

UJI SITOTOKSISITAS EKSTRAK AIR ASAM JAWA 5% TERHADAP CELL LINE BKH-21

Erawati Wulandari*, Latief Mooduto**, Theresia Indah Budhy S***

*Bagian Ilmu Kedokteran Gigi Anak Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

**Bagian Ilmu Konservasi Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga

***Bagian Biologi Mulut, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Airlangga

Abstract

Tamarindus indica (tamarind) is an established traditional medicine. Pulpa tamarindorum includes vitamin C, protein, fat, glucose, citric acid, etc. Citric acid is a root canal irrigant and vitamin C an antioxidant. This study aimed to elucidate the cytotoxicity of 5% tamarind extract as a root canal irrigant to the cell line BHK-21. Eighteen cultures of cell line BHK-21 were divided into 2 groups. Sterile aquabidest was placed on the group 1 cultures (as control), and 5% tamarind extract was on the group 2, for 2.5 minutes each, and then the percentage of the living and dead cells were counted. The collected data were statistically analyzed by using independent t test to 0.05 limit of significance. The results showed 1% of dead cells in group 1 and 22% in group 2, and that there was a significant difference between the effect of 5% tamarind extract and that of sterile aquabidest ($p < 0.05$). It was concluded that 5% tamarind extract is cytotoxic to the cell line BHK-21.

Key words: *Tamarindus indica*; cytotoxicity; root canal irrigant

Pendahuluan

Tahap preparasi saluran akar pada perawatan endodontia merupakan tahap penting meskipun aspek lain dari perawatan tidak dapat diabaikan.¹ Tindakan preparasi saluran akar tersebut dapat mendorong sisa jaringan nekrotik maupun bakteri keluar foramen apikal dan menyebabkan peradangan periradikular atau infeksi. Karena itu pada tahap preparasi dilakukan irigasi menggunakan bahan yang mampu melarutkan sisa jaringan pulpa dan debris dentin.² Irigasi saluran akar bertujuan untuk membersihkan saluran akar dari sisa jaringan nekrotik, serbuk dentin yang terasah, mikroorganisme, dan membasahi saluran akar sehingga mempermudah proses preparasi saluran akar.³

Koulaouzidou dkk.⁴ mengemukakan bahwa ke-
luarnya bahan irigasi dari apeks gigi akan menyebab-

kan iritasi jaringan periapiks dan menimbulkan kerusakan jaringan periapiks. Larutan irigasi dapat merembes ke periapiks melalui foramen apikal sehingga terjadi kontak dengan jaringan periapiks. Keadaan ini dapat menyebabkan komplikasi periapiks.⁵ Pada kasus gigi bawah keadaan ini banyak terjadi, terutama pada kasus pulpa nekrotik dengan foramen apikal terbuka, karena bahan yang digunakan pada saluran akar lebih mudah keluar dari foramen apikal.⁴ Mengingat hal tersebut maka efek toksik dari bahan yang digunakan dalam perawatan endodontia perlu diperhatikan karena penggunaan bahan toksik dapat menyebabkan degenerasi jaringan periapiks yang menunda kesembuhan luka.

Bahan irigasi yang baik selain bersifat antibakteri dan mampu membersihkan lapisan smear,^{4,6} juga bersifat tidak toksik atau toksisitas terhadap jaringan periapiks rendah. Untuk memperoleh hasil preparasi

*Alamat korespondensi: Bagian Ilmu Kedokteran Gigi Anak Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

saluran akar yang bersih dan tidak menimbulkan kerusakan jaringan periapiks yang disebabkan bahan irigasi saluran akar maka diperlukan pemilihan bahan irigasi saluran akar yang tepat dengan memperhatikan sifat bahan irigasi tersebut. Kegagalan perawatan dapat disebabkan karena pemilihan bahan atau cara kerja yang kurang tepat.

