, intestinal, plasenta dan placenta-like genes	19
4. Struktur kolagen	22
5. Ikan haruan (<i>Channa striata</i>)	29
6. Grafik kadar ALP pada kelompok perlakuan ekstrak ikan	52
7. Grafik kadar ALP kelompok kontrol negatif dan kontrol positif	53

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1. Rekomendasi Persetujuan Etik	66
2. Foto Penelitian	67
3. Analisis perbandingan kadar ALP antara kelompok	71

DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN

Lambang/Singkatan	Arti dan Keterangan
ALP	Alkalin Fosfatase
TNAP Fosfatase	<i>Tissue Non</i> Spesifik Alkalin
Ca(OH) ₂	Kalsium Hidroksida
ppm	Part Per Million
STIFA	Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi
CO ₂	Karbon dioksida
FBS	Fetal Bovine Serum
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
μl	Mikroliter
OD	Optical Density
p	Probability
LTA	Lipoteichoic acid
TGF-β	Transforming growth factor-beta

TLR 1 dan 2	Toll-like receptor
DSSP	Dentin sialophosphoprotein
DMP	Dentin matrix protein
BMPs	Bone morphogenetic protein
PDGF	Platelet derived growth factor
IGF	Insulin growth like factor
FGF	Fibroblast growth factor
VEGF	Vascular endothelial growth factor
HDPCs	Human dental pulp cells
BSA	Bovine serum albumin
(-SH)	Gugus sulfidril
NaHCO ₃	Sodium Bikarbonat
LAF	Laminar airflow

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Pulpa dan dentin dikenal sebagai pulpa dentin kompleks, karena keduanya berasal dari jaringan ikat mesodermal dan adanya hubungan yang erat pada lapisan sel pulpa perifer dan perpanjangan tubulus dentinalis. Vitalitas kompleks pulpa dentin sangat penting bagi kehidupan fungsional struktur gigi dan merupakan prioritas dalam strategi manajemen klinis. (Smith, 2003 ;Torabinejad, 2015)

Pulpa gigi dibatasi oleh dentin dan enamel, berada di pusat gigi dan terdiri dari sel odontoblas, sel fibroblas, sistem kekebalan tubuh, sel neuron, sel endotel, dan matriks ekstraselular. (Hashemi, 2017 ; Ricucci, 2013)

Odontoblas adalah salah satu sel paling khusus dari kompleks dentin-pulpa dengan fungsi dentinogenik, imunogenik, dan sensoris. (Torabinejad, 2015). Odontoblas membentuk suatu lapisan di daerah perifer dan membentuk dentin, serta memproduksi substansi dasar dan serabut kolagen yang merupakan matriks ekstraseluler pulpa. (Victor, 2004 ; Widjiastuti, 2014).

Pembentukan matriks dentin melalui diferensiasi odontoblas selama proses mineralisasi dapat diidentifikasi dan dikuantifikasi pada level protein atau ekspresi gen. Beberapa protein yang disekresikan antara lain

alkalin fosfatase (ALP), kolagen tipe-1, dentin matrix protein-1 (DMP-1), dentin sialophosprotein (DSPP), osteonektin dan osteokalsin, sering dijadikan biomarker untuk menganalisis aktivitas odontoblas. (Karanxha, 2014 ; Kim , 2017)

ALP penting pada mekanisme perbaikan dan penyembuhan setelah cedera pulpa dan berperan dalam proses mineralisasi. Aktivitas ALP pada sel odontoblas dan sub odontoblas lebih tinggi dibandingkan sel mesenkimal undiferensiasi lainnya. (Shiba, 2003 ; Yudaniayanti, 2005)

Bila pulpa terkena jejas, berupa trauma mekanis, bahan kimia dan bakteri serta produknya, maka pulpa akan mengadakan reaksi pertahanan berupa respon inflamasi dan respon imun yang dapat bersifat reversibel maupun ireversibel. Karena itu, diperlukan suatu perawatan agar vitalitas pulpa gigi dapat dipertahankan dengan membentuk dentin reparatif atau *dentinal bridge* yang menjadi acuan pada perawatan *pulp capping* (Njeh, 2016 ; Parasuraman, 2013)

Menurut Njeh (2016), keberhasilan perawatan *direct pulp capping* pada pemeriksaan histologis ditentukan berdasarkan terbentuknya *dentinal bridge*.

Mekanisme terbentuknya *dentinal bridge* saat ini belum diketahui secara pasti. Penelitian yang dilakukan oleh Yamamura dan Tziafas (1985) menunjukkan dua mekanisme yang mungkin terjadi pada pembentukan *dentinal bridge* yaitu adanya peranan sel odontoblas dalam

sintesis matriks kolagen dan sel progenitor yang membentuk *odontoblast like cell* pada subodontoblas. (Hammarstrom, 2002 ; Cooper, 2017)

Saat ini kalsium hidroksida telah digunakan sebagai bahan standar dan pilihan untuk perawatan *pulp capping* karena memiliki sifat alkali yang tinggi yang dapat menetralkan asam pada daerah inflamasi, memiliki efek antibakteri dan menstimulasi perbaikan pada pulpa yang terekspos. Namun, kalsium hidroksida memiliki toksisitas yang sangat tinggi terhadap sel dan kultur jaringan sehingga mengakibatkan inflamasi yang berlebihan dan telah terbukti dapat larut dan terdegradasi seiring waktu serta membentuk *dentinal bridge* yang bersifat *porous* dan ireguler yang sering menyebabkan kegagalan isolasi bakteriologis jangka panjang. (Njeh, 2016 ; Parasuraman, 2013 ; Aminabadi 2013)

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengembangkan bahan *pulp capping* yang paling sesuai dan memiliki sifat biokompabilitas yang baik, namun belum ada yang memberikan hasil yang menjanjikan. Oleh karena itu, sangat dibutuhkan pengembangan bahan *pulp capping* yang memiliki kemampuan biologis untuk mengaktifkan odontoblas dan mempercepat pembentukan *dentinal bridge*.

Sumber daya biologis perairan Indonesia mempunyai potensi yang sangat besar dalam pengembangan obat baru, salah satunya ialah ikan haruan (*Channa striata*), tidak hanya digunakan sebagai sumber protein hewani, tetapi juga digunakan sebagai obat alternatif untuk penyembuhan

luka pasca pembedahan, meningkatkan daya tahan tubuh, dan meningkatkan kadar albumin. (Siswanto, 2016)

Penelitian oleh Agustin (2016), menunjukkan bahwa ekstrak ikan haruan mengandung komponen-komponen esensial seperti albumin, dan mineral lain yang berperan dalam penyembuhan luka, yaitu pada fase inflamasi dan proliferasi. Dalam fase proliferasi, odontoblas berperan penting dalam memproduksi kolagen, glikosaminoglikan, serat elastin dan glikoprotein yang akan membentuk matriks fibrodenin.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah yang telah diuraikan, maka dirumuskan masalah sebagai berikut: “Bagaimanakah efektivitas pemberian ekstrak ikan haruan (*Channa striata*) terhadap kadar alkalin fosfatase pada *odontoblast cell line*”?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan Umum

Efektivitas pemberian ekstrak ikan haruan (*Channa striata*) dapat mempengaruhi kadar alkalin fosfatase pada *odontoblast cell line*.

Tujuan Khusus

1. Ekstrak ikan haruan (*Channa striata*) mempengaruhi kadar alkalin fosfatase pada *odontoblast cell line*.

2. Ekstrak ikan haruan (*Channa striata*) dapat merangsang fase proliferasi *odontoblast cell line*.

D. Manfaat Penelitian

1. Manfaat Umum

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan pengetahuan mengenai peran ekstrak ikan haruan (*Channa striata*) terhadap kadar alkalin fosfatase pada *odontoblast cell line*.

2. Manfaat Khusus

Sebagai penelitian awal dalam pemanfaatan ekstrak ikan haruan (*Channa striata*) dalam bidang kedokteran gigi secara umum dan secara khusus dalam bidang konservasi gigi.

BAB II

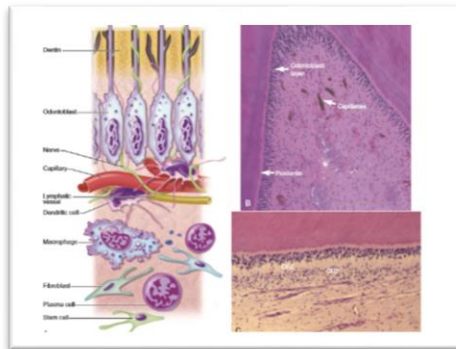
TINJAUAN PUSTAKA

A. Pulpa Gigi

Jaringan pulpa berasal dari sel ektomesenkim. Sel ini mengontrol perkembangan struktur gigi dan pembentukan jaringan kapiler untuk mendukung aktivitas suplai bahan makanan dari kompleks epitel ektomesenkim. Organ pulpa dikelilingi oleh dentin dan bagian tepi dikelilingi oleh lapisan seluler dari odontoblas di sekitar dentin. (Trilaksana, 2015 ; Hashemi , 2017)

Secara histologi pulpa dibagi 2 daerah berdasarkan perbedaan morfologinya : 1) **Pulpa zona perifer**, berlokasi di bagian perifer dan berdekatan dengan dentin serta terdapat deretan sel odontoblas. Di bagian tengah adalah lapisan subodontoblas atau disebut zona bebas sel. Pada daerah ini terdapat pleksus kapiler dan serabut saraf kecil. 2) **Pulpa zona sentral**, berlokasi di bawah zona bebas sel yang merupakan bagian utama pulpa. Daerah ini disebut juga zona kaya sel, karena terdapat pembuluh darah, saraf, sel fibroblas dan komponen ekstraseluler. (Hargreaves, 2012 ; Ricucci, 2013)

Odontoblas merupakan bagian dari dentin maupun pulpa karena badan sel berada pada ruang pulpa dan prosesus sitoplasmik meluas ke dalam tubulus dentin pada bagian dentin yang bermineral. (Ricucci, 2013)



Gambar.1 Gambaran histologi jaringan pulpa (Torabinejad, et all., 2015)

B. Fungsi dan Elemen Pulpa

1. Fungsi Pulpa

Pulpa merupakan organ yang unik, karena merupakan organ khusus dalam tubuh manusia yang mempunyai 5 fungsi, yaitu :
(Torabinejad, 2015 ; Heymann, 2013 ; Trilaksana, 2015)

a. **Formatif**

Produksi dentin primer sekunder yang dibentuk oleh odontoblas. Perannya dalam fungsi formatif, adalah mensintesis dan mensekresi matriks organik, memasukkan komponen anorganik ke dalam matriks dentin yang baru dibentuk, dan menciptakan suatu lingkungan yang memungkinkan terjadi mineralisasi matriks.

b. **Induktif**

Pulpa berpartisipasi dalam induksi dan pengembangan odontoblas dan dentin, bila telah terbentuk, menginduksi pembentukan enamel. Proses ini merupakan aktivitas yang

saling terkait dalam arti bahwa ameloblas mempengaruhi diferensiasi odontoblas dan mempengaruhi pembentukan enamel.

c. **Nutritif**

Melalui tubulus dentinalis, pulpa memasok nutrisi dan air yang sangat diperlukan bagi pembentukan dentin.

d. **Sensori**

Melalui sistem saraf, pulpa memancarkan sensori yang diperantarai oleh enamel dan dentin ke pusat saraf yang lebih tinggi. Stimuli ini pada umumnya diungkapkan secara klinis sebagai nyeri.

e. **Defensif**

Terutama berhubungan dengan respon terhadap iritasi berupa mekanik, termal, kimia atau bakteri. Bahan-bahan yang mengiritasi dapat menyebabkan degenerasi dan kematian dari prosesus odontoblas dan odontoblas yang terkait serta terjadi penggantian odontoblas dari *undifferentiated mesenchym cell* dengan bentuk yang ireguler. Serta terjadi deposisi dari dentin reparatif sebagai respon pertahanan karies atau faktor iritan lain. Namun inflamasi mungkin menjadi ireversibel dan mengakibatkan kematian pulpa jika inflamasi terus berlanjut karena dentin

yang rigid membatasi respon inflamasi dan kemampuan pulpa untuk penyembuhan kembali.

2. Elemen Pulpa

a. Sel Odontoblas

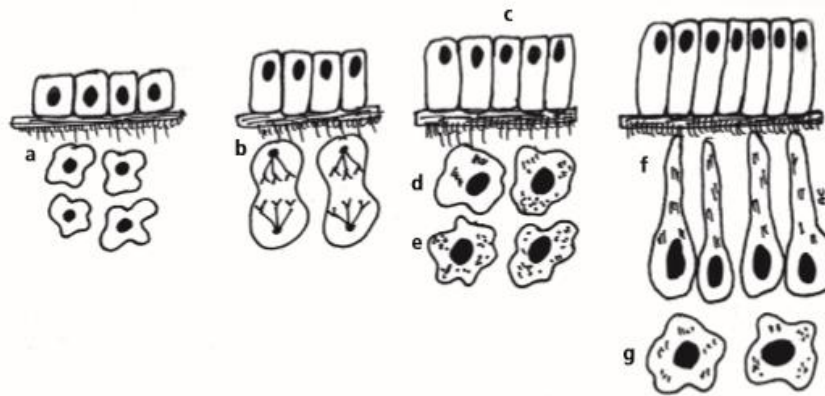
Odontoblas berasal dari sel ektomesenkim yang memiliki bentuk kolumnar yang memiliki inti polarisasi, membran basal dan satu proses sitoplasma tunggal. Meskipun konsep ini berlaku selama dentinogenesis aktif, sekarang jelas bahwa odontoblas bervariasi sepanjang siklus hidupnya, baik ukuran maupun kandungan organel sitoplasma dan perubahan ini terkait erat dengan aktivitas fungsionalnya. (Arana, 2004 ; Hargreaves, 2012 ; Torabinejad, 2015)

Sel odontoblas berada di sepanjang perifer pulpa setelah dentinogenesis dan memegang peranan dalam pemeliharaan integritas struktur gigi karena kapasitas mereka untuk menghasilkan dentin sekunder sepanjang hidup odontoblas. (Arana , 2004)

Lapisan kaya sel di bawah lapisan odontoblas menunjukkan beberapa karakteristik fenotip dalam hal morfologi seluler dan dapat berfungsi untuk mendukung aktivitas odontoblas, selama dentinogenesis aktif. Selama pembelahan sel terakhir dari preodontoblas sebelum

diferensiasi terminal, salah satu sel diposisikan berdekatan dengan membran basal gigi dan menerima sinyal induktif untuk berdiferensiasi menjadi odontoblas. Sel ini dapat berkontribusi pada populasi sel progenitor untuk berdiferensiasi menjadi *odontoblast like cell* selama dentinogenesis tersier. (Hargreaves, 2012)

Diferensiasi Odontoblas diawali pada ujung cusp pada lapisan perifer sel dental papilla yang sejajar dengan *interface* epitel mesenkim dan mengikuti tiga tahap: (1) induksi, (2) kompetensi, dan (3) diferensiasi terminal. Sinyal induktif dari sel epitel internal kemungkinan melibatkan TGF- β famili (BMP-2, BMP-4, dan TGF- β 1) yang sebagian ditempatkan pada lamina basal yang sejajar dengan sel perifer dental papila. Kompetensi dicapai setelah jumlah sel yang telah ditentukan selesai dan sel mengekspresikan reseptor *growth factor* spesifik. Pada tahap akhir pembelahan sel, hanya lapisan sel paling perifer yang terletak di bawah lamina basal yang merespon sinyal dari epitel internal sehingga berdiferensiasi menjadi odontoblas. Lapisan sel subodontoblastik mewakili sel dental papila yang merupakan sel kompeten yang terpapar sinyal induktif berdiferensiasi menjadi odontoblas. (Hargreaves, 2012)



