

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pulpa terdiri atas sel endotel, odontoblas, sel epitel dan fibroblas yang berperan menghasilkan mediator inflamasi seperti sitokin dan mengenali pola reseptor sehingga berkontribusi pada respon imun. Ketika terjadi inflamasi pada pulpa, neutrofil dan makrofag berinfiltrasi pada jaringan pulpa secara terus menerus dan mengekspresikan berbagai mediator inflamasi seperti sitokin. Berdasarkan fungsinya, sitokin dibagi menjadi sitokin proinflamasi seperti IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL6, IL-8 dan sitokin antiinflamasi seperti IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 (Galler *et al.*, 2021; Hargreaves *et al.*, 2012).

Interleukin-8 (IL-8) merupakan sitokin proinflamasi yang poten merekrut neutrofil ke daerah inflamasi. Selain itu, IL-8 disintesis di lokasi peradangan lokal yang akan merekrut dan mengaktifkan sel-sel inflamasi akut (Silva *et al.*, 2017). Interleukin-8 ditemukan lebih tinggi pada pulpa yang terinflamasi dan tidak terdeteksi pada gigi normal, serta lebih tinggi pada pulpitis akut dibanding pulpitis kronis (Guo *et al.*, 2000). Selain sitokin proinflamasi pada fase inflamasi, makrofag memfagositosis bakteri dan mengaktifasi sel-T serta menghasilkan berbagai sitokin antiinflamasi seperti IL-10. Sitokin ini menghambat produksi sitokin proinflamasi dan matriks metalloproteinase ekstraseluler sehingga dapat menghambat atau menghentikan kerusakan pulpa. Tingginya kadar IL-10 berhubungan dengan reduksi di apoptosis, misalnya sebagai antiinflamasi yang menghambat perkembangan suatu penyakit. Sitokin ini bertindak sebagai pengatur kemotaksis, aktivasi, dan kelangsungan hidup sel imunokompeten seperti limfosit, makrofag, dan granulosit untuk mengontrol inisiasi dan resolusi respon inflamasi (Elsalhy, 2011; Hargreaves, 2020; Li *et al.*, 2006; Smith, 2003; Zhao *et al.*, 2000). Interleukin-8 (IL-8) dan interleukin-10 (IL-10) direkomendasikan dalam pemilihan marker penelitian karena dapat memberikan informasi lebih lanjut tentang keseimbangan sitokin secara keseluruhan dalam pulpa. Hal ini dapat dijadikan acuan dalam memprediksi prognosis jangka panjang dari terapi pulp capping (Elsalhy, 2011).

Terapi pulp capping bertujuan untuk mempertahankan vitalitas dan fungsi jaringan pulpa yang mengalami inflamasi oleh karena lesi karies, iatrogenik atau trauma gigi. Salah satu material yang sering digunakan sebagai gold standard bahan pulp capping adalah kalsium hidroksida (CaOH₂). Bahan ini memiliki pH tinggi, yang bertanggung jawab atas stimulasi fibroblas bertujuan menstimulasi proses penyembuhan pada dentinal bridge. Selain itu, CaOH₂ memiliki sifat antibakteri yang baik, menghambat pertumbuhan mikroorganisme, meningkatkan pH larutan asam, mendorong mekanisme penyembuhan dan pertahanan jaringan pulpa. Meskipun sebagai gold standard, kalsium hidroksida memiliki beberapa kekurangan, antara lain dapat menyebabkan inflamasi dan nekrosis pada permukaan pulpa setelah pulp capping, larut dalam cairan mulut, mengalami degradasi seiring berjalannya waktu,

pembentukan tunnel defect, dan ketahanan mekanis yang rendah (Brizuela *et al.*, 2017; Hanna *et al.*, 2020; Islam *et al.*, 2023; Sun *et al.*, 2011).

Untuk mengimbangi kelemahan dari CaOH_2 sebagai bahan terapi pulp capping, beberapa tahun terakhir telah banyak dilakukan penelitian menggunakan senyawa aktif dari alam sebagai alternatif bahan tambahan yang dikombinasikan dengan kalsium hidroksida. Teripang emas (*Stichopus hermanii*) mengandung nutrisi yang lengkap, bioaktivitas antibakteri yang lebih tinggi dibanding dengan produk antibiotik komersial, berkhasiat meningkatkan penyembuhan luka dan dapat memperbaiki sel-sel rusak serta meningkatkan proliferasi fibroblas. (Damaiyanti, 2015; Monika *et al.*, 2021; Tamara *et al.*, 2015).

Berbagai manfaat teripang emas (*Stichopus hermanii*) menarik minat penulis untuk meneliti manfaat teripang emas dalam mempengaruhi sitokin inflamasi yang dapat dimanfaatkan sebagai alternatif bahan tambahan untuk dikombinasikan dengan kalsium hidroksida sebagai bahan pulp capping. Sebab itu, peneliti ingin mengetahui dinamika ekspresi interleukin-8 (IL-8) dan interleukin-10 (IL-10) pada pulpa gigi tikus wistar terinflamasi setelah aplikasi kombinasi pasta teripang emas (*Stichopus hermanii*) dengan kalsium hidroksida.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka permasalahan yang dapat dirumuskan adalah apakah terjadi penurunan ekspresi interleukin-8 (IL-8) dan peningkatan ekspresi interleukin-10 (IL-10) pada pulpa gigi tikus wistar terinflamasi setelah aplikasi kombinasi pasta teripang emas (*Stichopus hermanii*) dengan kalsium hidroksida?

1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian

1.3.1 Tujuan Penelitian

Tujuan Umum

Mengetahui efektivitas kombinasi pasta teripang emas (*Stichopus hermanii*) dengan kalsium hidroksida dalam menurunkan ekspresi sitokin IL-8 dan meningkatkan ekspresi sitokin IL-10 pada pulpa gigi tikus terinflamasi.

Tujuan Khusus

1. Menganalisis ekspresi sitokin interleukin-8 (IL-8) pada pulpa gigi tikus terinflamasi setelah aplikasi kombinasi pasta teripang emas (*Stichopus hermanii*) dengan kalsium hidroksida konsentrasi 25%, 50% dan 75%.
2. Menganalisis ekspresi sitokin interleukin-10 (IL-10) pada pulpa gigi tikus terinflamasi setelah aplikasi kombinasi pasta teripang emas (*Stichopus hermanii*) dengan kalsium hidroksida konsentrasi 25%, 50% dan 75%.

1.3.2 Manfaat Penelitian

Manfaat Umum

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai dinamika ekspresi interleukin-8 (IL-8) dan interleukin-10 (IL-10) setelah aplikasi kombinasi pasta teripang emas (*Stichopus hermanii*) dengan kalsium hidroksida sebagai potensi bahan tambahan pada perawatan pulp capping.