Pendayagunaan tanaman obat sebagai bahan alternatif telah digalakkan sehingga perlu dilakukan upaya penelitian, pengujian, pengembangan khasiat dan keamanan suatu tanaman obat agar peranannya dalam pelayanan kesehatan dapat ditingkatkan.⁷ Salah satu tanaman berkhasiat obat adalah asam jawa (*Tamarindus indica*). Daging buah asam jawa (*pulpa tamarindorum*) mempunyai khasiat sebagai obat untuk berbagai macam penyakit antara lain obat sariawan.^{7,8} Daging buah asam matang mengandung vitamin C yang merupakan antioksidan, selain itu juga mengandung air, protein, lemak, karbohidrat, asam sitrat, dll.^{7,9,10}

Asam sitrat di bidang kedokteran gigi telah lama digunakan sebagai bahan irigasi saluran akar. Asam sitrat dapat digunakan untuk menghilangkan lapisan *smear*.¹¹ Penelitian yang dilakukan Wulandari^{12,13,14} menunjukkan bahwa asam sitrat 6% mempunyai daya antibakteri terhadap bakteri saluran akar yaitu *Streptococcus viridans*. Menurut Scelza dkk.¹⁵ asam sitrat 10% dapat digunakan sebagai bahan dekalsifikasi dentin.

Suatu bahan yang digunakan dalam rongga mulut haruslah mempunyai sifat tidak merugikan atau tidak mempunyai efek toksik.¹⁶ Untuk mengukur sifat toksik suatu bahan terhadap sel dapat dilakukan uji sitotoksitas. Pengujian sitotoksitas yang paling sederhana dapat dilakukan dengan metode kultur sel (*tissue culture*) menggunakan *Baby Hamster Kidney-21 (BHK-21)* oleh karena sifat-sifat sel ini mirip dengan fibroblas jaringan periapiks gigi.¹⁷ Fibroblas merupakan sel yang dominan dalam jaringan penyangga gigi, berfungsi untuk sintesis kolagen dan matriks, berperan dalam degradasi kolagen yang menghasilkan perubahan yang konstan pada serabut utama (*remodeling*) dan memelihara jaringan periodontium yang sehat.¹

Telah dilakukan penelitian awal menggunakan ekstrak air asam jawa konsentrasi 5% untuk membersihkan lapisan *smear* dinding saluran akar gigi. Hasil menunjukkan bahwa ekstrak air asam jawa mampu membersihkan lapisan *smear*.¹⁸ Selain itu ekstrak air asam jawa 5% juga mempunyai daya antibakteri terhadap *Streptococcus viridans*.¹⁹ Berdasarkan latar belakang tersebut maka peneliti ingin meneliti sitotoksitas ekstrak air asam jawa konsentrasi 5% sebagai bahan irigasi saluran akar

terhadap fibroblas (*cell line BHK-21*). Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan untuk dasar pengembangan terapi di bidang Konservasi Gigi khususnya endodonsia dan didapatkan suatu bahan irigasi saluran akar alternatif dalam membersihkan saluran akar gigi pada perawatan endodonsia.

Bahan dan Cara Kerja

Bahan penelitian adalah ekstrak air asam jawa (EAAJ) 5%, akuabides steril, kultur *cell line BHK-21* (stok), *bovine serum* 10%, *phosphat buffer saline (PBS)*, larutan *versene tripsine* 0,25%, *tryphan blue*, media *Eagle*, larutan garam netral. Alat penelitian yaitu botol *Roux*, inkubator, neraca timbang (*Triple Beam Balance* merek *OHAUS*), pinset, mortal dan pastel untuk menghaluskan daging buah asam, filter *magnetic stirring* untuk mencampur daging buah asam dan akuabides steril, sentrifus (merek *Kokusan*), *millipore* 0,45 μ m (merek *Sartorius*) untuk menyaring dan sterilisasi EAAJ 5%, pipet, *microplate 24-well*, *laminar flow*, mikroskop cahaya (merek *Olympus CH40*), hemositometer untuk mengukur jumlah sel hidup dan sel mati.

