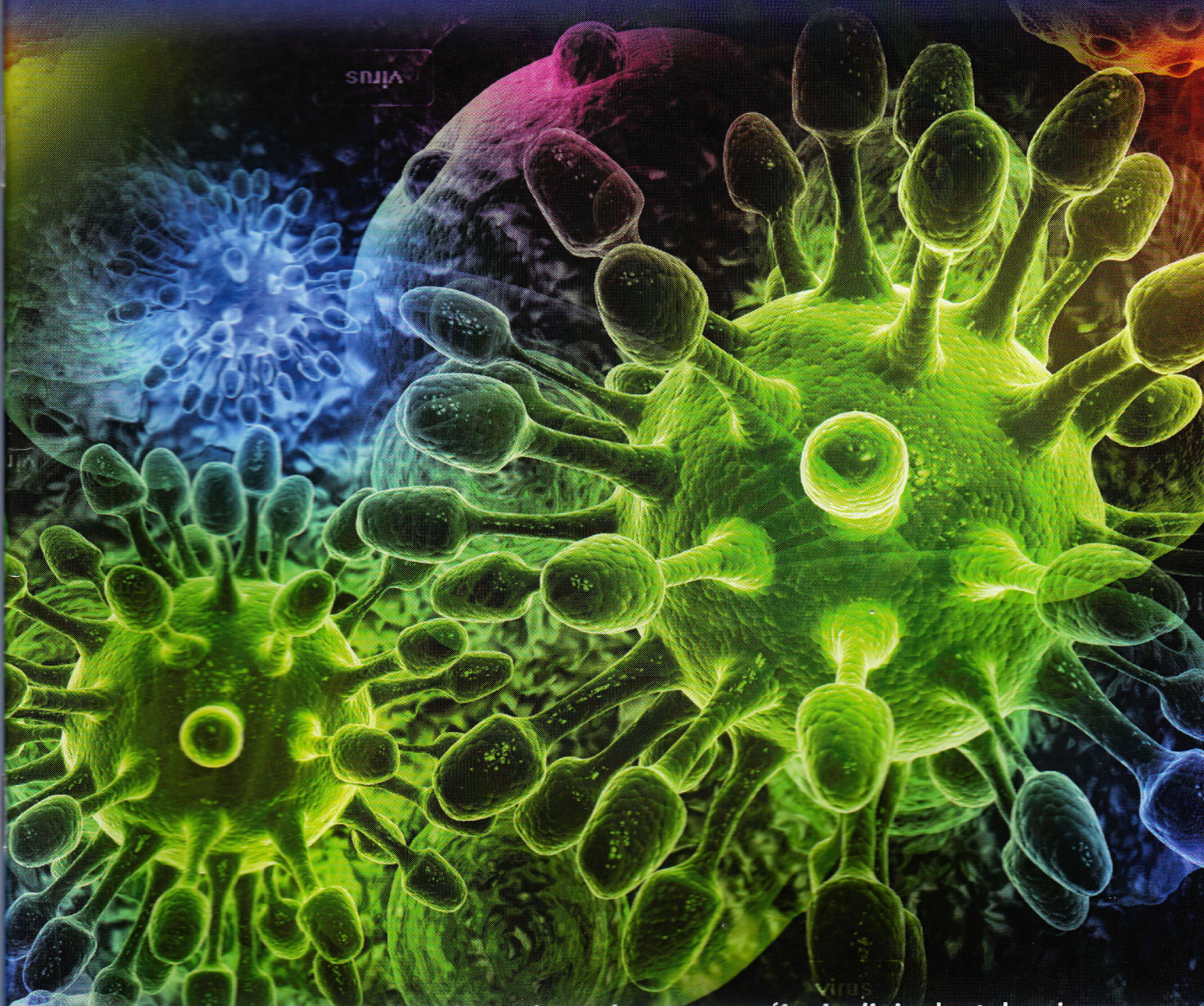


Dental Journal

Published quarterly per year

Majalah Kedokteran Gigi



• *Prevotella intermedia* and *Porphyromonas gingivalis* in dental caries with periapical granuloma • Dental pulp inflammatory response of Sprague Dawley rats after etching application of 19% ethylene diamine tetraacetic acid and 37% phosphoric acid • Antifungal effect of *Sticophus hermanii* and *Holothuria atra* extract and its cytotoxicity on gingiva-derived mesenchymal stem cell

Dental Journal

Majalah Kedokteran Gigi

EDITORIAL BOARD OF DENTAL JOURNAL (MAJALAH KEDOKTERAN GIGI)

SK: S2/H3.1.2/KD/2011
May 2nd, 2011 – May 2nd, 2013

Patron:

Dean of Faculty of Dental Medicine Universitas Airlangga

Advisors:

Vice Dean I, Vice Dean II, Vice Dean III

Chief Editor:

Udijanto Tedjosongko, drg., Ph.D., Sp.KGA(K)
(Pediatric Dentistry – Universitas Airlangga)

Editorial Boards:

Prof. R.M. Coen Pramono D, drg., SU., Sp.,BM(K) (Oral and Maxillofacial Surgery – Universitas Airlangga); **Prof. Dr. M. Rubianto, drg., MS., Sp.Perio(K)** (Periodontic – Universitas Airlangga); **Prof. Nairn Hutchinson Fulton Wilson, MSc., Ph.D., FDS** (Conservative Dentistry - University of Guy's Dental School, London); **Prof. W.J. Spitzer, DMD., MD** (Head Department of Cranio & Oral Maxillofacial Surgery Hamburg University, Germany); **Prof. Edward C. Combe, MSc., Ph.D., DDS** (Biomaterial – Minnesota University, U.S.A.); **Prof. Madya. H. A.B. Rani Samsudin, DDS., FDSRC, AM** (Oral and Maxillofacial Surgery - University Sains, Malaysia); **Prof. Widowati Witjaksono, DDS., Ph.D** (Kulliyah of Dentistry, International Islamic University Malaysia); **Prof. Taizo Hamada, DDS., Ph.D** (Prosthodontic - Tohoku University, Japan); **Prof. Yukio Kato, DDS., Ph.D.** (Oral Bio-Chemistry-University of Hiroshima, Japan); **Prof. Kozai Katsuyuki, DDS., Ph.D** (Pediatric Dentistry – University of Hiroshima, Japan); **Prof. dr. A.G.M. Tielens** (Medical Microbiology – University and Infections Diseases – Erasmus University Medical Centre, Rotterdam, The Netherlands); **Prof. Lakshman Samaranyake** (Oral Microbiology – The University of Hongkong); **Kok Van Kesel** (Medical Microbiology – University and Infections Diseases – Erasmus University Medical Centre, Rotterdam, The Netherlands); **Dr. Leslie Ang** (Restorative Dentistry – National Dental Centre of Singapore); **Prof. Dr. M. Suharsini, drg., MS., Sp.KGA** (Pediatric Dentistry - Universitas Indonesia); **Achmad Gunadi, drg., MS., Ph.D** (Prosthodontic - Universitas Negeri Jember)

Managing Editors:

Prof. Dr. Arifzan Razak, drg., MSc., Sp.Pros (Prosthodontics – Universitas Airlangga); **Prof. Dr. Latief Mooduto, drg., M.S., Sp.KG(K)** (Conservative Dentistry – Universitas Airlangga); **Prof. Dr. Mieke Sylvia M.A.R., drg., MS., Sp.Ort(K)** (Orthodontic – Universitas Airlangga); **Prof. Dr. Istiati Soehardjo, drg., MS** (Oral Biology – Universitas Airlangga); **Prof. Dr. Anita Yulianti, drg., M.Kes** (Dental Material – Universitas Airlangga); **Prof. Seno Pradopo, drg., SU., Ph.D., Sp.KGA** (Pediatric Dentistry – Universitas Airlangga); **Prof. Dr. Diah Savitri Ernawati, drg., M.SI, Sp.PM(K)** (Oral Medicine – Universitas Airlangga); **Prof. Thalca I. Agusni, drg., MHPEd., Ph.D., Sp.Ort(K)** (Orthodontic – Universitas Airlangga); **Dr. R. Darmawan Setijanto, drg., M.Kes** (Dental Public Health – Universitas Airlangga); **Dr. Elly Munadzirroh, drg., MS** (Dental Material – Universitas Airlangga); **Priyawan Rachmadi, drg., Ph.D** (Dental Material – Universitas Airlangga); **Dr. Retno Pudji Rahayu, drg., M.Kes** (Oral Biology – Universitas Airlangga); **Dr. Eha Renwi Astuti, drg., M.Kes** (Dental Radiology – Universitas Airlangga); **Bagus Soebadi, drg., MHPEd., Sp.PM** (Oral Medicine – Universitas Airlangga); **Endang Pudjirochani, drg., MS., Sp.Pro**s (Prosthodontic – Universitas Airlangga); **Markus Budi Rahardjo, drg., M.Kes** (Oral Biology – Universitas Airlangga); **Dr. Susy Kristiani, drg., M.Kes** (Oral Biology – Universitas Airlangga); **Dr. Ira Widjiastuti, drg., M.Kes., Sp.KG** (Conservative Dentistry – Universitas Airlangga); **Ketut Suardita, drg., Ph.D., Sp.KG.** (Conservative Dentistry – Universitas Airlangga); **Sianiwati Goenharjo, drg., MS** (Orthodontic – Universitas Airlangga); **Devi Rianti, drg., M.Kes** (Dental Material – Universitas Airlangga); **Dr. Chiquita Prahassanti, drg., Sp.Perio(K)** (Periodontic – Universitas Airlangga); **Rostiny, drg., M.Kes., Sp.Pro**s(K) (Prosthodontic – Universitas Airlangga); **An'nissa Chusida, drg., M.Kes** (Oral Biology – Universitas Airlangga); **Eric Priyo Prasetyo, drg., Sp.KG** (Conservative Dentistry – Universitas Airlangga); **Els Sunarsh Budipramana, drg., MS., Sp.KGA(K)** (Pediatric Dentistry – Universitas Airlangga); **Dr. Hendrik Setiabudi, drg., M.Kes** (Oral Biology – Universitas Airlangga); **Otty Ratna Wahyuni, drg., M.Kes** (Dental Radiology – Universitas Airlangga); **Anis Irmawati, drg., M.Kes** (Oral Biology – Universitas Airlangga); **Yulianti, drg., M.Kes** (Oral Biology – Universitas Airlangga); **Retno Palupi, drg., M.Kes** (Dental Public Health – Universitas Airlangga); **Eka Augustina, drg., Sp.Perio** (Periodontics – Universitas Airlangga); **Febriastuti, drg., Sp.KG** (Conservative Dentistry – Universitas Airlangga); **Mega M. Puteri, drg., Sp.KGA** (Pediatric Dentistry – Universitas Airlangga)

Administrative Assistant:

Novi Dian Prastiwi (Faculty of Dental Medicine – Airlangga University)

Thanks to editor in duty of Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi) Volume 46 Number 4 December 2013:

Prof. Dr. Mandojo Rukmo, drg., MSc., Sp.KG(K) (Conservative Dentistry – Universitas Airlangga)
Prof. Dr. Adioro Soetojo, drg., MS., Sp.KG(K) (Conservative Dentistry – Universitas Airlangga)
Dr. Theresia Indah Budhy, drg., M.Kes (Oral Pathology and Maxillofacial – Universitas Airlangga)
Dr. Indah Listiana Kriswandini, drg., M.Kes (Oral Biology – Universitas Airlangga)
Dr. Ernie Maduratna Setiawatie, drg., M.Kes., Sp.Perio (Periodontic – Universitas Airlangga)

Editorial Address c/o:

Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga
Jln. Mayjen. Prof. Dr. Moestopo No. 47 Surabaya 60132, INDONESIA
Telp. (062-31) 5039478/5030255. Fax. (031) 5039478/5020256
E-mail: dental_journal@yahoo.com Website: www.journal.unair.ac.id

Accredited No. 56/DIKTI/Kep/2012

Cover photo purchased from: www.fotia.com

Invoice number: 206708019-204225738

Dental Journal

Majalah Kedokteran Gigi

CONTENTS

	<i>Page</i>
1. Ekspresi COX-2 setelah pemberian ekstrak etanolik kulit manggis (<i>Garcinia mangostana</i> Linn) pada tikus wistar (<i>COX-2 expression after mangosteen rind (Garcinia mangostana Linn) etanolic extract administration in wistar rats</i>) Rendra Christedy Prasetya, Tetiana Haniastuti, dan Nunuk Purwanti	173-178
2. Profil jaringan lunak wajah kasus borderline maloklusi klas I pada perawatan ortodonti dengan dan tanpa pencabutan gigi (<i>Facial soft tissue profile on borderline class I malocclusion in orthodontic treatment with or without teeth extraction</i>) Pinandi Sri Pudyani dan Yenni Hanimastuti	179-184
3. Minyak ikan Lemuru (<i>Sardinella longiceps</i>) menurunkan apoptosis osteoblas pada tulang alveolaris tikus wistar (<i>Fish oil of Lemuru (Sardinella longiceps) reduced the osteoblast apoptosis in wistar rat alveolar bone</i>) Didin Erma Indahyani	185-189
4. Respon inflamasi pulpa gigi tikus Sprague Dawley setelah aplikasi bahan etsa ethylene diamine tetraacetic acid 19% dan asam fosfat 37% (<i>Dental pulp inflammatory response of Sprague Dawley rats after etching application of 19% ethylene diamine tetraacetic acid and 37% phosphoric acid</i>) Nadie Fatimatuzzahro, Tetiana Haniastuti dan Juni Handajani	190-195
5. Efek ekstrak daun singkong (<i>Manihot utilissima</i>) terhadap ekspresi COX-2 pada monosit yang dipapar LPS <i>E.coli</i> (<i>The effect of Manihot utilissima extracts on COX-2 expression of monocytes induced by LPS E. coli</i>) Zahara Meilawaty	196-201
6. The effect of CPP-ACP containing fluoride on <i>Streptococcus mutans</i> adhesion and enamel roughness Yulita Kristanti, Widya Asmara, Siti Sunarintyas, and Juni Handajani	202-206
7. Sifat fisik hidroksiapatit sintesis kalsit sebagai bahan pengisi pada sealer saluran akar resin epoxy (<i>Physical properties of calcite synthesized hydroxyapatite as the filler of epoxy-resin-based root canal sealer</i>) Emma Mulyawati, Marsetyawan HNES, Siti Sunarintyas, dan Juni Handajani	207-212
8. <i>Prevotella intermedia</i> and <i>Porphyromonas gingivalis</i> in dental caries with periapical granuloma Risya Cilmiaty, Afiono Agung Prasetyo, Khilyat Ulin Nur Zaini, Mandojo Rukmo, Suhartono Taat Putra and Widya Asmara	213-217

9. Antifungal effect of <i>Sticophus hermanii</i> and <i>Holothuria atra</i> extract and its cytotoxicity on gingiva-derived mesenchymal stem cell Kristanti Parisihni and Syamsulina Revianti	218–223
10. Korelasi indeks morfologi wajah dengan sudut interinsisal dan tinggi wajah secara sefalometri (<i>Cephalometric correlation of facial morphology index with interincisal angle and facial height</i>) Pricillia Priska Sianita K dan Verenna	224–228
11. Orthodontic-surgical treatment of a severe class III malocclusion Pakpahan Evie Lamtiur	229–234

Research Report

Ekspresi COX-2 setelah pemberian ekstrak etanolik kulit manggis (*Garcinia mangostana* Linn) pada tikus wistar

(COX-2 expression after mangosteen rind (*Garcinia mangostana* Linn) etanolic extract administration in wistar rats)

Rendra Chriestedy Prasetya,¹ Tetiana Haniastuti,² dan Nunuk Purwanti³

¹ Bagian Biomedik, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember-Indonesia

² Bagian Biologi Mulut, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada, Jogjakarta-Indonesia

³ Bagian Biomedik, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada, Jogjakarta-Indonesia

ABSTRACT

Background: Cyclooxygenase is an enzyme for prostaglandins (PGs) synthesis from arachidonic acid. Cyclooxygenase have been characterized and named as COX-1 and COX-2. COX-1 is responsible for constitutive PGs production under physiological condition and maintains normal function. On the other hand, while COX-2 expression is inducible by cytokines and endotoxin. Periodontitis is a chronic inflammatory disease caused by anaerobic bacteria especially gram negative bacteria. The periodontitis occurrence is followed by increased of COX-2 expression. Mangosteen rind (*Garcinia mangostana* Linn) contains gamma mangostin which inhibits the synthesis of PGE2 through inhibition of COX-2 expression. **Purpose:** This research was aimed to study COX-2 expression in experimental-induced periodontitis in wistar rats after mangosteen rind etanolic extract administration. **Methods:** Forty eight male wistar rats were induced periodontitis by putting silk ligature subgingivally around the cervical of the anterior lower teeth for 7 days. After the ligation was taken out, the rats were divided into 4 groups, and treated orally with mangosteen rind extract 60 mg/kg BB, 30 mg/kg BB, ibuprofen and saline respectively. The rats were sacrificed on the 1st, 3rd, 4th, 7th day after the treatment. The rats' anterior lower jaws were processed for paraffin embedded tissue, cut serially and stained with immunohistochemistry. COX-2 expression were observed and counted under the microscope (400x). The data were analyzed using kruskall wallis test. **Results:** Kruskal wallis test showed a significant difference COX-2 expression among group indicating that mangosteen rind etanolic extract affected COX-2 expression. **Conclusion:** Mangosteen rind etanolic extract reduced COX-2 expression in periodontitis rats.

Key words: Periodontitis, *Garcinia mangostana* Linn, mangosteen rind etanolic extract, cyclooxygenase-2, wistar rats

ABSTRAK

Latar belakang: Siklooksigenase adalah enzim yang mensintesis prostaglandin (PG) dari asam arakhidonat. Siklooksigenase dibagi menjadi 2 yaitu COX-1 dan COX-2. COX-1 bertanggung jawab pada sintesis PG dalam kondisi fisiologis dan mempertahankan fungsi normal, sedangkan ekspresi COX-2 dapat terinduksi oleh sitokin dan endotoksin. Periodontitis adalah penyakit peradangan kronis yang disebabkan oleh bakteri anaerob terutama bakteri gram negatif. Terjadinya periodontitis diikuti oleh peningkatan ekspresi COX-2. Kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* Linn) mengandung mangostin gamma yang menghambat sintesis PGE2 melalui penghambatan COX-2. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk meneliti ekspresi COX-2 pada tikus wistar jantan yang diinduksi periodontitis setelah pemberian ekstrak etanolik kulit manggis. **Metode:** Empat puluh delapan ekor tikus wistar jantan diinduksi periodontitis dengan meletakkan ligatur sutra pada subgingiva sevikal gigi anterior rahang bawah selama 7 hari. Setelah ligatur dilepas, tikus dibagi dalam 4 kelompok yaitu ekstrak kulit manggis dosis 60 mg/kg BB, 30 mg/kg BB, ibuprofen dan saline dengan pemberian secara peroral. Tikus didekapitasi pada hari ke-1,3, 5 dan 7 setelah perlakuan. Rahang bawah gigi depan dilakukan pemrosesan menjadi blok paraffin, dipotong serial dan dilakukan pewarnaan imunohistokimia. Ekspresi COX-2 diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x.

Data pengamatan dianalisa dengan uji *kruskal wallis*. **Hasil:** Uji *kruskal wallis* menunjukkan terdapat perbedaan bermakna ekspresi COX-2 diantara kelompok perlakuan yang mengindikasikan bahwa ekstrak kulit manggis mempengaruhi ekspresi COX-2. **Simpulan:** Ekstrak etanolik kulit manggis menurunkan ekspresi COX-2 pada tikus dengan periodontitis.

Kata kunci: Periodontitis, *Garcinia mangostana* Linn, ekstrak etanolik kulit manggis, tikus wistar

Korespondensi (*correspondence*): Rendra Chriestedy Prasetya, Bagian Biomedik, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Jl. Kalimantan no. 37 Jember 68121, Indonesia. E-mail: rendrachriestedy@gmail.com

PENDAHULUAN

Siklooksigenase dikenal juga prostaglandin H *synthase* merupakan enzim kunci dalam sintesa prostaglandin.¹ Siklooksigenase disintesis dari membran fosfolipid yang didegradasi oleh enzim fosfolipase A2 (PLA2). Asam arakidonat diubah menjadi prostaglandin H2 (PG-H2) oleh enzim siklooksigenase dan sintesis PGE2 oleh enzim prostaglandin sintase (PGES).² Siklooksigenase terdiri dari 2 isoform yaitu COX-1 dan COX-2.

Siklooksigenase-1 merupakan enzim utama yang ditemukan di banyak jaringan dan bertanggung jawab dalam menjaga fungsi normal tubuh termasuk keutuhan mukosa lambung dan pengaturan aliran darah ginjal.³ Siklooksigenase 2 merupakan enzim yang diekspresikan sebagai respon terhadap agen proinflamasi seperti sitokin dan endotoksin. Enzim ini berperan dalam pembentukan prostaglandin yang diikuti oleh proses patofisiologis seperti edema, hiperalgesia, dan demam.⁴

Periodontitis merupakan inflamasi kronis yang mengenai jaringan periodontal gigi. Penyebab utama terjadinya periodontitis adalah invasi bakteri dan produknya terutama bakteri gram negatif anaerob.⁵ Gambaran klinis periodontitis adalah kemerahan, terjadi perubahan kontur tekstur halus mengkilat, kedalaman probing yang dalam diikuti dengan hilangnya *attachment* dan kerusakan tulang alveolar. Apabila kerusakan tulang alveolar semakin parah akan menyebabkan kehilangan gigi (*tooth loss*).⁶ Salah satu gambaran histologis periodontitis adalah meningkatnya infiltrasi sel inflamasi terutama makrofag dan limfosit. Bakteri dan produknya akan menginduksi sel untuk mensintesis Interleukin-1 dan *Tumor necrosis factor-α* (TNF- α). Interleukin-1 dan TNF- α akan mempengaruhi kepada membran sel untuk mensintesis siklooksigenase-2 melalui metabolisme asam arakidonat.⁷

Saat ini perawatan periodontitis adalah perawatan mekanis yang ditunjang dengan penggunaan antibiotik dan anti inflamasi. Perawatan mekanis meliputi skaling dan *rootplaning* serta perawatan bedah yang bertujuan untuk mengurangi akumulasi plak dan kalkulus. Pemberian antibiotik dan anti inflamasi sebagai terapi tambahan dalam perawatan periodontitis bertujuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri, mengurangi bertambah parahnya periodontitis serta menurunkan infiltrasi sel inflamasi.⁸

Manggis merupakan tumbuhan yang berasal dari Asia tenggara meliputi Indonesia, Malaysia, Thailand. Manggis

merupakan buah yang fungsional, buahnya dipakai untuk buah kaleng, sirup atau sari buah. Secara tradisional buah manggis digunakan sebagai obat sariawan, wasir dan luka. Kulit buah dimanfaatkan sebagai pewarna termasuk untuk tekstil dan air rebusannya dimanfaatkan sebagai obat tradisional. Batang pohon dipakai sebagai bahan bangunan, kayu bakar atau kerajinan.⁹ Kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* Linn) telah dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai obat antiinflamasi. Khasiat anti inflamasi kulit buah manggis diduga berasal dari senyawa golongan xanton yang termasuk di dalamnya α -mangostin dan γ -mangostin.¹⁰

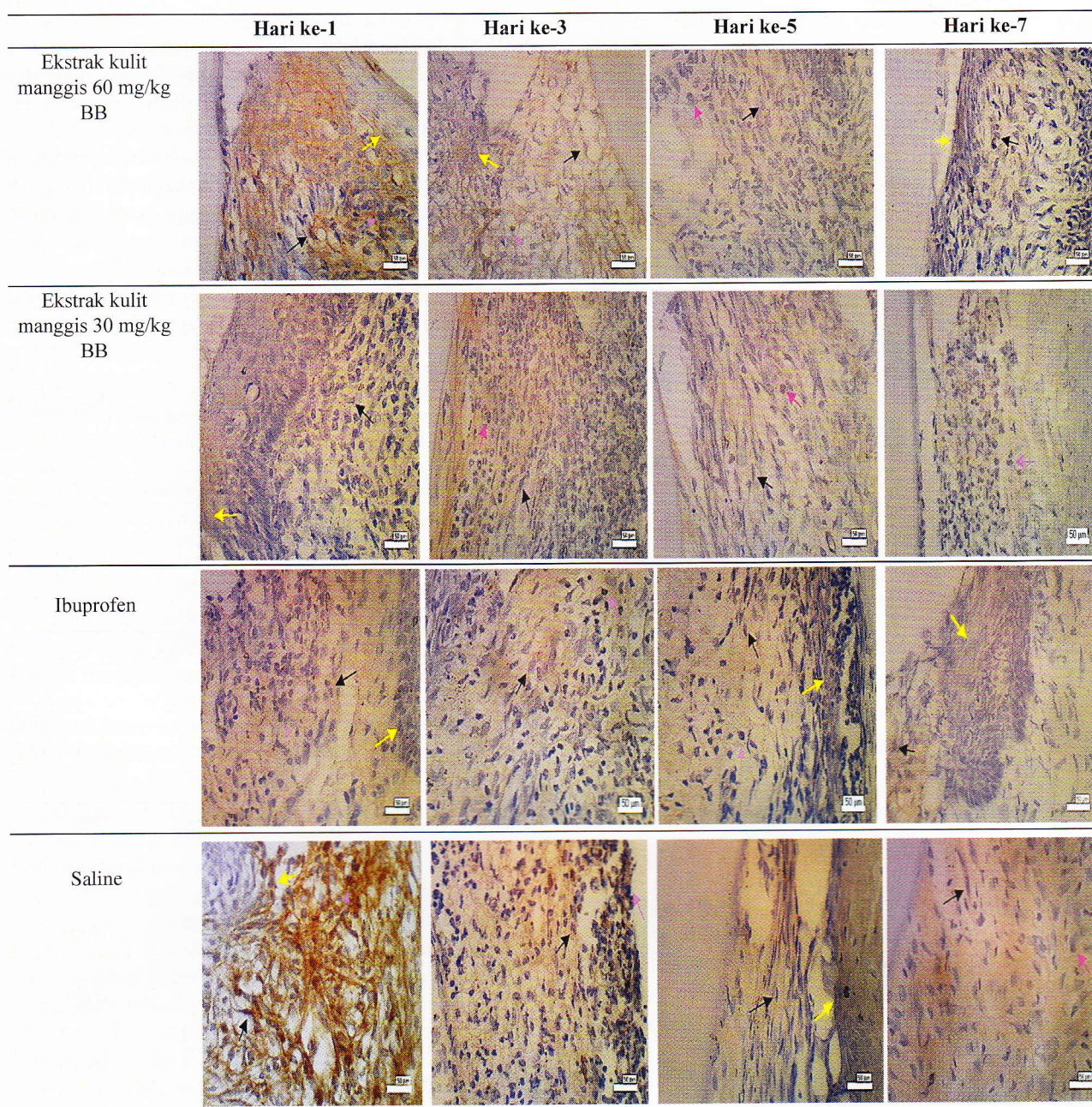
Hasil penelitian Chen et al¹¹ menunjukkan bahwa alfa mangostin secara signifikan menghambat produksi nitrit oksida (NO), Prostaglandin E2 (PGE2), *tumor necrosis factor*(TNF)- α dan *inducible NOS* (iNOS) pada sel RAW 264.7 yang diinduksi lipopolisakarida.¹¹ Selain itu hasil penelitian Nakatani et al¹² menunjukkan bahwa gamma mangostin mampu menghambat pelepasan PGE2 dengan menghambat ekspresi COX-2 dan mRNA pada sel glioma tikus C6 yang diinduksi Ca²⁺ ionophore A23187 (*in vitro*).

Penelitian ini bertujuan meneliti pengaruh ekstrak kulit manggis terhadap ekspresi siklooksigenase-2 pada gingiva tikus wistar yang diinduksi periodontitis.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini menggunakan 48 ekor tikus wistar jantan usia 2 bulan dengan berat badan 175-200 gram. Tikus dianestesi dengan diinjeksi ketamine HCl secara intramuskular pada otot paha belakang dengan dosis 0,2 ml/200 gram berat BB. Kulit manggis diidentifikasi di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada. Pembuatan ekstrak kulit manggis dilakukan di LPPT unit I UGM Yogyakarta dengan metode ekstraksi yang digunakan adalah metode perkolasi dengan pelarut etanol.

Induksi periodontitis dilakukan dengan mengikat benang sutra (*silk ligature*) ukuran 3,0 pada daerah subgingiva di servikal gigi *incisivus* rahang bawah. Pada hari ke-7 ligasi dilepas kemudian tikus dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan yaitu kelompok yang diberi ekstrak kulit manggis dosis 60 mg/kg BB, kelompok yang diberi ekstrak kulit manggis dosis 30 mg/kg BB, kelompok kontrol positif yang diberi ibuprofen 9 mg/kg BB dan kelompok kontrol negatif yang diberi saline 0,5 ml. Pemberian



Gambar 1. Ekspresi COX-2 pada gingiva tikus periodontitis hari ke-1,3,5 dan 7 setelah pemberian ekstrak kulit manggis 60 mg/kg BB, ekstrak kulit manggis 30 mg/kg BB, ibuprofen dan saline. Ekspresi COX-2 tampak di daerah sulkus gingiva meluas di jaringan ikat di bawah epitel *junctional* dan sulkuler. Tampak Ekspresi COX-2 dengan intensitas kuat pada kelompok ekstrak kulit manggis 60 mg/kg BB pada hari ke-1 dan terus menurun dengan intensitas lemah pada hari ke-7. Ekspresi COX-2 dengan intensitas kuat pada kelompok saline hari ke-1 dan ke-7. Sel yang mengekspresikan sel epitel basal (↘), fibroblast (↖) dan makrofag (↗).

fosfolipase A2. Siklooksigenase (COX) merupakan enzim yang disintesis dari metabolisme asam arakhidonat. Siklooksigenase berperan pertama kali mengkatalisis 2 tahap biosintesis prostaglandin dan terdapat dalam 2 bentuk yaitu COX-1 dan COX-2. Siklooksigenase 1 berperan dalam proses homeostasis sedangkan COX-2 jumlahnya meningkat saat terjadi inflamasi dan berperan dalam sintesis prostaglandin terutama PGE2.¹⁶ Peningkatan ekspresi COX-2 akan meningkatkan sintesis PGE2. Peningkatan sintesis PGE2 akan menyebabkan peningkatan vasodilatasi dan permeabilitas endotelium yang berakibat meningkatkan infiltrasi sel inflamasi.⁵

Penurunan ekspresi COX-2 pada kelompok yang diberi ekstrak kulit manggis lebih baik dibandingkan kelompok ibuprofen (kontrol positif) maupun kelompok saline (kontrol negatif), hal ini diduga disebabkan oleh kandungan kulit manggis sebagai bahan antiinflamasi. Kandungan kulit buah manggis adalah golongan xanton yang termasuk di dalamnya alfa mangostin dan gamma mangostin.¹⁰ Gamma mangostin dari kulit buah manggis mampu menghambat ekspresi MAPK, NF- κ B dan AP-1 dalam makrofag.¹⁷ Hasil penelitian Liu et al¹⁸ secara *in vitro* alfa mangostin kulit manggis terbukti mampu menurunkan induksi *lipopolisakarida* (LPS) terhadap sintesis sitokin pro inflamasi TNF- α dan IL-4 melalui penghambatan ekspresi gen *oncostatin M* pada jalur MAPK pada kultur sel U937.

Penurunan sekresi IL-1 dan TNF- α akan menurunkan ekspresi COX-2 karena hambatan sinyal dari IL-1 dan TNF- α untuk lepasnya fosfolipid dari membran sel, sedangkan ekspresi COX-2 pada kelompok kontrol negatif lebih tinggi. Jumlah mRNA dan protein COX-2 gingiva pada subyek dengan periodontitis kronis lebih tinggi dibandingkan yang sehat.¹⁹ Hal ini diperkuat hasil penelitian Mesa et al²⁰ bahwa ekspresi COX-2 pada pasien gingivitis ataupun periodontitis lebih tinggi dibandingkan dengan gingiva yang sehat.

Hasil penelitian ini juga menunjukkan ekspresi COX-2 pada kelompok ekstrak kulit manggis 60 mg/kg BB lebih rendah dibandingkan kelompok ekstrak kulit manggis 30 mg/kg BB. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh komponen senyawa yang terkandung dalam kulit manggis terdiri dari gabungan beberapa senyawa kimia yang saling bersinergi.²¹ Komponen yang terkandung dalam kulit manggis antara lain triterpenoid, xanton, vitamin B1, kalsium dan zat besi. Senyawa paling utama adalah golongan xanton yaitu alfa mangostin, beta mangostin, gamma mangostin, mangostanol, *garcinon* dan *E gartanin*.¹⁰ Semakin besar dosis yang diberikan semakin banyak komponen-komponen yang bekerja sinergis satu sama lainnya juga semakin kuat bekerja sebagai antiinflamasi sehingga infiltrasi sel inflamasi dan ekspresi COX-2 yang terhambat juga besar.²² Penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak kulit manggis mampu menurunkan ekspresi COX-2 pada tikus wistar yang diinduksi periodontitis.

DAFTAR PUSTAKA

1. Khan A, Ladaroda M, Yang HT, Dionne RA. Expression of COX-1 and COX-2 in a clinical model of acute inflammation. *J Pain* 2007; 8(4): 349-54.
2. Inada Y, Ikeda K, Tojo K, Sakamoto M, Takada Y, Tajima N. Possible involvement of corticotropin release factor receptor of signaling on vascular inflammation. *Peptides* 2006; 5: 142-47.
3. Zhang WY, Yang X, Jin D, Zhu X. Expression and enzyme activity determination of human COX-1 and 2 in baculovirus-insect cell system. *Acta Pharmacologica* 2004; 25(8): 1000-6.
4. Fracon NR, Teofilo MJ, Satin BR, Lamano T. Prostaglandin and bone: potential risk and benefit related to the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in clinical dentistry. *J Oral Sci* 2008; 50: 247-52.
5. Carranza F, Henry H, Newman, Michael, G *Clinical periodontology* 10th edition. New York: WB Saunders; 2006. p. 66-70.
6. Reddy DS. The role of neurosteroid in the pathophysiology and treatment of catamenial epilepsy. *Epilepsy Res* 2009; 3: 127-29.
7. Rose FL, Mealey LB, Genco JB, Rose WD. *Periodontics medicine and surgery*. Missouri: Mosby; 2004. p. 38-43.
8. Kumar V, Abbas A, Fausto N. *Pathologic basis of disease*. 8th ed. New York: Elsevier; 2006. p. 45-9.
9. Nugroho AE. Manggis (*Garcinia mangostana* L.): Dari Kulit Buah yang Terbuang Hingga Menjadi Kandidat Suatu Obat. *Majalah Obat Tradisional* 2011; 16(2): 64-9.
10. Chin YW, Jung, HA, Chai H, Keller WJ, Kinghorn AD. Xanthoness with quinone reductase-inducing activity from the fruits of *garcinia mangostana* (Mangosteen). *Phytochem* 2008; 69: 754-58.
11. Chen LG, Yang LL, Wang CC. Anti inflammatory activity of mangostins from *garcinia mangostana*. *J Food Chem Toxicol* 2006; 10: 1016.
12. Nakatani K, Yamakuni T, Kondo N, Arakawa T, Oosawa K, Shimura S, Inoue H, Ohizumi Y. Gamma mangostin inhibitor KB kinase activity and decreases lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 gene expression in C6 rat glioma cells. *J Mol Pharmacol* 2004; 66: 62-67.
13. Tsagareli W. Ultrastructural aspect of gingival soft tissue cells population under experimental gingivitis. *Georgia: MedNews* 2005; 120: 71-4.
14. Duarte MP, Tezolim RK, Figueiredo CL, Feres M, Bastus PM. Microbial profile of ligature-induced periodontitis in rats. *Arch Oral Biol* 2010; 55: 1142-47.
15. Gitlin MJ, Loftin DC. Cyclooxygenase-2 inhibition increases lipopolysaccharide-induced atherosclerosis in mice. *Cardiovascular Research* 2009; 81: 400-7.
16. Porth MC, Matfin G. *Pathophysiology concept of altered health science*. 8th ed. New York: Mosby; 2009. p. 66-71.
17. Bungumpert A, Kalpravidh R, Chuang C, Overman A, Martinez K, Kennedy A, McIntosh C. Xanthoness from mangosteen inhibit inflammation in human macrophages and in human adipocytes exposed to macrophage condition media. *J Nutr* 2010; 16: 342-47.
18. Liu SH, Lee LT, Huu NY, Huang KK, Shih YC, Muckenazu L, Li JM, Chou TY, Wang WH, Chen TS. Effect of alpha mangostin on the expression of anti inflammatory genes in u937 cells. *Chinese Med* 2012; 7-9.
19. Zahng F, Engebretson SP, Morton RS, Cavanaugh PF, Subbaranaiah K, Dannenberg AJ. The overexpression of cyclo-oxygenase-2 in chronic periodontitis. *JADA* 2013; 134: 61-7.
20. Mesa F, Aguilar M, Galindo-Moreno P, Bravo M, Valle OF. COX-2 expression in gingival biopsies from periodontal patient is correlated with connective tissue loss. *J Periodontol* 2012; 11: 561.
21. Pasaribu F, Sitorus P, Bahri S. The test of ethanol extract of mangosteen (*garcinia mangostana* l) to decrease blood glucose level. *J Pharm Pharmacol* 2012; 1: 1-8.
22. Wijaya A, Santoningsih D, Setyawati S. Pengaruh ekstrak kulit buah manggis (*garcinia mangostana* linn) terhadap penurunan jumlah foam cell pada aorta tikus (*rattus novergicus*) model aterosklerosis. Tesis. Malang: Universitas Brawijaya 2011.

Research Report

Profil jaringan lunak wajah kasus borderline maloklusi klas I pada perawatan ortodonti dengan dan tanpa pencabutan gigi

(Facial soft tissue profile on borderline class I malocclusion in orthodontic treatment with or without teeth extraction)

Pinandi Sri Pudyani dan Yenni Hanimastuti
Bagian Ortodonsia
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada
Yogyakarta - Indonesia

ABSTRACT

Background: Determination of orthodontic treatment plan with or without teeth extraction remains controversial, especially in borderline cases, so it requires more data and information to establish appropriate treatment plans in order to obtain optimal treatment results. **Purpose:** The study was aimed to determine the facial soft tissue changes in the borderline class I cases treated with and without tooth extraction on post-orthodontic treatment. **Methods:** The study was conducted on 28 lateral cephalograms, divided into two groups; 13 cases with tooth extraction, and 15 cases without tooth extraction. The subject criterias were as follows; class I malocclusion treated with straightwire technique, skeletal class I, in range of age between 18 to 30 years old, normal overjet 2-4 mm, arch length discrepancy between 2.5 to 5 mm, Index of Fossa Canine (IFC) between 37% to 44%, did not using extraoral devices, and treated with teeth extraction of 4 second premolars or without tooth extraction. The measurement of nasolabial angle, labiomental angle, and linear position of the upper and lower lip to E-Ricketts line were done on each cephalogram before and after orthodontic treatment. **Results:** In teeth extraction cases, there was a change on upper and lower lips positions ($p < 0.05$), but there were no changes on nasolabial angle and labiomental angle ($p > 0.05$). In non teeth extraction cases, there were no changes in nasolabial angle, labiomental angle, and lips positions ($p > 0.05$). Both of groups also have indicated that there were no changes on linear position of the upper and lower lip ($p > 0.05$). Post-orthodontic treatment indicated a significant differences between extraction and nonextraction cases on nasolabial and labiomental angle, and lips position ($p < 0.05$). **Conclusion:** The facial soft tissue profile changes on teeth extraction case was more retruded than non- teeth extraction case.

Key words: Class I malocclusion, borderline cases, facial soft tissue profile, teeth extraction, non teeth extraction

ABSTRAK

Latar belakang: Penentuan rencana perawatan ortodonti dengan pencabutan atau tanpa pencabutan masih menjadi kontroversi, terutama pada kasus borderline, sehingga diperlukan lebih banyak data dan informasi untuk menetapkan rencana perawatan yang tepat agar didapatkan hasil perawatan optimal. **Tujuan:** Studi ini bertujuan meneliti perubahan profil jaringan lunak wajah sesudah perawatan ortodonti dengan pencabutan dan tanpa pencabutan. **Metode:** Pengukuran dilakukan pada 28 sefalogram lateral yang terdiri dari 2 kelompok, yaitu 13 sefalogram lateral untuk kasus dengan pencabutan gigi dan 15 sefalogram lateral untuk kasus tanpa pencabutan gigi. Kriteria subjek penelitian adalah maloklusi klas I yang dirawat dengan teknik straightwire, hubungan skeletal klas I, berusia 18-30 tahun, overjet normal antara 2-4 mm, diskrepansi panjang lengkung antara 2,5-5 mm, Indeks Fossa Canina (IFC) antara 37%-44%, tidak menggunakan alat ekstraoral, dan perawatan dengan pencabutan 4 premolar kedua atau tanpa pencabutan. Pada tiap sefalogram dilakukan pengukuran sudut nasolabial, sudut labiomental, dan pengukuran linier posisi bibir atas dan bawah terhadap garis E Ricketts sebelum dan sesudah perawatan ortodonti. **Hasil:** Pada kelompok pencabutan terdapat perubahan posisi

bibir atas dan bawah terhadap garis E Ricketts ($p < 0,05$), namun tidak terdapat perubahan sudut nasolabial dan sudut labiomental ($p > 0,05$). Pada kelompok tanpa pencabutan tidak terdapat perubahan pada sudut nasolabial, sudut labiomental, dan posisi bibir ($p > 0,05$). Terdapat perbedaan sudut nasolabial, sudut labiomental, dan posisi bibir antara kelompok dengan pencabutan dan tanpa pencabutan sesudah perawatan ortodonti ($p < 0,05$). **Simpulan:** Profil jaringan lunak wajah kelompok yang dirawat dengan pencabutan gigi menjadi lebih retrusi daripada profil jaringan lunak wajah kelompok yang dirawat tanpa pencabutan.

