



**PENGARUH PASTA TULANG IKAN GURAMI (*Osphronemus gouramy*)
sebagai BAHAN *DIRECT PULP CAPPING* TERHADAP EKSPRESI
TNF- α pada TIKUS WISTAR JANTAN (*Rattus norvegicus*)**

SKRIPSI

Oleh

Dheamira Rosida

NIM 161610101023

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER**

2020



**PENGARUH PASTA TULANG IKAN GURAMI (*Osphronemus gouramy*)
sebagai BAHAN *DIRECT PULP CAPPING* TERHADAP EKSPRESI
TNF- α pada TIKUS WISTAR JANTAN (*Rattus norvegicus*)**

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Kedokteran Gigi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran Gigi

Oleh

Dheamira Rosida
NIM 161610101023

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER

2020

PERSEMBAHAN

Karya tulis ini saya persembahkan untuk:

1. Orang tua tercinta, Ibu Endang Sudaryanti dan Bapak Susilo Budi Utomo;
2. Kakek, nenek dan keluarga besar;
3. Dosen pembimbing dan dosen penguji yang selalu saya jadikan panutan;
4. Guru-guru sejak taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi yang saya hormati;
5. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

MOTTO

“Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya.”

(terjemahan QS. Al Baqarah ayat 286)^{*)}

“Cukuplah Allah sebagai penolong kami, dan Allah adalah sebaik-baiknya pelindung.”

(terjemahan QS. Ali-Imran ayat 173)^{**)}

^{*)} Mirchandani, D. 2004. *Al-Qur'anku Dengan Tajwid Blok Warna (Arab-Latin-Terjemahan)*. Jakarta : Lautan Lestari.

^{**)} #HambaAllah. 2017. *Sekolah Hati*. Depok: Magenta Media

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Dheamira Rosida

NIM : 161610101023

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Pengaruh Pasta Tulang Ikan Gurami (*Osphronemus Gouramy*) sebagai Bahan *Direct Pulp Capping* Terhadap Ekspresi TNF- α pada Tikus Wistar Jantan (*Rattus Norvegicus*)” adalah benar-benar hasil karya saya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 28 Mei 2020

Yang menyatakan,

Dheamira Rosida
NIM 161610101023

SKRIPSI

**PENGARUH PASTA TULANG IKAN GURAMI (*Osphronemus gouramy*)
sebagai BAHAN *DIRECT PULP CAPPING* TERHADAP EKSPRESI
TNF- α pada TIKUS WISTAR JANTAN (*Rattus norvegicus*)**

Oleh

Dheamira Rosida

NIM 161610101023

Pembimbing :

Dosen Pembimbing Utama : Prof. Dr. drg. I D A Ratna Dewanti, M. Si.

Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Erawati Wulandari, M. Kes.

Penguji :

Dosen Penguji Ketua : drg. Dwi Warna Aju Fatmawati, M.Kes .

Dosen Penguji Anggota : drg. Raditya Nugroho, Sp.KG.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Pengaruh Pasta Tulang Ikan Gurami (*Osphronemus Gouramy*) sebagai Bahan *Direct Pulp Capping* Terhadap Ekspresi TNF- α pada Tikus Wistar Jantan (*Rattus Norvegicus*)” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Kamis, 28 Mei 2020

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember

Dosen Penguji Ketua

Dosen Penguji Anggota

drg. Dwi Warna Aju Fatmawati, M.Kes.
NIP 197012191999032001

drg. Raditya Nugroho, Sp.KG.
NIP 198206022009121003

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Pendamping

Prof. Dr. drg. I D A Ratna Dewanti, M.Si.
NIP 196705021997022001

drg. Erawati Wulandari, M.Kes.
NIP 196708191993032001

Mengesahkan
Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember,

drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes, Sp.Pro.
NIP. 196901121996011001

RINGKASAN

Pengaruh Pasta Tulang Ikan Gurami (*Osphronemus Gouramy*) sebagai Bahan *Direct Pulp Capping* Terhadap Ekspresi TNF- α pada Tikus Wistar Jantan (*Rattus Norvegicus*); Dheamira Rosida; 161610101023; 2020; 96 Halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Trauma mekanis dapat menyebabkan inflamasi pulpa. Inflamasi pulpa ditandai dengan adanya akumulasi sel-sel inflamasi yang melepaskan mediator inflamasi (sitokin), seperti *tumor necrosis factor- α* (TNF- α). TNF- α pada kadar berlebihan merupakan tanggapan terhadap tingginya pertumbuhan mikroorganisme dan dapat menyebabkan kerusakan jaringan yang sangat berat dan fatal. *Pulp capping* adalah salah satu jenis perawatan pada inflamasi pulpa untuk mempertahankan vitalitas gigi. Bahan yang sering digunakan dalam perawatan *pulp capping* adalah kalsium hidroksida dan *mineral trioxide aggregate* (MTA). Akan tetapi, penggunaan bahan tersebut memiliki potensi menimbulkan efek samping karena memiliki kandungan berbagai bahan aktif atau agen kimiawi. Oleh karena itu, dibutuhkan bahan alternatif yang berasal dari bahan alami dan dapat meminimalisir efek samping. Salah satu bahan alternatif yang dapat digunakan adalah tulang ikan gurami. Kandungan tulang ikan gurami yaitu, omega 3, omega 6, dan flavonoid, asam amino, dan kolagen sebagai antiinflamasi dan antibakteri, sehingga dapat menurunkan ekspresi sitokin pro-inflamasi diantaranya adalah TNF- α . Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis pengaruh penggunaan pasta tulang ikan gurami (*Osphronemus gouramy*) sebagai bahan *direct pulp capping* terhadap ekspresi TNF- α .

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris. Jumlah sampel sebanyak 32 ekor tikus wistar jantan dengan berat 150-200 gr yang dibagi secara acak menjadi 4 kelompok dengan masing-masing kelompok terdiri dari 8 ekor. Kelompok pulpa normal (K1), gigi molar tikus tidak dilakukan perforasi dan perlakuan. Kelompok kontrol negatif (K2) gigi dipreparasi dengan bur bulat pada permukaan oklusal molar

kiri sampai perforasi pulpa ditumpat dengan tumpatan sementara tanpa diberi bahan apapun. Kelompok kontrol positif (K3), gigi molar tikus diperforasi lalu diberi kalsium hidroksida kemudian ditumpat sementara. Kelompok perlakuan (K4) gigi molar tikus diperforasi lalu diberi pasta tulang ikan gurami kemudian ditumpat sementara. Empat ekor tikus dari masing-masing kelompok didekapitasi pada hari ke-4 dan ke-7 untuk mendapatkan sampel jaringan. Kemudian dilakukan pengamatan ekspresi TNF- α pada sel leukosit (makrofag, neutrofil dan limfosit) menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000X.

Hasil perhitungan didapatkan ekspresi TNF- α pada leukosit tertinggi pada kelompok K2 hari dekapitasi ke-4 ($13,08 \pm 1,44$) dan terendah pada kelompok K1 hari dekapitasi ke-7 ($1,83 \pm 0,19$). Data yang didapat kemudian dianalisis dengan uji parametrik *One Way Anova*, selanjutnya dilakukan uji LSD. Hasil uji LSD menunjukkan perbedaan yang signifikan antara setiap kelompok. Tulang ikan gurami mengandung asam amino, Omega-3, Omega-6, flavonoid dan kolagen. Senyawa tersebut bekerja dengan menghambat *cyclo-oxygenase* (COX) sehingga dapat menurunkan PGE-2. Turunnya PGE-2 menyebabkan proses transkripsi NF- κ B menurun, sehingga dapat terjadi penurunan sitokin proinflamasi TNF- α . Selain itu, flavonoid juga dapat berperan sebagai antibakteri karena mampu menghambat proses sintesis DNA bakteri yang menyebabkan kematian sel bakteri. Tulang ikan juga mengandung kolagen yang dapat mempercepat proses pengendapan garam mineral dan akhirnya akan terbentuk lapisan *odontoblast-like cell* yang berperan sebagai sel pembentuk dentin reparatif. Pasta tulang ikan gurami menurunkan ekspresi TNF- α lebih kuat dibandingkan dengan pasta kalsium hidroksida dan tanpa pemberian bahan *pulp capping*. Sehingga, dapat disimpulkan bahwa pasta tulang ikan gurami pengaruh dalam menurunkan ekspresi TNF- α pulpa gigi tikus wistar. Oleh karena itu, dengan penelitian lebih lanjut nantinya diharapkan pasta tulang ikan gurami dapat digunakan sebagai alternatif bahan *direct pulp capping*.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala anugrah dan rahmatnya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengaruh Pasta Tulang Ikan Gurami (*Osphronemus Gouramy*) sebagai Bahan *Direct Pulp Capping* Terhadap Ekspresi TNF- α pada Tikus Wistar Jantan (*Rattus Norvegicus*)”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan dan bimbingan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan ucapan terimakasih kepada :

1. Allah SWT atas berkat rahmat-Nya saya dapat menyelesaikan skripsi ini;
2. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes, Sp.Pros., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
3. Prof. Dr. drg. I D A Ratna Dewanti, M.Si., selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah memberikan bimbingan, saran, motivasi, meluangkan waktunya sehingga skripsi ini dapat terselesaikan, serta melibatkan penulis dalam penelitiannya;
4. drg. Erawati Wulandari, M.Kes., selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang telah memberikan bimbingan, saran, motivasi, meluangkan waktunya sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
5. drg. Dwi Warna Aju Fatmawati, M.Kes., selaku Dosen Penguji Ketua yang telah memberi kritik, saran dan motivasi sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
6. drg. Raditya Nugroho, Sp.KG., selaku Dosen Penguji Anggota yang telah memberi kritik, saran dan motivasi sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
7. drg. Ari Triwanodyo Handayani, M.Kes., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan, motivasi dan semangat selama saya berada di Fakultas Kedokteran Gigi;
8. Kedua orang tua tercinta, Ibu Endang Sudaryanti dan Bapak Susilo Budi Utomo yang tak kenal lelah mendoakan, memberi dukungan, perhatian, serta kasih sayang yang teramat tulus selama ini;

9. Kakek Samidjo, nenek Sudarmi, serta keluarga besar yang senantiasa mendoakan dan memberi dukungan;
10. Novrana Aji Qumma'adz yang senantiasa mendoakan, memberi dukungan dan semangat berupa apapun, pengertian, perhatian dan selalu bersedia mendengarkan keluh kesah;
11. Teknisi laboratorium hewan Mas Agus, laboratorium histologi Bu Wahyu dan laboratorium farmasetika;
12. Dwi Elly Noviani, yang telah membantu dalam memberikan penjelasan analisis data statistik;
13. Sahabat “Broken Beyond Repair”, Nia Nurmawati, Balqis Salsabila Setya Aldianah, Rismawati Tri Kalasworojati dan Kartika Artha Rini, yang selalu bekerja sama, saling membantu dan memberi semangat dalam menyelesaikan skripsi ini;
14. Ananda Regina Putri Darna, Ulfa Mayasari, Rafif Naufi Waskita, mbak Rifqah Bela, Afifah Rizki Fauziah yang selalu mendengarkan keluh kesah, menghibur dan memberikan semangat lebih dalam mengerjakan skripsi;
15. Teman penelitian “gurami”, Shintia Dwi Pramesty dan Sunana Ageng Hikmawati yang telah membantu dalam mengerjakan skripsi;
16. Seluruh teman-teman “ANOVA”, “Tutorial 3 Gas” dan “DEXTRA FKG 2016”, terimakasih atas solidaritasnya, bantuan, semangat yang diberikan selama ini.
17. Semua pihak yang turut terlibat baik secara langsung maupun tidak langsung yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, terimakasih untuk semua.

Karya ini masih jauh dari sempurna, untuk ini penulis mengharapkan saran dan kritikan dari berbagai pihak sehingga skripsi ini dapat menjadi lebih baik.

Penulis

DAFTAR ISI

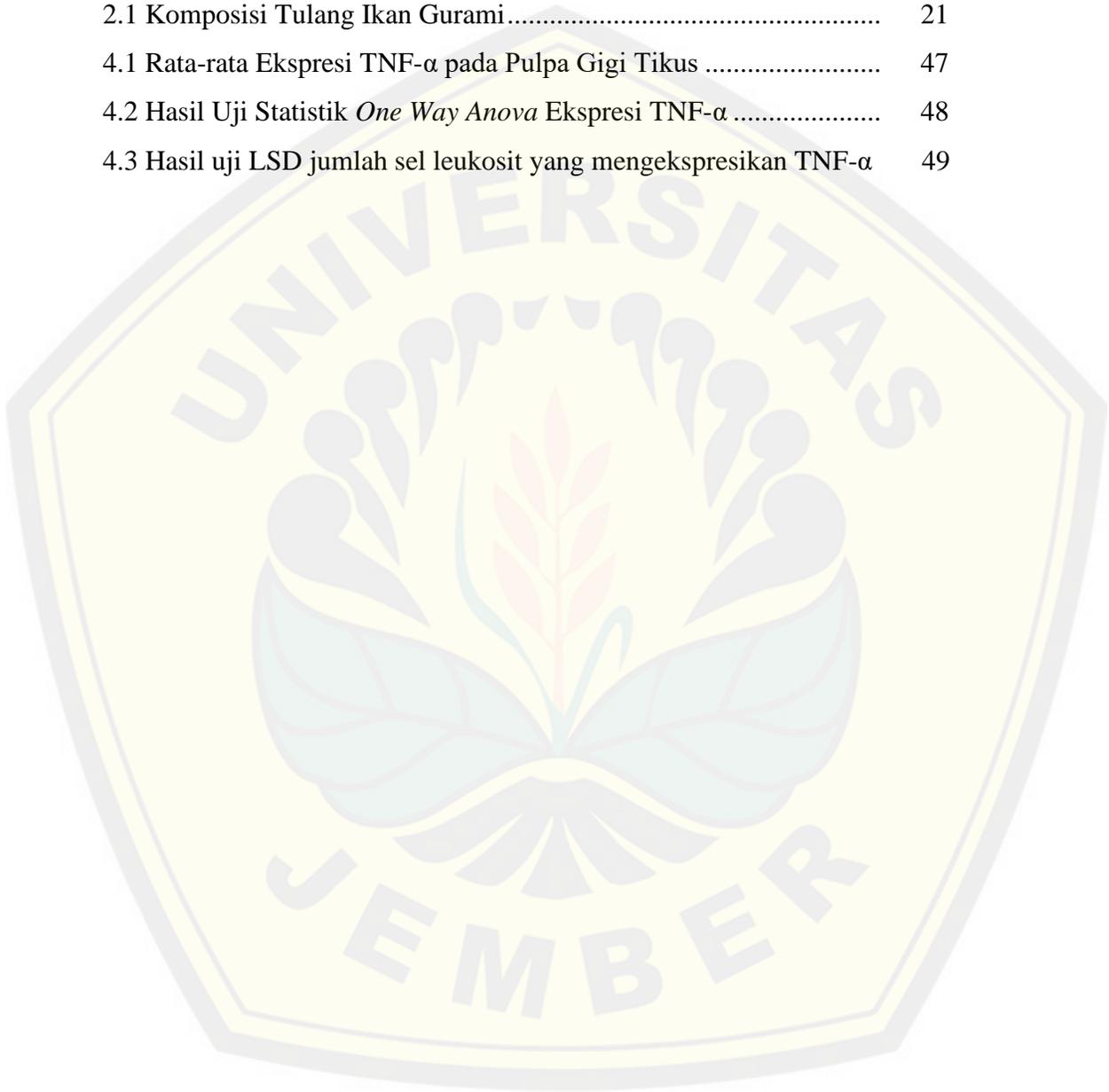
	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
PERSEMBAHAN	ii
MOTTO	iii
PERNYATAAN	iv
PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Inflamasi	5
2.2 TNF- α	7
2.3 Pulpitis	9
2.3.1 Definisi Pulpitis	9
2.3.2 Etiologi Pulpitis	9
2.4 Klasifikasi Penyakit Pulpa	10
2.5 Mekanisme Inflamasi Pulpa.....	11
2.6. <i>Pulp Capping</i>	13
2.6.1 Definisi <i>Pulp Capping</i>	13

2.6.2 Klasifikasi <i>Pulp Capping</i>	14
2.7 Bahan <i>Pulp Capping</i>	15
2.7.1 Syarat Bahan <i>Pulp Capping</i>	15
2.7.2 Pasta	16
2.7.3 Macam Bahan <i>Pulp Capping</i>	17
2.8 Ikan Gurami	19
2.8.1 Taksonomi Ikan Gurami	19
2.8.2 Morfologi Ikan Gurami.....	20
2.9 Tulang Ikan Gurami	20
2.10 Hubungan Tulang Ikan Gurami dan TNF- α	22
2.11 Imunohistokimia	24
2.12 Tikus Wistar.....	26
2.12.1 Taksonomi Tikus Wistar.....	26
2.12.2 Morfologi Gigi Tikus Wistar	27
2.13 Kerangka Konsep	28
2.14 Hipotesis Penelitian	30
BAB 3. METODE PENELITIAN	30
3.1 Jenis Penelitian	31
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	31
3.3 Identifikasi Variabel	31
3.3.1 Variabel Bebas	31
3.3.2 Variabel Terikat	31
3.3.3 Variabel Terkontrol	31
3.4 Definisi Operasional	32
3.5 Sampel Penelitian	33
3.5.1 Kriteria Sampel Penelitian	33
3.5.2 Jumlah Sampel	33
3.5.3 Kelompok Sampel Penelitian	33
3.5.4 Besar Sampel	34

3.6 Alat dan Bahan Penelitian	34
3.7 Prosedur Penelitian	37
3.7.1 Tahap Persiapan Hewan Coba	37
3.7.2 Pembuatan Serbuk Tulang Ikan Gurami.....	37
3.7.3 Pembuatan Pasta Tulang Ikan Gurami.....	38
3.7.4 Pengukuran pH Tulang Ikan Gurami.....	38
3.7.5 Sterilisasi Alat.....	39
3.7.6 Pengelompokan dan Perlakuan Hewan Coba	39
3.7.7 Pembuatan dan Pewarnaan Preparat Jaringan	41
3.8 Pengamatan Ekspresi TNF- α	43
3.9. Analisis Data.....	43
3.10 Alur Penelitian	44
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	45
4.1 Hasil	45
4.2 Pembahasan.....	50
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	57
5.1 Kesimpulan	57
5.2 Saran	57
DAFTAR PUSTAKA	58
LAMPIRAN	69

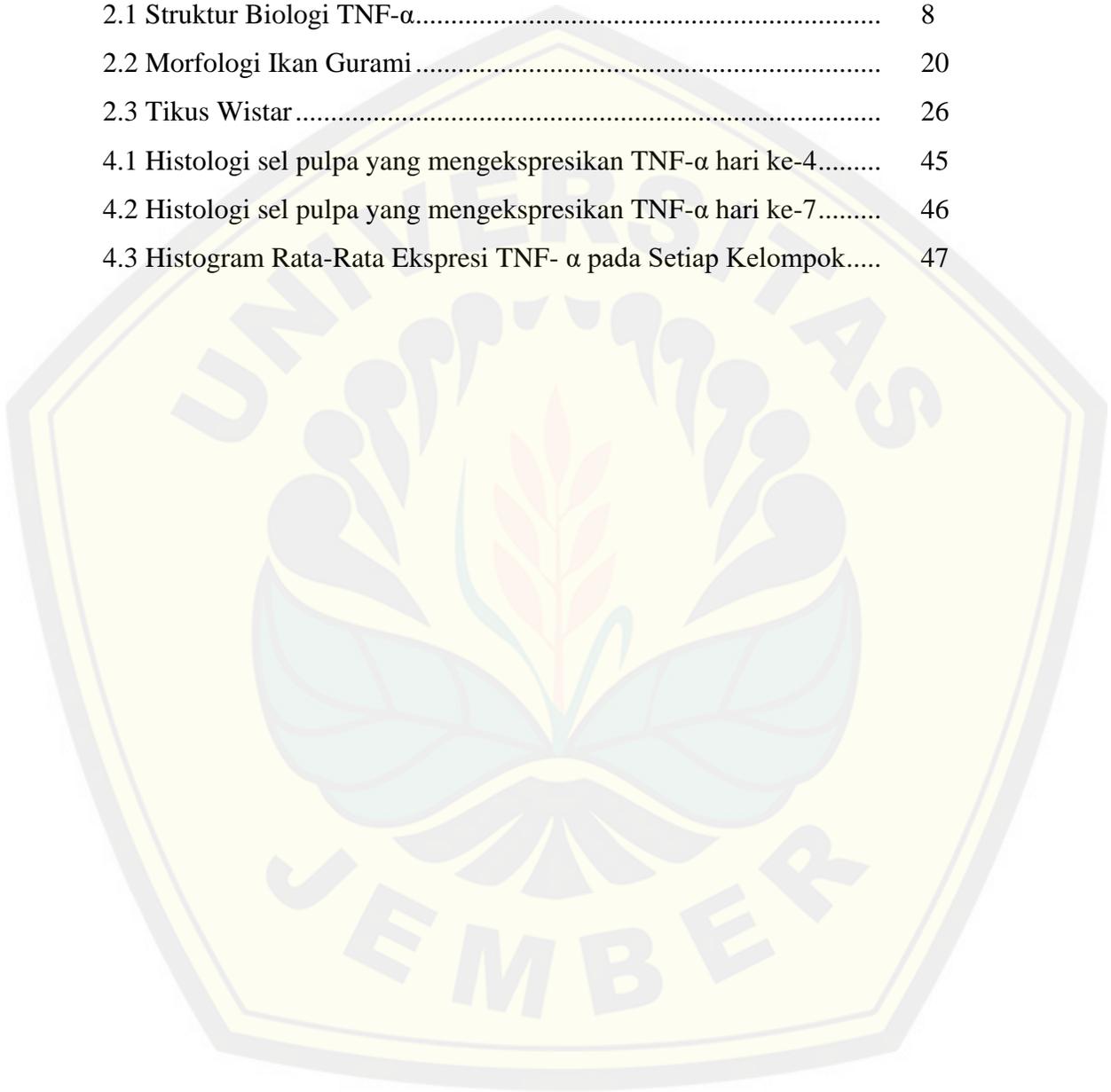
DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Komposisi Tulang Ikan Gurami.....	21
4.1 Rata-rata Ekspresi TNF- α pada Pulpa Gigi Tikus	47
4.2 Hasil Uji Statistik <i>One Way Anova</i> Ekspresi TNF- α	48
4.3 Hasil uji LSD jumlah sel leukosit yang mengekspresikan TNF- α	49



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Struktur Biologi TNF- α	8
2.2 Morfologi Ikan Gurami.....	20
2.3 Tikus Wistar.....	26
4.1 Histologi sel pulpa yang mengekspresikan TNF- α hari ke-4.....	45
4.2 Histologi sel pulpa yang mengekspresikan TNF- α hari ke-7.....	46
4.3 Histogram Rata-Rata Ekspresi TNF- α pada Setiap Kelompok.....	47



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran A. Ethical Clearance	69
Lampiran B. Ijin Penelitian	70
Lampiran C. Identifikasi Hewan	71
Lampiran D. Data Hasil Pengamatan Ekspresi TNF- α	72
Lampiran E. Hasil Analisa SPSS	73
Lampiran F. Alat Penelitian	76
Lampiran G. Bahan Penelitian	82
Lampiran H. Dokumentasi Penelitian	83
Lampiran I. Hasil Penelitian	94

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Salah satu penyebab inflamasi pulpa adalah trauma mekanis (Nirwana, 2012). Trauma mekanis dapat menyebabkan terbukanya pulpa, sehingga menyebabkan invasi berbagai macam mikroorganisme patogen ke dalam pulpa dan menyebabkan inflamasi serta kerusakan pada jaringan pulpa (Diana dan Santosa, 2013).

Terjadinya inflamasi pulpa ditandai dengan adanya akumulasi sel-sel radang yang melepaskan mediator inflamasi (sitokin), diantaranya adalah *tumor necrosis factor- α* (TNF- α). TNF- α adalah sitokin utama pada respon inflamasi akut terhadap bakteri gram-negatif dan mikroba lainnya pada inflamasi yang disekresi oleh berbagai macam sel tubuh (Abbas, 2016). Peningkatan ekspresi TNF- α pada jaringan akan menyebabkan terjadinya proses inflamasi akut dan stimulasi imunitas adaptif. Sekresi TNF- α pada kadar yang berlebihan merupakan respon terhadap tingginya pertumbuhan mikroorganisme dan dapat menyebabkan kerusakan jaringan yang sangat berat dan fatal (Irawati, 2014; Bratawidjaja dan Rengganis, 2014). Menurunnya ekspresi TNF- α menandakan terjadinya penurunan fase inflamasi dan adanya respon perbaikan jaringan (Domini dkk., 2019).

Pulp capping merupakan satu jenis perawatan yang bertujuan untuk mempertahankan vitalitas pulpa dengan memberikan lapisan material pelindung atau bahan di atas pulpa yang terbuka (Ghoddusi dkk., 2014). Pulpa gigi yang terbuka dikarenakan kesalahan mekanis yang kecil atau karena trauma dengan kondisi respon pulpa terhadap penyembuhan masih baik dan gigi dalam keadaan vital dapat dilakukan perawatan dengan *direct pulp capping* (Didilescu dkk., 2018).