Sel induk *BHK-21* (stok) dilakukan *revival* dengan cara yaitu dimasukkan ke botol *Roux* dan diberi media *Eagle*, *bovine serum* 10%, streptomisin 0,02 ml, fungison 0,06 ml dan disimpan dalam inkubator 37°C hingga sel *confluent*. Kemudian media *Eagle* dibuang dan dicuci dengan PBS sejumlah 15 ml sebanyak 2 kali untuk membuang sisa serum dalam botol lalu dilakukan *trypsinasi* dengan *versene tyypine* 0,25% sebanyak 1 ml. Jika sel sudah terpisah segera diletakkan dalam *microplate 24-well* masing-masing 120 sel/ml kemudian pada setiap sumuran ditambahkan media *Eagle* baru dan *bovine serum* 10%, lalu dimasukkan ke inkubator 37°C sampai sel *confluent*. Tahap selanjutnya adalah menyiapkan bahan uji (EAAJ 5%).

Bahan uji disiapkan dengan cara 5 gr daging buah asam jawa ke 100 cc akuabides steril, dicampur dan diaduk menggunakan *magnetic stirring* supaya daging buah asam dapat larut dengan baik, disentrifus 2500 rpm selama 15 menit agar terpisah antara endapan dan airnya. Air asam jawa diambil dan disaring dengan filter *Millipore* 0,45 μ m sehingga didapatkan EAAJ 5%.

Cara pengujian toksisitas yaitu sel fibroblas *BHK-21* dalam *microplate 24-well* dibagi dalam 2 kelompok perlakuan. Pada kelompok I, sel dalam

microplate dicuci dengan PBS, diberi 0,5 cc akuabides steril (kontrol), dibiarkan selama 2,5 menit. Setelah itu akuabides steril dibuang, dicuci dengan PBS dan diberi 0,1 cc *versene trypsin* dan ditunggu sampai sel rontok. Setelah sel rontok kemudian diberi media *eagle* + serum 0,9 cc dan diaduk dengan cara disedot dan disemprot berulang-ulang dengan menggunakan mikropipet sampai sel terpisah. Sel dalam *microplate* diambil 0,025 cc dan ditambah 0,025 cc *tryphan blue* lalu diteteskan ke dalam hemositometer untuk dilakukan penghitungan sel di bawah mikroskop. Pada kelompok II dilakukan dengan cara yang sama seperti di atas tetapi bahan yang digunakan adalah EAAJ 5%. Semua tindakan dilakukan dalam *laminary flow* dengan tujuan untuk menstabilkan kondisi penelitian dalam keadaan steril.

Cara menghitung sel yaitu sel hidup (terang) dan sel mati (biru gelap) yang terdapat pada kotak-kotak dalam lapang pandang hemositometer dihitung lalu dimasukkan dalam rumus dari Bird dan Forrester (1981) sehingga didapatkan persentase kematian sel.

Rumus:
 Persentase kematian sel =
$$\frac{\text{Sel mati}}{\text{Sel hidup} + \text{sel mati}} \times 100\%$$

Makin besar nilai persentase kematian sel makin tinggi sitotoksitas bahan uji.

Hasil

Dalam penelitian ini diperoleh data hasil penghitungan persentase kematian sel dari uji sitotoksitas dengan metode *die exclusion test* yang menggunakan *tryphan blue* (Tabel 1).

Tabel 1. Persentase kematian sel kelompok akuabides steril dan EAAJ 5%

Kelompok	Besar Sampel	Rerata (%)	Simpang baku	Kemaknaan
Akuabides steril	9	1	0	0,00
EAAJ 5%	9	21,97	2,33	

Dari yang diperoleh dilakukan uji normalitas menggunakan *Kolmogorov Smirnov Test* dan didapatkan data berdistribusi normal maka dilakukan uji beda dengan analisa statistik parametrik. Berdasarkan uji homogenitas (*Levene's test*) didapatkan data homogen dan *independent t test* menunjukkan ada perbedaan yang bermakna antara kelompok yang di irigasi dengan akuabides steril dan EAAJ 5% ($p < 0,05$).