Kata kunci: Maloklusi klas I, kasus borderline, profil jaringan lunak wajah, pencabutan gigi, tanpa pencabutan gigi

Korespondensi (*correspondence*): Pinandi Sri Pudyani, Bagian Ortodonsia, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada. Jl. Denta I, Sekip Utara Yogyakarta 55281, Indonesia. E-mail: pinandi@yahoo.com

PENDAHULUAN

Salah satu alasan utama pasien membutuhkan perawatan ortodonti adalah untuk meningkatkan penampilan fasialnya.¹ Profil fasial yang seimbang dan harmonis menjadi tujuan utama perawatan ortodonti masa kini. Penelitian mengenai interaksi antara perawatan ortodonti dan estetika profil fasial telah dilakukan sejak beberapa tahun yang lalu. Hasil dari penelitian tersebut menunjukkan bahwa beberapa prosedur ortodonti, termasuk pencabutan gigi, dapat mempengaruhi profil jaringan lunak, namun konsekuensi dari pencabutan masih menjadi kontroversi.²

Faktor utama yang menentukan kebutuhan untuk pencabutan premolar dalam perawatan ortodonti diantaranya adalah diskrepansi panjang lengkung, protrusi incisivus mandibula, *curve of Spee*, dan protrusi bibir.³ Penentuan rencana perawatan ortodonti dengan pencabutan atau tanpa pencabutan hingga saat ini masih menjadi kontroversi, terutama pada kasus-kasus *borderline*, sehingga diperlukan lebih banyak data dan informasi untuk menetapkan rencana perawatan yang tepat sehingga didapatkan hasil perawatan yang optimal. Penelitian mengenai pengaruh perawatan ortodonti pada kasus *borderline* maloklusi Klas I masih sangat sedikit dilakukan.¹ Malrelasi transversal ataupun vertikal pada rahang, seperti gigi yang berjejal dan iregularitas merupakan penyebab umum dari maloklusi Klas I dan umumnya perawatan dapat dilakukan dengan pencabutan atau tanpa pencabutan gigi-gigi permanen.⁴

Konsep pasien dalam kelompok *borderline* telah didiskusikan secara luas dalam ilmu ortodonti, namun hanya sedikit penelitian yang dilakukan untuk mendefinisikan istilah tersebut secara tepat.⁵ Carey⁶ merupakan orang pertama yang menggunakan istilah *borderline* dalam literatur dan menyarankan pasien dengan diskrepansi panjang lengkung kurang dari 2,5 mm harus dirawat dengan tanpa pencabutan, sementara pasien dengan diskrepansi panjang lengkung lebih dari 5 mm harus dirawat dengan pencabutan empat premolar pertama. Pasien intermediet, atau *borderline*, dengan diskrepansi panjang lengkung 2,5–5 mm dirawat dengan pencabutan empat premolar kedua.

Gigi berjejal lebih sering terjadi karena defisiensi lebar lengkung daripada defisiensi panjang lengkung. Howes

menemukan hubungan antara total lebar 12 gigi-gigi dari anterior hingga molar kedua dan lebar lengkung gigi pada regio premolar pertama, sehingga didapatkan rumusan, yaitu indeks *fossa canina* kurang dari 37% merupakan indikasi perawatan dengan pencabutan, indeks *fossa canina* lebih dari 44% perawatan kemungkinan dapat dilakukan tanpa pencabutan gigi-gigi, dan indeks *fossa canina* 37%–44% merupakan kasus *borderline*.⁷

Kebanyakan penelitian yang dilakukan menilai perubahan profil fasial pada perawatan ortodonti dengan pencabutan dan tanpa pencabutan pada kasus-kasus Klas II, meskipun maloklusi Klas I dengan gigi berjejal sering terjadi namun hanya sedikit penelitian yang membandingkan pengaruh perawatan dengan pencabutan dan tanpa pencabutan pada kasus-kasus Klas I. Masalah yang timbul dalam ortodonti adalah bagaimana merawat pasien-pasien *borderline* dengan gigi berjejal sedang dan keseimbangan fasial yang baik tanpa menyebabkan pengaruh negatif pada wajah.^{1,2}

Beberapa peneliti^{8,9} melaporkan bahwa pencabutan gigi premolar tidak menyebabkan perubahan atau peningkatan profil fasial, namun beberapa peneliti lainnya menyatakan bahwa pencabutan premolar dapat menyebabkan penampilan fasial yang rata yang tidak diinginkan.² Perbandingan perubahan sefalometri yang terjadi pada kelompok kasus *borderline* maloklusi klas II yang dirawat dengan dan tanpa pencabutan premolar menunjukkan bahwa kelompok yang dirawat dengan pencabutan menghasilkan profil 2 mm lebih rata daripada kelompok yang dirawat tanpa pencabutan.¹⁰ Perawatan kasus *borderline* maloklusi klas I yang dirawat dengan pencabutan menunjukkan perubahan jaringan lunak yang signifikan pada posisi bibir atas dan bawah, serta sudut nasolabial, sementara pada kelompok tanpa pencabutan menghasilkan retraksi bibir atas dan protraksi bibir bawah yang signifikan.¹ Penelitian pada subjek klas I dan klas II menyimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan pada profil dan posisi bibir pada perawatan ortodonti dengan pencabutan ataupun tanpa pencabutan, sehingga pernyataan bahwa pencabutan dapat menyebabkan profil *dished-in* atau profil yang lebih retrusif tidak dapat diterima.¹¹

Analisis sefalometri merupakan salah satu perangkat penunjang untuk menegaskan diagnosis dan rencana perawatan. Untuk mengevaluasi pertumbuhan kraniofasial,

sering dipakai garis-garis rujukan dengan metode yang telah diperkenalkan oleh beberapa ahli, diantaranya adalah Ricketts. Ricketts telah menganalisis kedudukan bibir terhadap garis estetik. Analisis jaringan lunak ini dimaksudkan untuk mengevaluasi keseimbangan jaringan lunak fasial.¹² Saelens dan De Smit¹³ membandingkan perubahan estetika fasial antara perawatan dengan pencabutan dan tanpa pencabutan. Pengukuran sefalometri jaringan lunak diantaranya meliputi pengukuran sudut nasolabial, sudut labiomental, pengukuran jaringan lunak wajah menggunakan garis estetik (E). Garis E digunakan sebagai referensi untuk protrusi bibir sesuai ketentuan Ricketts, yaitu garis yang menghubungkan jaringan lunak ujung hidung (titik P) ke jaringan lunak pogonion (Pog'). Nilai normalnya adalah bibir atas 4 mm di belakang garis E dan bibir bawah 2 mm di belakang garis E. Sudut nasolabial diukur dari *Columella* (C)-*Subnasale* (Sn)-*Labrale Superiorous* (Ls), sedangkan sudut labiomental diukur dari labrale inferior (Li)-titik B jaringan lunak (B')-Pogonion jaringan lunak (Pog').

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perubahan profil jaringan lunak pada kasus *borderline* klas I sesudah perawatan ortodontik dengan pencabutan dan tanpa pencabutan gigi.

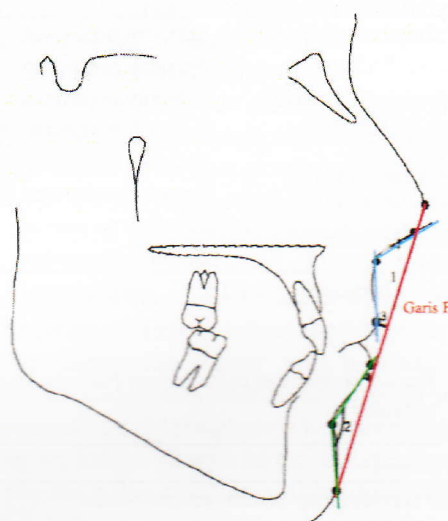
BAHAN DAN METODE

Sampel penelitian adalah data laporan pasien karyasiswa Program Pendidikan Dokter Gigi Spesialis Program Studi Ortodonsia Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta tahun 2000–2012 yang telah selesai perawatan ortodonti dengan kriteria sebagai berikut: 1) kasus *borderline* maloklusi klas I yang dirawat dengan teknik *straight wire*; 2) usia antara 18–35 tahun; 3) overjet 2–4 mm; 4) dilakukan pencabutan 4 premolar kedua atau perawatan tanpa pencabutan. Kasus *borderline* klas I adalah yang memiliki diskrepansi panjang lengkung 2,5–5 mm dan indeks fossa canina antara 37–44%, diukur dari studi model. Objek penelitian adalah sefalogram lateral sebelum dan sesudah perawatan ortodonti dari pasien yang telah memenuhi kriteria pemilihan subjek penelitian. Sefalogram lateral dari masing-masing subjek penelitian diseleksi kelengkapan sebelum dan setelah perawatan ortodonti dan kejelasan bidang dan titik-titik referensi. Didapatkan 28 data laporan pasien yang memenuhi kriteria, terdiri dari 15 kasus *borderline* klas I yang dirawat tanpa pencabutan dan 13 kasus *borderline* klas I angle yang dirawat dengan pencabutan premolar kedua.

Dilakukan panapan pada sefalogram sebelum dan setelah perawatan ortodonti dengan menggunakan kertas asetat dengan pensil 4H di atas illuminator. Bidang dan titik-titik yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 1 dan Gambar 1.

Tabel 1. Sefalometri *Landmarks* jaringan keras dan jaringan lunak

Sefalometri <i>Landmarks</i>	Definisi
Pronasale (P)	titik paling prominen atau paling anterior dari hidung (ujung hidung)
Pogonion jaringan lunak (Pog')	titik terdepan dari jaringan lunak dagu dalam bidang midsagital
Labrale superior (Ls)	titik yang mengindikasikan batas <i>mucocutaneus</i> bibir atas, titik terdepan pada kurva bibir atas
Labrale inferior (Li)	titik median pada margin bawah dari membran bibir bawah.
Columella (C)	septum nasal, batas bawah hidung
Subnasale (Sn)	titik di mana <i>columella</i> (septum nasal) menyatu dengan bibir atas dalam bidang sagital, titik paling atas paling posterior pada cekungan nasolabial
Titik B jaringan lunak (B')	titik tercekung pada pertengahan antara labrale inferior dan jaringan lunak pogonion. Disebut juga labiomental <i>sulcus</i>
Garis estetik (E)	garis yang menghubungkan jaringan lunak ujung hidung (titik P) ke jaringan lunak pogonion (Pog').
Sudut nasolabial	sudut yang diukur dari <i>Columella</i> (C)- <i>Subnasale</i> (Sn)- <i>Labrale Superiorous</i> (Ls).
Sudut labiomental	sudut yang diukur dari Labrale Inferior (Li)-titik B jaringan lunak (B')-Pogonion jaringan lunak (Pog').



Gambar 1. Pengukuran permukaan jaringan lunak wajah, 1. Sudut nasolabial: C-Sn-LS, 2. Sudut labiomental: LI-B'-Pog', 3. Posisi bibir atas terhadap garis E, 4. Posisi bibir bawah terhadap garis E.¹³

Subjek penelitian dibagi dalam dua kelompok, yaitu: 1) kelompok pencabutan dan 2) kelompok tanpa pencabutan. Jarak bibir atas dan bibir bawah terhadap garis E, sudut nasolabial, dan sudut labiomental sebelum dan sesudah perawatan diukur pada kedua kelompok menggunakan jangka sorong dan *protractor* sefalometri pada masing-masing sefalogram (Gambar 1).

Pengukuran dilakukan dua kali oleh peneliti dengan selang waktu satu minggu. Hasil dari kedua pengukuran dibandingkan, jika nilainya sama atau kurang dari 0,5 mm (\bar{Y} 0,5 mm) untuk pengukuran linier dan sama atau kurang dari 1° (\bar{Y} 1°) untuk pengukuran angular, maka dihitung reratanya. Penapakan dan pengukuran ketiga dilakukan bila perbedaan hasil kedua pengukuran linier lebih besar dari 0,5 mm ($> 0,5$ mm) dan pengukuran angular lebih dari 1° ($> 1^\circ$). Hasilnya dibandingkan dengan kedua nilai sebelumnya, kemudian nilai rerata ditentukan dari dua nilai yang terdekat.⁶

Data hasil pengukuran yang telah dikelompokkan, dianalisis dengan menggunakan *Paired t-test* untuk mengetahui perubahan posisi bibir, sudut nasolabial, dan sudut labiomental sebelum dan setelah perawatan pada masing-masing kelompok, serta menggunakan *Independent t-test* untuk membandingkan perubahan posisi bibir, sudut nasolabial, dan sudut labiomental setelah perawatan di antara kedua kelompok.

HASIL

Data hasil pengukuran pada kelompok dengan pencabutan dapat dilihat pada Tabel 2. Data hasil pengukuran pada kelompok tanpa pencabutan dapat dilihat pada Tabel 3. Uji *independent t test* perbandingan perubahan posisi bibir atas dan bibir bawah terhadap garis E Ricketts, sudut nasolabial, serta sudut labiomental antara perawatan dengan pencabutan dan tanpa pencabutan dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4 memperlihatkan perubahan yang bermakna posisi bibir atas, bibir bawah, sudut nasolabial, dan sudut labiomental antara perawatan ortodonti dengan pencabutan dan tanpa pencabutan. Rerata perubahan posisi bibir atas terhadap garis E Ricketts pada kelompok dengan pencabutan adalah -0,7938 dan pada kelompok tanpa pencabutan adalah 0,2760. Tanda positif menunjukkan perubahan posisi bibir berada di depan garis E Ricketts, sedangkan tanda negatif menunjukkan perubahan posisi bibir berada di belakang garis E Ricketts. Rerata perubahan sudut nasolabial pada kelompok dengan pencabutan adalah 3,0769 dan pada kelompok tanpa pencabutan adalah -3,9667. Tanda negatif menunjukkan terjadi pengurangan besar sudut nasolabial sesudah perawatan ortodonti aktif pada kelompok tanpa pencabutan, sedangkan tanda positif menunjukkan terjadi peningkatan besar sudut nasolabial sesudah perawatan

Tabel 2. Rerata, simpangan baku dan uji *Paired t-test* sebelum dan sesudah perawatan ortodonti pada kelompok perawatan dengan pencabutan

Variabel		N	Rerata	Simpangan baku	t	Sig (p)
Posisi bibir atas terhadap garis E Ricketts	Sebelum perawatan	13	0,6092	2,80062	3,380	0,005*
	Sesudah perawatan		-0,1846	2,79639		
Posisi bibir bawah terhadap garis E Ricketts	Sebelum perawatan	13	3,4169	3,17221	6,475	0,000*
	Sesudah perawatan		1,2108	2,65649		
Sudut nasolabial	Sebelum perawatan	13	90,077	14,1684	-1,623	0,131
	Sesudah perawatan		93,154	10,5739		
Sudut labiomental	Sebelum perawatan	13	133,308	10,6253	-1,893	0,083
	Sesudah perawatan		136,308	7,8992		

Keterangan: * : bermakna ($p < 0,05$) N : jumlah sampel

Tabel 3. Rerata, simpangan baku dan uji *Paired t-test* sebelum dan sesudah perawatan ortodonti pada kelompok perawatan tanpa pencabutan

Variabel		N	Rerata	Simpangan baku	t	Sig (p)
Posisi bibir atas terhadap garis E Ricketts	Sebelum perawatan	15	-0,1793	2,06611	-0,720	0,483
	Sesudah perawatan		0,0953	2,0047		
Posisi bibir bawah terhadap garis E Ricketts	Sebelum perawatan	15	2,1460	2,27210	0,260	0,798
	Sesudah perawatan		2,0727	2,06159		
Sudut nasolabial	Sebelum perawatan	15	90,167	12,1091	1,495	0,157
	Sesudah perawatan		86,200	10,1731		
Sudut labiomental	Sebelum perawatan	15	134,633	10,3880	1,341	0,201
	Sesudah perawatan		132,467	11,9201		

Keterangan: * : bermakna ($p < 0,05$) N : jumlah sampel

Tabel 4. Uji independent t test antara perawatan dengan pencabutan dan tanpa pencabutan

Variabel		N	Rerata	Simpangan baku	t	Sig (p)
Posisi bibir atas terhadap garis E Ricketts	Dengan pencabutan	13	-0,7938	0,84678	2,299	0,030*
	Tanpa pencabutan	15	0,2760	1,47857		
Posisi bibir bawah terhadap garis E Ricketts	Dengan pencabutan	13	-2,2062	1,22852	4,686	0,000*
	Tanpa pencabutan	15	-0,0733	1,09063		
Sudut nasolabial	Dengan pencabutan	13	3,0769	6,83693	-2,098	0,041*
	Tanpa pencabutan	15	-3,9667	10,27908		
Sudut labiomental	Dengan pencabutan	13	3,0000	5,71548	-2,282	0,031*
	Tanpa pencabutan	15	-2,1667	6,25833		

Ket: * : bermakna ($p < 0,05$); N : jumlah sampel

ortodonti aktif pada kelompok dengan pencabutan. Hasil penelitian ini menunjukkan terjadi perubahan posisi bibir atas, bibir bawah, sudut nasolabial, dan labiomental antara perawatan ortodonti dengan pencabutan dan tanpa pencabutan pada kasus *borderline* klas I sesudah perawatan ortodonti aktif.

PEMBAHASAN

Malrelasi transversal ataupun vertikal pada rahang, seperti gigi yang berjejal dan iregularitas merupakan penyebab umum maloklusi klas I, umumnya perawatan dapat dilakukan dengan pencabutan atau tanpa pencabutan gigi-gigi permanen. Pada kasus-kasus *borderline* penentuan rencana perawatan dengan pencabutan ataupun tanpa pencabutan masih menjadi perdebatan dan kontroversi, kemungkinan profil wajah juga ikut menentukan keputusan untuk dilakukan pencabutan atau tanpa pencabutan.

Hasil penelitian menunjukkan pada kelompok kasus *borderline* klas I yang dirawat dengan pencabutan terjadi retraksi posisi bibir atas dan bibir bawah terhadap garis E Ricketts sesudah perawatan ortodonti aktif. Berdasarkan garis E Ricketts, pada kelompok dengan pencabutan sebelum perawatan ortodonti, posisi bibir atas 0,6092 mm di depan garis E Ricketts menjadi 0,1846 mm dibelakang garis E Ricketts, sementara posisi bibir bawah sebelum perawatan 3,4169 mm di depan garis E Ricketts menjadi 1,2108 mm di depan garis E Ricketts. Terjadi retraksi bibir atas sebesar -0,7938 mm dan retraksi bibir bawah sebesar -2,2061 mm (Tabel 2). Tanda negatif menunjukkan adanya pengurangan jarak posisi bibir terhadap garis E Ricketts sesudah perawatan. Hasil penelitian sesuai dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Drobocky dan Smith,¹⁴ Kocadereli,¹⁵ dan Konstantonis.¹

Terjadinya retraksi bibir atas dan bibir bawah kemungkinan terjadi karena adanya retraksi gigi-gigi anterior untuk menutup ruang sisa bekas pencabutan premolar kedua. Posisi bibir atas dan bibir bawah sebelum dan sesudah perawatan ortodonti pada kelompok dengan pencabutan ini masih lebih kecil bila dibandingkan dengan nilai normal dari posisi bibir atas dan bibir bawah terhadap garis E Ricketts, yaitu bibir atas 4 mm di belakang garis E

Ricketts dan bibir bawah 2 mm di belakang garis E Ricketts. Keadaan tersebut kemungkinan terjadi disebabkan subjek penelitian yang digunakan adalah populasi orang Indonesia, dan kebanyakan populasi orang Indonesia memiliki tipe wajah yang hampir sama, yaitu protrusif bimaksila.¹⁷ Terdapat variasi yang luas di antara kelompok rasial, namun kebanyakan penelitian berdasarkan profil wajah jaringan lunak dengan standar subjek ras kulit putih yang memiliki profil wajah yang lebih rata bila dibandingkan dengan profil populasi ras yang ada di Asia. Retraksi pada bibir atas lebih kecil daripada retraksi bibir bawah, hal ini kemungkinan disebabkan pergerakan pada bibir atas lebih sulit diprediksi karena bibir atas dipengaruhi oleh posisi bibir bawah dan berhubungan dengan adanya perlekatan bibir atas terhadap hidung.¹⁶

Pada Tabel 2 memperlihatkan tidak terjadi perubahan besarnya sudut nasolabial dan sudut labiomental antara sebelum dan sesudah perawatan pada kelompok yang dirawat dengan pencabutan. Namun dari Tabel 2 terlihat adanya peningkatan rerata sudut nasolabial pada kelompok dengan pencabutan, sebelum perawatan ortodonti sebesar $90,077^\circ$ dan setelah perawatan ortodonti menjadi $93,154^\circ$, meskipun dalam penelitian perubahan sudut nasolabial sebelum dan sesudah perawatan tidak bermakna. Perubahan linier pada posisi bibir atas dan bawah tidak diikuti oleh perubahan anguler sudut nasolabial dan labiomanetal. Hal ini kemungkinan terjadi karena adanya perubahan pada kedalaman sulkus labial, sesuai dengan hasil penelitian Garmec dan Tanner² yang menyatakan terjadi peningkatan kedalaman sulkus labial pada perawatan dengan pencabutan. Meningkatnya kedalaman sulcus labial dapat terjadi karena adanya faktor pertumbuhan jaringan lunak pogonion dan resesi relatif dari titik sulkus labial inferior.² Nilai besarnya sudut nasolabial sebelum dan sesudah perawatan masih termasuk dalam rentang ideal sudut nasolabial yaitu antara $90-110^\circ$.

Pada kelompok tanpa pencabutan, tidak terdapat perbedaan posisi bibir atas, bibir bawah, sudut nasolabial, dan sudut labiomental antara sebelum dan sesudah perawatan ortodonti aktif. Keadaan tersebut menunjukkan bahwa tidak terjadi perubahan profil wajah jaringan lunak antara sebelum dan sesudah perawatan pada kelompok yang dirawat tanpa pencabutan. Berdasarkan Tabel 3,

terjadi sedikit perubahan pada posisi bibir terhadap garis E Ricketts, sudut nasolabial, dan sudut labiomental sesudah perawatan pada kelompok tanpa pencabutan yaitu posisi bibir menjadi sedikit lebih maju serta sudut nasolabial dan sudut labiomental menjadi sedikit lebih kecil sehingga tidak mempengaruhi profil wajah secara keseluruhan. Hasil penelitian tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Germec dan Taner.² Perubahan hasil perawatan yang sangat kecil pada kelompok tanpa pencabutan tersebut kemungkinan karena hanya terjadi sedikit pergerakan ke labial gigi-gigi anterior sehingga tidak menyebabkan profil yang protrusif di akhir perawatan pada kelompok tanpa pencabutan. Hal ini kemungkinan disebabkan adanya efek kompensasi jaringan lunak, keadaan ini juga ditemukan pada kasus dengan pencabutan premolar pertama dan kedua yaitu penutupan ruang bekas pencabutan dapat dilakukan tanpa mempengaruhi profil fasial.¹⁷

Tabel 4 menunjukkan hasil perbandingan perubahan profil jaringan lunak wajah antara kelompok kasus *borderline* klas I yang dirawat dengan pencabutan dan tanpa pencabutan terdapat perbedaan dari posisi bibir atas, bibir bawah, sudut nasolabial, dan sudut labiomental. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Paquette dkk.,¹⁰ Germec dan Taner,² serta Konstantonis¹ yang menyatakan bahwa pada kasus *borderline* perawatan dengan pencabutan premolar dapat menyebabkan profil yang retrusif daripada perawatan tanpa pencabutan premolar. Secara keseluruhan dari penelitian didapatkan bahwa pada kasus *borderline* klas I perawatan ortodonti dengan pencabutan menyebabkan profil wajah jaringan lunak menjadi lebih retrusif daripada perawatan tanpa pencabutan. Keadaan tersebut kemungkinan terjadi karena adanya gaya resiprokal dari gigi-gigi anterior dan gigi-gigi posterior pada saat penutupan ruang bekas pencabutan, sehingga terjadi retraksi pada gigi-gigi anterior yang mempengaruhi profil jaringan lunak wajah. Pada populasi orang Indonesia dengan mayoritas tipe wajah adalah protrusi bimaxila, perawatan ortodonti pada kasus *borderline* klas I dengan pencabutan 4 premolar kedua yang menghasilkan profil wajah yang lebih retrusif daripada perawatan tanpa pencabutan, kemungkinan akan lebih disukai.

Studi ini menunjukkan bahwa profil wajah jaringan lunak kasus *borderline* maloklusi klas I yang dirawat dengan pencabutan profil wajah menjadi lebih retrusif daripada kasus *borderline* maloklusi klas I yang dirawat dengan tanpa pencabutan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada atas dana penelitian Dana

Masyarakat 2013, dan Program Pendidikan Dokter Gigi Spesialis Ortodonsia Universitas Gadjah Mada Yogyakarta atas ijin penelitian yang diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Konstantonis D. The impact of extraction vs nonextraction treatment on soft tissue changes in Class I borderline malocclusions. *Angle Orthod* 2011; 82: 209-17.
2. Germec D and Taner U. Effects of extraction and nonextraction therapy with air-rotor stripping on facial esthetic in postadolescent borderline patients. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 2008; 133: 539-49.
3. Lim HJ, Ko KT, and Hwang HS. esthetic impact of premolar extraction and nonextraction treatments on Korean borderline patients. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 2008; 133: 524-31.
4. Aksu M and Kocadereli I. Arch width changes in extraction and nonextraction treatment in Class I patients. *Angle Orthod* 2005; 75: 948-52.
5. Xu T, Liu Y, Yang M, and Huang W. Comparison of extraction versus nonextraction orthodontic treatment outcomes for borderline Chinese patients. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 2006; 129: 672-7.
6. Hanimastuti H, Pudyani PS, Sutantyo D, Profil bibir dan posisi insisivus perawatan kasus *borderline* klas I dengan pencabutan dan tanpa pencabutan. *Majalah Kedokteran Gigi* 2013; 20(2): 132-9.
7. Bhalajhi SI, 2004, *Orthodontics The Art of Science*, Arya, Kuwait. p. 69-70, 176-7, 259-61.
8. James RD. A comparative study of facial profiles in extraction and nonextraction treatment. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 1998; 114: 265-76.
9. Bowman SJ, Johnston Jr LE. The esthetic impact of extraction and nonextraction treatments on Caucasian patients. *Angle Orthod* 2000; 70: 3-10.
10. Paquette DE, Beattie JR, and Johnston LE Jr. A Long-term comparison of nonextraction and premolar extraction edgewise therapy in "borderline" Class II patients. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 1992; 102: 1-14.
11. Bascifti FA, Usumez S. Effects of extraction and nonextraction treatment on Class I and Class II subject. *Angle Orthod* 2003; 73: 36-42.
12. Kusnoto H. Penggunaan Cephalometri Radiografi dalam Bidang Ortodonti, Bagian Ortodonti FKG Universitas Trisakti, Jakarta, 1977; 3-15.
13. Saelens NA, De Smit AA. Therapeutic changes in extraction versus non-extraction orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 1998; 20: 225-36.
14. Lew K. Profile change following orthodontic treatment of bimaxillary protrusion in adult with the Begg appliance. *Eur J Orthod* 1989; 11: 375-81.
15. Drobocky OB, Smith RJ. Changes in facial profile during orthodontic treatment with extraction of four first premolars. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 1989; 95: 220-30.
16. Kocadereli I. Changes in soft tissue profile after orthodontic treatment with and without extractions. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 2002; 122: 67-72.
17. Kusnoto J, Kusnoto H. The effect of anterior tooth retraction on lip position of orthodontically treated adult Indonesians, *Am J Orthod Dentofac Orthop* 2001; 120: 304-7.
18. Wholley CJ, Woods MG. The effects of commonly prescribed premolar extraction sequences on the curvature of the upper and lower lips. *Angle Orthod* 2003; 73: 386-95.

Research Report

Minyak ikan Lemuru (*Sardinella longicep*) menurunkan apoptosis osteoblas pada tulang alveolaris tikus wistar

(Fish oil of Lemuru (*Sardinella longicep*) reduced the osteoblast apoptosis in wistar rat alveolar bone)

Didin Erma Indahyani

Bagian Biologi Oral

Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Jember - Indonesia

ABSTRACT

Background: Periodontal disease is caused by periodontopathogen bacteria resulting the alveolar bone damage. The decrease of osteoblasts and the increased of osteoclasts can cause bone destruction. The decrease of osteoblasts, due to a disturbance of differentiation, proliferation and apoptosis. Inflammatory mediators are prostaglandin E2 (PGE2), interleukin-1 (IL-1), IL-6 also tumor necrosis alpha (TNF- α) stimulates osteoblast apoptosis through gene expression, signaling molecules and receptor-forming osteoblasts. Fish oil of Lemuru, which is widely encountered in Indonesian coast, containing n-3 poly unsaturated fatty acids (n-3 PUFAs) are quite high. Consumption of fish oil shown to reduce the expression of PGE2, IL-1, IL-6 and TNF- α . **Purpose:** The purpose of this study was to examine the effect of Lemuru (*Sardinella longicep*) fish oil on osteoblast apoptosis of rat alveolar bone induced periodontal infection. **Methods:** Thirty Wistar rats, male, age 5 days, divided into 3 groups: group I rats induced with normal saline, group II rats induced by LPS, and group III rats induced with lemuru fish oil and LPS. Each group was divided into 2 sub-groups that would be sacrificed at 13 days and 21 days of age. Fish oil was given at a dose 1ml/300-350 grams. Lipopolysaccharide (LPS) induced with the purpose to cause periodontal infection in the maxillary buccal fold molar region with dose 5 μ l LPS/PBS 0.03 ml. After decapitation and decalcification, the maxilla was cut in 5 μ m thickness. Apoptosis was analyzed on DNA and detected by TUNEL reaction (transferase-mediated digoxigenin-deoxy-UTP nick end labeling). **Results:** The results showed that apoptosis of osteoblast cells was significantly smaller in rats induced by Lemuru fish oil. **Conclusion:** The study showed that Lemuru fish oil reduced the osteoblast apoptosis of rats alveolar bone induced periodontal infection by LPS.

Key words: Fish oil, *Sardinella longicep*, osteoblast, apoptosis, n-3 PUFA, periodontal disease, bone resorption

ABSTRAK

Latar belakang: Penyakit periodontal akibat bakteri periodontopatogen, menyebabkan terjadinya kerusakan tulang alveolar. Penurunan jumlah osteoblas dan peningkatan jumlah osteoklas mengakibatkan kerusakan tulang. Penurunan jumlah osteoblas disebabkan terjadinya gangguan diferensiasi maupun proliferasi juga apoptosis. Apoptosis osteoblas dimodulasi oleh mediator-mediator inflamatori yaitu prostaglandin E2 (PGE2), interleukin-1 (IL-1), IL-6 juga tumor nekrosis alfa (TNF- α), melalui pengaruhnya pada ekspresi gen, molekul-molekul signaling maupun reseptor pembentukan osteoblas. Minyak ikan Lemuru yang banyak di pesisir Indonesia, banyak mengandung n-3 poly unsaturated fatty acid (n-3 PUFA). Konsumsi minyak ikan terbukti menurunkan ekspresi PGE2, IL-1, IL-6 maupun TNF alfa. **Tujuan:** Tujuan penelitian ini adalah untuk meneliti pengaruh minyak ikan Lemuru (*Sardinella longicep*) pada apoptosis osteoblas pada tulang alveolar tikus yang diinduksi infeksi periodontal. **Metode:** Tiga puluh ekor tikus Wistar, jantan, umur 5 hari, dibagi menjadi 3 kelompok yaitu: kelompok I tikus diinduksi dengan saline normal, kelompok II tikus diinduksi dengan lipopolisakarida (LPS), dan kelompok III tikus diinduksi dengan minyak ikan Lemuru dan LPS. Masing-masing kelompok dibagi menjadi

2 sub kelompok yaitu kelompok yang akan didekapitasi pada umur 13 hari dan umur 21 hari. Minyak ikan Lemuru diberikan dengan dosis 1ml/300-350 gram. Lipopolisakarida (LPS) diinduksikan dengan tujuan untuk menyebabkan infeksi periodontal pada buccal fold regio molar rahang atas, dengan dosis 5µl LPS/0,03PBS (konsentrasi 0,02 mg). Setelah didekapitasi dan dekalsifikasi, rahang atas dipotong dengan ketebalan 5µm. Apoptosis dianalisis pada DNA dan dideteksi dengan TUNEL reaction (Transferase-mediated digoxigenin-deoxy-UTP nick end labeling). **Hasil:** Hasil penelitian menunjukkan bahwa apoptosis sel osteoblas secara bermakna lebih kecil pada tikus yang diinduksi dengan minyak ikan. **Simpulan:** Penelitian ini menunjukkan bahwa minyak ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*) mampu menurunkan apoptosis sel osteoblas pada tikus Wistar yang diinduksi infeksi periodontal dengan LPS.

Kata kunci: Minyak ikan, *Sardinella longiceps*, osteoblas, apoptosis, n-3 PUFA, penyakit periodontal, resorpsi tulang

Korespondensi (correspondence): Didin Erma Indahyani, Bagian Biologi Oral, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember. Jl. Kalimantan No. 35 Jember 68121, Indonesia. E-mail: didinerm@yaho.com

PENDAHULUAN

Apoptosis osteoblas merupakan komponen penting yang terlibat dalam osteogenesis secara normal dan patologis. Di dalam skeletal pada masa post natal dan dewasa, apoptosis merupakan bagian integral terhadap fisiologi turnover tulang, repair dan regenerasi. Keseimbangan proliferasi, diferensiasi dan apoptosis osteoblas menentukan ukuran populasi osteoblas pada waktu tertentu.¹ Tingkat pembentukan tulang ditentukan oleh jumlah osteoblas, replikasi progenitornya dan life-span dari sel yang matur. Hal tersebut dapat mencerminkan waktu kematian sel oleh apoptosis. Telah dibuktikan bahwa apoptosis menentukan jumlah osteoblas, maka perubahan dalam prevalensi apoptosis pada osteoblas dapat mengubah laju pembentukan tulang.²

Periodontopatogen menyebabkan inflamasi dan destruksi tulang alveolaris. Mekanisme destruksi tulang merupakan proses kompleks yang melibatkan 2 aksi sel osteoklas dan osteoblas. Pada proses inflamasi, sel pembentuk tulang yaitu osteoblas mengalami penurunan jumlah maupun aktivitasnya, sedangkan sel osteoklas akan meningkat. Penurunan jumlah sel osteoblas diakibatkan oleh berkurangnya proliferasi atau tingginya apoptosis osteoblas ataupun sel prekursorinya, yang keduanya dipengaruhi oleh adanya inflamasi.³ Peristiwa tersebut diawali adanya respon sistem imun alami yaitu toll-like receptors (TLRs) pada sel epitel gingiva mendeteksi dan merespon struktur mikroba misalnya lipopolysaccharide (LPS), peptidoglycan, DNA bakteri, double-stranded RNA, dan lipoprotein. Struktur mikroba tersebut dikenal dengan pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). TLRs yang terdapat di permukaan sel host, mengenali PAMPs, dan menyebabkan aktivasi beberapa faktor transkripsi yaitu nuclear factor- κ B (NF κ B) dan aktivator protein 1 (AP-1) melalui mitogen-activated protein kinase (MAK) cascade.⁴

Selain itu respon sistem imun alami, akan mengaktivasi sitokin proinflamatori, chemokine serta eikosanoid yang berperan penting pada apoptosis sel osteoblas. Sitokin proinflammatory, misalnya IL-1 β dan TNF- α , secara langsung

menstimulasi apoptosis osteoblas ataupun prekursor osteoblas atau secara tidak langsung mempengaruhi stimulasi ekspresi Fas yaitu mediator proapoptosis yang potensial.⁵ Eikosanoid yaitu prostaglandin E-2 (PGE-2) berperan penting untuk menurunkan produksi osteoblas. PGE-2 menginduksi osteoblas memproduksi receptor activated nuclear kappa- β ligand (RANKL) dan menurunkan produksi osteoprotegerin (OPG). Selain itu PGE2 mempertinggi ikatan antara RANKL dan receptor activated nuclear kappa- β (RANK) pada prekursor osteoklas. Penurunan OPG yang berfungsi mengikat RANKL untuk membentuk osteoblas, mengakibatkan RANKL berikatan dengan RANK yang menyebabkan pembentukan osteoklas. Keadaan tersebut menyebabkan jumlah osteoblas menurun.⁶

Minyak ikan lemuru berasal dari ikan lemuru (*Sardinella longiceps*) banyak di temukan di pesisir Indonesia, terutama pulau Jawa. Produksinya melimpah, sehingga harganya sangat murah. Selama ini ikan lemuru selain di buat minyak ikan juga di buat tepung ikan sebagai makanan ternak. Minyak ikan lemuru mengandung n-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) yaitu eicosapentaenoic acid 13,70% (EPA) dan docohexanoic acid (DHA) 8,91%.⁷

n-3 PUFA adalah prekursor eikosanoid yang terlibat dalam metabolisme tulang, yaitu prostaglandin (PG) dan leukotrienes. Diet EPA dan DHA akan mengganti n-6 PUFA dalam membran platelet, eritrosit, monosit dan sel hati. Ini berperan pada perubahan rasio n-6/n3 PUFA dalam membran yang menyebabkan terjadinya perubahan sifat dan fungsi. Perubahan ini berperan penting pada penurunan produksi IL-1, IL-6 dan TNF- α .⁸ Konsumsi n-3 PUFA menurunkan TNF- α . Penurunan sitokin proinflamatori maupun eikosanoid oleh karena n-3 PUFA, menyebabkan konsumsi minyak ikan akan menyebabkan terjadinya peningkatan pembentukan tulang, dan menurunkan destruksi tulang.⁹ Penelitian ini bertujuan untuk meneliti pengaruh minyak ikan lemuru pada apoptosis sel osteoblas pada tulang alveolar tikus wistar yang diinduksi infeksi periodontal.

BAHAN DAN METODE

Tiga puluh ekor tikus Wistar jantan, umur 5 hari, dibagi menjadi 3 kelompok yaitu: kelompok I tikus diinduksi dengan saline normal, kelompok II tikus diinduksi dengan LPS, dan kelompok III tikus diinduksi dengan minyak ikan lemuru (produksi Muncar Banyuwangi) dan LPS. Masing-masing kelompok dibagi menjadi 2 sub kelompok yaitu kelompok yang didekapitasi pada umur 13 hari dan umur 21 hari. Waktu dekapitasi 13 hari setelah induksi minyak ikan, saat baru terjadi pergantian n-6 PUFA dengan n-3 PUFA pada membran sel dan pada 21 hari saat pergantian asam lemak tersebut sudah berlipat.¹⁰

Minyak ikan lemuru diberikan dengan dosis 1ml/300-350 gram berat badan tikus wistar, secara peroral, menggunakan sonde lambung, dan diberikan tiap hari (yang dimulai 3 hari setelah induksi LPS) sampai tikus dilakukan dekapitasi. Induksi LPS selama 3 x 24 jam telah menyebabkan peningkatan jumlah osteoklas pada tulang alveolaris. Induksi LPS dilakukan di bukal *fold* regio molar rahang atas, dengan dosis 5µl LPS/0,03PBS (konsentrasi LPS 0,02 mg), yang dilakukan 24 jam sekali sebanyak 8 kali.¹¹ Tikus didekapitasi setelah berumur 13 dan 21 hari. Tikus yang telah didekapitasi diambil rahang atas kanannya, kemudian difiksasi dengan *Bouin's fixative* 4°C semalam. Spesimen didemineralisasi menggunakan asam asetat/formalin dan ditanam dalam blok parafin kemudian di potong dengan ketebalan 5µm. Spesimen dilakukan Fragmentasi DNA dan dideteksi dengan *Transferase-mediated digoxigenin-deoxy-UTP nick end labeling (TUNEL reaction)*, untuk menganalisa apoptosis sel osteoblas, yang secara singkat adalah sebagai berikut. Irisan dikonterstain dengan 3% *metil green*, kemudian diinkubasi selama 1-2 menit dengan 0,15% CuSO₄ dalam 0,9% NaCl. *TUNEL reactions* nampak pada nukleus sel dan sel yang nukleusnya nampak coklat gelap yang jelas adalah positif. *TUNEL reactions* yang positif adalah sel yang mengalami proses apoptosis.¹²

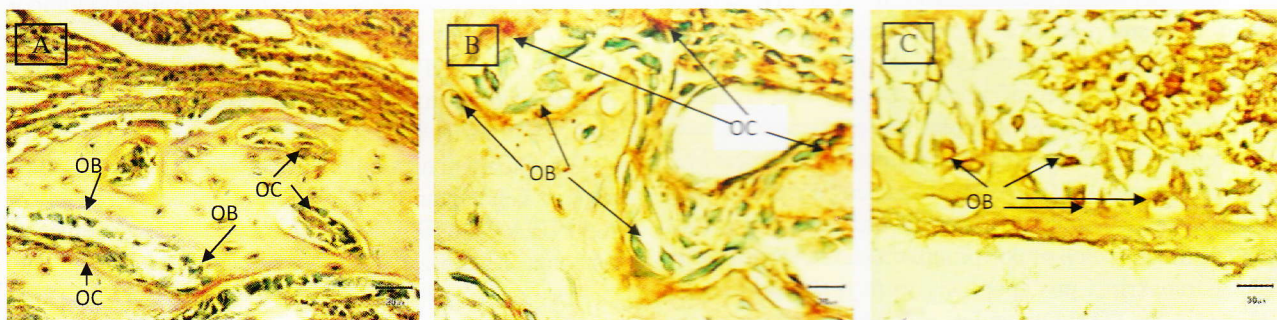
HASIL

Apoptosis osteoblas secara bermakna ($p < 0,05$) lebih besar pada tikus yang diinduksi LPS yang berumur 13 hari maupun 21 hari bila dibandingkan dengan kontrol. Tikus yang diinduksi LPS kemudian di beri minyak ikan mempunyai tingkat apoptosis yang lebih rendah secara signifikan ($p < 0,05$) pada umur 13 maupun 21 hari bila dibandingkan dengan kontrol (Tabel 1). Gambaran mikroskopis pada apoptosis osteoklas dan osteoblas dapat dilihat pada Gambar 1A, B, C.