Manfaat Khusus

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi bagi dokter gigi dan dokter gigi spesialis konservasi gigi pada khususnya sebagai dasar penelitian lebih lanjut dalam pemanfaatan aplikasi kombinasi pasta teripang emas (*Stichopus hermanii*) dengan kalsium hidroksida sebagai potensi bahan tambahan pada perawatan pulp capping.

1.4 Tinjauan Teori

1.4.1 Struktur Kompleks Dentin-Pulpa

Jaringan dentin dan pulpa adalah jaringan ikat khusus yang berasal dari mesodermal. Kedua jaringan ini dianggap satu jaringan, yang membentuk kompleks pulpa-dentin, dengan dentin yang termineralisasi merupakan produk akhir dari diferensiasi dan maturasi sel. Pergerakan cairan dentin, menghasilkan aktivasi hidrodinamik pulpa serabut saraf A- δ dan menyebabkan sensitivitas dentin, adalah contoh umum dari penggabungan fungsional jaringan. Kedua jaringan tersebut berasal dari papila gigi, dan perkembangan kedua jaringan tersebut berhubungan erat. Struktur dan komposisi matriks dentin, dan tubulus dentin merupakan pengaruh utama dalam proses invasi bakteri ke tubulus dentin (Love and Jenkinson, 2002).

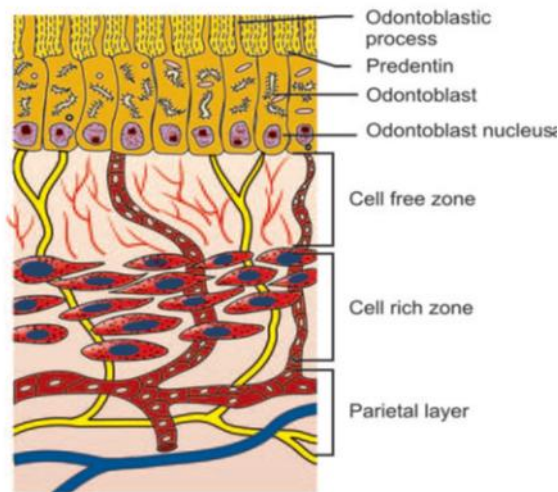
Dentin adalah jaringan ikat berpori, keras, dan termineralisasi yang terutama terdiri dari fibril kolagen tipe I dan dilapisi hidroksiapatit. Kolagen terdiri lebih dari 90% matriks organik dentin, kolagen tipe I merupakan kolagen yang paling banyak. Jenis kolagen lainnya (III, V, dan VI) dan protein non-kolagen serta proteoglikan muncul sebagai komponen kecil. Kolagen tipe III diekspresikan dan disintesis oleh odontoblas, telah diamati pada dentin intratubular dan predentin serta di dalam tubulus dentin (Goldberg *et al.*, 2012; Love and Jenkinson, 2002).

1.4.2 Pulpa

Pulpa gigi menempati rongga pulpa gigi, merupakan organ tubuh manusia yang unik dan memiliki empat fungsi: (1) formatif atau perkembangan, (2) nutrisi, (3) sensoris atau protektif, dan (4) defensif atau reparatif. Fungsi formatifnya adalah produksi dentin primer dan sekunder oleh odontoblas. Fungsi nutrisi mensuplai nutrisi dan kelembapan ke dentin melalui proses pasokan pembuluh darah ke odontoblas. Fungsi sensoris menyediakan serabut saraf di dalam pulpa untuk memediasi sensasi nyeri. Reseptor dentin bersifat unik karena berbagai rangsangan hanya menimbulkan rasa sakit sebagai responnya. Pulpa biasanya tidak dapat membedakan antara panas, sentuhan, tekanan, atau bahan kimia. Fungsi pertahanan pulpa terutama berkaitan dengan responnya terhadap iritasi yang disebabkan oleh rangsangan mekanis, termal, kimia, atau bakteri. Deposisi dentin

reparatif bertindak sebagai penghalang pelindung terhadap karies dan berbagai macam faktor iritasi lainnya (Heymann *et al.*, 2012). Pulpa gigi merupakan jaringan ikat yang mendukung dentin, secara histologis pulpa gigi dapat dibagi menjadi 4 zona yaitu :

1. Zona odontoblas, yaitu bagian pulpa dengan sel-sel odontoblas yang terletak pada bagian tepi pulpa.
2. *Cell free zone*, zona yang terdapat dibawah zona odontoblas dengan jumlah sel yang relatif sedikit.
3. *Cell rich zone*, memiliki kepadatan sel yang tinggi dan dapat terlihat dengan jelas pada pulpa koronal gigi berdekatan dengan *cell free zone*.
4. Zona inti pulpa, merupakan zona yang letaknya paling dalam, bagian tengah pulpa serta terdapat pembuluh darah dan syaraf.



Gambar 1.1. Zona-zona pulpa (Nisha and Amit, 2013)

Pulpa merupakan jaringan ikat yang dikelilingi oleh jaringan keras termineralisasi seperti dentin, email, dan sementum. Komponen utama jaringan ikat adalah matriks ekstraseluler, yang sebagian besar terdiri dari protein fibril dan substansi dasar. Fibril protein membentuk jaringan polimer luas yang disusun sebagai pasta terhidrasi dari matriks. Kolagen merupakan protein fibril yang paling melimpah dan merupakan komponen utama serat kolagen yang memperkuat jaringan. Substansi dasar terutama bertanggung jawab atas viskoelastisitas dan fungsi penyaringan jaringan ikat. Zat dasar ini terdiri dari makromolekul yang disebut proteoglikan, yang terdiri dari inti protein dan sejumlah besar polisakarida lurus (glikosaminoglikan) (Hargreaves *et al.*, 2012; Yu and Abbott, 2007).

Fungsi utama jaringan ikat adalah menyediakan matriks yang mengikat sel dan organ untuk memberikan dukungan pada tubuh. Jaringan ikat juga bertanggung jawab atas berbagai fungsi yang memulai dan mengatur respon terhadap invasi patogen, sehingga berperan sebagai bagian penting dari pertahanan tubuh. Jaringan

ikat juga mempunyai kemampuan besar dalam memperbaiki jaringan yang rusak dengan membentuk jaringan parut (Hargreaves *et al.*, 2012).

1.4.3 Mekanisme Pembentukan Dentin Reparatif

Dentin reparatif adalah matriks dentin tersier yang disekresikan oleh sel *odontoblast-like cell* baru, untuk merespon stimulus yang kuat setelah terjadi kematian odontoblast postmitotic original yang bertanggung jawab atas sekresi dentin primer atau sekunder. Respon dentin reparatif berada pada sisi pulpa yang terekspos, hal ini karena hilangnya odontoblas dan diperlukannya pembentukan *dentinal bridge* pada daerah tersebut. Dentinogenesis reparatif melibatkan sequensi (lebih kompleks) kejadian biologik yang lebih langka dibandingkan dentinogenesis reaksioner, karena melibatkan sel progenitor dan adanya induksi diferensiasi dari *odontoblast-like cell* sebelum terjadinya sekresi matriks dentin reparatif. Salah satu yang berperan dalam dentinogenesis reparatif adalah *growth factor*, yang bertindak sebagai regulasi beberapa fungsi sel seperti proliferasi, diferensiasi dan sintesis matriks (Hargreaves *et al.*, 2012).

