

**DINAMIKA EKSPRESI NEUTROFIL, TNF- α DAN IL-4 PULPA GIGI TIKUS
SETELAH APLIKASI EKSTRAK TERIPANG EMAS (*Stichopus hermanii*)
DAN KALSIMUM HIDROKSIDA**

**DYNAMICS OF NEUTROFIL, TNF- α AND IL-4 EXPRESSION OF RAT
DENTAL PULP AFTER APPLICATION OF GOLDEN SEA CUCUMBER
(*Stichopus hermanii*) EXTRACT AND CALCIUM HYDROXIDE**



**DWI PUJI LESTARI
J025211001**



**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER GIGI SPESIALIS
PROGRAM STUDI KONSERVASI GIGI
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**DINAMIKA EKSPRESI NEUTROFIL, TNF- α DAN IL-4 PULPA GIGI TIKUS
SETELAH APLIKASI EKSTRAK TERIPANG EMAS (*Stichopus hermanii*)
DAN KALSIMUM HIDROKSIDA**

**DWI PUJI LESTARI
J025211001**



**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER GIGI SPESIALIS
PROGRAM STUDI KONSERVASI GIGI
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**DYNAMICS OF NEUTROFIL, TNF- α AND IL-4 EXPRESSION OF RAT
DENTAL PULP AFTER APPLICATION OF GOLDEN SEA CUCUMBER
EXTRACT AND CALCIUM HYDROXIDE**

**DWI PUJI LESTARI
J025211001**



**CONSERVATIVE DENTISTRY SPECIALIST PROGRAM
FACULTY OF DENTISTRY
HASANUDDIN UNIVERSITY
MAKASSAR
2024**

**DINAMIKA EKSPRESI NEUTROFIL, TNF- α DAN IL-4 PULPA GIGI TIKUS
SETELAH APLIKASI EKSTRAK TERIPANG EMAS (*Stichopus hermannii*)
DAN KALSIUM HIDROKSIDA**

Tesis

sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar spesialis

Program Studi Pendidikan Dokter Gigi Spesialis Konservasi Gigi

Disusun dan diajukan oleh

DWI PUJI LESTARI
J025211001

kepada

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER GIGI SPESIALIS
PROGRAM STUDI KONSERVASI GIGI
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

TESIS

**DINAMIKA EKSPRESI NEUTROFIL, TNF- α DAN IL-4 PULPA GIGI TIKUS
SETELAH APLIKASI EKSTRAK TERIPANG EMAS (*Stichopus hermanii*)
DAN KALSIUM HIDROKSIDA**

DWI PUJI LESTARI

J025211001

telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Tesis Program Pendidikan
Dokter Gigi Spesialis Konservasi Gigi pada 3 Juni 2024 dan dinyatakan
telah memenuhi syarat kelulusan

pada

Program Studi Pendidikan Dokter Gigi Spesialis Konservasi Gigi
Departemen Konservasi Gigi
Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Hasanuddin
Makassar

Mengesahkan:

Pembimbing Utama,

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

Pembimbing Pendamping,

drg. Noor Hikmah, M.KG, Sp.KG, Subsp.KE(K)
NIP. 19830917 202204 4 001

Ketua Program Studi
PPDGS Konservasi Gigi,

drg. Nurhayaty Natsir, Ph.D, Sp.KG, Subsp.KR(K)
NIP. 19640518 199103 2 001

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Hasanuddin,

drg. Irfan Sugianto, M. Med. Ed., Ph.D
NIP. 19810215 200801 1 009

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, tesis berjudul "Dinamika Ekspresi Neutrofil, TNF- α dan IL-4 Pulpa Gigi Tikus setelah Aplikasi Ekstrak Teripang Emas (*Stichopus hermannii*) dan Kalsium Hidroksida" adalah benar karya saya dengan arahan dari tim pembimbing (Dr.drg. Juni Jekti Nugroho, Sp. KG, Subsp. KE(K) sebagai Pembimbing Utama dan drg. Noor Himah, M.KG, Sp. KG, Subsp. KE(K) sebagai Pembimbing Pendamping). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka tesis ini. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa tesis ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 15 Juni 2024



SEPULUH RIBU RUPIAH
10000
THE
METERAI
TEMPEL
23D23ALX250369875

Dwi Puji Lestari
NIM J025211001

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT karena hanya dengan berkat, kekuatan dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis ini dengan judul “Dinamika Ekspresi Neutrofil, TNF- α dan IL-4 Pulpa Gigi Tikus setelah Aplikasi Ekstrak Teripang Emas (*Stichopus hermannii*) dan Kalsium Hidroksida”.

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

1. **drg. Irfan Sugianto, M.Med.Ed, Ph.D** sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hasanuddin beserta seluruh pimpinan fakultas atas kesempatan yang diberikan untuk mengikuti Pendidikan Dokter Gigi Spesialis Konservasi Gigi Universitas Hasanuddin Makassar.
2. **drg. Nurhayaty Natsir, Ph. D, Sp. KG, Subsp. KR (K)** sebagai Ketua Program Studi Konservasi Gigi sekaligus penguji yang telah bersedia memberikan bimbingan, saran dan koreksi terhadap hasil penelitian ini.
3. **Dr. drg. Juni Jekti Nugroho, Sp.KG, Subsp. KE (K)** sebagai Pembimbing I yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan tenaga dalam memberikan arahan, masukan serta dukungan untuk menyelesaikan penelitian ini.
4. **drg. Noor Hikmah, M.KG., Sp. KG, Subsp. KE (K)** sebagai Pembimbing II yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan tenaga dalam memberikan arahan, masukan serta dukungan untuk menyelesaikan penelitian ini.
5. **Dr. drg. Aries Chandra Trilaksana, Sp. KG, Subsp. KE (K)** sebagai penguji yang telah bersedia memberikan bimbingan, saran dan koreksi terhadap hasil penelitian ini.
6. **Prof. drg. Rasmidar Samad, MS** sebagai penguji eksternal yang telah bersedia memberikan bimbingan, saran dan koreksi terhadap penelitian ini.
7. **drg. Wahyuni Suci Dwiandhany, Ph.D, Sp. KG, Subsp. KR (K), drg. Christine Anastasia Rovani, Sp.KG, Subsp. KR (K), drg. Afniati Rachmuddin, Sp.KG, Dr. drg. Maria Tanumihardja, M.DSC, Dr. drg. Hafsah Katu, M. Kes, dan Prof. Dr. drg. Ardo Sabir, M.Kes** sebagai dosen yang telah memberikan ilmu, bimbingan, dan masukan selama Pendidikan Dokter Gigi Spesialis Konservasi Gigi.
8. Seluruh staf Rumah Sakit Hewan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, yang telah membantu dalam pemeliharaan hewan coba.
9. Seluruh staf Laboratorium Politeknik Ujung Pandang, yang telah membantu dalam proses pembuatan ekstrak teripang emas (*Stichopus hermannii*).
10. Teman-teman residen konservasi gigi dan sahabat terkhusus angkatan 13, yaitu A. Ghina Zakiyah NZ, Rosida Indriyatmi, Theresia PL. Hurint, Irfan Fauzy Yamin, Sulastri, dan Jade Maruti Lolong. Terima kasih atas kebersamaan, kekompakan, dan suka duka yang telah dilalui bersama.

11. Teman-teman sejawat dan sahabat sejak S1 Angkatan 2004 (drg. Athirah Nanda Haerany, drg.Marini Arisandi, drg. Rosdiana Agustin, Sp.KGA, drg.Nina Permatasari, Sp.Pros, drg. Sri Widyastuty, drg. Yanti Kusumawati) yang telah senantiasa memberikan doa dan dukungan moril kepada penulis selama menjalani proses pendidikan.
12. Teman-teman residen konservasi gigi angkatan 10 (2019), angkatan 11 (2020.1), angkatan 12 (2020.2), angkatan 14 (2021.2), angkatan 15 (2022.1), angkatan 16 (2022.2), angkatan 17 (2023.1), dan angkatan 18 (2023.2).
13. Terkhusus kepada:
 - a. Ayah dan ibu tercinta, **dr.H.Asrori Asnawi, MPH** dan **Hj. Suarni Dohang, SKM, M.Kes**, serta saudara saya **dr. Kartika Handayani, Sp.An.Ti** yang telah memberikan dukungan doa dan moril selama penulis menjalani proses pendidikan. Ayah dan ibu mertua tercinta, **Drs.H. Ady Razak (Alm)** dan **Dra.Hj. Endang Sri Supatmi, MM (Almh)** yang semasa hidup tiada henti mendoakan anak-anaknya.
 - b. Suami tercinta, **Fandi Kurniawan, SE, MM**, anak-anak tersayang **Muhammad Alfatih, Muhammad Thaqif** dan **Muhammad Faruq** atas segala dukungan doa dan moril yang tiada henti kepada penulis selama menjalani proses pendidikan.

Akhir kata, dengan penuh kesadaran dan kerendahan hati penulis mengucapkan terima kasih yang setulus-tulusnya serta penghargaan kepada semua pihak yang telah berperan dalam penyusunan tesis ini yang tidak sempat penulis sebutkan satu persatu dan semoga Allah SWT selalu melimpahkan rahmat, kasih dan karunia-Nya kepada kita semua dan berkenan menjadikan tesis ini bermanfaat.

Makassar, Juni 2024

Dwi Puji Lestari

ABSTRAK

DWI PUJI LESTARI. **Dinamika Ekspresi Neutrofil, TNF- α Dan IL-4 Pulpa Gigi Tikus setelah Aplikasi Ekstrak Teripang Emas (*Stichopus hermannii*) Dan Kalsium Hidroksida** (dibimbing oleh Juni Jekti Nugroho dan Noor Hikmah).