Bahan yang biasa digunakan dalam perawatan *direct pulp capping* adalah kalsium hidroksida [Ca(OH)₂] yang menjadi “*material of choice*” dalam perawatan *direct pulp capping* selama beberapa dekade (Ghoddusi dkk., 2014). Kalsium hidroksida merupakan bahan kedokteran gigi yang memiliki sifat antibakteri yang kuat

dan dapat merangsang pembentukan dentin reparatif (Sari dan Utara, 2014; Nowicka dkk., 2015). Bahan lain yang digunakan dalam perawatan *pulp capping* adalah *Mineral Trioxide Aggregate* (MTA). MTA dipilih karena memiliki sifat biokompatibilitas yang baik, kemampuan sebagai *sealer* yang tinggi dan memiliki kemampuan untuk menghentikan perdarahan (Mostafa dkk., 2018).

Perawatan *pulp capping* menggunakan bahan-bahan seperti kalsium hidroksida dan MTA memiliki potensi menimbulkan efek samping karena memiliki kandungan berbagai bahan aktif atau agen kimiawi (Astuti dkk., 2018). Oleh karena itu, diperlukan suatu bahan alternatif dari bahan dasar alami yang dapat memenuhi syarat sebagai bahan *direct pulp capping*, berperan sebagai antiinflamasi, antibakteri, dan dapat mengurangi efek samping dari bahan kimiawi. Salah satu bahan alternatif yang dapat digunakan adalah tulang ikan gurami.

Ikan gurami (*Osporonemus gouramy*) merupakan jenis ikan yang paling sering dikonsumsi oleh masyarakat Kabupaten Jember (Dewanti dkk., 2019). Berdasarkan data Dinas Peternakan dan Perikanan Kabupaten Jember, produksi ikan gurami di Kabupaten Jember dari tahun ke tahun mengalami peningkatan. Produksi ikan gurami pada tahun 2013 sebesar 1.182.400 kg dan meningkat pada tahun 2016 yaitu 2.395.900 kg (Badan Pusat Statistik Kabupaten Jember, 2017). Konsumsi ikan gurami dalam skala industri maupun skala rumah tangga biasanya hanya memanfaatkan daging ikan sebagai bahan baku utama, sehingga bagian tubuh ikan yang lain akan menjadi limbah. Saat ini pemanfaatan gurami dalam bidang kesehatan masih belum banyak dilakukan. Salah satu limbah gurami yang dapat bermanfaat untuk meningkatkan kesehatan gigi dan mulut adalah bagian tulang ikan. Berdasarkan keunggulan gurami dari segi tingginya permintaan dan tingginya produksi diharapkan ketersediaan tulang ikan gurami akan stabil jika dimanfaatkan sebagai bahan alternatif (Nurjanah dkk., 2010).

Tulang ikan gurami mempunyai komposisi kimia yaitu protein yang tinggi dibandingkan dengan jenis ikan air tawar lain (Tridhar, 2016). Berdasarkan penelitian Pratama dkk. (2018), tulang ikan gurami mengandung berbagai macam asam amino yang berfungsi untuk meningkatkan proliferasi dan meningkatkan fungsi dari sel-sel

leukosit untuk membunuh patogen dan memproduksi sitokin antiinflamasi sebagai penghambat sitokin proinflamasi diantaranya adalah TNF- α dan berperan dalam penyembuhan luka dan memperbaiki jaringan yang rusak dengan mempercepat proses angiogenesis. Berdasarkan penelitian pendahuluan yang dilakukan oleh Dewanti dkk. (2019), tulang ikan mengandung omega 3, omega 6, dan flavonoid yang berperan sebagai antiinflamasi. Senyawa tersebut bekerja dengan menghambat *cyclo-oxygenase* (COX) dan transkripsi *nuclear factor kappa-beta* (NF- κ B) yang mengaktifkan sitokin proinflamasi (Apolinario dkk., 2015; Tortosa-Caparrós dkk., 2016; Widiartini dkk., 2018), sehingga diharapkan tulang ikan gurami dapat menurunkan sitokin proinflamasi diantaranya TNF- α . Tulang ikan mengandung kolagen yang dapat mempercepat proses pengendapan garam mineral dan akhirnya akan terbentuk lapisan *odontoblas-like cell* yang berperan sebagai sel pembentuk dentin reparatif (Permana dkk., 2012). Selain itu limbah ikan dapat dimanfaatkan karena memiliki komposisi mirip dengan dentin dan tulang manusia karena kaya akan hidroksiapatit, protein, dan kolagen dan merupakan sumber kalsium (Dewanti dkk., 2020).

Berdasarkan uraian tersebut maka penulis tertarik untuk meneliti lebih lanjut mengenai pengaruh penggunaan pasta tulang ikan gurami (*Osphronemus gouramy*) sebagai bahan *direct pulp capping* terhadap ekspresi TNF- α pada pulpa tikus wistar.

1.2 Rumusan Masalah

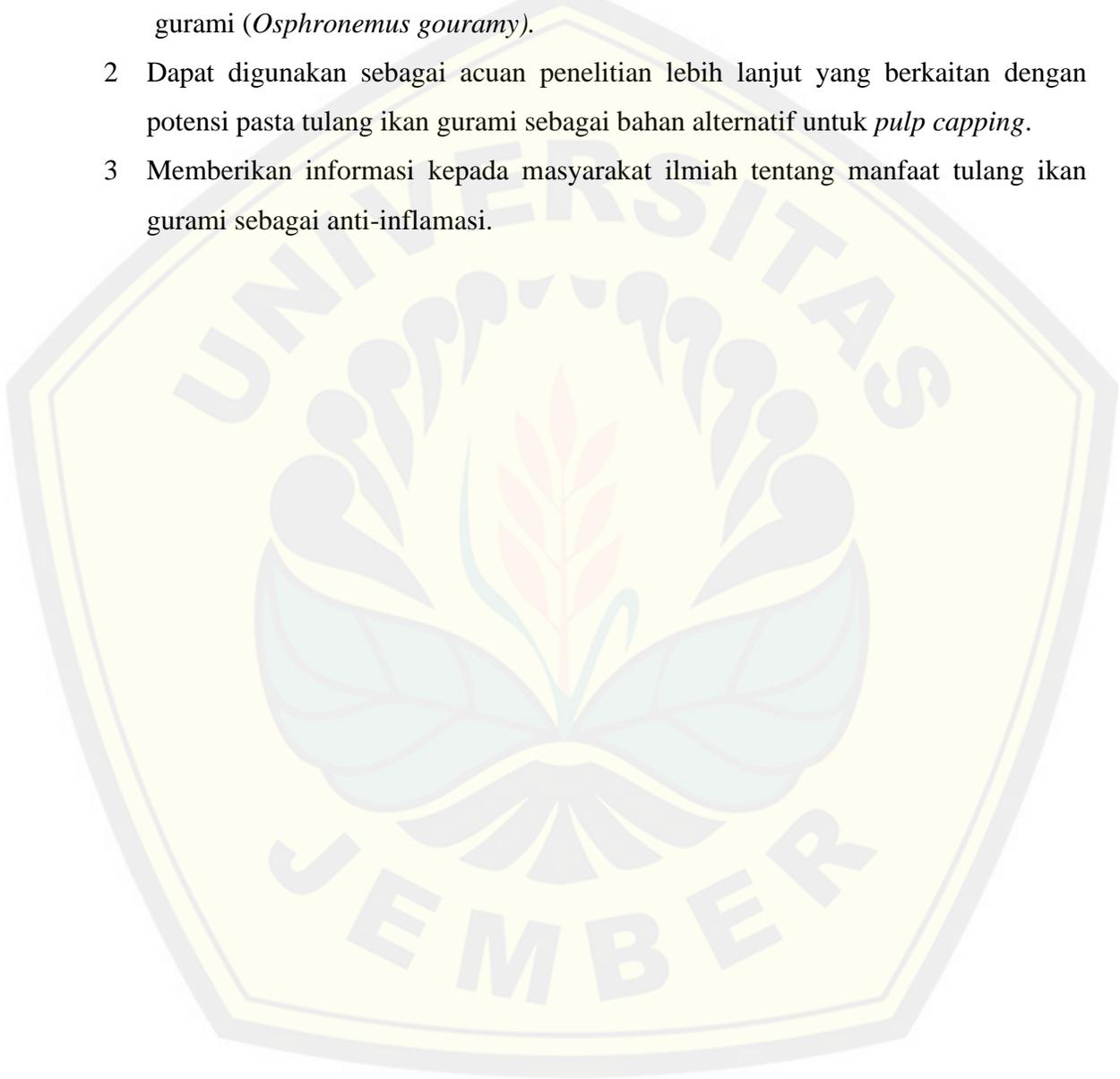
Bagaimana pengaruh penggunaan pasta tulang ikan gurami sebagai bahan *direct pulp capping* terhadap ekspresi TNF- α ?

1.3 Tujuan

Menganalisis pengaruh penggunaan pasta tulang ikan gurami (*Osphronemus gouramy*) sebagai bahan *pulp capping* terhadap ekspresi TNF- α .

1.4 Manfaat

1. Memberikan informasi kepada masyarakat ilmiah mengenai ekspresi TNF- α pada pulpa setelah dilakukan perawatan *pulp capping* menggunakan pasta tulang ikan gurami (*Ophronemus gouramy*).
2. Dapat digunakan sebagai acuan penelitian lebih lanjut yang berkaitan dengan potensi pasta tulang ikan gurami sebagai bahan alternatif untuk *pulp capping*.
3. Memberikan informasi kepada masyarakat ilmiah tentang manfaat tulang ikan gurami sebagai anti-inflamasi.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Inflamasi

Inflamasi adalah suatu respon fisiologis yang merupakan reaksi lokal jaringan terhadap adanya infeksi atau cedera. Penyebab utama inflamasi antara lain mikroorganisme, trauma mekanis, zat-zat kimia, dan pengaruh fisika. Tujuan akhir dari respon inflamasi adalah menarik protein plasma dan fagosit ke tempat yang mengalami cedera atau terinfeksi agar dapat mengisolasi, menghancurkan atau menginaktifkan agen yang masuk; membersihkan debris serta mempersiapkan jaringan untuk proses penyembuhan. Inflamasi dapat terjadi secara lokal, sistemik, akut dan kronis yang dapat menimbulkan kelainan patologis. Tanda utama terjadinya inflamasi lokal berupa *rubor* (kemerahan), *tumor* (bengkak), *kalor* (panas), *dolor* (sakit) dan *functio laesa* (kehilangan fungsi) (Bratawidjaja dan Rengganis, 2014). Inflamasi akut terjadi segera setelah adanya cedera, sedangkan inflamasi kronis adalah inflamasi yang berlangsung lebih dari dua minggu dan dapat timbul setelah terjadinya inflamasi akut atau karena infeksi yang tidak kunjung sembuh (Apriani, 2011). Proses terjadinya inflamasi sebenarnya merupakan salah satu mekanisme pertahanan diri dari tubuh terhadap benda asing, tetapi jika proses ini berlangsung secara terus menerus (kronis) justru akan merusak jaringan (Laka dkk., 2018)

Jaringan yang terkena inflamasi akan mengirimkan mediator-mediator pertahanan sel inang dan protein dalam darah menuju ke daerah infeksi. Inflamasi dimulai saat sel mast, yaitu makrofag, sel dendritik dan sel lain bergranulasi dan melepaskan bahan kimia seperti histamin, serotonin dan bahan kimia lainnya. Histamin merupakan mediator utama inflamasi, akibat pelepasan histamin akan terjadi vasodilatasi pembuluh darah sehingga terjadi peningkatan aliran darah dan terjadi peningkatan permeabilitas kapiler pada saat awal inflamasi (Bratawidjaja dan Rengganis, 2014).

Mediator lain yang dilepaskan selama proses inflamasi yaitu faktor kemotaktik neutrofil dan eosinofil yang dilepaskan oleh leukosit dan berfungsi untuk menarik sel ke daerah cedera. Selain itu juga dilepaskan prostaglandin terutama seri E (PGE). Saat membran sel mengalami kerusakan, fosfolipid akan diubah menjadi asam arakidonat dan dikatalis oleh fosfolipase A₂. Asam arakidonat selanjutnya akan dimetabolisme oleh lipooksigenase dan siklooksigenase (COX). Pada jalur siklooksigenase inilah prostaglandin di sintesis. Prostaglandin berfungsi untuk meningkatkan aliran darah ke tempat inflamasi, meningkatkan permeabilitas kapiler dan merangsang reseptor nyeri. Leukotrin adalah produk akhir dari metabolisme asam arakidonat pada jalur lipooksigenase. Senyawa ini juga berfungsi untuk meningkatkan permeabilitas kapiler dan meningkatkan adhesi leukosit pada pembuluh kapiler selama fase inflamasi (Apriani, 2011).

Mediator inflamasi lain yang diproduksi adalah sitokin. Sitokin adalah protein terlarut yang memerantarai reaksi imun dan inflamasi dengan cara merangsang sistem imun untuk berproliferasi atau menjadi aktif dan bertanggung jawab dalam komunikasi leukosit atau antara leukosit dengan sel lain (Abbas, 2016). Terdapat dua jenis sitokin, yaitu, sitokin pro-inflamasi dan sitokin anti-inflamasi. Sitokin pro inflamasi antara lain *interleukin-1* (IL-1), *interleukin-6* (IL-6), *interleukin-2* (IL-2), *tumor necrosis factor* (TNF), dan *interferon gamma* (INF- γ). Sitokin pro-inflamasi berperan dalam merangsang makrofag untuk meningkatkan fagositosis dan merangsang sumsum tulang untuk meningkatkan produksi leukosit dan erosit. Selain itu endotel yang teraktifasi akan melepaskan *nitric oxide* (NO), suatu bahan vasodilator poten yang berperan pada syok sepsis (Apriani, 2011).

Inflamasi juga mengaktifkan produksi dan pelepasan sitokin antiinflamasi. IL-10 adalah sitokin anti inflamasi utama. Sitokin ini menghambat produksi TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8. Sitokin ini juga menekan pelepasan radikal bebas dan aktifitas NO serta produksi prostaglandin. Beberapa sel yang dapat memproduksi IL-10 adalah CD-4, CD-8, makrofag, monosit, limfosit B, sel dendrit dan sel epitel. Monosit merupakan sumber utama dari sitokin ini (Sinaga, 2017).

Terdapat unsur-unsur dalam sistem kekebalan spesifik yang berperan dalam proses inflamasi, yang dapat dikelompokkan menjadi, fagosit mononuklear (monosit dan makrofag) dan granulosit (neutrofil, eosinofil, dan basofil). Sel-sel tersebut berasal dari sel induk hematopoietik multipoten terletak di sumsum tulang dan hati janin. Berdasarkan fungsinya, sel-sel ini tersebut dikelompokkan menjadi sel fagosit, sel mediator, dan limfosit. Peran sel-sel ini dalam respon imun dapat dilihat pada aktivitas fagositik dan peradangan yang merupakan bagian dari respon imun bawaan. Sementara itu monosit diketahui memiliki reseptor yang dapat mengenali antigen asing (Ratna dkk., 2018).

2.2 TNF- α

TNF- α merupakan salah satu jenis sitokin disekresi oleh berbagai macam sel tubuh, diantaranya odontoblas, fibroblas, makrofag, monosit dan diaktifkan oleh sel limfosit T, antigen, sel NK, dan sel mast (Fatimatuzzahro, 2014; Abbas, 2016:44 (Abbas, 2016).

TNF- α berperan sebagai imun primer dalam regulasi sistem imun sebagai respon terhadap patogen, diproduksi secara kontinyu oleh sel untuk homeostasis dan akan meningkat dengan tujuan *remodeling* atau *replacement* dari jejas. TNF- α yang berada dalam makrofag berfungsi khusus untuk meningkatkan aktivitas dalam membunuh patogen, aksi ini menjadi mediator penting pada inflamasi (Hikmah dan Dewanti, 2010). TNF- α bertanggung jawab untuk berbagai aktivitas pensinyalan sel, mendorong terjadinya nekrosis atau apoptosis sel (Lestari dkk., 2016).

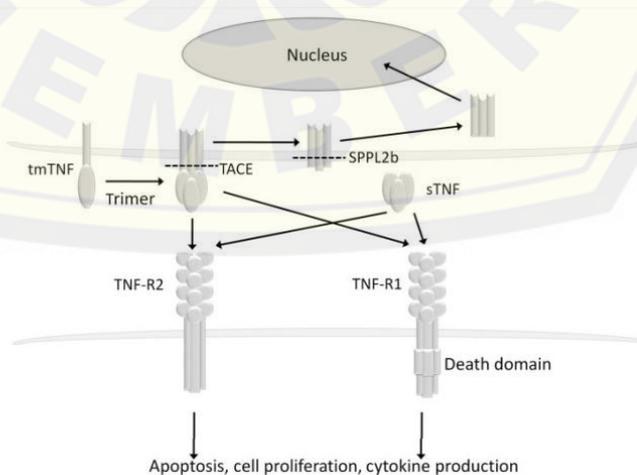
TNF- α memiliki peran ganda, yaitu pada kadar yang tepat akan memberi perlindungan dan penyembuhan jaringan, akan tetapi pada kadar berlebihan merupakan tanggapan terhadap tingginya pertumbuhan mikroorganisme dan dapat menyebabkan kerusakan jaringan yang sangat berat dan fatal (Irawati dkk., 2014). Kadar rendah TNF- α dalam plasma ($<10^{-9}$) akan memicu respon inflamasi lokal dengan bekerja terhadap leukosit dan endotel untuk menginduksi inflamasi akut, kadar sedang TNF- α bekerja terhadap efek sistemik inflamasi dan dalam kadar tinggi ($\geq 10^{-7}$) akan menimbulkan kelainan patologis berupa syok septik (Bratawidjaja dan Rengganis, 2014).

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

- Dapat meningkatkan peran dari pro trombotik dan merangsang molekul adhesi dari sel leukosit serta menginduksi sel endotel.
- Memiliki peran dalam mengatur aktivitas makrofag dan respon imun dalam jaringan dengan cara merangsang faktor pertumbuhan dan sitokin lain.
- Merekrut sel imun neutrofil, monosit, limfosit darah ke lokasi infeksi.
- Menjadi respon imun terhadap bakteri, virus, jamur, dan invasi parasit.
- Bersifat pirogenik, dapat menimbulkan demam ketika bekerja pada hipotalamus.

TNF- α adalah sitokin *pleiotropic* yang dihasilkan oleh berbagai jenis sel dalam tubuh. TNF- α bekerja melalui dua reseptor transmembran yaitu: reseptor TNF 1 (TNF-R1), dan reseptor TNF 2 (TNF-R2). TNF-R1 dan -R2 diekspresikan pada hampir seluruh sel yang memiliki nukleus (inti sel) (Horiuchi dkk., 2010).

TNF- α dihasilkan sebagai bentuk prekursor yang disebut transmembran TNF- α yang diekspresikan pada permukaan sel tipe II polipeptida yang terdiri dari 233 residu asam amino (26 kDa) oleh makrofag aktif dan limfosit serta sel-sel lainnya. Setelah TNF- α diproses oleh enzim metalloproteinase seperti TNF- α -convert enzim (TACE), TNF- α akan menjadi bentuk yang larut, kemudian dari 157 residu asam amino (17 kDa) dilepaskan dan menjadi perantara dari aktivitas biologis melalui reseptor TNF-R1 dan -R2 (TNF-R1 juga dikenal sebagai TNFRSF1A, CD120a dan TNF-R2 juga dikenal sebagai TNFRSF1B, CD120b) (Gambar 2.1) (Horiuchi dkk., 2010; Yu dkk., 2009).



Gambar 2.1 Struktur Biologi TNF- α (Horiuchi dkk., 2010)

Transmembran TNF- α (tmTNF) adalah bentuk prekursor dari TNF- α yang larut yang diekspresikan pada sel penghasil TNF sebagai homotrimer. Setelah diproses oleh TACE, TNF- α yang larut (sTNF) akan berikatan dengan TNF-R1 atau -R2. Setelah mengikat ke reseptor TNF, baik transmembran dan TNF- α berperan dalam efek *pleiotropik* (apoptosis, proliferasi sel dan produksi sitokin). Sisa transmembran TNF- α setelah pembelahan dengan TACE adalah selanjutnya diproses oleh SPPL2b dan domain intraseluler ditranslokasi ke dalam nukleus dan seharusnya menjadi perantara produksi sitokin (Horiouchi dkk., 2010).

2.3 Pulpititis

2.3.1 Definisi Pulpitis

Pulpitis adalah inflamasi pulpa sebagai reaksi jaringan ikat vaskuler yang sangat penting terhadap cedera. Reaksi pulpitis mirip dengan inflamasi jaringan ikat pada bagian tubuh lainnya. Sel-sel yang berhubungan dengan reaksi inflamasi pada jaringan ikat adalah leukosit polimorfonuklear dan leukosit mononuklear termasuk makrofag dan limfosit (Enggardipta dkk., 2016).

2.3.2 Etiologi Pulpitis

Etiologi pulpitis menurut Grossman (2014) adalah:

a. Fisis

1) Mekanis

a) Trauma

(1) Kecelakaan (olahraga kontak)

(2) Prosedur gigi *iatrogenic* (pemasangan baji pada gigi, preparasi atau mahkota, dll.)

b) Pemakaian patologik (atrasi, abrasi, dll.)

c) Retak melalui badan gigi (sindroma gigi retak)

d) Perubahan barometric (barodontalgia)

2) Termal

a) Panas berasal dari preparasi kavitas, pada kecepatan rendah atau terlalu tinggi

b) Panas eksotermik karena menjadi kerasnya (setting) semen

- c) Konduksi panas dan dingin melalui tumpatan yang ada dalam suatu bahan dasar protektif
 - d) Panas friksional (pergesekan) disebabkan oleh pemolsan restorasi
- 3) Listrik (arus galvanik dari tumpatan metalik yang tidak sama
- b. Kimiawi
- 1) Asam fosfat, monomeric akrilik, dll.
 - 2) Erosi (asam)
- c. Bakterial
- 1) Toksin yang berhubungan dengan karies
 - 2) Invasi langsung pulpa dari karies atau trauma
 - 3) Kolonisasi mikrobial di dalam pulpa oleh mikroorganisme bloodborne (anakoresis)

2.4 Klasifikasi Penyakit Pulpa

a. Pulpitis Reversibel

Pulpitis reversibel adalah suatu kondisi inflamasi pulpa yang tidak parah, ringan hingga sedang. Keadaan pulpa dapat kembali normal dan dapat pulih kembali jika penyebab inflamasi dihilangkan, namun apabila keadaan pulpitis reversibel dibiarkan dan tidak segera dilakukan perawatan, maka dapat menyebabkan terjadinya inflamasi yang lebih parah, yaitu pulpitis irreversibel hingga terjadi kematian pulpa (nekrosis). Pulpitis reversible dapat disebabkan karena adanya trauma oklusi, stimulus kimiawi misalnya bahan makanan manis serta bakteri karies, dehidrasi kavitas dengan alkohol atau klorofm yang berlebihan, rangsangan pada leher gigi yang dentinnya terbuka atau syok termal misalnya karena bur yang terlalu lama menyebabkan panas (Torabinejad dan Walton, 2014).

Gejala pulpitis reversibel meliputi gejala simtomatik dan asimtomatik. Gejala simtomatik berupa rasa sakit ngilu saat minum manis, asam, panas, atau dingin yang tidak timbul secara spontan dan tidak berlanjut apabila penyebab ditiadakan, sedangkan gejala asimtomatik dapat disebabkan oleh karies yang baru mulai dan dapat normal kembali apabila karies dihilangkan dan gigi direstorasi dengan baik (Tarigan, 2015).

b. Pulpitis Irreversibel

Pulpitis irreversibel adalah inflamasi pada pulpa yang terus-menerus dengan atau tanpa gejala dan disertai dengan kerusakan jaringan pulpa meskipun rangsangan dihilangkan. Penyebab utama pulpitis irreversibel adalah bakteri. Penyebab lainnya diantaranya, makanan manis, stimulus termis, mekanis, kimiawi dan asam.

Gejala pada pasien pulpitis irreversibel dapat berupa akut atau kronis. Pulpitis akut apabila terjadi sakit terus menerus, spontan, dan bisa menjalar, sakit yang tajam, rasa sakit bertahan beberapa menit sampai berjam-jam tetap ada meskipun stimulus dihilangkan. Gejala kronis apabila pasien tanpa gejala dan biasanya sudah terjadi drainase eksudat. Jenis pulpitis yang termasuk kedalam pulpitis ireversibel adalah *acute irreversible pulpitis*, *chronic irreversible pulpitis*, dan *chronic hiperplastic pulpitis* (Tarigan, 2015).

c. Nekrosis Pulpa

Nekrosis pulpa adalah kematian pulpa yang merupakan proses lanjutan dari radang pulpa akut maupun kronis atau terhentinya sirkulasi darah secara tiba-tiba akibat trauma. Nekrosis pulpa dapat parsial atau total. Nekrosis parsial menunjukkan gejala seperti irreversibel pulpitis dengan nyeri spontan sedangkan nekrosis pulpa total tidak menunjukkan gejala dan tidak ada respon terhadap tes termal dan tes listrik (Tarigan, 2015).