Gambar 2. Diferensiasi sel odontoblas (a) Sel mesenkim yang tidak terdiferensiasi. (b) Komitmen sel mesenkim gigi yang berada dalam keadaan mitosis atau pembelahan sel. (c) epitelium gigi bagian dalam, yang penting untuk mendorong diferensiasi sel yang paling dekat dengan membran dasar. (d) membran dasar. (e) Sel anakan yang kompeten untuk menjadi odontoblas tetap berada di zona perifer papilla gigi. (f) Diferensiasi odontoblas dengan nukleus terpolarisasi dan ekstensi sitoplasma. (g) sel subodontoblast (Hargreaves, 2012)

Odontoblas yang terdiferensiasi sepenuhnya adalah sel *postmitotik* yang secara morfologi berbeda dari sel-sel pulpa gigi. Ketika diferensiasi berlangsung dalam arah apikal, sel-sel ini mengubah bentuknya, dari bulat ke kuboid, hingga munculnya kolumnar yang tinggi. Pada tingkat subselular, sel memperoleh sintesis aparatus dan sekretoris dengan mengembangkan retikulum endoplasma kasar yang ekstensif dan aparatus golgi bersama dengan banyak lisosom. Untuk mengakomodasi organel ini dan untuk mempersiapkan sekresi komponen matriks dentin secara

apikal dan searah, nukleus bergerak ke kutub berlawanan dari sel dalam posisi yang berlawanan dengan sel epitel gigi bagian dalam. Repolarisasi *nuclear* merupakan salah satu keunggulan diferensiasi odontoblas terminal. (Hargreaves, 2012)

Dentin merupakan jaringan analog dengan tulang, karena matriks ekstraselulernya memiliki banyak kesamaan dengan matriks tulang. Kolagen tipe I merupakan komponen organik utama, selain itu juga mengandung berbagai matrik protein non kolagen. Odontoblas mensintesis dan mensekresikan semua komponen matriks. (Arana, 2004)

Lapisan odontoblas terpisah dari dentin termineralisasi oleh lapisan matriks yang tidak termineralisasi dengan ketebalan 10-40 μ m yang disebut predentin, yang serupa dengan osteoid yang memisahkan sel osteoblas dari matriks tulang yang termineralisasi. Namun, odontoblas memiliki perbedaan dengan osteoblas, yaitu memiliki sebuah prosesus tunggal yang muncul dari badan sel kolumnar dan menembus tubulus dentinalis dan kanalikula, yang disebut prosesus odontoblas. (Arana, 2004)

Matriks protein non kolagen disintesis dan disekresi oleh odontoblas, yang meliputi dentin sialophosphoprotein (DSSP), dentin matriks protein (DMP-1, DMP-2, DMP-3) dan

sejumlah kecil protein non kolagen (*osteopontin, bone sialoprotein, osteonectin dan osteocalcin*). (Arana, 2004)

Dentin yang terbentuk oleh sekresi kolagen dan protein non kolagen, disebut dentin intertubular. Setelah pembentukan mantel dentin, sel odontoblas mensekresikan komponen tambahan non kolagen. Matriks ini termineralisasi dengan cepat di antara dentin intertubular yang telah terbentuk sebelumnya dengan proses odontoblas yang disebut dentin peritubular. Dentin peritubular mengalami hipomineralisasi dan membentuk dinding tubulus dentinalis. Hal ini disebabkan karena dentin peritubular disekresi sepanjang hidup odontoblas. Dentin yang terbentuk hingga selesainya pembentukan akar, yang disebut sebagai dentin primer. Pembentukan dentin sekunder terutama terjadi di atap dan lantai ruang pulpa sehingga menyebabkan peningkatan pengurangan volume pulpa serta tingginya tanduk pulpa. Pada tahap ini, odontoblas kurang menunjukkan sintesis organel dibandingkan pada tahap pembentukan dentin primer. (Arana, 2004)

Sel odontoblas juga membentuk dentin tipe ketiga, dentin tersier. Terdapat 2 sub tipe pada dentin tersier karena kadang terjadi kematian pada odontoblas asli dan

terbentuk *odontoblast-like cell* yang akan membentuk lapisan dentin yang baru. Dentin tersier yang terbentuk oleh odontoblas asli terjadi karena adanya respon terhadap atrisi, karies atau stimulus lain, seperti prosedur restoratif yang disebut sebagai dentin reaksioner. Secara umum, tubulus dentin reaksioner akan berlanjut dengan dengan dentin sekunder, sedangkan ketebalannya berkaitan dengan intensitas dan durasi rangsangan. Dentin reaksioner memiliki matriks organik serta kandungan mineral yang serupa dengan dentin primer dan sekunder. (Arana, 2004 ; Hargreaves, 2012)

Dentin reparatif sebagian besar berbeda secara morfologi dari dentin reaksioner. Hal ini disebabkan karena mengandung komponen seluler yang menyerupai osteosit tulang. (Arana, 2004)

b. Sel Fibroblas

Fibroblas merupakan diferensiasi dari sel mesenkim. Setelah terjadi diferensiasi, fibroblas bereplikasi melalui proses mitosis. Fibroblas merupakan sel yang paling banyak ditemukan di dalam pulpa dan terbanyak di daerah kaya sel. Seperti odontoblas, kandungan organel sitoplasmiknya berubah sesuai dengan aktivitasnya. fibroblas yang tidak aktif, bentuknya memanjang dengan

sitoplasma yang sedikit dan intinya mengandung kromatin yang padat. Jika sel sedang aktif, bentuknya oval, intinya pucat dan sitoplasmanya lebih luas. Fibroblas mampu bergerak dan berkontraksi selama pembentukan jaringan ikat, *remodelling* dan perbaikan luka. Fibroblas mensintesis dan mensekresi bermacam molekul ekstraseluler termasuk elemen fibrous dari matriks ekstraseluler, komponen dari bahan dasar dan molekul biologi aktif seperti proteinase, sitokin dan *growth factor*. Jaringan ikat yang paling banyak terdapat adalah kolagen tipe I, dan tipe III. Fibroblas muda membentuk fibril kolagen dan asam hialuronat yang lebih sedikit. (Hargreaves, 2012)

Fibroblas mensintesis dua makro molekul utama yaitu, proteoglikan dan glikoprotein. Sifat penting dari permukaan sel dan proteoglikan adalah mempunyai kemampuan mengikat *growth factor*, sitokin dan biologi molekul aktif lainnya. Di dalam matriks ekstraseluler, *growth factor* terikat pada proteoglikan yang bertindak sebagai cadangan dari molekul aktif yang dapat mempengaruhi sel di dekatnya. Fibroblas merupakan sel yang tersebar pada jaringan ikat tak bermineral. Di dalam pulpa berbentuk jaringan longgar, yang melekat satu sama lain dengan *adheren type junction* dan *gap junction*. (Hargreaves, 2012)

C. Alkaline phosphate (ALP)

ALP merupakan kelompok enzim non spesifik yang mempunyai kemampuan memecah ion fosfat dari substrat organik pada pH alkali. (Rai, 2013) ALP merupakan enzim penanda untuk diferensiasi odontoblas yang berfungsi pada proses mineralisasi. (Tomlinson, 2015) Aktivitas ekstraseluler dari ALP pada mineralisasi terjadi pada saat pertumbuhan kristal hidroksiapatit.

Konsentrasi yang tinggi dari ALP didapatkan pada sel odontoblas dan fibroblas pulpa. Pada sel pulpa yang sedang tumbuh didapatkan konsentrasi ALP yang rendah, dan meningkat pada proses proliferasi sel. Jaringan pulpa mempunyai aktivitas yang tinggi pada dentinogenesis dan ALP penting pada mekanisme perbaikan dan penyembuhan setelah cedera pulpa. Keikutsertaan faktor intraseluler dan ekstraseluler pada pembentukan jaringan mineral sangat penting. Pembentukan enamel dan dentin dimulai pada saat penempatan pertama kristalisasi di dalam atau di permukaan membran yang berikatan dengan gelembung matriks yang berasal dari odontoblas. Aktivitas yang tinggi dari ion Ca akan mengaktifkan ALP, hal ini menunjukkan terjadi aktivitas odontoblas pada saat dentinogenesis. Pada penelitian aktivitas ALP, menunjukkan peningkatan ukuran ALP yang menjadi ciri khas pada pulpitis reversibel berdasarkan diagnosis klinis dan mikroskopik. Penurunan yang tajam dari aktivitas ALP pada

pulpitis irreversibel berhubungan dengan banyaknya mediator sistem imun dari sel inflamasi yang mempunyai efek menghambat sintesis ALP. (Priyambodo, 2005)

ALP berperan pada permulaan respon pulpa terhadap cedera. (Sakamoto, 2004) dan ALP merupakan *marker* awal diferensiasi *odontoblast-like cell* dan keberadaannya memberikan indikasi bahwa sel mengalami fase diferensiasi. (Shreta, 2014) Sel pulpa dalam keadaan normal tidak memproduksi ALP. Ekspresi ALP berubah bila sel memulai diferensiasi terminal selama pembentukan dentin. (Priyambodo, 2005)

Penelitian yang dilakukan pada proses penyembuhan tulang, sel osteoblas aktif menghasilkan jaringan osteoid dan mensekresikan sejumlah besar alkalin fosfatase, yang memegang peranan penting dalam mengendapkan kalsium dan fosfat ke dalam matriks tulang. Berdasarkan hal tersebut, maka sebagian dari alkalin fosfatase di dalam darah dapat menjadi indikator yang baik tentang tingkat pembentukan osteoid. Terdapat hubungan yang erat antara aktifitas osteoblas dengan konsentrasi alkalin fosfatase di dalam plasma, dimana aktifitas enzim ini bertanggung jawab terhadap proses klasifikasi fibril kolagen sebagai bahan dasar dari tulang. (Yudaniayanti, 2005)

1. Isoform dan distribusi Alkaline fosfatase

ALP dibagi menjadi empat isozim tergantung pada lokasi ekspresi jaringan yaitu, ALP intestinal (IALP), ALP plasenta (PLALP atau Regan isozim), ALP *Germ cell* (GCALP atau NAGAO isozim) dan alkaline fosfatase non spesifik atau ALP *liver/bone/kidney* (L/ B/ K ALP). Lokus ALP intestinal dan plasenta terletak di dekat ujung lengan panjang kromosom dan ALP *liver/bone/kidney* terletak di dekat ujung lengan pendek kromosom. (Sakamoto, 2004 ; Sharma, 2014)

2. Alkaline fosfatase *Liver/Bone/kidney*

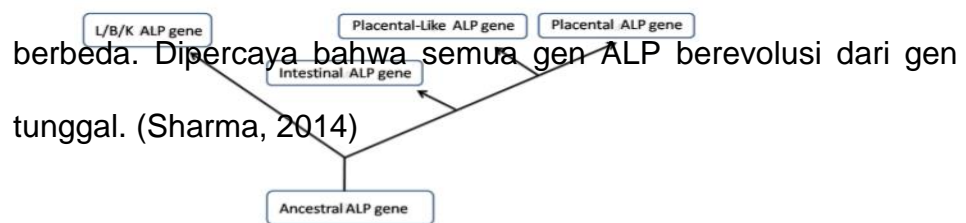
Isozim yang tidak stabil pada temperatur tinggi dan merepresentasikan jaringan non spesifik (TNSALP). Diekspresikan pada beberapa jaringan di seluruh tubuh dan terutama di *liver, bone* dan *kidney*. Perbedaan kecil dalam mobilitas elektroforetik dan stabilitas termo antara sel-sel L / B dari berbagai jaringan dikaitkan dengan perbedaan dalam modifikasi pasca-translasi, meskipun bagian proteinnya dikode oleh gen yang terpisah. Jaringan alkaline fosfatase nonspesifik (TNSALP) dikodekan sebagai lokus genetik tunggal, yang dipetakan ke lengan pendek kromosom 1. (Sharma, 2014)

Evolusi dari keluarga gen ALP mungkin melibatkan duplikasi jaringan primordial non spesifik dalam gen ALP untuk menciptakan gen TNSALP dan gen IAP intermediet, diikuti oleh

duplikasi tambahan untuk membentuk gen ALP intestinal, plasenta, dan *germ-cell*. (Sharma, 2014)

3. Struktur gen ALP

Alkalin fosfatase merupakan *metalloenzyme* yang terikat pada membran yang terdiri dari sekelompok isoenzim. Setiap isoenzim adalah glikoprotein yang dikodekan oleh lokus gen yang berbeda. Dipercaya bahwa semua gen ALP berevolusi dari gen tunggal. (Sharma, 2014)



Gambar 3. Ilustrasi hubungan evolusi isoenzim ALP gen liver/bone/kidney, intestinal, plasenta dan placenta-like genes. (Sharma, 2014)

Tiga gen ALP di kromosom 2q34-37 diekspresikan sebagai jaringan spesifik dan menghasilkan suatu isoenzim ALP plasenta, dan intestinal. Gen ALP keempat adalah ALP L/B/K terletak pada bagian distal lengan kromosom 1, *band* p34-p36.1 yang mengkode keluarga protein. Glikosilasi diferensial TNSALP menimbulkan spesifikasi jaringan yang berbeda satu sama lain melalui modifikasi pasca-translasi. Isoenzim ALP sekunder ditemukan di seluruh tubuh, tetapi secara spesifik paling banyak terdapat di *liver*, *bone* dan jaringan intestinal. (Sharma, 2014)

Jenis dan lokasi kromosom dari gen ALP dengan nomor aksesnya ditunjukkan pada Tabel 1.