Latar Belakang: Respon inflamasi pulpa terhadap iritan melibatkan aktivasi imun dan pelepasan mediator inflamasi dalam upaya menetralkan invasi mikroorganisme. Neutrofil merupakan sel imun pertama yang bermigrasi ke lokasi yang terinfeksi dan memfagosit iritan, diikuti dengan migrasi makrofag. Makrofag yang teraktivasi melepaskan sitokin *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) dan Interleukin-4 (IL-4) yang berperan sebagai modulator fase inflamasi dalam proses penyembuhan pulpa yang bersifat reversibel. Kalsium hidroksida (KH) masih menjadi *gold standard* pada perawatan *pulp capping*, namun penggunaannya juga berpotensi menyebabkan terjadinya nekrosis pulpa. Oleh sebab itu, dikembangkan kombinasi KH dengan bahan alternatif bioaktif dari teripang emas (*Stichopus hermannii*) yang memiliki efek antiinflamasi dan membantu percepatan regenerasi sel. **Tujuan:** Penelitian ini mengevaluasi dinamika ekspresi sel neutrofil, TNF- α dan IL-4 setelah aplikasi kombinasi ekstrak teripang emas (ETE) dan KH. **Metode:** Penelitian eksperimental laboratoris dengan *post-test only control group design*. Sampel gigi seri tikus sebanyak 24 dibagi 4 kelompok, yaitu kontrol positif (KH 100%), perlakuan 1 (ETE 25%, KH 75%), perlakuan 2 (ETE 50%, KH 50%), dan perlakuan 3 (ETE 75%, KH 35%). Induksi injuri pulpa dilakukan pada sampel kemudian diaplikasikan bahan uji dan dilakukan pengamatan pada hari ke-1, 3 dan 5. Analisis statistik menggunakan uji ANOVA dan *Post Hoc LSD*. **Hasil:** Terjadi penurunan ekspresi neutrofil dan TNF- α serta peningkatan IL-4 pada hari ke-3 dan ke-5 secara signifikan. **Kesimpulan:** Aplikasi kombinasi ETE 50% dan KH 50% pada pengamatan hari ke-3 terbukti efektif menurunkan jumlah neutrofil dan TNF- α , serta meningkatkan IL-4 dibandingkan kalsium hidroksida tunggal.

Kata Kunci: ekstrak teripang emas (*Stichopus hermannii*), kalsium hidroksida, neutrofil, tnf- α , il-4

ABSTRACT

DWI PUJI LESTARI. **Dynamics of Neutrophil, TNF- α and IL-4 Expression of Rat Dental Pulp After Application of Golden Sea Cucumber (*Stichopus hermanii*) Extract And Calcium Hydroxide** (supervised by Juni Jekti Nugroho dan Noor Hikmah).

Background: The pulp inflammatory response to irritants involves immune activation and the release of inflammatory mediators in an effort to neutralize the invasion of microorganisms. Neutrophils are the first immune cells to migrate into infected locations and phagocytose irritants, followed by macrophage migration. Activated macrophages release the cytokines tumor necrosis factor- α (TNF- α) and Interleukin-4 (IL-4) which act as modulators of the inflammatory phase in the reversible pulp healing process. Calcium hydroxide (KH) is still the gold standard in pulp capping treatment, but its use also has the potential to cause pulp necrosis. Therefore, a combination of KH was developed with alternative bioactive ingredients from golden sea cucumbers (*Stichopus hermanii*) which have anti-inflammatory effects and help accelerate cell regeneration. **Objective:** This study evaluated the dynamics of neutrophil, TNF- α and IL-4 expression after application the combined of golden sea cucumber extract (ETE) and KH. **Method:** Laboratory experimental research with post-test only control group design. Samples of 24 rat incisor teeth were divided into 4 groups, namely positive control (KH 100%), treatment 1 (ETE 25%, KH 75%), treatment 2 (ETE 50%, KH 50%), and treatment 3 (ETE 75% , KH 35%). Induction of pulp injury was carried out on the samples, then the test material was applied and observations were made on days 1, 3 and 5. Statistical analysis used ANOVA and Post Hoc LSD tests. **Results:** There was a decrease in the expression of neutrophils and TNF- α and an increase in IL-4 on the 3rd day and 5th significantly. **Conclusion:** The combination application of ETE 50% and KH 50% on day 3 of observation was proven to be effective in reducing the number of neutrophils and TNF- α , as well as increasing IL-4 compared to calcium hydroxide alone.

Keyword: golden sea cucumber extract (*Stichopus hermanii*), calcium hydroxide, neutrophil, TNF- α , IL-4

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
PERNYATAAN PENGAJUAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
ABSTRAK	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
DAFTAR SINGKATAN.....	xv
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	2
1.3 Tujuan dan Manfaat	2
1.4 Neutrofil	3
1.5 <i>Tumor necrosis factor- α</i> (TNF- α)	4
1.6 Interleukin-4 (IL-4)	5
1.7 Teripang Emas	6
1.8 Hewan Percobaan	9
1.9 Kerangka Teori	11
1.10 Kerangka Konsep	12
1.11 Hipotesis Penelitian	13
BAB II. METODE PENELITIAN	14
2.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	14
2.2 Waktu dan Tempat Penelitian	14
2.3 Variabel dan Definisi Operasional	14
2.4 Sampel Penelitian	15
2.5 Parameter Penelitian	15
2.6 Perhitungan Besar Sampel	16
2.7 Alat dan Bahan	17
2.8 Prosedur Penelitian	17
BAB III. HASIL DAN PEMBAHASAN	21
3.1 Hasil	21
3.2 Pembahasan	40
BAB IV. KESIMPULAN DAN SARAN	44
4.1 Kesimpulan	44
4.2 Saran	44

DAFTAR PUSTAKA.....	45
LAMPIRAN.....	52

DAFTAR TABEL

Nomor urut		Halaman
Tabel 1.	Perbandingan rerata ekspresi neutrofil ($\mu\text{g/mL}$) antara kelompok perlakuan berdasarkan hari pengamatan.....	32
Tabel 2.	Perbandingan rerata ekspresi TNF- α ($\mu\text{g/mL}$) antara kelompok perlakuan berdasarkan hari pengamatan.....	32
Tabel 3.	Perbandingan rerata ekspresi IL-4 ($\mu\text{g/mL}$) antara kelompok perlakuan berdasarkan hari pengamatan.....	33
Tabel 4.	Perbandingan ekspresi neutrofil ($\mu\text{g/mL}$) antar dua kelompok berdasarkan hari pengamatan (<i>p-value</i>).....	35
Tabel 5.	Perbandingan ekspresi TNF- α ($\mu\text{g/mL}$) antar dua kelompok berdasarkan hari pengamatan (<i>p-value</i>).....	36
Tabel 6.	Perbandingan rerata ekspresi IL-4 ($\mu\text{g/mL}$) antar dua kelompok berdasarkan hari pengamatan.....	37
Tabel 7.	Dinamika rasio ekspresi TNF- α /IL-4 antara kelompok perlakuan berdasarkan hari pengamatan	38

DAFTAR GAMBAR

Nomor urut		Halaman
GAMBAR 1.	Teripang emas (<i>Stichopus hermanii</i>)	7
GAMBAR 2.	Tikus galur wistar (<i>Rattus norvegicus</i>)	10
GAMBAR 3.	Kerangka teori	11
GAMBAR 4.	Kerangka konsep	12
GAMBAR 5.	Ekspresi neutrofil dengan pewarnaan HE pada hari ke-1...	22
GAMBAR 6.	Ekspresi neutrofil dengan pewarnaan HE pada hari ke-3...	23
GAMBAR 7.	Ekspresi neutrofil dengan pewarnaan HE pada hari ke-5...	24
GAMBAR 8.	Ekspresi TNF- α dengan pemeriksaan imunohistokimia pada hari-1.....	25
GAMBAR 9.	Ekspresi TNF- α dengan pemeriksaan imunohistokimia pada hari-3.....	26
GAMBAR 10.	Ekspresi TNF- α dengan pemeriksaan imunohistokimia pada hari-5.....	27
GAMBAR 11.	Ekspresi IL-4 dengan pemeriksaan imunohistokimia pada hari-1	28
GAMBAR 12.	Ekspresi IL-4 dengan pemeriksaan imunohistokimia pada hari-3	29
GAMBAR 13.	Ekspresi IL-4 dengan pemeriksaan imunohistokimia pada hari-5	30
GAMBAR 14.	Diagram ekspresi neutrofil berdasarkan waktu pengamatan setiap kelompok perlakuan.....	38
GAMBAR 15.	Diagram ekspresi TNF- α berdasarkan waktu pengamatan setiap kelompok perlakuan	39
GAMBAR 16.	Diagram ekspresi IL-4 berdasarkan waktu pengamatan setiap kelompok perlakuan	40

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor urut	Halaman
1. Surat rekomendasi persetujuan komite etik penelitian	19
2. Surat izin penelitian	20
3. Hasil analisis uji statistik menggunakan SPSS 26 <i>for Windows</i>	29
4. Dokumentasi Penelitian.....	31

DAFTAR SINGKATAN

Lambang/singkatan	Arti dan Penjelasan
AAE	<i>American Asssociation of Endodontic</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-α</i>
IL	<i>Interleukin</i>
EDTA	<i>Ethylene Diamin Tetraacetic Acid</i>
K	Kontrol
LSD	Least Signifinance Different
ml	milliliter
mm	milimeter
N	Newton
NaCl	Natrium Klorida
NaOCl	Natrium Hipoklorit
P1	Perlakuan Satu
P2	Perlakuan Dua
P3	Perlakuan Tiga
SPSS	Statistical Package for the Social
UTM	Sciences <i>Universal Texting Machine</i>
NF- κ β	<i>Nuclear factor-kappa beta</i>
PMN	<i>Polimorfonuklear</i>
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
IL-1 RA	<i>Interleukin receptor antagonist</i>
OPG	<i>Osteoprotegeri</i>
IgE	<i>Imunoglobulin E</i>
Th	<i>T Helper</i>
AAM	Aktivasi alternatif makrofag
IFN- γ	Interferon γ
MCP-3	<i>Monocyte Chemotactic Protein-3</i>
NO	<i>Nitric Oxide</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
COX- 2	<i>Siklooksigenase 2</i>
GAGs	<i>Sulphated Glikosaminoglikan</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
EPA	<i>Eicosapentaenoic acid</i>
DHA	<i>Docosaheksaenoic acid</i>
MCP-1	<i>Monosit Chemoattractan Protein</i>
ROS	Reaktif Oxygen Species
Ca(OH) ₂	Kalsium Hidroksida
HE	<i>Haematoxylin Eosin</i>

FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
ECM	Matriks Ekstraseluler

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Inflamasi pulpa merupakan keadaan pulpa yang mengalami inflamasi akibat iritasi mekanik, kimiawi, bakteri dan termal. Inflamasi ditandai dengan adanya respon kompleks tubuh terhadap cedera atau infeksi, yang melibatkan aktivasi sistem imun dan pelepasan mediator inflamasi. Pulpa memiliki fungsi defensif, yaitu mampu merespon inflamasi dan imunologis dalam upaya menetralkan atau menghambat invasi mikroorganisme atau iritan dan memperbaiki jaringan yang rusak (Walton and Torabinejad, 2008).

