



UNIVERSITAS INDONESIA

**NANOPARTIKEL MINERAL TRIOKSIDA MENINGKATKAN
PROLIFERASI DAN DIFERENSIASI SEL PUNCA PULPA
GIGI SERTA MATURASI SEL KE ARAH ODONTOBLAS**

DISERTASI

**MOHAMMAD CHAIR EFFENDI
0906506372**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
PROGRAM DOKTOR ILMU KEDOKTERAN GIGI
JAKARTA
JULI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**NANOPARTIKEL MINERAL TRIOKSIDA MENINGKATKAN
PROLIFERASI DAN DIFFERENSIASI SEL PUNCA PULPA
GIGI SERTA MATURASI SEL KE ARAH ODONTOBLAS**

DISERTASI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Doktor

**MOHAMMAD CHAIR EFFENDI
0906506372**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
PROGRAM DOKTOR ILMU KEDOKTERAN GIGI
JAKARTA
JULI 2012**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Disertasi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar**



Nama : Mohammad Chair Effendi
NMP : 0906506372
Tanda Tangan : 
Tanggal : 12 Juli 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Disertasi ini diajukan oleh:

Nama : Mohammad Chair Effendi
NMP : 0906506372
Program Studi : Ilmu Kedokteran Gigi
Judul disertasi : Nanopartikel Mineral Trioksida Meningkatkan Proliferasi dan Diferensiasi Sel Punca Pulpa Gigi serta Maturasi Sel Ke Arah Odontoblas

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Doktor pada Program Studi Ilmu Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Promotor : Prof. Boy M Bachtiar, drg., MS., PhD

Kopromotor 1 : Endang Winiati Bachtiar, drg., M.Biomed., PhD

Kopromotor 2 : Dr. Ellyza Herda, drg., M.Si

Tim Penguji : Prof. Bambang Irawan, drg., PhD (Ketua)

Prof. Dr. Edi Widjajanto, dr., MS., SpPK(K) (Anggota)

Dr. Sarworini B. Budiardjo, drg., SpKGA(K) (Anggota)

Dewi Fatma Suniarti, drg., MS, PhD (Anggota)

Prof. Sutiman B Sumitro, drs., SU, DSc (Anggota)

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 12 Juli 2012

KATA PENGANTAR/UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah, puji syukur kepada Allah SWT yang telah memberi rahmat dan ijin-Nya sehingga penyusunan disertasi ini dapat diselesaikan. Disertasi ini disusun berdasarkan hasil penelitian untuk memenuhi syarat menyelesaikan pendidikan Doktor di bidang Ilmu Kedokteran Gigi pada Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia. Penelitian dan penulisan disertasi ini masih jauh dari sempurna. Saya menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan serta dorongan dari berbagai pihak mulai masa perkuliahan, penelitian sampai penulisan disertasi, sangat sulit bagi saya menyelesaikan disertasi ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih dan menyampaikan penghargaan setinggi-tingginya kepada:

- (1) Rektor UI Prof. Dr. der Soz., Gumilar Rusliwa Somantri beserta para Wakil Rektor yang telah mengizinkan saya mengikuti pendidikan S3 pada Program Studi Ilmu Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran Gigi UI.
- (2) Rektor Universitas Brawijaya Prof. Dr. Ir Yogi Sugito dan Para Pembantu Rektor yang telah mengizinkan dan membiayai pendidikan S3 saya di Fakultas Kedokteran Gigi UI sampai selesai.
- (3) Dekan Fakultas Kedokteran Gigi UI Prof. Bambang Irawan, drg., PhD dan Wakil Dekan Prof. Dr. Margaretha Suharsini Soetopo, drg., SU., SpKGA(K) yang telah memberi kesempatan pada saya mengikuti pendidikan S3 dan memanfaatkan sarana/prasarana yang ada di Fakultas Kedokteran Gigi UI.
- (4) Penghargaan setinggi-tingginya kepada Prof. Boy M Bachtiar, drg., MS., PhD selaku Promotor, Endang Winiati Bachtiar, drg., M.Biomed., PhD selaku Kopromotor 1 dan Dr. Ellyza Herda, drg., M.Si selaku Kopromotor 2 yang luar biasa membimbing, mendampingi, memberi semangat dan dorongan kepada saya tanpa mengenal waktu demi kebaikan disertasi ini, sejak awal pendidikan, waktu penelitian dan sampai penulisan disertasi ini selesai.
- (5) Ketua Tim Penguji Prof. Bambang Irawan, drg., PhD dan anggota Tim Penguji Prof. Dr. Edi Widjanto, dr., MS., SpPK(K), Dr. Sarworini B Budiardjo, drg., SpKGA(K), Dewi Fatma Suniarti, drg., MS., PhD, Prof. Sutiman B Sumitro, drs., SU., DSc, saya ucapkan terima kasih yang telah