PEMBAHASAN

Induksi LPS mengakibatkan apoptosis sel osteoblas pada tikus umur 13 hari maupun 21 hari. Sel osteoblas yang mengalami apoptosis lebih banyak secara signifikan pada tikus yang hanya di induksi LPS. LPS bersifat endotoksin karena LPS mengikat reseptor *cluster of differentiation 14* (CD14) di permukaan sel makrofag dan monosit. *Toll-like receptor-4* (TLR4) makrofag dan monosit yang berikatan dengan bakteri oleh karena adanya CD14 akan menginduksi sekresi sitokin dan *mediator lipid inflammation*. Sitokin dan mediator inflamasi tersebut termasuk IL-1, TNF- α juga PGE-2. Mediator tersebut berperan pada diferensiasi dan aktifitas osteoklas dan menekan jumlah osteoblas. Mediator tersebut memacu terbentuknya osteoklas dari sel stromal/osteoblas melalui ikatan sel ke sel yaitu RANKL dalam osteoblas dengan RANK pada progenitor osteoklas.¹³

Pemberian minyak ikan lemuru mengakibatkan peningkatan jumlah osteoblas secara signifikan (Tabel 1). Minyak ikan lemuru mengandung EPA dan DHA. Konsumsi minyak ikan tersebut mengakibatkan terjadi peningkatan komposisi EPA dan DHA serta rendahnya asam *arachidonat* (AA) dalam membran sel. Asam *arachidonat* adalah sumber utama pembentukan PGE₂, leukotrin, lipoksin dan p45 akibat terjadinya oksidasi



Gambar 1. Gambaran apoptosis osteoblas, dengan TUNEL (pembesaran 1000x).

Keterangan: sel yang menunjukkan warna hijau merupakan sel yang *survive*, sedangkan sel yang berwarna coklat merupakan sel yang mengalami apoptosis. A. Tikus kontrol (tampak sel osteoblas dalam keadaan *survive*), B Tikus yang diinduksi LPS dan di beri minyak ikan (sel osteoblas terlihat lebih banyak yang *survive*). C, tikus yang diinduksi LPS (sel osteoblas banyak mengalami apoptosis). OB (osteoblas), OC (Osteoklas).

Tabel 1. Jumlah apoptosis sel osteoblas

	n	Apoptosis osteoblas	
		Mean	Std. Deviation
kontrol - 13 hari	5	1.80	.83
kontrol - 21 hari	5	1.20	1.30
LPS 13 hari	5	5.80	3.96
LPS 21 hari	4	10.00	5.22
LPS MI 13 hari	5	3.80	2.28
LPS MI 21 hari	5	2.60	2.70
Total	29	4.00	3.95

Keterangan: LPS: lipopolysaccharide, n: jumlah ulangan

oleh enzim-enzim lipoksigenase, siklooksigenase dan epoksigenase yang berasal dari n-6 PUFA.⁸ Konsumsi n-3 PUFA, selama 2 minggu mengakibatkan peningkatan α -linolenic acid (ALA) sebanyak 3-4 \times lipat, EPA 3 \times lipat dan DHA 1,5 \times lipat dalam membran sel. Peningkatan membran sel dengan n-3 PUFA tersebut menyebabkan penurunan produksi PGE2, tetapi akan meningkatkan PGE3 yang berfungsi sebagai anti inflamasi.¹³

Rendahnya PGE2 mempengaruhi pembentukan osteoblas, karena fungsi PGE2 yang menstimulasi ekspresi RANKL oleh prekursor osteoblas dan osteoblas matur akan menurun dan meningkatkan produksi OPG. OPG yang berikatan dengan RANKL berperan penting untuk terjadinya pembentukan osteoblas, akan tetapi apabila RANKL berikatan dengan RANK menyebabkan apoptosis osteoblas.⁸ n-3 PUFA mempengaruhi penurunan sitokin proinflamatori yaitu IL-1, IL-6 maupun TNF- α . Hal ini dihubungkan dengan penurunan aktivitas *antigen presenting cells* (APC), yaitu dengan berkurangnya ekspresi molekul *major histocompatibility cell* kelas II (MHC kelas II) dan *intercellular adhesion molecule* (ICAM). Ekspresi MHC kelas II diperlukan untuk berfungsinya APC, sedangkan ICAM merupakan molekul reseptor yang terdapat pada APC. Tanpa adanya MHC kelas II dan ICAM, APC tidak akan bisa aktif memapar antigen, misalnya LPS. APC yang aktif menstimulasi ekspresi sitokin proinflamatori. PGE-2, menyebabkan sitokin proinflamatori (IL-1 dan TNF- α) juga menurun. Penurunan sitokin proinflamatori berkaitan erat dengan penurunan jumlah osteoklas, dan peningkatan jumlah osteoblas. Sitokin proinflamatori bisa secara langsung menstimulasi apoptosis osteoblas dan prekursorinya, atau secara tidak langsung dengan menstimulasi ekspresi Fas. TNF- α menginduksi apoptosis sel ligamen periodontal yang berperan sebagai sumber prekursor osteoblas. Apoptosis yang distimulasi oleh sitokin proinflamatori, mempengaruhi faktor transkripsi pro apoptosis yaitu *forkhead box-O1* (FOXO1).⁵ FOXO1 meregulasi ekspresi gen proapoptosis yaitu *Fas-associated, via death domain* (FADD) dan *caspases-3, -8, and -9*. Peranan MAP kinase mempengaruhi *signal pro inflamatori*.¹⁴ *Upstream regulators p38 MAP kinase, MKK3 and MKK6*, diperlukan IL-1beta dan TNF-

α menginduksi ekspresi *RANK ligand* dalam *stromal bone marrow*.³ n-3 PUFA berperan menurunkan Fas melalui penurunan TNF- α , yang mempengaruhi transkripsi gen apoptosis dan menurunkan ekspresi RANKL akibat stimulasi dari IL-1 dan TNF- α .

Lipopolisakarida di ketahui berperan penting pada apoptosis osteoblas. Lipopolisakarida menginduksi osteoblas untuk mengekspresikan NOD1 dan NOD2, yaitu dua kelompok *nucleotide-binding domain* dan *leucine-rich repeat region* yang mengandung kelompok protein reseptor biasa disebut NLRs, yang bertindak sebagai sensor intraselular untuk bakteri peptidoglikan dan menginisiasi produksi mediator proinflamatori. *NLR family CARD domain* yang terdiri dari 4 (NLRC4, yang saat ini dikenal sebagai Ipaf, Card12, atau CLAN) dan *NLR family pyrin domain* yang terdiri dari 3 (NLRP3, yaitu dikenal sebagai CIAS1, cryopyrin, PYPAF1, atau NALP3) telah diimplikasikan dalam menginduksi kematian sel dalam merespon bakteri dan komponennya.^{15,16} Kedua molekul tersebut dapat berhubungan dengan protein adaptor yaitu *apoptosis-associated speck-like protein* (ASC) untuk menstimulasi aktivasi *caspase-1* and *caspase-8* yaitu enzim yang menunjukkan peningkatan aktivitas osteoblas setelah terinduksi bakteri. Aktivasi *caspase-1* dan *caspase 8* menginduksi apoptosis osteoblas.^{17,18}

Apoptosis osteoblas juga diakibatkan meningkatnya produksi *nitric oxide* (NO) akibat induksi lipopolisakarida. Lipopolisakarida dan sitokin proinflamatori, terbukti menstimulasi peningkatan iNOS. Kuzushima, dkk.,¹⁹ menyatakan bahwa TNF- α , interleukin-1 β and interferon- γ menyebabkan kematian sel osteoblas yang di mediai oleh apoptosis bukan nekrosis. Sitokin terbukti menghasilkan peningkatan *inducible nitric-oxide synthase* (iNOS) mRNA dan *nitric-oxide* (NO) dalam sel.¹⁹ NO menginduksi apoptosis osteoblas melalui *synthesis Bax protein*.²⁰

Selain itu NO menyebabkan penekanan pada viabilitas sel, potensial membran mitokondria dan sintesis ATP, yang mengakibatkan gangguan pada fungsi mitokondria, reaksi spesies oksigen intraseluler dan protein Bcl-2 yang berperan penting pada apoptosis osteoblas.²¹ Rendahnya sitokin tersebut berperan untuk menghambat pembentukan NO yang tinggi dan juga menghambat stimulasi kelompok protein reseptor yaitu NLRs yang berperan pada apoptosis osteoblas.¹⁰ n-3 PUFA yang berperan pada penurunan ekspresi sitokin proinflamatori dan eikosanoid, berpengaruh pada penurunan ekspresi iNOS.²²

Penelitian ini menunjukkan bahwa minyak ikan lemuru dengan kandungan n-3 PUFA dengan kandungan 12,5% n-3 PUFA yaitu EPA dan DHA menurunkan apoptosis sel osteoblas pada tikus Wistar yang diinduksi LPS.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada pemberi dana untuk pelaksanaan penelitian ini yaitu DP2M Dikti pada penelitian fundamental.

DAFTAR PUSTAKA

1. Hock JM, Krishnan V, Onyia JE, Bidwell JP, Milas J, Stanislaus D. Osteoblast apoptosis and bone turnover. *J Bone Miner Res* 2001; 16(6): 975-84.
2. Robert LJ, Robert S, Weinstein TB, Paula RA, Michael P, Manolagas SC. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J Clin Invest* 1999; 104: 439-46.
3. Graves DT, Li J, Cochran DL. Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. *J Dent Res* 2011; 90(2): 143-53.
4. Benedetto AD, Gigante I, Colucci S, Maria G. Periodontal disease: linking the primary inflammation to bone loss. *Clin and Develop Immunol* 2013: 7.
5. Behl Y, Siqueira M, Ortiz J, Li J, Desta T, Faibish D. Activation of the acquired immune response reduces coupled bone formation in response to a periodontal pathogen. *J Immunol* 2008; 181: 8711-18.
6. Kotake S, Toru Y, Manabu K, Yuki N. Effects of NSAIDs on differentiation and function of human and murine osteoclasts—crucial ‘human osteoclastology’. *Pharmaceuticals* 2010; 3: 1394-410.
7. Estiasih T. Mikroenkapsulasi konsentrat asam lemak omega 3 dari limbah cair pengalengan ikan lemuru. Tesis. Yogyakarta: Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada; 1996. h. 12-6.
8. Kajarabille N, Díaz-Castro J, Hijano S, López-Frías M, López-Aliaga I, Ochoa JJ. A new insight to bone turnover: role of ω -3 polyunsaturated fatty acids. *The Sci World J* 2013: 16.
9. Mahmoud MAA, Safar MM, Agha AM, El-shabrawy OAM, Yassin NAZ. Effect of linseed oil, fish oil and alendronate sodium on ovariectomy-induced osteoporosis in female rats. *J of Appl Sci Res* 2013; 9(3): 2119-125.
10. Montzioris E, Cleland LG, Gibson AR, Neumann MA, Demasi M, James MJ. Biochemical effects of a diet containing foods enriched with n-3 fatty acids. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 42-8.
11. Indahyani DE, Santoso ALS, Utoro T, Soesatyo MH. Lipopolysaccharide (LPS) introduction during growth and development period of rat's tooth toward the occurrence of enamel hypoplasia. *Dent J (Maj Ked Gigi)* 2007; 40(2): 85-8.
12. Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt M, Manolagas SC, Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt M, Manolagas SC. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblast and osteocytes by glucocorticoids. *J Clin Invest* 1998; 102: 274-82.
13. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 1999; 20(3): 345-57.
14. Rogers JE, Li F, Coatney DD, Otremba J, Kriegl JM, Protter TA. A p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor arrests active alveolar bone loss in a rat periodontitis model. *J Periodontol* 2007; 78: 1992-98.
15. Gumucio DL, Diaz A, Schaner P, Richards N, Babcock C, Schaller M, Cesena T. Fire and ICE: The role of pyrin domain-containing proteins in inflammation and apoptosis. *Clin Exp Rheumatol* 2002; (Suppl 26): S45–S53.
16. Sutterwala FS, Ogura Y, Szczepanik M, Lara-Tejero M, Lichtenberger GS, Grant EP, Bertin J, Coyle AJ, Galan JE, Askenase PW, Flavell RA. Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity* 2006; 24: 317–27.
17. Mariathasan S. ASC, Ipaf and Cryopyrin/Nalp3: bonafide intracellular adapters of the caspase-1 inflammasome. *Microbes Infect* 2007; 9: 664–71.
18. McCall SH, Sahraei M, Young AB, Worley SC, Duncan JA, Pan-Yun Ting J, Marriott I. Osteoblasts express NLRP3, a nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat region containing receptor implicated in bacterially induced cell death. *J bone and min Res* 2008; 23: 1.
19. Kuzushima M, Mogi M, Togari A. Cytokine-induced nitric-oxide-dependent apoptosis in mouse osteoblastic cells: Involvement of p38MAP kinase. *Arc of Oral Biol* 2006; 51(11): 1048-53.
20. Mungrue LN, Brecht DS, Stewart DJ, Husain M. From molecules to mammals: what's NOS got to do with it. *Acta Physiol scand* 2003; 179: 123-35.
21. Rwei-Ming Chen, Ta-Liang Chen, Wen-Ta Chiu, Chia-Chen Chang. Molecular mechanism of nitric oxide-induced osteoblast apoptosis. *J of Orth Res* 2005; 23(2): 462–68.
22. Sargi SC, Dalalio MMO, Moraes AG, Visentainer JEL, Morais DR, Visentainer JV. Role of omega-3 polyunsaturated fatty acids in the production of prostaglandin E2 and nitric oxide during experimental murine paracoccidiodomycosis. *BioMed Res Int* 2013: 6.

Research Report

Respon inflamasi pulpa gigi tikus Sprague Dawley setelah aplikasi bahan etsa ethylene diamine tetraacetic acid 19% dan asam fosfat 37%

(Dental pulp inflammatory response of Sprague Dawley rats after etching application of 19% ethylene diamine tetraacetic acid and 37% phosphoric acid)

Nadie Fatimatuzzahro,¹ Tetiana Haniastuti² dan Juni Handajani²

¹ Bagian Biomedik, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember, Jember-Indonesia

² Bagian Biologi Mulut, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta - Indonesia

ABSTRACT

Background: Etching agents such as ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) and phosphoric acid which are widely used in adhesive restoration system, are aimed to increase retention of restorative materials; however, these agents may induce inflammation of dental pulp. The major function of the inflammatory response is to remove invading pathogens or damaged tissue/ cells and therefore, initiate repair. Neutrophils and macrophages are motile phagocytes that constitute the body's first line of defense. **Purpose:** The purpose of the present research was to study the effect of 19% EDTA and 37% phosphoric acid for etching application agents on the inflammatory response of the dental pulp. **Methods:** Forty-five male Sprague Dawley rats were divided into 3 groups. Cavity preparation was made on the occlusal surface of maxillary first molar using a round diamond bur. Nineteen percent of EDTA, 37% phosphoric acid, and distilled water were applied on the surface of the cavity of the teeth in group I, II and III respectively. The rats were sacrificed at 1, 3, 5, 7, and 14 days after the application (n=3 for each day). The specimens were then processed histologically and stained with hematoxylin eosin. **Results:** ANOVA showed a significant difference ($p < 0.05$) among treatment groups, indicating that etching agents application induced neutrophils, macrophages and lymphocytes infiltration in the dental pulp. Tuckey HSD test showed that application of 37% phosphoric acid increased higher number of neutrophils, macrophages and lymphocytes significantly than 19% EDTA ($p < 0.05$). **Conclusion:** The study suggested that 37% phosphoric acid induced higher number of the inflammatory cells than 19% EDTA.

Key words: 19% EDTA, 37% phosphoric acid, inflammation, dental pulp, Sprague Dawley rats

ABSTRAK

Latar belakang: Penggunaan bahan etsa seperti ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) dan asam fosfat pada sistem restorasi adhesif bertujuan untuk meningkatkan retensi bagi bahan restorasi, namun penggunaan bahan-bahan tersebut dapat menginduksi inflamasi pada pulpa. Respon inflamasi berfungsi untuk menghilangkan patogen, sel-sel atau jaringan yang rusak dan menginisiasi perbaikan. Netrofil dan makrofag adalah sel fagosit yang merupakan garis pertama pertahanan tubuh. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk meneliti efek EDTA 19% dan asam fosfat 37% sebagai bahan etsa terhadap respon inflamasi pada pulpa gigi. **Metode:** Empat puluh lima ekor tikus Sprague Dawley jantan dibagi menjadi 3 kelompok. Permukaan oklusal gigi molar satu rahang atas dipreparasi menggunakan diamond round bur. Pada kelompok I kavitas diaplikasikan EDTA 19%, kelompok II diaplikasikan asam fosfat 37% dan kelompok III diaplikasikan akuades. Hewan coba dikorbankan pada hari ke-1, 3, 5, 7 dan 14 setelah aplikasi bahan etsa (n=3). Specimen diproses secara histologis dan dicat dengan hematoxilin eosin. **Hasil:** Hasil ANOVA menunjukkan perbedaan yang bermakna

($p < 0,05$) antar kelompok perlakuan, mengindikasikan bahwa aplikasi bahan etsa menyebabkan infiltrasi sel inflamasi pada pulpa, baik netrofil, makrofag dan limfosit. Hasil uji Tuckey HSD menunjukkan bahwa asam fosfat 37% menstimulasi infiltrasi sel netrofil, makrofag dan limfosit signifikan ($p < 0,05$) lebih banyak dibanding EDTA 19%. **Simpulan:** Penelitian ini menunjukkan bahwa asam fosfat 37% menyebabkan infiltrasi sel inflamasi yang lebih banyak dibanding EDTA 19%.

Kata kunci: EDTA 19%, asam fosfat 37%, inflamasi, pulpa gigi, tikus Sprague Dawley

Korespondensi (correspondence): Nadie Fatimatu Zahro, Bagian Konservasi Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Jl. Kalimantan 37 Jember 68121, Indonesia. E-mail: nadiefatima@gmail.com

PENDAHULUAN

Karies adalah penyakit infeksi mikroba pada gigi yang menyebabkan terurai dan rusaknya jaringan keras gigi. Destruksi gigi oleh karena karies atau faktor lain, membutuhkan restorasi untuk menggantikan substansi gigi yang hilang sehingga akan mengembalikan bentuk, fungsi dan estetika.¹ Restorasi adhesif menggunakan resin komposit digunakan oleh para dokter gigi karena memiliki estetika yang baik. Desain preparasi kavitas untuk bahan restorasi adhesif tidak memerlukan pembuatan retensi seperti *undercut*, sehingga meminimalkan pembedahan jaringan dan mengurangi terbukanya tubulus dentin.²

Penggunaan asam sebagai dentin kondisioner atau bahan etsa pada sistem restorasi adhesif bertujuan untuk menghilangkan *smear layer* dan mempersiapkan permukaan dentin untuk menerima bahan adhesif. Prosedur etsa menyebabkan demineralisasi komponen anorganik gigi sehingga terbentuk retensi berupa mikroporositas yang akan terisi oleh bahan adhesif.³

Bahan etsa asam fosfat konsentrasi 32-37% paling banyak digunakan pada sistem restorasi adhesif. Bahan ini merupakan asam kuat yang aktif pada pH rendah. Asam fosfat tidak hanya mampu menghilangkan *smear layer*, tetapi juga dapat menyebabkan demineralisasi dan membuka tubulus dentin.⁴ Penelitian terdahulu menunjukkan larutnya sebagian besar hidroksi apatit dan terbukanya kolagen setelah aplikasi asam fosfat pada dentin.³

Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) merupakan agen khelasi yang bekerja pada pH netral dan efektif menghilangkan *smear layer* sebanding dengan bahan etsa lain yang mempunyai pH rendah.⁴ Penggunaan EDTA untuk menghilangkan *smear layer* tidak mempengaruhi kekerasan dentin sehingga tidak menyebabkan dentin menjadi rapuh.⁵ Aplikasi 0,5 M EDTA (setara dengan EDTA konsentrasi 19%) selama 30 detik terbukti meningkatkan kekuatan pelekatan bahan adhesif dengan dentin dibandingkan asam fosfat 37%⁶ dan dapat meminimalkan kebocoran mikro pada tepi pelekatan antara komposit dan dentin.⁷

Kompleks dentin-pulpa bereaksi terhadap semua rangsangan yang mengenai gigi. Rangsangan dapat berupa karies, trauma, maupun semua tindakan dalam prosedur penempatan, mulai dari preparasi, pembersihan dan pengeringan kavitas, serta penempatan dan pemolesannya.⁸

Berbagai zat yang digunakan untuk sterilisasi seperti fenol dan eugenol, pembersih dentin seperti larutan asam, pelapis kavitas serta zat yang terdapat pada bahan tambal, merupakan rangsangan kimiawi yang dapat menyebabkan inflamasi pada pulpa.⁹

Inflamasi merupakan respon perlindungan inang yang bertujuan untuk menghilangkan penyebab jejas serta sel-sel dan jaringan nekrotik, sehingga terjadi proses penyembuhan dan perbaikan jaringan. Pada awal terjadinya inflamasi, netrofil merupakan sel pertahanan tubuh pertama terhadap jejas atau infeksi, kemudian makrofag akan membantu proses eliminasi infeksi dan jaringan yang rusak melalui proses fagositosis. Selanjutnya sel limfosit T berperan pada respon inflamasi kronis.¹⁰ Penelitian ini bertujuan untuk meneliti efek EDTA 19% dan asam fosfat 37% sebagai bahan etsa terhadap jumlah infiltrasi sel inflamasi (netrofil, makrofag dan limfosit) pada pulpa gigi tikus sprague Dowley.

BAHAN DAN METODE

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris, yang dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Seluruh prosedur penelitian ini telah mendapat persetujuan dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. *Ethylene diamine tetraacetic acid* 19% dibuat dengan melarutkan 19 gram serbuk EDTA (berat molekul 372,24 gram/mol) dalam 100 cc akuades. Larutan kemudian disaring dengan kertas saring dan pH disesuaikan hingga 7,4.

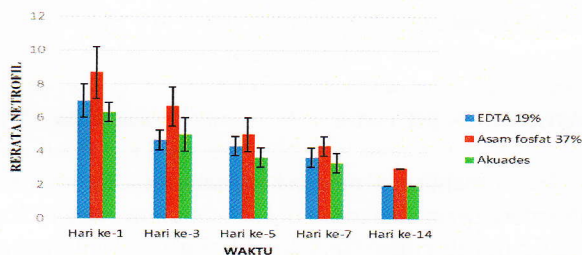
Penelitian ini menggunakan tikus *Sprague Dawley* jantan sebanyak 45 ekor. Tikus dianestesi secara intramuskular dengan ketamine HCl 0,2 ml/200 gram berat badan sebelum dilakukan preparasi kavitas. Gigi molar satu rahang atas dipreparasi pada permukaan oklusal menggunakan *diamond round bur* 0,9 (Edenta, Switzerland) dengan kedalaman 0,5 mm. Tikus dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan secara acak. Pada kelompok I, EDTA 19% diaplikasikan pada kavitas selama 30 detik menggunakan *microbrush*, selanjutnya bilas dengan akuades selama 30 detik.¹¹ Kelompok II, gel asam fosfat 37% (Dentamerica, USA)

diaplikasikan pada kavitas selama 20 detik, selanjutnya bilas dengan akuades selama 30 detik. Kelompok III, kavitas hanya dibilas akuades selama 30 detik. Kavitas dikeringkan dengan *cotton pellet* kemudian ditumpat dengan semen ionomer kaca Fuji IX-GC.

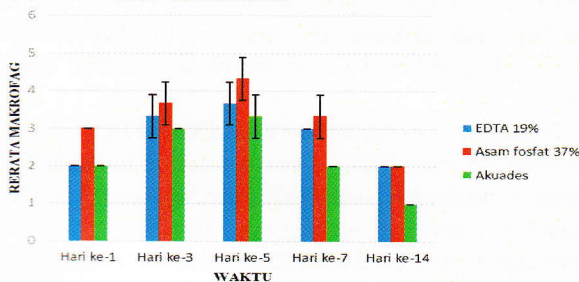
Pada hari ke-1, 3, 5, 7 dan 14 setelah perlakuan ($n=3$), tikus dikorbakan dengan cara dekapitasi. Rahang atas pada bagian gigi molar yang telah diberi perlakuan difiksasi dengan *buffered* formalin 10% selama 24 jam. Spesimen kemudian didekalsifikasi menggunakan EDTA 10% pH 7,4 selama 4 minggu pada suhu 4°C. Setelah lunak, spesimen ditanam dalam parafin, dan dipotong dengan ketebalan 5 μm untuk dilakukan pengecatan hematoksilin eosin (HE). Sel inflamasi yaitu netrofil, makrofag dan limfosit diamati menggunakan mikroskop dengan pembesaran 400x pada area di bawah preparasi kavitas. Jumlah infiltrasi sel inflamasi dihitung dari 3 lapang pandang yang berbeda. Data selanjutnya dianalisis dengan menggunakan ANOVA dan *Tuckey HSD*.

HASIL

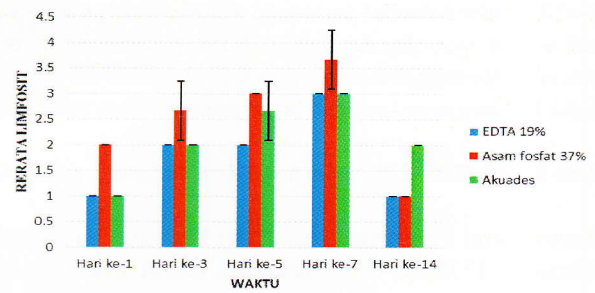
Pada semua kelompok, jumlah netrofil paling banyak ditemukan pada hari ke-1 setelah perlakuan dan jumlahnya semakin berkurang seiring dengan bertambahnya hari pengamatan (Gambar 1).



Gambar 1. Rerata dan simpangan baku jumlah netrofil. Infiltrasi sel netrofil lebih banyak pada kelompok yang diaplikasikan asam fosfat 37% dibandingkan EDTA 19% dan akuades.



Gambar 2. Rerata dan simpangan baku jumlah makrofag. Jumlah infiltrasi sel makrofag lebih sedikit pada kelompok setelah aplikasi EDTA 19% dan akuades dibanding asam fosfat 37%.



Gambar 3. Rerata dan simpangan baku jumlah limfosit. Infiltrasi sel limfosit pada kelompok setelah aplikasi EDTA 19% dan akuades lebih sedikit dibanding asam fosfat 37%.

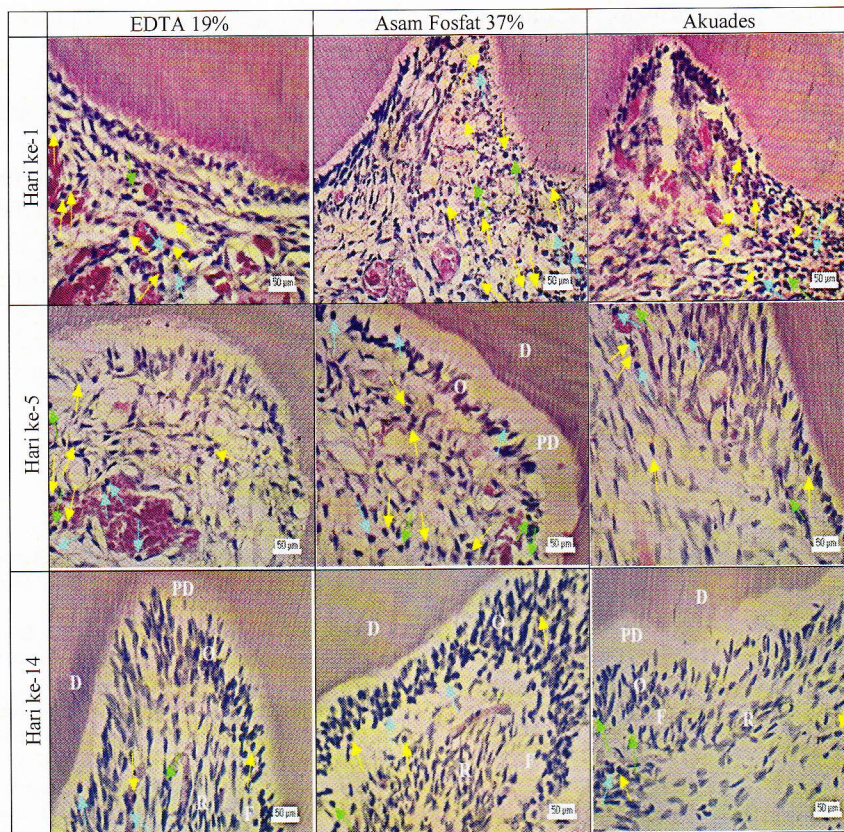
Makrofag sudah dapat diamati pada hari ke-1 setelah perlakuan. Jumlah makrofag semakin meningkat, mencapai puncaknya pada hari ke-5 setelah perlakuan, dan menurun sesudahnya. Rerata jumlah infiltrasi makrofag pada pulpa gigi tikus setelah aplikasi EDTA 19%, asam fosfat 37% dan akuades ditunjukkan pada Gambar 2.

Limfosit juga dapat diamati mulai hari ke-1 setelah perlakuan. Jumlah limfosit semakin meningkat dan paling banyak ditemukan pada hari ke-7 setelah perlakuan. Rerata jumlah infiltrasi limfosit pada pulpa gigi tikus setelah aplikasi EDTA 19%, asam fosfat 37% dan akuades ditunjukkan pada Gambar 3.

Hasil ANOVA menunjukkan bahwa jumlah netrofil, makrofag dan limfosit berbeda bermakna ($p < 0,05$) antar kelompok. Hal ini menunjukkan bahwa aplikasi bahan etsa berpengaruh bermakna terhadap infiltrasi sel inflamasi. Hasil uji *Tuckey HSD* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna jumlah infiltrasi sel netrofil, makrofag dan limfosit antara kelompok dengan aplikasi EDTA 19% maupun akuades bila dibandingkan dengan asam fosfat 37% ($p < 0,05$). Tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok dengan aplikasi EDTA 19% dibandingkan akuades ($p > 0,05$). Hal ini mengindikasikan bahwa asam fosfat 37% menyebabkan infiltrasi sel netrofil, makrofag dan limfosit yang lebih banyak dibandingkan EDTA 19% maupun akuades. Hasil pengamatan histologis pulpa gigi setelah aplikasi EDTA 19%, asam fosfat 37% dan akuades ditunjukkan pada Gambar 4.

PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa aplikasi asam fosfat 37% menyebabkan infiltrasi sel inflamasi lebih banyak dibandingkan EDTA 19%. Hal ini kemungkinan karena pH asam fosfat 37% sangat rendah yaitu 0,26, sedangkan EDTA 19% yang digunakan memiliki pH 7,4. Aplikasi asam fosfat pada kavitas akan menyebabkan demineralisasi yang berlebihan sehingga akan meningkatkan permeabilitas dentin. Akibatnya, terjadi penetrasi lebih banyak dari bahan



Gambar 4. Pada hari ke-1 setelah perlakuan, tampak infiltrasi sel inflamasi terutama netrofil. Infiltrasi sel inflamasi pada kelompok dengan aplikasi EDTA 19% tampak lebih sedikit dibandingkan asam fosfat 37%. Jumlah makrofag paling banyak ditemukan pada hari ke-5 setelah perlakuan. Pada hari ke-14 semua kelompok perlakuan tampak memberikan gambaran pulpa normal. Sel netrofil (↑), makrofag (↑), limfosit (↑). D=dentin, PD=predentin, O=odontoblas, F=zona bebas sel, R=zona kaya sel.

etsa melalui tubulus dentin ke dalam pulpa.¹² Bahan etsa asam dengan pH rendah menyebabkan lingkungan di luar sel bersifat hipertonik, sehingga cairan di dalam sitoplasma akan tertarik ke luar dan sel akan mengkerut. Hal ini dapat memicu kerusakan permanen pada sel odontoblas dan menyebabkan reaksi inflamasi. Pada inflamasi akan terjadi infiltrasi sel-sel inflamasi ke daerah jejas untuk mengeliminasi iritan dan debris seluler.¹³

Pada kondisi normal, terdapat sel makrofag dan sel dendritik sebagai *antigen presenting cell* (APC) pada pulpa yang akan mengenali iritan dan debris seluler.¹⁴ Iritan dan kerusakan sel/jaringan merupakan sinyal bagi makrofag sehingga teraktivasi dan akan mensekresi sitokin antara lain IL-1 dan TNF- α . Interleukin-1 dan TNF- α akan menginduksi sel endotel untuk menghasilkan E-selektin dan *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1). Kedua molekul adhesi tersebut akan berikatan dengan ligan pada netrofil sehingga menyebabkan netrofil teraktivasi dan melekat pada dinding endotelium. Langkah berikutnya dalam proses ini adalah migrasi netrofil melalui endotelium menuju lokasi jejas.¹⁰

Pada hari ke-1 setelah perlakuan, pada semua kelompok terjadi infiltrasi sel inflamasi terutama netrofil, dan

jumlahnya semakin menurun dengan bertambahnya hari pengamatan. Netrofil adalah sel fagosit yang merupakan pertahanan tubuh pertama terhadap infeksi atau benda asing, berperan pada respon inflamasi akut dan hanya berumur pendek (24-36 jam). Netrofil akan mati setelah menghancurkan iritan serta jaringan yang rusak melalui proses fagositosis.¹⁴

Penetrasi bahan etsa merupakan iritan kimia bagi sel-sel pada pulpa, dan sinyal bagi makrofag sehingga teraktivasi dan mensekresi sitokin antara lain IL-1 dan TNF- α . *Tumor necrosis factor- α* dapat menginduksi sel endotel dan sel dendritik untuk menghasilkan *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1) yang akan menyebabkan monosit keluar dari pembuluh darah menuju ke daerah inflamasi. Di jaringan, monosit akan berdiferensiasi menjadi makrofag. Infiltrasi makrofag paling banyak ditemukan pada hari ke-5 setelah perlakuan. Hal ini disebabkan setelah monosit bermigrasi ke jaringan, dibutuhkan waktu 48-72 jam untuk berdiferensiasi menjadi makrofag pada area jejas.¹⁴ Makrofag berperan penting dalam sistem imun untuk mengeliminasi antigen dengan aktivitas fagositosis.¹⁵

Sel dendritik merupakan APC utama yang terlibat pada respon imun pulpa. Sel dendritik akan bergerak memasuki

jaringan limfoid setelah menangkap dan memproses antigen untuk selanjutnya dipresentasikan pada limfosit T melalui molekul *major histocompatibility complex* (MHC) klas II. Hal ini merupakan sinyal bagi aktivasi limfosit untuk berproliferasi dan berdiferensiasi.^{16,17} Molekul MHC klas II juga diekspresikan pada permukaan sel makrofag yang akan mempresentasikan antigen pada limfosit T. Makrofag akan mensekresi IL-1 dan IL-12 setelah memproses antigen. Interleukin-1 akan memberi sinyal kepada limfosit T *helper* untuk berikatan dengan molekul MHC klas II pada makrofag dan IL-12 berperan pada aktivasi limfosit.¹⁸ Infiltrasi sel limfosit paling tinggi ditemukan pada hari ke-7 dan menurun pada hari ke-14 setelah perlakuan. Waktu yang dibutuhkan oleh limfosit untuk produksi dan diferensiasi menjadi sel efektor sekitar 3 sampai 5 hari, dan selanjutnya limfosit akan keluar dari vaskularisasi menuju ke jaringan.¹⁴

Mekanisme lain yang dapat menjelaskan terjadinya infiltrasi sel inflamasi setelah aplikasi bahan etsa, yaitu bahwa penggunaan asam fosfat dan EDTA dapat menyebabkan terlepasnya TGF- β 1 yang terdapat pada dentin. Selama dentinogenesis, odontoblas mensekresi *growth factor* tersebut kemudian termineralisasi dalam matriks dentin. Demineralisasi jaringan gigi akibat penggunaan bahan etsa dapat menyebabkan terlepasnya TGF- β 1.¹⁴ Setelah dilepaskan, TGF- β 1 akan berpenetrasi melalui tubulus dentinalis menuju pulpa, berperan pada respon pulpa terhadap jejas.¹⁹ Hasil penelitian *in vitro* menunjukkan bahwa TGF- β 1 menyebabkan peningkatan ekspresi IL-1 dan IL-8 pada kultur sel odontoblas dan jaringan pulpa.²⁰ Interleukin-8 merupakan kemoatraktan dan berperan pada aktivasi netrofil. *Transforming growth factor*- β 1 juga mampu menstimulasi ekspresi IL-1 dan TNF- α oleh makrofag yang berperan penting pada respon inflamasi pulpa.²¹

Hasil penelitian ini juga menunjukkan terjadinya infiltrasi sel inflamasi pada tikus yang diaplikasi akuades. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh preparasi kavitas yang dilakukan. Sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Feng Mei dkk. bahwa gesekan dan panas yang dihasilkan akibat penggunaan *rotary instrument* menyebabkan peningkatan ekspresi *nitric oxide* (NO) pada sel odontoblas.²² *Nitric oxide* merupakan radikal bebas yang dihasilkan dari enzim *nitric oxide synthase* (NOS). Radikal bebas tersebut berperan pada proses inflamasi dan kerusakan jaringan serta dapat menyebabkan vasodilatasi pembuluh darah sehingga sel inflamasi bermigrasi dari pembuluh darah menuju ke jaringan.¹⁵

Pada hari ke-14 setelah perlakuan, jumlah infiltrasi sel inflamasi semakin sedikit dibandingkan hari-hari sebelumnya dan memberikan gambaran pulpa normal. Hal ini mengindikasikan bahwa sel imun berhasil menghilangkan iritan dan debris seluler sehingga inflamasi tidak berlanjut. Selain itu kompleks dentin pulpa memiliki mekanisme perlindungan diri dalam membatasi penetrasi bahan-bahan yang membahayakan pulpa. Ion kalsium, fosfat dan cairan yang terdapat dalam tubulus dentin

mempunyai kapasitas buffer untuk menetralkan asam dari bahan etsa.¹⁴

Penggunaan glass ionomer sebagai bahan tumpatan dalam penelitian ini bertujuan untuk meminimalkan iritasi pada pulpa bila dibandingkan dengan resin komposit.²³ Pada penelitian ini tidak digunakan bahan tumpatan sementara oleh karena daya tahan yang rendah dalam rongga mulut. Apabila tumpatan sementara lepas akan terjadi deposit debris dan sisa makanan yang dapat menyebabkan inflamasi pulpa sehingga mempengaruhi hasil penelitian.²⁴ Penelitian menunjukkan bahwa asam fosfat 37% menyebabkan infiltrasi sel netrofil, makrofag dan limfosit yang lebih banyak dibanding EDTA 19%.

DAFTAR PUSTAKA

1. Roberson TM, Harald OH, Edward JS. Sturdevant's art and science of operative dentistry. 5th ed. St. Louis: Mosby Elsevier; 2006. p. 68-9, 283-5.
2. Walmsley AD, Walsh TF, Lumley PJ, Burke FJT, Shortall AC, Hayes-Hall R, Pretty IA. Restorative dentistry. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier; 2007. p. 76-8.
3. Summit JB, Robbins JW, Hilton T, Schwartz R. Fundamentals of operative dentistry. A contemporary approach. 3rd ed. Illinois: Quintessence Publishing Co., Inc.; 2006. p. 188-92.
4. Cederlund A, Jonsson B, Blomlöf J. Shear strength after ethylenediaminetetraacetic acid conditioning of dentin. Acta Odontol Scand 2001; 59(6): 418-22.
5. Swift EJ Jr, Perdigão J, Wilder AD Jr, Heymann HO, Sturdevant JR, Bayne SC. Clinical evaluation of two one-bottle dentin adhesives at three years. J Am Dent Ass 2001; 132(8): 11-7.
6. Jacques P, Hebling J. Effect of dentin conditioners on microtensile bond strength of a conventional and a self-etching primer adhesive system. Dent Mater 2005; 21: 103-9.
7. Shafiei F, Memarpour M. Effect of EDTA conditioning on mikroleakage of four adhesive system in composite restorations. J Dent 2008; 5(3): 150-5.
8. Sundoro EH. Serba-serbi ilmu konservasi gigi. Jakarta: Universitas Indonesia Press; 2005. h. 115-29.
9. Walton R, Torabinejad M. 2001. Principles and practice of endodontics. Sumawinata N, editor. Prinsip dan praktek ilmu endodonsi. Edisi 3. Jakarta: EGC; 2008. h. 10-20, 30-5.
10. Kumar V, Abbas A, Fausto N, Robbins SL, Cotran R. Pathologic basis of disease. 8th ed. Philadelphia: Saunders; 2006. p. 48-85.
11. Stape TH, Menezes MS, Barreto BC, Aguiar FH, Martins LR, Quagliatto PS. Influence of matrix metalloproteinase synthetic inhibitors on dentin microtensile bond strength of resin cements. Op Dent 2012; 37(4): 386-96.
12. Amaral KF, Rogero MM, Fock RA, Borelli P, Gavini G. Cytotoxicity analysis of EDTA and citric acid applied on murine resident macrophages culture. Int Endod J 2007; 40(5): 338-43.
13. Nemeth L, Erman A, Stiblar-Martincic D. Early odontoblastic layer response to cavity preparation and acid etching in rats. Folia Biol (Krakow) 2006; 54(1-2): 23-30.
14. Hargreaves MK, Goodis HE. Seltzer and bender's dental pulp. Carlos Stream: Quintessence Publishing Co., Inc; 2002. p. 13, 42, 54, 65, 69, 95-6, 137-9.
15. Roitt IM. 1996. Immunologi-essential immunology. Edisi 8. Harahap A, dkk, editor. Jakarta: Widya Medika; 2002. h. 233.
16. Lo Hahn C, Liewehr FR. Innate immune responses of the dental pulp to caries. J Endod 2007; 33(a): 643-51.
17. Lo Hahn C, Liewehr FR. Update on the adaptive immune responses of the dental pulp. J Endod 2007; 33(b):773-81.
18. Raven, Johnson, Mason, Singer. Biology. 9th ed. New York: Mosby Elsevier; 2007. p. 1156-8.