Gene	Protein name	Common name	Chromosomal location	Accession no.
ALPL	TNAP	Tissue-nonspecific alkaline phosphatase; TNSALP; liver/bone/kidney type AP	Chr1: 21581174-21650208	NM_000478
ALPP	PLAP	Placental alkaline phosphatase; PLALP	Chr2: 233068964-233073097	NM_001632
ALPI	IAP	Intestinal alkaline phosphatase; IALP	Chr2: 233146369-233150245	NM_001631
ALPP2	GCAP	Germ cell alkaline phosphatase; GCALP	Chr2: 233097057-233100922	NM_031313

Tabel 1. Nomenklatur isoenzim ALP dan lokasi kromosom, ukuran gen, dan nomer aksesnya

4. Fungsi Fisiologis ALP

Alkalin fosfatase (ALP) telah diteliti secara terus menerus dan ekstensif. Diketahui bahwa fungsi fisiologis ALPs di sebagian besar jaringan adalah enzim yang telah diduga memiliki peran dalam mineralisasi skeletal normal. Substrat alami untuk TNSALP tampaknya mengandung setidaknya tiga senyawa fosfor: phosphoethanolamine (PEA), pirofosfat anorganik (PPi), dan pyridoxal-50-fosfat (PLP). Beberapa mekanisme dapat menjelaskan peran ALP dalam mineralisasi tulang. (Sharma, 2014)

D. Kolagen

Kolagen adalah protein struktur ekstraselular yang mewakili penyusun utama semua jaringan ikat. Strukturnya ditandai dengan adanya domain tripel heliks, yang dibentuk oleh tiga rantai polipeptida (rantai α) yang terikat oleh ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik. Sel yang bertanggung jawab untuk sintesis kolagen meliputi odontoblas, fibroblas, kondroblas, osteoblas, dan sementoblas (Hargreaves, 2012)

Unit struktural dasar kolagen terdiri dari tiga rantai polipeptida yang disusun dalam bentuk triple helix dengan dua rantai identik ($\alpha 1$) dan yang ketiga yang sedikit berbeda dalam komposisi kimianya ($\alpha 2$) yaitu heteropolimer. Setiap rantai memiliki 1050 asam amino yang saling bergilir dengan struktur heliks tangan kanan yang panjangnya 300 nm. Diameternya sekitar 1.5 nm dan memiliki berat molekul sekitar 2,90,000. Strukturnya memiliki motif berulang Gly-X-Y, di mana X dan Y dapat berupa asam amino. Secara kimia, kolagen mengandung 2 asam amino yang khas, *hydroxyproline* dan *hydroxylysine glycine proline*. Pada setiap posisi asam amino ketiga, glisin sangat penting untuk memperkuat rantai 3 α dalam molekul tropocollagen. Kolagen dalam bentuk hexagonal dan quasi hexagonal akan membentuk tipe kolagen fibrillar. Kolagen dapat berupa lembaran atau microfibrillar. Kolagen mikroskopi ditemukan sebagai fibril memanjang. (Silvipriya, 2015)

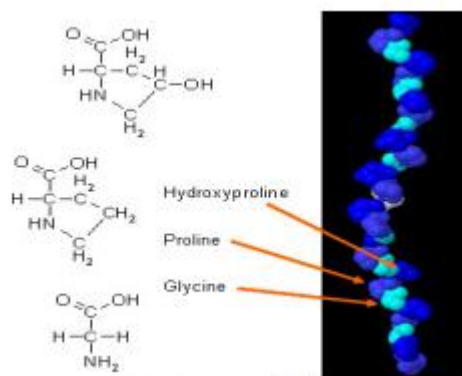
Jenis Kolagen

Hampir 28 jenis kolagen telah diidentifikasi, yang terdiri dari 46 rantai polipeptida yang berbeda. Kolagen memiliki karakteristik triple helix, tetapi panjang heliks dan ukuran serta sifat dari bagian non-heliks bervariasi. (Silvipriya, 2015)

Perbedaan dalam kombinasi dan keterkaitan rantai polipeptida yang membentuk molekul kolagen bertanggung jawab atas berbagai

jenis kolagen. Berdasarkan struktur supramolekulernya, kolagen dibagi menjadi dua kelas utama, kolagen fibrillar (misalnya, tipe I sampai III, V, dan XI) dan kolagen nonfibrillar (tipe II) yang hanya terdapat pada tulang rawan dan membentuk fibril yang tipis dan ditemukan pada pulpa. Kolagen tipe III biasanya terdistribusi bersama kolagen tipe I dalam berbagai jaringan dan merupakan komponen utama serat retikuler, yang membentuk jaring longgar dari serat halus yang banyak terdapat selama embriogenesis, proses inflamasi, dan penyembuhan luka. (Hargreaves, 2012)

Dari molekul kolagen yang terdapat di pulpa, tipe I dan III mewakili sebagian besar kolagen jaringan. Tipe I adalah tipe dominan dan dapat berkontribusi pada pembentukan pulpa. Proporsi kolagen tipe III dalam pulpa juga tinggi. Telah dilaporkan bahwa kolagen tipe III merupakan 42,6% dari total kolagen pada pulpa manusia dan lebih dari 40% pada pulpa *bovine*. (Hargreaves, 2012)



Gambar 4. Struktur kolagen (Silvipriya, 2015)

Karakteristik Kolagen

Kolagen mendukung sebagian besar jaringan dalam bentuk matriks ekstraseluler dan memberikan struktur ke sel. Memiliki kekuatan tarik, elastisitas dan kekuatan, serta membantu dalam perkembangan jaringan dan organ. Kolagen memiliki peran dalam fungsi biologis sel (kelangsungan hidup sel, proliferasi dan diferensiasi), membantu penyembuhan tulang yang rusak atau pembuluh darah dan mempertahankan integritas struktural. (Silvipriya, 2015)

Kolagen pada dentin dan predentin hampir seluruhnya terdiri dari tipe I, walaupun beberapa peneliti mendeteksi adanya kolagen tipe III dan tipe V pada predentin. Sel fibroblas dapat menghasilkan kolagen tipe I dan tipe III, sedangkan sebagian besar molekul kolagen yang diproduksi oleh odontoblas adalah kolagen tipe I. Temuan ini mendukung gagasan bahwa kolagen pada dentin berasal dari odontoblas dan bukan produk kombinasi dari odontoblas dan fibroblas. Serabut kolagen antara odontoblas pada awalnya digambarkan sebagai serat *argyrophilic* kasar, disebut sebagai serat *Korff*. Serat ini sangat jelas selama awal dentinogenesis, dan terlibat dalam diferensiasi odontoblas dan pembentukan mantel dentin. Serat ini terutama tersusun dari tipe kolagen I dan III. (Hargreaves, 2012)

Sintesis kolagen dalam pulpa dipercepat selama proses reparatif, dicontohkan dalam proses pembentukan *dentinal bridge* setelah prosedur *pulp capping* pada pulpa vital yang terpapar. Selama fase awal dentinogenesis reparatif, fibril kolagen menunjukkan susunan interodontoblastik yang sebanding dengan serat *korff*. Namun, serat-serat ini menjadi lebih tipis dan lebih sedikit setelah pembentukan lapisan odontoblas sekunder. Dengan demikian, dapat dinyatakan bahwa serat ini memberi dukungan pada prekursor odontoblas sekunder sebelum pembentukan lapisan odontoblastik reguler. (Hargreaves, 2012)

E. Inflamasi pulpa

Karies gigi adalah penyakit mulut yang paling banyak ditemui yang dapat disebabkan oleh stimuli eksternal. Karena prevalensinya yang tinggi, penanganan karies merupakan salah satu prosedur yang paling umum dilakukan dalam praktik gigi rutin. (Kitamura, 2011 ; Song, 2017)

Pada pulpa terbuka, vitalitas pulpa dapat dipertahankan melalui prosedur yang dikenal sebagai *direct pulp capping*. *Pulp capping* merupakan prosedur efektif untuk menginduksi terbentuknya dentin tersier. (Kitamura, 2011 ; Ricucci, 2013)

Secara klinis, perawatan *direct pulp capping* dikatakan berhasil, bila : (1) pulpa tetap vital, (2) tidak ada rasa sakit, dan (3)

Respon pulpa normal terhadap tes sensitivitas termal dan elektrik.
(Ricucci, 2013)

Penggunaan kalsium hidroksida dalam kedokteran gigi memegang peran penting dalam pengembangan pengobatan biologis untuk pulpa yang terpapar, karena sifat antibakterinya dan kemampuannya untuk merangsang pembentukan dentin reparatif, sehingga mampu meningkatkan tingkat keberhasilan prosedur klinis. Namun, kalsium hidroksida tidak menyatu pada dentin dan larut seiring berjalannya waktu, sehingga memungkinkan terjadinya penetrasi bakteri jangka panjang sehingga saat ini terus dilakukan pengembangan bahan dan teknik yang lebih efisien. (Aminabadi, 2012 ; Koike, 2014 ; Dwiandhono, 2016)

Tingkat keberhasilan kalsium hidroksida sebagai bahan pulp capping adalah 80,1% setelah satu tahun, 68% setelah 5 tahun dan 58,7% setelah 9 tahun. (Njeh, 2016)

Iritasi terhadap jaringan pulpa dapat disebabkan berbagai hal misalnya mikroorganisme, faktor mekanis, faktor kimiawi dan termis yang mengakibatkan tubuh memberikan respon yang dikenal dengan inflamasi. Iritasi oleh mikroorganisme menyebabkan karies pada email, dentin dan inflamasi pada pulpa. Mikroorganisme di dalam karies menghasilkan toksin yang berpenetrasi ke dalam pulpa melalui tubulus dentinalis. (Kitamura, 2012 ; Rechenburg, 2016 ; Hargreaves, 2012)

Aktivitas ALP pada jaringan pulpa gigi telah terbukti 8 kali lebih tinggi pada pulpitis reversibel dibandingkan dengan pulpa yang sehat dan pulpitis ireversibel. Hasil ini menunjukkan bahwa ALP dapat berperan dalam perubahan metabolisme pada pulpa gigi dan jaringan tubuh lainnya. (Perinetti, 2005)

Sistem pertahanan mencakup inflamasi lokal di dalam jaringan serta aktivasi lokal reaksi imun yang dapat memicu respon imun sistemik yang lebih luas. Peran bakteri dalam inflamasi pulpa dan gambaran jaringan dari proses inflamasi telah dikenali dengan baik. Limfosit T dan makrofag penting dalam *imunosurveillance* pulpa dan mungkin penting dalam inisiasi sistem imun spesifik pulpa setelah terpapar antigen. Limfosit B dan limfosit T ditemukan pada pulpa karies yang menunjukkan kondisi pulpitis reversibel atau irreversibel, dan peningkatan jumlah sel ini berhubungan dengan meningkatnya kedalaman lesi pada karies. (Ricucci, 2013)

F. Fase Proliferasi

Growth factor berperan dalam dentinogenesis reparatif, yang berfungsi sebagai regulasi beberapa fungsi sel seperti proliferasi, diferensiasi dan sintesis matriks. (Octiara, 2015 ; Dwiandhono, 2016)

Growth factor adalah grup protein yang dapat menginduksi proliferasi dan diferensiasi sel dengan berikatan pada reseptor permukaan sel. Berbagai jenis *growth factor* yang berperan

dalam regenerasi kompleks pulpa, antara lain, *Transforming growth factor-B* (TGF- β), *Bone morphogenetic protein* (BMPs), *Platelet derived growth factor* (PDGF), *Insuline growth like factor* (IGF), *Fibroblast growth factor* (FGF). (Hargreaves, 2012 ; Rechenberg, 2016 ; Octiara, 2015)

TGF- β termasuk dalam TGF super famili yang terdiri dari 40 jenis protein yang dapat diklasifikasi dalam 3 grup yaitu, TGF- β s (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, dan TGF- β 5), BMP (*Bone morphogenetic protein*) yang terdiri atas BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7 dan BMP-8) dan *activins/inhibis*. (Poniatowski, 2015)

TGF- β famili ditemukan pada dentin dan berperan pada *signalling* diferensiasi odontoblas, selama perkembangan gigi dan berperan penting sebagai molekul *signalling* repair. Dentin matriks berisi molekul bioaktif dengan potensi *signalling* sel yang akan dilepaskan dalam lingkungan pulpa selama cedera jaringan. (Smith, 2005)

Tiga langkah penting untuk dentinogenesis reparatif adalah **(1) perekrutan sel progenitor**, migrasi sel progenitor ke lokasi injuri untuk dentinogenesis reparatif memerlukan kemotaksis. TGF- β 1 dikenal sebagai kemotaksis untuk sel progenitor, makrofag, fibroblas, neutrophil, dan monosit. **(2) Signaling diferensiasi odontoblast like cell**, setelah perekrutan sel progenitor ke lokasi injuri, pemberian sinyal diferensiasi *odontoblast like-cell* harus dicapai seelum sekresi

dentin reparatif dapat dimulai. Kehadiran *growth factor*, khususnya TGF- β 1 dapat memberi sinyal diferensiasi. Pelepasan *growth factor* dapat timbul dari demineralisasi jaringan oleh asam bakteri selama proses karies, penggunaan bahan etsa, preparasi kavitas, dan prosedur restorasi, dan **(3) pengaturan ulang sekresi matriks**, umum terjadi pada dentinogenesis reaksioner, sedangkan dua langkah pertama membedakan dengan dentinogenesis reparatif. (Hargreaves, 2012 ; Song, 2017 ; Octiara, 2017)

G. Ikan haruan (*Channa striata*)

Ikan haruan merupakan ikan asli Kalimantan yang memiliki nilai ekonomis dan potensi untuk mempercepat penyembuhan luka. (Siswanto, 2016)

Ikan haruan mengandung senyawa-senyawa penting yang berguna bagi tubuh, salah satunya adalah protein. Ada 3 jenis protein yang terkandung, diantaranya miofibril, sarkoplasma dan stroma. Protein sarkoplasma mengandung protein albumin, mioalbumin, mioprotein, globulin-x, dan miostromin. (Afarisy, 2014)

Klasifikasi Ikan haruan :

Kingdom : Animalia

Phylum : Chordata

Class : Actinopterygii

Order : Perciformis

Family : Channidae

Genus : Channa

Species: Channa Striata

(Alfarisy, 2014 ; Mustafa, 2012)

Morfologi ikan haruan

Ikan gabus mempunyai ciri-ciri seluruh tubuh dan kepala ditutupi sisik sikloid dan stenoid. Bentuk badan hampir bulat di bagian depan dan pipih ke arah belakang sehingga disebut ikan berkepala ular (*snake head*), panjang dan semakin ke belakang semakin pipih (*compressed*). Bagian punggung cembung dan perut rata. Warna tubuh pada bagian punggung hijau kehitaman dan bagian perut berwarna krem atau putih. Sirip ikan haruan tidak memiliki jari-jari keras, mempunyai sirip punggung dan sirip anal yang panjang dan lebar, sirip ekor berbentuk setengah lingkaran, sirip dada lebar dengan ujung membulat. Ikan haruan dapat mencapai panjang 90-110 cm. (Alfarisy, 2014)



Gambar 5. Ikan haruan (*Channa striata*) (Al farisy, 2014)

Kandungan gizi ikan haruan

Ikan haruan mengandung protein lebih tinggi dari ikan jenis lainnya. Ekstrak ikan haruan mengandung albumin sebagai protein utama, asam lemak, glukosa, dan beberapa mineral Zn, Cu dan Fe. (Siswanto, 2016 ; Al Farisy, 2014 ; Hartini, 2015)

Berdasarkan tabel komposisi pangan indonesia, komposisi daging ikan haruan mengandung sebagian besar unsur zat gizi. (Al Farisy, 2014 ; Mustafa, 2012)

No	Nutrisi	Jumlah
1	Protein (g)	3.36 ± 0.29
2	Albumin (g)	2.17 ± 0.14
3	Total Lemak (g)	0.77 ± 0.66
4	Total glukosa (g)	0.07 ± 0.02
5	Zn (mg)	3.34 ± 0.8
6	Cu (mg)	2.34 ± 0.98
7	Fe (mg)	0.20 0.09

Tabel 2. Komposisi nutrisi ikan haruan dalam 100 ml ekstrak ikan haruan

H. Albumin

Selama 25 tahun terakhir ini, pemahaman kita tentang albumin telah banyak berkembang. Kini kita mengetahui susunan asam amino albumin *bovine* [sapi muda] dan manusia, urutan gen albumin manusia yang lengkap, dan lokasi mutasi dalam susunan gen tersebut. Selama tahun 1990an, dideksripsikan struktur kristal albumin berbentuk- hati dan satu protein baru, yang disebut α -albumin [afamin], ditambahkan dalam superfamili albumin, yang mengandung serum albumin, protein pengikat-vitamin D, dan α -fetoprotein. (Martinez, 2013)

Pada manusia, albumin adalah protein plasma yang paling banyak, dihitung sebanyak 55-60% dari protein serum yang diukur. Meliputi rantai polipeptida tunggal dari 609 asam amino dengan berat molekul 67 kDa. Rantai ini khas karena tidak memiliki *moeity* karbohidrat, triptofan dan residu *methionine* sangat langka, serta banyak mengandung residu bermuatan, seperti lisin, arginin, asam glutamat, dan asam aspartat. (Martinez, 2013)

