

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pulp capping merupakan terapi pulpa vital yang bertujuan untuk melindungi dan mempertahankan vitalitas jaringan pulpa gigi yang disebabkan oleh karies sangat dalam atau pada pulpa terbuka tanpa sengaja dan tanpa riwayat nyeri dengan diagnosis pulpitis reversibel. Terapi pulpa vital dapat dilakukan melalui perawatan pulpotomi atau *pulp capping* yang terdiri atas *indirect pulp capping* dan *direct pulp capping* (Arandi and Thabet, 2021; Dimitraki *et al.*, 2019). Bahan *direct pulp capping* yang banyak digunakan adalah kalsium hidroksida (CaOH_2) (Morotomi *et al.*, 2019).

Bahan *pulp capping* harus memenuhi syarat yaitu: bersifat biokompatibel, dapat melindungi vitalitas pulpa, bersifat bakterisidal ataupun bakteriostatik, bersifat insulator terhadap iritasi kimiawi dan termal, tidak mudah larut dalam cairan tubuli dentin, dapat melekat dengan baik pada struktur enamel dan dentin, dapat bereaksi mengeras (*setting*), tampak radiopak pada gambaran radiografi, serta dapat menyediakan *bacterial sealing* (Sakaguchi *et al.*, 2018).

Kalsium hidroksida (Ca(OH)_2) masih sebagai *gold standard* bahan *pulp capping*. Bahan ini memiliki pH alkalis sekitar 12 yang bertanggung jawab menstimulasi fibroblas, memberikan sifat antibakteri yang sangat baik, menghambat pertumbuhan mikroorganisme, serta mendorong mekanisme penyembuhan dan pertahanan jaringan pulpa (Morotomi *et al.*, 2019; Islam *et al.*, 2023). Kalsium hidroksida juga memiliki kekurangan yaitu, kelarutan yang tinggi, pembentukan *tunnel defect*, ikatan yang lemah dengan dentin dan menyebabkan inflamasi pada pulpa. Kondisi ini menyebabkan nekrosis jaringan pada pulpa, peradangan kronis, dan penurunan viabilitas sel fibroblas (Nirwana *et al.*, 2021; Widjiastuti *et al.*, 2019). Berdasarkan kekurangan dari kalsium hidroksida, diperlukan bahan tambahan dari alam yang berpotensi mengimbangi kekurangan dari kalsium hidroksida sebagai bahan *pulp capping*.

Salah satu bahan alam yang memiliki potensi digunakan dalam pengembangan pengobatan adalah teripang emas (*Stichopus hermanii*). Teripang emas (*Stichopus hermanii*) mempunyai beberapa kandungan senyawa metabolit sekunder yang penting seperti saponin, flavonoid dan asam hialuronat (Susanto *et al.*, 2018; Tamara *et al.*, 2015; Ahmadzadeh-Asl *et al.*, 2011). Kandungan saponin teripang emas (*Stichopus hermanii*) terbukti mampu menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif seperti *Bacillus subtilis*, *Streptococcus mutans*, dan *Mixed Periodontopathogen* (Tamara *et al.*, 2015). Senyawa flavonoid pada teripang emas (*Stichopus hermanii*) mampu membentuk *resin tag* yang dapat digunakan sebagai bahan penutup pulpa untuk melindungi pulpa vital serta dapat mereduksi asam arakidonat yang dapat menurunkan respon inflamasi pada pulpa (Widjiastuti *et al.*, 2019). kandungan asam hialuronat dalam ekstrak teripang emas (*Stichopus hermanii*) juga tinggi (Ahmadzadeh-Asl *et al.*, 2011). Senyawa ini bermanfaat sebagai

agen reparatif sehingga diharapkan dapat membantu mengurangi munculnya *tunnel defects* pada morfologi *barrier insulator* yang terbentuk oleh bahan kalsium hidroksida (Bogović *et al.*, 2011). Menurut Casale *et al.*, asam hialuronat 0.8% murni memberi efek yang baik bagi regenerasi jaringan keras (Casale *et al.*, 2016).

Ekstrak teripang emas (*Stichopus hermanii*) diharapkan memiliki sifat biokompatibel, yaitu tidak berbahaya bagi pulpa dan jaringan lunak, tidak mengandung zat yang dapat menimbulkan respon sistemik bila terdifusi atau diserap ke dalam sistem sirkulasi, dan tidak memiliki potensi karsinogenik (Walean *et al.*, 2021). Meskipun memiliki banyak kandungan yang bermanfaat namun perlu dilakukan uji sitotoksitas pada teripang emas (*Stichopus hermanii*) untuk mengevaluasi tingkat sitotoksitasnya sebelum digunakan (Salwa *et al.*, 2021; Walean *et al.*, 2021).

Uji sitotoksitas *in vitro* yang paling sering digunakan untuk mengetahui keamanan bahan terhadap sel adalah kultur sel fibroblas *Baby Hamster Kidney-21* (BHK-21) (Saputri *et al.*, 2019), sedangkan metode yang sering digunakan adalah *Microculture Tetrazolium Technique Assay* (MTT- Assay) (Salwa *et al.*, 2021). Sel yang paling banyak diteliti dalam uji sitotoksitas material di bidang kedokteran gigi yaitu sel fibroblas BHK-21 karena paling mirip dengan kemampuan fibroblas manusia dalam menghasilkan *growth factor*. Oleh karena itu, penulis tertarik meneliti biokompatibilitas ekstrak teripang emas (*Stichopus hermanii*) dengan menguji sitotoksitasnya terhadap kultur sel fibroblas BHK-21 menggunakan metode MTT-assay.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, dapat dirumusan masalah yaitu bagaimana aktivitas sitotoksik ekstrak teripang emas (*Stichopus hermanii*) kombinasi kalsium hidroksida terhadap kultur sel fibroblas BHK-21?