2.5 Mekanisme Inflamasi Pulpa

Jaringan pulpa akan memberikan suatu respon inflamasi sejak lapisan enamel terbuka oleh rangsangan eksternal seperti cedera mekanik, termis, kimia atau bakteri. Proses ini diawali dengan adanya rangsangan pada jaringan pulpa yang nantinya akan mengaktifkan enzim fosfolipase untuk mengubah fosfolipid menjadi asam arakidonat. Kemudian oleh enzim siklooksigenase, asam arakidonat sebagian diubah menjadi endoperoksida yang akhirnya menjadi prostaglandin. Prostaglandin akan mempengaruhi permeabilitas pembuluh darah dan sel-sel radang yang terlibat dalam proses inflamasi. Sedangkan bagian lain dari asam arakidonat akan diubah

oleh enzim lipooksigenase menjadi hidroperoksida dan leukotrien (Kurniasari, 2017).

Adanya rangsangan eksternal pada jaringan pulpa, akan mulai terlihat adanya lapisan odontoblas yang cedera. Odontoblas adalah sel bentukan dentin yang membentang kedalam tubuli dentin dan merupakan sel pertama yang menghadapi injuri (Kurniasari, 2017). Jejas yang terjadi pada pulpa akan menyebabkan kerusakan sel. Respon inflamasi awal terhadap jejas terlihat dengan akumulasi sel inflamasi kronis pada suatu titik. Sebagai sel yang paling tepi dalam pulpa, odontoblas ditempatkan sebagai yang pertama kali melawan jejas dengan mengenali antigen asing dan memulai respon imun. Deteksi patogen dilakukan dengan reseptor spesifik yang disebut *pattern recognition receptors* (PRRs). Reseptor ini mengenali *polamolekuler patogen* (PAMPs) pada organisme yang menginvasi dan memulai pertahanan host melalui *aktivasi nuclear factor* (NF- κ B). Salah satu molekul pengenal PAMPs adalah *toll-like receptor family* (TLRs). Dalam sitosol terdapat NF- κ B yang merupakan faktor transkripsi terjadinya respon inflamasi. NF- κ B yang inaktif terdapat sebagai kompleks dengan inhibitor yaitu I κ B sehingga berbentuk NF- κ B-I κ B. TLRs dapat mengaktifasi NF- κ B-I κ B dengan cara fosforilasi I κ B. I κ B yang terfosforilasi kemudian terlepas dari NF- κ B sehingga terjadi degradasi I κ B diikuti translokasi NF- κ B ke dalam inti. Kejadian tersebut akan memicu proses transkripsi untuk pembentukan berbagai sitokin pro-inflamasi diantaranya TNF- α yang selanjutnya akan dilepaskan ke luar sel (Nirwana, 2012; Domini dkk., 2019). Peningkatan ekspresi dari sitokin dan molekul adhesi tersebut akan menyebabkan terjadinya proses inflamasi akut dan stimulasi imunitas adaptif (Margono dkk., 2016). Lepasnya sitokin pro-inflamasi akan menyebabkan leukositosis, yaitu jumlah leukosit khususnya neutrofil meningkat dan teraktivasi. Neutrofil yang teraktivasi akan mengeluarkan MMP-9 sehingga menyebabkan kerusakan jaringan pulpa yang banyak mengandung kolagen. Sehingga, diperlukan suatu bahan yang dapat menekan terjadinya inflamasi untuk mendorong terjadinya perbaikan jaringan pulpa (Nirwana, 2012).

Sitokin hasil produksi odontoblas akan berinteraksi dengan sel endotel pembuluh darah, mengubah sistem mikrosirkulasi dalam jaringan pulpa, sehingga

terjadi hambatan aliran darah dan metabolisme dalam jaringan. Mula-mula terjadi vasodilatasi sistem mikrovaskularisasi yang menyebabkan sirkulasi darah menjadi statis. TNF- α berperan menginduksi ekspresi molekul adhesi pada sel endotel seperti E-selectin, *Vascular Cell Adhesion Molecule-1* (VCAM-1) dan *Intracellular Cell Adhesion Molecule-1* (ICAM-1) yang akan menyebabkan sel leukosit menempel pada dinding pembuluh darah dan bermigrasi ke jaringan untuk mengeliminasi iritan atau debris seluler. TNF- α dapat menginduksi sel endotel dan sel dendritik untuk menghasilkan *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) yang akan menyebabkan monosit keluar dari pembuluh darah menuju ke daerah inflamasi. Di jaringan, monosit akan berdiferensiasi menjadi makrofag (Fatimatuzzahro, 2014). Di dalam arteri terjadi mobilisasi leukosit, sel-sel *polimorfonuklear neutrofil* (PMN) mengadakan marginasi yang dilanjutkan dengan emigrasi ke jaringan sekitarnya. Hal ini mengakibatkan pengumpulan eksudat di jaringan untuk proses fagositosis, keadaan ini disebut inflamasi akut. PMN yang berperan pada respon inflamasi akut dan hanya berumur pendek (24-36 jam). Neutrofil akan mulai mati setelah menghancurkan iritan dan jaringan yang rusak melalui proses fagositosis. Kemudian sisa benda asing dan luruhan sel yang tidak terfagosit oleh neutrofil akan difagositosis oleh makrofag sebagai pertahanan lini kedua untuk mengisolasi, menghancurkan, atau mengaktifkan pertahanan, membersihkan debris, mempersiapkan proses penyembuhan dan perbaikan jaringan (Kurniasari, 2017).

Proses yang terjadi dalam inflamasi adalah fagositosis yang merupakan salah sistem kekebalan terhadap patogen. Proses fagositosis terdiri dari tahapan berikut: pengenalan, yang merupakan proses di mana mikroorganisme atau partikel asing dideteksi oleh sel fagosit; pergerakan (kemotaksis), sel-sel fagosit bergerak menuju patogen; adhesi, patogen akan melekat pada reseptor pada membran sel fagosit; proses menelan, proses menelan patogen ke dalam sitoplasma; pencernaan, lisosom yang mengandung enzim destruktif seperti asam hidrolase dan peroksidase, akan berfusi dengan fagosom untuk membentuk fagolisosom, kemudian mencerna benda asing; yang terakhir sekresi, sisa produk partikel asing yang tidak dicerna akan diekskresikan oleh sel fagosit. Proses fagositosis selalu terjadi dalam

inflamasi. Mediator kimia yang penting dalam inflamasi adalah TNF- α dan Il-1 β . TNF- α adalah sitokin proinflamasi yang kuat dan berperan dalam sistem kekebalan tubuh. Proses inflamasi harus terjadi, akan tetapi juga menyebabkan kerusakan sel karena dapat melepaskan mediator kimia, enzim fagosit oksidase, nitrat oksida sintase yang dapat diinduksi, dan protease lisosom, protease radikal bebas, dan superoksida (Dewanti dkk., 2019).

2.6 Pulp Capping

2.6.1 Definisi *Pulp Capping*

Pulp capping adalah salah satu jenis perawatan untuk jenis karies dalam tetapi pulpa gigi masih dalam keadaan vital. Tujuan utama dari perawatan pulpa vital adalah untuk mempertahankan jaringan pulpa, menghilangkan jaringan yang terkontaminasi oleh bakteri, dan memicu terjadinya perbaikan jaringan melalui *barier* jembatan dentin (*dentin bridge*) (Brizuela dkk., 2017: 1176).

2.6.2 Klasifikasi *Pulp Capping*

a. *Direct Pulp Capping*

Direct pulp capping adalah suatu prosedur pemberian obat, pelapis atau bahan yang diletakkan secara langsung diatas pulpa yang terbuka untuk mempertahankan vitalitas pulpa dan dilakukan dalam sekali kunjungan. Tujuan utama dari perawatan ini adalah untuk menstimulasi terjadinya pembentukan dentin reparatif tersier (Lipski dkk., 2017).

Indikasi *direct pulp capping* menurut Garg & Garg (2011), yaitu:

1. Pulpa dalam keadaan pulpitis reversibel.
2. Pulpa terbuka karena kesalahan dalam pemakaian instrumen saat preparasi kavitas (*iatrogenic*) atau karena trauma pada gigi.
3. Ukuran pulpa yang terbuka kecil, yaitu tidak lebih dari 1mm.
4. Pasien dengan usia dibawah 30 tahun, hal ini mempengaruhi usia dari pulpa karena tingkat keberhasilan perawatan lebih tinggi pada gigi permanen usia muda, oleh karena pulpa memiliki vaskularisasi darah yang lebih baik.
5. Tidak ada rasa sakit spontan, karena apabila timbul rasa sakit spontan maka tingkat keberhasilan perawatan akan lebih rendah.

Kontraindikasi *direct pulp capping* menurut Garg & Garg (2011), yaitu:

1. Pemeriksaan radiografi ditemukan patologi pada pulpa.
2. Riwayat nyeri gigi spontan atau dalam kondisi pulpitis irreversibel.
3. Terjadi pendarahan pada lokasi jejas.
4. Pulpa yang terbuka akibat karies karena pulpa sudah terinfeksi oleh bakteri
5. Ukuran pulpa yang terbuka dari 1mm.

b. *Indirect Pulp Capping*

Indirect Pulp Capping adalah prosedur yang digunakan dalam perawatan karies yang dalam apabila seluruh dentin yang terkena karies dibuang akan menyebabkan terbukanya pulpa. Perawatan ini hanya dilakukan pada pulpa yang tidak memiliki tanda-tanda pulpitis irreversibel. Setelah seluruh dentin lunak dibuang, diatas dentin sisa diletakkan bahan pulp capping untuk menekan bakteri lalu ditumpat sementara, kemudian setelah beberapa minggu tumpatan sementara dan bahan pulp capping dibuang dan digantikan oleh restorasi permanen (Torabinejad dan Walton., 2014).

Indikasi *indirect pulp capping* menurut Kay (2016), yaitu:

1. Kondisi rongga mulut yang sehat dan baik.
2. Adanya gejala pulpitis reversibel ringan, misalnya: rasa sakit ketika terdapat rangsangan saja.
3. Karies yang dalam tetapi tidak ada abses dan pembengkakan.
4. Karies yang tidak mencapai pulpa sehingga pulpa tidak terbuka.

Kontraindikasi *indirect pulp capping* menurut Kay (2016), yaitu:

1. Karies yang mencapai pulpa.
2. Adanya gejala pulpitis irreversibel, misalnya: muncul rasa sakit ketika malam hari atau rasa sakit yang muncul tanpa adanya rangsang.

2.7 Bahan Pulp Capping

2.7.1 Syarat Bahan Pulp Capping

Bahan *pulp capping* harus memenuhi syarat biokompatibilitas yang dapat diterima tubuh atau tidak membahayakan bagi penggunaannya. Bahan yang diletakkan dalam rongga mulut idealnya tidak boleh membahayakan jaringan pulpa

dan jaringan lunak rongga mulut. Selain itu, bahan *pulp capping* harus memiliki sifat-sifat, yaitu (Kurniasari, 2017; McCabe, 2015; Song dkk., 2017):

1. Isolator termal atau tidak menghantarkan panas.
2. Isolator listrik atau tidak menghantarkan listrik.
3. Dapat merangsang pembentukan dentin reparatif.
4. Dapat mempertahankan vitalitas pulpa.
5. Bersifat antibakteri.
6. Adesif pada dentin dan bahan restoratif.
7. Tahan terhadap tekanan selama penempatan restorasi dan selama masa restorasi, steril, bersifat radiopaque dan memberikan segel terhadap bakteri .
8. Tidak mengandung bahan toksik yang mampu berdifusi dan dapat diabsorpsi kedalam sistem sirkulasi tubuh yang menyebabkan reaksi toksik secara sistemik.
9. Bahan yang digunakan harus bebas dari agen-agen *sensitizing* yang dapat berperan menimbulkan alergi dan seharusnya tidak karsinogenik.
10. Bersifat radiopak supaya dokter mudah untuk melihat keberadaan bahan ketika dilakukan rontgen.
11. Memiliki pH yang tinggi karena berpengaruh dalam pembentukan dentin reparatif.

2.7.2 Pasta

Pasta adalah sediaan obat setengah padat yang mengandung satu atau lebih bahan obat yang ditujukan untuk pemakaian topikal (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2012). Menurut Anief (2019), pasta adalah salep yang mengandung lebih dari 50% zat padat serbuk.

Macam-macam pasta menurut Murtini (2016), adalah:

1. Pasta berlemak

Pasta berlemak adalah suatu salep yang mengandung lebih dari 50% bahan padat (serbuk). Sebagai bahan dasar salep digunakan vaselin, parafin cair, bahan tidak berlemak seperti gliserin, mucilago atau sabun dan digunakan sebagai antiseptik atau pelindung kulit. Pasta berlemak merupakan salep yang tebal, kaku, keras dan tidak meleleh pada suhu badan. Komposisi salep ini memungkinkan penyerapan pelepasan cairan berair yang tidak normal dari kulit. Karena jumlah

lemaknya lebih sedikit dibandingkan serbuk padatnya, maka supaya dapat lebih homogen lemak-lemak dapat dikerjakan dengan melelehkannya terlebih dahulu baru kemudian dicampurkan.

2. Pasta kering

Pasta kering merupakan suatu pasta yang tidak berlemak, mengandung kurang lebih 60% bahan padat (serbuk).

3. Pasta pendingin

Pasta pendingin merupakan campuran serbuk dengan minyak lemak dan cairan mengandung air. Contohnya adalah Salep Tiga Dara

2.7.3 Macam Bahan *Pulp Capping*

a. Kalsium Hidroksida

Salah satu bahan yang sering digunakan sampai saat ini untuk perawatan *pulp capping* adalah kalsium hidroksida ($\text{Ca}(\text{OH})_2$). Kalsium hidroksida dapat dihasilkan melalui reaksi kalsium oksida (CaO) dengan air (H_2O). Kalsium hidroksida dapat berupa kristal tidak berwarna atau bubuk putih (Sumarna, 2017). Penggunaan bahan $\text{Ca}(\text{OH})_2$ pada tindakan *pulp capping* didasarkan pada kemampuan bahan tersebut untuk merangsang jaringan keras, reaksi inflamasi yang minimal, memiliki sifat antibakteri dan biokompatibel terhadap jaringan (Aries, 2015).

Kalsium hidroksida merupakan bakterisid karena memiliki pH yang sangat tinggi, yaitu 11-13 dan bersifat alkali. Pelepasan ion hidroksil (OH^-), menyebabkan terciptanya suasana basa. Aktivitas antimikroba dari kalsium hidroksida terkait dengan pelepasan ion hidroksil. Ion hidroksil adalah oksidan radikal bebas yang memiliki reaktivitas yang tinggi dan dapat bereaksi dengan beberapa biomolekul. Suasana basa yang terbentuk dari pelepasan hidroksil dapat mempengaruhi atau mengubah lingkungan, sehingga bakteri tidak dapat berkembang biak dan memberikan kondisi netral, ion hidroksil bekerja dengan mendenaturasi protein dan berikatan dengan gugus karbonil bakteri untuk menghidrolisis lemak lipopolisakarida (LPS) sehingga menurunkan pirogenitas, toksisitas, dan memicu aktivasi makrofag dan komplemen, sehingga dinding sel bakteri akan rusak kemudian mengakibatkan kematian bakteri (Widyasri, 2010). Salah satu penelitian

menunjukkan bahwa terjadi penurunan bakteri sebanyak 100% setelah mengalami kontak dengan kalsium hidroksida (Hilton, 2009).

Pelepasan ion kalsium (Ca^{2+}) dapat melarutkan jaringan nekrotik, menetralkan kondisi asam, serta menyebabkan terjadinya remineralisasi jaringan keras gigi karena berperan untuk stimulasi diferensiasi odontoblas sehingga terbentuk jembatan dentin dan memelihara vitalitas pulpa (Mellisa dkk., 2011). Selain itu, juga dapat mengaktifkan *Adenosine Triphosphate* (ATP) yang mempercepat mineralisasi tulang dan dentin, dan *Transforming Growth Factor type β* (TGF- β) yang berperan penting pada biomineralisasi (Kusuma, 2016). Kalsium hidroksida dapat menstimulasi diferensiasi sel-sel odontoblas baru yang akan membentuk dentin tersier (Torabinejad dan Walton, 2014). Dentin tersier akan terbentuk lebih dari 60 hari setelah pengaplikasian bahan *pulp capping*. Pembentukan dentin tersier pada minggu keempat menghasilkan dentin tipis yang bersifat porous, namun pembentukannya akan terus berlanjut (Fajriyani, 2016).

Kalsium hidroksida memiliki beberapa kelemahan, diantaranya yaitu sulit dimanipulasi dan membentuk suatu *lining* kavitas yang *friable* dan mudah pecah (McCabe, 2015). Pada proses penyembuhan dapat terjadi poristas pada dentin yang dikenal sebagai *tunnel defect* yang menyebabkan kegagalan pembentukan jembatan dentin sebagai barrier terhadap infeksi bakteri karena *tunnel defect* tersebut akan menjadi jalan untuk bakteri dan produk bakteri untuk menginvasi pulpa sehingga akan menyebabkan inflamasi dan nekrosis pulpa (Mellisa dkk., 2011; Komabayashi dkk., 2016). Nekrosis pada bagian permukaan pulpa terjadi karena $\text{Ca}(\text{OH})_2$ dapat terionisasi menjadi Ca^{2+} dan OH^- yang merupakan alkali kuat. Sifat alkali dapat menyebabkan iritasi pulpa dan memicu terjadinya lesi periapikal (Prananingrum, 2010).

b. *Mineral Trioxide Aggregate* (MTA)

Mineral Trioxide Aggregate (MTA) adalah bahan yang sesuai dengan namanya terdiri dari agregat mineral trioksida. MTA dikembangkan oleh Prof. Torabinejad beserta timnya di Universitas Loma Linda California (USA) dari tahun 1992 hingga 1993. MTA terdiri dari bubuk yang mengandung trikalsium silikat, dikalsium silikat, trikalsium aluminat, tetrakalsium aluminat dan dikalsium sulfat

dihidrat. MTA dibuat dengan hidrasi menjadi gel koloid dengan pH 12,5. (Daniele, 2017; Sumarna, 2017).

MTA digunakan sebagai bahan alternatif *pulp capping* karena diyakini lebih baik daripada kalsium hidroksida. MTA dapat memicu proliferasi sel-sel pulpa yang akan menstimulasi osteoblast untuk menghasilkan interleukin yang memicu pembentukan jaringan berikatan pada dentin dengan komposisi yang mirip dengan hidroksiapatit. Jembatan dentin baru yang terbentuk memiliki ketebalan dan kekerasan yang lebih tinggi dan terbentuk dalam waktu yang lebih singkat dibandingkan kalsium hidroksida (Fransson, 2016; Daniele, 2017). MTA memiliki memiliki kelarutan yang lebih rendah dibanding kalsium hidroksida dan mempunyai kemampuan sebagai *sealer* yang lebih baik karena ketika *setting* mampu menutup ruang pulpa secara hermetis, mencegah kontaminasi bakteri dari luar. Studi histologis juga menunjukkan adanya lebih sedikit peradangan pada pulpa ketika pengaplikasian MTA (Tawil dkk., 2015). Secara umum, MTA memiliki sifat yang lebih baik daripada kalsium hidroksida, akan tetapi MTA memiliki kekurangan yaitu, harga yang sangat mahal, satu gram bubuk MTA dihargai setara dengan sekitar 24 gram kalsium hidroksida (Mostafa, 2018).

2.8 Ikan Gurami

Ikan gurami merupakan salah satu jenis ikan air tawar yang telah lama dikenal dan dibudidayakan oleh masyarakat Indonesia. Sejak tahun 1802, ikan gurami sudah ditulis orang sebagai ikan hias dan ikan konsumsi. Tempat asal ikan gurami yang asli belum diketahui, namun menurut *The Complete Aquarist's Guide to Freshwater* yang diedit oleh John Gilbert, disebutkan bahwa ikan gurami berasal dari Kepulauan Sunda Besar (Heriyanti dan Ristiyanto, 2017). Produksi gurami di Indonesia tiap tahunnya terus meningkat, dari tahun 2008 sekitar 36.636 ton hingga tahun 2013 menjadi 94.605 ton (Hernawan, 2018). Ikan ini merupakan salah satu komoditi unggulan apabila dilihat dari jumlah permintaan yang cukup besar dan harga yang relatif tinggi dibandingkan dengan ikan air tawar lainnya seperti ikan mas, nila, tambakan dan tawes dan merupakan salah satu sumber protein yang cukup tinggi (Budiana dan Rahardja, 2018).

2.8.1 Taksonomi Ikan Gurami

Menurut Bachtiar (2010), ikan gurami diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Pisces
Subkelas	: Actinopterygii
Super Ordo	: Perciformes
Ordo	: Labyrinthici
Sub-Ordo	: Anabantoidea
Famili	: Anabantidae
Genus	: <i>Osphronemus</i>
Spesies	: <i>Osphronemus gouramy</i>

2.8.2 Morfologi Ikan Gurami



Gambar 2.2 Morfologi Ikan Gurami (Oktaviandari, 2016)

Ikan gurami memiliki ciri-ciri morfologi yaitu, bentuk tubuh pipih, terdapat sirip dada yang memanjang sampai dengan pertengahan sirip anal pada ikan dewasa dan melewati ujung sirip anal pada ikan muda, sisik *stenoid*, garis lateral lengkap, bentuk mulut kecil (Gambar 2.2). Bentuk tubuh ikan muda dan dewasa berbeda, pada ikan muda memiliki bentuk kepala yang lancip, sedangkan ikan dewasa memiliki tubuh yang lebih kokoh dengan bentuk dahi kepala yang agak cembung. Ikan dewasa jantan berwarna kekuningan agak mencolok (Rachmatika, 2010). Ikan gurami dewasa di atas punggungnya terdapat sirip punggung yang keras dan tajam serta dibawah sirip punggungnya terdapat tulang rusuk yang bergaris menyilang (Bachtiar, 2010).

2.9 Tulang Ikan Gurami

Tulang ikan gurami mempunyai komposisi kimia yang tinggi yaitu protein dibandingkan dengan ikan air tawar lainnya (Tridhar, 2016). Komposisi dari air dan abu ikan gurami semakin menurun seiring dengan meningkatnya ukuran ikan gurami, sedangkan kadar protein dan lemak semakin meningkat seiring dengan bertambahnya ukuran ikan gurami (Nurjanah dkk., 2010). Penelitian sebelumnya oleh Dewanti dkk. (2018), menyatakan bahwa tulang ikan mengandung omega 3, omega 6, flavonoid, tannin yang berperan sebagai anti-inflamasi. Penelitian Amalina (2019), menyatakan bahwa tulang ikan gurami memiliki kadar kalsium yang lebih tinggi dibandingkan dengan tulang ikan tenggiri, yaitu 5,912 ppm pada tulang ikan gurami dan 2,382 pada tulang ikan tenggiri.

Tabel 2.1 Komposisi Tulang Ikan Gurami Menurut Tridhar (2016)

Komposisi	Jumlah (%)
Protein	84,85%
Kadar Abu	0,93%
Kadar Lemak	1,63%
Air	7,03%.

Berdasarkan tabel 2.1 terlihat bahwa komposisi tertinggi pada tulang ikan gurami adalah protein. Protein tersusun dari asam amino yang berfungsi untuk meningkatkan proliferasi dan meningkatkan fungsi dari sel makrofag yang terlibat dalam proses *innate immunity*. Komposisi asam amino akan menentukan kualitas suatu protein. Kandungan asam amino esensial pada ikan gurami dari jumlah yang tertinggi hingga terendah ialah leusina, lisina, isoleusina, valina, treonina, fenilalanina, metionina kemudian histidina. Leusina merupakan molekul penting yang dapat merangsang sintesis protein otot dan juga memiliki nilai pengobatan yang berhubungan dengan stress, trauma, dan luka bakar. Lisina memiliki peran penting karena merupakan bagian dari komposisi dasar antibodi, memperkuat sirkulasi dan menjaga pertumbuhan sel yang normal. Metionina merupakan asam amino yang penting untuk metabolisme lemak, menjaga kesehatan hati, mencegah akumulasi lemak dalam hati dan arteri utama, mencegah alergi dan osteoporosis. Histidina berperan dalam interaksi antar protein, sebagai prekursor histamin,

neurotransmitter penting dan juga dibutuhkan bagi pertumbuhan dan perbaikan jaringan (Pratama dkk., 2018).

Tulang ikan menjadi sumber penting dalam aplikasi biomedik karena tingginya hidroksiapatit pada konstituen anorganiknya (Cahyanto dkk., 2017). Hidroksiapatit memiliki sifat biokompatibilitas yang sempurna apabila diimplankan pada tulang manusia. Oleh karena itu, tulang ikan dapat digunakan sebagai bahan implan dalam penggantian tulang (*bone substitution*), katup jantung, sambungan pinggul dan juga bahan implan lain pada tubuh dan gigi manusia. Tulang ikan juga memiliki karakteristik yang sama dengan tulang dan gigi manusia dari segi struktur kimia (Aisyah dkk., 2012).

Sisik ikan gurami diduga mempunyai komposisi kimia mirip dengan tulang (Budirahardjo, 2010). Sisik ikan gurami memiliki pH rata-rata sebesar 7,7; 8,40; dan 8,46. Rata-rata pH menunjukkan kenaikan seiring dengan kenaikan bobot ikan, walaupun perbedaan nilainya tidak signifikan. Kisaran nilai pH tersebut menunjukkan bahwa sisik gurami bersifat basa. Tingkat keasaman sisik gurami kemungkinan dipengaruhi oleh kandungan kalsium. Kalsium pada sisik terdapat dalam bentuk kristal hidroksiapatit yang mengandung gugus OH, dimana gugus OH berperan dalam membuat sifat basa suatu zat (Nurjanah dkk., 2010).