Menurut *American Association of Endodontic (AAE)*, inflamasi pulpa yang bersifat reversibel dapat dipulihkan kembali dengan penatalaksanaan yang tepat dengan menghilangkan iritan penyebab terjadinya inflamasi sesuai etiologinya. Salah satu penanganannya adalah ekskavasi jaringan yang terinfeksi, yang dapat menyebabkan trauma mekanik seperti kesalahan iatrogenik. Perforasi pulpa karena kesalahan iatrogenik terjadi sekitar 2-12% pada gigi yang menerima perawatan endodontik. Adanya respon singkat terhadap cedera fisik, infeksi atau iritasi menandakan fase inflamasi akut. Neutrofil merupakan sel imun pertama yang bermigrasi ke lokasi yang terinfeksi, tetapi tidak berumur panjang (24-48 jam). Neutrofil akan memfagositosis iritan dan jaringan yang rusak, lalu akan mengalami apoptosis atau lisis (Ismiyatin *et al.*, 2020). Jaringan rusak yang tidak mengalami fagositosis oleh neutrofil, akan difagosit oleh sel makrofag yang berperan sebagai pertahanan tubuh ke dua (Fatimatuzzahro *et al.*, 2013).

Selama proses fagositosis, makrofag yang teraktivasi akan memproduksi dan melepaskan berbagai sitokin proinflamasi seperti interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) dan *tumor necrosis factor- α* (TNF- α). *Tumor necrosis factor- α* (TNF- α) merupakan sitokin proinflamasi yang meningkatkan permeabilitas pembuluh darah, pelepasan sitokin lainnya dan memicu respon imun, hal ini merangsang ekspresi molekul adhesi pada sel endotel, kemudian menghasilkan *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1) yang mengakibatkan monosit keluar dari pembuluh darah dan masuk ke area yang terinfeksi. Proses infiltrasi monosit ini berjumlah paling banyak pada hari ke-5. Hal ini dikarenakan setelah monosit melakukan migrasi menuju jaringan, dibutuhkan jeda waktu 48 - 72 jam untuk melakukan diferensiasi di daerah inflamasi (Fatimatuzzahro *et al.*, 2013; McComb *et al.*, 2013).

Tumor necrosis factor- α (TNF- α) yang diproduksi dan dilepaskan oleh makrofag, berperan penting dalam merespon infeksi, membantu mengontrol inflamasi dan memicu respon imun yang tepat. Namun, jika terjadi disfungsi dari TNF- α akan menyebabkan inflamasi yang berlebihan dan berkontribusi pada penyakit inflamasi kronis atau autoimun (McComb *et al.*, 2013).

Makrofag yang teraktivasi, sel-B dan sel-T tidak hanya melepaskan sitokin proinflamasi, tetapi juga berperan untuk melepaskan sitokin antiinflamasi seperti

interleukin-4 (IL-4) yang bertindak sebagai modulator pada fase inflamasi (Kritikou *et al.*, 2021).

Interleukin-4 (IL-4) diidentifikasi sebagai sitokin yang diproduksi oleh sel-T dan dapat meningkatkan proliferasi sel-B. Sebagian besar jenis sel mampu merespon IL-4 seperti makrofag yang kemudian akan diaktivasi melalui jalur lain dan berubah menjadi fenotipe M2 antiinflamasi sebagai respon terhadap IL-4. Makrofag M2 yang bersifat modulator imun ini berperan pada penyembuhan luka, pembersihan debris dan respon antiinflamasi lainnya (Luzina *et al.*, 2012; Kaeppler *et al.*, 2021).

Inflamasi pulpa yang bersifat reversibel dapat dipulihkan kembali dengan penggunaan *capping agent* untuk membantu proses penyembuhan pulpa, salah satu bahan yang populer digunakan adalah kalsium hidroksida (Hargreaves *et al.*, 2012; Daniele 2017). Bahan ini merupakan pilihan yang sangat baik digunakan untuk melindungi dan memperbaiki jaringan pulpa yang terinfeksi atau teriritasi (Estrella and Holland 2003).

Kalsium hidroksida memiliki nilai pH alkali dan bersifat bakterisidal, sehingga bahan ini dapat menetralkan pH rendah pada lesi karies. Kalsium hidroksida dapat mempromosikan diferensiasi odontoblas atau *odontoblast-like cells*, yang membentuk jembatan jaringan keras pada daerah pulpa yang terekspos dan merangsang penyembuhan jaringan (Estrella and Holland 2003; Torabinejad, 2014).

Saat ini kalsium hidroksida perlahan ditinggalkan karena terdapat beberapa kekurangan, yaitu merupakan basa kuat, dapat bersifat kaustik dan dapat menyebabkan nekrosis koagulasi superfisial pada jaringan pulpa, pembentukan *tunnel* pada *dentinal bridge* sehingga pulpa masih ada kemungkinan terbuka, mudah larut dan memiliki ikatan yang sangat rendah terhadap dentin, serta degradasi setelah pengaplikasian etsa asam (Hanafi *et al.*, 2021; Poggio *et al.*, 2015). Oleh karena itu, dibutuhkan alternatif bahan berasal dari alam yang berpotensi dapat dikombinasikan dengan kalsium hidroksida dengan tujuan meningkatkan efisiensinya sebagai bahan *capping agent*. Salah satu bahan alternatif yang dapat digunakan adalah senyawa bioaktif yang terdapat pada bahan alam, seperti teripang emas (*Stichopus hermanii*).

Teripang emas (*Stichopus hermanii*) dikenal sebagai organisme laut yang bermanfaat sebagai obat antivirus, antimikroba, antiinflamasi, antioksidan dan membantu mempercepat regenerasi sel, dengan kandungan senyawa bioaktif seperti kalsium, saponin, flavonoid, glikosaminoglikan, polisakarida dan peptida, yang diyakini memiliki efek mengurangi inflamasi dan mempercepat penyembuhan jaringan (Wijaya *et al.*, 2015; Yudo *et al.*, 2022).

Teripang emas (*Stichopus hermanii*) kaya akan *growth factor* sehingga dapat memperbaiki sel-sel yang rusak. Kandungan proteinnya mencapai 82% dari seluruh komponen teripang dan 80% bagian dari protein tersebut merupakan kolagen. Kandungan lain teripang emas adalah EPA (*eicosapentaenoic acid*), DHA (*docosaheksaenoic acid*), triterpenoid, saponin, dan glikosaminoglikan sulfat (GAGs) (Damaiyanti *et al.*, 2015; Burhan *et al.*, 2019). Berdasarkan penelitian oleh Castillo *et al.*, (2020), glikosaminoglikan dapat mengurangi tingkat protein proinflamasi seperti *nuclear factor-kappa beta* (NF- κ B), IL-6 dan TNF- α (Castillo *et al.*, 2020).

Berdasarkan penjelasan mengenai manfaat yang terkandung dalam teripang emas (*Stichopus hermanii*) yang memiliki efek antiinflamasi dan mempercepat penyembuhan jaringan, bahan ini berpotensi dijadikan sebagai bahan tambahan kalsium hidroksida untuk meningkatkan efektivitasnya sebagai *capping agent*. Sejauh ini, belum terdapat penelitian mengenai efektivitas kombinasi kedua bahan ini, sehingga menarik peneliti untuk menilai dinamika ekspresi neutrofil, TNF- α dan IL-4 pulpa gigi tikus setelah aplikasi ekstrak teripang emas dan kalsium hidroksida.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah apakah aplikasi kombinasi ekstrak teripang emas (*Stichopus hermanii*) dan kalsium hidroksida efektif menurunkan ekspresi sel neutrofil dan TNF- α serta meningkatkan ekspresi IL-4?

1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian

1.3.1 Tujuan Penelitian

Tujuan Umum

Mengetahui perubahan dinamika ekspresi neutrofil, TNF- α dan IL-4 pulpa gigi tikus setelah aplikasi ekstrak teripang emas dan kalsium hidroksida.