19. Murray PE, Windsor LJ, Smyth TW, Hafez AA, Cox CF. Analysis of pulpal reactions to restorative procedures, materials, pulp capping, and future therapies. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13(6): 509-20.
20. Pääkkönen V, Vuoristo J, Salo T, Tjäderhane L. Effects of TGF- β 1 on interleukin profile of human dental pulp and odontoblasts. *Cytokine* 2007; 40(1): 44-51.
21. Cooper PR, Takahashi Y, Graham LW, Simon S, Imazato S, Smith AJ. Inflammation-regeneration interplay in the dentin-pulp complex. *J Dent* 2010; 38(9): 687-97.
22. Feng Mei Y, Yamaza T, Atsuta I, Danjo A, Yamashita Y, Kido MA, Goto M, Akamine A, Tanaka T. Sequential expression of endothelial nitric oxide synthase, inducible nitric oxide synthase, and nitrotyrosine in odontoblasts and pulp cells during dentin repair after tooth preparation in rat molars. *Cell Tissue Res* 2007; 328: 117-27.
23. Rendjova V, Gjorgoski I, Ristoski T, Apostolska S. In vivo study of pulp reaction to glass ionomer cements and dentin adhesives. *Prilozi* 2012 ; 33(1): 265-77.
24. Schmalz G, Arenholt-Bindslev D. *Biocompatibility of dental materials*. Berlin: Springer; 2009. p. 151.

Research Report

Efek ekstrak daun singkong (*Manihot utilissima*) terhadap ekspresi COX-2 pada monosit yang dipapar LPS *E.coli*

(The effect of *Manihot utilissima* extracts on COX-2 expression of monocytes induced by LPS *E. coli*)

Zahara Meilawaty

Bagian Biomedik

Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Jember - Indonesia

ABSTRACT

Background: Periodontal disease is a common and widespread disease in the community. Gram negative bacteria have a role in periodontitis. These bacteria secrete a variety of products such as endotoxin lipopolysaccharide (LPS), which causes the occurrence of inflammation or infection. The body defense responses are neutrophils and mononuclear cells (monocytes and macrophages). In response to defense mechanism, the body will be expressed enzyme cyclooxygenase (COX) which functions convert arachidonic acid to prostaglandins. Cassava leaf cells known to play a role in reducing inflammation, but the mechanism for inhibiting COX-2, is not known. **Purpose:** The study was aimed to determine the effect of cassava leaf extract (*Manihot utilissima*) on expression of enzyme COX-2 in monocytes which were exposed by LPS *E. coli*. **Methods:** This study was in vitro experimental studies with the design of posttest only control group design. The sample was the cassava leaves extract (*Manihot utilissima*) at concentration of 12.5 % and 25 %. The expression of COX-2 was determined by immunocytochemistry method. Isolated monocytes were incubated in cassava leaf extract, and then exposed to LPS, after washing immunostaining procedure was performed using a monoclonal antibody (MAB) anti-human COX-2. The research data was the number of monocytes that express COX-2. **Results:** Expression of COX-2 in the group cassava leaf extract was higher than the group that induced by LPS *E. coli* only. **Conclusion:** Cassava leaf extract did not inhibit the expression of COX-2 in monocytes which were exposed by LPS *E. coli*.

Key words: LPS, monocytes, COX-2, cassava leaves, *Manihot utilissima*

ABSTRAK

Latar belakang: Penyakit periodontal merupakan penyakit umum dan tersebar luas di masyarakat. Bakteri yang banyak berperan pada periodontitis adalah Gram negatif. Bakteri ini mengeluarkan berbagai produk antara lain endotoksin lipopolisakarida (LPS) yang menyebabkan inflamasi atau infeksi. Respon pertahanan tubuh pertama adalah netrofil dan sel mononuklear (monosit dan makrofag). Pada respon pertahanan tubuh akan diekspresikan enzim siklooksigenase (COX) yang berfungsi mengubah asam arakidonat menjadi prostaglandin. Daun singkong diketahui berperan dalam menurunkan sel radang, tetapi mekanisme dalam menghambat COX-2, belum diketahui. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk meneliti ekstrak daun singkong terhadap ekspresi enzim COX-2 pada monosit yang dipapar LPS *E. coli*. **Metode:** Penelitian ini merupakan studi eksperimental in vitro dengan rancangan The posttest only control group design. Sampel adalah ekstrak daun singkong (*Manihot utilissima*) dengan dosis 12,5% dan 25%. Ekspresi COX-2 diteliti dengan metode imunositokimia. Isolat monosit diinkubasi ekstrak daun singkong, kemudian dipapar LPS, setelah pencucian kemudian dilakukan prosedur imunostaining menggunakan antibodi monoklonal (Mab) anti human COX-2. Data penelitian adalah jumlah monosit yang

mengekspresikan COX-2. **Hasil:** Ekspresi COX-2 pada kelompok ekstrak daun singkong lebih tinggi dibandingkan kelompok yang hanya diinduksi LPS *E. coli*. **Simpulan:** Ekstrak daun singkong tidak menghambat ekspresi COX-2 pada monosit yang dipapar LPS *E. coli*.

Kata kunci: LPS, monosit, COX-2, daun singkong, *Manihot utilissima*

Koresponden (*correspondence*): Zahara Meilawaty, Bagian Biomedik, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Jl. Kalimantan No. 37 Jember 68121, Indonesia. E-mail: zhr_mel@yahoo.com

PENDAHULUAN

Penyakit periodontal merupakan penyakit umum dan tersebar luas di masyarakat, bisa menyerang anak-anak, orang dewasa maupun orang tua. Salah satu bentuk penyakit periodontal adalah peradangan yang menyerang jaringan periodontal, dapat hanya mengenai gingiva yang disebut dengan gingivitis atau mengenai jaringan periodontal yang lebih luas yaitu ligamen periodontal, sementum dan tulang alveolar.¹ Bakteri yang paling banyak berperan terhadap timbulnya periodontitis adalah bakteri Gram negatif, diantaranya yaitu *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, dan *Bacteriodes forsythus*. Bakteri gram negatif anaerob ini, mengeluarkan berbagai produk antara lain endotoksin biologi aktif atau lipopolisakarida (LPS) yang menyebabkan aktivitas biologis sehingga terjadinya keradangan.^{2,3}

Lipopolisakarida adalah salah satu penyebab kelainan periodontal. Bahan ini merupakan struktur utama dinding sel bakteri gram negatif anaerob yang berfungsi untuk integritas struktur bakteri dan melindungi bakteri dari sistem pertahanan imun *hospes*.⁴ Lipopolisakarida mampu menimbulkan stimulasi pada berbagai sel imun, baik *in vitro* maupun *in vivo*, substansi ini mempunyai relevansi klinis yang penting karena berperan langsung dalam patogenesis infeksi bakteri gram negatif. Infeksi yang diakibatkan aktivitas bakteri dapat menimbulkan respon pertahanan didalam tubuh berupa respon imun spesifik maupun non spesifik. Respon imun yang berperan sebagai garis pertahanan pertama terhadap invasi bakteri adalah netrofil dan sel mononuklear (monosit dan makrofag).⁵

Sel darah yang berfungsi sebagai sistem kekebalan bagi tubuh adalah leukosit. Leukosit bergerak bebas dalam darah sebagai organisme selular bebas pada sistem kekebalan tubuh. Leukosit terdiri dari fagosit makrofag, neutrofil, sel dendritik, sel *mast*, eosinofil, basofil dan sel pembunuh alami yang merupakan mediator penting pada sistem kekebalan adaptif. Monosit merupakan jenis leukosit yang membentuk makrofag. Peran monosit ketika terjadi infeksi adalah meninggalkan aliran darah dan bergerak ke dalam jaringan untuk mengidentifikasi dan membunuh patogen dengan menyerang patogen yang lebih besar melalui kontak langsung kemudian membunuh mikroorganisme. Monosit bertindak sebagai fagosit yang berperan dalam merespon adanya bakteri patogen, sehingga viabilitas monosit menjadi faktor penting pada sistem kekebalan tubuh.⁶

Enzim siklooksigenase (COX) merupakan target utama obat antiinflamasi nonsteroid, COX merupakan enzim yang berperan dalam merubah asam arakidonat menjadi prostaglandin yang bertanggungjawab terhadap inflamasi, rasa sakit, proliferasi sel dan respon biologis lainnya. COX-2 dapat diinduksi oleh sitokin, *growth factor*, dan stimulus lainnya berdasarkan respon inflamasi. COX-2 biasanya diekspresikan bila terjadi inflamasi atau pada keadaan patologis lainnya, COX-2 juga diekspresikan di saraf otak dan ginjal. Secara farmakologi, penghambatan COX dapat digunakan sebagai *relief of pain* dari gejala inflamasi. Semua obat AINS, salah satunya ibuprofen bekerja sebagai antiinflamasi dengan menghambat sintesis prostaglandin dengan cara menghambat enzim COX yang mengkatalis reaksi asam arakidonat menjadi senyawa endoperoxidase. Obat ini diindikasikan untuk luka pada jaringan lunak, fraktur, ekstraksi gigi, vasktomi, pasca melahirkan, pasca operasi; dapat menekan terjadinya inflamasi. Tetapi, penggunaan obat AINS dapat menimbulkan efek samping, diantaranya dapat menyebabkan terjadinya perdarahan gastrointestinal, memperlama waktu perdarahan, serta dapat merusak fungsi ginjal.^{7,8}

Selama ini, masyarakat hanya mengenal daun singkong sebagai sayuran dan bahan makanan. Masyarakat kurang mengetahui bahwa daun singkong memiliki banyak manfaat di dunia kesehatan karena memiliki kandungan vitamin C yang cukup tinggi (sekitar 27,5%), senyawa organik flavonoid, triterpenoid, tanin serta saponin. Konsumsi vitamin C sangat bermanfaat dalam proses penyembuhan luka karena dapat mempengaruhi tingkat keparahan respon inflamasi dan kualitas penyembuhan.^{6,9} Penelitian lain juga telah membuktikan bahwa vitamin C dapat menurunkan jumlah neutrofil pada proses penyembuhan luka tikus *Wistar jantan*.¹⁰

Flavonoid dan saponin sejak lama diketahui memiliki aktivitas antimikroba dan antivirus. Demikian juga triterpenoid yang sering ditemukan pada banyak tanaman obat dan diketahui memiliki aktivitas antivirus dan antibakteri, serta dapat mengobati kerusakan pada kulit.¹¹ Flavonoid yang diisolasi dari daun singkong sebesar 100-200 µg/ml dapat mengurangi degranulasi sel *mast* yang diinduksi senyawa 48,80 albumin pada sebuah penelitian *in vitro*. Flavonoid diyakini dapat menghambat prostaglandin.¹² Ekstrak daun singkong juga diketahui berpotensi dalam menurunkan jumlah neutrofil pada proses penyembuhan luka tikus *Wistar jantan*.¹³ Tetapi mekanisme kerja ekstrak daun singkong itu sendiri terhadap ekspresi

enzim COX-2, yaitu enzim yang berperan dalam merubah asam arakidonat menjadi prostaglandin pada inflamasi sampai saat ini belum diketahui. Berdasarkan uraian di atas, timbul suatu permasalahan bagaimana potensi ekstrak daun singkong terhadap ekspresi COX-2 pada model inflamasi. Tujuan penelitian ini adalah meneliti ekstrak daun singkong (*Manihot utilissima*) terhadap ekspresi enzim COX-2 pada monosit yang dipapar LPS *E. coli*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan studi eksperimental *in vitro* dengan rancangan *the posttest only control group design*. Variabel bebas adalah ekstrak daun singkong (*Manihot utilissima*) dengan dosis 12,5% dan 25%. Variabel tergantung adalah ekspresi COX-2 pada monosit. Variabel terkontrol adalah jenis dan konsentrasi monosit dan LPS *E. coli* serta prosedur penelitian.

Daun singkong (*Manihot utilissima*) yang digunakan didapatkan dari daerah Tempurejo, Kecamatan Tempurejo Jember. Daun yang diambil adalah daun yang masih hijau, utuh dan berada di bagian tengah pohon untuk menghindari kandungan sianida yang berlebihan pada daun yang terlalu muda. Daun singkong terlebih dahulu diidentifikasi di Herbarium Jemberense, Laboratorium Botani dan Kultur Jaringan, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA Universitas Jember. Untuk pembuatan ekstrak, daun singkong dicuci bersih, dipotong kecil-kecil dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan selama 24 jam di dalam ruangan dengan suhu ruang, yang tidak terkena sinar matahari secara langsung, kemudian dioven selama 3 jam dalam suhu 45 °C. Setelah itu, daun yang kering tersebut digiling menggunakan blender, diayak dengan ayakan 50 *maze* sehingga didapatkan serbuk halus sebanyak total 400 gram serbuk daun. Setelah itu, serbuk daun dimaserasi dengan etanol 95% selama 2 hari dan dilakukan pengadukan setiap hari. Selanjutnya, larutan tersebut dipekatkan dengan rotavapor (*rotary evaporator*) dengan suhu 50°C dan putaran 90 rpm menjadi ekstrak daun singkong dengan konsentrasi 100%. Penyimpanan ekstrak 100% ini diletakkan dalam kulkas.

Isolasi monosit dilakukan dengan metode *ficoll hypaque centrifugation*.¹⁴ Sebanyak 12 cc darah (*heparinized whole blood*) dibagi menjadi dua, sentrifuse 600 rpm selama 10 menit pada suhu ruang. Serum yang mengandung platelet dipisahkan, sisa darah diencerkan dengan HBSS sehingga menjadi 9 cc. Setelah itu menyiapkan dua tabung falcon, masing-masing diisi dengan 3 cc *ficol*. Selanjutnya melapiskan darah (secara berhati-hati) di atas lapisan *ficol* dengan mikropipet. Darah yang telah dilapiskan disentrifuse selama 30 menit, 1400 rpm, sehingga terbentuk 4 lapisan dari atas ke bawah adalah (plasma, mononuklear, *ficol* dan polinuklear+RBC). Lapisan mononuklear (*interface plasma-ficol*) yang mengandung limfosit dan monosit dipisahkan dan dimasukkan dalam tabung falcon. Kemudian dicuci dengan HBSS dan disentrifuse

600 rpm, 10 menit, sebanyak 2 kali untuk menghilangkan kontaminan platelet. Hasil pencucian diresuspensi dalam HBSS sebanyak 2500 µl, kemudian dilakukan pipeting. Suspensi sel mononuklear kemudian dilapiskan pada *plastic microplate (24 well)* yang didasarnya telah diberi *cover slip* sebanyak 100 µl tiap *well*, kemudian diinkubasi selama 1 jam, 37 °C. Medium inkubasi yang mengandung limfosit dibuang, sisanya yang mengandung monosit dicuci 3 x dengan HBSS. Hasil pencucian pelet monosit diresuspensi dengan RPMI sebanyak 1000 µl tiap *well*. Kemudian tambahkan penstrep (5 µl dan fungison 5 µl) pada tiap *well*, pipeting medium secara hati-hati, monosit siap untuk diinkubasi dengan daun singkong.

Suspensi isolat monosit, masing-masing dibagi menjadi 4 kelompok uji (masing-masing terdiri dari 3 *well*) yaitu: (1) K= kontrol, tidak diinkubasi EDS, tetapi ditambahkan RPMI 1000 µl; (2) P1= tidak diinkubasi EDS, tetapi ditambahkan RPMI 1000 µl; (3) P2= diinkubasi EDS 12,5% (sebanyak 200 µl); (4) P3= diinkubasi EDS 25% (sebanyak 200 µl). Inkubasi dilakukan dalam inkubator *shaker* dengan 5% CO₂, 37 °C selama 18 jam. Setelah 18 jam, isolat monosit pada kelompok 2, 3 dan 4 kemudian dipapar dengan LPS *E. coli* sebanyak 5 µl tiap *well* kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C dan 5% CO₂.

Setelah inkubasi pemaparan LPS selama 1 jam, dilakukan pencucian. Kemudian dilakukan prosedur imunostaning menggunakan antibodi monoklonal (Mab) *anti human COX-2*. Ekspresi COX-2 dianalisis dengan metode imunositokimia. Ekspresi COX-2 ditunjukkan oleh monosit yang membran selnya berwarna coklat, pengamatan dilakukan di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali. Data penelitian adalah jumlah rata-rata monosit yang mengekspresikan COX-2 dihitung per 100 sel.

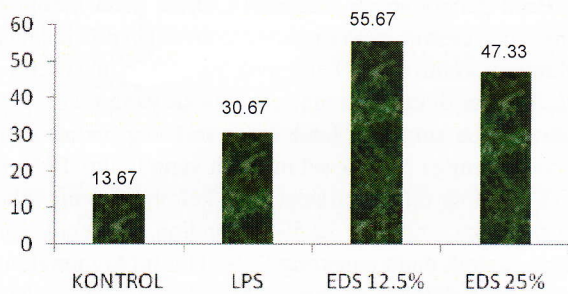
Data penelitian diuji normalitasnya menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan homogenitasnya menggunakan uji *Levene*. Selanjutnya dilakukan uji parametrik menggunakan uji *one way ANOVA* untuk mengetahui perbedaan ekspresi COX-2 dan dilanjutkan dengan uji LSD untuk membandingkan ekspresi COX-2 monosit antar kelompok percobaan.

HASIL

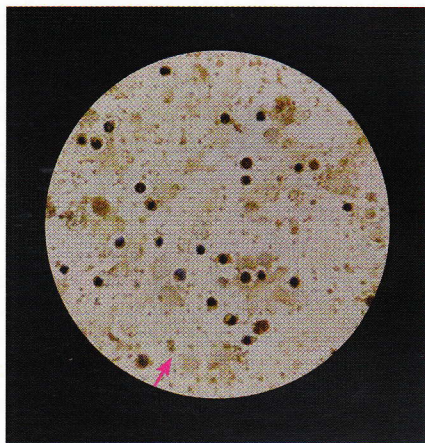
Ekspresi COX-2 dilihat menggunakan mikroskop dengan pembesaran 400 kali. Data penelitian adalah jumlah rerata monosit yang mengekspresikan COX-2 dihitung per 100 sel. Rerata dan simpangan baku ekspresi COX-2 pada masing-masing kelompok dapat dilihat pada Gambar 1.

Rerata ekspresi COX-2 tertinggi terdapat pada kelompok ekstrak daun singkong 12,5% sebesar 55,67, kemudian kelompok ekstrak daun singkong 25% sebesar 47,33; setelah itu kelompok yang hanya diberi LPS *E. coli* sebesar 30,67; dan ekspresi COX-2 terendah terdapat pada kelompok kontrol sebesar 13,67 (Gambar 1).

Data yang didapat diuji normalitasnya terlebih dahulu menggunakan uji *Shapiro-Wilk* sebelum dianalisis menggunakan uji parametrik. Hasil uji normalitas



Gambar 1. Grafik batang rerata ekspresi COX-2 berdasarkan kelompok perlakuan.



Gambar 2 Gambaran mikroskopis ekspresi COX-2, pembesaran 1000x. Tanda panah warna hitam menunjukkan monosit yang mengekspresikan COX-2, tanda panah merah menunjukkan monosit yang tidak mengekspresikan COX-2. Sel yang mengekspresikan COX-2 terlihat berwarna coklat, dan yang tidak mengekspresikan COX-2 berwarna biru. Counterstain menggunakan Mayer's hematoxylin.

menunjukkan bahwa data yang diuji mempunyai nilai sig 0,344 ($p > 0,05$), ini berarti data terdistribusi secara normal sehingga memenuhi syarat untuk dilakukan uji parametrik. Oleh karena itu, selanjutnya diuji dengan menggunakan uji parametrik *One-way Anova* yang rangkumannya dapat dilihat pada Tabel 1.

Ekspresi COX-2 pada masing-masing perlakuan mempunyai perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) dapat dilihat pada Tabel 1, selanjutnya untuk mengetahui perbedaan ekspresi COX-2 antara masing-masing kelompok dilakukan uji *LSD*.

Terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) antara kelompok kontrol dengan kelompok ekstrak daun singkong 12,5%; kelompok kontrol dengan kelompok ekstrak daun singkong 25%; kelompok LPS *E. coli* dengan kelompok ekstrak daun singkong 12,5% (Tabel 2). Gambaran mikroskopis ekspresi COX-2 dengan pembesaran 1000x dapat dilihat pada Gambar 2.

Tabel 1. Rangkuman hasil uji *one way ANOVA* potensi ekstrak daun singkong (*Manihot utilissima*) dalam memodulasi COX-2 pada monosit yang dipapar LPS *E. coli*

	F	Sig.
Between group	12,255	0,002

Tabel 2. Rangkuman hasil uji *LSD* potensi ekstrak daun singkong (*Manihot utilissima*) dalam memodulasi COX-2 pada monosit yang dipapar LPS *E. coli*

	Kontrol	LPS	EDS 12,5%	EDS 25%
Kontrol		.054	.001*	.002*
LPS			.010*	.058
EDS 12,5%				.300
EDS 25%				

PEMBAHASAN

Penelitian ini adalah penelitian *in vitro* yang menggunakan sel monosit. Hasil penelitian yang terlihat pada Gambar 1 menunjukkan bahwa rerata ekspresi COX-2 pada kelompok yang diinduksi LPS *E. coli* dan ekstrak daun singkong menunjukkan kecenderungan yang lebih banyak dibandingkan kelompok yang hanya diberi LPS *E. coli* ataupun kelompok kontrol. Hal ini juga menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun singkong 12,5% dan 25% mempunyai pengaruh yang bermakna terhadap peningkatan ekspresi COX-2, bahwa ekstrak daun singkong 12,5% dan 25% tidak menghambat ekspresi COX-2 pada sel monosit yang diinduksi LPS *E. coli*. Hasil ini tidak sesuai dengan hipotesis, bahwa pemberian ekstrak daun singkong dapat menghambat ekspresi COX-2 pada sel monosit yang diinduksi LPS *E. coli*.

Pada penelitian ini, didapatkan ekspresi COX-2 pada kelompok kontrol sangat sedikit atau paling rendah. Hal ini disebabkan pada kelompok kontrol tidak diinduksi LPS *E. coli* sehingga seharusnya sel monosit tidak mengekspresikan COX-2. COX-2 secara normal ditemukan dalam jumlah yang tidak signifikan tetapi dapat diinduksi oleh sitokin atau *growth factor*, tetapi akan lebih banyak diekspresikan pada keadaan inflamasi atau keadaan patologis lainnya.⁸

Lipopolisakarida bersifat endotoksik karena LPS mengikat reseptor CD14/ *Toll-like receptor-4* (TLR4) yang mengakibatkan sekresi sitokin proinflamasi dari beberapa tipe sel. CD14 merupakan reseptor permukaan sel pada makrofag dan monosit untuk karbohidrat. Makrofag yang berikatan dengan bakteri oleh karena adanya CD14, akan mensekresi sitokin [interleukin-1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL16, *tumor necrosis factor- α* (TNF- α)] dan *mediator lipid inflammation* yaitu prostaglandin (PGE₂).⁴ Keadaan inflamasi membuat ekspresi COX akan meningkat, baik

COX 1 maupun COX-2. COX 1 merupakan enzim yang ditemukan di banyak sel dan jaringan normal, berperan pada fungsi fisiologis seperti sekresi mukus untuk melindungi mukosa pencernaan, hemostasis, penyembuhan luka, ovulasi, dan untuk memelihara fungsi ginjal. COX-2 baru akan terbentuk setelah diinduksi oleh sitokin dan mediator inflamasi lainnya di daerah inflamasi atau pada keadaan patologis lainnya.^{8,15,16}

Pada kelompok yang diinduksi LPS *E. coli* seharusnya paling banyak mengekspresikan COX-2. LPS *E. coli* bisa menginduksi inflamasi atau peradangan, kondisi inflamasi ini bisa menginduksikan ekspresi COX-2. Tetapi pada hasil penelitian ini, ekspresi COX-2 hanya sedikit, secara statistik tidak berbeda bermakna dengan kelompok kontrol. Hal ini diduga karena LPS *E. coli* akan menstimulasi monosit untuk menghasilkan mediator inflamasi, apabila mediator inflamasi tersebut dikeluarkan dalam jumlah berlebihan akan menyebabkan kerusakan jaringan dan akhirnya dapat membuat monosit lisis.¹⁷ Hasil ini diperkuat dengan hasil uji viabilitas yang sudah dilakukan penulis sebelumnya yang menunjukkan nilai viabilitas 24,56 %; berarti hanya ada sekitar 25 sel monosit yang hidup dari 100 sel monosit yang diamati pada kelompok yang diberi LPS. Sel yang lisis atau mati tidak dapat merespon antibodi COX-2 dan tidak dapat mengekspresikan COX-2, sehingga pada penelitian ini hasil ekspresi COX-2 pada kelompok yang hanya diinduksi LPS *E. coli* lebih rendah daripada kelompok yang diberi ekstrak daun singkong.

Potensi flavonoid dalam menekan inflamasi adalah dengan jalan memblokir siklus siklooksigenase (COX) dan lipoksigenase, sehingga sel radang yang bermigrasi terbatas dan tanda-tanda klinis peradangan berkurang. Flavonoid juga dapat bertindak melindungi lipid membran terhadap agen yang merusak.¹¹ Diduga aksi ini yang menjaga membran sel tidak mudah dirusak bakteri dan tetap berfungsi dengan baik.

Saponin selama ini diketahui dapat bekerja sebagai antibakteri. Ketika berinteraksi dengan sel bakteri, saponin dapat meningkatkan permeabilitas membran sel bakteri sehingga terjadi hemolisis sel bakteri. Saponin juga memiliki efek antiinflamasi yang hampir sama dengan flavonoid, memblokir jalur prostaglandin sebagai penghambat aktifasinya, namun tidak berpengaruh terhadap sintesisnya. Dengan dihambatnya pelepasan prostaglandin maka keluarnya sel radang dapat ditekan.¹¹ Adanya saponin dalam ekstrak daun singkong diduga dapat mendukung proses penyembuhan luka lebih cepat dengan meminimalisir kontaminasi bakteri sehingga epitel dapat bermitosis dan berproliferasi dengan baik.

Tannin dan triterpenoid diketahui memiliki aktivitas antioksidan pada beberapa tanaman obat.¹² Antioksidan berperan menangkap radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan membran sel. Cedera pada membran sel tersebut kemudian mengaktifkan histamin yang nantinya menjadi mediator sel radang.¹⁸ Antioksidan di dalam tannin dan triterpenoid diduga dapat mengurangi adanya radikal bebas yang dapat merusak membran sel dan mengurangi pelepasan mediator sel radang.

Pada penelitian ini, ekspresi COX-2 pada kelompok yang diberi ekstrak daun singkong lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol dan kelompok yang diinduksi LPS *E. coli*. Hal ini diduga karena sel monosit yang telah diberi ekstrak daun singkong lebih tahan terhadap induksi LPS *E. coli* sehingga banyak sel monosit yang hidup. Ekspresi COX-2 paling tinggi terdapat pada kelompok yang diberi ekstrak daun singkong 12,5% dibanding kelompok yang diberi ekstrak daun singkong 25%. Hal ini kemungkinan karena ekstrak daun singkong 25% mempunyai toksisitas yang lebih tinggi. Konsentrasi obat atau bahan alami yang besar dapat menyebabkan toksisitas yang besar pula, sehingga dapat melisis sel monosit. Semakin tinggi dosis saponin pada *Colocynth* (*Citrullus colocynthis*) yang diberikan pada tikus, maka kematian tikus semakin tinggi, dosis saponin 100 mg/kg berat badan bersifat toksik.¹⁹ Hal tersebut juga mungkin yang terjadi pada hasil penelitian ini, pemberian ekstrak dengan konsentrasi lebih tinggi menyebabkan turunnya viabilitas. Viabilitas monosit yang diinkubasi ekstrak daun singkong 25% lebih kecil jika dibandingkan dengan viabilitas monosit yang diinkubasi dengan ekstrak daun singkong 12,5%. Viabilitas sel monosit pada kelompok yang diberi ekstrak daun singkong 12,5% yaitu sebesar 62,65%, sedangkan viabilitas sel monosit yang diberi ekstrak daun singkong 25% hanya sebesar 43,44%. Pada penelitian *in vitro* ini sel monosit yang sudah lisis tidak dapat meregenerasi selnya kembali, dan juga karena waktu hidup monosit yang pendek disirkulasi darah hanya 8 jam, sehingga sel monosit yang lisis tersebut tidak dapat mengekspresikan COX-2.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak daun singkong (*Manihot utilissima*) tidak menghambat ekspresi enzim COX-2 pada monosit yang dipapar LPS *E. coli*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada Rektor dan Ketua Lembaga Penelitian Universitas Jember atas dana DIP A Universitas Jember tahun 2013 sehingga penelitian ini terlaksana.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kurniawati A. Hubungan kehamilan dan kesehatan periodontal. *J Biomed Unej* 2005; II(2): 43-51.
2. Djais AI. Periodontitis sebagai faktor resiko jantung koroner aterosklerosis. *J PDGI* 2006; 56(2): 53-9.
3. Fitria E. Kadar IL-1B dan IL-8 sebagai penanda periodontitis, faktor resiko kelahiran prematur. *J PDGI* 2006; 56(2): 60-4.
4. Indahyani DE, Santoso AS, Utoro T. Pengaruh induksi lipopolisakarida (LPS) terhadap osteopontin tulang alveolaris tikus pada masa erupsi gigi. *Ind J Dent* 2007; 14(1): 2-7.
5. Susilowati H, Haniastuti T, Santoso AS. Produksi nitrat oksida dan aktivitas fagositosis makrofag mencit setelah stimulasi dengan lipopolisakarida. *Maj Ked Gigi* 2009; 16(1): 19-24.
6. Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. *Basic pathology*. 7th ed. Philadelphia: WB. Saunders Company; 2003. p. 33-78.
7. Tripathi KD. *Essentials of medical pharmacology*. 5th ed. New Delhi: Jaypee Brothers; 2003. p. 156-84.

8. Cicconetti A, Bartoli A, Ripari F, Ripari A. COX-2 selective inhibitors: a literature review of analgesic efficacy and safety in oral-maxillofacial surgery. *J Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97(2): 139-46.
9. Yendriwati. Kebutuhan vitamin C dan pengaruhnya terhadap kesehatan tubuh dan rongga mulut. *Dentika Dental Journal* 2006; II(1): 78-83.
10. Isgianto WA. Pengaruh vitamin C terhadap jumlah neutrofil PMN pada proses penyembuhan luka pada gingiva tikus (*Rattus norvegicus*). Skripsi. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember; 2005.
11. Robinson T. 1991. Kandungan organik tumbuhan tinggi. Edisi 6. Padmawinata K, editor. Bandung: ITB; 1995. h. 154, 191-3.
12. Adi LT. Tanaman obat dan jus untuk asam urat dan rematik. Jakarta: Agromedia Pustaka; 2006. h. 30-3.
13. Nurdiana AR. Potensi ekstrak daun singkong (*Manihot Esculanta*) terhadap jumlah neutrofil pada proses penyembuhan luka tikus wistar (*Rattus norvegicus*). Skripsi. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember; 2013.
14. Purwanto. Peran *Streptococcus mutans* dan monosit pada degradasi kolagen tipe IV dan agregasi platelet. Disertasi. Malang: Universitas Brawijaya; 2010.
15. Isbagio H. Peranan obat antiinflamasi non steroid terhadap nyeri dan inflamasi pada penyakit reumatik. *Cermin Dunia Kedokteran* 1992; No 78: 32-35
16. Goodman, Gilman. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 10th ed. Toronto: Mc Graw Hill; 2001. p. 687-71.
17. Newman MG, Carranza FA, Takei HH, Klokkevold PR. *Carranza's clinical periodontology*. 10th ed. Philadelphia: Saunders; 2006. p. 133-47.
18. Price SA, Wilson LM. 1995. *Patofisiologi: konsep klinis proses-proses penyakit*. Edisi 6. Pendit BU, editor. Jakarta: EGC; 2005. h. 35-46.
19. Diwan FH, Abdel-Hasan IA, Mohammed ST. Effect of saponin on mortality and histopathological changes in mice. *Eastern Mediterranean Health J* 2000; 6(2-3): 345-51.

Research Report

The effect of CPP-ACP containing fluoride on *Streptococcus mutans* adhesion and enamel roughness

Yulita Kristanti,¹ Widya Asmara,² Siti Sunarintyas,³ and Juni Handajani⁴

¹ Department of Conservative Dentistry, Faculty of Dentistry, Universitas Gadjah Mada

² Department of Microbiology, Faculty of Veterinary, Universitas Gadjah Mada

³ Department of Dental Biomaterials, Faculty of Dentistry, Universitas Gadjah Mada

⁴ Department of Oral Biology, Faculty of Dentistry, Universitas Gadjah Mada
Yogyakarta - Indonesia

ABSTRACT

Background: Direct contact between the bleaching agent and the enamel surface results in demineralization, alteration in surface roughness and bacterial adhesion. Many studies try to minimize this side effect through different way. **Purpose:** The aim of this study was to determine the effect of Calcium Phospho Peptide-Amorphous Calcium Phosphate (CPP-ACP) containing fluoride application before and after bleaching procedure on the adhesion of *S. Mutans* and enamel roughness. **Methods:** The samples were 6 teeth which were divided into 4 groups, and each tooth was cut into four pieces. Group A and C were treated with CPP-ACP after bleaching, while group B and D were treated with CPP-ACP before and after bleaching. CPP-ACP used in group C and D was the one that contain fluoride. After treatment, all samples were sterilized, immersed in steril human saliva for one hour, then immersed into *S. mutans* suspension of 108 CFU. Samples were incubated overnight. On the next day the samples were put into steril BHI and vortexed for one minute to detach the bacteria. Fifteen ml BHI containing bacteria was poured into TYS agar then incubated 37°C for 48 hours. Bacterial colony was counted with colony counter. The SEM examination was done on all samples. **Results:** Application of desensitizing agent reduced the *S. mutans* adhesion significantly among groups ($p < 0.05$) except between group A and C. SEM evaluation revealed significant differences among groups. **Conclusion:** The application of CPP-ACP containing fluoride before and after bleaching was effective to reduce the accumulation of *S. mutans* colony and enamel roughness.

Key words: CPP-ACP, fluoride, adhesion, *Streptococcus mutans*

ABSTRAK

Latar belakang: Kontak langsung antara bahan bleaching dan permukaan enamel menyebabkan demineralisasi, perubahan kekasaran permukaan dan berpengaruh terhadap banyaknya bakteri *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) yang melekat. Banyak peneliti mencoba meminimalkan efek samping ini dengan cara yang beragam. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk meneliti efek aplikasi CPP-ACP mengandung fluor sebelum dan setelah bleaching terhadap adhesi *S. mutans* dan kekasaran enamel. **Metode:** Sampel penelitian adalah 6 buah gigi yang dibagi dalam 4 kelompok, kemudian masing-masing gigi dibelah menjadi 4 bagian. Kelompok A dan C diaplikasi dengan CPP-ACP setelah bleaching, sedang Kelompok B dan D diaplikasi CPP-ACP sebelum dan setelah bleaching. CPP-ACP yang digunakan pada kelompok C dan D adalah yang mengandung fluor. Setelah perlakuan, semua sampel disterilkan dan direndam dalam saliva steril, lalu direndam dalam suspensi *S. mutans* 108 CFU dan diinkubasi 24 jam. Hari berikutnya sampel dimasukkan dalam BHI steril, divortex 1 menit untuk melepaskan bakteri. Lima belas ml BHI yang berisi *S. mutans* tersebut diambil untuk dikultur dalam agar TYS dan diinkubasi 37°C selama 48 jam. Bakteri yang tumbuh dihitung dengan colony counter. Pemeriksaan SEM dilakukan untuk meneliti permukaan enamel. **Hasil:** Aplikasi CPP-ACP(F) menurunkan jumlah bakteri yang melekat pada enamel secara signifikan ($p < 0,05$) pada semua kelompok, kecuali antara kelompok A dan C. **Simpulan:** Aplikasi CPP-ACP mengandung fluor sebelum dan sesudah bleaching efektif mengurangi akumulasi *S. mutans* dan kekasaran pada permukaan enamel.

Kata kunci: CPP-ACP, fluor, adhesi, *Streptococcus mutans*

Correspondence: Yulita Kristanti, c/o Bagian Ilmu Konservasi Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada. Jl. Denta, Sekip Utara Yogyakarta 55281, Indonesia. E-mail: litaugm11@gmail.com

INTRODUCTION

Information concerning esthetic dentistry that can be accessed easily make people more concerned to improve their performance. Brighter teeth are something that encourages people to see a dentist to bleach their teeth. Bleaching can be categorized into 2 groups: intracoronal bleaching and extracoronal bleaching. Intracoronal bleaching is performed to bleach non vital teeth, while extracoronal bleaching is indicated for vital teeth. Bleaching for vital teeth can be classified into at home bleaching (professionally dispensed) and in office bleaching (professionally administered).¹

People prefer their teeth to be bleached by a dentist (in office bleaching technique) than to do it by themselves because it does not take a long time to see the bleaching result. Beside that, they also feel much secured if the bleaching process is done by the dentist because of better gingival protection and better sensitivity control. This procedure is suitable for patient with bleaching tray intolerance although it result in higher tooth sensitivity than at home bleaching because of higher concentration used in this technique.²

The mechanism of bleaching discolored teeth still unclear. It differs according to the type of discoloration involved, the chemical and physical condition at the time of the reaction. Bleaching agent mainly oxidizers, slowly degrading organic structure into chemical product such as carbon dioxide that are lighter in color. The oxidation reduction reaction that occurs during bleaching is known as a redox reaction. The mechanism of bleaching involve the degradation of the extracellular matrix and oxidation of chromophores located within enamel and dentin.^{3,4}

Beside tooth sensitivity, there are several bleaching side effect that must be anticipated such as mineral loss, surface roughness and increasing bacterial adhesion such as *Streptococcus mutans* (*S. mutans*). *S. mutans* has ability to metabolize many sugars and produces various organic acid. *S. mutans* is strong acid producer hence cause an acidic environment. Consequently it lowers the pH of the surrounding environment that will lead to tooth demineralization.^{5,6} According to Mithra and Moeny remineralization using desensitizing agent calcium phospho peptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) 3 minutes twice a day was achieved after 35 days.⁷ Meanwhile the bleaching effect results in enamel porosity which enhances trans-enamel diffusion to reach deep area of dentin and pulp chamber.⁸ In vitro studies have demonstrated that a high concentration of toxic components released from hydrogen peroxide 35% bleaching gels used for in office treatment are capable of diffuse through enamel and dentin and they significantly decrease the metabolism of pulp cells.^{9,10}

Several studies have reported the effect of hydrogen peroxide on the structure of dental tissue such as pulp sensitivity, cervical resorption, release of selected components of dental materials and alteration of enamel surface.^{4,8-10} However little has been reported about the adhesion of *S. mutans* and its relationship with the difference morphological alteration of the outer enamel surface. The aim of this study was to determine the effect of fluoride and non fluoride desensitizing agent that applied prior to and after bleaching procedure on the adhesion of *S. mutans* to enamel and enamel roughness.

MATERIALS AND METHODS

Six maxillary extracted premolar were used as sample of this study. Samples were cut into 4 pieces. Furthermore, the 24 pieces classified into 4 groups, each group contains 6 specimen. Group A was treated using non fluoride CPP-ACP after bleaching procedure was performed. Group B was treated using non fluoride CPP-ACP before and after in office bleaching was performed. Group C was treated using CPP-ACP containing fluoride after bleaching was performed, and Group D was treated using CPP-ACP containing fluoride before and after bleaching was performed.

Group A was bleached using hydrogen peroxide 40% for one hour, washed, dried, followed by the application of non fluoride CPP-ACP for 30 minutes, immersed into human saliva for one hour then immersed into *S. mutans* suspension of 10^8 CFU, incubated 37°C (24 hours). The day after the teeth were put into 3 ml sterilized Brain Heart Infusion (BHI), vortex for 1 minute.¹¹ After diluting 10^3 0.1 ml BHI containing *S. mutans* were cultured in Trypticase-Soy-Sucrose-Bacitracin (TYS 20B) followed by incubating at 37°C for 48 hours. *S. mutans* colony were counted using colony counter. In group B, before in office bleaching procedure was performed, the non fluoride CPP-ACP was applied for 30 minutes then the samples were washed and dried. After bleaching, the non fluoride CPP-ACP was applied again, followed by washing and immersed into human saliva for one hour, immersed into *S. mutans* suspension 10^8 CFU, incubated 37°C (24 hours). The day after the teeth were put into 3 ml sterilized BHI, vortex for 1 minute.¹² After diluting 10^3 0.1 ml BHI containing *S. mutans* were cultured in TYSS 20B followed by incubating 37 °C for 48 hours.¹² *S. mutans* colony were counted using colony counter. Group C was treated with the same procedure as group A, but in group C the CPP-ACP used was the one that containing fluoride. CPP-ACP (F) was also used in Group D, it was applied before and after bleaching procedure.

RESULTS

The average of *S. mutans* colony accumulation was shown in Figure 1. The result showed that the the accumulation colony of *S. mutans* decrease when the CPP-ACP was used before and after bleaching. CPP-ACP (F) also reduced the amount colony of *S. mutans* (Figure 1).

The one way ANOVA showed there was a significant difference ($p < 0.005$) of the accumulation colony of *S. mutans* among groups with once and twice CPP-ACP application, with and without fluoride (Table 1). The result of this research showed there was a significant difference between groups ($p < 0.005$), except between group A and C ($p > 0.005$). This may be caused by low fluoride dosage when the DA applied only once. There were Scanning Electron Microscope (SEM) evaluation for detecting enamel surface roughness with 2000 magnification.