1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian

1.3.1 Tujuan Penelitian

Tujuan Umum

Mengevaluasi sitotoksitas kombinasi ekstrak teripang emas (*Stichopus hermanii*) kombinasi kalsium hidroksida terhadap persentase viabilitas sel fibroblas BHK-21 secara *in vitro*.

Tujuan Khusus

1. Menilai viabilitas sel fibroblas BHK-21 setelah pemberian kombinasi ekstrak teripang emas (*Stichopus hermanii*) konsentrasi 0.2% dengan kalsium hidroksida.
2. Menilai viabilitas sel fibroblas BHK-21 setelah pemberian kombinasi ekstrak teripang emas (*Stichopus hermanii*) konsentrasi 0.4% dengan kalsium hidroksida.
3. Menilai viabilitas sel fibroblas BHK-21 setelah pemberian kombinasi ekstrak teripang emas (*Stichopus hermanii*) konsentrasi 0.8% dengan kalsium hidroksida.

1.3.2 Manfaat Penelitian

Manfaat Umum

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah dan sebagai bahan referensi penelitian selanjutnya mengenai sitotoksitas ekstrak teripang emas (*Stichopus hermanii*) kombinasi kalsium hidroksida.

Manfaat Khusus

1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai sitotoksitas ekstrak teripang emas (*Stichopus hermanii*) kombinasi kalsium hidroksida terhadap kultur sel fibroblas BHK-21 sehingga dapat menjadi acuan pada uji klinis selanjutnya.
2. Sebagai informasi bagi dokter gigi tentang sitotoksitas ekstrak teripang emas (*Stichopus hermanii*) kombinasi kalsium hidroksida sebagai potensi bahan tambahan pada perawatan *pulp capping*.

1.4 Pulp Capping

Pulpa gigi adalah jaringan yang kaya persarafan dan vaskular, terbungkus oleh lapisan enamel dan dentin, dalam hubungan anatomi dan fungsional disebut sebagai kompleks dentin-pulpa (Yong and Cathro, 2021). Dentin bertugas sebagai barier yang melindungi pulpa gigi dari kontak langsung terhadap rangsangan eksternal yang berpotensi merusak jaringan (Nie *et al.*, 2021). Paparan terhadap pulpa gigi vital dapat disebabkan oleh proses karies gigi, paparan mekanis, dan cedera traumatis (Islam *et al.*, 2023). Prosedur *pulp capping* diindikasikan hanya pada gigi permanen muda (Arandi and Thabet, 2021). *Pulp capping* adalah prosedur mengaplikasikan bahan biokompatibel dan bioinduktor ke dalam jaringan pulpa yang terbuka untuk mempertahankan vitalitasnya dan menginduksi diferensiasi *odontoblast-like cells*, serta memperbaiki jaringan dentin yang terbuka dengan pembentukan dentin reparatif (Widjiastuti *et al.*, 2019). *Pulp capping* juga merupakan perawatan untuk pulpa vital yang terbuka yang melibatkan penempatan bahan gigi diatas area yang terbuka untuk memfasilitasi pembentukan barier, pelindung, dan pemeliharaan pulpa vital (Komabayashi *et al.*, 2016).

Tujuan dari perawatan ini adalah untuk menutup pulpa, sehingga melindungi dari penetrasi bakteri, untuk menginduksi pembentukan dentin *bridge* dan menjaga kesehatan jaringan pulpa. *Dentinal bridge* sering digambarkan sebagai dentin reparatif (Widjiastuti *et al.*, 2019). Keberhasilan *direct pulp capping* bergantung pada biokompatibilitas terhadap jaringan dan komposisi fisikokimia yang efektif (Widjiastuti *et al.*, 2019).

1.5 Bahan Pulp Capping

1.5.1 Kalsium Hidroksida (Ca(OH)₂)

Kalsium hidroksida telah lama dianggap sebagai *gold standart* dalam terapi pulpa vital (Yong and Cathro, 2021). Kelebihan Ca(OH)₂ antara lain: bersifat bakterisidal, bakteriostatik dengan toksisitas yang rendah, merangsang

penyembuhan dan perbaikan, memiliki *potential of hydrogen* (pH) tinggi yang akan menstimulasi pembentukan sel fibroblas, menghentikan resorpsi interna, dan dapat menetralkan pH asam yang rendah. Sediaan ekstrak $\text{Ca}(\text{OH})_2$ paling banyak dipakai daripada yang berbentuk bubuk karena lebih mudah diaplikasikan atau diinsersikan pada saluran akar (Sulistyo *et al.*, 2023). Adapun kekurangan dari kalsium hidroksida yaitu dapat menyebabkan peradangan pulpa dalam jangka waktu tertentu hingga tiga bulan, memberikan respon jaringan pulpa tidak dapat diprediksi dan menyebabkan pembentukan dentin reparatif yang tidak teratur yang berpotensi terbentuk *tunnel defects* (Widjiastuti *et al.*, 2019).

1.5.2 Mineral Trioxide Aggregate (MTA)

Mineral Trioxide Aggregate (MTA) adalah bahan berbasis semen Portland dengan ketahanan superior terhadap kebocoran dan memiliki hasil jangka panjang yang lebih baik daripada kalsium hidroksida pada perawatan *pulp capping* karena mempunyai keunggulan sebagai bahan pilihan dalam pengelolaan pulpa terbuka, sifat biologis, sifat mekanik bahan dan *sealing ability* (Yong and Cathro, 2021). Bahan ini mengandung campuran trikalsium silikat, trikalsium aluminat, dikalsium silikat, tetrakalsium aluminoferrit sebagai konstituen utama, selain bismut oksida dan kalsium sulfat (Arandi and Thabet, 2021; Matsuura *et al.*, 2021).