Tujuan Khusus

1. Mengevaluasi ekspresi sel neutrofil, TNF- α , dan IL-4 setelah aplikasi kombinasi ekstrak teripang emas (*Stichopus hermanii*) 25% dan kalsium hidroksida 75% pada pulpa gigi tikus galur wistar yang terinflamasi.
2. Mengevaluasi ekspresi sel neutrofil, TNF- α , dan IL-4 setelah aplikasi kombinasi ekstrak teripang emas (*Stichopus hermanii*) 50% dan kalsium hidroksida 50% pada pulpa gigi tikus galur wistar yang terinflamasi.
3. Mengevaluasi ekspresi sel neutrofil, TNF- α , dan IL-4 setelah aplikasi kombinasi ekstrak teripang emas (*Stichopus hermanii*) 75% dan kalsium hidroksida 25% pada pulpa gigi tikus galur wistar yang terinflamasi.
4. Mengevaluasi dinamika rasio ekspresi TNF- α dan IL-4 setelah aplikasi kombinasi ekstrak teripang emas (*Stichopus hermanii*) dan kalsium hidroksida pada pulpa gigi tikus galur wistar yang terinflamasi.

1.3.2 Manfaat Penelitian

Manfaat Umum

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi pengetahuan mengenai ekspresi neutrofil, TNF- α dan IL-4 pulpa gigi tikus setelah aplikasi ekstrak teripang emas dan kalsium hidroksida.

Manfaat Khusus

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi pengetahuan bagi dokter gigi dan dokter gigi spesialis konservasi gigi pada khususnya mengenai efektivitas aplikasi kombinasi ekstrak teripang emas (*Stichopus*

hermanii) dan kalsium hidroksida terhadap proses inflamasi pada pulpa gigi tikus galur wistar yang terinflamasi.

1.4 Neutrofil

Neutrofil memiliki warna biru keunguan dengan inti sel yang bentuknya bervariasi dan terkadang menyerupai huruf “U”, serta memiliki sitoplasma berwarna pink muda (Caraka *et al.*, 2017). Neutrofil berdiameter sekitar 12-15 mikron. Neutrofil memiliki multi lobus yaitu 2-5 lobus/segmen, sehingga disebut juga sel polimorfonuklear (PMN) (Khamael, 2018).

Neutrofil merupakan sel fagosit sebagai pertahanan tubuh utama ketika *host* terserang infeksi maupun iritasi. Sel ini merupakan sel darah putih yang paling banyak di pembuluh darah, yaitu sekitar 60-70% (Nugraha, 2015). Neutrofil yang telah aktif dan bermigrasi dari pembuluh darah ke daerah terinfeksi akan bekerja dengan memfagosit substansi asing pada daerah terinfeksi (Abdurrahmat, 2014). Neutrofil yang telah melakukan fagosit akan mati (24-48 jam), beberapa saat kemudian akan muncul makrofag untuk fagositosis. Setelah agen fagosit hilang, maka jaringan akan kembali normal, tetapi jika inflamasi terus terjadi, neutrofil akan tetap berada di daerah terinfeksi yang menyebabkan transisi makrofag fenotip M1 proinflamasi menjadi makrofag fenotip M2 reparatif akan terhambat. Hal ini akan mengakibatkan perlambatan proses perbaikan jaringan oleh M2 reparatif (Ismiyatin *et al.*, 2020).

1.5 *Tumor necrosis factor- α* (TNF- α)

Invasi bakteri dan produknya pada pulpa akan merangsang sel-sel inflamasi seperti sel epitel, sel neutrofil, makrofag dan fibroblas untuk mensekresi mediator inflamasi dan enzim seperti interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) dan *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), *matrix metalloproteinase* (MMP) dalam jumlah besar yang akan mempengaruhi kondisi inflamasi (Achmad *et al.*, 2020).

Tumor necrosis factor- α (TNF- α) merupakan *master regulator* pada inflamasi pulpa yang berfungsi dalam mekanisme pertahanan *host*. *Tumor necrosis factor- α* juga merupakan salah satu sitokin yang disekresi oleh berbagai sel tubuh, diantaranya odontoblas, fibroblas, makrofag, monosit dan diaktifkan oleh sel mast, sel endotel, jaringan saraf dan sel limfosit seperti limfosit T dan B dan sel *natural killer* (NK). *Tumor necrosis factor- α* berperan pada aktivitas pensinyalan sel, menginduksi dilatasi pembuluh darah dengan meningkatkan permeabilitas, meningkatkan respon inflamasi, sebagai imunostimulasi, mendorong terjadinya nekrosis atau apoptosis sel (Fatimatuzzahro, 2014; Lestari, 2016; Silva, 2019).

Tumor necrosis factor- α memiliki peran ganda, pada kondisi infeksi ringan, TNF- α bekerja terhadap leukosit dan endotel, menginduksi inflamasi akut. Namun, pada infeksi berat dapat memicu pelepasan TNF- α yang berlebihan pada fase inflamasi dapat meningkatkan kerusakan jaringan, perkembangan nyeri, infiltrasi sel dan menimbulkan reaksi sistemik (Baratawidjaja and Rengganis, 2012). Sitokin yang dilepaskan dapat mempengaruhi perkembangan mikroorganisme baik dengan

mempromosikan pertumbuhan mereka atau menunjukkan aktivitas antimikroba (Parameswaran and Patial, 2010).

Peran TNF- α pada proses inflamasi menurut Abbas (2016), antara lain:

1. Dapat meningkatkan peran dari pro trombotik dan merangsang molekul adhesi dari sel leukosit serta menginduksi sel endotel.
2. Memiliki peran dalam mengatur aktivitas makrofag dan respon imun dalam jaringan dengan cara merangsang faktor pertumbuhan dan sitokin lain.
3. Merekrut sel imun neutrofil, monosit, limfosit darah ke lokasi infeksi.
4. Menjadi respon imun terhadap bakteri, virus, jamur, dan invasi parasit.

1.6 Interleukin-4 (IL-4)

Secara skematis sitokin dibagi menjadi kelompok-kelompok sitokin pro dan antiinflamasi, dimana perbedaan antara keduanya adalah sitokin proinflamasi yaitu sitokin yang merangsang respon imun seperti Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) dan TNF- α , sedangkan sitokin antiinflamasi merupakan sitokin yang menghambat respon imun seperti IL-1Ra (IL-1 *receptor antagonist*), Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-10 (IL-10), Interleukin-13 (IL-13) dan osteoprotegerin (OPG) (Darwin, 2006; Ansar and Ghosh, 2016).

Interleukin-4 (IL-4) merupakan sitokin yang diproduksi oleh beberapa bagian dari sel limfoid. Interleukin-4 bertindak sebagai sitokin pleotropik yang berperan pada berbagai sel efektor sistem imun. Peran utamanya mendorong diferensiasi sel T helper (Th) tipe 2, sekresi imunoglobulin E (IgE) dan rekrutmen eosinofil (Luzina *et al.*, 2012; Vargiolu *et al.*, 2010). Interleukin-4 ditemukan pada tahun 1982 sebagai faktor yang mampu menginduksi perkembangbiakan murine limfosit B. Struktur IL-4 juga didasarkan pada bundel empat heliks dan berisi tiga jembatan disulfida. Sel Th2 adalah sumber utama IL-4, namun tingkat sitokin yang lebih rendah mungkin juga disekresikan oleh sel lain, termasuk sel *natural killer* (NK), limfosit B, sel mast, makrofag, basofil dan eosinofil (Iwazko *et al.*, 2021, Gadani *et al.*, 2012).

Interleukin-4 merupakan sitokin yang disekresikan oleh sel Th2 yang berperan dalam regulasi sistem imun untuk menurunkan reaksi inflamasi yang dimediasi oleh sitokin Th1 (Guilherme *et al.*, 2013). Interleukin-4 juga berperan penting pada kelangsungan hidup leukosit, imunitas yang dimediasi oleh Th2, perbaikan jaringan dan homeostasis dengan menghambat aktivasi makrofag yang diinduksi oleh TNF- α dan IFN- γ . Oleh karena itu IL-4 memiliki efek yang berlawanan dengan TNF- α dan IFN- γ , sehingga proses inflamasi dapat dihambat (Sachin *et al.*, 2012). Maerten, *et al.* (2005) menganalisis bahwa pengaruh IL-4 mampu mencegah apoptosis dan menghambat proliferasi Th1 dan produksi TNF- α .

Efek sinyal IL-4 dimediasi melalui rangkaian alpha reseptor IL-4 (IL-4R α). Pada saat IL-4R α mengikat ligannya, maka dapat berikatan dengan rantai gamma (γ) yang menghasilkan *signaling complex* tipe-1 yang terletak pada sel hematopoietik menghasilkan *signaling complex* tipe-2, pada sel non-hematopoietik. *Signaling complex* tipe-1 sangat penting untuk kecenderungan sel T menjadi Th2 dan aktivasi alternatif makrofag (AAM), sementara *signaling complex* tipe-2 berperan dalam respon non-hematopoietik terhadap IL-4 (Sachin *et al.*, 2012).

Interleukin-4 diketahui berperan dalam menghambat aktivasi dan migrasi makrofag, serta menurunkan regulasi sintesis mediator proinflamasi seperti IL-1 β , TNF- α , IL-6 dan PGE-2 (Bastos *et al*, 2009). Sitokin ini juga terlibat dalam penghambatan kemokin proinflamasi, seperti IL-8, protein kemotaktik monosit-3 (MCP-3), protein yang diinduksi interferon (IFN)- γ . Interferon- γ mendorong ekspresi makrofag dan memblokir produksi IL-4. Respon imun ini berperan dalam melawan patogen yang bereplikasi, tetapi dengan adanya hambatan dari IL-4 terhadap fungsi IFN- γ , sehingga menimbulkan efek berlawanan sebagai bentuk regulasi yang membantu respon imun terkendali. Interleukin-4 juga menekan fungsi prostaglandin, metaloproteinase, oksigen reaktif dan zat antara nitrogen (Mak and Saunders., 2006; lwazko *et al*, 2021).