In group A (CPP ACP after bleaching only): the dissolved periphery of enamel prism and the porosities could be seen. Areas of remineralization noted although at some places dissolved prism core and dissolved interprismatic substance are still evident (Figure 2). In group B (CPP ACP before and after bleaching) the configuration of the enamel was apparent with few porous defect. Areas of remineralization are evident clearly (Figure 3). In group C (CPP-ACP (F) after bleaching only) the porosities still could be seen clearly, but not as much as in group A. Certain areas of remineralization were evident (Figure 4). In group D (CPP ACFP before and after bleaching): the areas of mineralized deposits were more evident. The different pattern among group A, B, C and D maybe due to variation in crystallite orientation in the enamel prism (Figure 5). From this different morphological alteration point of view, SEM evaluation support the result

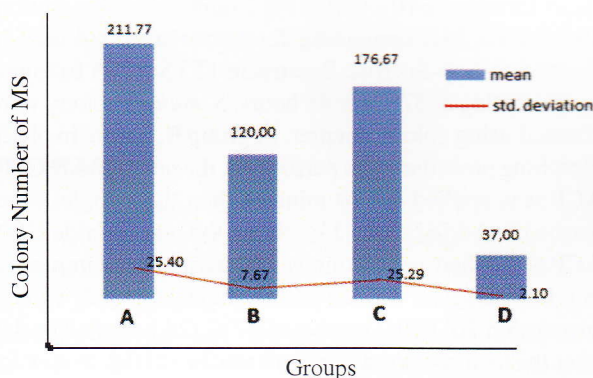


Figure 1. Average of *S. mutans* accumulation after once and twice DA application, with and without fluoride

Note:

- A. Bleaching → CPP-ACP
- B. CPP-ACP → bleaching → CPP-ACP
- C. Bleaching → CPP-ACP (F)
- D. CPP-ACP (F) → bleaching → CPP-ACP(F)

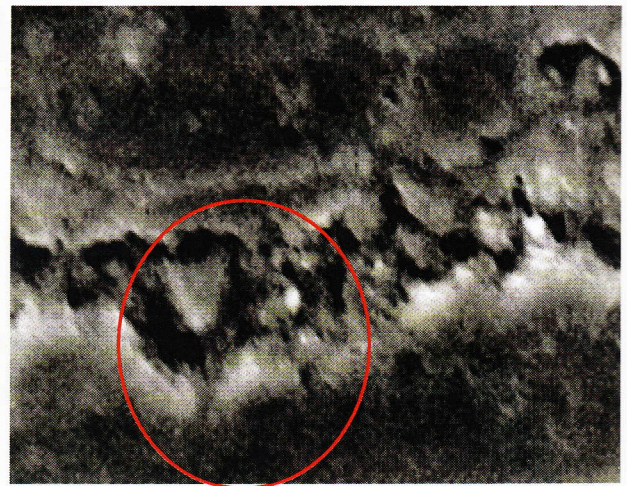


Figure 2. Group A (bleaching → CPP-ACP) the dissolve peripheral enamel prism and porosities appeared



Figure 3. Group B (CPP-ACP → bleaching → CPP-ACP) the configuration of enamel revealed few porous defect

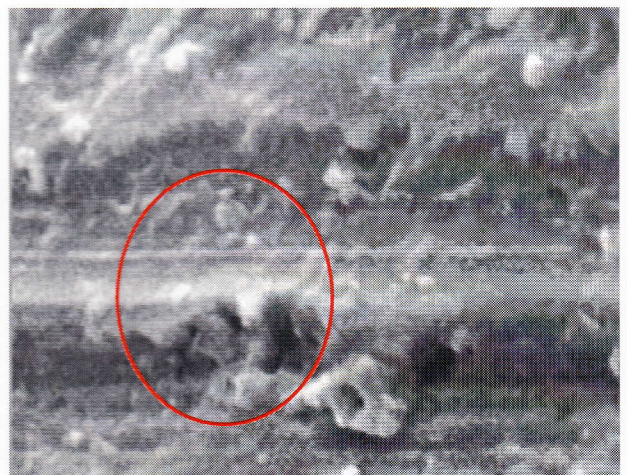


Figure 4. Group C (bleaching → CPP-ACP (F)) the porosities could be seen and certain area of remineralization were evident

Table 1. One way ANOVA of the accumulation colony of *S. mutans* after once and twice desensitizing agent application, with and without fluoride

	Sum of Squares	df	Mean square	F	Sig
Between groups	104163.792	3	34721.264	103.028	.000
Within groups	6740.167	20	337.008		
Total	110903.958	23			

**Figure 5.** Group D (CPP-ACP (F)→bleaching→CPP-ACP (F)) the areas of mineralized deposit were more evident

of this research. The higher the topography irregularities (roughness) of a material, the more the *S. mutans* colony could be counted.

DISCUSSION

The result showed there were significant difference occurred on the accumulation of *S. mutans* colony among group A and B, group A and D, group B and C. This phenomena has suggested that there is a relationship between the accumulation of *S. mutans* with different surface roughness among group A and B, group A and D, group B and C as a result of bleaching treatment with tooth bleaching containing 40% H₂O₂ (Figure 2-5). Tooth bleaching releases reactive free radicals that will influence the reducing agent, so the yellowish pigment (xanthopterin) will be oxidated and become a whitening pigmen (leucopterin).¹³ Bleaching agent can produce undesirable effect such as hypersensitivity, gingival irritation, micromorphological defect due to demineralization and effect on restorative material.¹ The result of this research shown that highest mean value of *S. mutans* colony can be noticed in group A, followed by group C, group B and group D. This means that application CPP-ACP (either with or without fluor) before and after bleaching were effective in reducing *S. mutans* colony. Mean value of *S. mutans* colony in group C below the mean value of *S. mutans* in group A. This means that fluoride containing DA showed better result in reducing *S. mutans* colony.

SEM evaluation showed that group A display the highest roughness value, followed by group C, B and D. Surface roughness can be measured by qualitative method such as SEM or quantitative method such as profilometry. SEM is a powerful magnification tool that utilizes focused beams of electron to obtain information while profilometer is a simple tool to measure surface's profile in order to quantify its roughness. It determines line roughness, in either vertical or horizontal direction, but it can not penetrate certain micro irregularities. This tool is easy to operate and rapid to obtain the measuring result. SEM and profilometry have limitation in defining surface topography. The electron beam techniques in SEM does not allow visualization of three dimensional surface texture.^{14,15}

According to Katsikogianni, the first stage of bacterial adhesion consist of the initial attraction of the cells to the surface followed by absorption and attachment. At the second stage, molecular-specific reaction between bacterial surface structure and substratum surface become predominant.¹⁶

There was no significant difference occurred between group A and C. This fact can be studied from three perspectives. First, it was suggested that *S. mutans* can adapt to fluoride because of either widespread or longterm use of fluoride. There are few alteration could be detected in fluoride resistant *S. mutans*, one of them is the fatty acid membrane. Membrane of fatty acid plays an important role in maintaining normal physiological cell function, tolerance of physiological stressor including oxidative stress.^{17,18} Cell membranes, which are structurally made of large amount of polyunsaturated fatty acid are highly susceptible to oxidative attacks. Oxidative attack will result in oxidative stress when the balance between the existance of reactive oxygen species and antioxidant defence is lost. The free radical mediated oxidative stress result in oxidation of membrane of lipoprotein, glycoxidation, oxidation of DNA, subsequently cell death result.¹⁹

In fluoride resistance *S. mutans*, the unsaturated/saturated ratio during the stationary phase was higher than the wild-type strain. A significant difference in the amount of long chain mono saturated fatty acids between fluoride resistant strain and wild-type strain was detected in acidic condition. Previous study conducted by Zhu *et al.*¹⁷ showed that the level of gene that is responsible for biosynthesis fatty acid (*fabM*) RNA in the fluoride resistant-strain was significantly higher than that of the wild- type strain in the acidic condition as well although the sequence of the *fabM* gene was the same in the fluoride resistant strain as

the one reported for the wild-type strain. The *fabM* gene sequence from the fluoride resistant strain was 100% homologous to the wild-type strain. A single gene product of *fabM* in *S. mutans* is responsible for the synthesis of monounsaturated fatty acid and is necessary for survival in acidic environment. Alteration in the lipid content of membranes of an organism is the major importance in response to environmental stress. These findings are consistent with Zhu *et al.*¹⁷ If that fluoride-resistant *S. mutans* exhibit greater ability to resist acid stress compare to wild-type *S. mutans*.

Another possibilities that influence this result is the concentration of the CPP-ACP containing fluoride in group C is to low (900 ppm). If the CPP-ACP only applied once after bleaching it means the fluoride delivered still below the traditional treatment as in mouth rinse or in tooth paste (1500 ppm). Many researcher still confuse to formulate the precision concentration of fluoride, so debate around fluoride concentration still persist. Treatment with 5000 ppm fluoride significantly enhanced remineralization and inhibit demineralization when compared with treatment with 1500 ppm.¹⁹ In group D, CPP-ACP containing fluoride was delivered twice before and after bleaching. It means the total fluoride delivered was 1800 ppm. Present findings showed lower surface roughness value and lower *S. mutans* colony accumulation (data not shown).

Our results indicated that fluoride combined with CPP ACP that was delivered before and after bleaching (group D) showed lower *S. mutans* colony accumulation than CPP ACP without fluoride that delivered in the same manner (group B) This is because fluoride can inhibit glucosyltransferase produced by *S. mutans* by inhibiting enolase that has an important role in glycolysis. Beside that, fluoride was involved in developing complex metal-fluor, usually aluminium fluoride (AlF₃) that account for inhibiting glucan formation from glucose 6-phosphatase that result in inhibiting glucosyltransferase activity.²⁰

On the colony counting method, the difference between alive and death *S. mutans* could not be seen, so it is possible to have false positive. The surface roughness value of group A seems to be the same as in group C. This condition could be as a result of contaminant such as residual of the desensitizing agent used that can not be rinsed because of the certain retentive topography on the enamel surface. The variation of enamel topography it self has wide diversity. Every part of enamel surface has diferent surface roughness value that can influence its agent retention capability. In this study the surface roughness value of human enamel before treatment are almost above 1 µm. It means that the starting point of surface roughness value was above critical value for bacterial colonization (0.2 µm).²¹

The study suggested that the application of CPP-ACP containing fluoride before and after bleaching was effective in reducing *S. mutans* accumulation and enamel roughness.

REFERENCES

- Greenwall L, Dunitz M. Bleaching techniques in restorative dentistry. London: The Livery House; 2001. P. 1-60.
- Gurgan S, Cakir FY, Yazici E. Different light-activated in office bleaching system: a clinical evaluation. *Lasers Med Sci* 2010; 25(6): 817-22.
- Ingle JI, Backland LK. Endodontics. 4th ed. London: Hamilton; 2002. p. 868-75.
- Goldberg M, Grootveld M, Lynch E. Undisreable and adverse effect of tooth-whitening products: a review. *Clin Oral Investig* 2010; 14(1): 1-10.
- Fozo EM, Quivey RG Jr. Shift in membrane fatty acid profile of *Streptococcus mutans* enhance survival in acidic environments. *Appl Environ Microbiol* 2004; (70)2: 929-6.
- Forstten SD, Bjorklund M, Ouwehand AC. *Streptococcus mutans*, caries and simulation models. *Nutrients* 2010; 2(3): 290-8.
- Hegde MN, Moeny. Remineralization of enamel subsurface lesions with casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: a quantitative energy dispersive x ray analysis using Scanning Electron Microscopy: An in Vitro study. *J Conserv Dent* 2012; 15(1): 61-7.
- Gökay O, Mújdeci A, Algin E. In vitro peroxide penetration into the pulp chamber from newer bleaching product. *Int Endod J* 2005; 38(8): 516-20.
- Coldebella CR, Riberio AP, Sacono NT, Trindade FZ, Hebling J, Costa CA. Indirect cytotoxicity of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on cultured odontoblast- like cell. *Braz Dent J* 2009; 20(4): 267-4.
- Trindade FZ, Ribeiro AP, Sacono NT, Oliveira CF, Lessa FC, Hebling J, Costa CA. Trans-enamel and trans-dentinal cytotoxic effects of a 35% hp bleaching gel on cultured odontoblast cell lines after constitutive applications. *Int Endod J* 2009; 42(6): 516-524.
- Elsayed ME, Sultan KO, El-Hameed HMA, Elsayed AE. Detection of Bacterial Colonization around Cobalt Chromium versus Zirconium Copings on Natural Teeth Supporting Overdenture. Two different in vitro studies. *J Am Sci* 2012; 8(7): 799-803.
- Anggraeni A, Yuliati A, Nirwana I, Perlekatan koloni Streptococcus mutans pada permukaan resin komposit sinar tampak. *Maj Ked Gigi (Dent J)* 2005; 38(1): 8-11.
- Mithra NH, Krishna S, Shishir S. Overview of in-office bleaching of vital teeth. *IRJP* 2012; 3(11): 12-6.
- Giacomelli L, Derchi G, Frustaci A, Bruno O, Covani U, Barone A, de Santis D, Chiapelli F. Surface roughness of commercial composites after different polishing protocols: an analysis with atomic force microscopy. *The Open Dent J* 2010; 4: 191-4.
- Kakaboura A, Fragouli M, Rahiotis C, Silikas N. Evaluation of surface characteristics of dental composites using profilometry, scanning electron, atomic force microscopy and gloss-meter. *J Mater Sci Mater Med* 2007; 18: 155-63.
- Katsikogianni M, Missirlis YF. Concise Review of Mechanism of Bacterial Adhesion to Biomaterials and of Techniques Used in Estimating Bacteria-Material Interaction, *European Cell and Matrials* 2004, 8:37-57.
- Zhu L, Zhang Z, Liang J. Fatty-acid profiles and expression of the *fabM* gene in a fluoride-resistant strain of *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 2012; 57(1): 10-4.
- Singh, SC, Sinha RP, Hader DP. Role of lipids and fatty acids in stress tolerance in cyanobacteria 2002; 41: 297-308.
- Ten Cate JM, Buis MJ, Miller CC, Exterkate RA. Elevated fluoride product enhance remineralization of advanced enamel lesions. *J Dent Res* 2008; 87(10): 943-7.
- Al-Jumaily EFA, Al-Mudhalal NHA, Muhimen NAA. The effects of inhibitors and anti GTF-1b antibody on growth of mutans Streptococci *Streptococcus sobrinus* (serotype G) N10 Strain *J Pharmacy* 2013; 3(4): 5-9.
- Botta AC, Mollica FB, Riberio CF, Araujo MAM, Nicolo RD, Balducci I. Influence of topical acidulated phosphate fluoride on surface roughness of human enamel and different restorative materials; *Rev Odonto Cienc* 2010; 25 (1): 83-7.

Research Report

Sifat fisik hidroksiapatit sintesis kalsit sebagai bahan pengisi pada sealer saluran akar resin epoxy

(Physical properties of calcite synthesized hydroxyapatite as the filler of epoxy-resin-based root canal sealer)

Emma Mulyawati,¹ Marsetyawan HNES,² Siti Sunarintyas,³ dan Juni Handajani⁴

¹ Departemen Konservasi Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada

² Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada

³ Departemen Biomaterial, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada

⁴ Departemen Biologi Oral, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada

Yogyakarta - Indonesia

ABSTRACT

Background: The filler addition to resin based sealers will enhance the physical properties of the polymer. Because of its biological properties, the synthetic hydroxyapatite (HA) has been proposed as filler for dental material such as composite resin. The calcite synthesized HA is the HA produced of calcite minerals that came from many Indonesian mining. **Purpose:** The aim of study was to determine the effect of different concentration of calcite synthesized HA as the filler of the epoxy-resin-based root canal sealer on the physical properties such as its contact angle, the film thickness and the microhardness. **Methods:** The crystal of the calcite synthesized hydroxyapatite with the size between 77.721-88.710 nm and the ratio of Ca/P 1.6886 were synthesized at Ceramic Laboratory, Mechanical Engineering, using wet method of hydrothermal microwave. The powders of the epoxy- resin were prepared by added the synthesized hydroxyapatite crystal in 5 different weight ratios (e.g.: HA-10%, HA-20%, HA-30%, HA-40% and HA-50%). Each of these was mixed with the paste of 3:1 ratio using spatula on a glass plate until homogen and then measuring the contact angle and the film thickness. Microhardness test was conducted after the mixture of experimental sealer was stored for 24 hrs at 37 oC to reach perfect polymerization. **Results:** All of contact angles were <90o and were not significantly different to each other ($p= 0.510$). All groups had a film thickness in accordance with ISO 6876 (<50 um) and with no statistical difference ($p= 0.858$). In the HA of 10%, 20%, 30% seen that the microhardness were increased, while in the HA-50% was decreased and in the HA-40% has the same microhardness to the control groups (HA-0%). **Conclusion:** Calcite synthesized HA as the filler did not affect contact angle and film thickness of the sealer. Microhardness of the epoxy-resin based sealer could be increased using maximum 30% of the calcite synthesized HA as the filler.

Key words: Physical properties, contact angle, film thickness, micro hardness, calcite synthesized hydroxyapatite, root canal sealer

ABSTRAK

Latar belakang: Penambahan bahan pengisi pada sealer berbahan dasar resin akan meningkatkan sifat fisik polimer. Karena sifat biologis bagus, hidroksiapatit (HA) sintetis digunakan sebagai bahan pengisi material kedokteran gigi seperti resin komposit. Hidroksiapatit sintesis kalsit merupakan HA yang dihasilkan dari mineral kalsit berasal dari berbagai daerah pertambangan di Indonesia. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk meneliti pengaruh berbagai konsentrasi HA sintesis kalsit sebagai bahan pengisi sealer berbahan dasar resin epoksi terhadap sifat fisiknya yaitu sudut kontak, ketebalan film dan kekerasan mikronya. **Metode:** Kristal HA sintesis kalsit yang berukuran 7,721-88,710 nm dengan rasio Ca/P 1,6886 diperoleh dari sintesis di Laboratorium Keramik, Teknik Mesin, Universitas Gadjah Mada menggunakan wet method dengan microwave hidrotermal. Serbuk resin epoksi dipersiapkan dengan menambahkan kristal HA sintesis kalsit dalam lima konsentrasi yang berbeda yaitu HA-10%, HA-20%, HA-30%, HA-40% dan HA-50% (dalam berat). Masing-masing serbuk diaduk dengan pasta resin epoksi dengan perbandingan 3:1 menggunakan spatula di

atas glassplate hingga homogen, selanjutnya dilakukan pengukuran sudut kontak dan ketebalan film. Pengukuran kekerasan mikro dilakukan setelah sealer disimpan dalam inkubator 37 oC selama 24 jam sehingga mencapai polimerisasi sempurna. **Hasil:** Semua kelompok menunjukkan bahwa sudut kontak <90o dan menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan ($p=0,510$). Semua kelompok menunjukkan bahwa ketebalan filmnya sesuai dengan ISO 6876 (<50 um) dan menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan ($p=0,858$). Pada kelompok HA-10%, 20% dan 30% kekerasan mikronya meningkat, sedangkan pada HA-50% menurun dan HA-40% kekerasannya sama dengan kelompok kontrol (HA-0%). **Simpulan:** Penambahan hingga 50% HA sintesis kalsit sebagai bahan pengisi sealer resin epoksi tidak mempengaruhi sudut kontak dan ketebalan film. Kekerasan sealer dapat ditingkatkan dengan menambahkan HA sintesis kalsit maksimum hingga 30%.

Kata kunci: Sifat fisik, sudut kontak, ketebalan film, kekerasan mikro, hidroksiapatit sintesis kalsit, sealer saluran akar

Korespondensi (*correspondence*): Ema Mulyawati, Departemen Ilmu Konservasi Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Gadjah Mada. Jl. Denta I, Sekip Utara, Yogyakarta 55281. Indonesia. E-mail: emamulyawati@gmail.com

PENDAHULUAN

Obturasi saluran akar (*root canal obturation*) bertujuan untuk mendapatkan penutupan hermetis sepanjang sistem saluran akar terutama di daerah apikal.¹ Kerapatan apikal menjadi parameter utama suatu bahan obturasi saluran akar yang akan mencegah terjadinya kebocoran apikal sebagai penyebab utama kegagalan perawatan saluran akar. Bahan obturasi saluran akar yang digunakan hingga saat ini adalah guta perca yang dalam aplikasinya harus dikombinasikan dengan sealer saluran akar (*root canal sealer*). Fungsi utama sealer adalah mengisi celah yang terjadi antara guta perca dan dinding saluran akar, sehingga bahan obturasi dapat menutup saluran akar baik ke arah apikal maupun lateral sehingga mencegah terjadinya kebocoran apikal.^{2,3} Secara fisik sealer harus dapat melekat atau beradaptasi dengan baik pada dinding saluran akar. Sifat fisik yang mempengaruhi pelekatan sealer antara lain daya pembasahan (*wettability*) dan ketebalan film (*film thickness*).⁴ Selain itu sealer harus mudah diaplikasikan pada dinding saluran akar, tidak mengerut setelah dimasukkan, radiopak, tidak mewarnai gigi, dan mudah dikeluarkan bila perlu.^{3,4}

Pada saat ini sealer resin merupakan sealer yang paling banyak digunakan. Resin merupakan suatu polimer sintetik yang mempunyai sifat adaptasi baik pada dinding saluran akar yang disebabkan daya adhesinya tinggi dan perubahan dimensi kecil.⁵ Sealer resin lambat mengeras dan dalam temperatur tubuh memerlukan waktu antara 9-15 jam, sehingga waktu kerja dan waktu *setting* cukup panjang.⁶ Kekurangan sealer berbahan dasar resin adalah selalu mengalami pengerutan pada saat polimerisasi (*polimerization shrinkage*) sehingga mempengaruhi kerapatan apikalnya. Jenis resin yang banyak digunakan sebagai siler adalah resin-epoxy yang berbasis *bisphenol A-diglycidyl ether* dengan kandungan *hexamethylen-tetramine* sebagai bahan katalisator dan *bismuth oxide* untuk sifat radiopaknya.^{5,6}

Sampai saat ini belum ditemukan bahan yang memenuhi semua persyaratan ideal suatu sealer saluran akar. Hal ini

yang mendorong selalu dicari usaha untuk meningkatkan mutu suatu sealer, antara lain dengan menambahkan suatu bahan pengisi (*filler*) pada bahan sealer yang digunakan. Penambahan bahan pengisi pada sealer resin akan mengurangi pengerutan selama proses polimerisasi. Salah satu bahan alternatif yang banyak dikembangkan saat ini adalah kalsium fosfat termasuk hidroksiapatit (HA).⁷⁻⁹ Hidroksiapatit sintesis sudah banyak digunakan dalam bidang kedokteran gigi antara lain sebagai bahan pengisi untuk beberapa material kedokteran gigi seperti resin komposit dan sistem adhesif,^{10,11} bahan pengganti tulang alveolar yang memacu penyembuhan kerusakan tulang periodontal dan memacu osteointegrasi dari implan titanium.¹²⁻¹⁴

Hidroksiapatit merupakan senyawa kalsium berbentuk kristal heksagonal, yang dapat diperoleh dari tulang dan struktur jaringan keras gigi yaitu email dan dentin baik pada manusia maupun binatang.¹⁵ Hidroksiapatit sintesis kalsit merupakan HA yang disintesis dari serbuk kalsit alami yang berasal dari beberapa daerah pertambangan di Indonesia.¹⁶ Hidroksiapatit dapat disintesis dari kalsit dengan *wet method* menggunakan *hydrothermal microwave* melalui transformasi dengan hydrogen phosphat. Hasil sintesis kalsit melalui transformasi menghasilkan HA dengan ukuran diameter kristal berkisar antara 77,721–88,710 nm, sedangkan HA-200 antara 57,538–77,534 nm yang artinya ukuran kristal HA sintesis kalsit lebih stabil dibandingkan HA sintesis (HA-200). Pengujian karakteristik HA sintesis kalsit secara *atomic absorption spectroscopy* (AAS) didapatkan hasil bahwa rasio Ca/P HA sintesis kalsit 1,6886 sedangkan Ca/P HA secara stokiometri adalah 1,6667. Dari hasil tersebut disimpulkan bahwa kemurnian HA sintesis kalsit mendekati kemurnian HA stokiometri yang sudah terbukti biokompatibel terhadap jaringan.¹⁷

Penelitian ini bertujuan untuk meneliti pengaruh penambahan HA sintesis kalsit sebagai bahan pengisi (*filler*) siler resin epoxy terhadap sifat fisik sealer yaitu sudut kontak (*contact angle*), ketebalan film (*film thickness*) dan kekerasan mikro (*microhardness*).

BAHAN DAN METODE

Kristal HA sintesis kalsit yang berdiameter antara 77,721- 88,710 nm dengan ratio Ca/P 1.6886 disintesis di Laboratorium Keramik, Jurusan teknik Mesin, Universitas Gadjah Mada. Sintesis dilakukan dengan *wet method* menggunakan *hydrothermal microwave*. Kalsit yang digunakan merupakan hasil olahan PT. Omya, Sidoarjo, Jawa Timur yang bersumber dari kalsit alami beberapa daerah pertambangan di Indonesia seperti Pacitan, Trenggalek Tulungagung, Kulon Progo, Gunung Kidul, Magelang, Bima dan Jeneponto.¹⁶ Jenis sealer resin yang digunakan adalah siler resin epoxy (Dentsply, Germany) yang terdiri atas cairan (*liquid*) yang mengandung resin epoxy *A-diglycidyl ether* dan serbuk (*powder*) yang mengandung *hexamethylen-tetramine* 25% sebagai katalisator dan *bismuth oxide* 75% untuk sifat radiopaknya. Dipersiapkan serbuk resin yang telah ditambahkan kristal HA sintesis kalsit dengan formula kandungan HA 10%, 20%, 30%, 40% dan 50% (dalam berat).

Pencampuran sealer dilakukan secara manual di atas *glass plate* menggunakan spatula dengan perbandingan 3 volume unit *powder* dicampur dengan 1 volume unit resin. Pencampuran dilakukan hingga mendapatkan konsistensi yang homogen, yang akan putus bila diangkat ke atas 1,5-2,5 cm dari *glass plate*. Seterusnya dilakukan pengujian sifat fisik (*physical properties*) kelima kelompok *experimental sealer* yaitu siler HA-10%, HA-20%, HA-30%, HA-40%, HA-50% dan kelompok kontrol yaitu *siler resin epoxy* tanpa HA sintesis kalsit (HA-0%). Semua pengujian baik sudut kontak, *film thickness* maupun kekerasan mikro pada semua kelompok siler masing-masing dilakukan 5 kali (n=5).

Daya pembasahan (*wettability*) dievaluasi dengan mengukur sudut kontak yaitu sudut internal (θ) antara siler (bahan adhesif) dengan substrat.⁴ Bahan coba sealer sebanyak 0,3 ml diletakkan di atas *object glass* ukuran 2,5 x 7,5 cm dengan ketebalan 1 mm yang diletakkan pada bidang datar. Setelah 3 menit dari mulainya pencampuran siler, lalu diambil foto siler tersebut dari arah samping segaris dengan ketebalan *object glass*. Pengukuran sudut kontak dilakukan pada foto tersebut dengan menggunakan komputer. Sudut kontak merupakan resultan antara kekuatan adesif sealer-substrat dengan kekuatan kohesive siler.

Ketebalan film dievaluasi sesuai dengan pedoman dari ISO 6876.¹⁸ Dipersiapkan dua buah *glass plate* ukuran 4,5 cm x 4,5 cm dengan ketebalan 5 mm. Kedua *glass plate* tersebut ditumpuk dan diukur ketebalan kombinasi keduanya menggunakan *sliding caliper* berskala micron (Sylvac S-Cal Pro, Swiss). Setelah itu bahan coba siler (*experimental sealer*) yang telah diaduk sebanyak 0,5 ml ditempatkan di tengah-tengah salah satu *glass plate* tersebut kemudian sealer ditekan menggunakan *glass plate* yang kedua. Setelah 3 menit dari mulainya pencampuran siler, diletakkan beban seberat 15 kg secara vertikal di atas *glass plate* kedua tersebut. Setelah 10 menit dari mulainya pencampuran sealer, ketebalan kedua *glass plate* dengan sealer di antara keduanya diukur menggunakan *sliding*

caliper. Perbedaan ketebalan antara kedua *glass plate* tanpa dan dengan sealer merupakan ketebalan film dari sealer tersebut. Pengukuran dilakukan empat kali pada masing-masing sisi *glass plate* dan diambil nilai reratanya.

Kekerasan mikro dievaluasi menggunakan Vickers Microhardness tester (HVM Shimadzu corp, Kyoto, Japan). Siler yang telah diaduk dimasukkan dalam cetakan logam bentuk diskus dengan ukuran 8 mm (diameter) x 2 mm (ketebalan) dan disimpan dalam inkubator 37°C selama 7x 24 jam hingga mencapai polimerisasi sempurna. Permukaan siler diratakan menggunakan *carborundum disc*. Uji kekerasan dilakukan dengan menekan siler menggunakan indentor yang terbuat dari batu intan berbentuk piramida selama 10 detik dengan beban sebesar 200 g. Pada bagian yang terkena indentor akan terbentuk cekungan berbentuk piramida, diukur panjang diagonal hasil indentasi tersebut pada dua sisi dan diambil reratanya.¹⁹

HASIL

Uji normalitas data dievaluasi menggunakan uji Shapiro-Wilk, sedangkan homogenitas variansi menggunakan *Levene-test*. Pada pengujian sudut kontak dan ketebalan film didapatkan hasil data normal dan homogen selanjutnya dilakukan uji ANOVA satu jalur. Hasil pengukuran sudut kontak dan ketebalan film dapat dilihat pada Tabel 1. Pada kelima kelompok bahan coba sealer (*experimental sealer*) dari kandungan HA-10% hingga 50% dan kelompok kontrol (HA-0%) menunjukkan hasil bahwa besar sudut kontaknya berkisar antara 67,43° hingga 71,13°, yang berarti < dari 90°, dan tidak ada perbedaan antara semua kelompok tersebut (p=0,510). Demikian juga ketebalan film pada semua kelompok menunjukkan bahwa ketebalan filmya <50,00 um, yang sesuai dengan standar ISO 6876, dengan hasil berkisar antara 44.85 hingga 47.85 um dan menunjukkan tidak ada perbedaan pada semua kelompok perlakuan (p= 0,858).

Tabel 1. Nilai rerata dan standard deviasi (SD) sudut kontak dan ketebalan film sealer resin berbahan pengisi HA sintesis kalsit dengan berbagai konsentrasi

Persentase HA kalsit	Sudut kontak (°)	Ketebalan film (um)
	Rerata ± SD	Rerata ± SD
HA- 0%	71,13 ± 1,89	45,92 ± 3,04
HA- 10%	71,02 ± 1,75	44,85 ± 2,51
HA- 20%	68,98 ± 3,49	46,69 ± 3,16
HA- 30%	67,43 ± 2,57	47,85 ± 2,39
HA- 40%	68,72 ± 3,24	46,15 ± 2,70
HA-50%	70,07 ± 4,54	47,35 ± 2,27

Pada uji kekerasan mikro, varian tidak homogen (p<0,05) sehingga data diuji menggunakan *Kruskal-Wallis* dan *Mann-Whitney*. Hasil uji kekerasan dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Nilai rerata dan standard deviasi (SD) kekerasan mikro siler resin berbahan pengisi HA sintesis kalsit dengan berbagai konsentrasi dalam *Vickers Hardness Number* (VHN)

Persentase HA kalsit	Kekerasan mikro (VHN)
	Rerata ± SD
HA-0%	64,28 ± 1,11
HA-10%	73,23 ± 2,55
HA-20%	77,31 ± 2,20
HA-30%	80,51 ± 0,74
HA-40%	65,37 ± 2,03
HA-50%	55,22 ± 1,59

Tabel 3. Hasil uji *Mann-Whitney* kekerasan mikro pada semua kelompok perlakuan siler resin berbahan pengisi HA sintesis kalsit dengan berbagai konsentrasi

Pasangan kelompok	p
HA- 0% - HA-10%	*0,009
HA- 0% - HA-20%	*0,008
HA- 0% - HA-30%	*0,009
HA- 0% - HA-40%	0,347
HA- 0% - HA-50%	*0,009
HA-10% - HA-20%	*0,045
HA-10% - HA-30%	*0,009
HA-10% - HA-40%	*0,009
HA-10% - HA-50%	*0,009
HA-20% - HA-30%	*0,026
HA-20% - HA-40%	*0,008
HA-20% - HA-50%	*0,008
HA-30% - HA-40%	*0,009
HA-30% - HA-50%	*0,009
HA-40% - HA-50%	*0,009

Keterangan: * berbeda bermakna ($p < 0,05$)

Dari uji *Kruskal-Wallis* didapatkan hasil bahwa ada perbedaan pada semua kelompok perlakuan maupun kontrol ($p < 0,05$) sehingga dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*. Dari uji *Mann-Whitney* diketahui bahwa pada penambahan HA-10% kekerasannya lebih tinggi ($p = 0,009$) dibandingkan HA-0%. Kekerasan siler HA-20% lebih tinggi dibandingkan dengan siler HA-0% ($p = 0,008$) maupun HA-10% ($p = 0,045$). Pada siler HA-30% kekerasannya lebih tinggi dibandingkan HA-0% ($p = 0,009$), HA-10% ($p = 0,009$) maupun HA-20% ($p = 0,026$). Kekerasan siler HA-40% menurun dibandingkan dengan HA-30% ($p = 0,009$), 20% ($p = 0,008$) maupun 10% ($p = 0,009$), tetapi tidak berbeda dengan siler HA-0% ($p = 0,347$). sealer HA-50% menunjukkan kekerasan mikro yang lebih kecil ($p < 0,05$) dibandingkan semua kelompok bahan coba sealer maupun kelompok kontrol (Tabel 3).

PEMBAHASAN

Penambahan partikel bahan pengisi dapat meningkatkan viskositas bahan adesif.²⁰ Viskositas suatu bahan

berhubungan langsung dengan daya pembasahan (*wettability*) bahan tersebut. *Wettability* merupakan hasil interaksi molekuler antara adesif dengan aderen atau substrat yang merupakan perlawanan terhadap daya kohesi bahan adesif dan merupakan faktor yang sangat menentukan terjadinya adesi yang baik dengan aderen. Agar bahan adesif dapat mengalir dan melekat pada permukaan substrat viskositas bahan tersebut harus rendah.⁴ *Wettability* secara tidak langsung dapat diketahui dengan mengukur sudut kontak. Secara umum dikatakan bahwa sudut kontak yang kecil didapatkan apabila tegangan permukaan bahan adesif rendah dan energi permukaan aderen atau substrat tinggi. Pada penelitian ini HA sintesis kalsit yang digunakan sebagai bahan pengisi berukuran kristal 77,721–88,710 nm¹⁷ dan menunjukkan hasil bahwa viskositasnya tidak berbeda dengan yang tanpa penambahan bahan pengisi. Hal ini dapat dilihat dari pengukuran sudut kontak yang menunjukkan tidak ada perbedaan antara kelompok kontrol (tanpa HA) maupun semua kelompok sealer dengan tambahan bahan pengisi HA sintesis kalsit (kelompok HA 10%, 20%, 30%, 40% dan 50%). Pada semua kelompok menunjukkan bahwa sudut kontaknya $< 90^\circ$. Ini menunjukkan bahwa penambahan HA sintesis kalsit tidak mengubah kemampuan pembasahan (*wettability*) dari siler epoxy tersebut. Kemampuan pembasahan suatu adesif dikatakan baik apabila sudut kontaknya kurang dari 90° dan dikatakan ideal apabila adesif dapat menyebar di seluruh permukaan aderen dengan sudut kontak 0° .⁴ Apabila bahan adesif sudut kontaknya $< 90^\circ$ maka bahan adesif dapat mengalir dan melekat dengan mudah, artinya bahan sealer ini dapat mengalir, mengisi celah yang kosong antara guta perca dan dinding saluran akar, berpenetrasi pada permukaan dentin saluran akar tanpa menghasilkan porositas pada antar permukaannya. Pada akhirnya bahan sealer yang sudah berpenetrasi akan mengeras dan menghasilkan ikatan yang berpautan (*interlocking bonding*) dengan struktur mikro dari dentin saluran akar dan menghasilkan retensi mikromekanikal sehingga kerapatan apikalnya bagus. Pemilihan bahan-bahan resin epoxy sebagai siler antara lain karena sifat *flow*nya yang tinggi dan viskositasnya rendah. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penambahan HA sintesis kalsit pada sealer resin hingga 50% terbukti tidak meningkatkan viskositasnya. Hal ini kemungkinan karena partikel HA kalsit yang digunakan sebagai bahan pengisi berukuran nano yaitu antara 77,721–88,710 nm, sehingga siler resin ini dapat digolongkan dalam klasifikasi *nanofiller*.

Pada uji ketebalan film (*film thickness*) semua kelompok siler baik kontrol maupun dengan penambahan HA sintesis kalsit menunjukkan bahwa ketebalan filmnya < 50 um. Menurut ISO 6876 sesuai dengan cara pengujian yang dilakukan dikatakan bahwa ketebalan ideal suatu sealer tidak boleh melebihi 50 um.¹⁸ Apabila ketebalan film bahan adesif melebihi 50 um maka bahan sealer akan sulit dimanipulasi sehingga mempengaruhi adaptasi sealer dengan dinding saluran akar. Pada penelitian ini terlihat bahwa penambahan HA sintesis kalsit tidak menurunkan

daya pembasahannya maupun meningkatkan ketebalan filmnya. Semakin tipis *film thickness* maka sealer akan semakin mudah diaplikasikan pada dinding saluran akar dan semakin mudah mengalir serta mengisi celah antara guta perca dengan dinding saluran akar.

Hasil pengukuran kekerasan mikronya, walaupun kekerasan mikro tidak berhubungan langsung dengan pelekatan, akan tetapi dapat dijadikan tolak ukur untuk menentukan tingkat polimerisasi atau derajat konversi sealer resin tersebut.²¹ Derajat konversi merupakan jumlah persentase ikatan ganda karbon yang telah menjadi ikatan tunggal membentuk polimer. Derajat konversi diperoleh dengan mengurangi persentase ikatan rangkap karbon dari 100%.^{22,23}

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa penambahan hidroksiapatit sebagai bahan pengisi dapat meningkatkan kekerasan bahan sealer. Ini sesuai dengan hasil penelitian terdahulu yang menyatakan bahwa penambahan bahan pengisi dapat meningkatkan sifat fisik maupun mekanis suatu resin.^{24,25} Selain meningkatkan kekerasan resin bahan pengisi dapat mengurangi koefisien termal ekspansi, pengerutan polimerisasi (*polymerization shrinkage*) dan memudahkan aplikasinya. Hidroksiapatit sintesis kalsit sebagai bahan pengisi tidak bereaksi dengan bahan-bahan *siler* tetapi partikelnya akan penetrasi diantara partikel-partikel resin epoksi, *hexamethylen-tetramine* dan *bismuth oxide*. Hidroksiapatit yang terdiri atas unsur kalsium dan fosfat, yang merupakan unsur utama jaringan keras gigi baik email maupun dentin, ternyata dapat meningkatkan kekerasan sealer.

Hasil penelitian didapatkan bahwa penambahan HA-10%, 20% dan 30% dapat meningkatkan kekerasan sealer. Akan tetapi pada penambahan HA-40% tidak menunjukkan peningkatan kekerasan walaupun apabila dibandingkan dengan HA-0% kekerasannya sama, sedangkan pada penambahan HA-50% terjadi penurunan kekerasan. Hal ini menunjukkan bahwa ada batasan tertentu pada penambahan bahan pengisi agar dapat meningkatkan sifat sealer. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penambahan HA sintesis kalsit akan meningkatkan kekerasan apabila tidak lebih dari 30%, dan pada penambahan 30% menunjukkan kekerasan paling tinggi dibandingkan kelompok lainnya.

Penurunan kekerasan mikro pada kelompok HA-50% menunjukkan terjadi gangguan pada proses polimerisasi. Proses polimerisasi resin epoxy dipicu dengan adanya *hexamethylen-tetramine*. Penambahan hidroksiapatit yang melebihi volume *hexamethylen-tetramine* sebagai katalisator, jumlahnya menjadi tidak cukup untuk menghasilkan reaksi polimerisasi yang sempurna. Polimerisasi yang tidak sempurna akan menyisakan lebih banyak monomer sisa yang tidak berikatan, akibatnya kekerasan sealer akan menurun. Kekerasan sealer rendah menunjukkan bahwa polimerisasi tidak sempurna atau derajat konversinya rendah, secara tidak langsung akan mempengaruhi kerapatan apikalnya. Sealer resin yang tidak terpolimerisasi sempurna akan meningkatkan sensitivitas

sealer terhadap lingkungan. Idealnya resin sealer yang terpolimerisasi dengan sempurna akan mempunyai sifat fisik dan kimiawi yang sempurna yang ditunjukkan dengan tidak larutnya sealer pada lingkungan lembab. Pada penggunaan klinis sealer selalu akan berkontak dengan jaringan yang lembab yaitu jaringan periodontal karena adanya foramen apikal, kanalis lateralis maupun asesoris yang menghubungkan bahan obturasi saluran akar dengan jaringan periodontal.

Sealer dengan derajat konversi yang rendah atau yang tidak terpolimerisasi sempurna akan lebih mudah larut dalam jaringan periodontal. Pada kondisi lembab monomer yang tidak terpolimerisasi akan lebih cepat terlepas dari resin polimer sehingga mempengaruhi sifat fisik sealer yaitu mengurangi adaptasi sealer dengan dinding saluran akar.^{26,27} Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada batasan tertentu penambahan HA sintesis kalsit sebagai bahan pengisi (*filler*) dapat meningkatkan sifat fisis bahan yang berarti meningkatkan kualitas bahan, sebaliknya pada batasan tertentu penambahan bahan pengisi HA justru menurunkan kualitas fisik bahan. Penambahan bahan pengisi juga dipercaya akan mengurangi pengerutan polimerisasi sealer resin ini. Pengerutan polimerisasi terjadi selama proses polimerisasi berlangsung, yaitu dengan memendeknya jarak antar monomer.²⁸ Bahan pengisi HA sintesis kalsit yang berpenetrasi di antara partikel monomer *epoxy A-diglycidyl*, *hexamethylen-tetramine* dan *bismuth oxide* akan mencegah terjadinya pemendekan jarak antar monomer sehingga pengerutan polimerisasinya juga berkurang.

Dari penelitian ini didapatkan hasil bahwa penambahan HA sintesis kalsit 10% hingga 50% sebagai bahan pengisi *siler resin epoxy* tidak mempengaruhi kemampuan pembasahan (*wettability*) dan ketebalan film (*film thickness*) tersebut, artinya secara fisik *siler* tersebut memenuhi syarat utama *siler* saluran akar. Selain itu penambahan HA sintesis kalsit hingga 30% dapat meningkatkan kekerasannya, tetapi penambahan hingga 50% justru menurunkan kekerasannya. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa penambahan hingga 50% HA sintesis kalsit sebagai bahan pengisi *siler* resin epoksi tidak mempengaruhi sudut kontak dan ketebalan film sedangkan kekerasan sealer dapat ditingkatkan dengan menambahkan HA sintesis kalsit maksimum hingga 30%.