Albumin memiliki struktur yang kuat dan mudah kembali ke bentuk semula, karena memiliki jembatan disulfida, yang memberi kekuatan, terutama dalam kondisi fisiologis. Pasca ruptur, molekul akan membangun kembali struktur jembatan disulfide. Denaturasi hanya terjadi jika ada perubahan suhu, pH, dan ionik atau lingkungan kimia yang dramatis dan non-fisiologis. (Martinez, 2013)

Penelitian yang dilakukan oleh Golberg (2002) menjelaskan konsep difusi antar sel. Pada hewan coba kelinci yang disuntik dengan albumin pada 1 jam, 6 jam dan 3 hari. Pada pengamatan radioautografi, *silver grain* terlihat di predentin setelah 1 jam dan di dentin setelah 6 jam. Struktur ini terdapat di kompleks *junctional* antara odontoblas dan ameloblas Albumin dianggap sebagai protein pengikat lipid dan kalsium. Albumin tidak disintesis oleh odontoblas, tetapi bisa ditemukan di dentin. (Goldberg, 2012)

Beberapa komponen matriks bermigrasi langsung dari serum ke kompartemen dentin. Mereka mengikuti terutama jalur interselular, albumin dan fosfolipid yang terlibat dalam pengangkutan mineral dan proses mineralisasi dentin intertubular. (Goldberg, 2012)

Albumin telah banyak diteliti, mengingat fungsinya yang penting bagi kesehatan. Penggunaan albumin eksogen dapat meningkatkan konsentrasi albumin intravaskuler selama penyakit kritis, penderita hipoalbumin dan luka pasca operasi maupun luka bakar. Albumin mempunyai banyak gugus sulfhidril (-SH) yang dapat berfungsi sebagai pengikat radikal, dan adanya gugus ini mempunyai peranan penting dalam penanganan kasus sepsis. Albumin dapat berfungsi sebagai antioksidan. Albumin terlibat dalam pembersihan radikal bebas oksigen yang diimplikasikan dalam patogenesis inflamasi. Larutan fisiologis albumin manusia telah diperlihatkan menghambat

produksi radikal bebas oleh leukosit polimorfonuklear. (Kusumaningrum, 2014)

Selama ini, albumin dihasilkan dari darah manusia, sehingga harganya cukup mahal. Penemuan ekstrak albumin ikan haruan kemudian dijadikan alternatif untuk mendapatkan albumin yang lebih murah. (Kusumaningrum, 2014)

Peranan ikan haruan (*Channa striata*) terhadap kadar alkalin fosfatase dan pembentukan kolagen

Ekstrak ikan haruan mengandung senyawa-senyawa penting bagi proses sintesis jaringan, seperti albumin, Zn, Cu, Fe dan asam lemak tak jenuh. Albumin merupakan protein darah yang mampu mengikat zn dan berfungsi sebagai alat angkut utama zn dalam plasma darah. Zn merupakan mineral mikro yang penting dalam meningkatkan proliferasi sel dan kekuatan kolagen. Cu berperan penting dalam penyatuan kolagen, pembentukan tulang, dan jaringan ikat. Fe berperan dalam pengiriman oksigen serta sintesis kolagen. Asam lemak tak jenuh pada ikan haruan berfungsi antiinflamasi meregulasi sintesis prostaglandin yang berperan sebagai vasodilator pembuluh darah sehingga infiltrasi dan aktivasi neutrophil pada proses inflamasi. (Siswanto, 2016 ; Agustin, 2016 ; Setiawan, 2015)

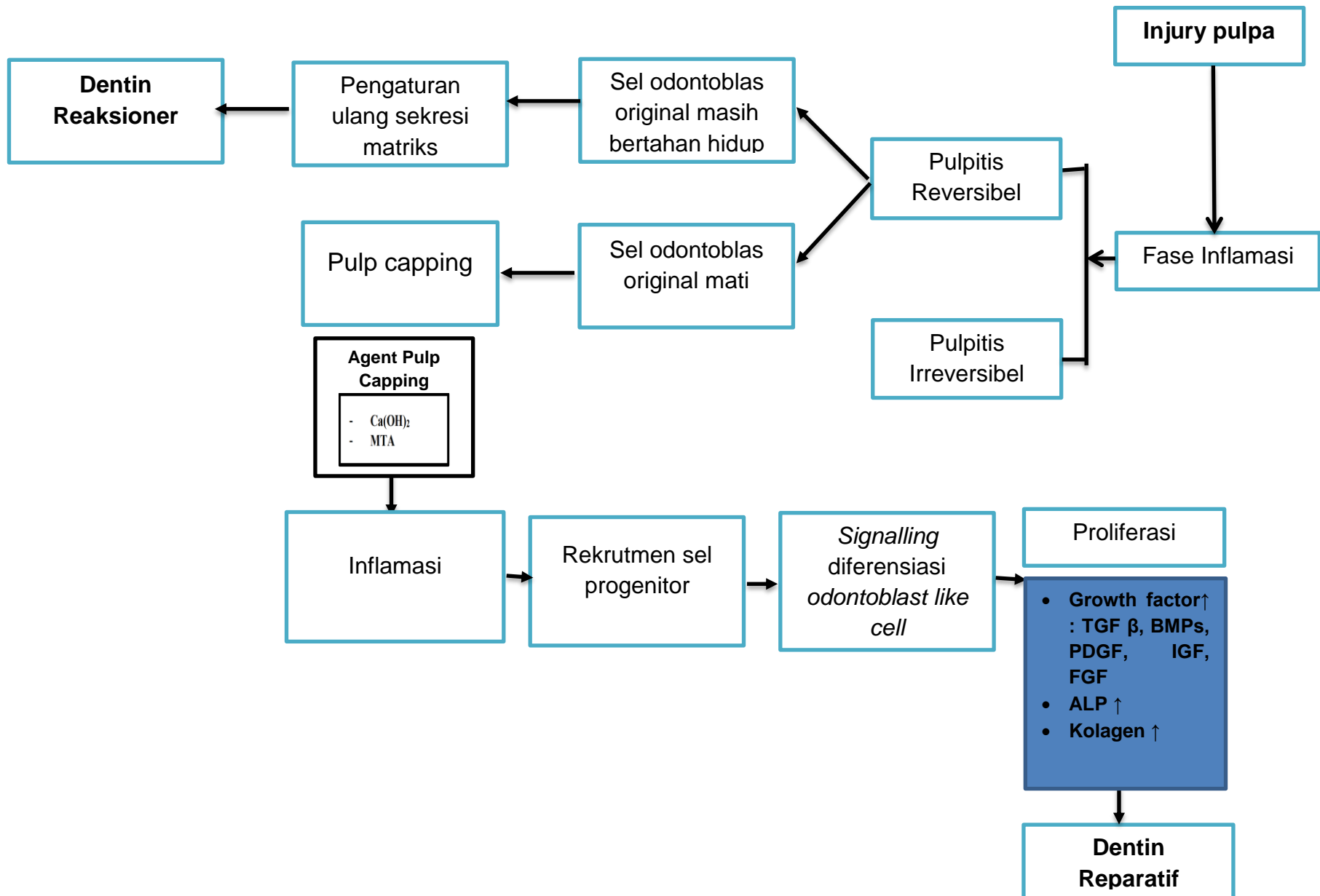
Growth factor terbukti terlibat dalam regulasi metabolisme, pertumbuhan sel, diferensiasi, pembentukan tulang dan stimulasi

produksi kolagen in vitro dan in vivo. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Sakamoto dkk (2004), yang menyatakan bahwa IGF dapat meningkatkan aktivitas ALP pada *human dental pulp cells* (HDPCs). (Sakamoto, 2004)

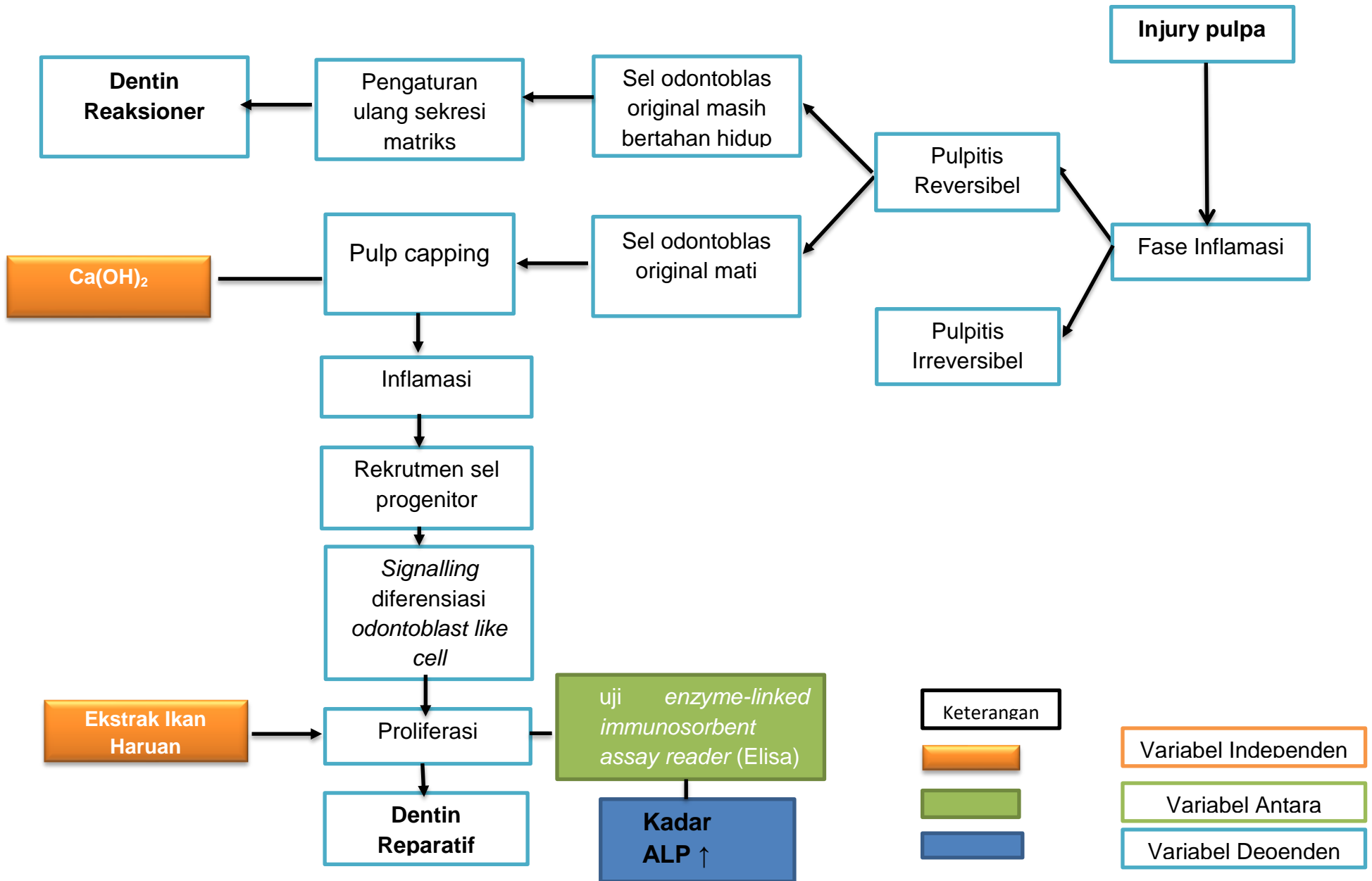
Terdapat hubungan antara aktivitas osteoblas dan konsentrasi ALP. Aktivitas enzim ini bertanggung jawab terhadap proses kalsifikasi fibril kolagen. (Yudaniayanti, 2005)

Bovine serum albumine (BSA) dipilih pada faktor pengaturan aktivitas ALP karena BSA telah terbukti dapat meningkatkan aktivitas alkalin fosfatase dari sel hepatoma tikus. Selain itu, BSA adalah salah satu protein yang paling umum digunakan sebagai protein prototipikal dalam model penelitian pemberian obat. Interaksi sel dengan beberapa protein menginduksi perubahan dalam keadaan fisikokimia membran plasma, yang berakibat pada metabolisme sel, dan pada akhirnya menyebabkan peningkatan aktivitas alkalin fosfatase. Peningkatan aktivitas alkalin fosfatase dalam berbagai kondisi disebabkan oleh modulasi molekul alkalin fosfatase disertai perubahan aktivitas enzim tanpa sintesis protein baru. Pengaktifan alkalin fosfatase mudah terjadi tidak hanya di hati secara in vivo tetapi juga pada sel yang dibiakkan secara in vitro. (Shrestha, 2014)

I. Kerangka Teori



J. Kerangka Konsep



K. Hipotesis Penelitian

Ekstrak ikan haruan (*Channa striata*) dapat meningkatkan kadar alkalin fosfatase (ALP) melalui diferensiasi dan proliferasi pada *odontoblast cell line*.

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

1. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris.

2. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian *post test only control group design*. Pengukuran variabel dilakukan setelah pemberian perlakuan.

B. Waktu dan Lokasi Penelitian

1. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Januari 2018 – Maret 2018

2. Lokasi Penelitian

1. Sub-kultur *odontoblast cell-line* dilakukan di bagian Mikrobiologi, Rumah sakit Pendidikan, Universitas Hasanuddin.
2. Pembuatan ekstrak ikan haruan di laboratorium Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi (STIFA) Makassar.
3. Proses *freeze drying* ekstrak ikan haruan di laboratorium Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin.

4. Pemeriksaan kadar alkalin fosfatase dengan metode elisa di bagian Mikrobiologi, Rumah sakit Pendidikan, Universitas Hasanuddin.

C. Sampel Penelitian

1. Sampel penelitian adalah *odontoblast MDPC-23 cell line* sebanyak 30.000sel/cm² yang disub-kultur pada medium cair (Dulbecco Modified Eagle's Medium) + NaHCO₃ +Hepes dengan 10 % FBS, diberi penicillin - streptomycin 2 mL, Amphotericin B 1 ml.
2. Kalsium Hidroksida (Ca(OH)₂) murni
3. Ekstrak ikan haruan (*Channa striata*).

Adapun kriteria sampel penelitian sebagai berikut :

1. *Odontoblast cell-line* yang diinkubasi selama 24 jam sebelum perlakuan.
2. Ikan haruan dalam keadaan hidup
3. Ikan haruan dengan jenis kelamin betina dan berat 500 - 700 gr
4. Ikan haruan dengan kondisi fisik sehat dan segar :
 - Berenang lebih aktif
 - Mata ikan jernih
 - Insang masih merah serta berlendir
 - Daging ikan kencang dan tidak terasa lembek

Perhitungan Besar Sampel

Perhitungan besar sampel dalam penelitian ini menggunakan

rumus Federer : $(n - 1) \times (t - 1) \geq 15$

Cara perhitungan besar sampel :

$$(n-1) \times (2-1) \geq 15$$

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

$$n \geq 15+1$$

$$n \geq 16$$

Keterangan :

n = jumlah sampel

t = jumlah kelompok penelitian

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Independen :

- Ekstrak ikan haruan

2. Variabel Dependen :

- Kadar Alkalin fosfatase (ALP)

3. Variabel Kendali

- Konsentrasi ekstrak ikan haruan konsentrasi 25 µg/mL, 50 µg/mL dan 100 µg/mL.

- Konsentrasi Ca(OH)₂ murni, konsentrasi 50 µg/mL.

- Sediaan ekstrak ikan haruan dan Ca(OH)₂ bentuk bubuk.