Saat ini diketahui bahwa IL-4 dan IL-13 mampu menginduksi program aktivasi makrofag alternatif. Berbeda dengan makrofag yang diaktifkan secara klasik (M1), yang berpartisipasi dalam respons terpolarisasi T helper tipe 1 (Th1) dan meningkatkan produksi sitokin proinflamasi, makrofag yang diaktifkan secara alternatif (M2) bersifat antiinflamasi melalui pelepasan IL-1ra dan IL-10 mengubah faktor pertumbuhan (TGF)- β dan meningkatkan penyembuhan luka dan perbaikan jaringan, pembersihan debris dan respon antiinflamasi lainnya (Woodward *et al.*, 2010; Kaeppler *et al.*, 2021). Sitokin turunan Th2 ini juga menghambat ekspresi gen proinflamasi, termasuk *nitric oxide* (NO) pada makrofag yang teraktivasi secara klasik, sehingga selanjutnya mendorong polarisasi menuju respon tipe II. (Hiroi *et al.*, 2013).

1.7 Teripang Emas

Indonesia merupakan negara penghasil teripang terbesar di dunia. Teripang (*Sea cucumber*) merupakan salah satu jenis spesies golongan invertebrata laut yang paling banyak. Teripang yang telah teridentifikasi lebih dari 1400 jenis (Damaiyanti, 2015). Teripang telah lama digunakan sebagai makanan dan obat tradisional di negara Asia, seperti *Thelenota ananas*, *Thelenota anax*, *Holothuria fuccogilva*, *Actinopyga mauritiana* dan *Stichopus hermanii* (Pangestuti and Arifin, 2018).

Teripang emas atau *Stichopus hermanii* merupakan salah satu teripang yang mudah ditemukan di Asia Tenggara, bagian barat Pasifik hingga perairan Indonesia barat (Hartati *et al.*, 2015). Teripang emas menjadi salah satu komoditas pesisir yang sedang berkembang (Purwanto *et al.*, 2019). Daerah penghasil utama teripang emas adalah perairan Sulawesi Tengah (1.140 ton), perairan pantai Nusa Tenggara Timur (433 ton), dan Sulawesi Selatan (327 ton) (Kustiariyah, 2007).

Klasifikasi teripang emas (*Stichopus hermanii*) (Damaiyanti, 2015):

Kingdom : *Animalia*
 Phylum : *Echinodermata*
 Class : *Holothuroidea*
 Ordo : *Aspidochirotida*
 Famili : *Stichopodidae*
 Genus : *Stichopus*
 Specific name : *Hermanii*
 Scientific name: *Stichopus hermanii*

Teripang emas termasuk dalam kelompok *Holothuroidea* dari filum *Echinodermata* yang merupakan hewan tidak bertulang belakang dan bertubuh lunak, berbentuk memanjang seperti mentimun (Sandana *et al.*, 2017). Dinding tubuhnya bersifat elastis, panjang dewasa untuk spesies terkecil 2.54 cm dan ukuran terpanjang sekitar 90 cm. Umumnya terdapat di perairan pantai dengan kedalaman mencapai 40 meter. Habitat teripang adalah ekosistem terumbu karang, sehingga teripang kaya akan berbagai macam protein dan mineral seperti kalsium dan fosfor yang penting bagi perkembangan tulang dan gigi (Sari and Hansen, 2019; Damaiyanti, 2015).



Gambar 1. Teripang emas (*Stichopus hermanii*) (Safitri *et al.*, 2019)

Teripang emas merupakan salah satu teripang yang dapat dikonsumsi dan memiliki nilai pengobatan tradisional (Yasin *et al.*, 2019). Teripang emas telah digunakan di China dan Malaysia sebagai obat tradisional dan telah dikenal sebagai tonik yang efektif untuk proses penyembuhan luka dan luka bakar (Arundina *et al.*, 2015).

Beberapa tahun terakhir, efek manfaat kesehatan teripang telah divalidasi melalui penelitian ilmiah, yang menunjukkan sebagai antikoagulan, antitumor, antimikroba, antiinflamasi, antioksidan, dan mempercepat penyembuhan luka (Pangestuti and Arifin, 2018). Teripang emas memiliki berbagai kandungan yang bermanfaat, diantaranya adalah kalsium (215mg/100g), fosfor (326mg/100g), asam amino esensial (14.76%), asam amino non-esensial (3.18%), glikoprotein (3.81%), kolagen (4.06%), glikosaminoglikan (3.18%), asam hyaluronat (0.14%), kondrotin sulfat (1.03%), heparin (0.86%), heparin sulfat 1.03%), proteoglikan (2.41%), EPA-

DHA (0.15%), flavonoid (0.04%), saponin (0.12%), triterpenoid (0.09%), dan *cell growth factor* (0,11%) (Sandana *et al.*, 2017).

Pada penelitian Yulianto (2013) menggunakan ekstrak teripang emas menunjukkan adanya peningkatan proliferasi fibroblas, hal ini dimungkinkan karena ekstrak teripang emas dapat merangsang PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*) dan TGF (*Transforming Growth Factor*) untuk berinteraksi dan merangsang FGF (*Fibroblas Growth Factor*) untuk merangsang proliferasi fibroblas sehingga penyembuhan luka terjadi lebih cepat (Damaiyanti, 2015).

Teripang emas memiliki beberapa kandungan bahan bioaktif yang berperan sebagai antiinflamasi dan terlibat dalam proses penyembuhan, diantaranya adalah:

1. Saponin dan Flavonoid

Saponin merupakan senyawa pada teripang emas yang berpotensi sebagai antimikroba dan antiinflamasi. Saponin dapat menurunkan aktivitas siklooksigenase-2 (COX-2) yang berperan dalam merangsang mediator inflamasi (Achmad *et al.*, 2020). Senyawa saponin akan merusak membran sitoplasma dan membunuh sel bakteri. Sedangkan mekanisme kerja senyawa flavonoid dengan mendenaturasi protein sel bakteri dan merusak membran sel tanpa dapat diperbaiki lagi, sehingga mencegah infeksi. Flavonoid juga memicu pembentukan kolagen, yaitu protein struktur yang berperan dalam proses penyembuhan luka, dan menghambat fase biosintesis prostaglandin (Damaiyanti, 2015; Robinson, 1995).

2. Glikosaminoglikan (GAGs)

Dinding tubuh teripang emas merupakan sumber kaya *sulphated glycosaminoglycan* (GAGs) (Masre *et al.*, 2012). *Sulphated glycosaminoglycan* yang bersumber dari kondroitin sulfat, dapat meningkatkan jumlah total kalsium dan absorpsi kalsium, yang meningkatkan kemampuan jaringan yang rusak untuk mengalami regenerasi (Shahrulazua *et al.*, 2013).

Glikosaminoglikan bergabung dengan unsur-unsur pembentuk struktur jaringan seperti tulang, elastin, dan kolagen. Kemampuannya menahan air dalam jumlah besar dan mengisi ruang dapat menjadi bantalan atau pelumas. Contoh glikosaminoglikan adalah asam hialuronat, kondroitin sulfat, dan heparin. *Fibroblast growth factor* (FGF) merupakan *growth factor* yang terikat pada glikosaminoglikan. *Fibroblast growth factor* merupakan suatu faktor angiogenik yang kuat, menyebabkan migrasi sel epitel yang makin banyak, dan mempercepat penyembuhan luka (Sirko *et al.*, 2007).

Glikosaminoglikan (GAGs) menyusun tiga tipe komponen pada matriks ekstraseluler (ECM), disamping protein struktural fibrous dan protein adesi sel. Glikosaminoglikan berikatan dengan protein inti, dan membentuk molekul yang disebut proteoglikan. Proteoglikan awalnya didefinisikan sebagai substansi dasar atau mukopolisakarida, dimana fungsinya untuk mengorganisasi ECM, namun sekarang molekul ini diketahui memiliki fungsi yang berbeda dalam meregulasi struktur dan permeabilitas jaringan ikat. Proteoglikan dapat berintegrasi dengan membran protein dan melalui ikatan dengan molekul dan aktivasi *growth factor* dan kemokin dapat bertindak sebagai modulator dari inflamasi, respon imun, pertumbuhan sel dan diferensiasi sel (Kumar *et al.*, 2020).

3. *Eicosapentaenoic Acid* (EPA) dan *Docosahexaenoic Acid* (DHA)

Asam lemak dari teripang emas merupakan komponen kunci dan bertanggung jawab untuk perbaikan jaringan dan penyembuhan luka (Achmad *et al.*, 2020). *Eicosapentaenoic Acid* (EPA) dan *Docosahexaenoic Acid* (DHA) adalah asam lemak tak jenuh ganda omega-3 rantai panjang (O-3) yang banyak terdapat sumber daya alam dari laut (ikan, kerang, teripang dan beberapa alga) (Tanaka *et al.*, 2014). Meskipun EPA dan DHA merupakan asam lemak omega-3, tetapi memiliki mekanisme berbeda dalam efek antiinflamasinya (Calder, 2010).

Eicosapentaenoic Acid dan DHA berperan dalam modulasi mediator inflamasi dengan mengubah produksi mediator inflamasi seperti eikosanoid dan sitokin (Crupi *et al.*, 2022). *Eicosapentaenoic Acid* terbukti memiliki efek antiinflamasi dengan mengurangi kemokin dan tingkat sitokin proinflamasi, seperti TNF- α dan IL-6 (Calder, 2010).

Eicosapentaenoic Acid dan DHA juga menghasilkan resolvin yang merupakan mediator inflamasi dan juga mampu menghentikan proses inflamasi yang sedang berlangsung, serta membatasi kerusakan jaringan. Resolvin E1, resolvin D1 dan protectin D1 adalah contoh resolvin yang terbukti menghambat migrasi neutrofil dan produksi sitokin (Calder, 2012).