2.10 Hubungan Tulang Ikan Gurami dan TNF- α

Tulang ikan merupakan salah satu bagian tubuh ikan yang sering tidak dimanfaatkan atau dianggap sebagai limbah. Padahal dengan menggunakan prinsip *zero waste*, tulang ikan dapat dimanfaatkan terutama dalam bidang kesehatan (Nurjanah dkk., 2010).

Salah satu kandungan tertinggi yang ada pada tulang ikan gurami adalah protein (Tridhar, 2016). Protein adalah suatu polipeptida yang mempunyai berat molekul yang sangat bervariasi, dari 5 kDa hingga lebih dari satu juta. Suatu protein terdiri dari lebih dari 20 asam amino yang terikat satu dengan yang lain oleh ikatan peptida sebagai penyusun protein (Masyitoh dkk., 2016). Protein merupakan zat yang paling penting dalam setiap organisme dan juga merupakan bagian dari semua sel hidup yang merupakan komponen penyusun terbesar tubuh setelah air.

Asam amino berfungsi untuk meningkatkan proliferasi dan meningkatkan fungsi dari sel-sel imun diantaranya adalah makrofag yang terlibat dalam proses *innate immunity*. Sel imun tersebut mampu memfagositosis patogen, membunuh fungi, dan menghasilkan *nitric oxide* (NO), *interleukin*, TNF- α dan *reactive oxygen species* (ROS) (Daslina, dkk. 2015).

Flavonoid dapat berperan sebagai antiinflamasi karena efek dari kemampuan flavonoid memodulasi sintesis prostaglandin dan metabolisme asam arakidonat, serta inhibitor enzim yang kuat. Flavonoid dalam konsentrasi tinggi terbukti dapat menghambat pelepasan asam arakidonat dan sekresi enzim lisosom dari membran dengan jalan menghambat jalur siklooksigenase, lipooksigenase dan enzim fosfolipase. Sementara dalam konsentrasi rendah, senyawa ini hanya dapat menghambat jalur lipooksigenase. Sehingga dengan terhambatnya pelepasan asam arakidonat dari sel atau jaringan yang terinflamasi menyebabkan kurang tersedianya substrat arakidonat bagi jalur siklooksigenase maupun lipooksigenase dan akhirnya proses peradangan akan menurun. Menurunnya proses inflamasi juga akan menurunkan sitokin proinflamasi seperti TNF- α (Kurniasari, 2017).

Flavonoid juga dapat berperan sebagai antibakteri dengan cara menghambat fungsi DNA gyrase bakteri sehingga kemampuan replikasi dan translasi bakteri dihambat. Membran sitoplasma dari bakteri yang terdiri dari lipid dan asam amino akan rusak karena bereaksi dengan gugus alkohol pada senyawa flavonoid. Proses ini akan menyebabkan dinding sel rusak dan senyawa tersebut dapat masuk ke dalam inti sel bakteri sehingga bakteri akan mengalami lisis dan mati (Akbari, 2017).

Asam amino, omega 3, omega 6 dan flavonoid memiliki aktivitas anti inflamasi yang sama yaitu dengan menghambat enzim COX dan transkripsi NF- κ B (Dewanti dkk., 2019; Hou dkk., 2015; Nobili dkk., 2016). NF- κ B adalah faktor transkripsi yang mengatur transkripsi banyak gen terutama yang terlibat dalam respon imun dan peradangan. Dengan kata lain, NF- κ B memainkan peran penting dalam respon imun dan inflamasi melalui regulasi gen yang mengkode pro-inflamasi sitokin, molekul adhesi, kemokin, faktor pertumbuhan, enzim yang diinduksi, seperti *cyclo-oxygenase 2* (COX2), dan diinduksi *nitric oxide synthase*

(iNOS) (Nirwana dkk., 2017). Terhambatnya transkripsi dari NF- κ B menyebabkan terjadinya penurunan ekspresi dari sitokin proinflamasi diantaranya adalah TNF- α , dan peningkatan ekspresi sitokin antiinflamasi pada pulpa gigi (Nirwana, 2012).

2.11 Imunohistokimia

Nama Imunohistokimia diambil dari kata “*immune*” yang menunjukkan bahwa prinsip dasar dalam proses ini adalah penggunaan antibodi dan “*histo*” menunjukkan jaringan secara mikroskopis (Bintari, 2016). Imunohistokimia adalah suatu metode untuk mendeteksi keberadaan molekul atau berbagai macam komponen yang terdapat di dalam sel atau jaringan dengan menggunakan prinsip reaksi antara antigen dengan antibodi. Metode imunohistokimia berdasarkan pada penggunaan suatu antibodi yang spesifik yang dilabel dengan ikatan kimia pada suatu zat yang dapat dilihat, tanpa label itu mempengaruhi kemampuan antibodi untuk membentuk suatu kompleks dengan antigen yang bersangkutan (Unitly dan Sahertian, 2010).

Tahapan Pengecatan Imunohistokimia

Pewarnaan imunohistokimia yang dilakukan untuk mendeteksi profil Immunoglobulin A mengacu pada instruksi pewarnaan *Skytek Laboratories* dan Wresdiyati dkk. (2013).

1. Proses deparafinasi dilakukan dengan cara merendam *object glass* dalam larutan *xylol* I, *xylol* II, dan *xylol* III, masing-masing selama 3 menit.
2. Selanjutnya adalah proses *rehidrasi* dengan cara merendam *object glass* dalam alkohol dengan konsentrasi absolut (100%) I, absolut (100%) II, alkohol 95% I dan alkohol 95% II. Perendaman pada masing-masing konsentrasi direndam secara berturut-turut selama 3 menit.
3. Proses selanjutnya adalah penghilangan enzim peroksidase endogen menggunakan H₂O₂ sebanyak 0.3 ml (disiapkan sesaat sebelum *object glass* dimasukkan) kemudian preparat dicelupkan ke dalam larutan selama 10-15 menit.
4. Selanjutnya dilakukan pencucian menggunakan *buffer Peroxidase Blocking Solution* (PBS) masing-masing sebanyak 2 kali selama 5 menit. Permukaan

preparat di sekitar jaringan dikeringkan menggunakan tisu namun jaringan tidak dibiarkan kering.

5. Gunakan *Superblock* (tutup biru), dan inkubasi selama 5 menit pada suhu kamar untuk memblokir pewarnaan latar yang tidak spesifik.
6. Kemudian preparat dicuci menggunakan PBS sebanyak 1 kali selama 5 menit dan dikeringkan.
7. Preparat selanjutnya ditetesi dengan antibodi primer antibodi primer *Anti-TNF- α* (*Bioss*) ditambahkan 20 μ l per preparat (d disesuaikan sampai semua bagian tergenang) dengan perbandingan 1:250 kemudian diinkubasikan pada nampan lembab pada suhu kamar (25°C) selama satu malam.
8. Setelah diinkubasi, preparat dicuci kembali dengan PBS sebanyak 4 kali masing-masing selama 5 menit
9. Selanjutnya ditambahkan satu tetes *UltraTek Anti-Polyvalent* (tutup kuning), dan inkubasi selama 10 menit pada suhu kamar.
10. Preparat dicuci kembali dengan PBS sebanyak 4 kali masing-masing selama 5 menit
11. Selanjutnya ditambahkan *UltraTek HRP* (tutup merah), dan inkubasi selama 10 menit pada suhu kamar.
12. Preparat dicuci kembali dengan PBS sebanyak 4 kali masing-masing selama 5 menit
13. Tambahkan 4 tetes (200ul) kromogen DAB ke DAB substrat, campur dengan cara diaduk dan aplikasikan ke jaringan. Inkubasi selama 5-15 menit
14. Kemudian preparat dicuci dengan PBS sebanyak 4 kali masing-masing selama 5 menit, lalu dicuci dengan *aquades* selama 5 menit.
15. Cat *Mayer hematoxylin (counterstain)* ditambahkan ke preparat sebagai counterstain, kemudian diinkubasi selama 1 menit, dicuci dengan *aquades* selama 10 menit, dan dikeringkan
16. Proses selanjutnya adalah dehidrasi pada alkohol bertingkat 70%, 80%, 90%, 95%, absolut I, II, dan III. Kemudian dilanjutkan penjernihan dengan *xylol* I, II, dan III selama 1 menit, dikeringkan dan dibersihkan

17. Proses pewarnaan diakhiri dengan *mounting* (penutupan dengan *cover glass*) menggunakan *entellan*. Kemudian dilakukan pemberian label pada preparat histologi kemudian diamati di bawah mikroskop cahaya.

2.12 Tikus Wistar



Gambar 2.3 Tikus Wistar (Rochmawati, 2018)

Tikus wistar (*Rattus norvegicus*) atau biasa dikenal dengan nama lain Norway Rat berasal dari wilayah Cina dan menyebar ke Eropa bagian barat. Jenis tikus ini paling sering digunakan untuk penelitian eksperimental karena mencerminkan karakteristik yang paling mirip secara fisiologi dengan mamalia dan manusia. Tikus galur wistar yang paling banyak digunakan, memiliki waktu hidup yang cukup lama (Nirwana, 2012; Kurniawan dkk., 2018).

2.12.1 Taksonomi Tikus Wistar

Taksonomi tikus wistar menurut Sharp dan Villano (2013) adalah sebagai berikut:

Phylum	: Chordata
Class	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Myomorpha
Family	: Muridae
Sub Family	: Murinae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>

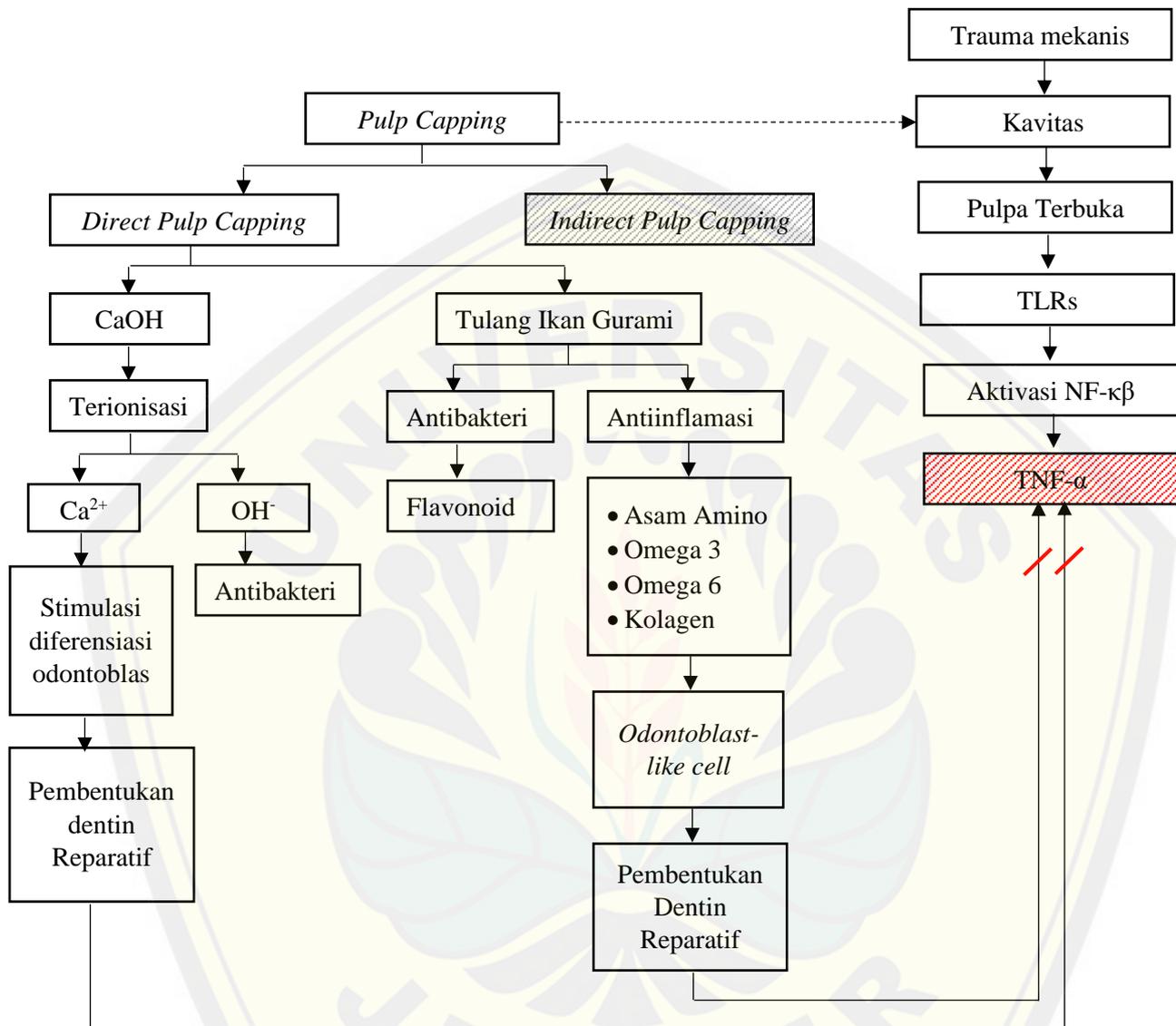
2.12.2 Morfologi Gigi Tikus Wistar

Gigi tikus putih terdiri dari 4 gigi pada setiap regio yang terdiri dari 1 gigi insisiv dan 3 gigi molar. Tikus wistar memiliki gigi molar yang berhenti tumbuh setelah erupsi. Sebaliknya, gigi insisivus pada spesies ini tumbuh terus-menerus (Nirwana, 2012).

Gigi tikus memiliki struktur anatomi sama seperti gigi manusia dimana terdapat enamel, dentin, dan ruang pulpa. Ketebalan enamel dari gigi molar tikus hanya sekitar 0.1 mm. Sedangkan, dentin dari molar tikus memiliki ketebalan sekitar 0.4–0.6 mm (Gay, 2013).

Tikus wistar digunakan sebagai hewan coba karena reaksi fisiologis pulpa terhadap suatu bahan sama dengan reaksi pulpa gigi manusia dan memiliki daya adaptasi yang tinggi sehingga banyak digunakan dalam penelitian eksperimental. Sementara gigi molar tikus wistar dipilih karena berdasarkan penampang mesio-distal memiliki bentuk dan struktur yang mirip dengan gigi manusia selain itu, kecepatan atrisi akibat mastikasi pada permukaan *oklusal* gigi molar lebih lambat dibandingkan permukaan insisal gigi tikus wistar (Sumarna, 2017).

2.13 Kerangka Konseptual



Keterangan :

-----> : perawatan

▨ : variabel yang tidak diteliti

▨ : variabel yang diteliti

— / —> : menghambat

Penjelasan Kerangka Konsep

Trauma mekanis dapat menyebabkan terbukanya pulpa yang akan menimbulkan jejas. Apabila tidak dilakukan perawatan mengakibatkan terjadinya inflamasi pulpa. Respon inflamasi pulpa dipacu oleh sel imun yaitu, makrofag, sel dendritik dan sel mast akan bertindak sebagai sel yang pertama kali merespon terjadinya jejas. Respon inflamasi awal terhadap jejas terlihat dengan akumulasi sel inflamasi kronis pada suatu titik. Deteksi jejas dilakukan dengan reseptor spesifik yang mengenali *polamolekuler patogen* (PAMPs) pada organisme yang menginvasi dan memulai pertahanan host melalui *aktivasi nuclear factor* (NF- κ B). Salah satu reseptor pengenalan PAMPs adalah *toll-likereceptor family* (TLRs). Dalam sitosol terdapat NF- κ B yang merupakan faktor transkripsi terjadinya respon inflamasi. TLRs yang terdapat di permukaan sel host, mengenali PAMPs, dan menyebabkan aktivasi faktor transkripsi NF- κ B. Kejadian tersebut akan memicu proses transkripsi untuk pembentukan berbagai sitokin proinflamasi diantaranya TNF- α yang selanjutnya akan dilepaskan ke luar sel. TNF- α yang dilepaskan menandai dimulainya fase inflamasi pada pulpa.

Kavitas yang timbul karena trauma mekanis dapat dilakukan perawatan *direct pulp capping*. Bahan yang biasa digunakan dalam perawatan *direct pulp capping* adalah kalsium hidroksida (Ca(OH)₂). Kalsium hidroksida akan terionisasi menjadi Ca²⁺ dan OH⁻. Ion OH⁻ merupakan alkalis karena sifat basa kuat memiliki pH yang tinggi, yaitu 11-13 yang berperan sebagai antibakteri karena dapat berikatan dengan gugus karbonil bakteri. Hal tersebut dapat merusak membran sitoplasma bakteri, denaturasi protein, dan merusak proses replikasi DNA bakteri, sehingga menyebabkan penurunan invasi mikroorganisme patogen. Ion Ca²⁺ berperan dalam merangsang pembentukan jaringan keras melalui jembatan dentin dan memelihara vitalitas pulpa. Kalsium hidroksida dipercaya mampu melepaskan molekul bioaktif yang berperan dalam proses dentinogenesis dan menjadi mediator dalam perbaikan pulpa, karena merupakan sitokin antiinflamasi. Munculnya sitokin antiinflamasi akan menghambat sitokin proinflamasi diantaranya TNF- α .

Bahan alternatif lain yang dapat digunakan untuk bahan *direct pulp capping* adalah tulang ikan gurami. Tulang ikan gurami mengandung asam amino, omega 3, omega 6, dan flavonoid memiliki aktivitas anti inflamasi, yaitu dengan cara menghambat enzim COX yang dapat mempengaruhi penurunan produksi PGE-2, sehingga terjadi penurunan transkripsi NF- κ B. Menurunnya NF- κ B akan menyebabkan penurunan sitokin proinflamasi TNF- α . Penurunan ekspresi TNF- α menandakan bahwa fase inflamasi menurun dan menandakan terjadinya respon perbaikan jaringan (proliferasi jaringan). Perbaikan jaringan disebabkan karena produksi sitokin anti-inflamasi IL-10, TGF- β dan peningkatan IL-4 yang berfungsi sebagai penghambat sitokin pro-inflamasi dan berperan dalam penyembuhan luka dan memperbaiki jaringan yang rusak dengan mempercepat proses angiogenesis, dan merangsang pembentukan dentin reparatif. Selain itu, kandungan protein kolagen akan mempercepat proses pengendapan garam mineral yang akhirnya akan terbentuk lapisan *odontoblas-like cell* yang berperan sebagai sel pembentuk dentin reparatif.

2.14 Hipotesis Penelitian

Pasta tulang ikan gurami (*Osphronemus gouramy*) dapat menurunkan ekspresi TNF- α pada pulpa gigi.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratoris. Rancangan penelitian menggunakan *the post-test only control group*, yaitu pengamatan atau pengukuran pada kelompok perlakuan dan membandingkan dengan kelompok kontrol dalam waktu tertentu (Notoatmodjo, 2012).

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.1 Tempat : Laboratorium Farmakologi Ruang Hewan dan Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember Jawa Timur, Laboraturium Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Jember Jawa Timur.

3.2.2 Waktu : September 2019 – November 2019.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah tulang ikan gurami (*Osphronemus gouramy*).

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah ekspresi TNF- α pada leukosit pulpa tikus wistar.

3.3.3 Variabel Terkontrol

- a. Lingkungan hidup tikus wistar.
- b. Hewan coba (tikus wistar jantan) berdasarkan : Jenis kelamin, usia dan berat badan, pemeliharaan, makanan dan minuman.
- c. Teknik preparasi gigi molar tikus wistar .
- d. Prosedur pembuatan pasta tulang ikan gurami.

3.4 Definisi Operasional Penelitian

3.4.1 Tulang Ikan Gurami

Tulang ikan gurami (*Osphronemus gouramy*) berasal dari ikan gurami segar yang didapat dari salah satu Pasar Tradisional di Kabupaten Jember dan telah diidentifikasi jenisnya di Dinas Perikanan Kabupaten Jember, kemudian dilakukan *fillet* untuk memisahkan antara daging dengan tulang ikan. Tulang ikan yang digunakan hanya bagian tengah badan, bagian ekor dan kepala tidak digunakan.

3.4.2 Pasta Tulang Ikan Gurami

Pasta tulang ikan gurami merupakan campuran dari sediaan bubuk tulang ikan gurami sebanyak 75% dengan bahan pembuat pasta sebanyak 25% yang dilakukan di Laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Jember.

3.4.3 *Direct Pulp Capping*

Direct pulp capping adalah suatu prosedur perawatan yang dilakukan pada gigi molar satu rahang bawah tikus wistar jantan yang telah teranastesi, kemudian dilakukan preparasi kavitas klas I pada permukaan oklusal menggunakan *contra angle low speed* dengan mata bur *round end* (nomer 10) sedalam 0.5mm lalu dilakukan perforasi atap pulpa dengan sonde yang ditandai dengan adanya sedikit perdarahan. Setelah itu kavitas dibersihkan dan dikeringkan, lalu segera mungkin diberi kalsium hidroksida atau pasta tulang ikan gurami di dasar kavitas dengan *liner applicator*, kemudian dikondensasi dengan *stopper cement*. Kavitas ditutup dengan tumpatan sementara menggunakan *plastis filling instrument* atau dengan sonde dan ditekan dengan kapas lembab.

3.4.4 Pasta Kalsium Hidroksida

Pasta kalsium hidroksida yang digunakan untuk perawatan *pulp capping* adalah tipe *hard setting (dycal)*.

3.4.5 Ekspresi TNF- α

Ekspresi TNF- α didapatkan dari pengamatan preparat imunohistokimia sampel gigi molar tikus wistar dimana area positif ekspresi TNF- α ditunjukkan dengan munculnya warna coklat pada sitoplasma leukosit (makrofag, neutrofil dan

limfosit) yang diamati dibawah mikroskop cahaya pada 3 lapang pandang berbeda dengan perbesaran 1000x.

3.4.6 Leukosit

Leukosit adalah sel darah putih yang berfungsi sebagai pertahanan tubuh terhadap jejas atau mikroorganisme dan jaringan asing. Leukosit berbentuk bulat, memiliki inti sel, bergranular atau tidak bergranular dan berukuran 1-2 kali lebih besar daripada sel darah merah.

3.5 Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini adalah tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*).

3.5.1 Kriteria Sampel

- a. Jenis kelamin jantan dengan strain atau galur wistar.
- b. Berat badan 150-200 gram.
- c. Usia 2-3 bulan.
- d. Keadaan umum tikus baik setelah diadaptasikan selama 7 hari.

3.5.2 Jumlah Sampel

Jumlah sampel pada penelitian ini sebanyak 32 ekor tikus wistar jantan, yang dibagi menjadi 4 kelompok secara acak dengan jumlah tiap kelompok terdiri dari 8 ekor tikus wistar jantan dan tiap kelompok dibagi lagi menjadi 2 sub-kelompok dengan jumlah 4 ekor tikus wistar jantan tiap sub-kelompok.

3.5.3 Kelompok Sampel

Sampel pada penelitian ini dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan, yaitu :

- a. Kelompok K1 : Gigi molar tikus tidak diberi perlakuan.
- b. Kelompok K2 : Gigi molar tikus dipreparasi kavitas klas I menggunakan *round bur* hingga mencapai atap pulpa, kemudian diperforasi menggunakan sonde, dan ditumpat dengan tumpatan sementara.
- c. Kelompok K3 : Gigi molar tikus dipreparasi kavitas klas I menggunakan *round bur* hingga mencapai atap pulpa, kemudian diperforasi menggunakan sonde, lalu diberi *bahan pulp capping* $\text{Ca}(\text{OH})_2$, dan ditumpat dengan tumpatan sementara.

- d. Kelompok K4 : Gigi molar tikus dipreparasi kavitas klas I menggunakan *round bur* hingga mencapai atap pulpa, kemudian diperforasi menggunakan sonde, lalu diberi bahan *pulp capping* pasta tulang ikan gurami, dan ditumpat dengan tumpatan sementara.

3.5.4 Besar Sampel

Cara penghitungan besar sampel yang digunakan dalam penelitian eksperimental laboratoris adalah berdasarkan rumus sebagai berikut (Daniel, 2013;189):

$$n = \frac{z^2 + \sigma^2}{d^2}$$

Keterangan:

n = besar sampel minimum

σ = standar deviasi (SD) sampel

d = kesalahan yang masih ditoleransi, diasumsikan $d = \sigma$

z = konstanta pada tingkat kesalahan tertentu, jika $\alpha = 0,05$, maka nilai Z adalah 1,96

P = keterpercayaan penelitian (95%)

Oleh karena itu, perhitungannya menjadi:

$$n = (1,96)^2$$

$$n = 3,84 \approx 4$$

Jumlah sampel minimum yang harus digunakan adalah 4 sampel tiap kelompok perlakuan. Sehingga jumlah total tikus yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebanyak 32 ekor.