Pada dasarnya *growth factor* akan dilepaskan pada matriks dentin sebagai kompensasi injuri jaringan dan prosedur restorasi. Pada kejadian karies, difusi asam dari metabolit bakteri yang masuk ke dalam jaringan gigi akan menyebabkan demineralisasi dan pada keadaan ini akan dilepaskan komponen matriks ekstraseluler soluble termasuk *growth factor*. Komponen ini akan berdifusi pada pulpa secara langsung kemudian berinteraksi dengan sel. Kejadian demineralisasi akibat proses karies ini akan menyebabkan dilepasnya *growth factor* selama periode waktu yang cukup lama, sehingga dapat memfasilitasi terjadinya komunikasi seluler (Hargreaves *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2018).

Penyembuhan pada pulpa yang mengalami cedera dimulai dengan induksi apoptosis sel yang rusak. Sel progenitor pada pulpa, khususnya yang berada di daerah distribusi perivaskuler dan cell rich zone dirangsang untuk berproliferasi dan bermigrasi ke daerah yang mengalami cedera untuk berdiferensiasi menjadi sel odontoblas yang melapisi dentin reparatif (tersier) (Sharma *et al.*, 2010).

Kontrol molekuler dibalik diferensiasi odontoblas dan dentinogenesis reparatif dipengaruhi oleh ekspresi gen diferensial, aktivitas protein, dan pelepasan molekul yang memberikan sinyal dari pulpa yang mengalami cedera. Dentin merupakan sumber yang kaya akan *growth factor* dan molekul bioaktif yang akan dilepaskan ketika dentin mengalami demineralisasi atau penguraian oleh asam yang berasal dari bakteri atau karena bahan tertentu seperti kalsium hidroksida, Mineral Trioxide Aggregate (MTA) dan etsa yang digunakan selama prosedur restoratif (Sharma *et al.*, 2010).

1.4.4 Sitokin Inflamasi Pulpa

Sitokin merupakan polipeptida yang dikeluarkan oleh leukosit dan sel-sel lainnya yang pada dasarnya bertindak pada sel-sel hematopoetik dan memiliki efek modulasi pada respon imun dan inflamasi. Sitokin-sitokin ini bersifat pleiotropik pada efeknya dan dapat memiliki beberapa sel target sehingga memiliki beberapa aksi. Sitokin

yang secara struktur berbeda dapat saling tumpang tindih, namun memiliki aksi yang tidak identik. Karakteristik lain dari sitokin adalah satu sitokin dapat menginduksi atau mempengaruhi aksi sitokin lainnya dan dapat berfungsi secara sinergis (Elsalhy, 2011; Hargreaves, *et al.*, 2012).

Sitokin dapat diklasifikasikan berdasarkan respon imunnya menjadi sitokin Th1 dan Th2. Sitokin Th1 termasuk ke dalam sel imunitas yang dimediasi seperti IFN- γ , IL-2 dan TNF- α . Sitokin Th2 meliputi sitokin yang berperan dalam memediasi antibodi respon imun seperti IL-4, IL-5, IL-6, dan IL-10. Klasifikasi lainnya yakni berdasarkan fungsi proinflamasi/antiinflamasi. Sitokin IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6 dan IL-8 merupakan sitokin proinflamasi, sedangkan IL-4, IL-6, IL-10 dan IL-13 merupakan sitokin antiinflamasi (Mocellin *et al.*, 2003; Elsalhy, 2011; Hargreaves, *et al.*, 2012).

1.4.5 Interleukin-8 (IL-8)

Interleukin-8 adalah kemokin inflamasi multifungsi, yang memiliki efek kemotaktik yang kuat pada neutrofil dan sel lain, sehingga meningkatkan respons inflamasi pada pulpa gigi dan memperparah gejala inflamasi. Interleukin-8 diproduksi oleh berbagai macam sel, termasuk monosit, neutrofil, sel T, fibroblas, sel endotelial dan sel epitelial, setelah terpapar antigen atau stimulan radang (iskemia dan trauma). Dua bentuk IL-8 (77 CXC dan 72 CXC) merupakan sekresi neutrofil pada saat teraktivasi. Interleukin-8 sedikit diekspresikan pada pulpa gigi yang sehat. Ekspresi tersebut secara bertahap meningkat seiring dengan tingkat keparahan inflamasi pulpa (Wu, 2022).

Interleukin-8 berfungsi menstimulasi kerusakan jaringan ikat dan resorpsi tulang. Hal ini menyebabkan apoptosis pada sel-sel (osteoblas, osteoklas, jaringan ikat ligamen periodontal, makrofag dan neutrofil) sehingga terjadi kerusakan periradikuler (Liapatas *et al.*, 2003). Interleukin-8 biasanya dilepaskan, mengikuti stimulasi sel oleh molekul lipopolisakarida, bakteri atau sitokin pro-inflamasi awal lainnya seperti TNF- α dan IL-1. Interleukin-8 diekspresikan secara terus menerus oleh sel odontoblas dan berperan dalam rekrutmen neutrofil pada kasus inflamasi pulpa untuk mendukung proses penyembuhan (Ferges, 2015). Interleukin-8 disintesis dengan cepat di lokasi peradangan lokal, sebagai salah satu sitokin paling kuat (Remick, 2005).

Penelitian lain memperlihatkan sampel jaringan pulpa yang mengalami inflamasi juga menunjukkan tingkat IL-8 yang lebih tinggi baik melalui ELISA maupun imunohistokimia dibandingkan dengan pulpa sehat (Cecilia *et al.*, 2009). Literatur sebelumnya juga melengkapi hasil ini pada tingkat ekspresi gen, dimana tingkat IL-8 sangat berbeda antara pulpa gigi manusia yang sehat secara klinis dan yang mengalami inflamasi (Zehnder *et al.*, 2003).

Interleukin-8 akan menyebabkan degranulasi neutrofil, sehingga mengakibatkan pengeluaran elastase dan laktoferin. Elastase yang dilepaskan akan mengakibatkan kebocoran plasma dan kerusakan jaringan sehingga terjadi kerusakan akumulatif di endotel. Hal ini kemungkinan disebabkan tingginya jumlah IL-8 secara terus menerus sehingga jumlah neutrofil yang berfungsi dalam proses peradangan akan terus tinggi. Pada saat peradangan terus terjadi maka NF- κ B secara

terus menerus menghasilkan sitokin proinflamasi berupa IL-1 β dan TNF- α , kedua sitokin tersebut di dalam jaringan yang akan menyebabkan kerusakan jaringan (Yuanita *et al.*, 2017).