Eicosapentaenoic Acid dan DHA dapat masuk ke dalam fosfolipid membran sel inflamasi dan mengubah komposisinya yang akan mempengaruhi fungsi sel tersebut melalui perubahan fisik membran, mengganggu jalur pensinyalan sel dan perubahan pola mediator lipid yang dihasilkan (Calder, 2012). Peningkatan kandungan membran DHA lebih berperan menghasilkan perubahan pola produksi resolvin dan eikosanoid (Calder, 2010).

Eicosapentaenoic Acid dan DHA juga mampu menghambat kemotaksis atau pergerakan sel imun menuju lokasi inflamasi dengan mengurangi *protein chemoattractant monosit 1* (MCP-1). Kedua asam lemak ini dapat mengurangi jarak dan jumlah sel yang bermigrasi menuju kemoatraktan. Efek antikemotaktik mungkin lebih dominan pada EPA dibandingkan dengan DHA (Clader, 2010). Selain itu, EPA dan DHA dapat mempengaruhi dan mengurangi ekspresi molekul adhesi pada endotel yang terlibat dalam perlekatan sel imun selama proses inflamasi. Hal ini juga dapat mempengaruhi migrasi sel imun dari pembuluh darah ke jaringan yang mengalami inflamasi (Tanaka, 2014).

Eicosapentaenoic Acid juga menghambat produksi MMP oleh makrofag, yang berperan dalam degradasi matriks ekstraseluler dan perkembangan inflamasi. *Eicosapentaenoic Acid* mampu secara signifikan mengurangi pembentukan *reaktif oxygen species* (ROS) dan kaskade apoptosis (Crupi *et al.*, 2022). Selain itu, omega-3 (EPA dan DHA) dan flavonoid memiliki aktivitas antiinflamasi yang sama yaitu menghambat enzim siklooksigenase (COX) dan transkripsi *nuclear factor-kappa beta* (NF- $\kappa\beta$) yang mengatur transkripsi gen terutama yang terlibat dalam respon imun dan inflamasi melalui regulasi gen yang mengkode proinflamasi sitokin, molekul adhesi, kemokin, *growth factor*, enzim yang diinduksi, seperti siklooksigenase-2 (COX-2) (Dewanti *et al.*, 2019; Hou *et al.*, 2015, Nirwana *et al.*, 2017). Terhambatnya transkripsi NF- $\kappa\beta$ menyebabkan terjadinya penurunan ekspresi dari sitokin

proinflamasi diantaranya TNF- α dan peningkatan ekspresi sitokin antiinflamasi pada pulpa gigi (Nirwana, 2012).

1.8 Hewan Percobaan

Hewan percobaan merupakan hewan yang sengaja dipelihara untuk digunakan sebagai hewan model guna mempelajari dan mengembangkan berbagai macam bidang ilmu dalam skala penelitian atau pengamatan laboratoris. Tikus putih merupakan hewan percobaan yang umum digunakan. Terdapat tiga galur yang biasa digunakan dalam penelitian yaitu galur *Sprague dawley*, galur *Long evans* dan galur Wistar (Widiartini, 2013).

Penelitian ini menggunakan bahan hidup (*in vivo*) dengan jenis hewan coba adalah tikus galur Wistar (*Rattus norvegicus*). Hewan ini termasuk dalam beberapa strain tikus yang dapat digunakan dalam penelitian karena memiliki karakteristik tertentu seperti sifat, struktur anatomi dan zat gizi yang diperlukan relatif serupa dengan manusia, serta mempunyai kesamaan dengan aspek fisiologis metabolis manusia (Endi, 2013).

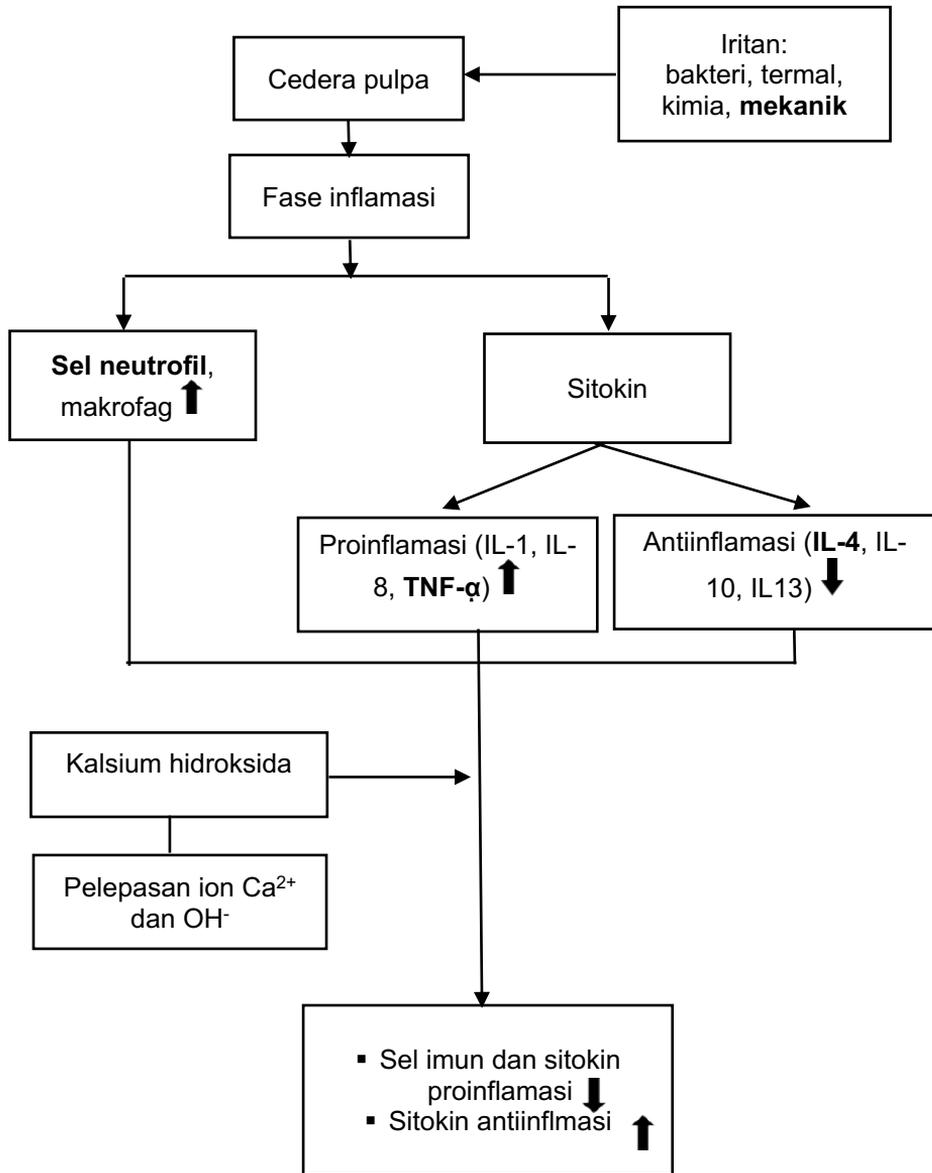
Taksonomi tikus galur Wistar (*Rattus norvegicus*), sebagai berikut (Baker, *et al.*, 2013):

Kingdom : *Animalia*
Phylum : *Chordota*
Class : *Mammalia*
Ordo : *Rodentia*
Famili : *Muridae*
Genus : *Rattus*
Specific name : *norvegicus*
Scientific name : *Rattus norvegicus*



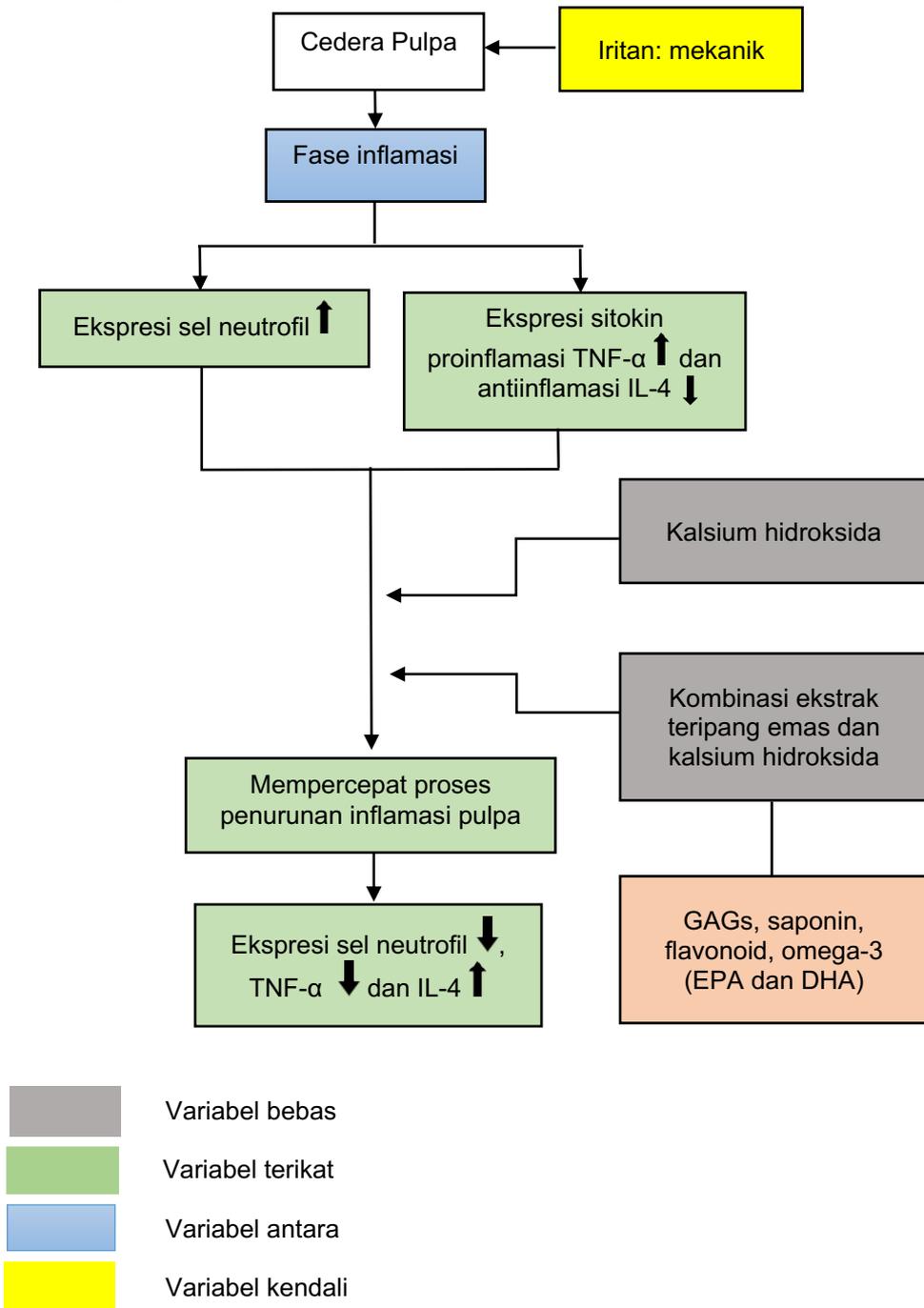
Gambar 2. Tikus galur wistar (*Rattus norvegicus*) (Hedrich, 2006)