3.6 Alat dan Bahan

3.6.1 Alat Penelitian

- a. Alat sterilisasi

Autoclave (Ependorf)

- b. Alat Pembuatan Pasta Tulang Ikan Gurami

- 1) Kaca arloji
- 2) Mortar dan stampen
- 3) Timbangan (*SNUG-300*)

- 4) Gelas ukur 10ml (*Iwaki*)
 - 5) Oven (*Memmert*)
 - 6) Kompor gas (*Rinnai*)
 - 7) Panci (*Global eagle*)
 - 8) Pisau
 - 9) Blender (*Philips*)
 - 10) Ayakan
 - 11) Loyang
- e. Alat Pengukur PH Tulang Ikan dan Pasta Tulang Ikan Gurami
- 1) PH meter (*pHep by Hanna*)
 - 2) Kertas Lakmus (*KGaA, 64271 Darmstadt*)
 - 3) Aquadest (*Onemed*)
 - 4) Timbangan (*SNUG-300*)
 - 5) Batang Pengaduk
 - 6) Gelas Ukur (*Iwaki, pyrex*)
- d. Alat Persiapan Hewan Coba
- 1) Timbangan hewan coba
 - 2) Tempat makan dan minum tikus
 - 3) *Rat Dental Chair*
 - 4) Kandang tikus
- e. Alat Preparasi Kavitas
- 1) Masker (*One Med*)
 - 2) Sarung tangan (*Maxter*)
 - 3) Sonde
 - 4) Spatula semen
 - 5) *Excavator*
 - 6) *Glass Plate*
 - 7) *Plastis filling instrument*
 - 8) Pinset
 - 9) Gunting
 - 10) Gelas Ukur

- 11) *Blade dan Scalpel*
- 12) Stopper semen
- 13) *Diamond round bur No.10 (Edenta)*
- 14) *Liner Applicator*
- 15) *Cotton pellet*

f. Alat Pembuatan Preparat

- 1) Mikrotom (*Leica RM2135*)
- 2) Waterbath (*Memmert*)
- 3) *Slide Warmer (Tissue-Tek PS-53)*
- 4) *Object glass dan cover glass (Poly-L-Lysine, Duran Group)*

g. Alat Analisis

- 1) Mikroskop binokuler (*Olympus CX21, USA*)
- 2) Optilab (*Minocos 2.0*)

3.6.2 Bahan Penelitian

- 1) Tikus wistar jantan
- 2) Makanan tikus wistar jenis konsentrat (*Rat Bio*)
- 3) Ikan gurami (*Osphronemus gouramy*)
- 4) Kalsium hidroksida (*Hydcal, Technew*)
- 5) Tumpatan sementara (*Orafil, Denpro*)
- 6) Air
- 7) *Ketamine dan Xylazine*
- 8) *Aquadest steril (One Med)*
- 9) Alkohol 70%, 80%, 95%, 100% (*One Med, CV. Nugra gemilang*)
- 10) NaOCl 2,5 %
- 11) Formalin 10%
- 12) Tissue Paraffin
- 13) *Xylol (Makmur Sejati)*
- 14) Reagen Imunohistokimia (*imunostaining kit, antibody primer Anti-THF- α (Bioss BS-2081R), Antibodi sekunder staining kit Skytec Laboratories Cat No AMF080-IFU*)
- 15) *Cat Mayer Hematoxylin (ScyTek Laboratories)*

16) *Entellan (KGaA)*

17) *Phosphate Buffer Saline (PBS)*

18) H_2O_2

3.6.3 Bahan Pembuat Pasta

a. Plasebo

1) Magnesium Carbonat 22gr

2) Calcium Carbonat 25gr

3) Gliserin 9ml

4) Propilen glikol 7ml

5) *Aquadest ad* 100gr

b. Bubuk tulang ikan gurami (*Osphronemus gouramy*) 75%

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Tahap Persiapan Hewan Coba

- a. Sebelum penelitian, dilakukan persiapan pembuatan *Ethical clearance* di Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- b. Kandang yang dipersiapkan berupa bak plastik dengan ukuran 40 x 30 x 20 cm, dimana setiap kandang dilengkapi dengan penutup kandang berupa kawat (Khoswanto, 2019). Kandang diberi alas dengan alas sekam dengan ketebalan 3 cm sebagai penghangat bagi tikus (Irdalisa dkk., 2015). Selama percobaan temperatur ruangan berkisar antara 26-27°C (Nugroho dkk., 2018).
- c. Adaptasi sampel tikus wistar terhadap lingkungan kandang selama 1 minggu dan diberi makan standar konsentrat berupa pellet sebanyak 5 gram/ ekor tikus dan minum berupa air jernih yang diberikan secara *ad libitum* (Fianti, 2017).
- d. Berat badan tiap sampel tikus ditimbang dan dikelompokan menjadi 4 kelompok secara acak masing-masing 8 ekor.

3.7.2 Pembuatan Serbuk Tulang Ikan Gurami

Prosedur pembuatan serbuk tulang ikan gurami yang dibuat berdasarkan penelitian Nur dkk. (2018), Putranto dkk. (2015), dan Spiraliga dkk. (2017):

a. Pemisahan dan Pencucian Tulang Ikan Gurami

Ikan gurami *difillet* menggunakan pisau. Kemudian, tulang bagian tengah ikan gurami dipisahkan dari dagingnya. Setelah dilakukan pemisahan, tulang ikan di letakkan pada saringan dan segera dicuci dengan air mengalir untuk membersihkan tulang ikan dari sisa-sisa daging yang masih menempel.

b. Perebusan dan Pencucian Tulang Ikan Gurami

Tulang ikan yang sudah bersih direbus dalam air mendidih menggunakan panci aluminium dengan suhu 70°C-100°C selama 30 menit (*degreasing*). Perebusan dilakukan untuk memastikan kembali tidak adanya sisa-sisa daging dan lemak yang masih menempel pada tulang. Setelah direbus tulang ikan diangkat dan ditiriskan. Lalu dicuci kembali tulang ikan sampai bersih dengan air mengalir.

c. Pengeringan dan Penghalusan

Tulang ikan yang sudah bersih kemudian dikeringkan menggunakan oven pengering selama 48 jam pada suhu 65°C. Setelah kering, tulang ikan dihaluskan menggunakan blender sehingga menjadi tepung tulang ikan. Selanjutnya ayak tepung tulang ikan menggunakan ayakan.

3.7.3 Pembuatan Pasta Tulang Ikan Gurami

Pembuatan pasta tulang ikan gurami adalah sebagai berikut (Akbari, 2017; Sumarna, 2017):

- a. Tulang ikan gurami ditimbang untuk mendapatkan berat 75gr.
- b. Mencampurkan semua bahan hingga didapatkan berat 100gr. Untuk mendapatkan pasta dengan konsentrasi tulang ikan gurami 75% adalah dengan cara mencampurkan 75gr bubuk tulang ikan gurami (*Osphronemus gouramy*) + 25gr plasebo (bahan pasta).

3.7.4 Pengukuran pH Tulang Ikan Gurami Dan Pasta

Pengukuran pH tulang ikan dilakukan dengan tahapan sebagai berikut (Pertiwi dkk., 2018):

- a. Timbang 10gr bubuk tulang ikan gurami, lalu masukkan ke dalam beker glass.
- b. Larutkan dengan aquadest hingga mencapai volume 100ml.
- c. Ukur PH tulang yang sudah dilarutkan menggunakan PH meter.

Pengukuran PH pasta tulang ikan gurami (Pertiwi dkk., 2018; Bawinto dkk., 2015):

- a. Timbang pasta tulang ikan gurami sebanyak 1gr, lalu masukan ke dalam beker glass.
- b. Larutkan dengan 10ml aquadest.
- c. Aduk dengan batang pengaduk selama kurang lebih 1 menit.
- d. Ukur PH pasta yang sudah dilarutkan menggunakan PH meter.

3.7.5 Sterilisasi Alat

Alat penelitian dari plastik disterilkan dengan menggunakan alkohol. Alat dari logam dicuci bersih kemudian disterilkan dalam *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C (Ma'at, 2009).

3.7.6 Tahap Pengelompokkan dan Perlakuan Hewan Coba

Pengelompokkan dan perlakuan hewan coba sebanyak 32 ekor tikus wistar jantan dengan berat 150-200 gram secara acak dibagi menjadi 4 kelompok. Setiap kelompok berjumlah 8 ekor tikus.

1. Kelompok Pertama (K1) Pulpa Normal
 - a. Tikus pada kelompok pertama tidak diberikan perlakuan.
2. Kelompok Kedua (K2) Kontrol Negatif
 - a. Tikus dianastesi secara intramuskular dengan ketamin 40 mg/KgBB kemudian diletakan di *Rat Dental Chair* (IAS Veterinary Staff, 2014).
 - b. Gigi molar kiri rahang bawah tikus dibur. Preparasi klas I dimulai pada oklusal gigi menggunakan bur bulat nomer 10 dengan arah sejajar sumbu gigi sedalam kurang lebih 0,5 mm menyisakan selapis tipis dentin, kemudian dilakukan perforasi pulpa menggunakan sonde lurus sampai atap pulpa terbuka yang ditandai dengan adanya perdarahan (Fatimatuzzahro, 2014). Perdarahan segera dikontrol dengan papper point.
 - c. Membersihkan kavitas dari serbuk dentin yang tersisa dengan irigasi menggunakan NaOCl 2,5% dan *aquades* lalu dikeringkan menggunakan kapas kering steril (Dianat dkk., 2018).
 - d. Kavitas kemudian ditutup menggunakan tumpatan sementara yang diaplikasikan dengan sonde kemudian dimampatkan dengan stopper semen kecil (Enggardipta dkk, 2016).

3. Kelompok Ketiga (K3) Kontrol Positif
 - a. Tikus pada kelompok ini diberi perlakuan yang sama seperti kelompok (K2) sampai pada tahap pengeringan kavitas menggunakan kapas kering steril.
 - b. Menyiapkan bahan *pulp capping* kalsium hidroksida dengan cara mencampurkan 2 pasta yaitu base dan katalis menggunakan sonde diatas *paper pad* (Akbari, 2017).
 - c. Pasta kalsium hidroksida (*dycal*) diaplikasikan ke dasar kavitas dengan menggunakan *liner applicator*.
 - d. Kavitas kemudian ditutup menggunakan tumpatan sementara (*orafil*) yang diaplikasikan dengan sonde kemudian dimampatkan dengan stopper semen kecil (Enggardipta, 2016).
4. Kelompok Keempat (K4) Perlakuan
 - a. Tikus pada kelompok ini diberi perlakuan yang sama seperti kelompok (K2) sampai pada tahap pengeringan kavitas menggunakan kapas kering steril.
 - b. Kavitas yang telah kering diberi bahan *pulp capping* pasta tulang ikan gurami dengan menggunakan *liner applicator*.
 - c. Kavitas kemudian ditutup menggunakan tumpatan sementara yang diaplikasikan dengan sonde kemudian dimampatkan dengan stopper semen kecil (Enggardipta, 2016).

Selanjutnya tiap kelompok perlakuan dibagi lagi menjadi 2 sub-kelompok berdasarkan hari euthanasia, yaitu pada hari ke-4 dan ke-7 setelah perlakuan dengan tiap sub-kelompok terdiri dari 4 ekor tikus. Tikus wistar jantan dikorbankan lalu didekapitasi pada hari ke-4 karena leukosit dapat mulai diamati di jaringan 24-96 jam setelah jejas, dan mencapai puncaknya pada hari ke-4. Euthanasia pada hari ke 7 karena infiltrasi leukosit mulai menurun karena fase inflamasi sudah berakhir dan memasuki fase proliferasi (Enggardipta dkk., 2016):

1. Sub-kelompok pertama adalah pengamatan tikus pada hari ke-4, tikus dianestesi secara intraperitoneal menggunakan ketamin dan *xylazine* dosis masing-masing 75 mg dan 10 mg/kg BB. (IAS Veterinary Staff, 2014), hingga

overdosis. Dalam situasi overdosis, agen ini dapat menyebabkan kematian 3-5 detik setelah injeksi (AVMA, 2013). Setelah tikus mati kemudian dilakukan dekapitasi dan pemotongan rahang bawah regio molar kiri.

2. Sub-kelompok kedua adalah pengamatan tikus pada Hari ke-7, dilakukan perlakuan yang sama seperti sub-kelompok pertama.

Kemudian semua sampel jaringan dari semua kelompok perlakuan difiksasi menggunakan formalin 10% selama minimal 12-18 jam untuk mencegah terjadinya autolisis, mempertahankan morfologi, dan mencegah pertumbuhan jamur serta bakteri. Setelah difiksasi jaringan dicuci dengan air mengalir.

3.7.7 Pembuatan dan Pewarnaan Preparat Jaringan

a. Dekalsifikasi jaringan

Sampel yang telah dimasukkan ke dalam formalin 10% selanjutnya dilakukan dekalsifikasi. Proses dekalsifikasi menggunakan larutan asam format untuk menghilangkan garam-garam kalsium dari jaringan tulang dan gigi sebelum pemotongan, sehingga tulang dan gigi menjadi lebih lunak dan memudahkan dalam pemotongan. Tahap dekalsifikasi sebagai berikut (Akbari, 2017; Kurniasari, 2017 & Sumarna, 2017):

- 1) Sampel yang telah direndam dalam formalin 10% dicuci dengan air bersih yang mengalir pelan selama 30 menit.
- 2) Kemudian dimasukkan ke dalam larutan asam format 10% selama 14 hari dan dilakukan vibrasi setiap hari agar proses dekalsifikasi merata.
- 3) Setelah itu dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan sisa bahan dekalsifikasi.

Setelah melalui tahap dekalsifikasi semua sampel rahang yang sudah lunak dipotong untuk memperkecil jaringan sehingga menyisakan gigi molar dan jaringan periodontal dari tikus.

b. Tahap pembuatan sediaan histologi.

Tahapan ini meliputi proses *dehidrasi, clearing dan impregnasi*, yaitu (Akbari, 2017; Kurniasari, 2017 & Sumarna, 2017):

- 1) *Dehidrasi* dengan cara merendam dalam alkohol secara bertingkat dengan konsentrasi 70%, 80%, 95% I, 95% II, Absolut (100%) I, Absolut (100%)

II, Absolut (100%) III untuk menghilangkan air dalam jaringan. Pada tiap konsentrasi direndam secara berturut-turut selama 60 menit.

- 2) Tahap berikutnya *clearing* dengan cara merendam dalam larutan xylol I, xylol II, dan xylol III, masing-masing selama 60 menit.
- 3) Setelah itu dilakukan *impregnasi* melalui proses infiltrasi parafin dalam oven dengan suhu 60 0C, dengan cara bertahap. Sediaan dimasukkan ke dalam parafin murni I, II, dan III masing-masing selama 120 menit(Akbari, 2017; Kurniasari, 2017 & Sumarna, 2017).

c. Pembuatan blok (*embedding*)

- 1) Persiapan alat cetak dari logam yang berbentuk balok bersiku yang ditempatkan di atas permukaan kaca. Alat cetak diolesi dengan gliserin untuk mempermudah pemisahan alat cetak dengan blok parafin yang telah setting.
- 2) Parafin cair disiapkan dalam wadah, parafin cair ini digunakan untuk *embedding*.
- 3) Parafin cair untuk *embedding* dituangkan ke dalam cetakan hingga penuh setinggi permukaan, lalu jaringan ditanamkan pada posisi yang sesuai dan diusahakan jaringan menempel pada dasar cetakan dalam kondisi rata.
- 4) Bila parafin sudah mengeras, cetakan dilepaskan dan blok parafin diberi label dan siap dilakukan pemotongan (Akbari, 2017; Kurniasari, 2017 & Sumarna, 2017).

d. Pemotongan jaringan menggunakan mikrotom

- 1) Blok parafin diletakkan pada mikrotom.
- 2) Pisau mikrotom harus dalam keadaan bersih, kemudian memasang pisau mikrotom pada posisinya.
- 3) Mengatur ketebalan sayatan antara 4-6 mikron dengan arah bukolingual.
- 4) Memindahkan hasil sayatan yang berupa pita tipis dari mikrotom menggunakan kuas ke atas permukaan air dalam *waterbath* dengan temperatur 56°C-58°C agar sayatan jaringan dapat mengembang dan terpisah satu sama lainnya.

- 5) Hasil sayatan dipindahkan dari *waterbath* ke atas *object glass* yang telah diolesi *meyer albumin* menggunakan kuas dan diberi label sesuai dengan label jaringan yang dipotong.
 - 6) Sediaan jaringan dibiarkan kering diatas *object glass* dan dipanaskan dengan slide warmer suhu 30°C-35°C selama minimal 12 jam dan selanjutnya dilakukan tahap pengecatan jaringan (Akbari, 2017; Kurniasari, 2017 & Sumarna, 2017).
- e. Tahap Pengecatan Imunohistokimia
- Pewarnaan imunohistokimia yang dilakukan untuk mendeteksi profil Immunoglobulin A mengacu pada instruksi pewarnaan *Skytek Laboratories* dan Wresdiyati dkk. (2013).
- f. Tahap *Mounting* (penutupan dengan *cover glass*) menggunakan *entellan*

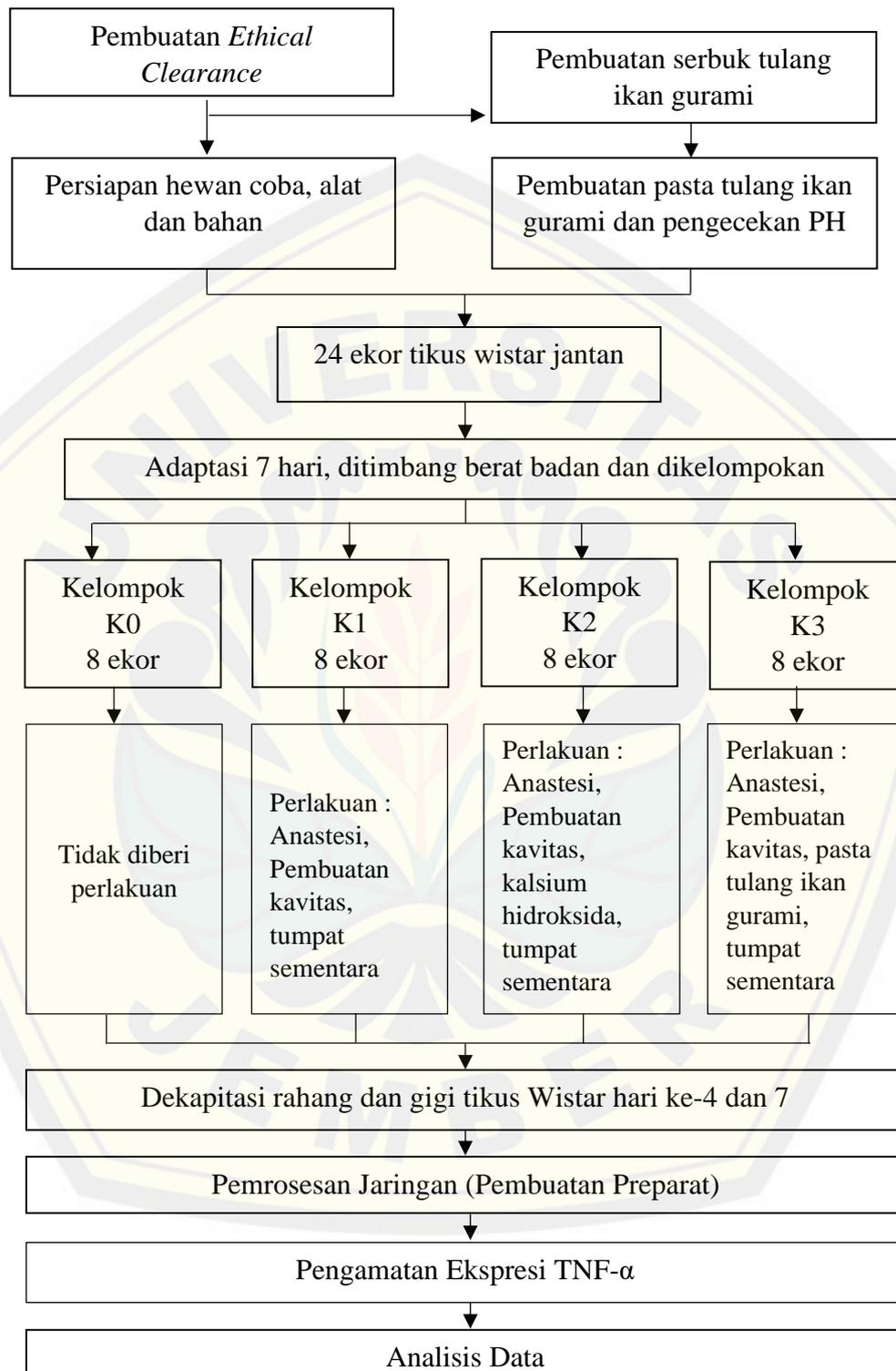
3.8 Pengamatan Ekspresi TNF- α

Pengamatan sel leukosit yaitu makrofag, limfosit dan neutrofil yang menunjukkan positif ekspresi TNF- α ditandai dengan warna coklat pada sitoplasma sel leukosit. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x pada 3 lapang pandang yang berbeda (Fatimatuzzahro, 2014; Kusumawardani dkk., 2013; Meizarini dkk., 2016).

3.9 Analisis Data

Data penelitian yang telah diperoleh kemudian dilakukan uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-wilk* dan di uji *Levene* untuk menguji homogenitas. Dilanjutkan dengan uji parametrik menggunakan *One Way ANOVA* dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$) lalu dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significance Difference*) dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$) untuk mengetahui kelompok mana saja yang memiliki perbedaan bermakna (Nirwana, 2012).

3.10 Alur Penelitian



BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan didapatkan kesimpulan bahwa penggunaan pasta tulang ikan gurami (*Osphronemus gourami*) sebagai bahan *direct pulp capping* berpengaruh dalam menurunkan ekspresi TNF- α pada pulpa gigi tikus wistar.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, saran yang dapat diberikan penulis adalah sebagai berikut :

- 5.2.1 Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh penggunaan pasta tulang ikan gurami terhadap komponen sel imun yang lain.
- 5.2.2 Perlu dipertimbangkan penggunaan konsentrasi lain dari pasta tulang ikan gurami.
- 5.2.3 Perlu dipertimbangkan penggunaan bahan tumpat *glass ionomer cement* GIC atau *cement base*.
- 5.2.4 Perlu pemeriksaan secara radiologis untuk melihat pembentukan dentin reparatif.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K. A.H. Lichtman, S. Pillai. 2016. *Imunologi Dasar Abbas Fungsi Kelainan Sistem Imun*. Singapore: Elsevier. h.44-47.
- Adhi, K.C., S. Sulistyowati, dan S.H. Respati. 2016. Kadar Human Leukocyte Antigen-G (HLA-G) dan Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) pada Abortus dan Kehamilan Normal. *Jurnal Kesehatan Reproduksi*. 2(2): 71-76.
- Agustini, D. 2014. Ekspresi Tumor Necrosis Factor (TNF- α) dan Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil Induksi Tiroglobulin Kambing (CTg) Sebagai Upaya Optimasi Hewan Model Autoimmune. *Skripsi*. Malang: Universitas Brawijaya Malang. h.6-7.
- Akbari, M.M. 2017. Efektifitas Pasta Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea Canephora*) Sebagai Bahan Alternatif Untuk Pulp Capping Terhadap Jumlah Odontoblas Pada Pulpa Tikus Wistar Jantan (*Rattus norvegicus*). *Skripsi*. Jember: Universitas Jember. h. 19.
- Amalina, L.R. 2019. Analisis Kadar Kalsium (Ca) Dan Fosfor (P) Tepung Tulang Ikan Tenggiri (*Scomberomorus Comerson*) Dan Ikan Gurami (*Osphronemus Gouramy*) Di Kabupaten Jember. *Skripsi*. Jember: Universitas Jember. h. 33.
- American Veterinary Medical Association. 2013. Guidelines for Euthanasia of Animals. <https://www.avma.org/sites/default/files/resources/euthanasia.pdf>. [Diakses pada 31 Mei 2020].
- Angriani, N., Suradi, Y.S. Sutanto. 2017. Pengaruh Omega 3 Polyunsaturated Fatty Acids terhadap Kadar IL-8 Serum, %VEP1, dan Skor COPD Assessment Test Penderita PPOK Stabil. *J Respir Indo*. 37(4):265-277.
- Anief, M. 2019. Ilmu Meracik Obat: Teori dan Praktik. Yogyakarta: Gajahmada Press. h.95.
- Apriani, D.R. 2011. Uji Efek Antiinflamasi Kombinasi Ekstrak Air Akar Tanaman Akar Kucing (*Acalypha indica* Linn.) dan Ekstrak Etanol 70% rimpang Jahe Merah (*Zingiber officinale* Rosc.) terhadap Udem Telapak Kaki Tikus yang diinduksi Karaginan. *Skripsi*. Depok: Universitas Indonesia. h.6.
- Apolinario, L.M., Carvalho, S.C.A.D., Neto, H.S., & Marques, M.J. 2015. Long-Term Therapy with Omega-3 Ameliorates Myonecrosis and Benefits Skeletal Muscle Regeneration in Mdx Mice. *The Anatomical Record*. 298:1589–1596.