bersedia menjadi Tim Penguji sekaligus memberi bimbingan dan masukan demi kebaikan disertasi ini.

- (6) Manajer Pendidikan Dr. Ellyza Herda, drg., M.Si dan Koordinator Pendidikan Paska Sarjana Dr. Ratna Meidyawati, drg., SpKG beserta seluruh staf Biro Administasi Pendidikan Fakultas Kedokteran Gigi UI yang telah banyak membantu memberi fasilitas yang diperlukan selama proses pendidikan S3 hingga selesai.
- (7) Dekan Fakultas Kedokteran UB Dr. Karyono Mintaroem, dr., SpPA dan para Pembantu Dekan, juga tidak lupa kepada Dekan Fakultas Kedokteran Dr. Samsul Islam, dr., SpMK., M.Kes serta Pembantu Dekan terdahulu yang telah memberi kesempatan kepada saya mengikuti pendidikan S3 dan memberi bantuan dana penelitian melalui DPP-SPP FKUB beserta fasilitas lainnya yang telah banyak membantu saya dalam proses pendidikan S3 hingga selesai.
- (8) Wahyu Bambang Widayatno, S.Si., M.Si staf Pusat Penelitian Fisika LIPI Serpong beserta staf lainnya yang telah membantu pembuatan nanopartikel, Ir. D.J. Djoko H Santjojo, M.Phil., PhD dosen pada jurusan Fisika FMIPA UB yang telah banyak memberi masukan tentang materi dan pembuatan nanopartikel, Ahmad Taufik SPd., M.Si dosen jurusan Fisika UM yang telah memberi kesempatan pada saya menggunakan peralatan di Lab Sentral FMIPA UM, Ir Basril staf Lembaga Penelitian BATAN Jakarta yang ikut membantu memberi fasilitas sterilisasi material nanopartikel.
- (9) Seluruh staf Laboratorium Oral Biologi Fakultas Kedokteran Gigi UI Maysaroh S.Si yang telah banyak membantu saya dalam menyelesaikan penelitian ini, dan Dessy S Ashari, S.Si. Kepada staf Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran UB yang ikut membantu menyelesaikan penelitian ini.
- (10) Sahabat saya seluruh dosen di Program Studi Pendidikan Dokter Gigi (PSPDG) Fakultas Kedokteran UB yang banyak membantu, bekerjasama, memberi semangat dan dorongan hingga selesainya pendidikan S3 ini, termasuk staf kependidikan PSPDG.
- (11) Kedua orang tua saya tercinta (alm) bapak Moh. Tahir Singoningajudo dan ibunda H. Fatimah Tahir yang telah mendidik, menyayangi dan membesarkan

serta menanamkan kaidah Islamiah, saya ucapkan terima kasih yang tidak terhingga. Terima kasih juga kepada kedua mertua saya (alm) bapak M. Yassin dan ibu Nursiati.