DAFTAR PUSTAKA

- Glickman GN, Walton RE. Obturation. In: Torabinejad M, Walton RE, eds. *Endodontic principles and practice*. 4th ed. China: Saunders Elsevier; 2009. p. 298-339.
- Johnson WT, Kulild JC. Obturation of the cleaned and shaped root canal system. In: Hargreaves, Cohen, eds. *Pathways of the pulp*. 10th ed. China: Mosby Elsevier; 2011. p. 349-88.
- Gutmann JL, Dumsha TC, Lovdahl PE. *Problem solving in endodontics*. 4th ed. St. Louis: Mosby Elsevier; 2006. p. 197-238.
- Sakaguchi RL, Power JM. *Craigs restorative dental materials*. 12th ed. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2012. p. 327-47.

5. Roberts S, Kim JR, Gu LS, Kim YK, Mitchell QM, Pashley DH, Tay FR. The efficacy of different sealer removal protocols on bonding of self-etching adhesives to AH plus-contaminated dentin. *J Endod* 2009; 35(4): 563-7.
6. Huang TH, Yang JJ, Li H, Kao CT. The biocompatibility evaluation of epoxy resin-based root canal sealers in vitro. *Biomaterials* 2002; 23(1): 77-83.
7. Markovic D, Zivijinovic V, Kokovic V, Jokanovic V. Hydroxyapatite as root canal system filling material: cytotoxicity testing. *Materials Science Forum* 2004; 453: 555-60.
8. Khashaba RM, Moussa MM, Chutkan NB, Borke JL. The response of subcutaneous connective tissue to newly developed calcium phosphate-based root canal sealers. *Int Endod J* 2011; 44(4): 342-52.
9. Collares FM, Leitune VC, Rostirolla FV, Trommer RM, Bergmann CP, Samuel SM. Nanostructured hydroxyapatite as filler for methacrylate-based root canal sealers. *Int Endod J* 2012; 45(1): 63-7.
10. Domingo C, Arcés RW, Osorio E, Osorio R, Fanovich MA, Rodríguez-Clemente R, Toledano M. Hydrolytic stability of experimental hydroxyapatite-filled dental composite materials. *Dent Mater* 2003; 19(6): 478-86.
11. Shojai S. Effect of HA nanofiber on the properties of dental adhesive. *Dental Mater* 2010; 26: 471-82.
12. Hayashi Y, Imai M, Yanagiguchi K, Vilorio IL, Ikeda T. Hydroxyapatite applied as direct pulp capping medicine substitutes for osteodentin. *J Endod* 1999; 25(4): 225-9.
13. Anusavice KJ. *Phillips science of dental material*. 11th ed. St Louis: Elsevier Science; 2003. p. 752-53.
14. Okamoto H, Arai K, Matsune K, Hirukawa S, Matsunaga S, Kiba H. The Usefulness of new hydroxyapatite as a pulp capping agent in rat molars. *J Oral Med Sci* 2006; 5: 50-6.
15. Hargreaves KM, Goodis HE. *Seltzer and Bender's: dental pulp*. 3rd ed. China: Quintessence Book Pub Co, Inc; 2002. p. 309-24.
16. Sukandarrumidi. *Bahan galian industri*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press; 2004. h. 45-105.
16. Syamsudin. *Analisis uji tekan dan porositas materials kompaksi sinter Ha-ZnO sebagai material substitusi tulang*. Tesis. Yogyakarta: Sekolah Pasca Sarjana Universitas Gadjah. Mada; 2010. h. 43-72.
17. Bhavan M, Shah B, Marg Z. *ISO 6876: Indian standard. Dental root canal sealer materials*. New Delhi: Bureau of Indian Standards; 2012. p. 1-5.
18. Safarcherati H, Alaghehmand H. Hardness of composite resin polimeriuzed with different light-cure units. *Caspian J Dent Res* 2012; 1: 32-5.
19. Hanemann T. Influence of particle properties on the viscosity of polymer alumina composit. *Ceramics International* 2008; 34: 2099-105.
20. Thiab SS. Influence of light curing method and curing time on the surface hardness and degree of cure in composite resins. *J Babylon Univ* 2012; 2: 778-95.
21. Finan L, Palin WM, Moskwa N, McGinley EL, Fleming GJ. The influence of irradiation potential on the degree of conversion and mechanical properties of two bulk-fill flowable RBC base materials. *Dent Mater* 2013; 29(8): 906-12.
22. Salazar DC, Dennison J, Yaman P. Inorganic and prepolymerized filler analysis of four resin composites. *Oper Dent* 2013; 38(6): E201-9.
23. Hervás-García A, Martínez-Lozano MA, Cabanes-Vila J, Barjau-Escribano A, Fos-Galve P. Composite resins. A review of the materials and clinical indications. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 11(2): E215-20.
24. Lombardini M, Chiesa M, Scribante A, Colombo M, Poggio C. Influence of polymerization time and depth of cure of resin composites determined by Vickers hardness. *Dent Res J (Isfahan)* 2012; 9(6): 735-40.
25. Malacarne J¹, Carvalho RM, de Goes MF, Svizero N, Pashley DH, Tay FR, Yiu CK, Carrilho MR. Water sorption/solubility of dental adhesive resins. *Dent Mater* 2006; 22(10): 973-80.
26. Ghulman MA. Effect of cavity configuration (C factor) on the marginal adaptation of low-shrinking composite: a comparative ex vivo study. *Int J Dent* 2011; 2011: 159749.
27. Lee IB, Cho BH, Son HH, Um CM. A new method to measure the polymerization shrinkage kinetics of light cured composites. *J Oral Rehabil* 2005; 32(4): 304-14.

Research Report

***Prevotella intermedia* and *Porphyromonas gingivalis* in dental caries with periapical granuloma**Risya Cilmiaty,¹ Afiono Agung Prasetyo,^{2,3,4} Khilyat Ulin Nur Zaini,^{3,4} Mandojo Rukmo,⁵ Suhartono Taat Putra⁶ and Widya Asmara⁷¹Department of Dental and Oral Disease, Faculty of Medicine, Universitas Sebelas Maret, Surakarta-Indonesia²Department of Microbiology, Faculty of Medicine Universitas Sebelas Maret, Surakarta- Indonesia³A-IGIC Research Group, Universitas Sebelas Maret, Surakarta-Indonesia⁴Center of Biotechnology and Biodiversity Research and Development, Universitas Sebelas Maret, Surakarta-Indonesia⁵Department of Conservative Dentistry, Faculty of Dentistry Universitas Airlangga, Surabaya-Indonesia⁶Department of Pathobiology, Faculty of Medicine Universitas Airlangga, Surabaya-Indonesia⁷Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta-Indonesia**ABSTRACT**

Background: Dental caries with necrotic pulp is a multifactorial disease that attacks enamel involving tooth pulp. The anaerobic bacteria infection in the pulp chamber could induce the formation of periapical granuloma. However, the presence of the most frequently anaerobic bacteria identified in apical periodontitis, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*, in periapical granuloma have not been confirmed. **Purpose:** The aims of study were to determine the presence of *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in dental caries with necrotic pulp and to determine its relation to periapical granuloma. **Methods:** Thirty-six patients of dental caries with necrotic pulp in Dr. Moewardi General Hospital in Surakarta, Indonesia were involved and classified into two groups, the group of patients with periapical granuloma and the group of patients without periapical granuloma. The caries tooth was extracted, and the chronic periapical tissue was swabbed and cultured on blood agar medium in anaerobic condition. The bacterial DNA was extracted from the positive cultures and subjected for Polymerase Chain Reaction (PCR). **Results:** Periapical granuloma was more likely found in women (OR 5.5, 95% CI=1.277-23.693; RR 2.5, 95% CI= 1.025-6.100). Black colonies bacteria were associated with periapical granuloma (OR 2.2, 95% CI=0.517-9.594; RR 1.5, 95% CI=0.655-3.623). *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* were detected in group with or without periapical granuloma, however, only *Prevotella intermedia* was associated with periapical granuloma (OR 1.6, 95% CI=0.418-5.903; RR 1.3, 95% CI=0.653-2.393). **Conclusion:** The presence of *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in periapical granuloma were confirmed, however, only *Prevotella intermedia* were associated with periapical granuloma.

Key words: Dental caries, necrotic pulp, periapical granuloma, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*

ABSTRAK

Latar belakang: Karies gigi dengan pulpa nekrosis adalah penyakit multifaktorial yang menyerang enamel hingga ruang pulpa gigi. Infeksi bakteri anaerob di pulpa nekrosis dapat menginduksi pembentukan granuloma periapikal. Namun, keberadaan bakteri anaerob yang paling banyak ditemukan di periodontitis apikal, *Porphyromonas gingivalis* dan *Prevotella intermedia*, di granuloma periapikal masih perlu diteliti. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan meneliti keberadaan bakteri *Porphyromonas gingivalis* dan *Prevotella intermedia*, di karies gigi dengan pulpa nekrosis dan menganalisis kaitannya dengan granuloma periapikal. **Metode:** Tiga puluh enam pasien karies gigi dengan pulpa nekrosis di Rumah Sakit Umum Dr. Moewardi di Surakarta Indonesia dilibatkan dan diklasifikasikan dalam dua kelompok yaitu kelompok pasien dengan granuloma periapikal dan kelompok pasien tanpa granuloma periapikal. Gigi karies diekstraksi dan jaringan periapikal kronis diusap dan dikultur di media agar darah dalam kondisi anaerob. DNA bakteri diekstrak dari kultur yang positif dan dilakukan pemeriksaan dengan Polymerase Chain Reaction (PCR). **Hasil:** Granuloma periapikal lebih banyak ditemukan pada wanita (OR 5,5, 95% CI= 1,277-23,693; RR 2,5, 95% CI= 1,025-6,100). Koloni bakteri berwarna hitam diasosiasikan dengan granuloma periapikal (OR 2,2, 95% CI= 0,517-9,594; RR 1,5, 95% CI= 0,655-3,623). *Porphyromonas gingivalis* dan *Prevotella*

intermedia terdeteksi di jaringan karies dental dengan atau tanpa granuloma periapikal, namun hanya *Prevotella intermedia* yang diasosiasikan dengan granuloma periapikal (OR 1,6, 95% CI= 0,418-5,903; RR 1,3, 95% CI= 0,653-2,393). **Simpulan:** *Porphyromonas gingivalis* dan *Prevotella intermedia* ditemukan di granuloma periapikal, namun hanya *Prevotella intermedia* yang terkait langsung dengan granuloma periapikal.

Kata kunci: Karies gigi, pulpa nekrosis, granuloma periapikal, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*

Correspondence: Afiono Agung Prasetyo, c/o: Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36 A Surakarta 57126, Indonesia. Email: afie.agp.la@gmail.com atau afieagp@yahoo.com

INTRODUCTION

Dental caries is characterized by the progressive demineralization of enamel, following acid metabolism by the bacteria.¹ The Indonesian population in range of age 15 years old or older, 71.2% had caries and 52.3% cases are untreated.² The untreated dental caries could lead into necrotic pulp, and infection of the root canal system resulting a disruption at the apical.³⁻⁵ In some case, the tooth become sensitive that is caused by hyperemia, edema and inflammation of the apical periodontal.⁶

Endodontic and periodontal infections are commonly found preceded by caries process and associated with anaerobic bacteria, including that of the black-pigmented bacteria, *Porphyromonas spp.* and *Prevotella spp.*⁷⁻⁹ The most frequently identified in acute and chronic apical periodontitis are *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*.^{9,10} As gram-negative bacteria, both bacteria have lipopolysaccharide (LPS) in the cell wall, which can induce macrophage to release pro-inflammatory cytokines such as interleukin-8 (IL-8), IL-1 β , interferon gamma (IFN- γ) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α), causing tissue inflammation and bone resorption.^{7,11} The bacteria also have exopolysaccharides (EPS) which can enhance their virulence.¹² *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) has occurred between family members¹³ and the bacteria presentation in periodontitis tissue also indicative of alveolar bone loss.¹⁴ *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) has ability to invade and evade the host innate response, so the possibility of infection will be increased.¹⁴ However,

the role of both bacteria in periapical granuloma have not been elucidated.

The presence of periodontal pathogen may affected by ethnic and geography.¹³ In Indonesia, the presence of *P. gingivalis* and *P. intermedia* are quite high in oral cavity, but there is lack information concerning the bacteria of chronic periapical tissue due to dental caries. The aims of study were to determine the presence of *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in dental caries with necrotic pulp and to determine its relation to periapical granuloma.

MATERIALS AND METHODS

Chronic periapical tissue of permanent teeth from dental caries patients aged 17-57 years old with normal albumin levels and no anemia at Dr. Moewardi General Hospital, in Surakarta, Indonesia were assayed in the study. All patients had no antibiotic and or immunosuppressant therapy prior the tooth extraction. None patient had systemic disease. The sample size was 9 in every group, calculated as previously published.¹⁶ The sample used was doubled for each group. Finally, the total sample used was 36, were classified into two groups, with and without periapical granuloma, based on following dental radiographic criteria: well-circumscribed radiolucent periapical lesion attached to the root apex and measured less than 1 cm^{6,17} (Figure 1A and 1B).

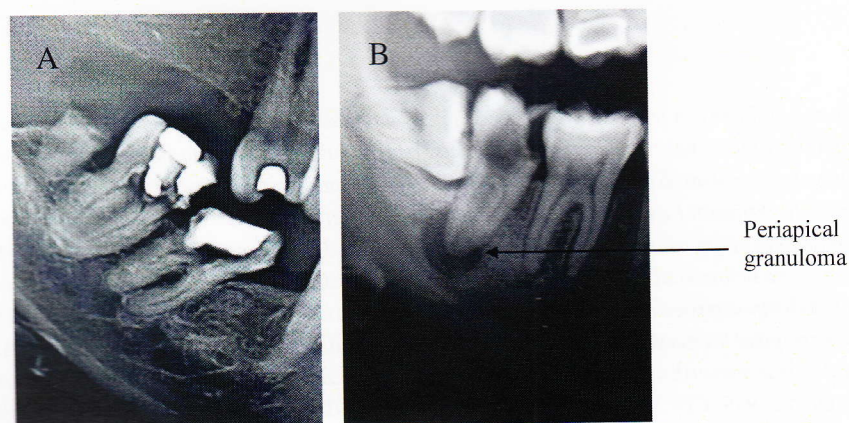
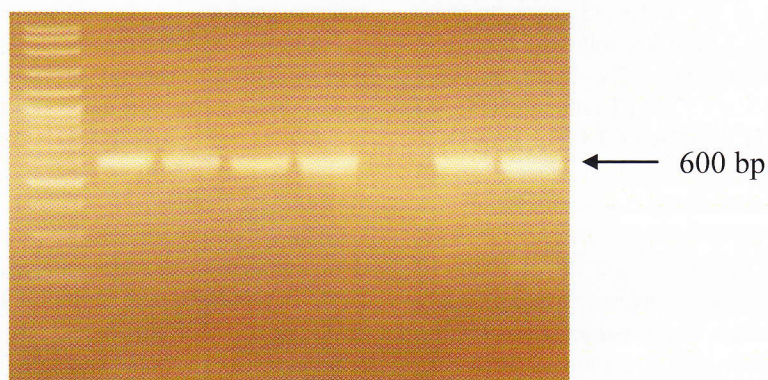
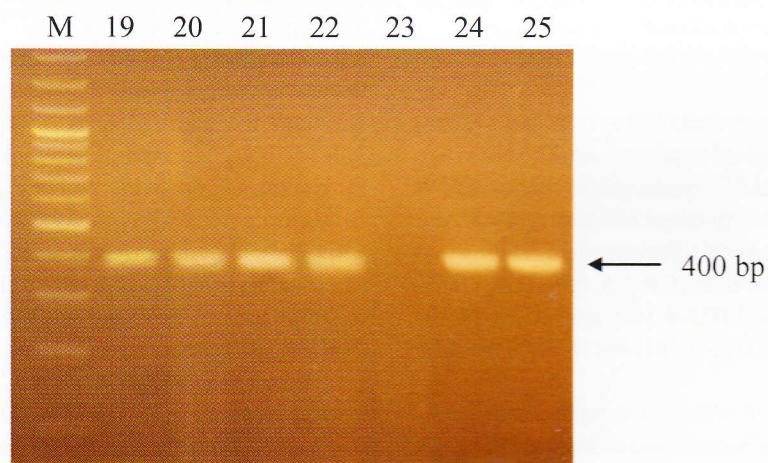


Figure 1. The radiographic of tooth (A) without periapical granuloma, (B) with periapical granuloma (radiolucent).

Table 1. Age, gender, dental element and radiographic of dental caries patients in General Hospital Dr. Moewardi in Surakarta.

		With periapical granuloma (n= 18)		Without periapical granuloma (n= 18)	
		N	%	N	%
Age	<21	5	27.8	4	22.2
	21-30	1	5.6	2	11.1
	31-40	8	44.4	2	11.1
	41-50	2	11.1	8	44.4
	>50	2	11.1	2	11.1
Gender	Men	4	22.2	11	61.1
	Women	14	77.8	7	38.9
Element	Quadrant 1	0	-	1	5.6
	Quadrant 2	4	22.2	7	38.9
	Quadrant 3	7	38.9	3	16.7
	Quadrant 4	7	38.9	7	38.9

**Figure 2.** A sample of electrophoresis result from PCR assay to detect the presentation of *P. gingivalis*'s DNA. PCR results from sample no. 19-25 were shown. M= VC 100bp Plus DNA Ladder (Vivantis, Selangor, Malaysia). *P. gingivalis*'s DNA was detected in sample no. 19-22 and 24-25.**Figure 3.** A sample of electrophoresis result from PCR assay to detect the presentation of *P. intermedia*'s DNA. PCR results from sample no. 19-25 were shown. M= VC 100bp Plus DNA Ladder (Vivantis). *P. intermedia*'s DNA was detected in sample no. 19-22 and 24-25.

Approval was obtained from institutional ethical committee review boards of the Faculty of Medicine of Universitas Sebelas Maret and Dr. Moewardi General Hospital in Surakarta, Indonesia. Informed consent was obtained from all patients involved in the study. Data including age, gender, dental elements and dental radiographic were obtained from all patients.

The caries tooth from each patient was extracted and the chronic periapical tissue was swabbed. The swab was then smeared on blood agar medium and incorporated into anaerobic jar with Gas generating kit (Thermo Scientific, Hampshire, United Kingdom) at 37° C for 7-14 days. The present study was focused on *P. gingivalis* and *P. intermedia*, so only the black-pigmented bacteria colonies' DNA were extracted using a High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Molecular Diagnostics, Mannheim, Germany), according to the manufacturer's instructions. The *P. gingivalis*' DNA was detected using 5' - AGG CTT CAG GCC ATA CTG CG - 3' and 5' - ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT - 3' set primer. Briefly, the PCR reaction was performed by initial denaturation at 94° C for 5 minutes, 40 cycles of 94° C for 45 seconds, 66° C for 1 minute and 72° C for 2 minutes, followed by a final extension at 72° C for 10 minutes. The *P. intermedia*'s DNA was detected using 5' - TTT GTT GGG GGG GAG TAA AGC - 3' and 5' - TCA ACA TCT CTG TAT CCT GCG T - 3' set primer. The PCR reaction was performed by initial denaturation at 94° C for 5 minutes, 40 cycles of 94° C for 45 seconds, 62° C for 1 minute and 72° C for 2 minutes followed by a final extension at 72° C for 10 minutes. All PCR reaction was performed using Ready To Go PCR Bead (Promega, Buckinghamshire, United Kingdom). The PCR products were then subjected to electrophoresis in 1% agarose gels, stained with Ethidium Bromide, and visualized under ultraviolet illumination. The data was analyzed by SPSS version 16 software (SPSS, Chicago, IL). A 95% confidence interval (CI) was used for all data analysis.

RESULTS

Thirty-six dental caries patients (19 women and 17 men) with necrotic pulp were agreed to participate. The mean age of the patients studied was 35.7 years old (in range of 17 to 57 years old) and the most frequent element was derived from 4th quadrant (38.9%, 14/36). Periapical granuloma was found in 77.8% (14/18) women (OR 5.5, 95% CI= 1.277-23.693; RR 2.5, 95% CI= 1.025-6.100) and 22.2% (4/18) men (OR 0.2; 95% CI= 0.042-0.783; RR 0.400; 95% CI= 0.164-0.976) (Table 1).

Twenty-five of the 36 (69.4%) samples had black-pigmented bacteria. These bacteria were identified in 77.8% (14/18) periapical granuloma's samples (OR 2.2, 95% CI= 0.517-9.594; RR 1.3, 95% CI=0.817-1.983) and 61.1% (11/18) of non periapical granuloma's samples (OR 0.4, 95% CI= 0.104-1.934; RR 0.8, 95% CI= 0.504-1.224). *P.*

gingivalis's DNA was detected (Figure 2) in 64.3% (9/14) of black colonies from periapical granuloma's samples and 63.6% (7/11) of black colonies from non periapical granuloma's samples ($p= 1.00$) and had no association with periapical granuloma formation (OR 1.0, 95% CI= 0.271-3.694). *P. intermedia*'s DNA was detected (Figure 3) in 57.1% (8/14) of black colonies from periapical granuloma's samples (OR 1.6, 95%CI= 0.418-5.903; RR 1.3, 95% CI=0.653-2.393). Co-infection of *P. gingivalis* and *P. intermedia* was detected only in 33.3% (6/18) periapical granuloma's samples (OR 1.0, 95% CI= 0.250-3.999; RR 1.0, 95% CI= 0.500-1.999).

DISCUSSION

Dental caries with necrotic pulp is a multi-causal disease that attacks the enamel and reach tooth pulp chamber, causing destruction structure of the tooth, and open the door to bacterial infection.^{1,4} The bacterial infection can activate host immune response to isolate and eradicate microorganisms or chronic irritants, causing periapical granuloma, an inflammatory reaction in the apex of non-vital tooth. The inflammatory tissue of periapical granuloma (containing macrophages, polymorphonuclear leukocytes and lymphocytes) is covered by epithelial cells and ultimately results in destruction of the alveolar bone surrounding the tooth.^{7,8}

The *P. gingivalis* and *P. intermedia* already known dominant in primary endodontic infection due to its content, LPS.⁸ LPS induces pulp fibroblast and osteoblast to produce IL-8. The IL-8 then attracts and activates polymorphonuclear leukocytes to surround and kills the bacteria, stimulates osteoclast activity and causes pain symptom in periapical lesion. The LPS also activates macrophages through CD14 receptor to produce pro-inflammatory mediators, IL-1 and TNF- α . IL-1 then induces the production of IL-12, TNF- α , IFN- γ and IL-1 itself. In human periapical lesion, IL-1 β , one variant of IL-1, is predominant and stimulates T-lymphocytes; enhances bone resorption and inhibits bone formation. The macrophages and T-lymphocytes in the inflammatory tissue also produce TNF- α . The TNF- α activates the macrophages, T-lymphocytes and natural killer cells and also stimulates bone resorption. However, if the bacteria (*P. gingivalis* and or *P. intermedia*) are difficult to be eliminated, T-lymphocyte would lead B-lymphocyte activation, to synthesize the antibody to bacterial antigen. The bacterial-antibody formation will attract activated-macrophages to surround and phagocyte the formation. Finally, all reaction will causes periapical granuloma formation in the root of the tooth.^{7,18-20}

P. gingivalis and *P. intermedia* are frequently detected in intraoral⁷⁻⁹ and the numbers of these bacteria are increase in the disease site compared with healthy site.⁹ In the present study, *P. gingivalis* and *P. intermedia* could be isolated from dental caries tissue, both of with and without periapical granuloma, consistent with previous reports,^{7,8,21}

however, only *P. intermedia* was associated with periapical granuloma.

In the present study, periapical granuloma was more likely found in women than in men. LPS of bacteria induces production of IL-1 β and TNF- α .¹¹ These pro-inflammatory cytokines could be influenced by sex hormone. Sex hormone, especially estrogen, already known significantly reduces *P. gingivalis* bacteria compared with *P. intermedia*.²¹ Testosterone also could reduce the expression of TNF- α and IL-1 β , so reduce the inflammation process.^{9,21-23} The study revealed that the presence of *P. gingivalis* and *P. intermedia* were confirmed in periapical granuloma and could be isolated in dental caries tissue; however, only *P. intermedia* had association with periapical granuloma. Further studies are needed to confirm and extend our findings.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported partially by grants from the APBN/DIPA UNS (No. 159a/UN27.11/PN/2013) and BOPTN UNS (No. 165/UN27.11/PN/2013).

REFERENCES

1. Deljo E, Cavaljuga S, Mescovic B. Prevalence of dental caries in the municipality gorazde during the period 2007-2012. *Mater Sociomed* 2013; 25(3): 163-6.
2. The Indonesian household health survey. Health profile of Indonesian 2004. Jakarta: Ministry of health republic of Indonesia; 2006. p. 19.
3. Bjørndal L. The caries process and its effect on the pulp: The science is changing and so is our understanding. *Pediatr Dent* 2008; 30(3): 192-6.
4. Martin F, Nadkarni M, Jacques N, Hunter N. Quantitative microbiological study of human carious dentine by culture and real-time PCR: Association of anaerobes with histopathological changes in chronic pulpitis. *J Clin Microbiol* 2002; 40(5): 1698-704.
5. Gomes GB, Sarkis-Onofre R, Bonow ML, Etges A, Jacinto RC. An investigation of the presence of specific anaerobic species in necrotic primary teeth. *Braz Oral Res* 2013; 27(2): 149-55.
6. Rajendran R. Shafer's textbook of oral pathology 6th ed. India: Elsevier; 2009. p. 482.
7. Garcia CC, Sempere FV, Diago MP, Bowen EM. The post-endodontic periapical lesion: Histologic and etiopathogenic aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007; 12(8): 585-90.
8. Narayanan L, Vaishnavi C. Endodontic microbiology. *J Conserv Dent* 2010; 13(4): 233-9.
9. Estrela CR, Pimenta FC, Alencar AH, Ruiz LF, Estrela C. Detection of selected bacterial species in intraoral sites of patients with chronic periodontitis using multiplex polymerase chain reaction. *J Appl Oral Sci* 2010; 18(4): 426-31.
10. Ge X, Rodriguez R, Trinh M, Gunsolley J, Xu P. Oral microbiome of deep and shallow dental pockets in chronic periodontitis. *PLoS One* 2013; 8(6): e65520.
11. Corcoran MP, Meydeni M, Lichtenstein AH, Schaefer EJ, Dillar A, Lamon-Fava S. Sex hormone modulation of proinflammatory cytokine and C-reactive protein expression in macrophages from older men and postmenopausal women. *J Endocrinol* 2010; 206(2): 217-24.
12. Yamanaka T, Yamane K, Furukawa T, Matshumoto-Mashimo C, Sugimori C, Nambu T, Obata N, Walker CB, Leung K, Fukushima H. Comparison of the virulence of exopolysaccharide-producing *Prevotella intermedia* to exopolysaccharide non-producing periodontopathic organism. *BMC Infect Dis* 2011; 11: 228.
13. Van Winkelhoff AJ, Rijnsburger MC, Abbas F, Timmerman MF, Van der Weijden GA, Winkle EG, Van der Velden U. Java project on periodontal disease: a study on transmission of *Porphyromonas gingivalis* in a remote Indonesian population. *J Clin Periodontol* 2007; 34(6): 480-4.
14. Chaves ES, Jeffcoat MK, Ryerson CC, Snyder B. Persistent bacterial colonization of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in periodontitis and its association with alveolar bone loss after 6 months of therapy. 2000; 27(12): 897-903.
15. Kononen E, Paju S, Pussinen PJ, Hyvonen M, Tella PD, Suominen-taipe L, Knuutila M. Population-based study of salivary carriage of periodontal pathogens in adults. *J Clin Microbiol* 2007; 45(8): 2446-51.
16. Sastroasmoro S, Ismael S. Dasar-dasar metodologi penelitian klinis. Edisi 2. Jakarta: Sagung Seto; 2002. p. 258-64.
17. Langland OE, Anglais RP, Preece JW. Principle of dental imaging. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002. p. 413.
18. Nair PNR. Pathogenesis of apical periodontitis and causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15(6): 348-81.
19. Yang LC, Huang FM, Lin CS, Liu CM, Lai CC, Chang YC. Induction of interleukin-8 gene expression by black-pigmented bacteroides in human pulp fibroblast and osteoblast. *Int Endod J* 2003; 36(11): 774-9.
20. Graunaite I, Lodiene G, Maciulskiene V. Pathogenesis of apical periodontitis: a literature review. *J Oral Maxillofac Res* 2011; 3(4): e1.
21. Tarkkila L, Kari K, Furuholm J, Tiitinen A, Meurman J. Periodontal disease-associated micro-organisms in peri-menopausal and postmenopausal women using or not using hormone replacement therapy. A two-year follow-up study. *BMC Oral Health* 2010; 10: 10.
22. Blasco-Baque V, Serino M, Vergnes J, Riant E, Loubieres P, Arnal J, Gourdy P, Sixou M, Burcelin R, Kemoun P. High-fat diet induces periodontitis in mice through lipopolysaccharides (LPS) receptor signaling: Protective action of estrogens. *PLoS One*. 2012; 7(11): e48220.
23. Saitoa A, Inagaki S, Ishihara K. Differential ability of periodontopathic bacteria to modulate invasion. *Microb Pathog* 2009; 47(6): 329-33.

Research Report

Antifungal effect of *Sticophus hermanii* and *Holothuria atra* extract and its cytotoxicity on gingiva-derived mesenchymal stem cell

Kristanti Parisihni and Syamsulina Revianti

Department of Oral Biology

Faculty of Dentistry, Universitas Hang Tuah

Surabaya – Indonesia

ABSTRACT

Background: Sea cucumber had been acknowledged to have some medical properties *Sticophus hermanii* and *Holothuria atra* are species of sea cucumber which has been known to have antifungal properties thus potentially explored as therapeutic agent in oral candidiasis. **Purpose:** The aim of this study was to examine the antifungal property *Sticophus hermanii* and *Holothuria atra* extract against *Candida albicans* and its cytotoxicity to human gingiva-derived mesenchymal stem cell. **Methods:** The study was an experimental laboratories research with post test only control group design. Methanolic extract of *Sticophus hermanii* and *Holothuria atra* in concentrations of 1%, 0.5%; 0.25%; 0.13%, 0.07%; 0.03%, 0.02% and 0.01%; were tested its cytotoxicity on gingiva-derived mesenchymal stem cell. Cell viability were measured by MTT assay. The antifungal property against *Candida albicans* was tested by disk diffusion method. Data were analyzed by ANOVA followed by LSD. **Results:** Extract of *Sticophus hermanii* showed no cytotoxicity in all concentrations ($p > 0.05$), while *Holothuria atra* showed toxicity in the concentration of 1% and not cytotoxic in the concentrations below ($p < 0.05$). Both sea cucumber extract could inhibit the growth *Candida albicans*, in vitro, proved by the clear zone around the disc in all concentrations ($p < 0.05$). **Conclusion:** *Sticophus hermanii* and *Holothuria atra* extract had the antifungal effect against *Candida albicans*. Sea cucumber extract were not cytotoxic to gingiva-derived mesenchymal stem cell in the concentration of *Sticophus hermanii* $\leq 1\%$ and *Holothuria atra* $\leq 0.5\%$.

Key words: *Sticophus hermanii*, *Holothuria atra*, cytotoxicity, gingival, mesenchymal stem cell

ABSTRAK

Latar belakang: Teripang telah diketahui mempunyai berbagai khasiat medis. *Sticophus hermanii* dan *Holothuria atra* adalah spesies teripang yang telah diketahui mempunyai sifat anti jamur sehingga sangat potensial untuk dieksplorasi sebagai agen terapeutik pada infeksi di rongga mulut. **Tujuan:** Tujuan dari penelitian ini adalah untuk meneliti sifat anti jamur ekstrak *Sticophus hermanii* dan *Holothuria atra* terhadap *Candida albicans* dan sitotoksitasnya terhadap stem sel mesenkimal yang berasal dari gingiva manusia. **Metode:** Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan rancangan post test only control group design. Ekstrak metanol *Sticophus hermanii* dan *Holothuria atra* pada konsentrasi 1%, 0,5%; 0,25%; 0,13%, 0,07%; 0,03%, 0,02% and 0,01% diuji sitotoksitasnya terhadap stem sel mesenkimal yang berasal dari gingiva. Viabilitas sel diukur dengan menggunakan metode MTT. Sifat anti jamur terhadap *Candida albicans* diuji dengan metode difusi. Data dianalisis dengan ANOVA dan LSD. **Hasil:** Ekstrak *Sticophus hermanii* tidak menunjukkan adanya toksisitas pada seluruh konsentrasi ($p > 0,05$), sedangkan *Holothuria atra* menunjukkan adanya toksisitas pada konsentrasi 1% dan tidak toksik pada konsentrasi di bawahnya ($p < 0,05$). Kedua ekstrak mampu menghambat

pertumbuhan *Candida albicans* in vitro yang ditunjukkan dengan adanya zona jernih disekitar disk pada semua konsentrasi ($p < 0,05$).

Simpulan: Ekstrak *Sticophus hermanii* dan *Holothuria atra* mempunyai daya anti jamur terhadap *Candida albicans*. Ekstrak teripang bersifat tidak toksik terhadap stem sel mesenkimal yang berasal dari gingiva masing-masing pada konsentrasi *Sticophus hermanii* $\leq 1\%$, dan *Holothuria atra* $\leq 0,5\%$.

Kata kunci: *Sticophus hermanii*, *Holothuria atra*, sitotoksitas, gingiva, stem sel mesenkimal

Correspondence: Kristanti Parisihni, c/o: Bagian Biologi Oral, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah. Jl. Arif Rahman Hakim No. 150 Surabaya 60111, Indonesia. E-mail: tanti_kris@yahoo.co.id

INTRODUCTION

Sea cucumbers belong to the phylum *Echinodermata*, meaning that, they are spiny-skinned, under the class *Holothuridea*. Sea cucumbers are important components of the marine ecosystem. Sea cucumbers, informally named as bêche-de-mer, or gamat, have long been used for food and folk medicine in the communities of Asia and Middle East.¹⁻⁶

Marine biota is the source of structurally unique natural products that are mainly accumulated in living organisms, not just as food consumption and industrial need but later has been known to have biomedical properties. Therapeutic properties and medicinal benefits of sea cucumbers can be linked to the presence of a wide array of bioactives especially triterpene glycosides (saponins), chondroitin sulfates, glycosaminoglycan (GAGs), sulfated polysaccharides, sterols (glycosides and sulfates), phenolics, cerberosides, lectins, peptides, glycoprotein, glycosphingolipids and essential fatty acids. Nutritionally, sea cucumbers have an impressive profile of valuable nutrients such as vitamin A, vitamin B1 (thiamine), vitamin B2 (riboflavin), vitamin B3 (niacin), and minerals, especially calcium, magnesium, iron and zinc.^{4,7}

Generally, most species of sea cucumber share the same bioactive compound mentioned above but in different level contain.^{4,7} Regarding to its contents, the aqueous and organic extracts from some sea cucumber species has been proved to have antioxidant and antiproliferative activities,^{3,4,7} immunomodulator^{1,4} while the other has been known to have antimicrobial properties on Gram negative, Gram positive bacteria^{2,4,8} and antifungal action.^{4,9,10,11}

Candidiasis is the most common fungal infection in oral cavity caused by *Candida albicans*, which its prevalence raised specially along with the raise prevalence of HIV-AIDS.^{12,13} A natural source of antifungal agent could become the novel alternative solution in therapy of oral candidiasis.

Considering to the bioactive compound, the extract of *Sticophus hermanii* and *Holothuria atra* are potentially explored its antifungal property to *Candida albicans* and as the potential candidate therapeutic agent in oral candidiasis,^{8,14} its cytotoxicity should be well identified to assure the biocompatibility to oral cells.¹⁵ During the

last years, the interest of in vitro systems as an alternative to animal experiments in toxicological research has been steadily increasing.¹⁶⁻¹⁸ Stem cells and their derivatives represent a promising opportunity for developing in vitro, human cell assays that would ultimately replace, enhance, or surpass the current models that are used for predictive toxicology.¹⁹⁻²³

In this paper, two sea cucumber extract *Sticophus hermanii* and *Holothuria atra* were studied its antifungal property to *Candida albicans* and its cytotoxicity to gingiva-derived mesenchymal stem cell. These two species of sea cucumber are found plenty in Karimun Jawa coastal and so far had been explored mostly for food consumption.¹² Considering to the bioactive compound, there are some opportunities to explore sea cucumber for medical properties and yield more great value on it specially in oral disease.

The aim of this study was to examine the antifungal property and cytotoxicity of various concentration of *Sticophus hermanii* and *Holothuria atra* extract on human gingiva-derived mesenchymal stem cell. The result of this study could be served as preliminary data to be continued in preclinical and clinical research with marine natural products which will probably result in novel therapeutic agents for the treatment of fungal infection in oral disease.

MATERIALS AND METHODS

Two sea cucumber species: *Sticophus hermanii* and *Holothuria atra* were collected from Karimun Jawa coastal region. Adult sea cucumber were selected to get the best extract result considering to its maximum secondary metabolite contents. The collected samples were cleaned from dirt, immersed in water for one night to get rid of salt and parasite then dried in dryer machine. Sea cucumber then splitted, the inner abdomen were removed then cleaned and washed, so only the flesh of the body proceed to next process. Each samples were cut in small piece of 3-10 cm, the wet weight then measured then dried up in solar dryer for 3-4 days to reduce the water content. The dried sea cucumber then cut into smaller pieces of 1 cm, mashed by blender the the weight were measured and ready for the maceration process. Two hundred and fifty (250) gram

mashed dry sea cucumber sample immersed until soaked in 500 mL methanol solvent for 24 hours at room temperature, then filtered with filter paper to separate filtrate and residue.

Residue then reimmersed in 500 mL methanol solvent for 24 hours, again filtered with filter paper to separate filtrate and residue, resulted in maceration filtrate with the ratio of 250 gram sample / 1000 mL solvent (1:4 w/v). Methanol (polar) filtrate got homogenized with 1000 mL hexane solvent (non polar) then performed partition with separatory funnel the each of the filtrate layer of methanol and hexane solvent were separated. Methanol (polar) filtrate then got re-homogenized with 1000 mL chloroform solvent (semi polar), performed partition with separatory funnel the each of the filtrate layer of methanol and chloroform solvent were separated. Each filtrate were separated by its solvent with rotary evaporator until extract produced. The evaporated extract then placed in the vial and stored in -30°C until the next analysis.

Candida albicans were cultured in Sabouraud dextrose agar, suspension were prepared by inoculating one single loop of fungal colony to Sabouraud broth medium, incubated in 37°C for 24 hours and adjusted its turbidity to standard McFarland 0,5. The samples were divided into 5 groups each consisted of 6 samples i.e: positive control was given nystatin oral solution 100.000 IU, negative control was given DMSO 1%, treatment group were given *Sticophus hermanii* and *Holothuria atra* extract separately, each diluted by DMSO 1% with concentration of 20%, 40% and 80%. Antifungal activity test was performed by disk diffusion method on Mueller Hinton agar.

Fungal suspension of *Candida albicans* equal to 0,5McFarland was swabbed on to Muller Hinton agar plate. Sterile paper disks were immersed for 15 second into each concentration of extracts for treatment groups, for control negative groups in DMSO 1%, each, and for the positive control group in nystatin oral solution, then put on to Muller Hinton agar, gently pressed for a while and leave, incubated in 37°C for 48 hours. The clear zone around the disk showed inhibition effect to the growth of *Candida albicans*. Diameter of inhibition zone was measured with digital caliper.

The MTT 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) cytotoxicity test is tests for in vitro cytotoxicity, was performed to evaluate the viability of gingiva-derived mesenchymal stem cell after treated with *Sticophus hermanii* and *Holothuria atra* extracts which diluted with DMSO 1% into 9 groups concentration of 1%, 0,5%; 0,25%; 0,125%; 0,006%; 0,003%, 0,0015%, 0,0007%; 0,0003%. The gingiva-derived mesenchymal stem cell were obtained from ITD, Surabaya. After the thawing process, the cell were resuspended with culture medium of α minimum essential medium (MEM) (Gibco, Invitrogen Co, New York, USA), centrifuged for 5 minute in 1500 rpm, repeated for 3 times then get cultured, passaged every 4 days. In the second passage monolayer was formed and ready to be performed the cytotoxicity test.

The cells were seeded into 96-well microplates (Iwaki, Asahi Glass co, Tokyo, Japan) each containing 200 μl with the density of 5×10^4 in α MEM medium incubated at 37°C for 24 hours. Medium then replaced then extract were added as amount of 200 μl and incubated 37°C for 20 hours. Control positive cells were also prepared containing cells in culture medium, assumed to be viable 100%.

Microplates then taken out from the incubator, added the solution of MTT 5 mg/ml in PBS 25 μl for each well, incubated for 4 hour. The medium then discarded, replaced with 200 μl DMSO in each well. Cell viability was assessed by the mitochondrial dependent reduction of yellow MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide) to purple formazan. After the exposure, the formazan formations were determined for each treatment concentration by ELISA reader at a wavelength of 595 nm. The relative viability of the treated cells as compared to the control cells were expressed as the % cytoviability, using the following formula:

$$\% \text{ Cell viability} = [\text{Asample}/\text{Acontrol}] \times 100\%$$

Note: A sample is mean value of the measured optical density of the treated cells; A control is mean value of them measured optical density of the control cells.¹⁶⁻¹⁸

The data were presented as means \pm standard deviation (SD). Statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA) to determine the effect of sea cucumber extract concentration on the gingiva-derived mesenchymal stem cells cytoviability.

RESULTS

Antifungal activity showed by the inhibition zones around the disk were observed in all treatment groups and positive control but not the negative control. All treatment groups in all concentrations showed inhibition zones but the diameter were less than nystatin as positive control. Both *Sticophus hermanii* and *Holothuria atra* extracts showed that the increasing concentration tested on *Candida albicans* resulted in the increasing diameter of inhibition zone as shown in Figure 1.

Further statistical analysis by two way ANOVA test and LSD multiple comparison test at 5% significance level presented in Table 1 showed the significant difference on all concentration of *Sticophus hermanii* and *Holothuria atra* extract compared to negative and positive control group ($p < 0.05$).