1.4.6 Interleukin 10

Interleukin-10 (IL-10) adalah sitokin pleiotropik dan imunoregulator yang penting dalam melindungi host dari infeksi yang berhubungan dengan imunopatologi, autoimunitas, dan alergi. Interleukin-10 awalnya dicirikan sebagai sitokin spesifik Th2. Namun, penelitian lebih lanjut menyatakan bahwa produksi IL-10 juga berhubungan dengan respon regulator sel T (Ng *et al.*, 2013).

Interleukin-10 dihasilkan oleh sejumlah jenis sel berbeda, khususnya sel-sel inflamasi seperti limfosit T dan merupakan inhibitor penting pada sintesis sitokin dan aktivitas makrofag. Produsen penting lainnya dari IL-10 yakni monosit dan distimulasi dengan tepat oleh makrofag, serta beberapa kumpulan sel dendritik (Mosser and Zhang, 2008). Interleukin-10 juga menghambat produksi sitokin proinflamasi dan matriks metalloproteinase ekstraseluler (Elsalhy, 2011; Mosser and Zhang, 2008; Ng *et al.*, 2013).

Interleukin-10 menghambat produksi beberapa sitokin seperti TNF- α , IL-1 β , dan IL-6 pada beberapa jenis sel serta bersifat self-modulated. Penelitian Yamaoka *et al.*, (1999) dan Szereday *et al.*, (1997) menyimpulkan bahwa produksi IL-10 meningkat pada proses inflamasi karena memiliki fungsi protektif, sebab tingginya kadar IL-10 berhubungan dengan reduksi di apoptosis, misalnya sebagai antiinflamasi yang menghambat perkembangan suatu penyakit (Elsalhy, 2011).

1.4.7 Mekanisme Penyembuhan Luka

Penyembuhan adalah pergantian sel mati oleh sel hidup atau jaringan fibrosa dan terjadi melalui regenerasi atau organisasi, hasil akhir tergantung dari keseimbangan lokal diantara kedua faktor tersebut. Proses penyembuhan yang ideal diklasifikasikan menjadi 4 tahap, yaitu tahap hemostasis, inflamasi, proliferasi dan remodeling.

Hemostasis

Pulpa gigi memiliki elemen seluler, saraf, dan vaskuler unik yang berperan penting dalam homeostasis dan patofisiologi pulpa sebagai respon terhadap cedera karies. Tahap ini adalah tahap awal dari proses penyembuhan yang melibatkan penyempitan pembuluh darah yang mengarah pada pengurangan suplai darah di tempat cedera. Hal ini menghasilkan agregasi trombosit yang membantu dalam penutupan dinding pembuluh darah. Faktor pembekuan merupakan faktor yang bertanggung jawab untuk pembelahan fibrinogen ke fibrin, yang dilepaskan untuk membantu pembentukan fibrin mesh menjadi gumpalan. Tahap ini dimulai langsung dari mendeteksi rusaknya barier epitel. Untaian fibrin pertama mulai melekat dalam waktu sekitar 60 detik (Potres *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2017).

Inflamasi

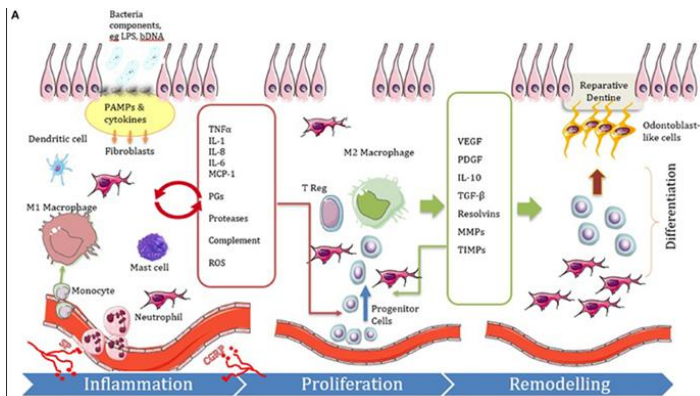
Tahap inflamasi diaktifkan selama fase hemostasis. Peran utama inflamasi adalah melakukan pembersihan pada daerah cedera dengan mengeliminasi mikroorganisme yang menyerang. Inflamasi selanjutnya dibagi menjadi dua tahap. Tahap pertama ditandai dengan masuknya neutrofil ke lokasi luka dan fase inflamasi akhir melibatkan migrasi makrofag. Ciri khas dari proses inflamasi ini adalah aktivasi kaskade sinyal NF κ B dan MAPK, setelah pengikatan PAMP oleh sel imun dan non-imun. Proses ini kemudian menghasilkan pelepasan serangkaian sitokin proinflamasi, termasuk TNF- α , IL-1, IL-8, IL-12, IL-6, dan IFN- δ . Berbagai sel pulpa gigi, termasuk odontoblas, fibroblas, neuron, sel endotel, dan sel induk mengekspresikan reseptor intraseluler dan ekstraseluler yang mampu mendeteksi komponen bakteri (Potres *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2017).

Proses inflamasi awal ini ditandai dengan produksi neutrofil polimorfonuklear (PMN). Neutrofil bermigrasi dari pembuluh darah ke daerah cedera yang difasilitasi oleh transforming growth factor- β (TGF- β). Sel-sel ini menghilangkan materi asing dan menyerang patogen. Di tahap akhir fase ini, jumlah sel akan menurun dan digantikan secara bertahap oleh makrofag setelah sekitar 72 jam. Tujuan utama dari tahap ini adalah dekontaminasi daerah yang cedera oleh fagositosis patogen yang menyerang (Sharma *et al.*, 2017).

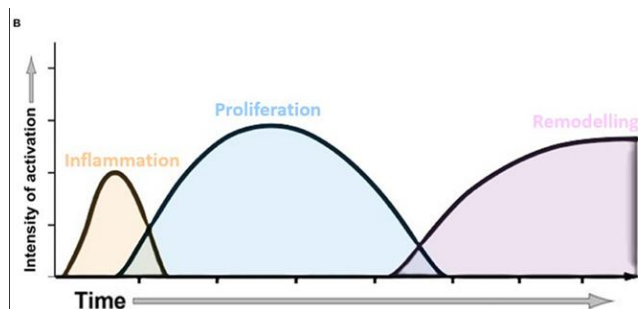
Ciri khas dari tahap inflamasi akhir ini adalah adanya makrofag. Sel ini penting dalam respon inflamasi. Makrofag mencapai daerah yang cedera sekitar 48-72 jam setelah cedera sampai ke tahap fagositosis. Makrofag mengeluarkan sejumlah sitokin seperti *platelet derived growth factor* (PDGF) dan *transforming growth factor- β* (TGF- β) yang menarik sel-sel seperti fibroblas untuk membantu proses penyembuhan lebih lanjut. Makrofag ini menunjukkan fungsi menghilangkan debris sel, neutrofil dan bakteri (El Karim *et al.*, 2021; Sharma *et al.*, 2017).