E. Defenisi Operasional

1. Ekstrak ikan haruan (*Channa striata*) adalah hasil ekstraksi ikan haruan (kecuali kepala, sirip, sisik dan isi perut), kemudian dikukus dengan perbandingan ikan haruan dengan aquades 1:1, pada suhu 60°C selama 50 menit, kemudian dikeringkan dengan *freeze dryer* selama 30 jam sehingga didapatkan konsistensi berupa bubuk.

2. Kadar alkalin fosfatase (ALP)

ALP merupakan enzim penanda untuk diferensiasi sel odontoblas yang berfungsi pada mineralisasi, dan kadarnya meningkat pada fase proliferasi. Aktivitas enzim diekspresikan sebagai kadar ALP yang diukur dengan uji *enzyme-linked immunosorbent assay reader* (Elisa).

F. Alat dan Bahan Penelitian

Alat Penelitian

- *Microplate reader* (Thermo Scientific™, Sweden)
- Laminar Airflow (Biohazard, England)
- Autoclave (Hirayama, Japan)
- Flask kultur (Biologix, China)
- *Beaker glass* volume 1000 ml (Pyrex, Germany)
- Botol duran 1000 ml, 250 ml (Schoot, Germany)
- Mikropipet 100 µl ,1000 µl (BioRad, USA)
- Centrifuge (Sorval Legend T, USA)
- Ultralow Temperature Freezer (New Brunswick Scientific, Sweden)

- *Blue tip, Yellow tip* (Onemed, Sweden)
- Hemositometer (Nesco, Taiwan)
- *Counter* (Genmes, Germany)
- Mikroskop binokuler (Olympus, Japan)
- *Magnetic stirring bar* (Heidolph, Germany)
- *Magnetic hot plate stirrer* (Kenko, Japan)
- pH-meter (Nesco, Taiwan)
- Filter 0,2 mikron (Corning^R, USA)
- Neraca Elektronik (Kern, Japan)

Bahan Penelitian

- *Odontoblast MDPC-23 Cell Line*
- Ekstrak ikan haruan
- Kalsium hidroksida murni, (NO.M2047, Darmstadt, Germany)
- Alkohol 70 %, 95 %
- D-MEM (SIGMA Chemichal Co., St.Louis, MO, USA)
- NaHCO₃
- Hepes
- Akuades steril 1000 ml
- Penisilin-Streptomisin 2 ml
- Amphotericin B 1 ml
- FBS (Fetal bovine serum) 20 ml
- Tripsin EDTA
- *Human ALP Elisa Kit* (Bioassay Technology Laboratory, China)

F. Prosedur Penelitian

a, Persiapan sub-kultur *odontoblast-cell line*

Alat-alat yang akan digunakan disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121°C , seperti botol duran, gelas beker, *yellow tip*, *blue tip*, mikropipet. dan disimpan di LAF. Kemudian dilakukan prosedur pembuatan media cair. D-Mem dituang ke dalam gelas beker. Tambahkan 2 gr NaHCO_3 , 2 gr hepes dan aquades steril ke dalam gelas beker hingga volume 1000 mL. Aduk dengan menggunakan *magnetic stirring bar* pada *magnetic hot plate stirrer* hingga D-MEM, NaHCO_3 dan hepes dapat larut dan homogen. Lakukan filtrasi media dengan filter 0,2 mikron, tampung ke dalam botol duran 1000 ml. Beri penandaan dan simpan media di kulkas dengan suhu 4°C .

Prosedur Pembuatan Media Kultur Lengkap

Media kultur lengkap adalah media yang mengandung faktor pertumbuhan seperti *Fetal Bovine Serume* (FBS) dan juga Penisilin-Streptomisin sebagai antibiotik. Pembuatan media kultur lengkap dilakukan di LAF pada kondisi aseptis, sehingga sebelum dan sesudah mengambil bahan yang sudah steril. Cairkan FBS dan Penisilin-streptomisin pada suhu kamar terlebih dahulu sebelum digunakan. Masukkan Penisilin-streptomisin sebanyak 2 ml/100 ml ke dalam botol duran 250 ml. Tambahkan Amphotericin B 1 ml/100 ml, 20 ml/100 ml FBS, Tambahkan media cair sampai 100 ml ke

dalam botol duran. Beri penandaan pada botol berupa nama media, tanggal pembuatan media kultur lengkap. Simpan media kultur lengkap di kulkas dengan suhu 4⁰C.

Prosedur Penumbuhan Sel (*Cell thawing*)

Sel apabila tidak digunakan dalam penelitian disimpan dalam tangki nitrogen cair untuk waktu penyimpanan yang lama, atau disimpan dalam suhu -80 ⁰C untuk penyimpanan selama 2-3 bulan. Sel ditumbuhkan kembali dalam medium saat akan digunakan dalam uji in vitro. Dalam proses penumbuhan sel perlu diperhatikan beberapa faktor agar sel dapat tumbuh dengan baik pada mediumnya, sehingga hasil analisis yang diperoleh menjadi valid.

Siapkan media kultur (D-MEM) sebanyak 3 ml ke dalam tabung sentrifus. Ambil *cryo tube* yang berisi sel dari *freezer* pada suhu -80⁰C. Cairkan suspensi sel dalam *cryo tube* pada suhu kamar hingga mencair. Mikropipet 1000 μ l digunakan untuk mengambil suspensi sel, masukkan tetes demi tetes ke dalam media kultur (D-MEM) yang telah disiapkan. Masukkan tabung sentrifus dan tutup *conical tube* dengan rapat. Sentrifugasi dengan sentrifus untuk *conical tube* pada 600 g selama 5 menit. Kembali ke dalam LAF, semprot tabung sentrifus dan tangan dengan alkohol 70 %. Tuang supernatan media kultur ke dalam pembuangan. Tambahkan 4 ml D-MEM baru, resuspensi kembali sel hingga homogen. Transfer

masing-masing 2 ml suspensi sel ke dalam 2 *dish*. Tambahkan masing-masing 5 ml D-MEM ke dalam dish, homogenkan. Kondisi sel diamati dengan mikroskop, selanjutnya simpan sel ke dalam inkubator CO₂.

Prosedur Panen sel

Sel dikeluarkan dari inkubator CO₂, kondisi sel diamati, panen sel dilakukan setelah 80 % konfluen. Media dibuang dengan menggunakan mikropipet. Sel dibilas dengan media kultur D-MEM. Tambahkan tripsin-EDTA secara merata selama 5-10 menit sebanyak 1 ml, kemudian tambahkan media kultur D-MEM untuk menghentikan reaksi kerja tripsin-EDTA 0,25 %. Amati sel dengan mikroskop. Transfer sel yang terlepas ke dalam *falcon* steril baru. Masukkan sebanyak 0,5 ml ke dalam *plate well*.

Prosedur perhitungan sel

Transfer 10 µl panen sel ke hemasitometer. Hitung sel dibawah mikroskop dengan *counter*. Untuk sel yang akan ditanam (untuk perlakuan), lakukan transfer sejumlah sel yang diperlukan ke dalam *falcon* dan tambahkan media kultur sesuai dengan konsentrasi yang dikehendaki.

Cara Perhitungan :

Hitung sel pada 4 kamar hemasitometer. Sel yang gelap (mati) dan sel yang berada di batas luar sebelah atas dan di sebelah kanan tidak ikut dihitung. Sel di batas kiri dan batas bawah ikut dihitung.

b. Pembuatan ekstrak ikan haruan (*Channa striata*)

Ikan haruan dikukus dengan perbandingan ikan haruan dengan akuades 1:1, pada suhu 60°C selama 50 menit kemudian dikeringkan dengan menggunakan *freeze dryer* selama 30 jam sehingga diperoleh konsistensi berupa bubuk.

c. Prosedur in-aktivasi bakteri *Lactobacillus sp.*

Sebelum bakteri *Lactobacillus sp* dipaparkan pada *odontoblast cell line*, dilakukan in-aktivasi dengan memanaskan bakteri pada suhu 121°C pada *autoclave* selama 5 menit, kemudian dilakukan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Dosis efektif paparan bakteri ditentukan dengan menggunakan perbandingan sel : bakteri adalah 1:20.

d. Perlakuan sampel :

1. Kontrol negatif (kontrol sel) :

Odontoblast-cell line dan media.

2. Kontrol Positif

- a. Aplikasi $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ke *odontoblast cell line* .
 - b. Aplikasi toksin (*Lactobacillus,sp*) ke *odontoblast cell line*.
 - c. Aplikasi toksin (*Lactobacillus,sp*), kemudian ditambahkan $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ke *odontoblast cell line*.
2. Aplikasi ekstrak ikan haruan 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ke *odontoblast cell line*.
 3. Aplikasi toksin (bakteri *Lactobacillus,sp*), tambahkan $\text{Ca}(\text{OH})_2$, dan tambahkan ekstrak ikan haruan 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ke *odontoblast cell line*.

e. Prosedur uji kadar alkalin fosfatase

Persiapan Reagen

1. Semua reagen berada pada suhu ruangan
2. **Standard** : Campur 120 μl *standard solution* (800 IU/L) dengan 120 μl *standard diluent* untuk menghasilkan 400 IU/L stok *larutan standard*. Agitasi selama 15 menit dengan pelan sebelum dilakukan pengenceran. Siapkan duplikat standard dengan serial pengenceran dari stok larutan standar(400 IU/L) 1: 2 dengan standard diluent untuk menghasilkan duplikat larutan 200 IU / L, 100 IU / L, 50 IU / L, dan 25 IU / L. *Standard diluent* berfungsi sebagai standar nol (0IU / L). Setiap larutan yang tersisa harus dibekukan pada suhu 20 °C dan digunakan dalam jangka waktu 1

bulan. Pengenceran *standard dilution* yang disarankan adalah sebagai berikut :

400 IU/L	Standar No.5	120µl <i>original standard</i> + 120 µl <i>standard diluent</i>
200 IU/L	Standar No.4	120µl <i>standard</i> No.5 + 120 µl <i>standard diluent</i>
100 IU/L	Standar No.3	120µl <i>standard</i> No.4 + 120 µl <i>standard diluent</i>
50 IU/L	Standar No.2	120µl <i>standard</i> No.3 + 120 µl <i>standard diluent</i>
25 IU/L	Standar No.1	120µl <i>standard</i> No.2 + 120 µl <i>standard diluent</i>

Wash Buffer : Encerkan 20 ml *wash buffer* ke dalam 500 ml akuades.

Prosedur Assay

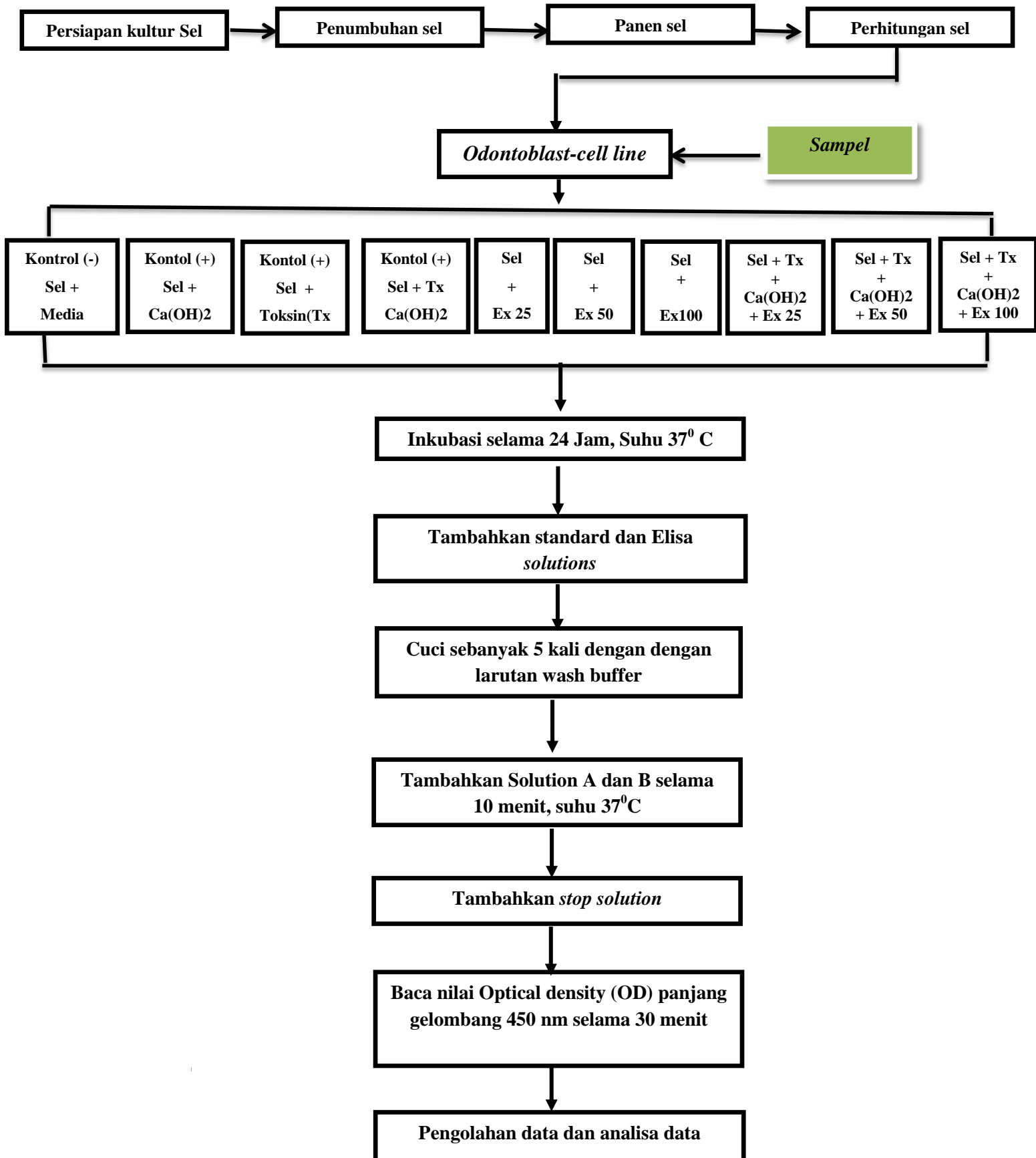
Persiapkan semua *reagen*, larutan *standard* dan sampel pada suhu ruangan. Tambahkan 50 µl larutan *standard* ke *well*, tambahkan 40 µl sampel ke *well* dan tambahkan 10 µl *anti-ALP antibody* ke sampel *well*, kemudian tambahkan 50 µl streptavidin-HRP ke sampel *well* dan *standard well*. Tutup permukaan *well* dengan *sealer*. Inkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C.

Lepaskan *sealer*, bilas *plate well* sebanyak 5 kali dengan larutan *wash buffer*. Rendam kurang lebih 0,35 ml selama 30 – 60 detik setiap pembilasan. Untuk pembilasan otomatis, aspirasi semua *well* dan bilas sebanyak 5 kali dengan larutan *wash buffer*. Keringkan *plate well* di atas tissue kering. Tambahkan 50 μ l larutan *substrate A* ke tiap *well*, kemudian tambahkan 50 μ l larutan *substrate B* ke tiap *well*. Inkubasi *plate well*, tutup dengan *sealer* selama 10 menit pada suhu 37⁰C dalam ruang gelap. Tambahkan larutan stop ke tiap *well*, warna biru gelap, seketika berubah menjadi warna kuning. Tentukan nilai *optical density* (OD) ke tiap *well* secara langsung dengan menggunakan *microplate reader* dengan panjang gelombang 450 nm selama 30 menit setelah penambahan larutan stop.