Mineral Trioxide Aggregate mempunyai dua varian yaitu MTA putih dan MTA abu-abu. *Mineral Trioxide Aggregate* putih diperkenalkan mengatasi perubahan warna gigi akibat MTA abu-abu. *Mineral Trioxide Aggregate* putih memiliki komposisi yang mirip dengan MTA abu-abu, tetapi tidak mengandung tetrakalsium aluminoferrit dan memiliki kadar aluminat yang lebih rendah. Selain mempunyai beberapa kelebihan, MTA memiliki beberapa kekurangan yaitu *setting time* yang lama, sifat mekanik yang buruk, perubahan warna gigi, penanganan yang sulit, dan relatif mahal (Arandi and Thabet, 2021; Moussa, 2018).

1.5.3 Semen Berbasis Kalsium Silikat Bioaktif (Biodentine)

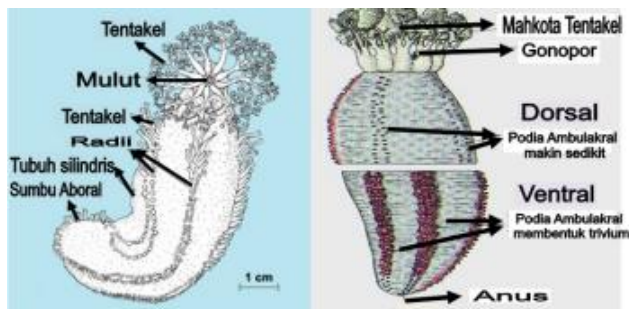
Biodentine adalah bahan kalsium silikat bioaktif dengan kemurnian tinggi yang disintesis untuk mendapatkan kekuatan mekanik yang tinggi dan waktu pengerasan yang singkat serta memiliki sifat mekanis, biokompatibilitas, dan sifat bioaktif yang baik. Biodentine memiliki kegunaan beragam bagi beberapa kondisi klinis seperti *pulp capping*, pulpotomi, dan penutupan ujung akar (Annisa and Pertiwi, 2018; Matsuura *et al.*, 2021).

Biodentine bekerja secara efektif melawan infeksi mikroba karena kemampuannya menginduksi pH tinggi (Rajendran *et al.*, 2017). Keunikan Biodentine tidak hanya terletak pada sifat bioaktif dan kimianya untuk melindungi pulpa, tetapi pada aplikasinya yang universal, baik pada mahkota gigi diindikasikan untuk *pulp capping* atau akar gigi (Annisa and Pertiwi, 2018).

1.6 Teripang emas (*Stichopus hermannii*)

Teripang adalah golongan invertebrata laut bertubuh lunak dimana tempat hidupnya adalah di perairan dangkal hingga perairan dalam, dengan kondisi dasar

pasir berlumpur diantara batuan karang (Nurwidodo *et al.*, 2018; Pangestuti and Arifin, 2018). Salah satu komoditas ekspor bidang perikanan yang sangat potensial, mempunyai prospek cukup baik dan bernilai ekonomis tinggi, baik di pasaran domestik maupun internasional (Nurwidodo *et al.*, 2018; Hartati *et al.*, 2016; Damaiyanti, 2015). Hampir semua jenis teripang dapat dengan mudah dikenali melalui bentuk tubuhnya yang bulat memanjang seperti mentimun (*cucumber shaped*) oleh karena itu di Indonesia teripang emas dikenal dengan nama lokal timun laut, gamat emas, gamat kacang, dan taikongkong (Nurwidodo *et al.*, 2018; Pangestuti and Arifin, 2018). Permukaan tubuhnya yang bertekstur halus licin hingga kasar, berwarna hitam polos, hijau, hingga merah terang atau putih dengan bercak hitam. Hewan ini biasanya lunak dan bila diangkat dari habitatnya akan mengeluarkan air maupun isi perutnya dari lubang di ujung tubuhnya (Nurwidodo *et al.*, 2018). Morfologi atau bentuk tubuh teripang ditunjukkan pada gambar 1.1 (Nurwidodo *et al.*, 2018).



Gambar 1.1 Morfologi Teripang. Sumber: Nurwidodo *et al.*, 2018.

Hewan ini termasuk dalam kelas *Holothuroidea* dari bangsa *Echinodermata* yang merupakan hewan tidak bertulang belakang dan bertubuh lunak atau berduri (Suryaningrum, 2008). *Echinodermata* memiliki 5 kelas yaitu kelas *Asteroidea* (bintang laut), kelas *Ophiuroidea* (bintang laut), kelas *Echinoid* (landak laut), kelas *Crinoidea* (lili laut), dan kelas *Holothuridea* (teripang laut) (Katili, 2011). *Holothuridae* atau teripang memiliki 3 famili yaitu *Holothuridae* (genus *Actinopyga* dan *Holothuria*), *Stichopodidae* (genus *Stichopus*) dan *Synaptidae* (genus *Synapta*) (Hartati *et al.*, 2016). Pada penelitian ini, jenis teripang yang digunakan adalah teripang emas (*Stichopus hermannii*). Berdasarkan taksonomi, klasifikasi teripang emas (*Stichopus hermannii*) yaitu: (Hartati *et al.*, 2016; Akram *et al.*, 2011; Nurwidodo *et al.*, 2018):

Kingdom : *Animalia*
 Phylum : *Echinodermata*
 Subphylum : *Eleutherozoa*
 Infraphylum : *Echinozoa*
 Class : *Holothuroidea*
 Subclass : *Aspidochirotea*
 Order : *Aspidochirotida*

Family : *Stichopodidae*
Genus : *Stichopus*
Specific name : *hermanii*
Scientific name : *Stichopus hermanii*



Gambar 1.2 *Stichopus hermanii* atau Teripang Emas. Sumber:
<https://unair.ac.id/perubahan-kadar-gula-darah-usai-diberi-ekstrak-teripang-emas-Sticophus-hermanii>, 2019.