Pada fase proliferasi, terjadi migrasi fibroblas ke daerah yang cedera dan membentuk matriks ekstraseluler. Aktivitas seluler akan mendominasi, termasuk aktivasi, proliferasi, migrasi, dan diferensiasi sel progenitor yang tinggal di jaringan. Aktivasi dan perekrutan proses seluler ini mulai terjadi ketika peradangan pulpa mulai mereda. Sinyal yang diperlukan untuk memobilisasi sel-sel ini dari tempatnya sebagian besar merupakan produk peradangan seperti mencakup sitokin, kemokin, growth factor, dan komplemen (setelah fase hemostasis dan respon imun berhasil, penyembuhan luka fokus ke perbaikan jaringan (El Karim *et al.*, 2021; Sharma *et al.*, 2017).

Fase *Remodelling* merupakan fase akhir pada proses penyembuhan. Pada fase ini terbentuk jaringan granulasi yang secara bertahap berubah menjadi jaringan parut. Fase ini berlangsung setelah 3 minggu dan perubahan dapat terjadi selama bertahun-tahun (Sharma *et al.*, 2017).



Gambar 1.2. Diagram ilustrasi tiga fase proses perbaikan pada pulpitis, menunjukkan keterlibatan sel dan molekuler. (El Karim *et al.*, 2021).



Gambar 1.3. Diagram ilustrasi dinamika waktu tiga fase perbaikan pada pulpitis. (El Karim *et al.*, 2021).

1.4.8 Teripang Emas

Indonesia adalah negara dengan potensi dan penghasil teripang terbesar di dunia. Dalam setahun, 42 ton teripang dapat dihasilkan dan salah satu komoditas perikanan yang mempunyai prospek cukup baik dan bernilai ekonomis yang tinggi baik di pasaran domestik maupun internasional. Asia Tenggara mewakili pasar global untuk perdagangan teripang karena keanekaragaman hayati (Damaiyanti, 2015; Hartati and Fatimah, 2015).



Gambar 1.4. Morfologi *Stichopus hermanii* bagian dorsal (A1), bagian ventral (A2) (Hartati *et al.*, 2015).

Holothuroidea atau lebih dikenal dengan teripang adalah salah satu spesies dari *Echinodermata* dan memiliki 5 kelas, yaitu kelas *Asteroide* (bintang laut), kelas *Ophiuroidea* (bintang laut), kelas *Echinoid* (bulu babi), kelas *Crinoidea* (lili laut), dan kelas *Holothuroidea* (teripang). *Holothuroidea* (mentimun laut) memiliki 3 famili, yaitu *Holothuroidea* (genus *Actinopyga* dan *Holothuria*), *Stichopodidae* (genus *Stichopus*), dan *Synaptidae* (genus *Synapta*). Pada penelitian ini, jenis teripang yang digunakan adalah teripang emas (*Stichopus hermanii*). Adapun taksonomi dari teripang emas (*Stichopus hermanii*) sebagai berikut: (Damaiyanti, 2015; Hartati and Fatimah, 2015).

Filum : *Echinodermata*
 Subfilum : *Eleutherozoa*
 Infrafilum : *Echinozoa*
 Class : *Holothuroidea*
 Subclass : *Aspidochiroacea*
 Ordo : *Aspidochirotida*
 Famili : *Stichopodidae*
 Genus : *Stichopus*
 Spesies : *hermanii*

Stichopus hermanii memiliki bentuk penampang tubuh dengan ukuran yang relatif besar seperti pada umumnya famili *Stichopodidae* yang memiliki penampang tubuh berbentuk trapesium atau persegi. Warna coklat kekuningan dengan warna papila atau tonjolan seperti kutil berwarna kehitaman tampak di bagian dorsal. Sedangkan bagian ventral berwarna jingga dengan kaki tabung yang dominan berwarna hitam berukuran sekitar 0.5-1 cm. Garis yang memisahkan kaki tabung dari bagian tubuh kanan dan kiri teripang dengan warna jingga tampak di bagian ventral. Bagian anterior cenderung berwarna kuning kecokelatan, dan warna tentakel berwarna kuning keputih-putihan. Struktur tubuh bagian luar licin, tebal dan berbuku-buku. Anatomi *Stichopus hermanii* yang lain adalah tentakel, cincin kapur, lambung, pohon respirasi. Pohon respirasi pada teripang mirip dengan fungsi paru-paru pada manusia. Posisi mulut dan tentakel berada pada ujung anterior dan lubang anus di ujung posterior (Damaiyanti, 2015; Hartati and Fatimah, 2015).

Berdasarkan analisa ekstrak teripang emas melalui spektrofotometri didapatkan hasil sebagai berikut: (Damaiyanti, 2015).

Tabel 1.1. Kandungan ekstrak teripang emas (*Stichopus hermanii*)

No	Kandungan	Persentase (%)
1.	Air	5.65
2	Protein total	76.82
3	Asam amino esensial	48.11
4.	Asam amino non esensial	28.70
5.	Glikoprotein	4.62
6.	Kolagen	4.05
7.	Glikosaminoglikan	1.62
8	Asam hyaluronat	0.29
9.	Heparin	0.38
10.	Heparin sulfat	1.02
11.	Mukopolisakarida	0.69
12.	Proteoglikan	1.13
13.	EPA-DHA	0.16
14.	Alkaloid	0.11
15.	Flavonoid	0.16
16.	Tanin	0.02
17.	Glikosida	0.81
18.	Saponin	0.56
19.	Zn	0.01
20.	Sn	0.59

Senyawa aktif pada teripang emas banyak terlibat dalam proses penyembuhan, diantaranya asam amino, glikosaminoglikan (GAGs), omega-3 (EPA-DHA), saponin, dan trace element seperti seng dan kalsium.

Asam Amino

Para peneliti menemukan 11 asam amino pada teripang: *miristat*, *palmitat*, *palmitoleat*, *stearat*, *oleat*, *linoleat*, *arakhsidat*, *behenat*, *erusat*, *eicosapentaenat* (EPA) dan *docosahexaenat* (DHA). *Eicosapentaenat* (EPA) dan *docosahexaenat* (DHA) inilah yang mempercepat penyembuhan luka. Kandungan asam EPA dan DHA pada ekstrak cair teripang emas sebesar 0.16%. Nilai EPA yang besar menandakan kecepatan teripang memperbaiki jaringan rusak dan menghalangi pembentukan prostaglandin penyebab radang tinggi. Sedangkan DHA, asam lemak utama pada sperma dan otak serta retina mata. Asupan DHA tinggi dapat menurunkan trigliserida darah penyebab penyakit jantung. Kekurangan DHA menyebabkan penurunan serotin otak pemicu penyakit alzheimer dan depresi (Damaiyanti, 2015).