- Aries, C.T. 2015. Dinamika Kadar Leptin Dan Fibronektin Terhadap Calcium Hydroxide Dan Mineral Trioxide Aggregate Sebagai Bahan Pulp Capping. *Skripsi*. Makassar: Universitas Hassanudin. h. 48-49.
- Astuti, N.D., M.L. Apriasari, Y.I. Nahzi. 2018. The Effect of Mauli Banana (*Musa acuminata*) Stem Extract on Macrophage Cell Number in Pulp Inflammation (In Vivo Study In Male Wistar Rat (*Rattus norvegicus*) Teeth. *Dentino Jurnal Kedokteran Gigi* 3(1):37.
- Bachtiar, Y. 2010. *Buku Pintar Budi Daya dan Bisnis Gurami*. Jakarta: PT Agromedia Pustaka. h.15
- Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI. 2018. *Riset Kesehatan Dasar*. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI. h. 118.
- Badan Pusat Statistik Kabupaten Jember. 2017. Kuantitas Produksi Ikan Air Tawar Menurut Jenis di Kabupaten Jember, Tahun 2016. Jember: Badan Pusat Statistik.
- Bare, Y., A.D. Kuki, A.H. Rophi, G.C. Krisnamurti, M.R.W.G. Lorenza, D.R.T. Sari. 2019. Prediksi Asam Kuinat Sebagai Anti-Inflamasi Terhadap COX-2 Secara Virtual. *Biota* 4(3):124-129.
- Bawinto, A.S., E. Mongi, B.E. Kaseger. 2015. Analisa Kadar Air, Ph, Organoleptik, Dan Kapang Pada Produk Ikan Tuna (*Thunnus Sp*) Asap, Di Kelurahan Girian Bawah, Kota Bitung, Sulawesi Utara. *Jurnal Media Teknologi Hasil Perikanan* 3(2):58.
- Belobrov I. dan P. Parashos. 2011. Treatment of tooth discoloration after the use of white mineral trioxide aggregate. *J Endod* 37(7): 1017-1020.
- Bintari, I.G. 2016. Deteksi areomonas hydrophilia pada ginjal mencit dengan Teknik imunohistokimia. Skripsi. Surabaya. Universitas Airlangga. h.19.
- Bratawidjaja, K., I. Rengganis. 2014. *Imunologi Dasar Edisi Ke 11 (Cetakan Ke-2)*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. h.226-229.
- Brizuela, C. Andrea, O. Carolina, C. Roxana C. Carolina, I. Valeria, R. Montse M. 2017. Direct Pulp Capping with Calcium Hydroxide, Mineral Trioxide Aggregate, and Biodentine in Permanent Young Teeth with Caries: A Randomized Clinical Trial. *JOE* 43(11):1776.
- Budiana dan B.S. Rahardja. 2018. Teknik Pembenuhan Ikan Gurame (*Osphronemus gouramy*) Di Balai Benih Ikan Ngoro, Jombang. *Journal of Aquaculture and Fish Health* 7(3):91.

- Budirahardjo, R. 2010. Sisik Ikan Sebagai Bahan Yang Berpotensi Mempercepat Proses Penyembuhan Jaringan Lunak Rongga Mulut, Regenerasi Dentin Tulang Alveolar. *Stomatognatic (J.K.G Unej)* 7(2): 136-40.
- Cahyanto. A., E. Kosasih, D. Aripin, Z. Hasratiningsih. 2017. Fabricated of Hidroxyapatite from Fish Bones Waste Using Reflux Method. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 1-5.
- Chapkin, R.S., W. Kim, J.R. Lupton, D.N. McMurray. 2009. Dietary Docosahexanoic And Eicosapentaenoic Acid : Emerging Mediators of Inflammation. *Prostaglandins, Leukot, Essent Fatty Acid*. 81(2-3):187 – 191
- Daniel, W.W., C. L. Cross. 2013. *Biostatistics: A Foundation for Analysis in the Health Sciences*. Tenth Edition. USA: JohnWiley & Sons, Inc. h.189.
- Daniele, L. 2017. Mineral Trioxide Aggregate (MTA) direct pulp capping: 10 years clinical results. *Giornale Italiano di Endodonzia*. Italy. h.1-10.
- Daslina, E. Darwin, A.Z. Djamal. 2015. Pengaruh Pemberian Glutamin pada Kemampuan Fagositosis Makrofag terhadap pseudomonas Aeruginosa. *Jurnal Kesehatan Andalas*. 4(3):691.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2012. *Farmakope Indonesia* Ed.V. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta. h.42.
- Dewanti, I.D.A.R., P.E. Lestari, Purwanto, E. Wulandari, R.W.E Yani, S. Wibisono, J. Burlakov. 2020. Bones, scales of *Upeneus sulphureus* and *Osphronemus gouramy* increase adhesion and decrease IL-1 β expression on monocytes against *Streptococcus mutans*. *Annals of Tropical Medicine & Public Health* 23(8): 1253.
- Dewanti, I.D.A.R., R. Budiraharjo, R.W.E Yani, P.E. Lestari, D. Setyorini, E.H. Jubhari, S. Wibisono. 2016. Steeping from green and black robusta coffee beans increase viability of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) and salivary leukocytes which is induced by streptococcus mutans. *Journal of Dentomaxillofacial Science (J Dentomaxillofac Sci)* 4(3): 157.
- Dewanti, I.D.A.R., I.D.A Susilawati, Purwanto, P.E. Lestari, R. Budirahardjo, D. Setyorini, R.W.E. Yani, E. Wulandari & M.A. Wahyukundari. 2019. The Role of Kuniran (*U. moluccensis*) and Gurami (*O. goramy*) Fish Thorns and Scales in Increasing Salivary Leukocyte and Monocyte Cells Viability against *Streptococcus mutans*. *Dent. J. (Majalah Kedokteran Gigi)* 52(1): 45–50.

- Dewanti, I.D.A.R., I.D.A., Susilawati, P.E, Lestari, R. Budirahardjo. 2016. Robusta Coffee Beans Decrease of Inflammation in Dental Caries. *Proceeding ICMHS*. p.173.
- Dewanti, I.D.A.R., I.D.A. Susilawati, P.E. Lestari, R.W.E Yani, E. Wulandary, R. Budirahardjo, D. Setyorini, S. Wibisono. 2019. Robusta Coffee (*Coffea canephora*) Decreasing IL-1 α (Interleukin-1 α) Expression and Increasing the Number of Fibroblasts in Healing Process in Dental Pulp in Wistar Rats. *J. Math. Fund. Sci* 51(1): 71.
- Dewanti, I.D.A.R., P.E. Lestari, R. Budirahardjo, D. Setyorini, R.W.E Yani, S. Wibisono, M. Mel. 2019. The Effect Of Steeping Robusta Coffee Beans On Monocytes:Expression Of IL-1 β and TNF-a Against *Streptococcus Mutans*. *Coffee Science, Lavras* 14(4): 477.
- Diana, S., P. Santosa. 2013. Perawatan Satu Kunjungan Pada Premolar Pertama Atas Menggunakan Protaper Rotary dan Restorasi Resin Komposit. *Maj Ked Gi* 20 (1): 85-91.
- Dianat, O., F. Mashhadiabbas, Z. Ahangari, S. Saedi, & S.R. Motamedian. 2018. Histologic comparison of direct pulp capping of rat molars with MTA and different concentrations of simvastatin gel. *Journal of Oral Science* 60(1): 57–63.
- Didilescu, A.C., C.M. Cristache, M. Andrei, G. Voicu, P. Perlea. 2018. The effect of dental pulp-capping materials on hard-tissue barrier formation A systematic review and meta-analysis. *The Journal of American Dental Association* 6(3):1-17.
- Dinas Peternakan dan Perikanan Kabupaten Jember, 2014. Produksi Ikan Gurami di Kabupaten Jember Tahun 2009-2013. Jember.
- Domini, F.B.A., I.D.A.R. Dewanti, E. Wulandari. 2019. Analisis Jumlah Sel Monosit yang Mengekspresikan Tnf-A setelah dipapar *Porphyromonas Gingivalis* dan Tulang Ikan Kuniran (*Upeneus Sulphureus*) dengan Teknik Imunositokimia. *Jurnal Kesehatan Gigi* 6(2): 87-92.
- Dwiandhono, I., R. Effendy, S. Kurniati. 2016. The thickness of odontoblast-like cell layer after induced by propolis extract and calcium hydroxide. *Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi)*. 49(1): 17-21.
- Dwitanandi, C. Nahzi, M.Y. Ichrom dan S.D. Rahardja. 2016. Pengaruh Ekstrak Kulit Manggis (*Garcinia Mangistana* Linn.) Terhadap Jumlah Makrofag pada Inflamasi Pulpa. *Dentino Jurnal Kedokteran Gigi*. 1(2):151-157.

- Enggardipta, R.A. Haniastuti, T. Handajani, T. 2016. Efek eugenol terhadap jumlah sel inflamasi pada pulpa gigi molar tikus Sprague Dawley. *Maj Ked Gi Ind* 2(2):66.
- Fatimatuzzahro, N. 2014. Ekspresi Tumor Necrosis Factor-A Dan Interleukin-1 β Sebagai Respon Pulpa Setelah Aplikasi Asam Fosfat 37% dan Ethylene Diamine Tetraacetic Acid 19%. *Penelitian Dosen Pemula*. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. h.1-14.
- Fajriyani, R. 2016. Evaluasi Klinis Keberhasilan Perawatan Kaping Pulpa Indirek Dengan Bahan Kalsium Hidroksida Tipe Hard Setting di Rsgm UMY. *Skripsi*. Yogyakarta: Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. h. 27.
- Farges, J.C., A.L. Brigitte, R. Emmanuelle, D. Maxime, G. Alexis, J.S. Anthony, dan Paul, R.C. 2015. Dental Pulp Defence and Repair Mechanisms in Dental Caries. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4619960/pdf/MI2015-230251.pdf>. [Diakses pada 29 Februari 2020].
- Fianti, L.L. 2017. Efektivitas Perasan Daun Afrika (*Vernonia Amygdalina Del*) Terhadap Penurunan Kadar Glukosa Darah Mencit (*Mus musculus*). *Skripsi*. Bandung. h.34.
- Fransson, H. E. Wolf. K. Petersson. 2016. Formation of a hard tissue barrier after experimental pulp capping or partial pulpotomy in humans: an updated systematic review. *Int Endod J*. 49(6): 533-42.
- Garg, N & Garg, A. 2011. Textbook of Preclinical Conservative Dentistry. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers. h.253-254.
- Gay. I., William. 2013. Methods of Animal Experimentation Volume 3. Academic Press New York and London. p. 266.
- Ghoddusi, J., M. Forghani, I. Parisay. 2014. New Approaches in Vital Pulp Therapy in Permanent Teeth. *Iranian Endodontic Journal* 9(1):15-22.
- Grossman, L.I., S. Olliet. C.E.D. Rio. 2014. *Endodontic Practice* -Ed.13. India:Wolters Kluwer Health. h.89-96.
- Haniastuti, T. 2008. Potential Role of Odontoblasts in the Innate Immune Response of the Dental Pulp. *Majalah Kedokteran Gigi (Dental Journal)* 41(3):2-4.
- Heriyanti, B dan Ristiyanto. 2017. *Binatang Penular Penyakit di Sekitar Lingkungan Rumah* Ed. 1. Jakarta: Yayasan Pustaka Obor Indonesia. h.3.

- Hernawan, F.A. 2018. Ekstraksi dan Karakterisasi Sifat Fisis Kolagen dari Limbah Sisik Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy*). *Skripsi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor. h.1.
- Hikmah, N. dan I.D.A.R. Dewanti. 2010. Ekspresi TNF- α Makrofag di Rongga Mulut Tikus Wistar yang Diberi Konsumsi Ekstrak Cair Daun Mimba (*Azadirachta indica*). *Jurnal Sainstek (Sains dan Teknologi)* 9(1): 45-49.
- Hilton, T.J. 2009. Keys to Clinical Success with Pulp Capping: A Review of the Literature. *Oper Dent* 34(5): 615-625.
- Horiuchi, T., Mitoma, H., Harashima, S.I., Tsukamoto, H., & Shimoda, T. 2010. Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *J Rheumatology* 49(7): 1215–1228.
- Hou, X. L., Tong, Q., Wang, W. Q., Shi, C. Y., Xiong, W., Chen, J., & Fang, J. G. 2015. Suppression of Inflammatory Responses by Dihydromyricetin, a Flavonoid from *Ampelopsis grossedentata*, via Inhibiting the Activation of NF- κ B and MAPK Signaling Pathways. *Journal of Natural Products*; 78(7): 1689–1696.
- IAS Veterinary Staff. 2014. Recommended Methods of Anesthesia, Analgesia, and Euthanasia for Laboratory Animal Species. Van Etten: Albert Einstein College of Medicine Institute for Animal Studies. h.4.
- Indahyani, D.E. 2013. Minyak ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*) menurunkan apoptosis osteoblas pada tulang alveolaris tikus wistar. *Dent. J (Maj. Ked. Gigi)*. 46(4):185–189.
- Irawati, L. 2014. Hubungan Tumor necrosis Factor-Alfa (Tnf-A) dengan Kadar Hemoglobin dan Parasitemia pada Infeksi Malatia Falciparum. *Jurnal Kesehatan Andalas*. 3(2): 98.
- Irdalisa, Safrida, Khairil, Abdullah, Sabri S. 2015. Profil kadar glukosa darah pada tikus setelah penyuntikan aloksan sebagai hewan model hiperglikemik. *Jurnal EduBio Tropica* 3(1): 26.
- Junqueira, L.C. Carneiro, J. 2016. *Histologi Dasar* Edisi 14. Jakarta: EGC.
- Kartikasari, V. S, Fidelia, J, Sudiono. 2018. Efek Ekstrak Etanol Tumbuhan Sarang Semut (*Myrmecodia Pendans*) terhadap Sel Odontoblas pada Pulpitis (Kajian pada Sediaan Histopatologi Pulpa Gigi Tikus (Sprague Dawley). *Prosiding Seminar Nasional Cendekiawan ke 4 Tahun 2018*. ISSN (P) : 2460 – 8696: 777.

- Kay, E.J. 2016. *Dentistry at a Glance. First Edition*. New Jersey: John Wiley & Sons, Ltd. h.126.
- Khoswanto, C. 2019. A New Technique for Research on Wound Healing through Extraction of Mandibular Lower Incisors in Wistar Rats. *European Journal of Dentistry*. ISSN 1305-7456. p.2.
- Kiswari, R. 2014. *Hematologi dan Transfusi*. Semarang: Penerbit Erlangga.
- Komabayashi, T., Q. Zhu, R., Eberhart. 2016. Current Status Of Direct Pulp-Capping Materials For Permanent Teeth. *Dental Materials Journal* 35(1): 2.
- Kurniasari, A. 2017. Efektivitas Pasta Biji Kopi Robusta (*Coffea robusta*) Sebagai Bahan Direct Pulp Capping Terhadap Jumlah Sel Makrofag Dan Sel Limfosit Pulpa Gigi. *Skripsi*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. h.13.
- Kurniawan, S. N., Raisa, N., & Margareta. 2018. Penggunaan Hewan Coba pada Penelitian di Bidang Neurologi. Malang: Universitas Brawijaya Press. h. 44.
- Kusuma, A.R.P. 2016. Pengaruh Lama Aplikasi Dan Jenis Bahan Pencampur Serbuk Kalsium Hidroksida Terhadap Kekerasan Mikro Dentin Saluran Akar. *Dental Journal* 3(1): 48-49.
- Kusumawardani, B., Marsetyawan, H.S., Djaswadi, D., dan Widya, A. 2013. Placental Trophoblast Responses to *Prophyromonas gingivalis* Mediated by Toll-Like Receptor- 2 and -4. *Journal of Dentistry Indonesia*. 20(2): 32-38.
- Laka, L.O. Santosa, Y.I. Naftali, Z. 2018. Pengaruh Ekstrak Kunyit (*Curcuma longa*) Terhadap Histopatologi Koklea pada Ototoksisitas (Studi Eksperimental pada Tikus Wistar yang diinduksi Gentamisin). *Jurnal Kedokteran Diponegoro* 7(1): 281.
- Lestari, P.E., I.D.A. Susilawati, I.D.A.R. Dewanti, R. Budiraharjo. 2016. Robusta Coffee Beans Increase Levels of TNF- α as a Response To *Streptococcus mutans*. *Proceeding ICMHS*. p.164.
- Lipski, M. Alicja, N. Katarzyna, K. 2017. Factors affecting the outcomes of direct pulp capping using Biodentine. *Clinical Oral Investigations* 22(5): 2021.
- Ma'at, S. 2009. Sterilisasi dan Disinfeksi. Surabaya: Airlangga University Press. h.18.
- Margono, D.P.N.H., E. Suhartono, H. Arwati, H 2016. Potensi Ekstrak Kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F) Bedd) Terhadap Kadar Tumor Necrosis

Factor-Alfa (Tnf-A) Pada Mencit Balb/C Yang Diinfeksi *Plasmodium berghei* Anka. *J Berkala Kedokteran* 12(1): 80.

- Masyitoh, M.D., I.D.A.R. Dewanti, D. Setyorini. 2016. Analisis Profil Protein Ekstrak Aquades dan Etanol Daun Mimba (*Azadirachta Indica* A. Juss) dengan Metode SDS-PAGE (Protein Profile Analysis of Aquadest and Ethanol Extract of Neem Leaves by Means of SDS-PAGE Method). *e-Jurnal Pustaka Kesehatan* 4(3): 534.
- McCabe, John F. 2015. *Bahan Kedokteran Gigi* – Ed. 9 ; Alih Bahasa, Siti Sunarintyas, Dewi Nurul Mustaqimah. Jakarta: EGC. h.399; 381-387.
- Mellisa. Wignyo, H. Juanita, A.G. 2011. Mineral Trioxide Aggregate (MTA) Studi Pustaka. *MIKGI* (Edisi Khusus): 88-89.
- Meizarini, A., Siswandono, dan Anita, Y. 2016. The Role of TLR2, NF- κ B, TNF α as an Inflammation Markers of Wound Dressing Combination of Zinc Oxide with Turmeric Liquid Extract. *Journal of International Dental and Medical Research*. 9(3): 173-177.
- Mohammadi, Z. Shalavi, S. Yasdzadeh, M. 2012. Antimicrobial Activity of Calcium Hydroxide in Endodontics: A Review. *Chonnam Medical Journal* 48(3): 133-140.
- Monfoulet, L.E. P. Becquart, D. Marchat. The pH in the microenvironment of human mesenchymal stem cells is a critical factor for optimal osteogenesis in tissue-engineered construct. 2014. *Tissue Eng Part A*. 20(13-14);1827-40.
- Mostafa, N.M. Moussa, S.A. 2018. Mineral Trioxide Aggregate (MTA) vs Calcium Hydroxide in Direct Pulp Capping – Literature Review. *On J Dent & Oral Health*. 1(2): 2-6.
- Natarajan, M.M. 2018. Characterisation of Pulpal Responses to Bacterial Challenge and Novel Antimicrobial for Management of Bacterial Contamination of Infected Pulp. *Tesis*. United Kingdom: Cardiff University.
- Nirwana, I. 2012. Aktivitas Ekstrak Buah Delima (*Punica granatum* L.) Sebagai Material Pulp Capping Terhadap Ekspresi IL-10, IL-6, TGF-B1, MMP-1 dan Kolagen Tipe I pada Gigi Perforasi Mekanik. *Disertasi*. Surabaya: Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. h.83.
- Nirwana, I., Agustantina, T. H., & Soekartono, R. H. 2017. NF- κ B Expressions on Rat Dental Pulp Mechanically Exposed after Pomegranate Fruit Extract

- Administration. *Journal of International Dental and Medical Research* 10(1):123-127.
- Nobili, V., Alisi, A., Musso, G., Scorletti, E., Calder, P. C., & Byrne, C. D. 2016. Omega-3 fatty acids: Mechanisms of benefit and therapeutic effects in pediatric and adult NAFLD. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 53(2): 106-120.
- Notoadmodjo, S. 2012. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta: Rineka Cipta. h.60.
- Nugroho, S. Widi, K. R. Fauziyah, D. Sajuthi, dan H.S. Darusman. 2018. Profil Tekanan Darah Normal Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur Wistar dan Sprague-Dawley. *ACTA VETERINARIA INDONESIA* 6(2): 33.
- Nur, A. Besti, V. Anggraini, H.D. 2018. Formulasi dan Karakteristik Bihun Tinggi Protein dan Kalsium dengan Penambahan Tepung Tulang Ikan Patin (*Pangasius hypophthalmus*) untuk Balita Stunting. *JURNAL MKMI*. 14(2): 159.
- Nurjanah. Taufiqurrahman, N. M. Tati. 2010. Komposisi Kimia Dan Vitamin A, B1, B2, B3 Daging Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy*) pada Berbagai Ukuran. *Jurnal Sumberdaya Perairan Akuatik* 4(1): 7-12.
- Oktaviandari, F. 2016. Pengaruh Pemberian Lisin Pada Pakan Komersial Terhadap Laju Pertumbuhan dan Retensi Protein Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy*). *Skripsi*. Surabaya: Universitas Airlangga. h.4.
- Permana, H.J., F. Rizqi, A.I. Defrigunawan. 2012. Inovasi Tissue Engineering Menggunakan Limbah Ikan sebagai Biomaterial Pengisi Soket Pasca Ekstraksi. *JMKG* 1(2):109.
- Pertiwi, M. Atma, Y. Mustopa, A.Z. Maisarah, R. 2018. Karakteristik Fisik dan Kimia Gelatin dari Tulang Ikan Patin dengan PreTreatment Asam Sitrat. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan* 7(2): 85.
- Prananingrum, W. 2010. The Increasing of Odontoblast-like Cell Number on Direct Pulp Capping of *Rattus norvegicus* using chitosan. *Dent. J. (Maj. Ked. Gigi)* 43(4): 169.
- Pratama, R.I. Rostini, I. Rochimma, E. 2018. Profil Asam Amino, Asam Lemak Dan Komponen Volatil Ikan Gurame Segar (*Osphronemus gouramy*) dan Kukus. *JPHPI* 21(2): 222-223.

- Putranto, H.F. Asikin, A.N. Kusumaningrum, I. 2015. Karakterisasi Tepung Tulang Ikan Belida (*Chitala Sp.*) Sebagai Sumber Kalsium Dengan Metode Hidrolisis Protein. *ZIRAA'AH* 40(1): 13.
- Robbins, S. R. S., Kumar, V. 2007. "*Basic Patology*". Disadur Staf Pengajar Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Buku Ajar Patologi. Edisi 7. Jakarta : EGC. h. 322-324
- Rochmawati, A. 2018. Ekstrak Bonggol Nanas (*Ananas Comusus L.*) Sebagai Antidiabetes Pada Tikus Yang Diinduksi Aloksan. *Skripsi*. Sidoarjo : Universitas Muhammadiyah Sidoarjo. h.30
- Samsi N.A., 2012, Perbandingan Efek Antibakteri Ekstrak Propolis, Formokresol, dan Kalsium Hidroksida terhadap Bakteri pada Abses Periapikal. *Skripsi*. Universitas Hasanuddin Makassar : 29-33.
- Sharp, P. dan Villano, J. 2013. *The Laboratory Rat Second Edition*. Boca Raton: CRC Press. h.1.
- Shi, L. Shanqi, F. dkk. 2017. TNF-alpha stimulation increases dental pulp stem cell migration in vitro through integrin alpha-6 subunit upregulation. *Archives of Oral Biology Elsevier* 75(2017):49.
- Sinaga, E. 2017. Pengaruh Tingkat Keparahan Sepsis bakterialis Terhadap Nilai Low Density Lipoprotein (LDL). *Tesis*. Medan: Progam Magister Kedokteran Klinik Spesialis Ilmu Penyakit Dalam Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Sumatra Utara. h.5-10.
- Song, M., B. Yu, S. Kim, M. Hayashi, C. Smith, S. Sohn, E. Kim, J. Lim, R.G. Stevenson, R.H. Kim. 2017. Clinical and Molecular Perspectives of Reparative Dentin Formation Lessons Learned from Pulp-Capping Materials and the Emerging Roles of Calcium. *Dent Clin N Am*. 61(1): 93–110.
- Spiraliga, R.R. Darmanto. Y.S. Amalia, U. 2017. Karakteristik Nasi Analog Tepung Mocaf Dengan Penambahan Tepung Rumput Laut I Dan Tiga Jenis Kolagen Tulang Ikan. *J. Peng. & Biotek* 6(1):3.
- Sumarna, A.H. 2017. Pengaruh Pasta Kopi Robusta (*Coffea robusta*) Sebagai Bahan Direct Pulp Capping Terhadap Jumlah Neutrofil. *Skripsi*. Jember: Universitas Jember. h.40.
- Tarigan, R. 2013. *Perawatan Pulpa Gigi (Endodonti)*. Edisi 3. Jakarta: EGC. h.26-36

- Tawil, P.Z., D.J. Duggan dan J.C. Galicia, 2015. MTA: A Clinical Review. *Compend Contin Educ Dent* 36(4): 247–264.
- Tridhar, NA. 2016. Perbandingan Produksi Kolagen dari Sisik dan Tulang Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy*) secara Kimia dan Enzimatis. *Skripsi*. Bandung: Universitas Pasundan. h.1.
- Torabinejad, M., Walton R. E. 2014. Prinsip dan Praktek Ilmu Endodonsia. Alih bahasa: Narlan S, Winiati S, Bambang N. Edisi 4. Jakarta: EGC. h.76.
- Tortosa-Caparrós, E., Navas-Carrillo, D., Marín, F., & Orenes-Piñero, E. 2016. Anti-inflammatory effects of omega 3 and omega 6 polyunsaturated fatty acids in cardiovascular disease and metabolic syndrome. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(16), 3421–3429.
- Rachmatika, I. 2010. Taksonomi dan habitat ikan gurame sungai, *Osphronemus septemfasciatus* Roberts. *Jurnal Iktiologi Indonesia* 10(2):147.
- Ratna, I.D.A., R.W.E. Yani, R. Budiharjo. 2019. The Adhesion Activity to Monocytes Against *Streptococcus mutans* with Exposure Steeping Robusta Coffee Beans. *Journal of International Oral Health* 11(1): 41.
- Unitly, A.J.A., D.E Sahertian. 2010. Deteksi Kandungan Antioksidan Superoksida Dismutase (SOD) pada Organ Ginjal Tikus *Rattus norvegicus* dengan Pewarnaan Imunohistokimia. *Seminar Nasional Basic Science II*. h.43–53
- Widiartini, C., Pribadi, F. W., & Sulistyono, H. 2018. Perbandingan Potensi Anti Stres Oksidatif Ekstrak Etanol Kulit Salak (*Salacca Zalacca*) Dan Allopurinol Pada Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Hiperurisemik. Prosiding Seminar Nasional dan Call for Papers "Pengembangan Sumber Daya Perdesaan dan Kearifan Lokal Berkelanjutan VII". 14 - 15 November 2018. 41-52.
- Widjiastuti, I., N. Irnantari, M. Rukmo. 2017. Stimulasi Ekstrak Propolis Pada Odontoblast Like Cells Yang Diinduksi *Lactobacillus Acidophilus* Inaktif Terhadap Ekspresi TLR2 Dan TNF α . *Odonto Dental Journal* 4(2):85-92.
- Wresdiyati T, Setiorini Y, Laila SR, Arief II, Astawan M. 2013. Probiotik lokal meningkatkan kandungan IgA usus halus tikus yang diinfeksi Enteropathogenic *E. Coli* (EPEC): studi imunohistokimia. *Jurnal Kedokteran Hewan* 7(2):109-115.
- Yu, M. Shi, W. Zhang. J. 2009. Influence of reverse signaling via membrane TNF- α on cytotoxicity of NK92 cell. *Eur J Cell Biol* 88(1):181–191

LAMPIRAN

Lampiran A. Ethical Clearance



KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK)
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS JEMBER
(THE ETHICAL COMMITTEE OF MEDICAL RESEARCH
FACULTY OF DENTISTRY UNIVERSITAS JEMBER)

ETHIC COMMITTEE APPROVAL
No.580/UN25.8/KEPK/DL/2019

Title of research protocol	: *Analysis of TNF Alpha, IL-10, TLR 2 Expression in Dental Pulp and Alveolar Bone of Wistar Rats that given With Scales, Thorns of Gouramy and Kuniran Fishes "
Document Approved	: Research Protocol
Principal investigator	: Prof. Dr.drg I Dewa Ayu Ratna Dewanti, M.Si
Member of research	: 1. Prof. Dr.drg I Dewa Ayu Ratna Dewanti, M.Si 2. Dheamira Rosida 3. Shintia Dwi Pramesty 4. Sunana Ageng Hikmawati
Responsible Physician	: Prof. Dr.drg I Dewa Ayu Ratna Dewanti, M.Si
Date of approval	: September- November 2019
Place of research	: Laboratorium Biomedik FKG Universitas Jember

The Research Ethic Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember States That the above protocol meets the ethical principle outlined and therefore can be carried out.