Result on cytotoxicity test showed that all concentrations of *Sticophus hermanii* extract were not cytotoxic to gingiva-derived mesenchymal stem, showed by the average of cell viability above 50%, while *Holothuria atra* extract were

Table 1. ANOVA and LSD summary of inhibition zone of *Sticophus hermanii* and *Holothuria atra* extracts on serial concentration extracts to *Candida albicans* compared to control groups

Group	Aquaeous	Nystatin	<i>Holothuria atra</i> 20%	<i>Holothuria atra</i> 40%	<i>Holothuria atra</i> 80%	<i>Sticophus hermanii</i> 20%	<i>Sticophus hermanii</i> 40%	<i>Sticophus hermanii</i> 80%
Aquaeous		0.000*	0.032*	0.001*	0.002*	0.117	0.006*	0.000*
Nystatin			0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
<i>Holothuria atra</i> 20%				0.238	0.307	0.547	0.53	0.023*
<i>Holothuria atra</i> 40%					0.872	0.077	0.578	0.263
<i>Holothuria atra</i> 80%						0.107	0.692	0.201
<i>Sticophus hermanii</i> 20%							0.221	0.005*
<i>Sticophus hermanii</i> 40%								0.096

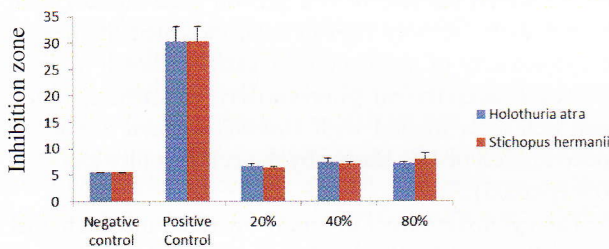


Figure 1. The inhibition zone of *Sticophus hermanii* and *Holothuria atra* extracts on serial concentration to *Candida albicans* compared to control groups.

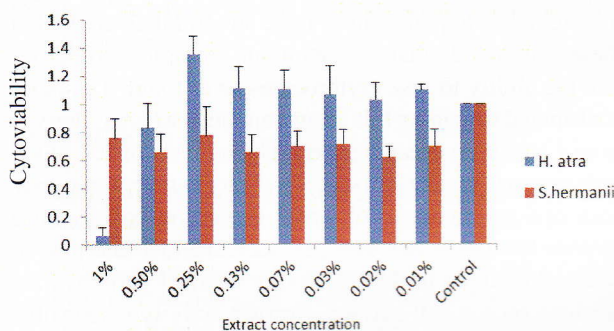


Figure 2. Cytoviability percentage of gingiva-derived mesenchymal stem cell treated by various concentration of *Sticophus hermanii* and *Holothuria atra* extract.

cytotoxic on the concentration of 1% and not cytotoxic on the concentration below.

The result of relative viability of the treated cells as compared to the control cells was showed in Figure 2. The increased concentration of the *Sticophus hermanii* and *Holothuria atra* extract exposure on the cells resulted in the decreasing of cytoviability percentage of gingiva-

Table 2. ANOVA summary of cytotoxicity of *Sticophus hermanii* and *Holothuria atra* extracts concentrations on gingiva-derived mesenchymal stem cell

	Group	F	Sig
<i>Sticophus hermanii</i> extract	Between groups	2.056	0.086
	Within groups		
	Total		
<i>Holothuriaatra</i> extract	Between groups	20.326	0.000
	Within groups		
	Total		

derived mesenchymal stem cell. The less concentrations of the two sea cucumber extract applied to gingiva-derived mesenchymal stem cell, the more cells viability increased.

Further statistical analysis by ANOVA as shown in Table 2 described that there was not any significant influence of the treated extracts concentration on the cytoviability of gingiva-derived mesenchymal stem cell ($p > 0.05$). *Sticophus hermanii* extracts showed no cytotoxic effect where the cells were viable more than 50% after the treatment in all extract concentrations ($p > 0.05$). *Holothuria atra* showed cytotoxic effect to the gingiva-derived mesenchymal stem cellin concentration of 1% where the the viable cells appeared less than 50% after the treatment, but it showed no cytotoxic effect on the treatment of the extract in lower concentration of 0.5-0.0001% ($p < 0.05$).

DISCUSSION

Result of antifungal sensitivity test showed inhibition zone around the disk in all treatment group and in control positive group, means that both extract of *Sticophus*

hermanii and *Holothuria atra* has antifungal effect to *C. albicans* in vitro. The largest diameter of inhibition zone of treatment group was in the concentration of 80 mg/mL but still less than in the control group of nystatin ($p < 0.05$).

Nystatin is a polyene antifungal drug to which many molds and yeasts are sensitive, including *Candida spp*, used as the positive control for its the common topical antifungal agent therapy on oral candidiasis. Nystatin exerts its antifungal activity by binding to ergosterol found in fungal cell membranes. Binding to ergosterol causes the formation of pores in the membrane. Potassium and other cellular constituents leak from the pores causing cell death.^{12,13}

Sea cucumber extract have been known to have the antifungal property, assumed to be related to its content of alkaloid, saponin and triterpen glycoside.^{1,4,9,11} Result showed both *Sticophus hermanii* and *Holothuria atra* has antifungal activity against *C. albicans* according to the study stated that generally, most species of sea cucumber share the same bioactive compound mentioned above but in different level contain.^{4,7}

Saponin were identified in the content of sea cucumber extract.^{1,4,9} It is secondary metabolites of glycosidic nature widely distributed in higher plants and marine invertebrates resulted as the defend mechanism also has the biological properties i.e. the ability to lyse erythrocytes or to foam. It form complexes with cell membrane cholesterol leading in consequence to pore formation and cell permeabilization, alterations in the negatively charged carbohydrate portions on the cell surface.^{24,25}

Saponin performed its antifungal activity by the interaction with sterol membrane of *C. albicans* and disrupting the cell wall's integrity caused the cell death, similar with the mechanism action of nystatin. *Sticophus hermanii* and *Holothuria atra* have been extracted by methanolic extract.¹⁴ The antibacterial compound of sea cucumber assumed to be polar for it is dissolved in methanol solvent and have been proven to have the antibacterial, antifungal and cytotoxic agent on some studies.^{2,3,4,9}

Regarding to antifungal property of both sea cucumber extract to *C. albicans*, cytotoxicity test must be performed to examine its biocompatibility prior to explore its potency as treatment in oral candidiasis. Cell culture can be used to screen for toxicity both by estimation of the basal functions of the cell or by tests on specialized cell functions.^{19,20} Recently, toxicity test have been developed and stem cells were explored regarding to some basic consideration in some advantage in the technique and result. Human stem cells are potentially attractive reagents for predictive toxicology, particularly if they can be shown to be a reliable, large-scale source of differentiated human cells. The use of human cells could increase the correlation between safety studies and clinical trials, an important benefit since conventional animal models of toxicity are not always predictive of human responses. Stem cells that are generated from adult tissues (iPS cells) could allow models to be created from individuals with a diverse range of drug susceptibilities, resistances or disease, which could reduce

the rate of adverse effects within patient subpopulations.²¹

In this research, cytotoxicity test of *Sticophus hermanii* and *Holothuria atra* extracts were performed on gingiva-derived mesenchymal stem cell. Gingiva-derived mesenchymal stem cells (GMSCs) were employed on this study considering to its accessibility and potency for further application in oral therapy. GMSC are stem cells from human gingiva, a tissue source easily accessible from the oral cavity, which exhibited clonogenicity, self-renewal, and multipotent differentiation capacities. Most importantly, GMSCs were capable of immunomodulatory functions and able to induce osteogenic, chondrogenic, and adipogenic differentiation.^{22,25} The cytotoxicity test of sea cucumber extract on GMSC will be a proper predictor regarding to the potency of the cell. Once the extract is not cytotoxic to GMSC the greater possibility of oral application without degrading the potency of stem cell attained.

Cytotoxicity testing includes numerous methods, both qualitative and quantitative. In this study we used indirect test, in which the rate of cell growth (cell number) and the metabolic activity (MTT) have indicated the degree of cytotoxicity of sea cucumber extract. Result showed cytotoxic activity on gingiva-derived mesenchymal stem cell after treated with *Holothuria atra* extract in concentration of 1%, shown by the cell viability less than 50% ($p < 0.05$).

The cytotoxic effect to gingiva-derived mesenchymal stem cell assumed related to the content of saponin in sea cucumber extract. It has been stated that the bioactive compound of *Holothuria atra* are mostly triterpene glycoside (saponin). Saponins are secondary metabolites of glycosidic nature widely distributed in higher plants but also found in some animal sources, like e.g. marine invertebrates. Saponins have large structural diversity, but these compounds share some unique biological properties like the ability to lyse erythrocytes or to foam. The latter contributed to naming this group saponins, which is derived from Latin *sapo* meaning soap. Haemolysis of red blood cells seems to result from saponin ability to form complexes with cell membrane cholesterol leading in consequence to pore formation and cell permeabilization, and also to cause alterations in the negatively charged carbohydrate portions on the cell surface. Surface activity responsible for foaming properties, as well as some other biological functions including haemolytic activity, are attributed to characteristic structural features of saponins and their amphiphilic nature which results from the presence of a hydrophilic sugar moiety and a hydrophobic genin (called sapogenin). It seems that for all saponins both aglycone and sugar part play an important role for cytotoxic activity. With respect to cytotoxic mechanisms of both triterpene and steroid saponins a wide variety of these was reported. Cytotoxic effect of most of the reviewed saponins was due to their ability to stimulate apoptotic process in tumor cells, usually through its intrinsic pathway. Moreover, non apoptotic processes were also involved in saponin cytotoxic

activity, such as cell cycle arrestment, autophagic cell death stimulation, inhibiting of metastasis and cytoskeleton disintegration.^{23,24}

Result showed no cytotoxic activity on gingiva-derived mesenchymal stem cell after treated with all concentration of *Sticophus hermanii* extract ($p > 0.05$). Regarding to its bioactive component, the saponin content probably have less role than in *Holothuria atra* extract, but prominently it has been known that *Sticophus hermanii* mostly contained polyunsaturated fatty acids (PUFA): arachidonic acid (AA C20:4 n-6), eicosapentaenoic acid (EPA C20:5 n-3), docosa hexaenoic acid (DHA C22:6 n-3).⁴ It has been stated that fatty acids including arachidonic acid (AA C20:4), eicosa pentaenoic acid (EPA C20:5), and docosa hexaenoic acid (DHA C22:6) can play a potential role in tissue repair and wound healing. An appreciable amount of EPA in sea cucumbers might be linked well with the ability of these echinoderms to initiate tissue repair.⁴ It related to the traditional medicine which believed that direct use of sea cucumber can reduce wound recovery time and help new tissue formation and regeneration in human just as the sea cucumber's ability to quickly regenerate its own body tissue when damaged.

The conclusion of this research is that *Sticophus hermanii* and *Holothuria atra* extract had the antifungal effect against *Candida albicans* on the concentration of 80 mg/mL. Sea cucumber extract were not cytotoxic to gingiva-derived mesenchymal stem cell in the concentration of *Sticophus hermanii* $\leq 1\%$ and *Holothuria atra* $\leq 0.5\%$.

ACKNOWLEDGEMENT

This research was supported by a grant from Fundamental Research Program, funded by Ministry of Education and Culture Indonesia.

REFERENCES

- Mayer AMS, Rodrigues AD, Berlinck RGS, Hamann MT. Marine pharmacology in 2005-6: marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, antiviral activities; affecting the cardiovascular immune and nervous system and other miscellaneous mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* 2009;1790(5): 283-308.
- Abraham TJ, Nagarajan J, Shanmugam SA. Antimicrobial substances of potential biomedical importance from holothurian species. *Indian J Marine Sci* 2002; 31(2):161-4.
- Althunibat OY, Hashim R, Taher M, Daud JM, Ikeda MA, Zali BI. In vitro antioxidant and antiproliferative activities of three Malaysian sea cucumber species. *Eur J Sci Res* 2009; 37(3): 376-87.
- Bordbar S, Anwar F, Saari N. High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods-a review. *Mar. Drugs* 2011; 9(10): 1761-805.
- Dang NH, Thanh NV, Kiem PV, Huong le M, Minh CV, Kim YH. Two new triterpen glycosides from the vietnamese sea cucumber *holothuriscabra*. *Arch Pharm Res* 2007; 30(11): 1387-91.
- Farouk AE, Ghouse FAH, Ridzwan BH. New bacterial species isolated from Malaysian sea cucumbers with optimized secreted antibacterial activity. *Am J Biochemistry and Biotechnology* 2007; 3(2): 60.
- Sendih SG. Keajaiban teripang penyembuh mujarab dari laut. Jakarta: Agromedia Pustaka; 2006. p.13-45.
- Pringgencies D, Ali Ridlo, Kemal TAJ. The potency antibacterial of bioactive compound of *holothuria atra* extract from territorial water of bandengan. World Ocean Conference. Manado 2009.
- Pranoto EN, Maruf WS, Pringgencies D. Kajian aktivitas bioaktif ekstrak teripang pasir (*Holothuriscabra*) terhadap jamur *Candida albicans*. *Jurnal Pengolahan dan Bioteknologi Hasil Perikanan* 2012; 1(1): 1-8.
- Aminin DL, Pinegin BV, Pichugina LV, Zaporozhets TS, Agafonova IG, Boguslavski VM, Silchenko AS, Avilov SA, Stonik VA. Immuno modulatory properties of cumaside. *International Immunopharmacology* 2006; 6: 1070-82.
- Han H, Yi YH, Li L, Liu BS, La MP, Zhang HW. Antifungal active triterpene glycosides from sea cucumber *Holothuriscabra*. *Yao XueXueBao* 2009;44(6):620-4.
- Williams D, Lewis M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *J Oral Microbiol* 2011; 3.
- Shalini K, Kumar N, Drabu S, Sharma PK. Advances in synthetic approach to antifungal activity of triazoles. *Beilstein J Org Chem* 2011; 7: 668-677.
- Pringgencies D, Ocky KR, Sabdon A, Hartati R, Widianingsih. Penerapan teknologi budidaya teripang dalam meningkatkan produksinya dan bioprospek teripang sebagai sumber senyawa antimikroba untuk kesehatan. Laporan Penelitian. Hibah Kemitraan Hi-Link; 2008. p. 65.
- Gallagher ME. Toxicity testing requirements, methods and proposed alternatives. *Environ* 2003; 26(2): 253-73.
- Sunarintyas S, Siswomihardjo W, Tontowi AE. Cytotoxicity of *Criculatriphenestrata* cocoon extract on human fibroblasts. *Int J Biomater* 2012; 2012: 493075.
- Dufrane D, Cornu O, Verraes T, Schecroun N, Banse X, Schneider YJ, Delloye C. In vitro evaluation of acute cytotoxicity of human chemically treated allografts. *Eur Cell Mater* 2001; 1: 52-8.
- Cao T, Saw TY, Heng BC, Liu H, Yap AU, Ng ML. Comparison of different test models for the assessment of cytotoxicity of composite resins. *J Appl Toxicol* 2005; 25(2): 101-8.
- Lausriat D, Gide J, Peschanski M. Human pluripotent stem cells in drug discovery and predictive toxicology. *Biochem Soc Trans* 2010; 38(4): 1051-7.
- Mitrano TI, Grob MS, Carrión F, Nova-Lamperti E, Luz PA, Fierro FS, Quintero A, Chaparro A, Sanz A. Culture and characterization of mesenchymal stem cells from human gingival tissue. *J Periodontol* 2010; 81(6): 917-25.
- Jeon KM. International review of cell and molecular biology. 1st ed. San Diego: Elsevier Academic Press; 2009. p. 161-202.
- Junqueira C, Carneiro J. Basic histology: text and atlas. 11th ed. Philadelphia: McGraw-Hill; 2005. p. 106-7.
- Zhang Q, Shi S, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Shi S, Le AD. Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *J Immunol* 2009; 183(12): 7787-98.
- Podolak I, Galanty A, Sobolewska D. Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochem Rev* 2010; 9(3): 425-74.
- Wojtkielewicz A, Długosz M, Maj J, Morzycki JW, Nowakowski M, Renkiewicz J, Strnad M, Swaczynová J, Wilczewska AZ, Wójcik J. New analogues of the potent toxic saponin OSW-I. *J Med Chem* 2007; 50(15): 3667-73.

Research Report

Korelasi indeks morfologi wajah dengan sudut interinsisal dan tinggi wajah secara sefalometri

(Cephalometric correlation of facial morphology index with interincisal angle and facial height)

Pricillia Priska Sianita K dan Verenna

Departemen Ortodonsia

Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Prof. DR. Moestopo (B)

Jakarta - Indonesia

ABSTRACT

Background: In a disaster or criminal case, comprehensive information is needed for identification process of each victim. Especially for some cases that only leave skull without any information that could help the identification process, including face reconstruction that will be needed. One way of identifications is specific face characteristic, race, some head-neck measurements, such as facial morphology index, interincisal angle and facial height. **Purpose:** The aim of study was to determine the correlation of facial morphology index with interincisal angle and facial height through cephalometric measurement. **Methods:** The samples were cephalogram of 31 subjects (Deutro-Malayid race) who met the inclusive criteria. Cephalometric analysis were done to all samples and followed by Pearson Correlation statistical test. **Results:** The correlation was found between facial morphology index and facial height, but no correlation between facial morphology index and interincisal angle. **Conclusion:** The study showed that the cephalometric measurement of facial morphology index and facial height could be used as the additional information for identification process.

Key words: Facial morphology index, interincisal angle, facial height, identification, facial type

ABSTRAK

Latar belakang: Dalam bencana alam atau kasus kriminal informasi yang komprehensif diperlukan untuk proses identifikasi masing korban. Khususnya pada beberapa kasus yang hanya meninggalkan tengkorak tanpa informasi yang dapat membantu proses identifikasi, termasuk rekonstruksi wajah yang akan dibutuhkan. Salah satu cara identifikasi karakteristik wajah tertentu, ras, beberapa pengukuran kepala leher, seperti indeks morfologi wajah, sudut interinsisal dan tinggi wajah. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan meneliti korelasi indeks morfologi wajah dengan sudut interinsisal dan tinggi wajah melalui pengukuran sefalometrik. **Metode:** Sampel penelitian adalah cephalogram dari 31 subyek ras Deutro - Malayid ras yang memenuhi kriteria inklusif. Analisis sefalometri dilakukan pada semua sampel dan dilanjutkan dengan uji statistik korelasi Pearson. **Hasil:** Korelasi ditemukan antara indeks morfologi wajah dan tinggi wajah, tapi tidak ada korelasi antara indeks morfologi wajah dan sudut interinsisal. **Simpulan:** Hasil penelitian menunjukkan bahwa pengukuran sefalometrik indeks morfologi wajah dan tinggi wajah, dapat digunakan sebagai informasi tambahan untuk proses identifikasi.

Kata kunci: Indeks morfologi wajah, sudut interinsisal, tinggi wajah, identifikasi, tipe wajah

Korespondensi (correspondence): Pricillia Priska Sianita K, Departemen Ortodonsia, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Prof. Dr. Moestopo (B). Jl. Bintaro Raya 3 Jakarta Selatan 12330, Indonesia. E-mail: ppriska@cbn.net.id

PENDAHULUAN

Dalam proses identifikasi seseorang, diperlukan informasi secara umum, termasuk karakteristik wajah seseorang yang kemudian dapat menunjukkan ciri khas ras seseorang yang diidentifikasi.¹ Dalam proses menentukan karakteristik wajah seseorang, diperlukan informasi terkait struktur wajah dan susunan gigi geligi. Informasi struktur wajah ini meliputi dimensi vertikal wajah yang juga akan dipengaruhi oleh relasi oklusi gigi geligi.²⁻⁴ Pembahasan hubungan oklusal ini melibatkan sudut yang juga terlibat dalam pengukuran dimensi vertikal, yaitu sudut interinsisal.⁵ Keanekaragaman pengukuran vertikal wajah akan menghasilkan keanekaragaman tipe vertikal wajah. Satu metode pengukuran vertikal wajah adalah indeks morfologi wajah. Indeks ini dihasilkan melalui pengukuran jarak dari nasion (n) sampai gnathion (gn) dikalikan 100 dan dibagi dengan jarak dari titik zygon (zy) kiri sampai kanan. Hasil pengukuran ini akan menempatkan subyek ke dalam klasifikasi tipe wajah sangat lebar, lebar, sedang, sempit dan sangat sempit (Tabel 1).⁶

Sudut interinsisal adalah sudut yang dibentuk oleh perpotongan garis yang melalui sumbu gigi insisif rahang atas dan gigi insisif rahang bawah.⁵ Tinggi vertikal wajah merupakan jarak yang diukur dari nasion (n) sampai gnathion (gn).^{4,5} Tipe-tipe wajah yang dihasilkan dari pengukuran ini sangat khas dan menjadi ciri bagi individu yang bersangkutan, yang tentunya sangat penting dalam kaitan dengan proses identifikasi di bidang Forensik.

Penelitian ini merupakan kajian pada sub ras Deutro-Malayid, salah satu populasi yang banyak tersebar di wilayah Indonesia bagian barat.^{6,7} Dengan demikian, diharapkan dapat membantu mempermudah pengambilan sampel subyek penelitian.

Tujuan penelitian adalah untuk meneliti korelasi antara indeks morfologi wajah dengan sudut interinsisal dan tinggi wajah dalam analisis sefalometri. Diharapkan, hasil penelitian ini dapat menjadi masukan dalam pertimbangan pemanfaatannya pada proses identifikasi kerangka tengkorak individu yang membutuhkan rekonstruksi ataupun pembuatan sketsa wajah dengan mengacu pada tipe wajah aslinya berdasarkan hasil pengukuran yang bersifat ilmiah.

BAHAN DAN METODE

Sampel penelitian terdiri dari 31 subyek sub ras Deutro-Malayid yang memenuhi kriteria inklusi sebagai berikut, maloklusi klas I angle, diskrepansi panjang lengkung gigi ≤ 4 mm, usia 20–30 tahun dan belum pernah menjalani perawatan ortodonsi serta bersedia berpartisipasi dengan menandatangani surat persetujuan setelah penjelasan (PSP) atau *informed consent*. Adapun kelompok subyek sub ras Deutro-Malayid ini dipilih melalui wawancara dan pengisian kuesioner tentang identitas diri sampai ke tingkatan dua generasi di atasnya yaitu ibu dan nenek yang termasuk dalam kelompok sub ras Deutro-Malayid. Selanjutnya, dilakukan pembuatan sefalogram lateral di Rumah Sakit Gigi dan Mulut Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Prof. Dr. Moestopo (Beragama).

Analisis sefalometri dan somatometri dilakukan pada sampel penelitian yang diambil dengan cara *purposive sampling* berdasarkan kriteria inklusi yang telah ditetapkan, antara lain: subyek dengan maloklusi klas I angle, diskrepansi panjang lengkung gigi 4 mm, berusia 20–30 tahun dan belum pernah menjalani perawatan ortodonsi. Pengukuran somatometri dilakukan untuk

Tabel 1. Klasifikasi indeks morfologi wajah genap menurut Martin⁶

Tipe wajah	Laki-laki	Perempuan
Sangat lebar (<i>Hypereuryprosopic</i>)	x – 78,9	x – 76,8
Lebar (<i>Euryprosopic</i>)	79,0 – 83,9	77,0 – 80,9
Sedang (<i>Mesoprosopic</i>)	84,0 – 87,9	81,0 – 84,9
Sempit (<i>Leptoprosopic</i>)	88,0 – 92,9	85,0 – 89,9
Sangat sempit (<i>Hyperleptosoprosopic</i>)	93,0 – x	90,0 – x

Tabel 2. Distribusi sudut interinsisal dan tinggi wajah subyek penelitian

	Descriptive			Statistic	
	N	Mean	std. Deviation	Min	Max
Indeks morfologi wajah I	31	84.6648	6.00852	75.85	98.28
Indeks morfologi wajah II	31	84.9642	6.06908	75.40	98.51
Indeks morfologi wajah (rerata)	31	84.8145	5.97828	75.78	98.40
Sudut interinsisal (sefalogram lateral)	31	123.3226	10.34211	105.00	147.00
Tinggi wajah (sefalogram lateral)	31	126.2258	10.02567	108.00	156.00

Tabel 3. Hasil pengukuran indeks morfologi wajah dengan tinggi wajah

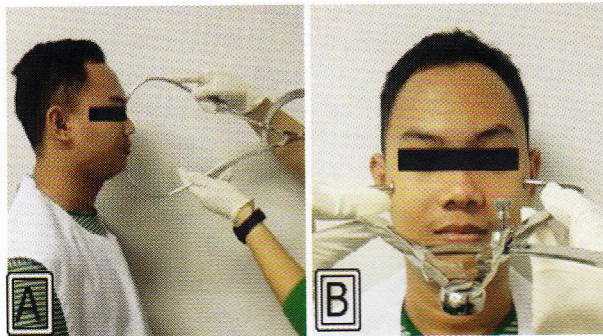
		Indeks morfologi wajah	Tinggi wajah (sefalogram lateral)
Indeks morfologi wajah	Pearson correlation	1	.383*
	<i>Sig. (2-tailed)</i>		.033
	N	31	31
Tinggi morfologi wajah (sefalogram lateral)	Pearson correlation	.383*	1
	<i>Sig. (2-tailed)</i>	.033	
	N	31	31

Keterangan: $p < 0,05$ = korelasi bermakna; $p > 0,05$ = korelasi tidak bermakna

Tabel 4. Hasil pengukuran indeks morfologi wajah dengan sudut interinsisal

		Indeks morfologi wajah	Sudut interinsisal
Indeks morfologi wajah	<i>Pearson correlation</i>	1	.218
	<i>Sig. (2-tailed)</i>		.238
	N	31	31
Sudut interinsisal	<i>Pearson correlation</i>	.218	1
	<i>Sig. (2-tailed)</i>	.238	
	N	31	31

Keterangan: $p < 0,05$ = korelasi bermakna; $p > 0,05$ = korelasi tidak bermakna



Gambar 1. Pengukuran indeks morfologi wajah. A) pengukuran jarak dari titik nasion (n) ke titik gnation (gn); B) pengukuran jarak *Bi-zygion*.

indeks morfologi wajah: mengukur jarak titik nasion (n) ke titik gnation (gn), dilanjutkan pengukuran jarak *Bi-zygion*. Pengukuran dilakukan dengan kaliper lengkung (Gambar 1). Pengukuran sudut interinsisal dan tinggi wajah dilakukan pada sefalogram lateral dari 31 subyek penelitian. Sudut interinsisal adalah sudut dalam yang dibentuk oleh perpotongan garis sumbu gigi insisif atas dan gigi insisif bawah (Gambar 2). Tinggi wajah pada sefalogram merupakan jarak dari titik nasion ke gnation.

Hasil pengukuran dalam penelitian ini berupa skala rasio dan menjalani uji statistik *Pearson-correlation* sebagaimana terlihat dalam Tabel 3 dan Tabel 4. Uji statistik dengan menggunakan *Pearson-correlation* dilakukan pada data hasil pengukuran untuk menilai

korelasi antara hasil pengukuran indeks morfologi wajah dengan sudut interinsisal dan dengan tinggi wajah.

HASIL

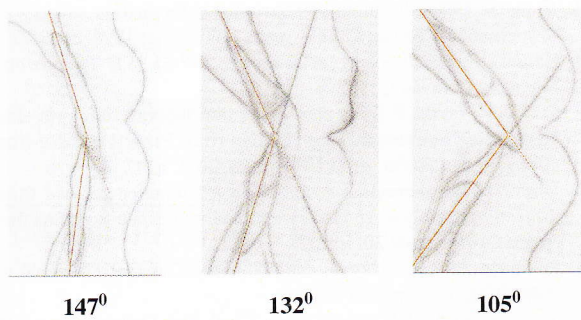
Ukuran tinggi wajah dan sudut interinsisal dapat dilihat pada Tabel 2 sedangkan hasil uji statistik *Pearson-correlation* ditunjukkan pada Tabel 3 dan 4.

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna antara Sudut Interinsisal dan indeks morfologi wajah genap ($p > 0,05$), sementara dengan tinggi wajah yang diukur secara sefalometri dan indeks morfologi wajah genap memperlihatkan korelasi bermakna ($p < 0,05$) (Tabel 3). Hasil analisis statistik sebagaimana terlihat dalam Tabel 3, memperlihatkan adanya perbedaan korelasi hasil pengukuran indeks morfologi wajah dengan sudut interinsisal dan dengan tinggi wajah secara sefalometri

PEMBAHASAN

Identifikasi karakteristik seseorang dapat membutuhkan informasi tentang banyak hal, antara lain, tinggi wajah (dimensi vertical wajah), yang berhubungan dengan tipe wajah, mulai dari *leptoprosopic* sampai *euryprosopic*, lebar tengkorak dan susunan gigi geligi.^{1,8}

Hal ini terutama bila berhadapan dengan sisa jasad yang hanya berwujud tengkorak. Sementara korban



Gambar 2. Kedudukan gigi insisif dan besar sudut interinsisal yang dihasilkan.

putus atau hilang kontak dengan keluarganya, dan data awal yang berfungsi sebagai pembanding dalam proses identifikasi menjadi sulit atau hampir mustahil didapatkan. Dengan demikian, pada proses rekonstruksi wajah untuk mengetahui prakiraan sub ras melalui tipe fasial, pengukuran tinggi wajah pada sefalometri lateral dapat menjadi salah satu sumber informasi data ante mortem. Di samping itu, data yang diperoleh ini juga bisa menjadi dasar untuk membangun prakiraan sketsa wajah untuk membantu korban menemukan kembali keluarganya atau sebaliknya, pihak keluarga mengenali sketsa korban yang dibuat berdasarkan data perhitungan tersebut^{9,10}. Dalam hal ini, tinggi wajah dapat membantu pihak pembuat sketsa untuk menggambarkan korban mendekati rupa aslinya, sementara besar sudut insisal dapat membantu menggambarkan pola konveksitas daerah sepertiga bawah dari tinggi wajah korban.¹¹⁻¹³

Temuan dalam penelitian ini, sebagaimana tertuang dalam Tabel 3, dengan nilai $p < 0,05$ membuktikan bahwa terdapat hubungan bermakna antara indeks morfologi wajah dengan tinggi wajah pada analisis sefalometri lateral. Adanya korelasi bermakna ini diharapkan memberikan manfaat aplikatif dalam proses identifikasi individu yang hanya menyisakan tengkorak kepala. Sketsa individu dalam ukuran tinggi wajah juga berhubungan dengan klasifikasi tipe fasial, mulai dari tipe *leptoprosopic* sampai *euryprosopic*.¹⁴ Jadi pada korban dalam wujud tengkorak yang tidak memiliki identitas, dimana tim identifikasi tidak memiliki gambaran apapun tentang rupa korban semasa hidup, maka korelasi bermakna antara indeks morfologi wajah dan tinggi wajah secara sefalometri lateral dapat dimanfaatkan untuk menjadi dasar pertimbangan rekonstruksi sketsa wajah korban dalam upaya mengembalikan korban kepada keluarganya. Foto sefalogram lateral dapat dibuat pada tengkorak kepala korban untuk mendapatkan tinggi wajahnya dan pengukuran indeks morfologi wajah dapat diukur langsung untuk mendapatkan gambaran tipe fasial untuk kemudian dihubungkan dengan karakteristik tinggi wajah korban.

Dalam penelitian ini, juga diperoleh korelasi tidak bermakna pada perhitungan statistik antara indeks morfologi wajah dan sudut interinsisal. Hal ini diduga disebabkan oleh adanya variasi besar dan relasi sudut interinsisal pada klasifikasi maloklusi yang sama sekalipun (Gambar 2). Variasi besar dan relasi sudut interinsisal ini bilamana dikaitkan dengan variasi *soft tissue thickness* yang membungkus kondisi dentoalveolar individu akan semakin mempertegas tingkat kesulitan variabel tersebut sebagai faktor yang dapat membantu proses rekonstruksi prediktif yang bersangkutan. Dalam hal ini karakteristik tipe fasial yang diperoleh melalui pengukuran indeks morfologi wajah dapat membantu menggambarkan pola jaringan lunak yang umumnya dimiliki oleh individu tertentu, mulai dari tipe *leptoprosopic* sampai *euryprosopic*.

Kondisi yang lebih menguntungkan mungkin bisa diperoleh bilamana tengkorak yang tersisa masih dilengkapi dengan gigi geligi dalam jumlah memadai, terutama gigi geligi anterior di rahang atas maupun rahang bawah. Dengan adanya gigi geligi anterior atas maupun bawah, maka relasi dan gigitan dapat diperoleh untuk kemudian dibuat roentgenogramnya sehingga dapat diukur pola konveksitas ataupun *protrusiveness* gigi geligi anterior korban.^{11,14} Hasil pengukuran ini dapat gilirannya diharapkan dapat menyumbangkan informasi yang berharga pada tim pembuat sketsa rekonstruktif wajah korban untuk tujuan identifikasi maupun pencarian keluarga korban.

Pada akhirnya, penelitian ini merupakan langkah awal kolaborasi antara bidang keilmuan Ortodonsia, yang memiliki kaitan erat dengan berbagai pengukuran di area kepala dengan menggunakan titik-titik baku anatomis pada jaringan keras di tengkorak, dengan bidang keilmuan Forensik odontologi, yang tidak jarang berhadapan dengan sisa jasad korban dalam wujud tengkorak yang bilamana dicermati memiliki banyak sekali titik baku anatomis yang diharapkan dapat menyumbangkan informasi berharga dalam proses menguak identitas individu termasuk korban.^{15,16} Diharapkan ke depannya, akan semakin banyak lagi penelitian-penelitian dalam bentuk kolaborasi bidang keilmuan yang dapat memberikan kontribusi dalam pengembangan ilmu Forensik Odontologi.

Melalui penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa terdapat korelasi bermakna ($p < 0,05$) antara indeks morfologi wajah dengan tinggi wajah hasil pengukuran pada sefalogram lateral, sedangkan untuk analisis indeks morfologi wajah dengan sudut interinsisal, diperoleh korelasi tidak bermakna, sehingga korelasi bermakna antara indeks morfologi wajah dengan tinggi wajah secara sefalometri diharapkan dapat membantu proses rekonstruksi wajah dalam kaitannya dengan *digital imaging* tiga dimensi yang biasanya dapat membantu menggambarkan tipe fasial melalui perkiraan beberapa titik anatomis. Namun, hasil dari penelitian ini masih memerlukan penelitian lebih lanjut terhadap sub ras lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

1. Hinchliffe J. Forensic odontology. Part1 dental identification. Br Dent J 2011; 210(5): 219-24.
2. Debi G. Asessment of facial type: average, short, or long. CDHA J 2007; 23(2): 23-5.
3. Foster TD. A textbook of orthodontics. 2nd ed. Blackwell Scientific Publications; 1984. p. 85-101.
4. Enlow, Donald H, Mark G Hans. Essentials of facial growth. Philadelphia: WB Saunders Company; 1997. p. 122-9.
5. Jacobson, A, Jacobson, RL. Radiographic cephalometry. 2nd ed. Canada: Quintessence Publishing; 2006. p. 63-183.
6. Glinka J. Antropometri & antroposkopi. Surabaya: FISIP Universitas Airlangga; 1990. h. 57-68.
7. Djoeana KH. Antropologi untuk mahasiswa kedokteran gigi. Jakarta: Universitas Trisakti, 2005. h. 6-7, 40-90.
8. Korkmaz S, Fulya I, Göksu T, Tülin A. An evaluation of the errors in cephalometric measurements on scanned cephalometric images and conventional tracings. European J Orthodontics 2007; 29(1): 105-8.
9. Brons R. Facial harmoni standarts for orthognathic surgery and orthodontics. Canada: Quintessence Publishing; 1998. p. 69-77.
10. Enlow DD. Handbook of facial growth. 2nd ed. WB. Philadelphia: Saunders Company; 1982. p. 228-311.
11. Sianita K, Priska P. Buku ajar sefalometri laboratorium orthodonti Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Prof. Dr. Moestopo (Beragama). Jakarta: FKG UPDM (B); 2011. h. 47-60.
12. Olmez H. Measurement accuracy of a computer-assisted three-dimensional analysis and a conventional two-dimensional method. Angle Orthodontist 2011; 81(3): 375-82.
13. Jacobson A. Radiographic cephalometry. Canada: Quintessence Publishing; 1995. p. 236-54.
14. Singh G. Textbook of orthodontics. 2nd ed. New Delhi: Jaypee; 2007. p. 216-23.
15. Farkas LG. Anthropometry of the head and face in medicine. 2nd ed. New York: Raven Press; 1994. p. 241-336.
16. Herschaft EE. Manual of forensic odontology. 4th ed. USA: CRC Press; 2007. p. 12.

Case Report

Orthodontic-surgical treatment of a severe class III malocclusion

Pakpahan Evie Lamtiur

Department of Orthodontic

Faculty of Dentistry, Universitas Prof Dr. Moestopo (B)

Jakarta - Indonesia

ABSTRACT

Background: Adult patient with dentofacial deformities usually need surgical orthodontic treatment. Although case of class II dentofacial deformities are more common, the need for treatment and improvement in term of facial profile is generally greater in class III patients. When a skeletal Class III malocclusion is diagnosed, orthognathic surgery is always considered if the orthodontist and patient desire complete correction of the skeletal discrepancy. **Purpose:** The purpose of this article were to reported a case of severe class III malocclusion and to showed the positive effect of orthognathic surgical treatment on the patient's profile. **Case:** This case report describes the surgical-orthodontic treatment of a 20 year old male patient with class III dentofacial deformity. **Case managements:** To allow adequate surgical movement, both maxillary first premolars were extracted, and the maxillary incisors were retracted. No extractions were performed in the mandibular arch. Surgery included a Le Fort I osteotomy with 8 mm advancement, a bilateral sagittal split osteotomy with the mandibula was set back 13 mm at right side and 11 mm at left side for the correction of dental midline and chin deviation. The genioplasty treatment also was done. **Conclusion:** Surgical-orthodontic treatment could be chosen as a treatment option for achieving an acceptable occlusion and a good esthetic result in a patient with a Class III dentofacial deformity. Nevertheless, it should be performed by a multidisciplinary team to ensure a satisfactory outcome

Key words: Class III dentofacial deformity, orthognathic surgery, orthodontic treatment

ABSTRAK

Latar belakang: Pasien dewasa dengan deformitas dentofacial biasanya ditangani dengan perawatan bedah orthodonti. Walaupun kasus deformitas dentofacial klas II lebih sering dijumpai, namun kebutuhan perawatan dan keinginan untuk memperbaiki profil muka lebih tinggi pada pasien dengan kasus klas III. Untuk koreksi kelainan skeletal secara menyeluruh pada maloklusi skeletal klas III maka dibutuhkan perawatan bedah ortodonti. **Tujuan:** Laporan kasus ini bertujuan melaporkan penanganan kasus dengan kelainan klas III maloklusion skeletal serta memperlihatkan hasil perawatan bedah ortognati yang memperbaiki profil pasien. **Kasus:** Perawatan bedah ortodonti dilakukan pada pasien laki-laki (20 tahun) dengan kelainan deformitas dentofacial klas III. **Tatalaksana Kasus:** Dilakukan pencabutan premolar pertama rahang atas kanan dan kiri, kemudian dilakukan retraksi gigi insisif rahang atas, agar didapatkan pergerakan yang adekuat. Tidak dilakukan pencabutan gigi pada rahang bawah. Perawatan bedah yang dilakukan adalah Le Fort I osteotomy dengan memajukan rahang atas sebanyak 8mm, mandibula dimundurkan dengan tehnik bilateral sagittal split ostetomy sebanyak 13 mm disebelah kanan, dan 11 mm disebelah kiri untuk koreksi dental midline dan deviasi dagu. Pasien juga mendapatkan perawatan genioplasty. **Simpulan:** Bedah ortognatik dapat dipilih sebagai perawatan untuk mendapatkan oklusi dan hasil estetik yang baik pada pasien dengan deformitas dentofasial kelas III. Namun demikian, perawatan perlu dilakukan oleh tim dari multidisiplin untuk mendapatkan hasil yang memuaskan.

Kata kunci: Deformitas dentofasial Klas III, bedah orthognati, perawatan ortodonti

Correspondence: Pakpahan Evie Lamtiur, c/o: Departemen Ortodonsia, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Prof Dr. Moestopo (B). Jl. Bintaro Permai Raya no. 3 Jakarta Selatan 12330, Indonesia. E-mail: evie_lamtiur@yahoo.com

INTRODUCTION

Many approaches have been performed successfully by orthodontist for the treatment of malocclusion and Class III malocclusion is considered as one of the most complex and difficult orthodontic problem to be diagnosed and treated.¹ In reality dental camouflage only leads to an effective improvement of aesthetics in a few situations. More frequently it has no significant influence on facial aesthetics, as in purely orthodontic correction of class III cases. In an adult with dentoskeletal discrepancy, surgery is the only sure treatment option if the dental defect cannot be corrected by orthodontics alone or if dental camouflage would involve technical or periodontal contraindications, or would not produce a marked aesthetic improvement. When a skeletal class III malocclusion is diagnosed, orthognatic surgery is almost always a consideration if the orthodontist and the patient desire complete correction of the skeletal discrepancy. Individuals with class III malocclusion frequently show combinations of skeletal and dentoalveolar components. Several distinct cephalometric features have been reported in class III patients, such as a short anterior cranial base length, acute cranial base angle, a short and retrusive maxilla, proclined maxillary incisors, retroclined mandibular incisors, an excessive lower anterior face height and obtuse gonial angle.² Therefore class III patients are large proportion of those seeking surgical orthodontic treatment. However, the etiology all class III malocclusion might not be the same. The

etiology of class III malocclusions may involve hereditary factors, environmental influences and even pathology.³ Additionally, class III patients typically have longer and unpredictable facial growth.² Class III patients can have varying degrees of dental and skeletal abnormalities. An accurate diagnosis is important to treat the malocclusion in order to insure that the treatment plan is directed at correcting the various abnormalities.³

The purpose of this article were to reported a case of severe class III malocclusion and to showed the positive effect of orthognatic surgical treatment on the patients profile.