Seng (Zn)

Penelitian terhadap beberapa hewan percobaan dilaporkan bahwa terjadi akumulasi seng pada jaringan yang disembuhkan sebagai respon terhadap meningkatnya kebutuhan lokal seng pada jaringan yang disembuhkan. Seng berfungsi pada replikasi fibroblas, sintesa kolagen serta pengikatan silang kolagen. Hewan yang menderita defisiensi seng mengalami hambatan dalam penyembuhan luka dan garis bekas jahitan pada luka dapat dengan mudah pecah. Karakteristik ekstrak air teripang emas mengandung seng sebesar 0.01% (Damaiyanti, 2015).

Kalsium (Ca)

Kalsium (Ca) memiliki berbagai peran biologis dimana dibutuhkan untuk proses seperti *structural support*, perlekatan sel, mitosis, koagulasi darah, kontraksi otot dan sekresi kelenjar. Kalsium meregulasi sejumlah besar fisiologis tubuh seperti proliferasi, pensinyalan neuron, proses belajar, kontraksi, sekresi sehingga regulasi Ca intraseluler sangat penting (Damaiyanti, 2015).

Glikosaminoglikan (GAG)

Glikosaminoglikan mukopolisakarida terdiri dari sejumlah rantai karbohidrat kompleks yang dicirikan oleh kandungan gula amino dan asam uronat, jika rantai ini melekat pada molekul protein maka senyawa disebut sebagai suatu proteoglikan. Glikosaminoglikan bergabung dengan unsur-unsur pembentuk struktur jaringan seperti tulang, elastin, dan kolagen. Sifatnya yang menahan air dalam jumlah besar dan mengisi ruang sehingga menjadi bantalan atau pelumas. Contoh glikosaminoglikan adalah asam hialuronat, kondroitin sulfat dan heparin. *Fibroblast growth factor* (FGF) merupakan *growth factor* yang terikat pada glikosaminoglikan, faktor angiogenik yang kuat, menyebabkan migrasi sel epitel yang makin banyak, dan mempercepat kontraksi luka (Damaiyanti, 2015).

Glikosaminoglikan (GAGs) menyusun 3 tipe komponen pada *extracellular matrix* (ECM), di samping protein struktural fibrous dan sel protein adhesi. 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 (Damaiyanti, 2015).

Saponin

Senyawa saponin bekerja sebagai antibakteri yang dapat merusak membran sitoplasma dan membunuh sel. Mekanisme kerja senyawa flavonoid diduga mendenaturasi protein sel bakteri dan merusak membran sel tanpa dapat diperbaiki lagi, sehingga dapat mencegah infeksi pada bekas luka pencabutan. Saponin juga memacu pembentukan kolagen, yaitu protein struktur yang berperan dalam proses penyembuhan luka (Damaiyanti, 2015).

Omega-3

Omega-3 termasuk dalam asam lemak tak jenuh jamak *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) yang terbagi menjadi 2 grup penting yaitu asam lemak omega-3 dan asam lemak omega-6. Asam lemak omega-3 pada minyak ikan kaya akan EPA dan DHA yang berfungsi sebagai antiinflamasi. Omega-3 yang mempengaruhi produksi PGE-2, meningkatkan regulasi produksi kolagen, menyebabkan peningkatan sintesis kolagen dengan cara menurunkan faktor PGE-2 (Damaiyanti, 2015).

1.4.9 Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*)

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) banyak digunakan sebagai hewan coba karena mempunyai respon yang cepat serta dapat memberikan gambaran secara ilmiah, yang mungkin terjadi pada manusia maupun hewan lain. Dalam kode etik penelitian kesehatan dicantumkan bahwa salah satu prinsip dasar riset biomedis, dimana manusia sebagai subjek harus memenuhi prinsip ilmiah yang telah diakui dan harus didasarkan atas eksperimen laboratorium dan hewan percobaan yang memadai, serta berdasarkan pengetahuan yang lengkap dari literatur ilmiah. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) termasuk hewan nokturnal dan sosial. Salah satu faktor yang mendukung kelangsungan hidup tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan baik ditinjau dari segi lingkungan adalah temperatur dan kelembaban. Temperatur yang baik untuk tikus putih (*Rattus norvegicus*), yaitu 19-23°C, sedangkan kelembaban 40-70% (Wolfenshon and Lloyd, 2013). Taksonomi tikus putih (*Rattus norvegicus*):

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Klas	: Mamalia
Ordo	: Rodensia
Famili	: Muridae
Subfamili	: Murinae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>norvegicus</i>

Kelebihan tikus putih (*Rattus norvegicus*) sebagai binatang percobaan antara lain bersifat omnivora (pemakan segala), mempunyai jaringan yang hampir sama dengan manusia, dan gizi yang dibutuhkan juga hampir sama dengan manusia. Selain itu dari segi ekonomi memiliki harga yang murah, ukuran yang kecil, dan berkembang dengan cepat. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) percobaan galur Wistar yang dikembangkan secara luas sangat mudah menyesuaikan diri dengan lingkungan. Makanan tikus putih (*Rattus norvegicus*) juga mempunyai variasi susunan, meliputi: protein 20-25%, karbohidrat 45- 50%, serat 5%. Setiap hari seekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) dewasa membutuhkan makanan antara 12-20 gr, air minum antara 20-45 ml, mineral berupa besi sebesar 35 mg/kg (Smith and Mangkoewidjojo, 1998).

1.5 Hipotesis Penelitian

Terjadi penurunan ekspresi interleukin-8 (IL-8) dan peningkatan interleukin-10 (IL-10) setelah aplikasi kombinasi pasta teripang emas (*Stichopus hermannii*) dengan kalsium hidroksida pada pulpa gigi tikus wistar yang terinflamasi.

1.5.1 Hipotesis Nol (H_0)

Tidak terjadi penurunan ekspresi interleukin-8 (IL-8) dan peningkatan interleukin-10 (IL-10) setelah aplikasi kombinasi pasta teripang emas (*Stichopus hermannii*) dengan kalsium hidroksida pada pulpa gigi tikus wistar yang terinflamasi.

1.5.2 Hipotesis Kerja (H_1)

Terdapat penurunan ekspresi interleukin-8 (IL-8) dan peningkatan interleukin-10 (IL-10) setelah aplikasi kombinasi pasta teripang emas (*Stichopus hermannii*) dengan kalsium hidroksida pada pulpa gigi tikus wistar yang terinflamasi.