G. Analisis Data

1. Jenis data : Data primer
2. Pengolahan data : SPSS 17.00 for Windows 7
3. Analisa data : Uji statistik Anova dan *Multiple Comparison* metode *bonferroni*
4. Penyajian data : Dalam bentuk tabel dan grafik

ALUR PENELITIAN



BAB IV

HASIL PENELITIAN

Data yang diperoleh dari hasil uji pengaruh pemberian ekstrak ikan haruan (*Channa striata*) terhadap aktivitas alkalin fosfatase (ALP) pada *odontoblast cell line* dengan menggunakan uji *Anova* dan *Multiple Comparison* metode *Bonferroni*. Hasil uji statistik signifikan jika diperoleh nilai $p < 0.05$.

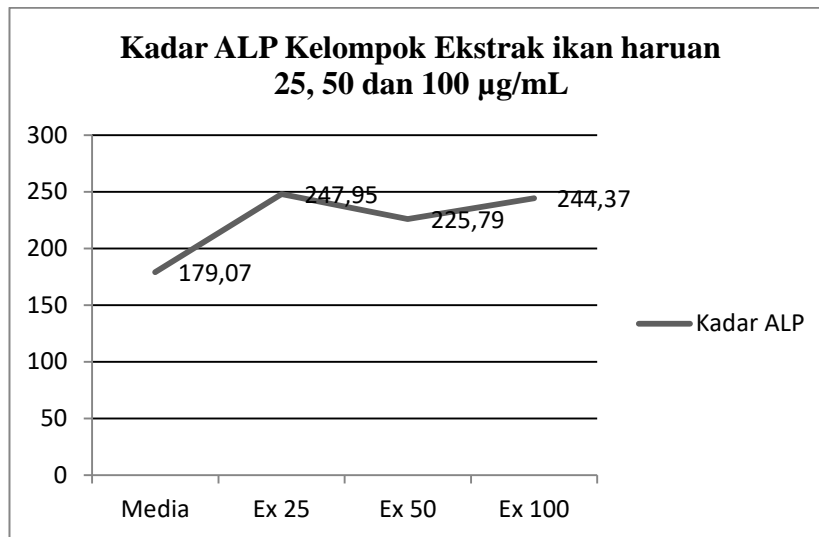
Tabel 1. Perbandingan kadar ALP pada kelompok perlakuan ekstrak ikan haruan (*Channa striata*) pada konsentrasi 25 µg/mL, 50 µg/mL dan 100 µg/mL

Kelompok	n	Mean ± SD	p
Kontrol Negatif	3	179,07 ± 14,14	-
Ex 25	3	247,95 ± 28,88	0,234
Ex 50	3	225,79 ± 34,90	1,000
Ex 100	3	244,37 ± 21,75	0,356

Bonferroni ($p < 0,005$). Kadar ALP pada kelompok ekstrak ikan haruan (*Channa striata*) pada konsentrasi 25,50 dan 100 µg/mL)

Tabel 1, menunjukkan kadar ALP pada kelompok perlakuan ekstrak ikan haruan konsentrasi 25 µg/mL, 50 µg/mL dan 100 µg/mL mempunyai nilai yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (*odontoblast cell line* + media). Namun konsentrasi 25 µg/mL menunjukkan nilai yang lebih tinggi dibanding konsentrasi 50 dan 100 µg/mL. Hasil pengamatan menunjukkan ekstrak ikan haruan (*Channa*

striata) konsentrasi 25 µg/mL, 50 µg/mL dan 100 µg/mL memiliki kadar ALP rata-rata masing-masing 247,95 ; 225,79 dan 244,37.



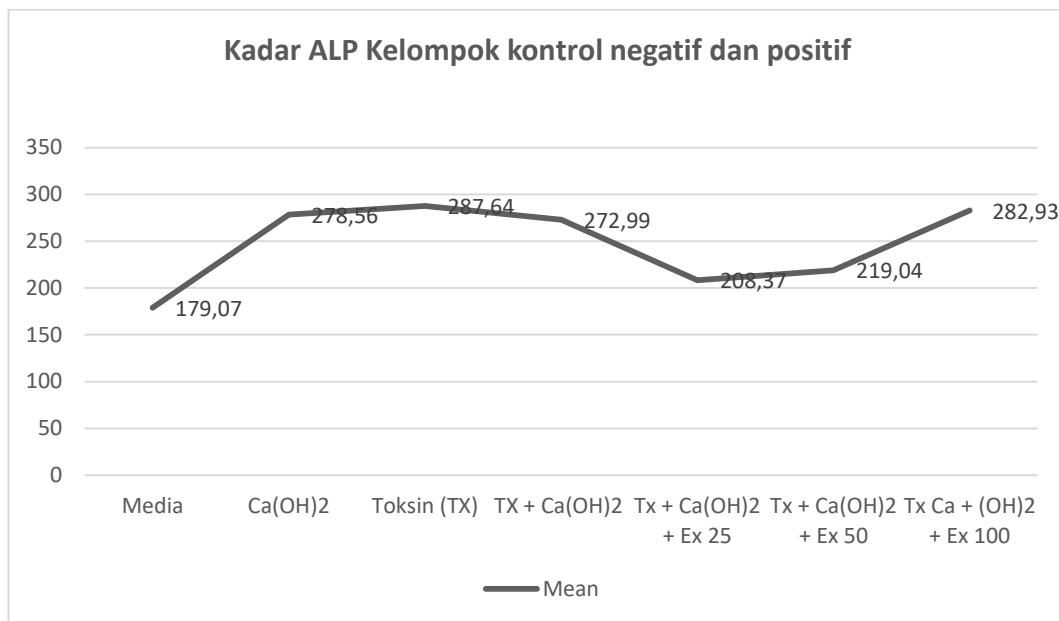
Grafik 1. Grafik kadar ALP pada kelompok perlakuan ekstrak ikan haruan (*Channa striata*) konsentrasi 25 µg/mL, 50 µg/mL dan 100 µg/mL.

Tabel 2. Perbandingan ALP pada kelompok kontrol negatif dan kontrol positif

Kelompok	n	Mean ± SD	p
Kontrol negatif	3	179,07 ± 14,14	-
Ca(OH) ₂	3	278,56 ± 38,69	0,005
Toksin (TX)	3	287,64 ± 29,66	0,002
TX + Ca(OH) ₂	3	272,99 ± 26,53	0,011
Tx + Ca(OH) ₂ + Ex 25	3	208,37 ± 13,79	1,000
Tx + Ca(OH) ₂ + Ex 50	3	219,04 ± 10,42	1,000
Tx Ca + (OH) ₂ + Ex 100	3	282,93 ± 10,55	0,003

Bonferroni ($p < 0,005$). Kadar ALP pada kelompok kontrol negatif (*odontoblast cell line + media*), kelompok kontrol positif (Ca(OH)₂), dan kelompok toksin (*bakteri Lactobacillus, sp*)

Tabel 2, menunjukkan kelompok toksin (Tx) mempunyai nilai kadar ALP yang lebih tinggi secara signifikan dibanding kelompok kontrol negatif (odontoblast cell line + media) dan kontrol positif lain dengan nilai p sebesar 0,002. Kadar ALP pada kelompok Ca(OH)₂ + Tx + Ex 100 menunjukkan nilai yang lebih tinggi secara signifikan dibanding kelompok lain, dengan nilai p sebesar 0,003.



Grafik 2. Grafik kadar ALP pada kelompok kontrol negatif dan kontrol positif

BAB V

PEMBAHASAN

Penelitian ini melakukan uji aktivitas alkalin fosfatase (ALP) pada *odontoblast cell line*, ekspresi ini dikaitkan dengan peranan ALP dalam biomineralisasi email dan dentin, dimana ketersediaan protein dalam mengikat ion kalsium dan fosfat sangat penting untuk nukleasi hidroksiapatit dan pertumbuhan kristal sekunder. (J Matthew, dkk., 2007)

Sebelumnya, ekspresi ALP yang dikultur melalui (*Human Dental Pulp Cells*) hDSPC telah ditentukan secara biokimia dan digunakan sebagai marker untuk abilitas sel yang memproduksi matriks mineral secara in vitro (Gronthos dkk., 2000 ; Luisi dkk., 2007; Wei dkk., 2007)

Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh J Matthew dkk (2007) yang membuktikan bahwa *Tissue Non Spesifik Alkalin Fosfatase* (TNAP) dapat disekpresikan oleh sel pulpa gigi dan ekspresi meningkat seiring waktu terkait dengan densitas sel. Ekspresi TNAP oleh hDPSC mengalami peningkatan karena perpanjangan periode kultur. Ketika hDPSC dikultur pada konsentrasi tetap selama 2 minggu, ditemukan bahwa tingkat ekspresi TNAP meningkat, yaitu tingkat ekspresi ditemukan kurang dari 1% pada hari ke 4, dan meningkat seiring waktu hingga 26% sel pada hari ke 14.

Sebelum dilakukan uji aktivitas alkalin fosfatase pada *odontoblast cell line*, terlebih dahulu dilakukan pembuatan kultur *odontoblast cell line*

yang akan digunakan dalam penentuan kadar alkalin fosfatase. Satu jenis sel yang dapat digunakan dalam evaluasi in vitro untuk regenerasi dentin adalah *odontoblast cell line* seperti , MDPC-23. Awalnya sel ini berasal dari dental papilla gigi molar tikus betina yang berusia 18-19 hari. MDPC 23 *odontoblast cell line* berukuran lebih kecil dari sel fibroblast dan berbentuk epiteloid serta memiliki beberapa membran sel kecil. MDPC 23 *odontoblast cell line* juga mensintesis protein lain yang umum untuk jaringan termineralisasi, seperti ALP, kolagen tipe I, osteopontin dan *osteocalcin* dan mampu mengekspresikan dan mensekresi dentin sialoprotein (DSP) dan dentin phosphoprotein (DPP) dalam kultur. (Funtik M., 2013)

Odontoblas merupakan sel yang bertanggung jawab untuk pembentukan jaringan mineralisasi berbasis kolagen yang membentuk sebagian besar gigi. Sel-sel *ectomesenchymal* yang tidak berdiferensiasi berada pada pulpa, terutama pada lapisan subodontoblastik. Meskipun mekanisme yang tepat yang menginduksi terjadinya diferensiasi sel-sel pulpa menjadi *odontoblast like-cell* masih belum diketahui, namun sel-sel baru muncul setelah sinyal *growth factor* yang memicu terjadinya pembelahan sel, kemotaksis, migrasi sel, adhesi sel dan sitodiferensiasi. (E Victor, 2004).

Bakteri yang terdapat pada karies dentin pada umumnya adalah *Lactobacillus, acidophilus*, dan termasuk bakteri gram positif yang mengeluarkan toksin berupa *Lipoteichoic acid* (LTA). LTA terkandung

dalam dinding sel bakteri dan merupakan salah satu komponen penting bakteri gram positif. Bakteri gram positif masuk ke dalam jaringan dentin melalui proses karies dan merangsang respon imun di pulpa gigi manusia. Odontoblas merupakan sel pertama yang berkontak dengan bakteri dan memberi respon melalui reseptor TLR2 dan TLR4.

Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Widjiastuti (2017), menggunakan *odontoblast like cells* yang dipapar bakteri *Lactobacillus acidophilus* inaktif untuk menginduksi ekspresi sitokin proinflamasi. Pemilihan tersebut berdasarkan bahwa selama proses pertumbuhan gigi hanya dibutuhkan sejumlah kecil sel progenitor odontoblas yang mengalami mitosis sebelum berdiferensiasi membentuk odontoblas.

Pada penelitian ini, pengaruh pemberian ekstrak ikan haruan (*Channa striata*) terhadap aktivitas ALP pada *odontoblast cell line* menunjukkan bahwa terjadi peningkatan ALP pada kelompok ekstrak ikan haruan dengan konsentrasi 25 µg/mL, 50 µg/mL dan 100 µg/mL dibandingkan kelompok kontrol negatif. Namun konsentrasi 25 µg/mL menunjukkan nilai yang lebih tinggi dibanding konsentrasi 50 dan 100 µg/mL. Perbedaan konsentrasi memberikan nilai kadar ALP yang berbeda, hal ini mungkin disebabkan karena albumin merupakan protein yang memiliki berat molekul yang cukup besar sehingga proses difusi ke dalam sel juga lebih lambat pada konsentrasi yang lebih tinggi. (Istiqomah, 2014)

Dalam penelitian ini, membandingkan kadar ALP pada kelompok toksin bakteri *Lactobacillus*, Sp yang mempunyai nilai kadar ALP yang lebih tinggi secara signifikan dibanding kelompok kalsium hidroksida. Hal ini disebabkan kerana toksisitas kalsium hidroksida pada konsentrasi 50 µg/mL memiliki toksistas yang lebih tinggi dibandingkan kelompok toksin (*Lactobacillus*, Sp). Hal ini sesuai dengan dengan hasil penelitian mengenai pengaruh ekstrak ikan haruan (*Channa striata*) terhadap viabilitas *odontoblast cell line* yang menunjukkan bahwa, viabilitas *odontoblast cell line* setelah pemberian kalsium hidroksida sebesar 86,11 %, sedangkan viabilitas *odontoblast cell line* pada pemberian toksin sebesar 94,44 %.

Pada penelitian ini, menunjukkan kadar ALP pada kelompok kalsium hidroksida yang ditambahkan ekstrak ikan haruan dengan konsentrasi 100 µg/mL menunjukkan nilai yang lebih tinggi secara signifikan dibanding kelompok kalsium hidroksida yang ditambahkan ekstrak ikan haruan konsentrasi 25 dan 50 µg/mL. Hal ini mungkin disebabkan oleh peranan protein albumin dalam mineralisasi dan mempersingkat proses inflamasi. Struktur molekul albumin mampu berikatan kuat dengan anion organik hidrofobik, seperti asam lemak, kalsium dan magnesium. (Bever, 2006)

Hasil penelitian ini berkaitan dengan penelitian oleh Agustin (2016) yang membuktikan bahwa ekstrak ikan haruan 25 %, 50 % dan 100 % dapat membantu proses penyembuhan luka pada fase inflamasi proses

penyembuhan luka tikus Wistar karena albumin yang terkandung dalam ekstrak ikan haruan dapat membantu meregulasi sintesis prostaglandin yang penting dalam fase inflamasi dan menginduksi penyembuhan luka. Prostaglandin merupakan salah satu produk jaringan yang timbul saat reaksi inflamasi yang mengaktifkan sistem makrofag dengan kuat sehingga jumlah makrofag meningkat dan memfagositosis benda-benda asing di daerah luka seperti pada kelompok perlakuan yang diberikan ekstrak ikan haruan. (Tamales, 2016)

Hasil penelitian oleh Njeh, et al (2016) yang menggunakan *bovine serum albumin (hydrogel)* sebagai bahan *pulp capping*, menyebabkan inflamasi ringan, sehingga tidak bersifat toksik terhadap sel odontoblas. Sebaliknya, kalsium hidroksida yang bersifat senyawa alkali tinggi, dapat menghasilkan daerah nekrotik ringan pada batas dentinal reparatif dan pulpa vital setelah 2 minggu pasca *capping*, dan proses inflamasi masih jelas terlihat setelah 4 minggu. Disamping itu, kalsium hidroksida menghasilkan dentin reparatif yang bersifat *porous* karena bersifat toksik terhadap sel odontoblas, sehingga dapat menyerap cairan darah dan eksudat dari pulpa yang menyebabkan terjadi peningkatan tekanan pulpa.