Indonesia merupakan negara penghasil teripang terbesar di dunia (Damaiyanti, 2015a). Teripang emas (*Stichopus hermanii*) umumnya digunakan dalam bentuk bubuk (gamat). Gamat biasanya diformulasikan menjadi lotion atau salep topikal. Teripang kaya akan *growth factor* sehingga dapat memperbaiki sel-sel rusak. Kandungan protein teripang mencapai 82% dari seluruh komponen teripang, dan 80% bagian dari protein tersebut merupakan kolagen (Damaiyanti, 2015a). Hasil analisis laboratorium menunjukkan bahwa ekstrak teripang kering mengandung protein sampai 86.8%, kolagen 80%, mineral, mukopolisakarida, glukosaminoglikan (GAG), antiseptik alamiah, kondroitin, omega-3, omega-6, dan omega-9, serta berbagai asam amino (Suryaningrum, 2008). Kandungan lain teripang adalah asam lemak esensial, berguna memperkuat sel hati untuk mengeluarkan antibodi. Teripang biasa disebut sebagai imunomodulator. Produk ekstrak teripang menunjukkan peningkatan proliferasi fibroblas, hal ini dimungkinkan karena ekstrak teripang 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. Kandungan lain teripang emas yang diduga mempunyai pengaruh terhadap penyembuhan luka adalah omega-3 dan saponin (Damaiyanti, 2015). Teripang emas (*Stichopus hermanii*) memiliki aktivitas EPA dan DHA yang tinggi, ditandai dengan aktivitas *superoxide dismutase* (SOD) yang berperan dalam mencegah stres oksidatif (Setianingsih and Riami, 2021).

Menurut Mamelona *et al.*, (2007) teripang memiliki sifat antiinflamasi, antibakteri, dan aktivitas antioksidan yang sangat penting untuk mempercepat proses penyembuhan luka. Sementara itu, aktivitas antioksidan teripang disebabkan oleh

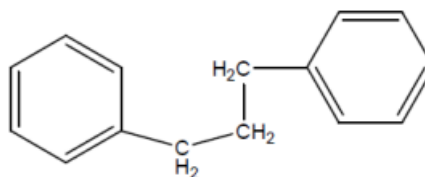
kandungan fenoliknya, khususnya flavonoid, yang bertindak melawan reaksi oksidatif, terutama yang dipicu oleh radikal peroksid, sehingga menurunkan risiko kerusakan oksidatif pada jaringan (Zohdi *et al.*, 2011).

Menurut Damaiyanti *et al.*, (2015a) setelah dilakukan uji karakteristik ekstrak teripang emas (*Stichopus hermannii*) terdapat air (5.65%), protein total (76.82%), asam amino esensial (48.11%), asam amino non esensial (28.70%), glikoprotein (4.62%), kolagen (4.05%), glikosaminoglikan (1.62%), asam hialuronat (0.29%), heparin (0.38%), heparin sulfat (1.02%), mukopolisakarida (0.69%), proteoglikan (1.13%), EPA-DHA (0.16%), alkaloid (0.11%), flavonoid (0.16%), tanin (0.02%), glikosida (0.81%), saponin (0.56%), Zn (0.01%), Ca (0.59%) (Mulawarmanti, 2019).

1.7 Kandungan Ekstrak Teripang emas (*Stichopus hermannii*)

1.7.1 Flavonoid

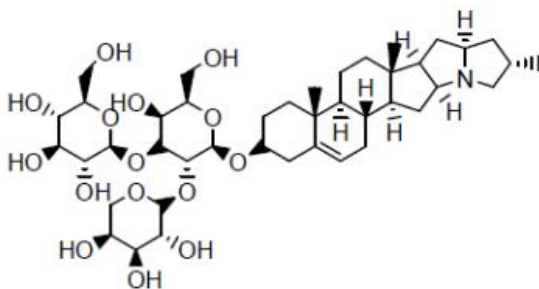
Flavonoid merupakan senyawa yang memiliki efek antibakteri (Othman *et al.*, 2019; Rahmani *et al.*, 2021). Menurut Othman *et al.*, flavonoid menunjukkan aktivitas bakterisidal dan bakteriostatik terhadap spesies Gram-positif dan Gram-negatif (Othman *et al.*, 2019). Mekanisme kerja senyawa flavonoid yaitu menyebabkan koagulasi atau penggumpalan protein sel dan menghambat enzim DNA bakteri (Rahmani *et al.*, 2021). Flavonoid dalam konsentrasi tinggi menyebabkan kerusakan membran sel bakteri secara total dan mengendapkan protein sel, sedangkan dalam konsentrasi rendah menyebabkan kebocoran sel bakteri sehingga metabolit-metabolit penting keluar dari sel bakteri (Mufti *et al.*, 2017).



Gambar 1.3 Struktur Senyawa Flavonoid. Sumber: Noer *et al.*, 2018.

1.7.2 Saponin

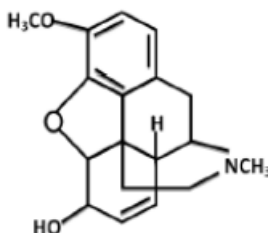
Senyawa saponin bekerja sebagai antibakteri dengan cara merusak membran sitoplasma dan membunuh sel (Damaiyanti, 2015a). Saponin bersifat antioksidan sehingga berpotensi sebagai imunomodulator yang dapat meningkatkan jumlah makrofag (Astuti *et al.*, 2018; Supriatna *et al.*, 2019). Senyawa saponin berperan meningkatkan ekspresi TGF- β yang dapat menambah jumlah makrofag (Astuti *et al.*, 2018). Saponin mengandung *aglycone* bersifat membranolitik yang dapat menurunkan tegangan dinding sel bakteri (Rahmani *et al.*, 2021). Tegangan permukaan dinding sel bakteri yang menurun menyebabkan kebocoran sel sehingga senyawa intraseluler keluar, dan menyebabkan pertumbuhan sel bakteri terhambat (Mufti *et al.*, 2017).



Gambar 1.4 Struktur Senyawa Saponin. Sumber: Noer *et al.*, 2018.