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu

2.1.1 Tempat Penelitian

Pembuatan sediaan pasta teripang emas (*Stichopus hermanii*) dikerjakan di Laboratorium Politeknik Negeri Ujung Pandang Makassar. Pemeliharaan hewan, preparasi, aplikasi bahan dan dekapitasi hewan coba tikus galur wistar (*Rattus norvegicus*) dilakukan di Rumah Sakit Hewan Pendidikan Universitas Hasanuddin Makassar. Pembuatan slide preparat dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin, Makassar. Pengamatan histologi dilakukan di Laboratorium Biokimia Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

2.1.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret-April 2024

2.2 Alat dan Bahan

2.2.1 Alat Penelitian

1. Pisau
2. Tabung *Erlenmeyer* (Pyrex®, Jepang)
3. Maserator elektrik (Toshiba®, Jepang)
4. Corong pemisah (Pyrex®, Jepang)
5. Rotary evaporator
6. Inkubator
7. *Autoclave*
8. Toples
9. Cawan porselen
10. Oven simplisia
11. Handskun dan masker
12. Spoit injeksi 1 ml (Shindobang®, Korea)
13. *Navytip Capillary*
14. Mikromotor *contra angle handpiece* (NSK, Nakamishi Inc, Japan)
15. Bur bulat diamond BR-49 (Mani Inc., Japan)
16. Micropipet
17. Set diagnostik : kaca mulut, ekskavator, pinset, sonde, *plastis instrument, ball applicator*
18. *Cotton pellet*
19. *Light cure* (Woodpacker, China)
20. Timbangan digital

2.2.2 Bahan Penelitian

1. Ekstrak teripang emas (*Stichopus hermanii*)

2. Kalsium hidroksida (UltraCal™ XS, Ultradent, USA)
3. Resin Modified Glass Ionomer Cement (Ionoseal, Voco, Germany)
4. Aquades
5. Alkohol
6. Ketamin 35 mg/kgBB
7. Xylazine 4 mg/kgBB
8. Larutan saline steril (Otsu-WI®)
9. Iodine
10. Kloroform
11. Metanol

2.3 Metode Penelitian

2.3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian *experimental laboratories* dengan desain penelitian *post-test only control group design*.

2.3.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah gigi tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi serta menerima tindakan penembusan atap pulpa pada gigi seri rahang bawah. Adapun kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

Kriteria Inklusi

1. Tikus wistar dalam keadaan sehat, aktivitas dan tingkah laku normal
2. Gigi seri rahang bawah tidak mengalami karies
3. Jaringan periodontal di sekitar gigi sehat

Kriteria Eksklusi

1. Tikus wistar dalam keadaan tidak aktif dan sakit
2. Tikus wistar mati dalam periode penelitian

2.3.3 Perhitungan Besar Sampel

Perhitungan besar sampel dalam penelitian ini menggunakan rumus Federer:

Keterangan:

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

n = jumlah sampel

t = jumlah kelompok penelitian

Cara perhitungan besar sampel:

t = 4 kelompok penelitian

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

$$3(n - 1) \geq 15$$

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 15 + 3$$

$$n \geq 6$$

Berdasarkan hasil perhitungan jumlah sampel untuk setiap kelompok perlakuan adalah 6 sampel. Jadi jumlah minimal sampel adalah $6 \times 4 = 24$. Untuk

memenuhi syarat distribusi normal pada uji statistik maka ditetapkan jumlah sampel untuk setiap perlakuan adalah 8. Jadi jumlah keseluruhan adalah $8 \times 4 = 32$ sampel. Pengamatan dilakukan pada 4 kelompok, yaitu:

- Kelompok 1 : kelompok kontrol positif (aplikasi kalsium hidroksida 100%), terdiri dari 6 ekor tikus wistar yaitu 2 ekor didekapitasi hari ke-1, 2 ekor didekapitasi hari ke-3, dan 2 ekor didekapitasi hari ke-5.
- Kelompok 2 : kelompok perlakuan 1 (aplikasi pasta teripang emas konsentrasi 25% dan kalsium hidroksida 75%), terdiri dari 6 ekor tikus wistar yaitu 2 ekor didekapitasi hari ke-1, 2 ekor didekapitasi hari ke-3, dan 2 ekor didekapitasi hari ke-5.
- Kelompok 3 : kelompok perlakuan 2 (aplikasi pasta teripang emas konsentrasi 50% dan kalsium hidroksida 50%), terdiri dari 6 ekor tikus wistar yaitu 2 ekor didekapitasi hari ke-1, 2 ekor didekapitasi hari ke-3, dan 2 ekor didekapitasi hari ke-5.
- Kelompok 4 : kelompok perlakuan 3 (aplikasi pasta teripang emas konsentrasi 75% dan kalsium hidroksida 25%), terdiri dari 6 ekor tikus wistar yaitu 2 ekor didekapitasi hari ke-1, 2 ekor didekapitasi hari ke-3, dan 2 ekor didekapitasi hari ke-5.

2.3.4 Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional

Variabel Penelitian

- Variabel bebas : kombinasi pasta teripang emas (*Stichopus hermanii*) dengan kalsium hidroksida dalam beberapa konsentrasi.
- Variabel antara : fase inflamasi
- Variabel terikat : ekspresi interleukin-8 (IL-8) dan interleukin-10 (IL-10)
- Variabel kendali : diameter dan kedalaman penembusan kavitas, waktu pengamatan 1, 3 dan 5 hari, konsentrasi pasta teripang emas (*Stichopus hermanii*), jenis kelamin, umur, berat badan, cara pemeliharaan, kesehatan dan jenis makanan, serta gigi tikus wistar yang digunakan

Definisi Operasional

1. Kalsium hidroksida adalah serbuk kalsium hidroksida murni berwarna putih dengan rumus kimia Ca(OH)_2 yang bersifat basa dengan pH 10-12.5.
2. Pasta teripang emas (*Stichopus hermanii*) adalah ekstrak yang diperoleh secara ekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% dengan cara maserasi dan evaporasi hingga diperoleh sediaan pasta.
3. Kombinasi pasta teripang emas (*Stichopus hermanii*) dengan kalsium hidroksida adalah sediaan yang diperoleh dari hasil pencampuran pasta teripang emas dan kalsium hidroksida berdasarkan perbandingan berat (mg/mg) yang diaplikasikan 1x sebanyak 0.5 mg pada pulpa gigi tikus galur wistar yang terinflamasi. Kombinasi perlakuan 1 sebesar 25% (ekstrak teripang 0.1 gr + Ca(OH)_2 0.4 gr), kombinasi perlakuan 2 sebesar 50% (ekstrak teripang 0.2 gr + Ca(OH)_2 0.2 gr), kombinasi perlakuan 3 sebesar 75% (ekstrak teripang 0.4 gr + Ca(OH)_2 0.1 gr)
4. Ekspresi interleukin-8 (IL-8) adalah jumlah sitokin IL-8 pada pemeriksaan

imunohistokimia menggunakan mikroskop cahaya dalam 4 lapangan pandang mikroskop, dihitung berdasarkan jumlah yang terdapat pada setiap sampel preparat.