1.9 Kerangka Teori



Gambar 3. Bagan Kerangka Teori

1.10 Kerangka Konsep



Gambar 4. Bagan Kerangka Konsep

1.11 Hipotesis Penelitian

Kombinasi ekstrak teripang emas (*Stichopus hermannii*) dan kalsium hidroksida pada pulpa gigi tikus galur wistar yang terinflamasi efektif menurunkan ekspresi sel neutrofil dan TNF- α serta meningkatkan ekspresi sitokin antiinflamasi IL-4.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian *true experimental laboratories* dengan rancangan penelitian yang digunakan adalah *post-test only control group design*.

2.2 Waktu dan Tempat Penelitian

2.2.1 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari – Mei 2024

2.2.2 Tempat Penelitian

1. Pembuatan sediaan ekstrak Teripang Emas (*Stichopus hermanii*) di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Ujung Pandang.
2. Pemeliharaan, preparasi dan dekapitasi hewan coba tikus galur wistar (*Rattus norvegicus*) dilakukan di Rumah Sakit Hewan Pendidikan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Hasanuddin.
3. Pembuatan *slide* preparat dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin Makassar.
4. Pengamatan histologi dilakukan di Laboratorium Biokimia Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

2.3 Variabel dan Definisi Operasional Penelitian

2.3.1 Variabel Penelitian

Variabel bebas: kombinasi ekstrak teripang emas (*Stichopus hermanii*), kalsium hidroksida ($\text{Ca}(\text{OH})_2$)

Variabel terikat: ekspresi sel neutrofil, TNF- α dan IL-4

Variabel antara: fase inflamasi

Variabel kendali: diameter preparasi dan kedalaman kavitas, waktu pengamatan (hari ke-1, ke-3, ke-5), jenis kelamin, umur, berat badan, cara pemeliharaan, kesehatan dan jenis makanan hewan coba, serta gigi tikus galur wistar (*Rattus norvegicus*) yang digunakan.

2.3.2 Definisi Operasional Penelitian

1. Ekstrak teripang emas merupakan sediaan gel yang dibuat dari ekstrak daging teripang emas konsentrasi 100%.
2. Kalsium hidroksida adalah sediaan bubuk dengan kandungan kalsium hidroksida 100% yang diaplikasikan sebanyak 0.5 mg pada pulpa gigi tikus galur wistar yang terbuka.
3. Kombinasi ekstrak teripang emas dan kalsium hidroksida adalah sediaan pasta yang diperoleh dari hasil pencampuran ekstrak teripang emas dan kalsium hidroksida dengan perbandingan 25%:75%, 50%:50% dan

75%:25% yang diaplikasikan sebanyak 0.5 mg pada pulpa gigi tikus galur wistar yang terbuka.

4. Neutrofil adalah ekspresi sel neutrofil setelah diberi pewarnaan *Haematoxylin Eosin* menggunakan mikroskop elektron dengan pembesaran 100x dan 400x, didasarkan pada perhitungan 4 lapangan pandang mikroskop, dihitung berdasarkan jumlah yang terdapat pada setiap sampel preparat.
5. *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) adalah ekspresi TNF- α pada pemeriksaan imunohistokimia menggunakan mikroskop cahaya dalam 4 lapangan pandang mikroskop, dihitung berdasarkan jumlah yang terdapat pada setiap sampel preparat.
6. Interleukin-4 (IL-4) adalah ekspresi sitokin IL-4 pada pemeriksaan imunohistokimia menggunakan mikroskop cahaya dalam 4 lapangan pandang mikroskop, dihitung berdasarkan jumlah yang terdapat pada setiap sampel preparat.
7. Pulpa terinflamasi adalah pulpa gigi tikus galur wistar yang mengalami inflamasi setelah dibuat iritan mekanik kavitas klas 1 hingga mencapai atap pulpa dan terlihat suatu titik berwarna merah.

2.4 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini menggunakan gigi hewan coba tikus galur wistar (*Rattus norvegicus*) yang memenuhi kriteria dan menerima tindakan preparasi gigi seri rahang bawah hingga mencapai atap pulpa.

Adapun kriteria inklusi dan eksklusi adalah sebagai berikut :

Kriteria inklusi:

1. Tikus wistar dalam keadaan sehat, aktivitas dan tingkah laku normal
2. Jenis kelamin jantan
3. Berat 250-300 gram
4. Umur 12-16 minggu
5. Gigi tidak karies
6. Jaringan periodontal sekitar gigi sehat

Kriteria eksklusi:

1. Tikus wistar dalam keadaan tidak aktif dan sakit
2. Tikus wistar mati dalam periode penelitian
3. Gigi fraktur/perforasi

2.5 Parameter Penelitian

Pemeriksaan imunohistokimia menggunakan metode semikuantitatif, dengan skor (Rezaee *at al.*, 2017) :

Persentase yang terwarnai dengan

Skor 0 = 0% yang terwarnai

1= 1-5% yang terwarnai

2= 6-20% yang terwarnai

3= 21-50% yang terwarnai

4 = >50% yang terwarnai

Sedangkan intensitas yang terwarnai :

0 = *negative*, 1 = *weak*, 2 = *moderate*, 3 = *strong*, 4 = *intense*

Hasil yang didapatkan dari persentase dan intensitas kemudian dikalikan dan dimasukkan ke dalam empat kategori, yaitu :

0 = negatif

1-3 = lemah

4-7 = sedang

8-16 kuat

2.6 Perhitungan Besar Sampel

Perhitungan besar sampel dalam penelitian ini menggunakan rumus Federer:

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

Keterangan:

n = jumlah sampel

t = jumlah kelompok penelitian

Cara perhitungan besar sampel:

t = 4 kelompok penelitian

$(n-1) \times (4-1) \geq 15$

$3(n-1) \geq 15$

$3n - 3 \geq 15$

$3n \geq 15+3$

$n \geq 6$

Sampel pada tiap kelompok perlakuan berdasarkan rumus Federer adalah 6 sampel. Teknik pengambilan sampel pada tiap kelompok perlakuan adalah *simple random sampling*. *Simple random sampling* merupakan teknik *sampling* yang dipilih secara acak. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 24 ekor tikus galur wistar (*Rattus norvegicus*). Hewan coba dibagi menjadi 4 kelompok secara random, yaitu:

1. Kelompok 1: kontrol positif (aplikasi kalsium hidroksida), terdiri dari 6 ekor tikus galur wistar.
2. Kelompok 2: kelompok perlakuan 1 (aplikasi ekstrak teripang emas 25% dan kalsium hidroksida 75%) terdiri dari 6 ekor tikus galur wistar.
3. Kelompok 3: kelompok perlakuan 2 (aplikasi ekstrak teripang emas 50% dan kalsium hidroksida 50%) terdiri dari 6 ekor tikus galur wistar.
4. Kelompok 4: kelompok perlakuan 3 (aplikasi ekstrak teripang emas 75% dan kalsium hidroksida 25%) terdiri dari 6 ekor tikus galur wistar.

2.7 Alat dan Bahan

2.7.1 Alat Penelitian

Alat untuk membuat ekstrak teripang emas

1. Handskun dan masker
2. Pisau
3. Papan potong
4. Corong pemisah (Pyrex®®, Jepang)
5. Kertas saring Japan 58x58 cm
6. Gelas kimia tabung Erlenmeyer (Iwaki, Asahi glass®, Indonesia)
7. Cawan petri plastik 90 mm steril

Alat yang digunakan saat perlakuan ke hewan coba

1. Handskun dan masker
2. Spoit injeksi 1 ml (Shindobang®, Korea)
3. *Micromotor contra angle handpiece* (NSK, Nakamishi Inc, Japan)
4. *Round diamond bur BR-49* (Mani Inc., Japan)
5. Set diagnostik: kaca mulut, ekskavator, pinset, sonde, aplikator bulat, *plastis instrument*
6. K-File #15 (Dentsply, Switzerland)
7. *Cotton pellet*
8. Mikropipet
9. *Light cure* (Nobleese, Eighteeth)
10. *Sterilisator*
11. Timbangan digital

2.7.2 Bahan Penelitian

1. Ekstrak teripang emas
2. Bubuk kalsium hidroksida PA (Emsure)
3. *Resin Modified Glass Ionomer Cement* (Ionoseal, VOCO)
4. Aquadest
5. Formalin 10% buffer
6. Metanol PA
7. Alkohol
8. Ketamine HCl (100 mg/mL) (Virbac Laboratories, French)
9. Larutan saline steril (Onemed)
10. Kloroform

2.8 Prosedur Penelitian

2.8.1 Tahapan Persiapan Penelitian

- Teripang emas dipilih dalam keadaan hidup untuk menjaga kualitas ekstrak yang dihasilkan. Teripang emas dicuci dan dibersihkan, lalu dagingnya dipotong dalam ukuran kecil dengan ketebalan \pm 3-10 cm, ditimbang berat basahnya kemudian ditambahkan *aquadest* lalu diblender hingga mencapai konsistensi yang halus (Damaiyanti, 2015; Pringgenies *et al.*, 2017; Yudo *et al.*, 2022).