1.7.3 Alkaloid

Alkaloid adalah senyawa hasil akhir dari reaksi detoksifikasi tanaman, merupakan kelompok metabolit sekunder terdiri dari struktur heterosiklik yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen (Othman *et al.*, 2019; Rostikawati, 2020). Alkaloid dikenal baik dalam pengobatan tradisional maupun modern karena memiliki beberapa aktivitas farmakologis (Othman *et al.*, 2019). Alkaloid memiliki potensi sebagai antibakteri (Rostikawati, 2020). Aktivitas alkaloid yaitu mengganggu stabilitas komponen penyusun peptidoglikan dinding sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel bakteri tidak terbentuk utuh dan menyebabkan kematian bakteri (Rostikawati, 2020; Tjandra *et al.*, 2020).

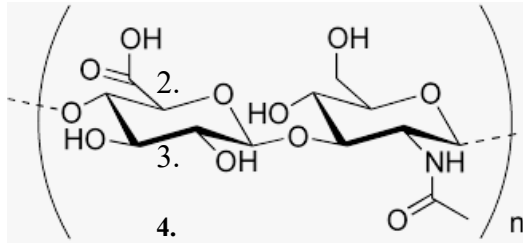


Gambar 1.5 Struktur Senyawa Alkaloid.
Sumber: Onyema and Ogbuagu, 2016.

1.7.4 Asam Hialuronat

Asam hialuronat (HA) adalah mukopolisakarida alami, polimer karbohidrat dari kelompok glikosaminoglikan nonsulfat alami dengan berat molekul tinggi 4000-20.000.000 Da. Struktur HA terdiri dari unit disakarida polianionik dari asam glukuronat dan N-asetil glukosamin yang dihubungkan melalui ikatan β-3 dan β-4 secara bergantian (Casale *et al.*, 2016; Bogović *et al.*, 2011).

Asam hialuronat disintesis pada permukaan sitoplasma membran plasma dan umum terjadi pada manusia dan vertebrata lainnya. Asam hialuronat adalah glikosaminoglikan anionik yang didistribusikan secara luas melalui jaringan ikat, epitel, dan saraf (Bogović *et al.*, 2011; Asgary *et al.*, 2018).



Gambar 1.6 Struktur Senyawa Asam Hialuronat. Sumber: https://id.wikipedia.org/wiki/Asam_hialuronat, 2023.

1.8 Sel Fibroblas

Fibroblas adalah sel yang paling banyak terdapat dalam jaringan ikat, berbentuk memanjang, mensintesis beberapa komponen matriks ekstraseluler seperti kolagen, elastin dan memiliki retikulum endoplasma kasar dalam jumlah banyak (Damayanti and Wathon, 2017; Churiyah *et al.*, 2016). Sel fibroblas merupakan komponen terpenting dan terbesar dari pulpa, ligamen periodontal, dan gingiva (Meilena *et al.*, 2018). Fungsi utama fibroblas adalah menjaga integritas jaringan pendukung dengan cara mengatur perubahan umur matriks ekstraseluler secara berkesinambungan dan menghasilkan, mensintesis, mempertahankan kolagen dan matriks serta substansi dasar pulpa dan mengubah struktur pulpa jika ada penyakit (Walton and Torabinejad, 2002; Kurniawati *et al.*, 2015).

Sel fibroblas BHK-21 adalah sel fibroblas yang diperoleh dari ginjal hamster (Andiana, 2017). Kultur sel fibroblas BHK-21 sering digunakan untuk uji sitotoksitas bahan dan obat-obatan di bidang kedokteran gigi (Saputri *et al.*, 2019). Sel fibroblas BHK-21 memiliki kecepatan pertumbuhan sangat baik, kemampuan melekat yang tinggi, regenerasi cepat dan kemampuan memperbanyak diri serta integritas sel tetap terjaga (Budiatin *et al.*, 2016; Kurniawati *et al.*, 2015).

1.9 Uji Toksisitas

Uji toksisitas dilakukan untuk menganalisis biokompatibilitas sediaan baru terhadap sel fibroblas (Saputri *et al.*, 2019). Faktor yang menentukan sifat toksik dari suatu senyawa adalah dosis, konsentrasi bahan, sifat senyawa, paparan terhadap organisme dan bentuk efek yang ditimbulkan. Uji toksisitas merupakan suatu uji untuk menentukan potensial suatu senyawa sebagai racun, mengenali kondisi biologis setelah efek toksik tersebut timbul dan mengenali karakteristik efek tersebut. Uji toksisitas dilakukan terlebih dahulu sebagai tahap awal penilaian biokompatibilitas suatu bahan dan mengetahui efek toksik dari suatu bahan secara langsung terhadap kultur sel (Ma'at, 2019).

Sel yang sering digunakan untuk uji toksisitas di bidang kedokteran gigi adalah kultur sel fibroblas *Baby Hamster Kidney-21* (BHK-21) (Saputri *et al.*, 2019). Persentase viabilitas sel menunjukkan pertumbuhan dan jumlah sel yang hidup (Sulistyo *et al.*, 2023; Walean *et al.*, 2021). Hasil tes menggunakan sel fibroblas BHK-21 dapat digunakan sebagai dasar untuk pengujian yang akurat (Saputri *et al.*, 2019).

1.10 Klasifikasi Uji toksisitas

Uji toksisitas terhadap biokompabilitas bahan dapat diklasifikasikan sebagai berikut (Leha *et al.*, 2020) :

1. Uji primer yaitu uji toksisitas bahan secara *in vitro* dengan cara dikontakkan secara langsung pada kultur sel. Uji primer digunakan sebagai *screening* atau uji pendahuluan terhadap suatu bahan baru.
2. Uji sekunder, yaitu evaluasi kemampuan bahan untuk berinteraksi dengan sistem biologis hewan coba untuk menimbulkan toksisitas sistemik, mengetahui respon imun, iritasi mukosa, dan toksisitas kronis suatu bahan.
3. Uji aplikasi klinis, yaitu uji secara klinis pada manusia atau pada hewan yang memiliki kesamaan anatomi dengan manusia. Pada uji klinis, suatu bahan ditempatkan pada jaringan yang sama dengan fungsinya ketika bahan tersebut digunakan pada saat praktek klinis.