5. Ekspresi interleukin-10 (IL-10) adalah jumlah sitokin IL-10 pada pemeriksaan imunohistokimia menggunakan mikroskop cahaya dalam 4 lapangan pandang mikroskop, dihitung berdasarkan jumlah yang terdapat pada setiap sampel preparat.
6. Pulpa terinflamasi adalah kondisi pulpa gigi tikus galur wistar yang mengalami inflamasi setelah dibuat iritan mekanik kavitas klas 1 menggunakan round bur ukuran 1/4 dengan kedalaman 0.5 mm hingga mencapai atap pulpa dan terlihat suatu titik berwarna merah.

2.4 Pelaksanaan Penelitian

2.4.1 Persiapan Sediaan Pasta Teripang Emas (*Stichopus hermanii*)

Ekstrak teripang emas (*Stichopus hermanii*) diperoleh melalui metode maserasi hasil freeze dried teripang emas (*Stichopus hermanii*) dengan pelarut etanol 96% mengacu pada penelitian Tamara (2015) dan Pringgenies (2017).

1. Teripang emas (*Stichopus hermanii*) segar dibersihkan dari organ bagian dalam dan dicuci bersih dengan air.
2. Teripang emas (*Stichopus hermanii*) diblender dengan aquades dan dikeringkan dengan alat freeze dryer.
3. Sampel kemudian dimasukkan dalam erlenmeyer, diberi pelarut metanol dengan perbandingan 1 (teripang) : 5 (etanol) sampai sampel terendam kemudian ditutup aluminium foil.
4. Dilakukan maserasi selama 3 hari dengan pelarut etanol kemudian disaring untuk mendapatkan ekstrak etanol teripang emas (*Stichopus hermanii*).
5. Hasil maserasi diuapkan dengan alat evaporator suhu 50°C dan disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit agar zat pelarut terpisah kemudian hasil penguapan didinginkan sehingga menghasilkan ekstrak kental teripang emas (*Stichopus hermanii*).
6. Ekstrak teripang emas (*Stichopus hermanii*) dan gliserin ditimbang dengan perbandingan 1:1 dan diletakkan di dalam cetakan plastic silinder molds berdiameter 5 mm dan tinggi 8 mm yang diletakkan di atas glass lab.
7. Ekstrak teripang emas (*Stichopus hermanii*) dan gliserin diaduk dengan spatula semen hingga homogen dan diperoleh konsistensi menyerupai pasta

2.4.2 Pengaplikasian pada Hewan Coba

Tikus wistar yang digunakan dalam penelitian ini diberi makan standar (pelet) dan air minum secara ad libitum. Tikus wistar dibagi secara random menjadi 4 kelompok yang terdiri dari 6 ekor. Tahapan persiapan hewan coba:

1. Anastesi IM dengan Ketamin 35 mg/kgBB dikombinasikan Xylazine 4 mg/kgBB
2. Rongga mulut didisinfeksi dengan iodine
3. Preparasi gigi seri rahang bawah dengan membentuk kavitas klas 1 (klasifikasi Black) dengan lebar 1 mm dan kedalaman mencapai atap pulpa menggunakan

round bur BR 49 (Mani, Inc Japan). Perdarahan dibersihkan menggunakan *cotton pellet* yang dibasahi larutan salin.

4. Dilakukan tindakan penembusan atap pulpa gigi hingga terlihat titik merah.
5. Pasta kalsium hidroksida diaplikasikan ke kelompok 1, kombinasi pasta teripang emas konsentrasi tertentu dengan kalsium hidroksida diaplikasikan pada kelompok 2, 3 dan 4 di atas pulpa gigi yang terpapar.
6. RMGIC diletakkan di atas pulpa yang terpapar menggunakan *ball applicator* sampai seluruh kavitas terisi.
7. Light curing 40 detik.
8. Hewan coba didekapitasi pada hari ke 1, ke-3 dan hari ke-5.

2.4.3 Pemeriksaan Imunohistokimia IL-8 dan IL-10

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 etanol absolut lalu alkohol 95% dan alkohol 70%, masing-masing 5 menit.
4. Bilas dengan air mengalir selama 5 menit.
5. Memasukkan preparat ke dalam buffer sitrat dan dipanaskan ke dalam microwave:
 - a. Cook I: power level 8 selama 5 menit (sampai titik didih pertama)
 - b. Cook II: power level 1 selama 5 menit
6. Dinginkan ± 30 menit dalam suhu ruang.
7. Bilas dengan *wash buffer* (PBS) 3x2 menit, keringkan air disekitar potongan jaringan.
8. Melingkari 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. Bilas dengan *wash buffer* (PBS) 3x2 menit.
11. Blocking preparat dengan meneteskan background blocker selama 5 menit
12. Buang cairan *blocking* tanpa dibilas.
13. Meneteskan preparat dengan antibodi primer IL-8 dan IL-10 dan biarkan selama 60 menit dalam rak inkubasi.
14. Bilas dengan *wash buffer* (PBS) 3x2 menit.
15. Meneteskan preparat dengan PolyVue Plus Enhancer secukupnya dan biarkan selama 10 menit dalam rak inkubasi.
16. Bilas dengan *wash buffer* (PBS) 3x2 menit.
17. Meneteskan preparat dengan PolyVue Plus HRP secukupnya dan biarkan selama 10 menit dalam rak inkubasi.
18. Bilas dengan *wash buffer* (PBS) 3x2 menit.
19. Meneteskan preparat dengan DAB + substrat dan biarkan selama 2-5 menit.
20. Bilas dengan *wash buffer* (PBS) 3x2 menit.
21. Counterstain preparat dengan pewarnaan hematoxylin eosin selama 1-2 menit.

22. Bilas dengan *wash buffer* (PBS) 3x2 menit.
23. Bilas dengan air mengalir selama 5 menit.
24. Dehidrasi dengan cara mencelupkan preparat secara berurutan dalam alkohol 70%, alkohol 96% dan etanol absolut masing-masing selama 5 menit.
25. Melakukan *mounting* dan tutup dengan kaca penutup

Slide imonohistokimia dinilai positif bila pada inti (tercat coklat atau hitam, diffuse/granular) untuk satu lapangan pandang dengan pembesaran 200x, 400x, dan 1000x. Penghitungan ekspresi slide imonohistokimia IL-8 dan IL-10 dilakukan secara semikuantitatif pada daerah odontoblas. Untuk slide imonohistokimia IL-8 dinilai persentase dan intensitas sel yang terwarnai dalam satu lapangan pandang.

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, yakni :

0 = negatif

1 - 3 = lemah

4 - 7 = sedang

8 - 16 = kuat

Untuk slide imonohistokimia IL-10 dinilai dengan skor :

0 = tidak ada sel yang terwarnai

1 = sel yang terwarnai < 10%

2 = sel yang terwarnai 10 - 50%

3 = sel yang terwarnai > 50%