- Teripang emas yang telah halus, dimasukkan ke dalam wadah plastik dan selanjutnya dilakukan tahapan *freeze drying*. *Freeze drying* ini untuk menghilangkan cairan yang ada pada sampel teripang emas hingga menghasilkan bubuk daging teripang emas (Ashwini *et al*, 2014). Bubuk teripang emas yang dihasilkan dari proses *freeze drying* selanjutnya dilakukan maserasi dengan pelarut metanol pro analisis dengan perbandingan 1 (teripang) : 5 (metanol) kemudian ditutup dengan aluminium foil (Shukla, 2011).
- Proses maserasi dilakukan selama 3 hari, hasil maserasi kemudian disaring untuk mendapatkan ekstrak metanol teripang emas (*Stichopus hermannii*).
- Hasil maserasi kemudian diuapkan menggunakan alat evaporator pada suhu 50° C dan disentrifugasi dengan kecepatan 6000rpm selama 10 menit agar zat pelarut terpisah dari ekstrak, kemudian ekstrak hasil penguapan didinginkan sehingga menghasilkan gel ekstrak teripang emas (*Stichopus hermannii*).
- Gel ekstrak teripang emas kemudian dicampur dengan bubuk kalsium hidroksida pro analisis dengan perbandingan tertentu (Fava and Saunders. 1999; Yucel *et al.*, 2007):
 - Kombinasi 1 : ekstrak teripang emas dan kalsium hidroksida dengan perbandingan 25% : 75%.
 - Kombinasi 2 : ekstrak teripang emas dan kalsium hidroksida dengan perbandingan 50% : 50%.
 - Kombinasi 3 : ekstrak teripang emasi dan kalsium hidroksida dengan perbandingan 75% : 25%.

2.8.2 Tahapan Pelaksanaan Prosedur Penelitian

Prosedur Induksi Inflamasi pada Hewan Coba

- Anastesi tikus galur wistar secara intramuskular dengan Ketamine HCl 10%.
- Permukaan gigi yang akan dibur didisinfeksi iodine.
- Induksi injuri pulpa: preparasi gigi seri rahang bawah dibuat kavitas klas 1 menggunakan *handpiece* dengan *diamond round bur* berwarna biru (BR-49) (Mani Inc., Japan) hingga hampir mencapai atap pulpa dan terlihat suatu titik berwarna merah. Kavitas kemudian diirigasi dengan larutan salin steril dan dikeringkan menggunakan *cotton pellet*.

Prosedur Aplikasi Bahan Uji pada Hewan Coba

- Tikus wistar dibagi secara random menjadi 4 kelompok yang masing-masing terdiri dari 6 ekor, yaitu :
- Kelompok 1: merupakan kelompok kontrol positif, diaplikasikan kalsium hidroksida kemudian ditumpat menggunakan bahan *Resin Modified-Glass Ionomer Cement* (GC, Jepang) dan di lakukan *light curing* selama 40 detik.
- Kelompok 2: merupakan kelompok perlakuan 1, diaplikasikan kombinasi ekstrak teripang emas dan kalsium hidroksida dengan perbandingan 25%:75% kemudian ditumpat menggunakan bahan *Resin Modified-Glass Ionomer Cement* (GC, Jepang) dan dilakukan *light curing* selama 40 detik.

- Kelompok 3: merupakan kelompok perlakuan 2 diaplikasikan kombinasi ekstrak teripang emas dan kalsium hidroksida dengan perbandingan 50%:50% kemudian ditumpat menggunakan bahan *Resin Modified-Glass Ionomer Cement* (GC, Jepang) dan dilakukan *light curing* selama 40 detik.
- Kelompok 4: merupakan kelompok perlakuan 3 diaplikasikan kombinasi ekstrak teripang emas dan kalsium hidroksida dengan perbandingan 75%:25% kemudian ditumpat menggunakan bahan *Resin Modified-Glass Ionomer Cement* (GC, Jepang) dan dilakukan *light curing* selama 40 detik.
- Dekapitasi hewan coba dilakukan pada hari ke-1, 3, dan 5 setelah perlakuan, menggunakan sedasi etanol over konsentrasi, Eutha (0,1 ml/ 1 gram BB).

2.8.3 Pemeriksaan Mikroskopis Jumlah Neutrofil

Untuk melihat ada atau tidaknya sel inflamasi pada pulpa gigi, maka dilakukan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE). Prosedurnya adalah sebagai berikut (Guyton, 2007):

1. Jaringan yang telah dipotong dan diproses di dalam mesin prosesing jaringan (*Tissue Automatics Processor*)
2. Proses *embedding* (jaringan yang telah diproses dalam mesin prosesing di blok menggunakan parafin cair).
3. Potong jaringan dalam blok parafin dengan ketebalan 4 μ m.
4. Pita jaringan yang terbentuk dicelupkan ke dalam *waterbath*.
5. Diambil potongan jaringan dengan slide lalu tiriskan
6. Dituliskan kode pada slide sesuai dengan kode yang tertera pada blok parafin menggunakan pensil.
7. Dipanaskan *slide* diatas *hot plate* selama 1 jam.
8. Didinginkan *slide* lalu masukkan ke dalam keranjang *slide*.
9. Deparafinasi (xylol I, xylol II, xylol III) masing-masing 5 menit.
10. Rehidrasi (alkohol 96%, alkohol 80%, alkohol 70%), masing-masing selama 5 menit.
11. Bilas dengan air mengalir selama 5 menit.
12. Direndam dengan Hematoxylin Meyer 7-10 menit.
13. Dicuci di air mengalir selama 5 menit.
14. Dichelupkan ke dalam larutan eosin 10 detik
15. Dehidrasi (alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 96%)
16. Clearing (xylol I, xylol II, xylol III) masing-masing 5 menit.
17. Dikeringkan *slide* lalu tetesi dengan entelan dan tutup dengan *deck glass*.
18. Diamati di mikroskop
19. Penghitungan jumlah sel makrofag dilakukan dengan menghitung rerata dari 4 lapangan pandang pada *slide* sampel jaringan.
20. Data yang diperoleh merupakan hasil pengamatan secara histologis dari ke-4 kelompok berskala ordinal yang selanjutnya dianalisis menggunakan statistik parametrik. Untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan jumlah neutrofil pada ke-4 kelompok, dilakukan analisis data.

2.8.4 Pemeriksaan Imunohistokimia Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) dan Interleukin-4 (IL-4)

1. Persiapan preparat berupa potongan tipis jaringan 4 μm yang sudah ditempelkan pada kaca objek silanized
 2. Deparafinisasi dengan mencelupkan preparat ke dalam cairan xylol sebanyak 3 kali, masing-masing 5 menit
 3. Rehidrasi dengan cara mencelupkan secara berurutan dalam etanolabsolut lalu alkohol 95% dan alkohol 70%, masing-masing 5 menit
 4. Dibilas dengan air mengalir selama 5 menit
 5. Dimasukkan preparat ke dalam *buffer sitrat* dan dipanaskan ke dalam microwave:
 - Cook I: power level 8 selama 5 menit (sampai titik didih pertama)
 - Cook II: power level 1 selama 5 menit
 6. Didinginkan \pm 30 menit dalam suhu ruang
 7. Dibilas dengan *wash buffer* (PBS) 3x2 menit, keringkan air disekitarpotongan jaringan
 8. Dilingkari sekeliling jaringan yang ingin dipulas dengan *Pap pen*
 9. Blocking preparat dengan mencelupkan ke dalam Endogen Peroksidase 0.5% (*tissue primer*) selama 5 menit
 10. Dibilas dengan *wash buffer* (PBS) 3x2 menit
 11. *Blocking* preparat dengan meneteskan *background blocker* selama 5 menit
 12. Dibuang cairan *blocking* tanpa dibilas
 13. Diteteskan preparat dengan antibodi primer IL-1 β dan biarkan selama 60 menit dalam rak inkubasi
 14. Dibilas dengan *wash buffer* (PBS) 3x2 menit
 15. Diteteskan preparat dengan *PolyVue Plus Enhancer* secukupnya danbiarkan selama 10 menit dalam rak inkubasi
 16. Dibilas dengan *wash buffer* (PBS) 3x2 menit
 17. Diteteskan preparat dengan *PolyVue Plus HRP* secukupnya dan biarkan selama 10 menit dalam rak inkubasi
 18. Dibilas dengan *wash buffer* (PBS) 3x2 menit
 19. Diteteskan preparat dengan DAB + substrat dan biarkan selama 2-5menit
 20. Dibilas dengan *wash buffer* (PBS) 3x2 menit
 21. *Counterstain* preparat dengan pewarnaan *Hematoxylin* selama 1-2menit
 22. Dibilas dengan *wash buffer* (PBS) 3x2 menit
 23. Dibilas dengan air mengalir selama 5 menit
 24. Dehidrasi dengan cara mencelupkan preparat secara berurutan dalamalkohol 70%, alkohol 96% dan etanol absolut masing-masing selama 5 menit
 25. Dilakukan *mounting* dan tutup dengan kaca penutup
- 2.5 Parameter Pengamatan