1.11 MTT-Assay

Uji MTT penggunaannya mudah dilakukan, memerlukan waktu yang relatif singkat, memiliki keakuratan yang baik, dan dapat digunakan untuk mengukur sampel dalam jumlah besar. Prinsip uji MTT dalam menentukan viabilitas sel adalah penentuan fungsi mitokondria dengan mengukur aktivitas enzim mitokondria seperti enzim suksinat dehidrogenase. *Nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen* (NADH) akan mereduksi garam MTT menjadi kristal formazan ungu yang tidak larut dalam air. Oleh karena itu, sebelum mengukur absorbansi, diperlukan pelarut organik seperti SDS atau isopropanol untuk melarutkan kristal. Hasil dari uji MTT dibaca dengan *ELISA reader* dan diukur dengan absorbansi cahaya pada panjang gelombang 595 nm. Konsentrasi formazan ungu dapat ditentukan dengan spektrofotometri visibel. Konsentrasi formazan berbanding lurus dengan jumlah sel hidup. Semakin besar daya absorbansi maka semakin banyak juga jumlah sel yang hidup. Perubahan garam MTT menjadi formazan ungu dipengaruhi oleh durasi inkubasi. Semakin lama durasi inkubasi akan menghasilkan akumulasi warna dan peningkatan sensitivitas hingga batas tertentu. Namun, waktu inkubasi memiliki batasan durasi karena terdapat sifat sitotoksik dari reagen MTT jika diinkubasi melebihi batas waktu tertentu. Sel yang mati akan kehilangan kemampuan untuk mengubah garam MTT menjadi formazan ungu sehingga perubahan warna menjadi indikator viabilitas sel. Hasil pembacaan dari *ELISA reader* adalah *optical density*. *Optical density* adalah rasio intensitas logaritmik dari cahaya yang jatuh pada material dengan cahaya yang ditransmisikan ke suatu material. Viabilitas sel dihitung untuk menentukan persentase jumlah sel yang hidup setelah diberi paparan (Sulistyo *et al.*, 2023).

1.12 Hipotesis Penelitian

Kombinasi ekstrak teripang emas (*Stichopus hermannii*) dengan kalsium hidroksida terhadap sel fibroblas BHK-21 memiliki aktivitas sitotoksik rendah.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian adalah *True experimental laboratories* dengan rancangan penelitiannya yaitu *post-test only control group design*.

2.2 Tempat dan Waktu

2.2.1 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan mulai bulan Februari - Maret 2024

2.2.2 Tempat Penelitian

1. Pembuatan sediaan ekstrak teripang emas (*Stichopus hermannii*) dikerjakan di Teknik Kimia, Politeknik Negeri Ujung Pandang.
2. Uji toksisitas ekstrak teripang emas (*Stichopus hermannii*) terhadap kultur sel fibroblas BHK-21 dengan metode MTT-assay dilakukan di Laboratorium Pengujian Mutu dan Pengembangan Produk Pusat Veteriner Farma (PUSVETMA) Surabaya.

2.3. Variabel dan Definisi Operasional Penelitian

2.3.1 Variabel Penelitian

Variabel bebas: ekstrak teripang emas (*Stichopus hermannii*), bubuk kalsium hidroksida

Variabel terikat: kultur sel fibroblas

Variabel antara: uji sitotoksitas

Variabel terkontrol:

1. Waktu inkubasi selama 24 jam
2. Metode yang digunakan adalah metode MTT-assay
3. Media kultur sel fibroblas BHK-21 yang digunakan adalah media *eagle's*
4. Penggunaan alat, bahan dan media yang steril
5. Kalsium hidroksida (*Emsure for Analysis*)

2.3.2 Definisi Operasional Penelitian

1. Ekstrak teripang emas adalah hasil ekstraksi teripang emas (*Stichopus hermannii*) dengan cara maserasi menggunakan pelarut metanol, dibuat dalam sediaan pasta dengan konsentrasi 0.2%, 0.4% dan 0.8%.
2. Kalsium hidroksida adalah bubuk kalsium hidroksida murni berwarna putih dengan rumus kimia Ca(OH)_2 (*Emsure for Analysis*).
3. Kombinasi ekstrak teripang emas (*Stichopus hermannii*) dengan kalsium hidroksida adalah kombinasi kedua bahan ditambah *propylene glycol* dengan perbandingan 1 gr : 1.5 gr : 0.375 gr kemudian diaduk sampai homogen hingga diperoleh konsistensi berupa pasta.

4. Sel fibroblas adalah sel yang berasal dari stem sel fibroblas BHK-21 berbentuk *cell line* dan dibiakkan secara murni pada media *Eagle's*.
5. Uji sitotoksitas adalah viabilitas sel fibroblas BHK-21 terhadap ekstrak teripang emas (*Stichopus hermanii*), dihitung menggunakan metode MTT-assay berdasarkan ELISA *reader* pada panjang gelombang 620nm dengan gambaran berwarna biru formazan pada sel yang hidup.

2.4 Sampel Penelitian

2.4.1 Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah sel fibroblas BHK-21.

2.4.2 Sampel

Penentuan jumlah sampel menggunakan rumus Federer:

$$(t - 1) (r - 1) \geq 15$$

Keterangan:

t = jumlah perlakuan

r = jumlah sampel

jumlah perlakuan = 6, t = 6

$$(t - 1) (r - 1) \geq 15$$

$$(6 - 1) (r - 1) \geq 15$$

$$6r - r - 6 + 1 \geq 15$$

$$5r - 5 \geq 15$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq 4$$

Berdasarkan hasil perhitungan jumlah sampel untuk setiap kelompok perlakuan adalah 4 sampel. Jadi jumlah sampel minimal adalah $4 \times 6 = 24$ sampel. Untuk memenuhi syarat distribusi normal pada uji statistik maka ditetapkan jumlah sampel untuk setiap perlakuan adalah 5. Jadi sampel keseluruhan adalah $5 \times 6 = 30$ sampel.