Penelitian terbaru telah dilakukan mengenai kemungkinan protein *hydrogel* peptida bisa berkontribusi untuk mendukung diferensiasi *stem cell* pulpa gigi, serta dapat menjadi *carrier* molekul bioaktif (Cavalcanti dkk., 2013; Goldberg dkk., 2015)

Penelitian oleh Elefteriou,dkk (2006) membuktikan pentingnya protein (asam amino) dalam pembentukan mineral. Peningkatan asam amino dapat meningkatkan sintesis kolagen tipe I dan ekspresi osteokalsin. (Hamrick , 2016)

Berdasarkan hasil penelitian ini, ekstrak ikan haruan (*Channa striata*) dapat dipertimbangkan sebagai bahan biomineralisasi yang dapat meningkatkan proliferasi sel odontoblas.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Kombinasi ekstrak ikan haruan (*Channa striata*) 100 µg/mL dan kalsium hidroksida dapat meningkatkan kadar ALP, karena kandungan albumin dalam ekstrak ikan haruan dapat mempersingkat fase inflamasi pada *odontoblast cell line*.
2. Ekstrak ikan haruan (*Channa striata*) berpotensi sebagai *carrier* molekul bioaktif dan dapat meningkatkan proliferasi *odontoblast cell line*.
3. Ekstrak ikan haruan (*Channa striata*) dapat berperan sebagai bahan biomineralisasi sehingga dapat terjadi pembentukan *dentinal bridge*.

B. Saran

1. Perlu dilakukan periode kultur dengan rentang waktu dalam pengukuran kadar ALP.
2. Perlu dilakukan uji lanjut untuk melihat pengaruh ekstrak ikan haruan terhadap efektivitas kalsium hidroksida pada *odontoblast cell line*.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustin R, Dewi N, Rahardja SD. 2016. Efektivitas ekstrak ikan haruan (*Channa striata*) dan ibuprofen terhadap jumlah sel neutrofil pada proses penyembuhan luka studi in vivo pada mukosa bukal tikus (*Rattus norvegicus*) wistar. *Dentino J Kedokt Gigi*.1(1):69-70.
- Alfarisy M. 2014. Effect of body length and sex on albumin contents of snakehead fish (*Channa striata*). Departement of Biology Faculty of Mathematics and natural sciences Sepuluh November Institute of Technology Surabaya. 1-15.
- Aminabadi NA, Maljaei E, Erfanparasi L, Aghbali A. 2012. Simvastatin versus calcium hydroxide direct pulp capping of human primary molars: a randomized clinical trial. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 7(1):9.
- Arana VE,Chaves, Massa LF. 2004. Odontoblasts: The cells forming and maintaining dentine. *Int J Biochem Cell Biol*. 36(8):1367-72.
- Bever, Lonneke M, et all. 2006. Low albumin levels increase endothelial NO production and decrease vascular NO sensitivity. *Nephrol Dial Transplant*. 21: 3443–3449.
- B Worth. 1997. Dental pulp lesions covered with albumin. *J Oral surgery*. 30(3).
- Calvacanti BN, Zeitin BD, Nor JE. 2013. A hydrogel scaffold that maintains viability and supports differentiation of dental pulp stem cells. *Dent Mater*.29:97-102.
- Cooper PR, J Ilaria, Holder MJ, Milward MR.2017. Inflammation and regeneration in the dentin pulp complex : Net gain or net loss. *Regenerative endodontics*. *J of Endod*. 43(95):587.
- D'Souza R, Qin C. 2012. Development of pulpodentin complex. In: Hargreaves KM, Goodis HE, Tay FR. *Dental pulp*. 2nd edition. Chicago, Berlin: Quintessence Publishing .p15-6.
- Dwiandhono I, Effendy R, Kunarti S. 2016. The difference between thickness of odontoblast-like cell layer after induced by propolis extrct and calcium hydroxyde (in vivo). *Dental journal*. 49(1):17-20.
- E Victor, C Arana, F Luciana, Massa. 2004. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. *j.biocel*. 36:1367–1373

- Fauzi M, Salim MN, Nazaruddin. 2017. Efektivitas salep getah jarak pagar (*Jatropha curcas, Linn*) pada fase epitelisasi penyembuhan luka sayat mencit (*Mus musculus*). *Jimvet*. 1(3):327
- Funtik M. 2013. Monitoring MDPC-23 Odontoblast-Like Cell Proliferation Using Cell Count and DNA Content Methods. Master's Theses. [online] Available from: http://digitalcommons.uconn.edu/gs_theses/389. (Diakses pada 5 Agustus 2018).
- Goldberg M, Kulkarni A, Young M, Boskey A. 2012. Dentin : Structure, Composition and mineralization : The role of dentin ECM in dentin formation and mineralization.. *NIH Public Access*. 3:718
- Goldberg M, Njeh A, Uzunoglu E. 2015. Is pulp inflammation a prerequisite for pulp healing and regeneration?. *J hindawi Med of Inflammation*. 1-8
- Gronthos S. Differential Cell Surface Expression of the STRO-1 and Alkaline Phosphatase Antigens on Discrete Developmental Stages in Primary Cultures of Human Bone Cells. *Journal of bone and mineral research*; 14(1):47-55
- Hamrick M, MacDonell R, Isaacs CM. 2016. Protein/amino-acid modulation of bone cell function. *International bone and mineral society. J Bonekey Rep*. 5(827): 1-23
- Hammarstro L, Matsumoto K, Lyngstadaas SP. 2002. The induction of reparative dentine by enamel proteins. *Int Endod J*. 35:407.
- Hartini, Ps, Dewi N, Hayatie L. 2015. Extract of haruan (*Channa striata*) decreases macrophages count in inflammation phase of wound healing process. *J Dentomaxillofac Sci*. 14(1): 6-10
- Hargreaves KM. 2012. *Dental pulp*. 2nd edition. Chicago, Berlin: Quintessence Publishing .p28-9, 34-6.
- Hashemi-beni B, Khoroushi M, Foroughi MR, Karbasi S, Khademi AA. 2017. Tissue engineering: dentin–pulp complex regeneration approaches (A review). *J. Tissue Cell*. 1:13.
- Istiqamah L, Damayanti E, Julendra H, Istika D, Winarsih S. 2014. Daya hambat granul ekstrak cacing tanah (*Lumbricus Rubellus*) terhadap bakteri patogenik in vitro. *JSV*. 32(1):93-102
- J Matthew, D Tomlinson, Caitriona, B Xuebin, Yang, K Jennifer. 2014. Tissue non-specific alkaline phosphatase production by human dental pulp stromal cells is enhanced by high density cell culture.

Cell Tissue Res. 361(3):529–540.

Karanxha, L. Park, SJ. Son WJ, Nor JE, Min KS. 2013. Combined effects of simvastatin and enamel matrix derivate on odontoblastic differentiation of human dental pulp cells. J.Endod. 39(1):2.

Kim JY, Kim DS, Auh QS, Yi JK, Moon SU, Kim EC. 2017. Role of protein phosphatase 1 in angiogenesis and odontoblastic differentiation of human dental pulp cells. J Endod. 43(3):417.

Kitamura C, Nishihara T, Terashita M, Tabata Y, Washio A. 2012. Local regeneration of dentin-pulp complex using controlled release of FGF-2 and naturally derived sponge-like scaffolds. Int J Dent. 1(1): 1

Koike T, Polan MA, Izumikawa M, Saito T. 2014. Induction of reparative dentin formation on exposed dental pulp by dentinphosphoryn/collagen composite. Biomed research international. 1-8

Kusumaningrum GA, Alamsjah MA, Mashitah ED. 2014. Uji kadar albumin dan pertumbuhan ikan gabus (*Channa striata*) dengan kadar protein pakan komersial yang berbeda. Jurnal ilmiah perikanan dan kelautan. 6(1):25.

Mustafa A, Widodo MA, Kristianto Y. 2012. Albumin and zinc content Of snakehead fish (*Channa striata*) extract and its role in health. IESEE Int J Sci Technol. 1(2):1–7.

Martinez RG, Caraceni P, Bernadi M, Gines P, Arroyo V, Jalan R. 2013. Albumin : Pathophysiologic basic of its role in the treatment of cirrhosis and its complications. Clinical journal of the American association for the study of liver diseases. 58:1386-7.

Njeh A, Uzunoglu E, Simon S, Berdal A, Kellermann O, Goldberg M. 2016. Reactionary and reparative dentin formation after pulp capping: Hydrogel vs . Dycal. Evid Based Endod. 1:2–9.

Octiara E. 2015. Dentin reparatif dan *growth factor* yang berperan dalam dentinogenesis reparatif. Dentika Dent J. 18(3):294–9.

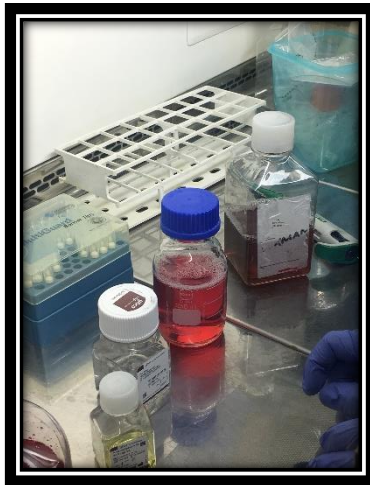
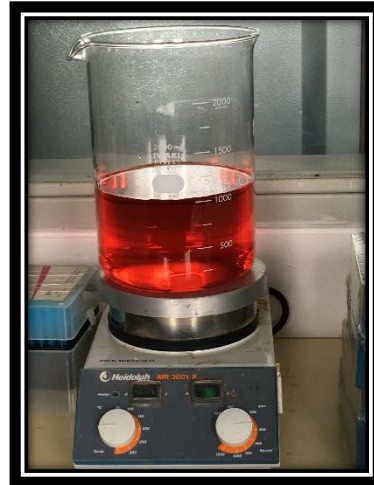
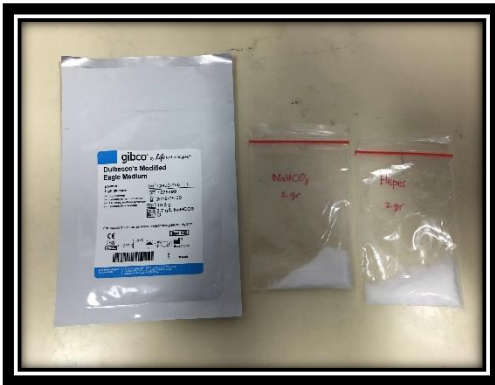
Okiji T. 2012. Pulp as a connective tissue. In: Hargreaves KM, Goodis HE, Tay FR. Dental pulp. 2nd edition. Chicago, Berlin: Quintessence Publishing .p.70-1,78-9,85.

Perinetti, G et al. 2005. Alkaline phosphatase activity in dental pulp of orthodontically treated teeth. Am J Orthod Dentofacial Orthop.128:492-6.

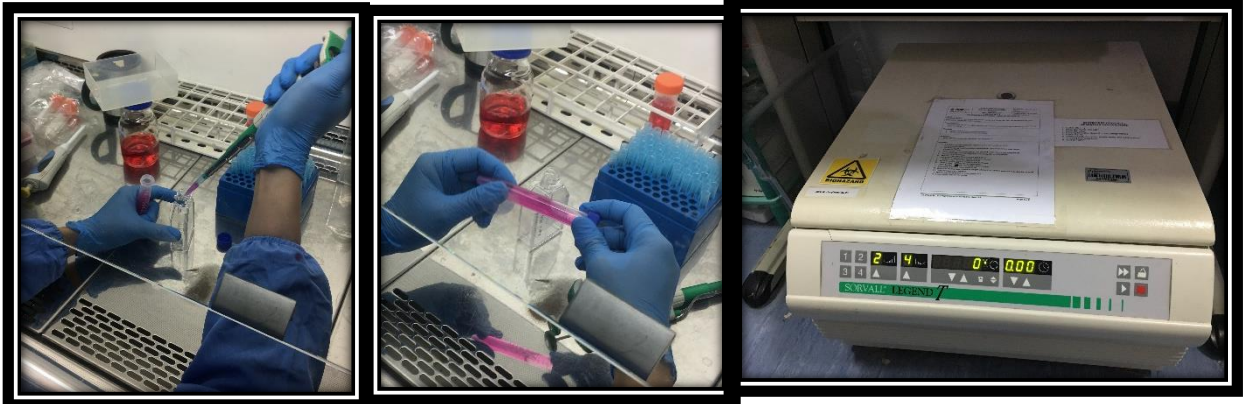
- Poniatowski ŁA, Wojdasiewicz P, Gasik R, Szukiewicz D. 2015. Transforming growth factor beta family: insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications. *Mediators Inflamm.* 2015 :1–2
- Prijambodo SK. 2005. Stimulasi aktivitas fibroblas pulpa dengan pemberian TGF- β 1 sebagai bahan perawatan bahan pulp capping. Disertasi tidak diterbitkan. Program Pascasarjana universitas Airlangga.
- Rai AK, Saikia P, Mech B. 2013. Histochemical localization of alkaline phosphatase activity during cutaneous woun healing in a catfish under acid stress. *International journal of scientific and research publications.* 3(8):1
- Ricucci, D. Siqueira J. 2013. *Endodontology An integrated biological and clinical view.* Berlin: Quintessence Publishing. p1-2,78
- Rechenberg D, Galicia JC, Peters OA. 2016. Biological markers for pulpal inflammation : A systematic review. *Journal* :15-6.
- Siswanto A, Dewi N, Hayatie L. 2016. Effect of haruan (*Chanaa striata*) extract on fibroblast cells count in wound healing : *Journal of dentomaxillofacial science* : 234-39.
- Silvipriya et al. 2015. Collagen: Animal Sources and Biomedical Application. *Journal of Applied Pharmaceutical Science.* 5 (03):123-127.
- Smith AJ. 2012. Formation and repair of dentin in the adult. In: Hargreaves KM, Goodis HE, Tay FR. *Dental pulp.* 2nd edition. Chicago, Berlin: Quintessence Publishing. p28-9, 34-6.
- Smith AJ. 2003. Vitality of the dentin-pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. *J Dent Educ.* 67(6):678-80.
- Sakamoto M, Matsushima K, Yamazaki M. 2004. Stimulation of alkaline phosphatase activity by PGE 2 through induction. *Int J Oral-Med.* 2(1):36.
- Setiawan MR, Dewi N, Oktaviyanti I. 2015. Extract of haruan (*Channa striata*) increases neocapillaries count in wound healing process. 2015. [J Dentomaxillofac Sci.](#)14(1):1-5

- Sharma U, Pal D, Prasad R. 2014. Alkaline phosphatase: An overview. *Indian J Clin Biochem.* 29(3):269–78.
- Shrestha S, Diogenes A, Kishen A. 2014. Temporal-controlled release of bovine serum albumin from chitosan nanoparticles: effect on the regulation of alkaline phosphatase activity in stem cells from apical papilla. *J of Endod.* (16):1–6.
- Shiba H, Nakanishi k, Rashid F, Mizuno N, Hino T, Ogawa , Kurihara H. 2003. Proliferative ability and alkaline phosphatase activity with in vivo cellular aging in human pulp cells. *J of endodontics.* 29(12):9.
- Song M, Yu B, Kim S, Hayashi M, Smith C, Sohn S, et al. 2017. Clinical and molecular perspectives of reparative dentin formation lessons learned from pulp-capping materials and the emerging roles of calcium. *Dent Clin.* 61:93–4.
- Tamale D, Dewi N, Rosida L. 2016. Extract of haruan (*Channa striata*) extract increasing reepithelialization count in wound healing process on wistar rat's buccal mucosa. *J Dentomaxillofac Sci.* 1(1);12-5
- Torabinejad M, Holland,GR. 2015. The biology of dental pulp and periradicular tissues In : Torabinejad M, Walton R. *Endodontics a principles and practice.* 5th ed. St.Louis, Missouri: Elsevier Saunders. p.6-8.
- Tomlinson MJ, Dennis C, Yang XB, Kirkham J. 2015. Tissue non-specific alkaline phosphatase production by human dental pulp stromal cells is enhanced by high density cell culture. *Cell Tissue Res.* 1(1):1-2.
- Trilaksana, A.C.2015. The dynamic of leptin and fibronectin levels in calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate as pulp capping materials. Disertasi tidak diterbitkan. Makassar. Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin.
- Varalakshmi PR, Kavitha M. 2013. Effect of statins with a -tricalcium phosphate on proliferation, differentiation , and mineralization of human dental pulp cells. *J Endod.* 39(6): 806.
- Widjiastuti I, Suardita K, Saraswati W. 2014. The expressions of NF- κ B and TGF β -1 on odontoblast-like cells of human dental pulp injected with propolis extracts. *Dent J.* 47(1):14.
- Yudaniayanti IS. 2005. Aktifitas alkaline phosphatase pada proses kesembuhan patah tulang femur dengan terapi CaCO_3 dosis tinggi pada tikus jantan. *Media Kedokt Hewan.* 21(1):15–6.