Jember, September 10th 2019



Dean of Faculty of Dentistry
Universitas Jember

(drg. R. Rahardyan P. M. Kes, Sp. Pros.)



Chairperson of Research Ethics Committee
Faculty of Dentistry Universitas Jember

(Prof. Dr.drg. I Dewa Ayu Ratna Dewanti, M.Si.)

Lampiran B. Ijin Penelitian



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
Jl. Kalimantan No. 37 Jember ☎(0331) 333536, Fak. 331991

Nomor : 5584 /UN25.8/TL/2019
Perihal : Ijin Penelitian

27 AUG 2019

Kepada Yth
Kepala Bagian Laboratorium Biomedik
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
Di
Jember

Dalam rangka pengumpulan data penelitian maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan ijin penelitian bagi dosen kami dibawah ini :

1	Nama	: Prof. Dr. drg. IDA Ratna Dewanti, MSi
2	NIP	: 196705021997022001
3	Semester/Tahun	: 2019/2020
4	Fakultas	: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
5	Alamat	: Jl. Danau Toba I/18 A Jember
6	Judul Penelitian	: Analisis Biokompatibilitas Dan ogenitas Limbah Ikan (Duri Dan Sisik) Sebagai Material Tissue Engeneerins
7	Lokasi Penelitian	: Laboratorium Patologi Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
8	Data/alat yang dipinjam	: Imunohistokimia
9	Waktu	: Agustus 2019 s/d Selesai
10	Tujuan Penelitian	: Untuk Menganalisis Imunogenitas

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih

an Dekan
Wakil Dekan I.



Dr. drg. Masniari Novita, M.Kes, Sp.OF(K)
NIP. 196811251999032001

Lampiran C. Identifikasi Hewan



PEMERINTAH KABUPATEN JEMBER
DINAS PERIKANAN
Jl. Letjen Suprpto Nomor 139 Telp. (0331) 5101342
Jember 68122

SURAT KETERANGAN HASIL ANALISA HEWAN

No. 523/511 /35.09.329/2019

Berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen hewan yang dikirim ke Dinas Perikanan Kabupaten Jember oleh mahasiswa :

Nama : DHEAMIRA ROSIDA
N IM : 161610101023
Fakultas : Kedokteran Gigi Universitas Jember

maka disimpulkan hasil identifikasi spesimen tersebut adalah :

Kingdom : Animalia
Filum : Chordata
Kelas : Pisces
Sub Kelas : Teleostei
Ordo : Labyrinthici
Sub Ordo : Anabantoidae
Famili : Anabantidae
Genus : Osphronemus
Spesies : *Osphronemus gouramy* (Lacapede)
Nama Indonesia : Ikan Gurami

Demikian surat keterangan ini dibuat, untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 26 September 2019

An. KEPALA DINAS PERIKANAN
KABUPATEN JEMBER
Kepala Bidang Sumberdaya Perikanan
Dan Kelautan

**Ir. TIGO DEWANTO**

Pembina

NIP. 19670829 199303 1 002

Lampiran D. Data Hasil Pengamatan Ekspresi TNF- α

Kelompok	Hari	Tikus	Lapang Pandang			x	NA
			1	2	3		
K1	4	1	3	3	3	3	2,08333
		2	2	2	1	1,66667	
		3	1	1	2	1,33333	
		4	2	3	2	2,33333	
	7	1	2	2	2	2	1,83333
		2	1	1	3	1,66667	
		3	2	2	1	1,66667	
		4	3	1	2	2	
K2	4	1	18	18	8	14,6667	13,8333
		2	16	15	9	13,3333	
		3	17	15	12	14,6667	
		4	18	11	9	12,6667	
	7	1	13	12	11	12	12,25
		2	10	12	13	11,6667	
		3	15	12	12	13	
		4	12	12	13	12,3333	
K3	4	1	12	10	12	11,3333	10,75
		2	10	13	9	10,6667	
		3	9	11	11	10,3333	
		4	11	12	9	10,6667	
	7	1	11	9	11	10,3333	9,08333
		2	10	8	9	9	
		3	8	9	10	9	
		4	9	9	6	8	
K4	4	1	10	10	9	9,66667	9,33333
		2	8	7	11	8,66667	
		3	9	6	9	8	
		4	9	15	9	11	
	7	1	7	7	6	6,66667	7
		2	8	6	9	7,66667	
		3	7	7	8	7,33333	
		4	6	5	8	6,33333	

Lampiran E. Hasil Analisa SPSS

E.1 Hasil Uji *Shapiro-Wilk*

Tests of Normality							
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Kelompok	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ekspresi	K1	.191	8	.200*	.920	8	.433
	K2	.174	8	.200*	.905	8	.320
	K3	.269	8	.092	.911	8	.359
	K4	.168	8	.200*	.947	8	.682

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

E.2 Hasil Uji *Levene*

Levene's Test of Equality of Error Variances ^{a,b}						
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.	
Ekspresi	Based on Mean	1.625	7	24	.176	
	Based on Median	1.447	7	24	.233	
	Based on Median and with adjusted df	1.447	7	13.144	.267	
	Based on trimmed mean	1.616	7	24	.179	

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Dependent variable: Ekspresi

b. Design: Intercept + Kelompok + Hari + Kelompok * Hari

E.3. Hasil Uji *One Way Anova*

ANOVA					
Jumlah	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	522.636	3	174.212	132.419	.000
Within Groups	36.837	28	1.316		
Total	559.473	31			

E.4 Hasil Uji LSD

Multiple Comparisons

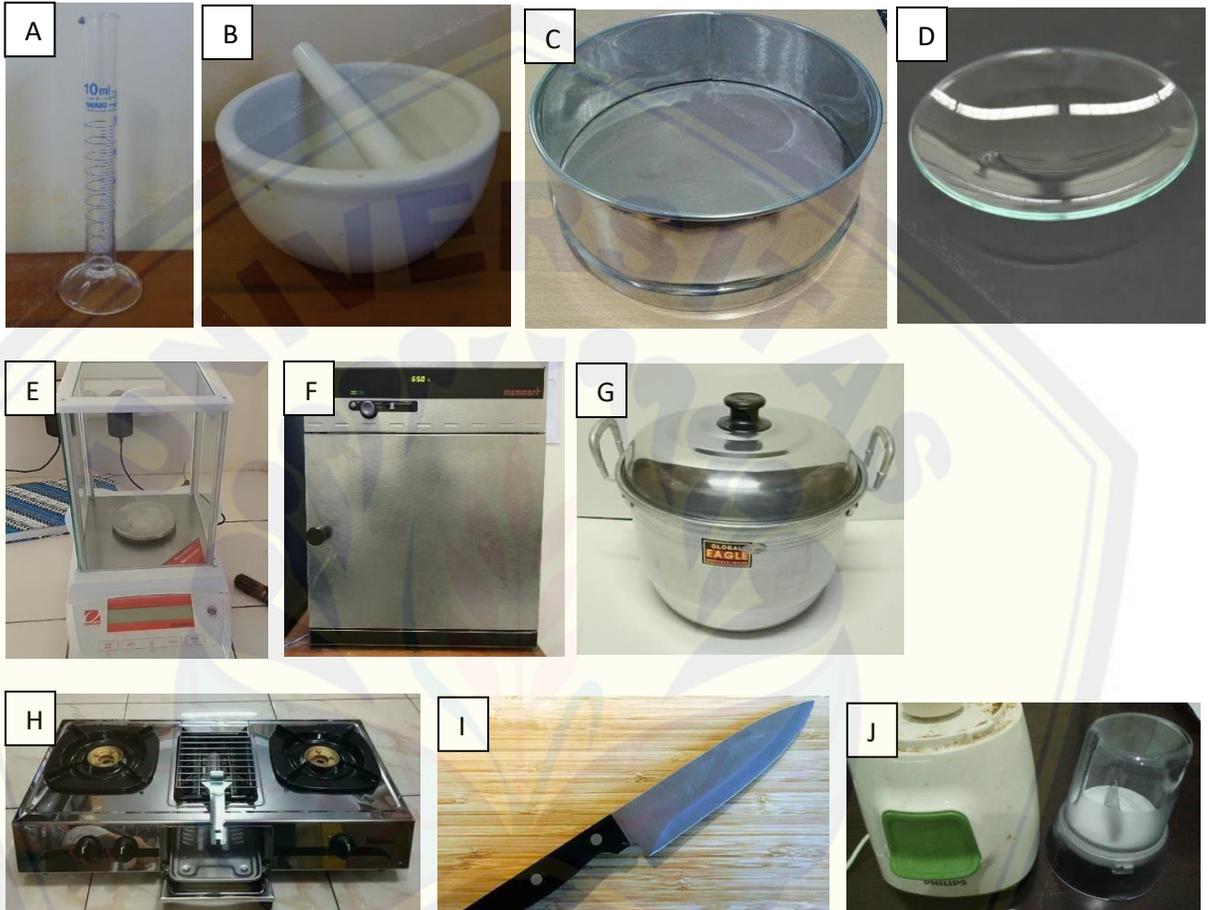
Dependent Variable: Ekspresi

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K1H4	K1H7	.25000	.57047	.665	-.9274	1.4274
	K2H4	-11.69250 [*]	.57047	.000	-12.8699	-10.5151
	K2H7	-10.16750 [*]	.57047	.000	-11.3449	-8.9901
	K3H4	-8.66750 [*]	.57047	.000	-9.8449	-7.4901
	K3H7	-7.00000 [*]	.57047	.000	-8.1774	-5.8226
	K4H4	-7.25250 [*]	.57047	.000	-8.4299	-6.0751
	K4H7	-4.91750 [*]	.57047	.000	-6.0949	-3.7401
K1H7	K1H4	-.25000	.57047	.665	-1.4274	.9274
	K2H4	-11.94250 [*]	.57047	.000	-13.1199	-10.7651
	K2H7	-10.41750 [*]	.57047	.000	-11.5949	-9.2401
	K3H4	-8.91750 [*]	.57047	.000	-10.0949	-7.7401
	K3H7	-7.25000 [*]	.57047	.000	-8.4274	-6.0726
	K4H4	-7.50250 [*]	.57047	.000	-8.6799	-6.3251
	K4H7	-5.16750 [*]	.57047	.000	-6.3449	-3.9901
K2H4	K1H4	11.69250 [*]	.57047	.000	10.5151	12.8699
	K1H7	11.94250 [*]	.57047	.000	10.7651	13.1199
	K2H7	1.52500 [*]	.57047	.013	.3476	2.7024
	K3H4	3.02500 [*]	.57047	.000	1.8476	4.2024
	K3H7	4.69250 [*]	.57047	.000	3.5151	5.8699
	K4H4	4.44000 [*]	.57047	.000	3.2626	5.6174
	K4H7	6.77500 [*]	.57047	.000	5.5976	7.9524
K2H7	K1H4	10.16750 [*]	.57047	.000	8.9901	11.3449
	K1H7	10.41750 [*]	.57047	.000	9.2401	11.5949
	K2H4	-1.52500 [*]	.57047	.013	-2.7024	-.3476
	K3H4	1.50000 [*]	.57047	.015	.3226	2.6774
	K3H7	3.16750 [*]	.57047	.000	1.9901	4.3449
	K4H4	2.91500 [*]	.57047	.000	1.7376	4.0924
	K4H7	5.25000 [*]	.57047	.000	4.0726	6.4274

K3H4	K1H4	8.66750*	.57047	.000	7.4901	9.8449
	K1H7	8.91750*	.57047	.000	7.7401	10.0949
	K2H4	-3.02500*	.57047	.000	-4.2024	-1.8476
	K2H7	-1.50000*	.57047	.015	-2.6774	-.3226
	K3H7	1.66750*	.57047	.007	.4901	2.8449
	K4H4	1.41500*	.57047	.021	.2376	2.5924
	K4H7	3.75000*	.57047	.000	2.5726	4.9274
K3H7	K1H4	7.00000*	.57047	.000	5.8226	8.1774
	K1H7	7.25000*	.57047	.000	6.0726	8.4274
	K2H4	-4.69250*	.57047	.000	-5.8699	-3.5151
	K2H7	-3.16750*	.57047	.000	-4.3449	-1.9901
	K3H4	-1.66750*	.57047	.007	-2.8449	-.4901
	K4H4	-.25250	.57047	.662	-1.4299	.9249
	K4H7	2.08250*	.57047	.001	.9051	3.2599
K4H4	K1H4	7.25250*	.57047	.000	6.0751	8.4299
	K1H7	7.50250*	.57047	.000	6.3251	8.6799
	K2H4	-4.44000*	.57047	.000	-5.6174	-3.2626
	K2H7	-2.91500*	.57047	.000	-4.0924	-1.7376
	K3H4	-1.41500*	.57047	.021	-2.5924	-.2376
	K3H7	.25250	.57047	.662	-.9249	1.4299
	K4H7	2.33500*	.57047	.000	1.1576	3.5124
K4H7	K1H4	4.91750*	.57047	.000	3.7401	6.0949
	K1H7	5.16750*	.57047	.000	3.9901	6.3449
	K2H4	-6.77500*	.57047	.000	-7.9524	-5.5976
	K2H7	-5.25000*	.57047	.000	-6.4274	-4.0726
	K3H4	-3.75000*	.57047	.000	-4.9274	-2.5726
	K3H7	-2.08250*	.57047	.001	-3.2599	-.9051
	K4H4	-2.33500*	.57047	.000	-3.5124	-1.1576

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

Lampiran F. Alat Penelitian**F.1 Alat Pembuat Pasta Tulang Ikan Gurami**

Keterangan:

A. Gelas ukur 10ml

B. Mortar dan stampen

C. Ayakan

D. Kaca arloji

E. Timbangan

F. Oven

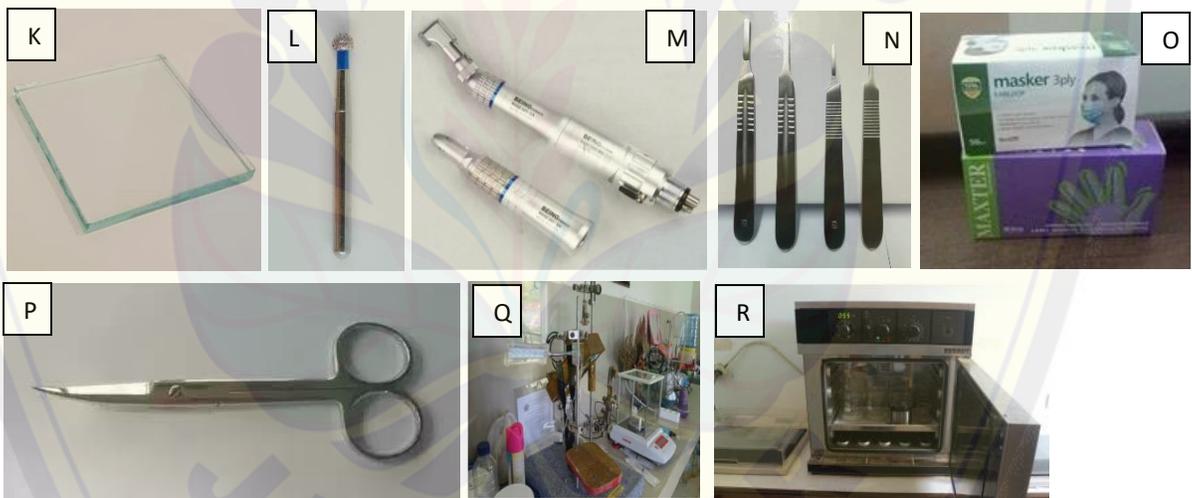
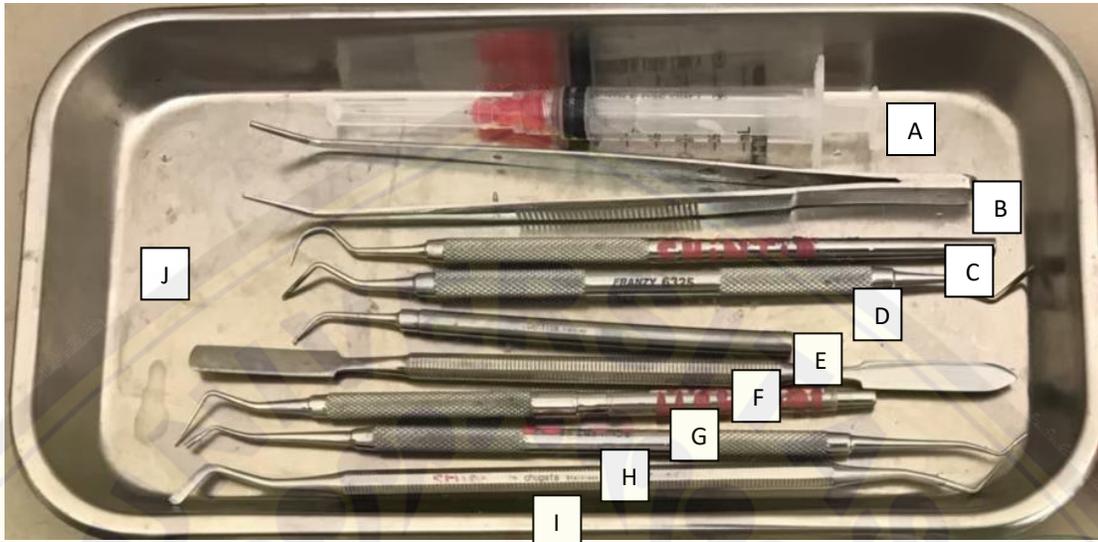
G. Panci

H. Kompor Gas

I. Pisau

J. Blender

F.2 Alat *Pulp Capping* Gigi Tikus Wistar



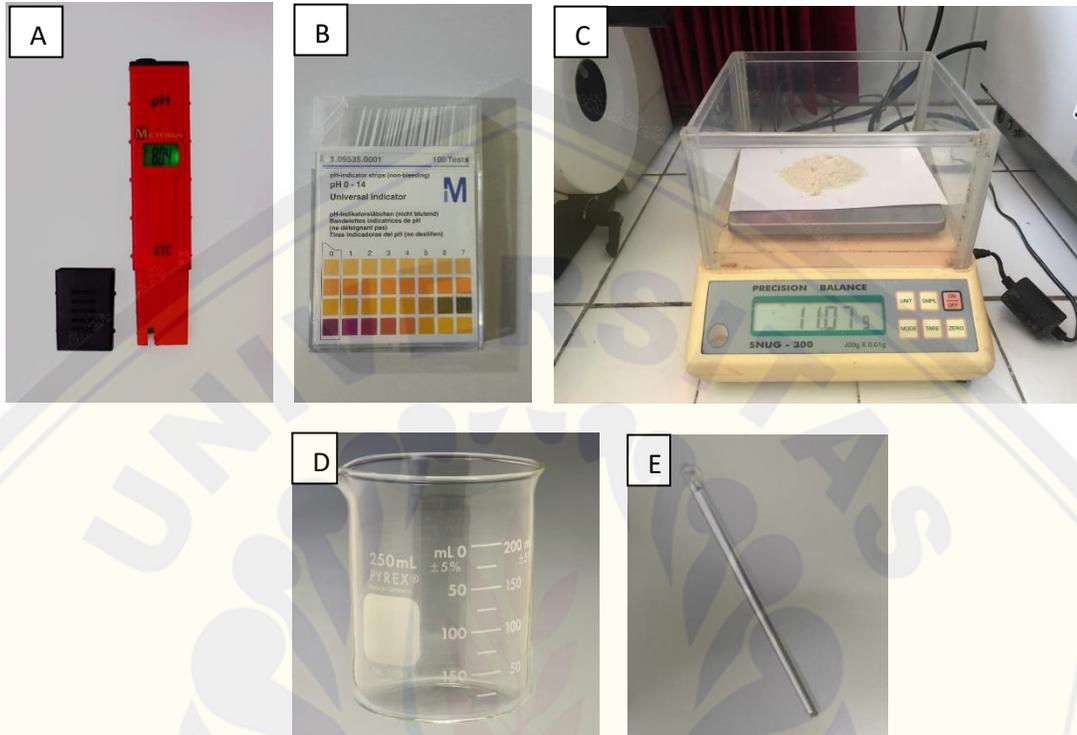
Keterangan :

A. Syring irigasi; B. Pinset; C. Sonde half moon; D. eskavator; E. Liner applicator;
 F. Spatula semen; G. Sonde lurus; H. Stopper semen; I . Plastis filling instrument;
 J. Neer beken; K. Glass plate; L. Diamond round bur uk 1/4; M. Handpiece low speed;
 N. Blade scalpel; O. Masker dan sarung tangan; P. Gunting bedah; Q. Rat dental chair
 R. Autoclave

F.3 Alat Pembuatan Preparat Histologi

Keterangan:

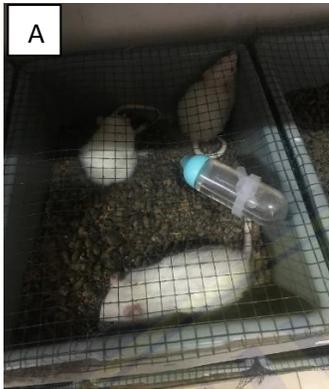
- A. Alat pemroses jaringan
- B. Mikrotom
- C. Waterbath
- D. Slide warmer
- E. Kompor listrik
- F. Mikroskop binokuler
- G. Cetakan embedding parafin

F.4 Alat Pengecekan pH Tulang Ikan dan Pasta Tulang Ikan Gurami

Keterangan:

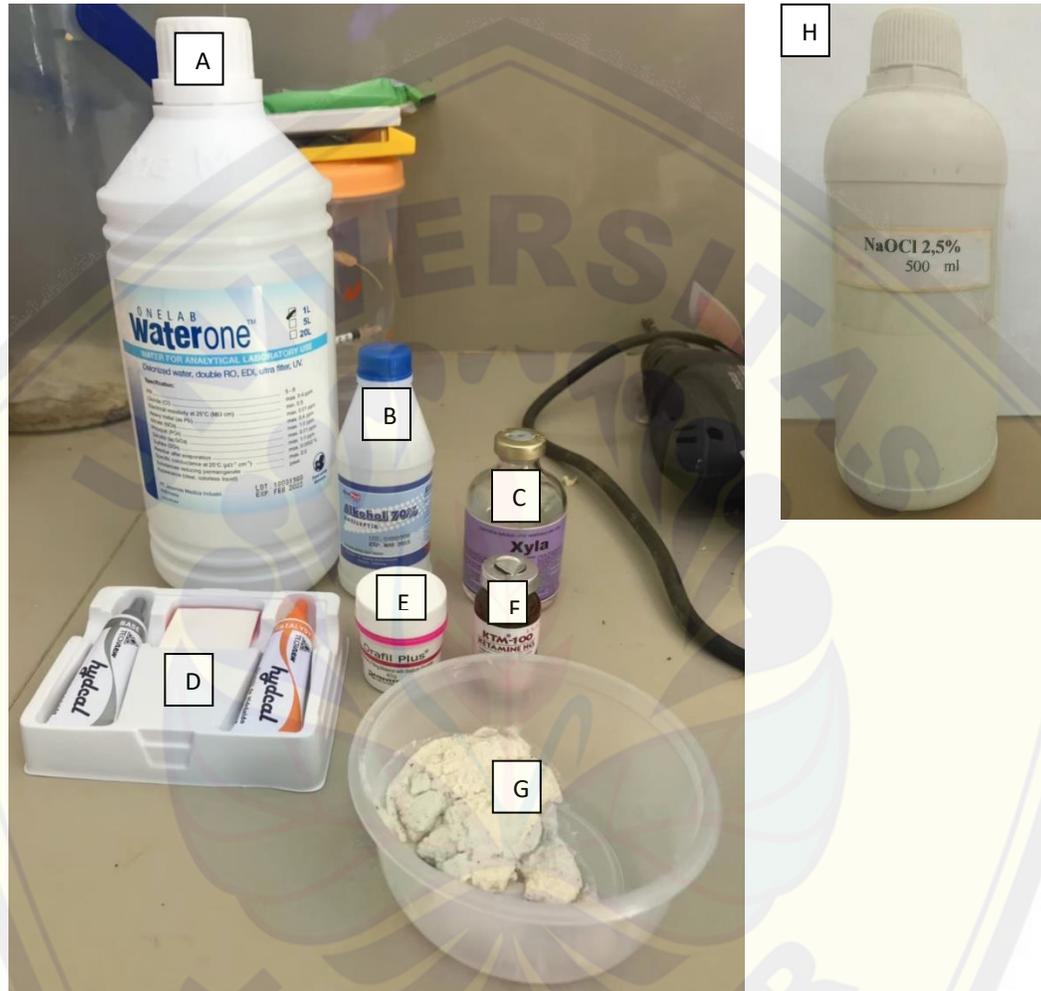
- A. pH meter
- B. Kertas lakmus
- C. Timbangan
- D. Gelas ukur
- E. Batang pengaduk

F.5 Alat Persiapan Hewan Coba



Keterangan:

- A. Tikus wistar
- B. Timbangan
- C. Tempat minum tikus
- D. Kandang tikus dan jaring penutup
- E. Pakan tikus

Lampiran G. Bahan Penelitian**G.1 Bahan Pulp Capping Gigi Tikus Wistar**

Keterangan:

A. Aquadest

B. Alkohol 70%

C. Xylazine

D. Kalsium hidroksida

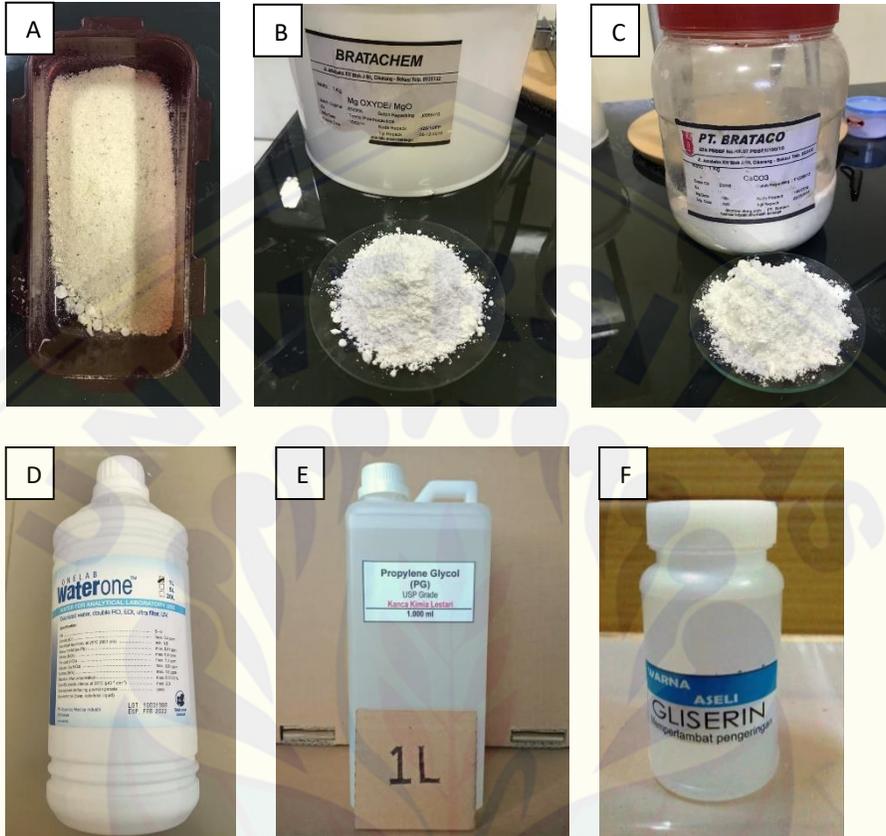
E. Tumpatan sementara

F. Ketamine

G. Pasta tulang ikan gurami

H. NaOCl 2,5%

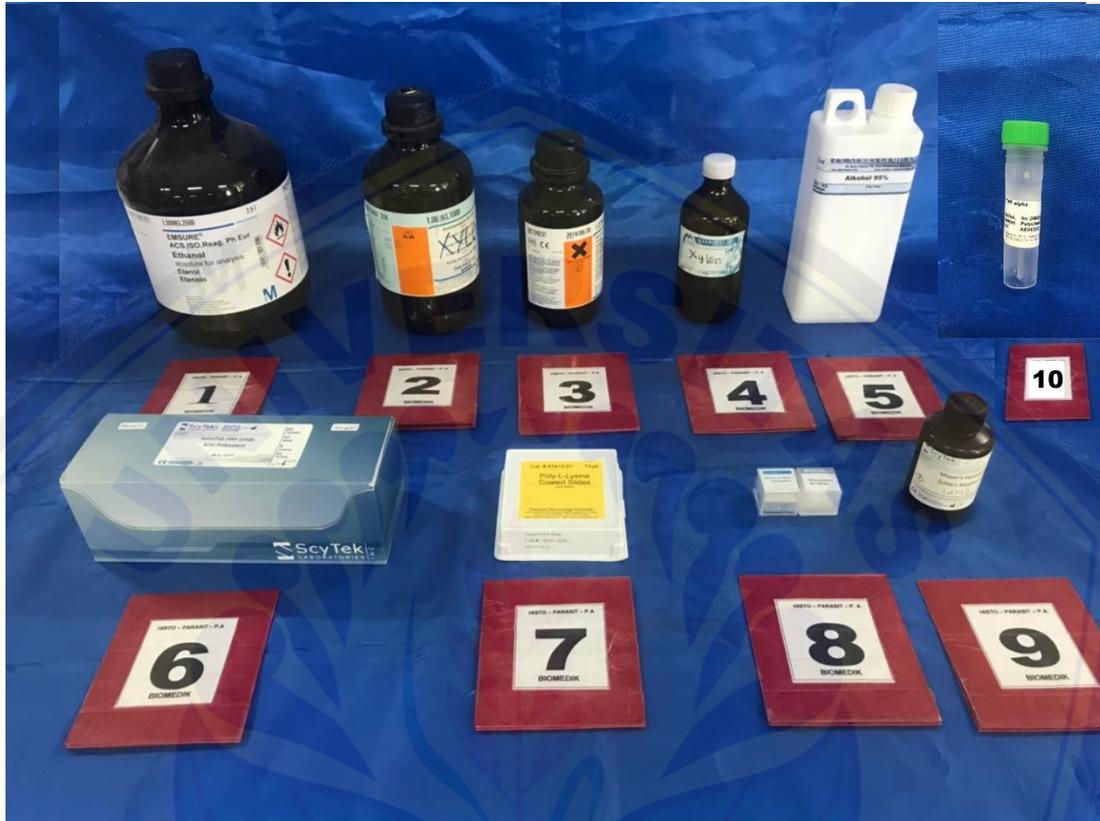
G.2 Bahan Pembuat Pasta Tulang Ikan Gurami



Keterangan:

- A. Bubuk tulang ikan gurami
- B. Magnesium Carbonat
- C. Calcium Carbonat
- D. Aquadest
- E. Propylene glycol
- F. Gliserin

G.3 Bahan Pembuatan Preparat Histologi



Keterangan:

1. Alkohol absolut 100%
2. Xylol
3. Entelan
4. Xylen
5. Alkohol 95%
6. Reagen imunohistokimia
7. Object glass
8. Deck glass
9. Hematoxylin eosin
10. Antibodi TNF- α

Lampiran H. Dokumentasi Penelitian

H.1 Proses Pembuatan Bubuk Tulang Ikan Gurami

1. Pemisahan tulang bagian tengah dan daging ikan gurami dengan cara *fillet*



2. Perebusan tulang dengan suhu 70°C-100°C selama 30 menit dan pencucian tulang ikan yang sudah direbus

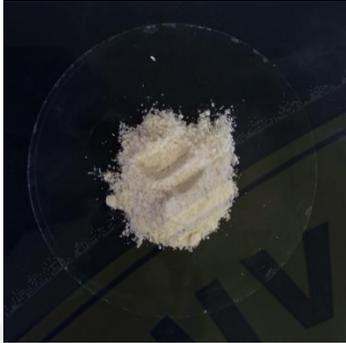


3. Pengeringan menggunakan oven, penghalusan menggunakan blender dan penyaringan bubuk tulang ikan gurami menggunakan ayakan



H.2 Proses Pembuatan Pasta Tulang Ikan Gurami

1. Tulang ikan gurami ditimbang untuk mendapatkan berat 75gr

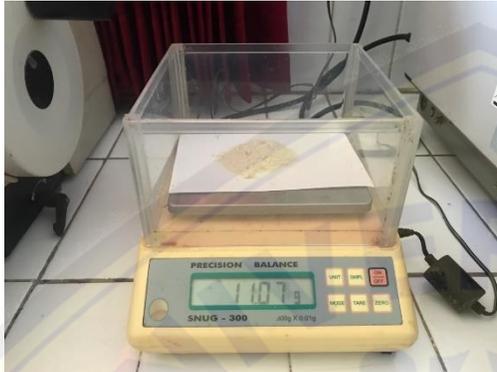


2. Tulang ikan yang sudah ditimbang kemudian dicampur dengan seluruh bahan pembuat pasta hingga didapatkan berat 100gr



H.3 Proses Pengukuran PH Bubuk dan Pasta Tulang Ikan Gurami

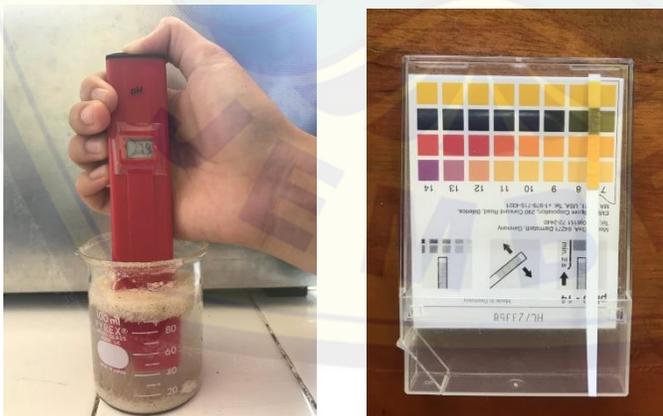
1. Menimbang bubuk dan pasta tulang ikan gurami



2. Melarutkan bubuk dan pasta tulang ikan gurami dengan aquadest



3. Mengukur pH menggunakan PH meter dan kertas laksmus



H.3 Tahapan *Direct Pulp Capping* Pulpa Gigi Tikus Wistar

1. Sterilisasi Alat



2. Pengelompokkan dan penimbangan hewan coba



3. Anestesi umum tikus secara intramuscular



4. Preparasi klas I menggunakan bur bulat ukuran $\frac{1}{4}$ sedalam kurang lebih 0,5 mm



5. Perforasi pulpa menggunakan K-File



6. Irigasi pulpa dengan aquadest dan NaOCl



7. Meletakkan bahan *pulp capping* kalsium hidroksida dan pasta tulang ikan gurami



8. Menutup kavitas dengan tumpatan sementara



H.4 Tahapan Dekapitasi Gigi Tikus Wistar

1. Anestesi umum tikus secara intraperitoneal



2. Dekapitasi pengambilan gigi tikus wistar



3. Mencuci dengan air mengalir



4. Fiksasi menggunakan formalin



H.5 Tahapan Pembuatan Preparat Histologi

1. Pemrosesan jaringan dalam alat



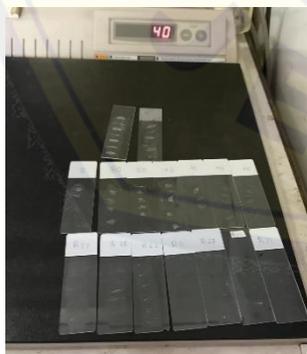
2. Parafiniasi



3. Pemotongan jaringan



4. Penyimpanan jaringan dalam slide warmer

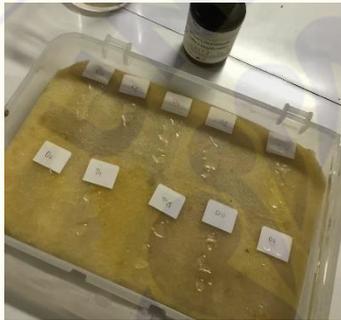


H.6 Tahapan Pewarnaan Immunohistokimia

1. Perendaman preparat dalam xylol dan alkohol



2. Pencucian dengan PBS



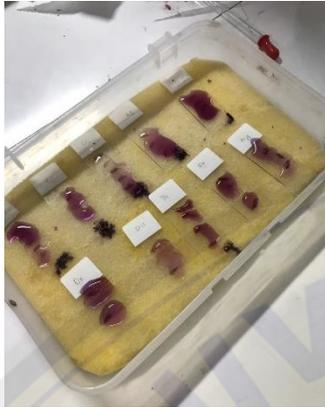
3. Pemberian *Superblock*



4. Pemberian antibodi primer anti TNF- α untuk pewarnaan immunohistokimia



5. Pewarnaan dengan HE

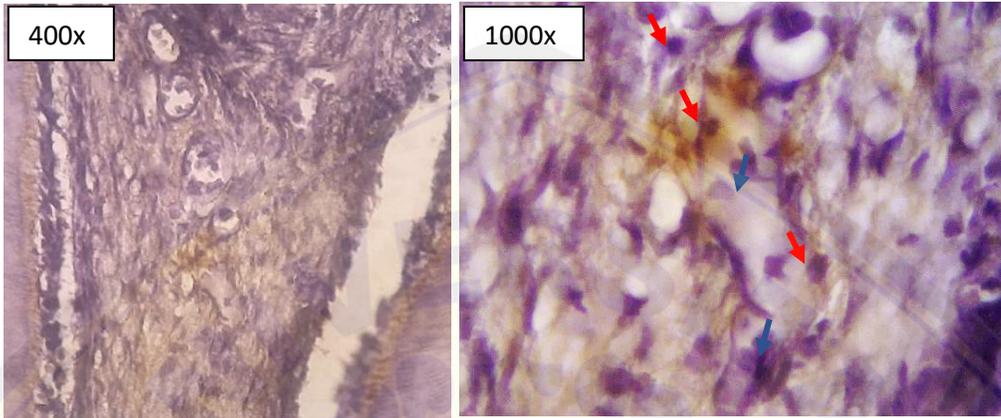


6. Penutupan dengan entellan dan *cover glass*

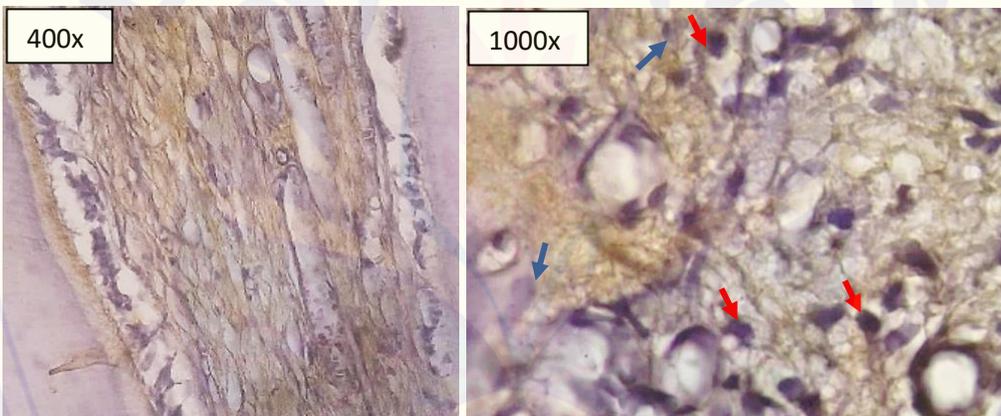


Lampiran I. Hasil Penelitian

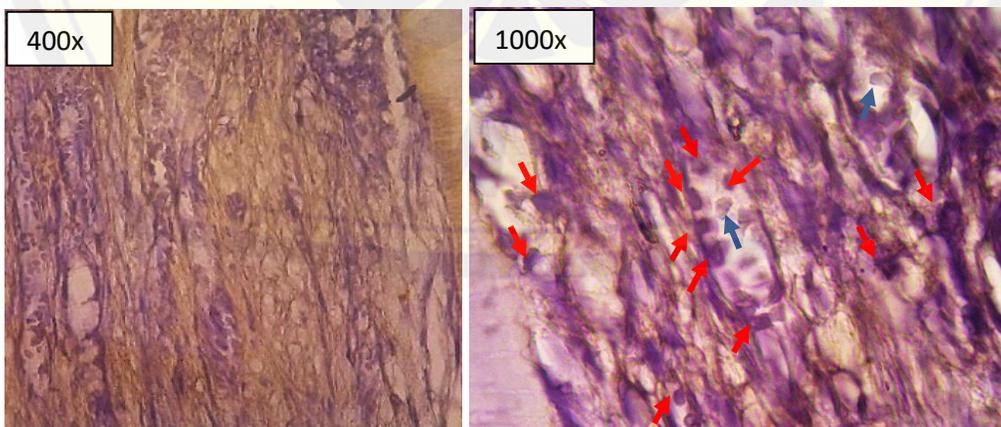
Kelompok Pulpa Normal Hari ke-4



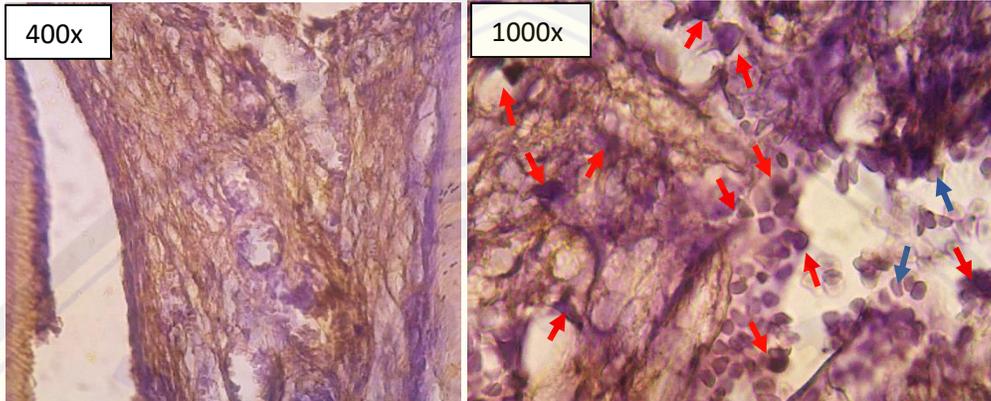
Kelompok Pulpa Normal Hari ke-7



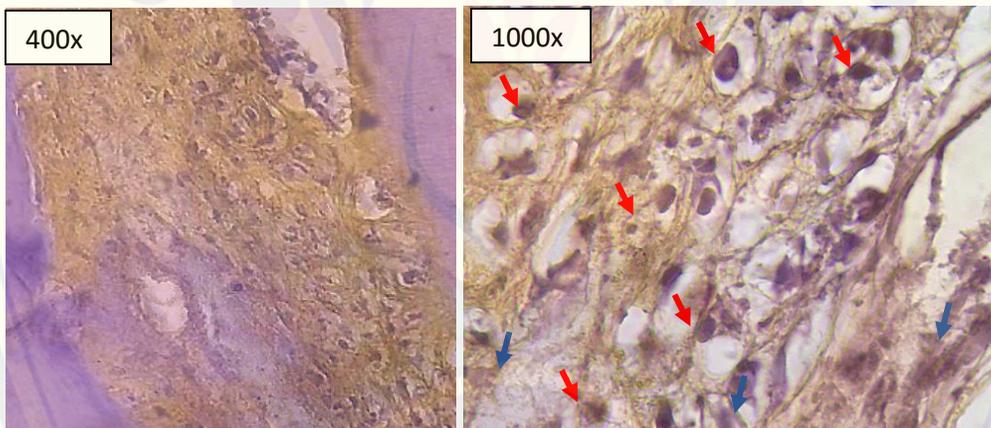
Kelompok Kontrol Negatif Hari ke-4



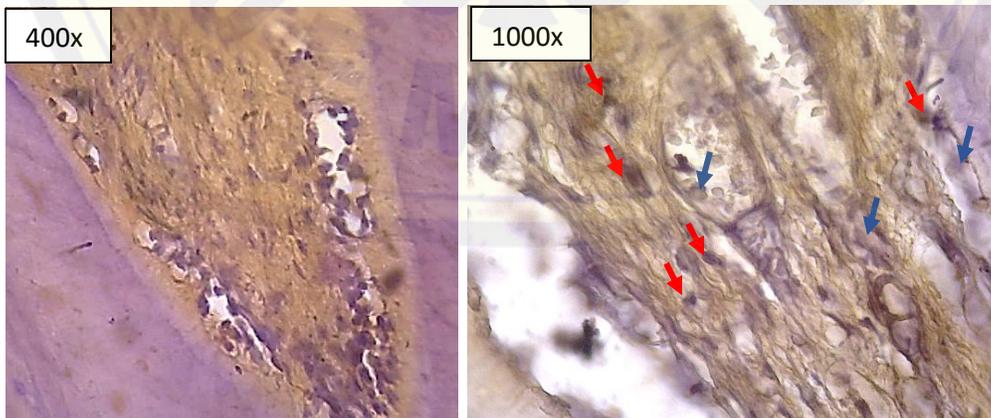
Kelompok Kontrol Negatif Hari ke-7



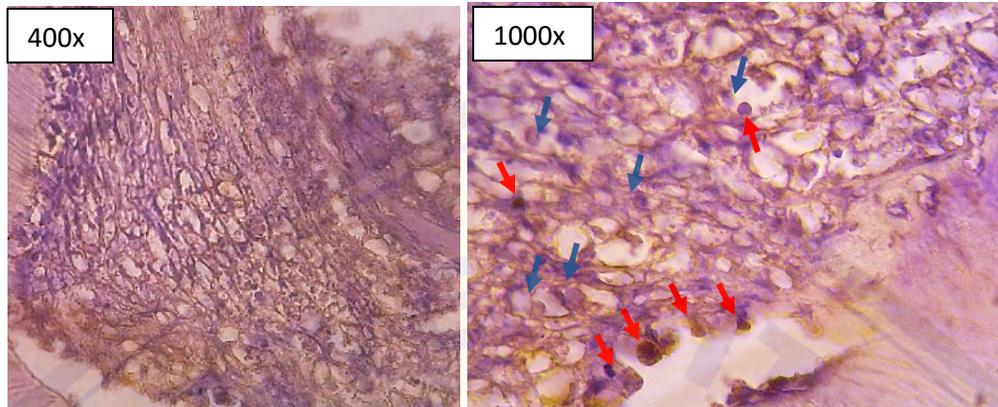
Kelompok Kontrol Positif Kalsium Hidroksida Hari ke-4



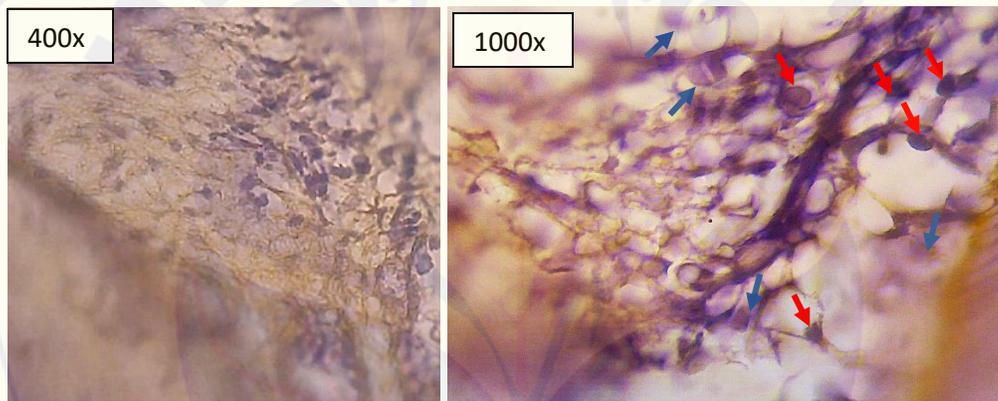
Kelompok Kontrol Positif Kalsium Hidroksida Hari ke-7



Kelompok Perlakuan Pasta Tulang Ikan Gurami Hari ke-4



Kelompok Perlakuan Pasta Tulang Ikan Gurami Hari ke-7



Keterangan gambar : Gambaran histologis pulpa gigi molar satu rahang bawah tikus wistar dengan pewarnaan imunohistokimia. Leukosit yang mengekspresikan TNF- α ditunjuk dengan (→) dan yang tidak mengekspresikan ditunjuk dengan (→).