Berdasarkan perhitungan diatas, didapatkan jumlah sampel total pada semua kelompok perlakuan yaitu 30 sampel. Maka jumlah minimal pengulangan untuk setiap perlakuan adalah 5 kali.

2.5 Alat dan Bahan

2.5.1 Alat Penelitian

Alat Pembuatan Ekstrak Teripang Emas (*Stichopus hermanii*)

1. *Beaker glass* (Pyrex, Japan)
2. Gelas ukur (Pyrex, Japan)
3. Kertas saring (Whatman no.40, UK)
4. Gunting
5. Oven (Memmert GmnH & Co. KG, tipe 300, Germany)
6. Blender (Phillips, Indonesia)
7. Pisau *stainless steel*
8. Tampah

9. Timbangan digital (*Electronic Balance*. BS 600 H, USA)
10. Pengaduk
11. *Rotary evaporator* (Heidolph, Laborota 4000, Germany)
Alat untuk Uji sitotoksitas
12. *96-sumuran tissue culture plate* (Nune, USA)
13. Botol kultur (Roux, Schott Duran, Germany)
14. *Elisa reader* (Thermo Scientific, USA)
15. *Automatic plate shaker* (Vari shaker, USA)
16. Inkubator CO₂ (Mettler, Germany)
17. *Microscope inverted* (Nikon, Jepang)
18. *Multichannel pipette* (ICN, Germany)
19. *Laminar flow hood* (Clemco, Australia)

2.5.2 Bahan Penelitian

1. Teripang emas (*Stichopus hermannii*)
2. Bubuk kalsium hidroksida (Emsure for Analysis)
3. Kultur sel: cell line BHK-21
4. Media Eagle's
5. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Sigma-USA)
6. Media Mueller Hinton Agar (MHA)
7. Pencuci serum: Phosphate Buffer Saline (PBS)
8. Fetal bovine serum (FBS) 10%Fetal bovine serum (FBS) 10%
9. Akuades
10. Metanol
11. Propylene Glycol
12. Trypsine Versene

2.6 Prosedur Penelitian

2.6.1 Persiapan Pembuatan Ekstrak Teripang Emas (*Stichopus hermannii*)

Ekstrak teripang emas (*Stichopus hermannii*) diperoleh melalui metode maserasi hasil *freeze dried* teripang emas (*Stichopus hermannii*) dengan pelarut metanol mengacu pada penelitian Monika (2021), Safithri *et al* (2020), Safithri *et al* (2022).

1. Teripang emas dibersihkan dan dipisahkan bagian daging dan jeroannya menggunakan gunting dan dicuci bersih dengan air.
2. Teripang emas diblender dengan aquades dan dikeringkan dengan alat *freeze dryer* bersuhu -50°C selama 24 jam.
3. Setelah itu dilakukan maserasi selama 3 hari dengan pelarut metanol dengan perbandingan 1 (teripang) : 5 (metanol) dan diaduk dengan *orbital shaker* dalam wadah tertutup.
4. Proses maserasi dilakukan ditempat gelap dan terlindungi dari cahaya matahari.
5. Proses maserasi dilakukan 3 kali sampai didapatkan maserat berwarna bening.

6. Hasil maserasi yang berupa larutan disaring dengan kertas saring sehingga didapat filtrat dan residu.
7. Filtrat yang diperoleh disentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm selama 10 menit dan filtrasi dipekatkan dengan suhu 40°C menggunakan *rotary evaporator* hingga menghasilkan ekstrak kental.

2.6.2 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Teripang Emas (*Stichopus hermanii*)

Angka kelipatan seri konsentrasi diperoleh menggunakan rumus:

$$f = \sqrt[n-1]{\frac{Dt}{Dr}}$$

Keterangan:

f = angka kelipatan seri konsentrasi

n = banyaknya seri konsentrasi

Dt = konsentrasi tertinggi

Dr = konsentrasi terendah

Konsentrasi tertinggi yang digunakan sebesar 0.8% dan konsentrasi terendah sebesar 0.2% dengan angka kelipatan seri konsentrasi 2.

Penentuan konsentrasi 0.2%, 0.4% dan 0.8% pada ekstrak teripang emas (*Stichopus hermanii*) didapatkan dengan cara:

- Konsentrasi 0.2% = 200 mg ekstrak teripang emas (*Stichopus hermanii*) dilarutkan dalam 100 ml aquades.
- Konsentrasi 0.4% = 400 mg ekstrak teripang emas (*Stichopus hermanii*) dilarutkan dalam 100 ml aquades.
- Konsentrasi 0.8% = 800 mg ekstrak teripang emas (*Stichopus hermanii*) dilarutkan dalam 100 ml aquades.

2.6.3 Kombinasi Ekstrak Teripang Emas (*Stichopus hermanii*) dengan Kalsium Hidroksida

Kombinasi ekstrak teripang emas (*Stichopus hermanii*) dengan kalsium hidroksida didapatkan dengan mengkombinasikan ekstrak teripang emas (*Stichopus hermanii*), bubuk kalsium hidroksida dan *propylene glycol* dengan perbandingan 1 gr ekstrak teripang emas (*Stichopus hermanii*) : 1.5 gr Ca(OH)₂ : 0.375 gr *propylene glycol* kemudian diaduk sampai homogen hingga diperoleh konsistensi berupa pasta.

2.6.4 Tahapan Persiapan Sel Fibroblas BHK-21

Tahapan persiapan sel fibroblas BHK-21 mengacu pada penelitian Salwa (2021) dan Saputri (2019).