FOTO PENELITIAN

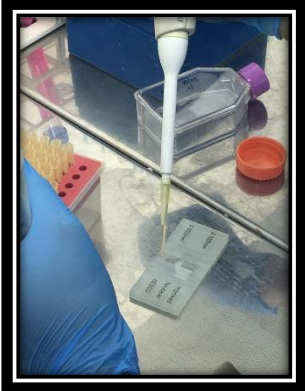


Pembuatan medium kultur sel

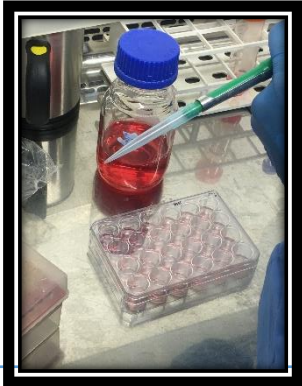


Prosedur *cell thawing*

Prosedur panen sel

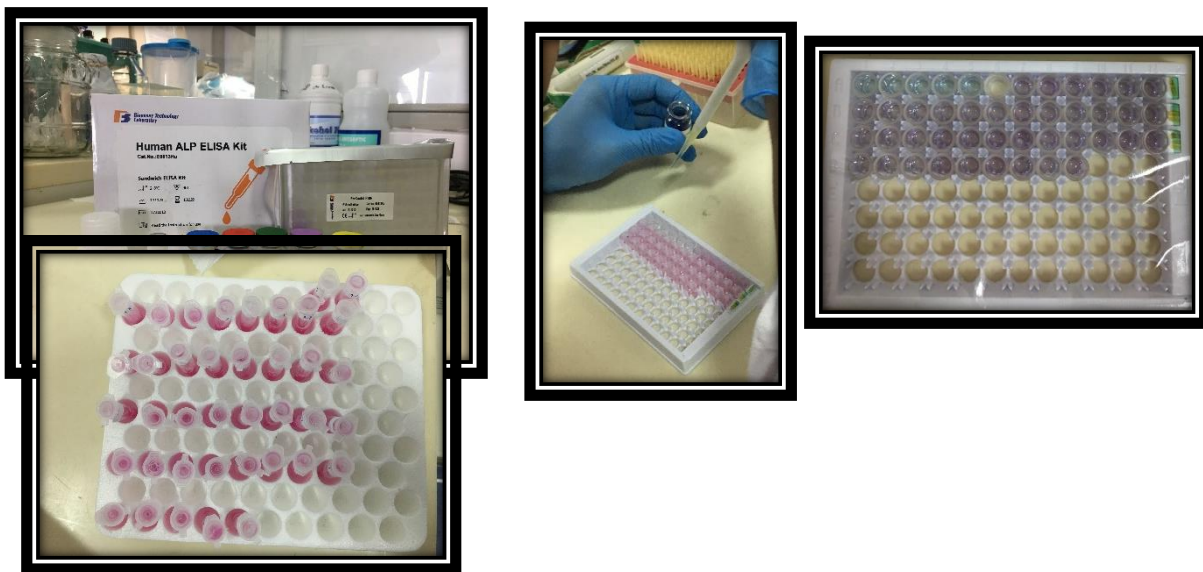
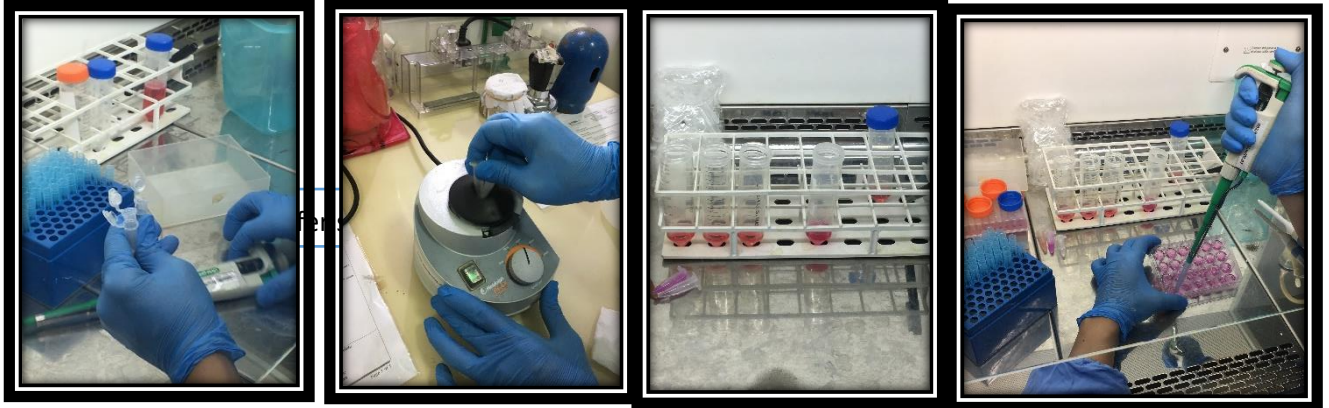


Hitung sel di bawah mikroskop dengan kamar hitung

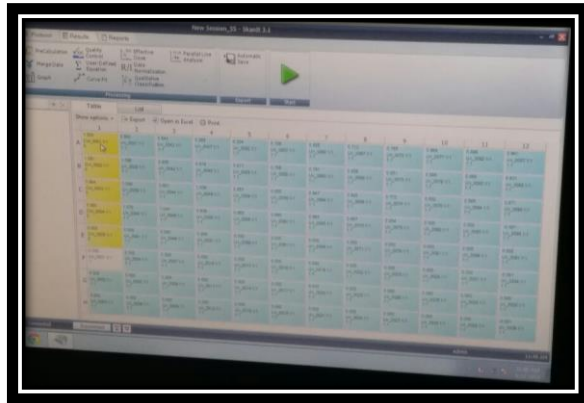
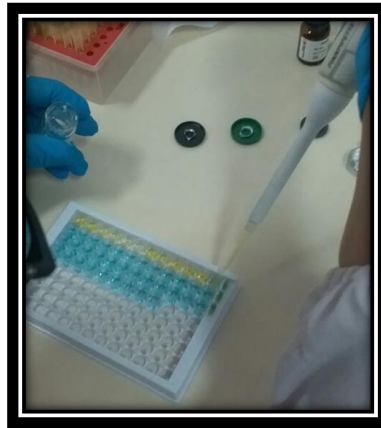
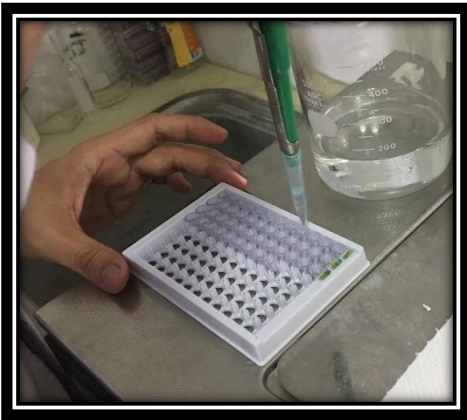


Odontoblast cell line : 80 % confluent

Prosedur perlakuan sel



Prosedur Uji kadar alkalin fosfatase
(Uji Elisa)



LAMPIRAN : Analisis Perbandingan antara Kelompok

Dependent Variable: Akalin Fosfatase

Bonferroni

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	SE	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Media	Ca	-99,48 [*]	21,04	,005	-181,08	-17,89
	Tx	-108,57 [*]	21,04	,002	-190,16	-26,98
	Ca+Tx	-93,91 [*]	21,04	,011	-175,51	-12,32
	Ca+Tx+Ex 25	-29,30	21,04	1,000	-110,89	52,30
	Ca+Tx+Ex 50	-39,96	21,04	1,000	-121,56	41,63
	Ca+Tx+Ex100	-103,85 [*]	21,04	,003	-185,45	-22,26
	Tx+Ex 25	-90,63 [*]	21,04	,016	-172,22	-9,04
	Tx+Ex 50	-76,47	21,04	,094	-158,06	5,12
	Tx+Ex 100	-70,54	21,04	,192	-152,14	11,05
Ca	Media	99,48 [*]	21,04	,005	17,89	181,08
	Tx	-9,09	21,04	1,000	-90,687	72,51
	Ca+Tx	5,57	21,04	1,000	-76,02	87,16
	Ca+Tx+Ex 25	70,19	21,04	,200	-11,41	151,78
	Ca+Tx+Ex 50	59,52	21,04	,692	-22,07	141,11
	Ca+Tx+Ex100	-4,37	21,04	1,000	-85,96	77,22
	Tx+Ex 25	8,85	21,04	1,000	-72,74	90,45
	Tx+Ex 50	23,01	21,04	1,000	-58,58	104,61
	Tx+Ex 100	28,94	21,04	1,000	-52,65	110,53
Tx	Media	108,57	21,04	,002	26,98	190,16
	Ca	9,09	21,04	1,000	-72,51	90,68
	Ca+Tx	14,66	21,04	1,000	-66,94	96,25
	Ca+Tx+Ex25	79,27	21,04	,067	-2,32	160,87
	Ca+Tx+Ex50	68,61	21,04	,241	-12,99	150,20
	Ca+Tx+Ex100	4,72	21,04	1,000	-76,88	86,31
	Ex25	39,69	21,04	1,000	-41,90	121,29
	Ex50	61,85	21,04	,530	-19,74	143,45
	Ex100	43,27	21,04	1,000	-38,32	124,87
Ca+Tx	Media	93,91 [*]	21,04	,011	12,32	175,51
	Ca	-5,57	21,04	1,000	-87,16	76,02
	Tx	-14,66	21,04	1,000	-96,25	66,94
	Ca+Tx	-9,94	21,04	1,000	-91,53	71,65
	Ca+Tx+Ex 25	64,62	21,04	,386	-16,98	146,21
	Ca+Tx+Ex 50	53,95	21,04	1,000	-27,64	135,54
	Tx+Ex 25	3,28	21,04	1,000	-78,31	84,88
	Tx+Ex 50	17,44	21,04	1,000	-64,15	99,04
	Tx+Ex 100	23,37	21,04	1,000	-58,22	104,96
Ca+Tx+Ex 25	Media	29,30	21,04	1,000	-52,30	110,89
	Ca	-70,19	21,04	,200	-151,78	11,41
	Tx	-79,27	21,04	,067	-160,87	2,32
	Ca+Tx	-64,62	21,04	,386	-146,21	16,98
	Ca+Tx+Ex 50	-10,67	21,04	1,000	-92,26	70,93
	Ca+Tx+Ex100	-74,56	21,04	,118	-156,15	7,04
	Tx+Ex 25	-61,33	21,04	,563	-142,93	20,26
	Tx+Ex 50	-47,17	21,04	1,000	-128,77	34,42
	Tx+Ex 100	-41,25	21,04	1,000	-122,84	40,35
Ca+Tx+Ex 50	Media	39,96	21,04	1,000	-41,63	121,56
	Ca	-59,52	21,04	,692	-141,11	22,07
	Tx	-68,61	21,04	,241	-150,20	12,99

	Ca+Tx	-53,95	21,04	1,000	-135,54	27,64
	Ca+Tx+Ex 25	10,67	21,04	1,000	-70,93	92,26
	Ca+Tx+Ex100	-63,89	21,04	,419	-145,48	17,70
	Tx+Ex 25	-50,67	21,04	1,000	-132,26	30,93
	Tx+Ex 50	-36,51	21,04	1,000	-118,10	45,09
	Tx+Ex 100	-30,58	21,04	1,000	-112,17	51,01
Ca+Tx+Ex100	Media	103,85	21,04	,003	22,26	185,45
	Ca	4,37	21,04	1,000	-77,22	85,96
	Tx	-4,72	21,04	1,000	-86,31	76,88
	Ca+Tx+Ex 25	74,56	21,04	,118	-7,04	156,15
	Ca+Tx+Ex 50	63,89	21,04	,419	-17,70	145,48
	Ca+Tx+Ex 100	9,94	21,04	1,000	-71,65	91,53
	Tx+Ex 25	13,22	21,04	1,000	-68,37	94,82
	Tx+Ex 50	27,38	21,04	1,000	-54,21	108,98
	Tx+Ex 100	33,31	21,04	1,000	-48,28	114,90
Ex 25	Media	68,88	21,04	,234	-12,72	150,47
	Ca	-30,61	21,04	1,000	-112,20	50,99
	Tx	-39,69	21,04	1,000	-121,29	41,90
	Ca+Tx	-25,04	21,04	1,000	-106,63	56,56
	Ca+Tx+Ex 25	39,58	21,04	1,000	-42,01	121,07
	Ca+Tx+Ex 50	28,91	21,04	1,000	-52,68	110,51
	Ca+Tx+Ex100	-34,98	21,04	1,000	-116,57	46,62
	Ex 50	22,16	21,04	1,000	-59,43	103,75
	Ex 100	3,58	21,04	1,000	-78,01	85,17
Ex 50	Media	46,72	21,04	1,000	-34,88	128,31
	Ca	-55,77	21,04	1,000	-134,36	28,83
	Tx	-61,85	21,04	,530	-143,45	19,74
	Ca+Tx	-47,20	21,04	1,000	-128,79	34,40
	Ca+Tx+Ex 25	17,42	21,04	1,000	-64,17	99,01
	Ca+Tx+Ex 50	6,75	21,04	1,000	-74,84	88,35
	Ca+Tx+Ex100	-57,14	21,04	,904	-138,73	24,46
	Ex 25	-22,16	21,04	1,000	-103,75	59,43
	Ex 100	-18,58	21,04	1,000	-100,17	63,01
Ex 100	Media	65,30	21,04	,356	-16,30	146,89
	Ca	-34,19	21,04	1,000	-115,78	47,41
	Tx	-43,27	21,04	1,000	-124,87	38,32
	Ca+Tx	-28,62	21,04	1,000	-110,21	52,98
	Ca+Tx+Ex 25	36,00	21,04	1,000	-45,59	117,59
	Ca+Tx+Ex 50	25,33	21,04	1,000	-56,26	106,93
	Ca+Tx+Ex100	-38,56	21,04	1,000	-120,15	43,04
	Ex 25	-3,58	21,04	1,000	-85,17	78,01
	Ex 50	18,58	21,04	1,000	-63,01	100,17

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.