Pembahasan

Dalam penelitian ini pada kelompok sel yang diberi perlakuan dengan EAAJ 5% didapatkan persentase kematian sel sebesar 21,97%, sehingga diasumsikan EAAJ 5% relatif tidak sitotoksik terhadap fibroblas (*BHK-21*). Hal ini diduga karena EAAJ 5% mengandung vitamin C yang merupakan antioksidan terhadap radikal bebas. Radikal bebas adalah suatu atom atau molekul yang mempunyai satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbit terluarnya sehingga tidak stabil dan reaktif. Akibatnya elektron yang tidak berpasangan tersebut mencari elektron dari molekul lain secara radikal untuk menstabilkan diri.^{10,20}

Pembentukan radikal bebas merupakan produk samping dari proses oksidasi atau pembakaran sel yang berlangsung pada saat metabolisme sel. Fungsinya untuk mencegah kerusakan yang diakibatkan oleh virus, bakteri serta bahan-bahan lain. Produksi radikal bebas yang berlebihan akan menyerang sel itu sendiri dengan cara seperti menyerang benda asing dan berakibat destruktif. Radikal bebas dapat merusak lemak, protein, dan asam nukleat.^{10,20,21}

Fungsi antioksidan adalah mengubah radikal bebas menjadi molekul yang kurang dampak negatifnya, menangkap senyawa radikal bebas serta mencegah reaksi berantai pembentukan radikal bebas. Vitamin C yang merupakan antioksidan eksogen akan memberikan satu atom hidrogen (H) kepada molekul radikal bebas (R^{\bullet}) dan menetralkan radikal bebas.^{10,21} Vitamin C juga bertindak sebagai koenzim dalam proses metabolisme sel dan berperan dalam regenerasi.²²

Ekstrak air asam jawa (EAAJ) juga mengandung zat gula, lemak dan protein yang dibutuhkan untuk aktivasi *Glutathione peroxidase* (GSH) yang merupakan antioksidan endogen. Jika GSH tidak bekerja dengan baik maka proses penyeimbangan radikal bebas menjadi tidak terkontrol.¹⁰

Kematian sel pada pemberian ekstrak air asam jawa (EAAJ) disebabkan karena pH ekstrak air asam jawa yang rendah yaitu 2. Kadar pH rendah tersebut dapat menyebabkan sel mengalami denaturasi protein, yaitu rusaknya ikatan disulfida kovalen intramolekul dengan ikatan ionik, ikatan hidrofobik, dan ikatan hidrogen.^{23,24}

Pada penelitian ini waktu kontak 2,5 menit diduga juga berpengaruh terhadap kematian sel. Respons seluler terhadap stimuli injuri tergantung pada tipe injuri, lama injuri dan keparahan. Injuri yang persisten atau berlebihan menyebabkan sel

melewati batas ambang menuju *irreversibel injury* dan menyebabkan kematian sel.¹⁰

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak air asam jawa 5% sebagai bahan irigasi saluran akar tidak sitotoksik terhadap fibroblas (BHK-21).