1. Sel fibroblas BHK-21 berbentuk *cell-line* dengan media *eagle's* dan FBS 10% ditanam dalam botol *rous* dan diinkubasi menggunakan inkubator CO₂ dengan suhu 37°C selama 48 jam.
2. Proliferasi sel dilakukan sampai sel fibroblas BHK-21 menempel dan memenuhi dinding botol *flash/rous*.
3. Setelah sel menempel dan memenuhi dinding botol *flash/rous*, larutan media *eagle's* dan FBS 10% dipindahkan ke dalam botol penampung.

4. Botol *flash/rous* dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali, untuk menghilangkan sisa serum.
5. Ditambahkan *Trypsine Versene* ½ ml untuk melepaskan sel dari dinding botol *flash/rous* dan memisahkan ikatan antar sel agar tidak menggumpal. Hal ini dilakukan dengan cara mengetuk botol hingga dinding *flash/rous* bersih dan cairan di dalam *flash/rous* menjadi keruh.
6. Setelah itu ditambahkan media *eagle's* dan FBS 10% untuk menghentikan perontokan dan sel fibroblas BHK-21 dipindahkan ke *microplate* 96-sumuran sesuai jumlah sampel dan kontrol menggunakan *micropipet multichannel* (Eppendorf).

2.6.5 Perlakuan Sampel

1. Kelompok I, aplikasi ekstrak teripang emas (*Stichopus hermanni*) konsentrasi 0.2% kombinasi kalsium hidroksida menggunakan *micropipet* ke cawan yang berisi kultur sel fibroblas, sebanyak 5 sumuran.
2. Kelompok II, aplikasi ekstrak teripang emas (*Stichopus hermanni*) konsentrasi 0.4% kombinasi kalsium hidroksida menggunakan *micropipet* ke cawan yang berisi kultur sel fibroblas, sebanyak 5 sumuran.
3. Kelompok III, aplikasi ekstrak teripang emas (*Stichopus hermanni*) konsentrasi 0.8% kombinasi kalsium hidroksida menggunakan *micropipet* ke cawan yang berisi kultur sel fibroblas, sebanyak 5 sumuran.
4. Kelompok IV, aplikasi kalsium hidroksida (*Ensure for Analysis*) menggunakan *micropipet* ke cawan yang berisi kultur sel fibroblas, sebanyak 5 sumuran.
5. Kelompok IV (kontrol sel), berisi kultur sel fibroblas BHK-21 dan media *eagle's* yang dianggap kehidupan sel sebanyak 100%, sebanyak 5 sumuran.
6. Kelompok V (kontrol media), berisi media *eagle's* yang dianggap kehidupan sel sebanyak 0%, sebanyak 5 sumuran.

2.6.6 Tahapan Uji Sitotoksitas Ekstrak Teripang Emas (*Stichopus hermanni*)

1. Operator memasukkan masing-masing konsentrasi ekstrak teripang emas (*Stichopus hermanni*) ke dalam *microplate* 96-sumuran yang berisi 50 µl media *eagle's* dan 50 µl sel fibroblas BHK-21.
2. Pembagian kelompok pada *microplate* terdiri dari 3 kelompok perlakuan (I, II, dan III), satu kelompok kontrol positif (IV), dan satu kelompok kontrol negatif (V).
3. *Microplate* diinkubasi dalam inkubator CO₂ dengan suhu 37°C selama 48 jam.
4. Sampel dikeluarkan, *microplate* 96-sumuran dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali.
5. Media *eagle's* dan FBS 10% ditambahkan pada setiap sumuran.
6. Operator menambahkan reagen MTT berwarna kuning sebanyak 10µl pada setiap sumuran. Inkubasi sel selama 4 jam di dalam inkubator CO₂.
7. Tambahkan 50 µl dimetil sulfoksida (DMSO) pada setiap sumuran untuk menghentikan reaksi antara MTT dengan sel.
8. *Microplate* 96-well (sumuran) dikocok menggunakan *plate shaker* selama 5 menit sampai kristal formazan larut.

9. Sel hidup fibroblas BHK-21 diwarnai dengan formazan biru keunguan, karena sel mati tidak berubah warna menjadi biru keunguan.
10. Absorbansi formazan dibaca menggunakan ELISA *reader* dengan panjang gelombang 620 nm.
11. Semakin pekat warna, semakin tinggi nilai absorbansinya, dan semakin tinggi jumlah sel hidup.
12. Operator melakukan perhitungan persentase nilai viabilitas sel fibroblas BHK-21.
13. Data absorbansi yang didapatkan dihitung persentase viabilitas sel menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ viabilitas} = \frac{(OD \text{ perlakuan} - OD \text{ media})}{(OD \text{ kontrol sel} - OD \text{ media})} \times 100\%$$

Keterangan:

% viabilitas = persentase jumlah sel hidup setelah pengujian

OD perlakuan = nilai *optical density* pada semua perlakuan

OD media = nilai *optical density* pada kontrol media

OD kontrol sel = nilai *optical density* pada kontrol sel

Penetapan tingkat sitotokisitas suatu bahan berdasarkan klasifikasi jumlahsel yang hidup, menurut Bajrami *et al* (2014) yaitu:

- Sel yang hidup lebih dari 90% diklasifikasikan tidak toksik.
- Sel yang hidup antara 60% - 90% diklasifikasikan sebagai toksisitas ringan.
- Sel yang hidup antara 30% - 59% diklasifikasikan sebagai toksisitas sedang.
- Sel yang hidup kurang dari 30% diklasifikasikan sebagai toksisitas berat.

2.7 Analisis Data

Jenis data pada penelitian ini adalah data primer dengan pengelolaan data menggunakan aplikasi *software* SPSS 26.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Data penelitian yang dikumpulkan selanjutnya dilakukan analisis data menggunakan uji analisis Uji normalitas menggunakan uji tes *Shapiro-Wilk*, uji *Kruskal Wallis* dan uji *Post Hoc Mann Whitney*. Penyajian data dalam bentuk tabel dan gambar grafik.