CASE

A male patient, 20 years old, initially came for orthodontic treatment with the complaint of long face, crossbite and inability to incise. He has family history of class III malocclusion. The patient has a nonrelevant medical history. After thorough clinical examination and cephalometric analysis, surgical-orthodontic treatment was recommended.

Extraoral examination showed a concave profile with extremely long lower face height, incompetent lip and a flattened lower lip without labiomental sulcus. Frontal view of the face showed chin deviation to the left and long middle third of the face. The lower lip was stretched to compensate for the vertical discrepancy (Figure 1).

Table 1. Cephalometric summary

Measurement	Initial	Presurgical	Postsurgical
NA	85°	84°	92°
SNB	96°	96°	90°
ANB	-11°	-12°	+2°
Wits	-20mm	-29mm	-10mm
NAPg	-20°	-22°	-2°
FMA	40°	40°	35°
N PERP A	-3°	-5°	+4°
N PERP B	+12°	+13°	+6°
N-ANS	60 mm	59mm	65mm
ANS-Me	87mm	86mm	75mm
Faxial axis	66°	65°	62°
Sn Go Gn	39°	38°	35°
I SN	114°	107°	110°
IPP	125°	120°	109°
MX I TO NA	10mm	12mm	8mm
	25°	24°	35°
Mn I to nb	6mm	10mm	7mm
	14°	32°	15°
I mpa	65°	77°	75°
E line bibir atas	-5mm	-6mm	-3mm
E line bibir bawah	+5mm	+5mm	+3mm

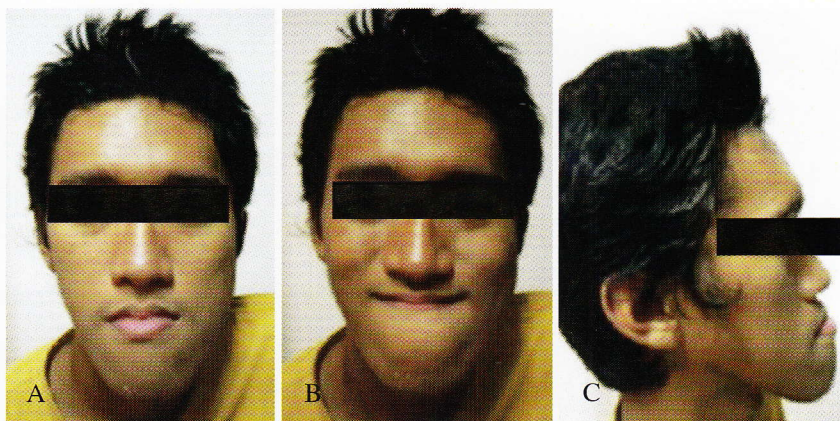


Figure 1. Pretreatment facial profiles: A, B. front; C. Right side.

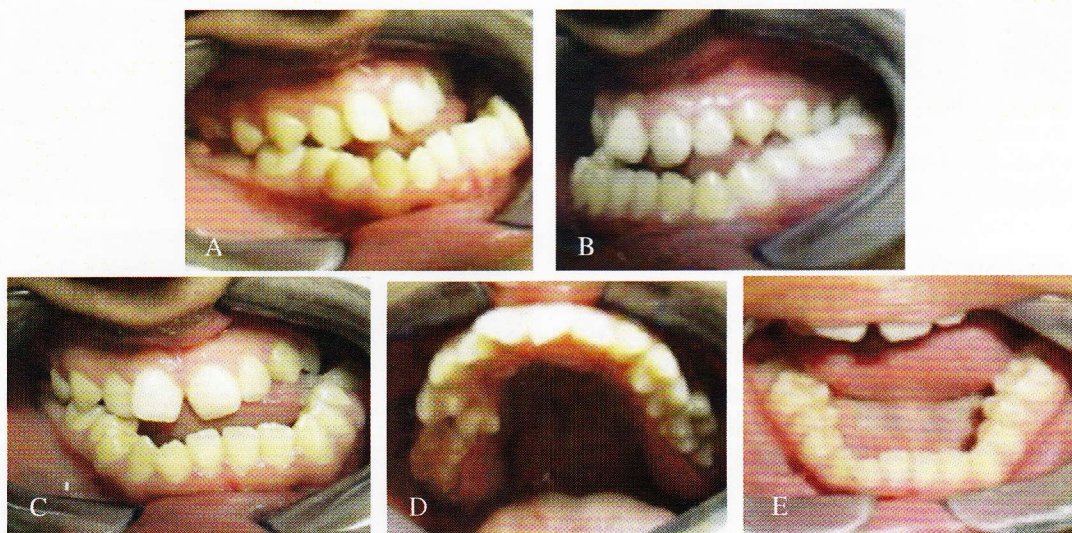


Figure 2. Pretreatment intraoral photographs. A) right side; B) left side; C) front; D) maxilla; E) mandibula.



Figure 3. Presurgical cephalometric radiograph.

The analysis of intraoral confirmed an angle class III malocclusion with antero posterior discrepancy in the molar relationship was more than 10 mm, and a -13 mm incisor overjet, absence of overbite were measured. The mandibular dental midline were deviated 6mm to the left. There was posterior crossbite on the left side, mild crowding in the lower as well and compensation of incisor inclination in both arches (Figure 2).

Study model analysis showed an angle class III malocclusion more than 10 mm anteroposterior discrepancy in the molar relationship. The archform were not well coordinated due to severe compensations that led to large anterior and buccal overjet. The lateral cephalometric radiograph revealed Class III skeletal malocclusion ($ANB = -11^\circ$), maxillary a bit protusion ($SNA = 85^\circ$), and mandible protusion ($SNB = 96^\circ$) in relation to the anterior skull base. Concave bone profile ($NAPg = -20^\circ$), dolichofacial morphological type (facial axis = 66°) and predominance of vertical growth of the face ($SNGoGn = 39^\circ$ and $FMA = 40^\circ$). The maxillary incisors presented increased to their alveolar (Table 1 and Figure 3).



Figure 4. A, C, E) Presurgical ekstraoral photographs. B, D, F) post surgical ekstraoral photographs-1.

CASE MANAGERMENTS

preoperative orthodontic preparation was performed with 0.022 appliance. Leveling and alignment began with 0.016-in nickel-titanium archwires, followed by 0.018, 0.016 x 0.022-inch nickel-titanium archwires up to 0.19 x 0.025-inch stainless steel rectangular archwires. In the leveling and alignment stage, the archwires were coordinated. To allow adequate surgical movement, the maxillary first premolars on both side was extracted to correct the position of maxillary incisor therefore the maxillary incisors were retracted. No extractions were performed in the mandibular arch because there was minimal crowding. The mandibular incisors were aligned and the arch and the archform were coordinated.

After presurgical orthodontic treatment achieved, the orthognathic surgery were performed. Surgery included a Le Fort I osteotomy with 8mm of advancement and it was rotated anterior down 3 mm and posterior up 1 mm at Posterior Nasal Spine (clockwise rotation). The pivoting point is around the first molar. A bilateral sagittal split osteotomy with 13 mm of setback at right and 11 mm at left for the correction of dental midline and chin deviation. The chin therefore moves 11 mm backward. Rigid internal fixation with screws and plates was used to stabilize the osteotomy site. The patient was followed up closely after the procedures. Postoperatively, to achieve the proper occlusal contacts, vertical intermaxillary and class III elastic were used.

After surgery, it was observed functional occlusion, normal overjet and overbite, and adequate intercuspation, with class II Angle molar relationship and class I canine relationship, coincident midlines. Mandibular prognatism and asymmetry were eliminated and facial esthetic was

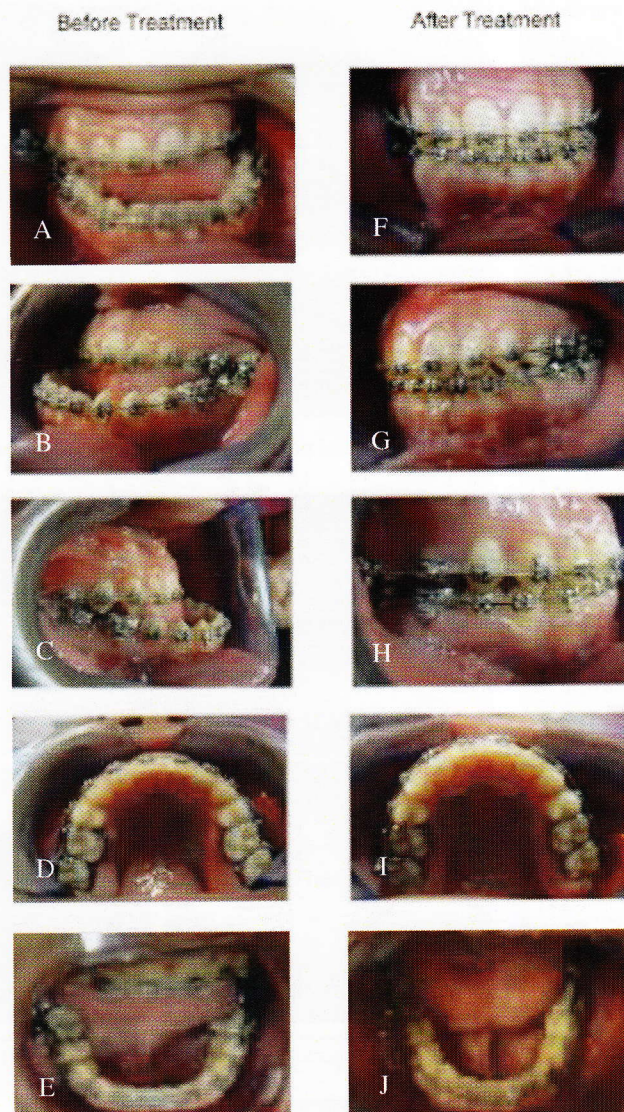


Figure 5. A, B, C, D, E) Presurgical intraoral photographs. F, G, H, I, J) post surgical intraoral photographs copy.

considerably improved. Figures 4 and 5 show the results obtained with the orthognathic surgery and orthodontic finishing stage, and postsurgical cephalometric radiograph is shown in Figure 6.

DISCUSSION

There are three main treatment options for skeletal class III malocclusion, which is growth modification, orthodontic therapy, and orthognathic surgery combined with orthodontic treatment. Maxillofacial growth modification with dentofacial orthopedic appliance is an effective method for resolving skeletal class III jaw discrepancies in children. Correcting this problem in adults requires orthognathic surgery in conjunction with orthodontic treatment.⁴

Some studies reported the factors that the choice between conventional orthodontic treatment and surgical orthodontic



Figure 6. Post surgical cephalometric radiograph copy.

treatment. Kerr⁵ et al reported that patients with ANB angles of less than -4° and mandibular incisor inclination of less than 83° were more likely to have surgical-orthodontic treatment than conventional orthodontic treatment. A recent study concluded that surgical patients could be distinguished from nonsurgical ones, on the basis of WITS measurement, maxillary/mandibular length ratio, gonial angle, and sella-nasion distance.⁶ Miller⁵ found there were four areas of significantly difference between the surgery and non surgery case, which are: ANB Angle was significantly more negative in the surgical group.⁵ Surgery was often considered necessary when ANB angle was less than -4° . Thus the ratio of maxillary to mandibular lengths was significantly smaller for the surgical patients. Also, the lower incisor were more retroclined in the surgical group. The division between the two group was about 83° . The last role is the Holdaway angle was larger in the orthodontic group. Surgery was almost always carried out when the Holdaway angle was less than 3.5° .⁵ Before treatment this patient had ANB = -11° , and mandibular incisor inclination of less than 83° which is 65° (Table 1 and Figure 3). That measurement indicate for this patient to have orthognatic surgery treatment.

It is very important to understand the components of facial asymmetry in order to outline an accurate and effective treatment plan.⁷⁻¹⁰ The analysis of posteroanterior cephalometric radiographs determines if the asymmetry is related to the maxilla, mandible or both, in the sagittal or transverse direction, and is the anomaly is also associated with dental compensations. Most studies have demonstrated that transverse dental compensation

is correlated with skeletal asymmetry.¹¹⁻¹³ Inclination of the occlusal plane greater than 4 and mentum deviations observed in the posteroanterior cephalogram are important characteristic to determine the presence and extension of facial asymmetry.¹⁴⁻¹⁵ The patient of this case presented significant facial asymmetry with mandibular asymmetry and mentum deviation to the left. Severt and Proffit also Haraguchi *et al.*¹⁵ have reported that in patients with dentofacial deformities with mandibular deviation, lateral excursion to the left was present in over 85% of the studied population. He also added that the mandible is more asymmetrical than the maxilla because of its greater potential. While the mandible is a movable bone, the maxilla is rigidly connected to the adjacent skeletal structures by means of sutures and synchondroses.

The patient presented unilateral posterior crossbite on the left side and midline shifting to the left, it results from mandibular deviation. The mandibular deviation and midline shifting was corrected by surgically. The same treatment was taken with similar cases in some case report.^{17,18} Orthodontic treatment to obtain the preoperative alignment of the dental arches was also an important part as the best result with minimum relapse could not be expected without a stable occlusion.¹⁹⁻²⁰ The maxillary premolars on both side were extracted to correct maxillary incisors inclination. The main aim of the presurgical orthodontic phase is to correct the incisor inclinations to normal to allow maximum surgical correction and the less-than-ideal outcomes for the skeletal relationships might have been due to inadequate presurgical orthodontic decomensation of the incisor inclination.²⁰

After surgery the position of maxilla in this patient was +5mm anterior to the nasion Frankfort line and the maxillary incisor was +8mm anterior to the nasion Frankfort. Position maxillary incisor was 109° . When only orthodontic treatment considered, the orthodontist formulates a treatment plan based on the desired final position of the mandibular incisor. For surgical treatment planning the scenario is reversed; the maxillary incisor final position is used to determine the placement of the facial bones. McNamara's nasion Frankfort perpendicular is an anteroposterior guideline that can be used to help determine the best placement of the maxillary incisor.²¹ Point A should be positioned as close as possible to the nasion Frankfort line, but more importantly, the maxillary incisor should be positioned 5 mm \pm 2 mm anterior to the nasion Frankfort line and at 110° to the palatal plane.²²⁻²³

The overall result of the treatment was good (Figure 4, 5 and 6). The lower face height (ANS-Me) was improved cephalometrically from 87 mm to 75 mm. The ANB was improved from -11° to $+2^{\circ}$. Visually, pleasing changes in the frontal and profile views of the face are evident (Figure 4). The pretreatment lip incompetency was totally eliminated and the labiomental sulcus was normalized.

Dental changes resulted in a class II molar occlusion with a class I canine relationship. The pretreatment maxillary midline deviation to the left was completely

corrected. All the functional movement of the mandible are without limitation and without symptoms. The treatment protocol produced a satisfactory occlusal and esthetic result for the patient and his parents as demonstrated by their attitude.

This case report describes the treatment of an adult patient with severe class III dentofacial deformity. Orthognathic surgery treatment was the best option for achieving an acceptable occlusion and a good esthetic result in this patient. An experienced multidisciplinary team approach ensures a satisfactory outcome. Presurgical orthodontics removes all the dental compensations and suggests the location and extent of the skeletal discrepancy. Normal skeletal base relationship was achieved by osteotomy and setback of the prognathic mandible, postsurgical orthodontics guides the normal occlusal rehabilitation by correcting any emerging dental discrepancies.

ACKNOWLEDGEMENTS

Sincere gratitude to dr. Enrina Diah, Sp.BP for performing the orthognathic surgery in Cipto Mangunkusomo Hospital, Jakarta.

REFERENCES

- Mucedero M, Coviello A, Baccetti T, Franchi L, Cozza P. Stability factors after double-jaw surgery in class III malocclusion. *Angle Orthodontist* 2008; 78(6): 1141-52.
- Katiyar R, Singh GK, Mehrotra D, Singh A. Surgical-orthodontic treatment of a skeletal class III malocclusion. *Natl J Maxillofac Surg* 2010; 1(2): 143-9.
- Lowenhaupt EB. Compromised nonsurgical treatment of a patient with a severe class III malocclusion. *International Dentistry* 2009; 11: 52-61.
- seng YC, Pan CY, Chou ST, Liao CY, Lai ST, Chen CM, Chang HP, Yang YH. Treatment of adult class III malocclusion with orthodontic therapy or orthognathic surgery: Receiver operating characteristic analysis. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2011; 139(5): e485-e493.
- Kerr WJ, Miller S, Dawber JE. Class II malocclusion: surgery or orthodontics?. *Br J Orthod* 1992; 19: 21-4.
- Stellzig-Eisenhauer A, Lux CJ, Schuster G. Treatment decision in adult patients with class III malocclusion: orthodontic therapy or orthognathic surgery?. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2002; 122: 27-37.
- Decker, JD. Asymmetric mandibular prognatism: A 30-year retrospective case report. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006; 129(3): 436-43.
- Hayashi K, Mugutuma T. Morphologic characteristic of the dentition and palate in cases of skeletal asymmetry. *Angle Orthod* 2004; 74(1): 26-30.
- Ko EW, Huang CS, Chen YR. Characteristic and corrective outcome of face asymmetry by orthognathic surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 2009; 67(10): 2201-9.
- Sekiya T, Nakamura Y, Oikawa T, Ishii H, Hirashita A, Seto K. Elimination of transverse dental compensation is critical for treatment of patients with severe facial asymmetry. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2010; 137(4): 552-62.
- Hayashi K, Muguruma T. Morphologic characteristics of the dentition and palate in cases of skeletal asymmetry. *Angle Orthod* 2004; 74(1): 26-30.
- Kusayama M, Motohashi N, Kuroda T. Relationship between transverse dental anomalies and skeletal asymmetry. *Am J Ortho Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2003; 123(3): 329-37.
- Van Elslande DC, Russett SJ, Major PW, Flores-Mird C. Mandibular asymmetry diagnosis with panoramic imaging. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2008; 134(2): 183-92.
- Padwa BL, Kaiser MO, Kaban LB. Occlusal cant in the frontal plane as a reflection of facial asymmetry. *J Oral Maxillofac Surg* 1997; 55(8): 811-6.
- Haraguchi S, Takada K, Yasuda Y. Facial asymmetry in subjects with skeletal class III deformity. *Angle Orthod* 2002; 72(1): 28-35.
- Severt TR, Proffit WR. The prevalence of facial asymmetry in the dentofacial deformities population at the University of North Carolina. *Int J Adult Orthodon Orthognath Surg* 1997; 12(3): 171-6.
- Janson M, Janson G, Sant Ana E, Tibolao, Martins DR. Orthognathic treatment for a patient with class III malocclusion and surgically restricted mandible. *Am J Orthod J Dentofacial* 2009; 136(2): 290-8.
- Cho HJ. Patient with severe skeletal class II malocclusion and severe open bite treated by orthodontic and orthognathic surgery-a case report. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 1996; 110(2): 155-62.
- Nakajima T, Kajikawa Y, Hirose T, Tokiwa N, Hanada K, Fukuhara T. Surgical-orthodontic approach to skeletal class III malocclusion. *Int J Oral Surg* 1978; 7(4): 274-80.
- Johnston C, Burden D, Kennedy D. Class III surgical-orthodontic treatment: A cephalometric study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006; 130: 300-9.
- Mc Namara JA. A method of cephalometric evaluation. *Am J Orthod* 1984; 86(6): 449-69.
- Bilodeau JE. Vertical consideration in diagnosis and treatment, a surgical orthodontic case report. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 1995; 107(1): 91-100.
- Bilodeau JE. Correction off a severe class II malocclusion that required two stage orthognathic procedure: A case report. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 1995; 108(4): 421-7.

Subject Index

Volume 46

- 19% EDTA, 190
37% phosphoric acid, 190
8-oxo-dG, 119
Acyclovir, 30
Adhesion, 202
Aesthetic Component IOTN, 97
Alginate, 5
 extraction, 65
Allergic, 85
Amelogenin, 113
 expression, 135
Anterior bite splint, 23
Anti inflammatory gel, 30
Antisense p45Skp2 gene, 18
Antropometry, 167
Apoptosis, 18, 185
Asymmetrical, 55
Baby bottle nipple, 75
Bactericidal, 9
Bcl-2, 35
Bite marks, 107
Bone resorption, 185
Borderline cases, 179
Calbindin-28kDa, 113
Calcite synthesized hydroxyapatite, 207
Calcium, 113
Cassava leaves, 196
CBCT, 61
Chelex, 107
Chemical element, 65
Children, 158, 167
Chitosan gel, 152
Citotoxicity, 9, 218
Citrus aurantifolia swingle, 50
Class I malocclusion, 179
Class III dentofacial deformity, 229
Communication performances, 1
Compressive strength, 101
Contact angle, 207
COX-2, 196
CPP-ACPF, 39, 202
Cyclooxygenase-2, 173
Cytotoxicity, 221
Deciduous tooth, 61
Demand, 97
Density of pulp chamber, 61
Dental caries, 61, 158, 213
Dental health services, 1
Dental pulp, 130, 190
Denture cleanser, 75
Desensitizing agent, 204
Diagnose, 146
Differentiation, 140
Dry heat oven, 71
EFLAE, 9
Ellagic acid, 35, 148
Enamel defect, 55
Enamel matrix density, 113
Enterococcus faecalis, 14, 45
Environmental carcinogen, 140
Epstein-Barr virus, 140
Esthetic line, 92
Extraction, 181
Facial morphology index, 224
 height, 224
 profile, 92
 soft tissue profile, 179
 type, 224
Fiber composite post, 162
Film thickness, 207
Fish oil, 185
Fluoride, 124, 202
Fluorosis, 113
Functional groups, 65
Garcinia mangostana Linn, 173
Gene, 18
Gentian violet 1%, 75
Gestational diabetes mellitus, 135
GIC bonding, 39
Gingival, 218
 ulcer, 152
Halitosis, 50
Hemolysin, 45
Heteroplasmy, 130
Holothuria atra, 228
Hybrid composite resin, 101
Identification, 224
Inducible Nitric Oxide Synthase, 14
Inflammation, 190
Interincisal Angle, 224
Intra-uterine growth restriction, 55
Invasion, 18
Javanese population, 92
Lateral cephalometric, 167
Lightbox, 101
Lipopolysaccharide, 85
Local muscle soreness, 23
Locus vWA and TH01, 107
LPS, 196
LSTR 3Mix-MP, 80
Macrophage, 152
Malignant cells, 35, 148

Malocclusion, 97
Mangosteen rind etanolic extract, 173
Manihot utilisissima, 196
Mental retardation, 167
Mesenchymal stem cell, 218
Metal crown, 162
Methyl mercaptan, 50
Micro hardness, 207
Micronucleus, 119
Molar band, 71
Molecular biomarker, 140
Monocytes, 196
Morphology, 65
mtDNA, 130
n-3 PUFA, 185
Nasopharyngeal carcinoma, 140
Necrotic pulp, 213
Neutrophyl, 152
Non invasive, 146
 teeth extraction, 179
Obesity, 158
Oral thrush, 75
Orthodontic treatment, 97, 229
Orthognatic surgery, 229
Osteoblast, 185
p53 wild, 154
Patients expectation, 1
Periapical granuloma, 213
Periapical lesions, 14
Periodontal disesease, 185
Periodontitis, 173
Periodontopathic bacteria, 85
Peroxide alkaline, 75
Personal identification, 130
Physical properties, 207
Polimerization, 5
Pomegranate fruit extract, 35
Pomegranate, 154
Porphyromonas gingivalis, 50, 213
Post curing, 101
Prevotella intermedia, 213
Primary teeth, 80
Primer, 45
Pulp necroses, 80
Ponica Granatum L (PGL), 148
Rabbit, 119
Radiography panoramic exposure, 119
Root canal, 45
 sealer, 207
Saliva, 45
Salivary leptin, 158
Sensitive, 146
Setting time, 5
Shear strength, 39
Small for gestational age, 55
Soft palate cancer cell, 18
 putty, 23
Sprague Dawley rats, 190
Specific, 140
Spectrophotometry, 124
Steam autoclave, 71
Sterilization, 71
Sticophus hermanii, 218
Streptococcus mutans, 202
Symmetrical, 55
Teeth extraction, 179
Toothpaste, 124
Transmission, 85
Unidentified angular ulceration, 30
Virulence, 45
Water temperature, 5
Whole morphology facial index, 228
Wild p53, 148
Wistar rats, 135, 173
Wound healing, 152
Young permanent molar, 162

Authors Index Volume 46

- Adisty, Tasya, 152
Amtha, Rahmi, 30
Apriasari, Maharani Laillyza, 75
Aryanto, Mirza, 101
Atzmaryanni, Elfrida, 158
Ayu N.P.A, Dewa, 45
Bramantoro, Taufan, 1
Budipramana, Melisa, 39
Cilmiaty, Risya, 213
Dewi, Nurdiana, 135
Elianora, Dewi, 167
Fatimatuzzahro, Nadie, 190
Febri K, Ardyni, 130
Fitriyani, Nadiya, 92
Hastuti, Susanti Pudji, 124
Herdiyati Y, 61
Hernawati, Sri, 35, 148
Indahyani, Didin Erma, 185
Indrani, Decky J, 5, 65
Kaolinni, Wees, 97
Kristanti, Yulita, 202
Laksono, Harry, 23
Lantiur, Pakpahan Evie, 229
Meilawaty, Zahara, 196
Mulyawati, Ema, 207
Parisihni, Kristanti, 218
Prasetya, Rendra Chriestedy, 173
Pratiwi, Theresia Dhearine, 162
Pudyani, Pinandi Sri, 179
Saskianti, Tania, 80
Shantiningsih, Rurie Ratna, 125
Sianita K, Pricillia Priska, 224
Sjarif, Willyanti Soewondo, 55
Sudiono, Janti, 9, 140
Supriatno, 18
Sutrisno, Imelda Kristina, 107
Tridianti, Anggia, 71
Utomo, Haryono, 85
Wahluyo, Soegeng, 113
Yuanita, Tamara, 14
Yusinta, Anindya Prima, 50

Thanks to Editor Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi)

Volume 46 Number 1 March 2013 :

1. Dr. Retno Indrawati, drg., MSi. (Oral Biology – Universitas Airlangga)
2. Dr. Indah Listiana, drg., M.Kes. (Oral Biology – Universitas Airlangga)
3. Wisnu Setyari, drg., M.Kes. (Oral Biology – Universitas Airlangga)
4. Dr. Ira Arundina, drg., M.Kes (Oral Biology – Universitas Airlangga)

Volume 46 Number 2 June 2013 :

1. Prof. Dr. Pinandi Sri Pudyani, drg., S.U., Sp.Ort (Orthodontics – Universitas Gadjah Mada)
2. Prof. Dr. Mandojo Rukmo, drg., MSc., Sp.KG(K) (Conservative Dentistry – Universitas Airlangga)
3. Prof. Dr. Adioro Soetojo, drg., MS., Sp.KG(K) (Conservative Dentistry – Universitas Airlangga)
4. Dr. IB. Narmada, drg., Sp.Ort(K) (Orthodontics – Universitas Airlangga)
5. Kus Harijanti, drg., MS., Sp.PM (Oral Medicine – Universitas Airlangga)

Volume 46 Number 3 September 2013 :

1. Prof. Dr. drg. Iwa Sutardjo Rus Sudarso, SU., Sp.KGA(K) (Pediatrics Dentistry – Universitas Gadjah Mada)
2. Prof. Dr. Adioro Soetojo, drg., MS., Sp.KG(K) (Conservative Dentistry – Universitas Airlangga)

Volume 46 Number 4 December 2013 :

1. Prof. Dr. Mandojo Rukmo, drg., MSc., Sp.KG(K) (Conservative Dentistry – Universitas Airlangga)
2. Prof. Dr. Adioro Soetojo, drg., MS., Sp.KG(K) (Conservative Dentistry – Universitas Airlangga)
3. Dr. Theresia Indah Budhy, drg., M.Kes (Oral Pathology and Maxillofacial – Universitas Airlangga)
4. Dr. Indah Listiana Kriswandini, drg., M.Kes (Oral Biology – Universitas Airlangga)

Guide for authors

Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi) only publishes original articles on all aspects of dentistry and dental related disciplines. Articles are considered for publication with the condition that they have not been published or submitted for publication elsewhere. Articles can be classified as research reports, case reports and literature reviews that keep the readers informed of current issues, innovative cases and reviews in dentistry. They should also support scientific advancement, education and dental practice development. Manuscripts will be published in English therefore it is the author's responsibility to ensure the submitted manuscript to be provided in appropriate English. The language used in manuscript must be non numeral, and free of mistypes. The length of manuscript must be proportional.

The manuscript must be submitted in soft copy file via CD or e-mail. Manuscript should be typed using MS Word program. The font used should be Times New Roman, sizing 14 pt for the title, and 12 pt for others. Headlines are typed in bold, while Latin names are typed in italics. Three legible copies of the manuscript which are typed in double space with wide margins on good quality A4 white paper (210 × 297 mm) should also be enclosed. The length of article should not below 10 pages and should not exceed 12 pages. The left, right, top, and bottom margin should be 2.5 cm or 1 inch length. Authors should also follow the manuscript preparation guidelines.

All Research Reports, Case Reports, and Literature Reviews must contain:

- **Title** should be brief, specific and informative. The title must contain maximum 10 words (not exceeding 40 letters and spaces) with capital letter on the first word of the title. The title must be provided in English and Bahasa Indonesia.
- **Name of Author(s)** should include full names of author(s), address to which proofs are to be sent, name and address of the department(s) to which the work should be attributed and appointed accordingly with asterisk (*) symbol.

Example:

Jamal Bin Razak*, Matsuo Hamada**, Ninuk Hartati***, and Harold Whitfield****

* Department of Oral and Maxillofacial Surgery
Faculty of Dentistry - University of Malaya
Malaysia

** Department of Prosthodontics
School of Dentistry - Hiroshima University
Japan

*** Department of Dental Public Health
Faculty of Dentistry - Airlangga University
Surabaya - Indonesia

**** Department of Endodontics
School of Dental and Health Sciences -
The University of Melbourne
Australia

- **Abstract** should be structured with concise description (contains not more than 250 words, formatted in 1 space, and done in one paragraph). The abstract must be provided in English and Bahasa Indonesia.
- **Abstract in Research Reports** should consists of "**Background:**", "**Purpose:**", "**Method:**", "**Result:**" and "**Conclusion:**" typed in bold within one paragraph. Footnotes, references, and abbreviations are not used in the abstract.

- **Abstract in Case Reports** should consists of "**Background:**", "**Purpose:**", "**Case(s):**", "**Case Management:**" and "**Conclusion:**" typed in bold within one paragraph. Footnotes, references, and abbreviations are not used in the abstract.
- **Abstract in Literature Reviews** should consists of "**Background:**", "**Purpose:**", "**Reviews:**", and "**Conclusion:**" typed in bold within one paragraph. Footnotes, references, and abbreviations are not used in the abstract.
- **Key words** contain 3-5 words and/or phrases and must be provided below the abstract. The key words must be provided in English and Bahasa Indonesia.
- **Correspondence** should contain details of the author in charge with detailed mailing address and e-mail.

Correspondence is followed by the following sections according to type of article (Research Reports, Case Reports, or Literature Reviews) as follows:

I. Contents in Research Reports:

The research reports should contain the following sections: introduction, materials and methods, and results.

- **Introduction** comprises the problem's background, its formulation and purpose of the work or case or review and prospect for the future. Introduction in literature reviews are followed by headline topics and exposures to be discussed.
- **Materials and Methods** contain clear description on used materials and scheme of experiments as well as methods in order to enable other examiners to undertake retrial or duplication and validity checked if necessary. Reference should be given to the unknown method. Research ethics on animal and human subjects must be stated accordingly, if applicable.
- **Results** should be presented accurately and concisely in logical sequence with the minimum number of tables and illustrations necessary for summarizing only important observations. Tables must be made in horizontal (without vertical line separation) for simple viewing. **Mathematical Equations** should be clearly stated. When mathematical symbols are not available on the typewriter, hand written symbols with soft lead pencil could be used. **Decimal numbers** should be separated by *point* (.). **Tables, illustration, and photographs** should be cited in the text in consecutive order and provided separately from the texts of manuscript. The titles and detailed explanations of the figures belong in the legends for illustrations (figures, graphs) not on the illustrations themselves. All non-standard abbreviations that are used must be explained in footnotes.

II. Contents in Case Reports:

The case reports should contain the following sections: introduction, case(s), and case management.

- **Introduction** comprises the problem's background, its formulation and purpose of the work or case or review and prospect for the future.
- **Case(s)** contain clear and detailed description on presented case(s) including anamnesis and clinical examinations.
- **Case(s) management** should be presented accurately and concisely in chronological sequence supported with figures and detailed descriptions on what was done.

III. Contents in Literature Reviews

The literature reviews should contain the following sections: introduction, and overviews.

- **Introduction** comprises the problem's background, its formulation and purpose of the work or case or review and prospect for the future. Introduction in literature reviews are followed by headline topics and overviews to be discussed.

All Research Reports, Case Reports, and Literature Reviews must be followed by:

- **Discussion** explains the meaning of the examination's results, not repeating the result, in what way the reported result can solve the problems, differences and equalities with previous study and development possibilities. This section should include the conclusion of the reported work or case and suggestion for further studies if necessary.
- **Acknowledgements** to all research contributors, if any, should be stated in brief at the manuscript, prior to references.
- **References** should be arranged according to the Vancouver system. References must be numbered consecutively in the order in which they are first mentioned in the text, and listed at the end of the text in numeric, not alphabetical order. Identify references in text, tables, and legends by Arabic numerals in superscript. References must be valid and taken within the last 10 years of publication, containing at least 70% of primary references (from journals, thesis, dissertations, and patent documents). Unpublished sources, such as manuscripts in preparation and personal communications are not acceptable as references. Only sources cited in the text should appear in the reference list. List all authors when four or fewer authors are involved; when there are more than four authors, list the first three authors and add "et al.". The name of authors must be written in consistency. The number and volume of journals must be included. Edition, publisher, city, and page numbers of textbooks must be included. Internet downloaded references must include the time of access and web address. Any abbreviation of journals must comply with dental index and medic index.

Citation format for journal articles:

1. Donnelly PV, Miller C, Ciardullo T, Occlusion and its role in esthetics. *J Esthetic Dentistry* 1996; 8: 111–8.
2. Grimes EW. A use of freeze-dried bone in Endodontics. *J Endod* 1994; 20: 355–6.
3. Bilhaut. Guerison d'un pounce par un nouveau procede operatoire. *Congres Francais de Chirurgie* 1998; 4: 576–580.

Citation format for textbooks:

1. Hickey JC, Zarb GA. Boucher's prosthodontic treatment for edentulous patients. 9th ed. St. Louis: Mosby; 1985. p. 452–9.
2. Cohen S, Burns RC. Pathways of the pulp. 5th ed. St Louis: Mosby Co; 1994. p. 123–47.

Citation format for electronic publications:

1. Morse SS. Factors in the emergence of infectious disease. *Emerg Infect Dis* [serial online] 1995 Jan–Mar; 1(1): [24 screens]. Available from: URL: <http://www.cdc.gov/ncidoc/EID/eid.htm>. Accessed December 25, 1999.

2. Yu F. Management of thumbs duplication. *Emerg Infect Dis* (on line) <http://www.cdc.gov/ncidoc/EID/eid.html>. 1997.
3. Surgery, Edward G. Media Scientific, producer. 4th ed. San Diego: Media Scientific, 1998. p. 4

Citation format for proceedings:

1. Perry CH, Lu F, Namavar F, Kalkhoran NM, Soref RA. Radical styloid. *Proceedings of the 10 International Congress of Clinic*; New York, USA. Amsterdam: Elsevier; 1991.
2. Favier JJ, Camel D. Enforcement of data in medical information. In: Lun KL, editor. *Proceedings of the Eight International Conference on Medicine*; York, UK, 1986 Sept 8–10.

Citation format for thesis and dissertations:

1. Ramos R. Preventive Health Amendments. PhD Thesis. College van Dekanen. University of Twente. The Netherland, 1992.
2. Amerongen AVN, Michels LFE, Roukema PA, Veerman ECI. 1986. Ludah dan kelenjar ludah arti bagi kesehatan gigi. Rafiah Arbyono dan Sutatmi Suryo. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press; 1992. p. 1–42.
3. Salim S. Pengaruh humiditas dan waktu penyimpanan serta cara curing terhadap sifat fisik, kimia dan mekanik akrilik basis gigi tiruan. Disertasi. Surabaya: Pascasarjana Universitas Airlangga; 1995. p. 8–21.

Citation format for patents:

1. Yamagishi H, Hiroe A, Nishio H, Miki K, Tawada Y. Methods Procedures of Hand Surgery. US Patent No. 5264710, 1993 Nov 23.

All figures, illustrations and photos must be relevant, informative, concise, and referred if any, provided in file (jpg, tiff, etc.). Non-file photos should be printed in clear glossy paper. The size should meet with the minimum measurement of 125 × 195mm. The maximum number of figures, illustrations, photos, and tables in research report and literature review is 4 (four). The maximum number of figures, illustrations, photos, and tables in case report is 8 (eight). All figures, illustrations and photos must be separated from the texts of manuscript. Written permission must be obtained for material that has been published in copyrighted material; this includes tables, figures, and quoted text that exceeds 150 words. Signed patient release forms are required for photographs of identifiable persons. A copy of all permissions and patient release forms must accompany the manuscript.

The editor reserves the right to edit the manuscript, fit articles into space availability, and ensure conciseness, clarity, and stylistic consistency. All accepted manuscripts and their accompanying illustrations will become the permanent property of the publisher, and may not be published elsewhere in full or in part, in print or electronically, without written permission from the publisher. All data, opinions or statements appeared on the manuscript are the sole responsibility of the author(s). Accordingly, the publisher, the editorial board, and their respective employees of the Dental Journal will accept no responsibility or liability whatsoever for the consequences of any such inaccurate or misleading data, opinions, or statements.

SUBSCRIPTION ORDER FORM
FORMULIR BERLANGGANAN

Dental Journal

Majalah Kedokteran Gigi

FACULTY OF DENTISTRY AIRLANGGA UNIVERSITY

Editorial Address c/o: Jln. Mayjen. Prof. Dr. Moestopo No. 47 Surabaya 60132, Indonesia

Telp./Fax.: (062-31) 5039478

E-mail: dental_journal@yahoo.com Website: www.journal.unair.ac.id, www.dentj.fkg.unair.ac.id,

International Subscription – include shipping [Please Tick (✓)]

Country	Issue*		
	6 month	1 year	2 years
Surabaya	<input type="checkbox"/> Rp80.000,00	<input type="checkbox"/> Rp160.000,00	<input type="checkbox"/> Rp320.000,00
Java Island (Pulau Jawa)	<input type="checkbox"/> Rp90.000,00	<input type="checkbox"/> Rp180.000,00	<input type="checkbox"/> Rp360.000,00
Outside Java Island (Luar Pulau Jawa)	<input type="checkbox"/> Rp100.000,00	<input type="checkbox"/> Rp200.000,00	<input type="checkbox"/> Rp400.000,00
Other Countries (Negara Lain)	<input type="checkbox"/> US \$ 27	<input type="checkbox"/> US \$ 54	<input type="checkbox"/> US \$ 108

* Quarterly Publication (terbit 4 kali setahun)

I Wish to subscribe Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi)

Saya ingin berlangganan Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi)

Name>Nama:

Date of Birth/Tanggal Lahir:

Job Title/Pekerjaan:

Institution/Institusi:

Address/Alamat Surat:

.....

.....

Country/Negara:

Telp.:

Fax.:

E-mail:

Date/Tanggal:

I am paying this magazine by: [Please Tick (✓)]

Saya membayar majalah ini dengan: [beri tanda (✓)]

Bank draft/Cheque

Money-order/Wesel

Transfer to:

Account No : 033-01-11343-16-0
Name of Bank : Bank Niaga Cabang Dharmahusada
Name of Beneficiary : Drg. Sianiwati Goenharto

Others/Lainnya (please specify/sebutkan):

.....

Signature/Tanda Tangan:

FOR CUSTOMERS ONLY
UNTUK PELANGGAN

Mail to:
DENTAL JOURNAL
(MAJALAH KEDOKTERAN GIGI)
Jln. Mayjen. Prof. Dr. Moestopo No. 47
Surabaya 60132

Or
Fax to:
(062-31) 5039478

CHANGE OF MAILING ADDRESS
PERUBAHAN ALAMAT SURAT

Name>Nama:

Address/Alamat:

.....

Country/Negara:

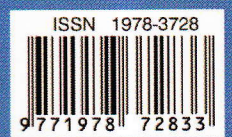
Telp.:

Fax.:

E-mail:

Date/Tanggal:

Signature/Tanda Tangan:





KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS JEMBER
UPT PERPUSTAKAAN

Jalan Kalimantan No. 37 - Kampus Bumi Tegal Boto Kotak Pos 198 Jember 68121
Telp. (0331) 338261, 333860, 330224 pes. 308 Fax. (0331) 338261
Website: <http://library.unej.ac.id> Email: library@unej.ac.id

SURAT KETERANGAN KARYA DEPOSIT
No. 399/UN25.5.1/TU.3/2015

Jenis Karya : Jurnal Ilmiah

Memperhatikan Surat Pengantar Pembantu Dekan I Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember tanggal 10 Maret 2015 Nomor: 0803/UN25.1.8/SP/2015 dengan ini Kepala UPT Perpustakaan Universitas Jember menerangkan bahwa :

No.	N a m a	Fakultas	Telah Menulis pada halaman
1.	Dr. drg. Didin Erma Indahyani, M.Kes.	Kedokteran Gigi	185-189

yang dimuat dalam *Dental Journal Majalah Kedokteran Gigi* Volume 46 Number 4, Desember 2013 dengan judul : Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella Longicep*) Menurunkan Apoptosis Asteoblas Pada Tulang Alveolaris Tikus Wistar.

ISSN : 1978-3728

Karya Ilmiah tersebut telah didaftar dan didokumentasikan di UPT Perpustakaan Universitas Jember dengan nomor inventaris : KK. 223/3.12/2015.

Jember, 11 Maret 2015

Universitas Jember

Rektor,

u.b. Kepala UPT Perpustakaan



Dra. Tri Lestari Mg., SIP., M.Si
NIP. 19560414 198203 2 001

TEMBUSAN :

1. Yth. Pembantu Dekan I FKG
Universitas Jember
2. Arsip



Certificate NO : QMS/173