Daftar Acuan

1. Grossman LI, Oliet S, Del Rio CED. *Ilmu Endodontia dalam Praktek*. Penerjemah Rafia Abiono. Jakarta: PT EGC 1995: 196.
2. Cohen S, Burns RC. *Pathways of the Pulp*. 8th ed. St. Louis, London: Mosby. 2002: 544.
3. Leonardo MR, Filho MT, Silva LA, Filho PN, Bonofolio KC, Ito IY. In vitro Antimicrobial Activity 2% Chlorhexidine Used as a Root Canal Irrigating Solution. *J Endod* 1999; 25 : 167-71.
4. Koulaouzidou EA, Margelos J, Beltes P, Kortsaris AH. Cytotoxic Effect of Different Concentrations of Neutral and Alkaline EDTA Solutions Used as Root Canal Irrigant. *J Endod* 1999; 1 : 21-3.
5. Chang YC, Huang FM, Tai KW, Chou MY. The Effect of Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine on Cultured Human Periodontal Ligament Cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 92:446-50.
6. Walton REM, Torabinejad M. *Prinsip dan Praktek Ilmu Endodonti*. Penerjemah Narlan Sumawinata. Jakarta: PT EGC, 1998: 277-80.
7. Wijayakusuma W. *Tanaman Berkhasiat Obat di Indonesia*, Jilid 3. Jakarta: Pustaka Kartini. 1997 : 26-9.
8. Rismunandar. *Mengenal Tanaman Buah-buahan*. Bandung: Sinar Batu Press, 1986 : 74-5.
9. Verheij EWM, Coronel RE. *Sumber Daya Nabati Asia Tenggara 2, Buah-buahan yang Dapat Dimakan*. Prosea: Gramedia Pustaka Utama, 1997.
10. Kumar, Abbas, Fausto. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*, 7th ed, Philadelphia: Elsevier Saunders. 2005 : 16-8.
11. Maduratna E. *Biokompatibilitas Tetrasiklin pada Kultur Sel Fibroblas dan Pengaruhnya terhadap Pelepasan Lapisan Smir*. (Tesis) Surabaya; Program Pascasarjana, Universitas Airlangga, 1999: 16-9.
12. Wulandari E. Perbedaan Khasiat Antibakteri Bahan Irigasi Hidrogen Peroksida 3% dan Asam Sitrat 6% terhadap *Streptococcus viridans*. *Maj Ked Gigi*. 2000 ; 33(1) :14-6.
13. Wulandari E. Khasiat Antibakteri Bahan Irigasi Asam sitrat 6% dan Klorheksidin Glukonat 0,2% terhadap *Streptococcus viridans*. *Maj Ked Gigi*. 2001 ; 34 (1) : 4-6.
14. Wulandari E. Kemampuan Asam Sitrat sebagai Bahan Irigasi Saluran Akar dalam Menghambat Pertumbuhan *Streptococcus viridans*. *J. Ked Gigi Indonesia* 2003 ; 10 (2) : 6-9.
15. Scelza MFZ, Teixeira AM, Scelza P. Decalcifying effect of EDTA-T, 10% Citric Acid, and 17% EDTA on Root Canal Dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003 ; 95 : 234-6.
16. Anusavice, JK. *Phillip's Science of Dental Material*, 10th ed. Philadelphia: WB Saunders. 1996 : 69-298.
17. Freshney RI. *Culture of animal cells. A manual of basic technique*, 4th ed. New York: Wiley-Liss Inc, 2000: 330-7.
18. Wulandari E. *Kemampuan Ekstrak Air Asam Jawa 5% sebagai Pembersih Lapisan Smear* (Belum dipublikasi), 2006.
19. Dharmayanti AW. *Kemampuan Larutan Buah Asam Jawa (Tamarindus indica L) dalam Menghambat Pertumbuhan Streptococcus viridans*. [Skripsi] Jember: Program Sarjana Kedokteran Gigi, Universitas Jember, 2003.
20. Niwa Y. *Radikal Bebas Mengundang Maut*, Personal Care Co., Ltd, Jepang. 1997 : 30-7.
21. Karyadi E. *Antioksidan, Resep Sehat dan Umur Panjang*. dari <http://www.indonesia.com/intisari/1997/juni/antioks.html>. Diakses 18 Maret 2006.
22. Harijanti K. Peranan Vitamin C dalam Kesehatan Jaringan Lunak Rongga Mulut. *Maj Ked Gigi* 1996; 29(3) : 59-62.
23. Volk WA, Wheeler MF. *Mikrobiologi Dasar*, ed. 5, jilid 2. Terjemahan Markham dari Basic Microbiology. Surabaya : Erlangga, 1989 : 53.
24. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. *Jawetz, Melnick & Adelberg's Mikrobiologi Kedokteran*. Terjemahan Mudihardi, dkk dari Medical Microbiology. Jakarta: Medika. 2001 : 79-80.