- (12) Istri tercinta Dra. Amelia Rosana dan anak-anakku yang tersayang Rr. Khairiyah Amalia, Rr. Khairrizki Amalia, R. Khairiza Muhammad dan Rr. Khairunnisa Amalia, yang dengan sabar membantu, mendampingi, memberi semangat serta penuh pengertian selama saya menempuh pendidikan S3 ini, terima kasih sayang.
- (13) Saudara-saudaraku Hawijah Sri Wahjuni, Malik Effendi, Mufid Effendi dan Kutwati Sri Wahjuni yang telah memberi bantuan moril dan materiil selama menempuh pendidikan S3.
- (14) Kepada Ananta Rurri, drg., SpPM dan Witriana Latifa, drg., SpKGA terima kasih atas kesediaannya menjadi pendamping saya pada saat ujian promosi doktoral.
- (15) Kepada semua pihak yang namanya tidak bisa saya sebut satu persatu yang telah banyak membantu dalam penyelesaian pendidikan ini, terima kasih setulusnya atas bantuan yang diberikan selama ini.

Akhir kata, saya mendoakan agar amal dan budi baik semua pihak yang telah membantu saya mendapat imbalan pahala yang berlipat ganda dari Allah SWT. Semoga disertasi ini mendapat ridlo Allah SWT dan bermanfaat bagi pengembangan ilmu. Amien.

Jakarta, 12 Juli 2012

Mohammad Chair Effendi

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademika Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Mohammad Chair Effendi
NMP : 0906506372
Program Studi : Ilmu Kedokteran Gigi
Fakultas : Kedokteran Gigi
Jenis Karya : Disertasi

Demi kepentingan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (Non-exclusive Royalty-Free Right)** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

**NANOPARTIKEL MINERAL TRIOKSIDA MENINGKATKAN
PROLIFERASI DAN DIFERENSIASI SEL PUNCA PULPA GIGI SERTA
MATURASI SEL KE ARAH ODONTOBLAS**

beserta instrumen/disain/perangkat. Berdasarkan persetujuan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini, Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihkan bentuk mengalihmediakan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (data base), merawat serta mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis atau pencipta dan juga sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya secara sadar tanpa paksaan dari pihak manapun.

Dibuat di : Jakarta
Pada Tanggal : 12 Juli 2012

Yang membuat pernyataan



Mohammad Chair Effendi

ABSTRAK

Nama : Mohammad Chair Effendi
Program Studi : Ilmu Kedokteran Gigi
Judul disertasi : Nanopartikel Mineral Trioksida Meningkatkan Proliferasi dan Diferensiasi Sel Punca Pulpa Gigi serta Maturasi Sel Ke Arah Odontoblas

Disertasi ini membahas modifikasi *mineral trioxide aggregate* (MTA) menjadi nanopartikel mineral trioksida (NMT) dan menentukan potensi NMT tersebut dengan cara menganalisis aktivitas proliferasi dan diferensiasi sel punca mesensimal pulpa gigi serta maturasi sel ke arah odontoblas. Penelitian ini adalah penelitian kuantitatif dengan desain eksperimental laboratorik. Hasil penelitian menyimpulkan bahwa a) NMT meningkatkan proliferasi dan tidak toksis terhadap DPSC dan SHED; b) NMT meningkatkan aktivitas ALP khususnya pada SHED; c) NMT meningkatkan aktivitas OC khususnya pada DPSC; d) NMT meningkatkan aktivitas DSPP pada DPSC dan SHED; e) NMT meningkatkan jumlah deposit kalsium dan matrik ekstraselular pada DPSC dan SHED.

Kata kunci :

sel punca pulpa gigi, nanopartikel, *marker* odontoblas

ABSTRACT

Name : Mohammad Chair Effendi
Study Programme : Dentistry
Title : Using Nanoparticle Mineral Trioxide to Increase the Proliferation and Differentiation of Dental Pulp Stem Cells and Maturation to Odontoblasts

The Dissertation discussed the modification of *mineral trioxide aggregate* (MTA) to nanoparticle mineral trioxide (NMT) and determining NMT potential by analyzing the proliferation and differentiation of dental pulp stem cells and maturation activities to odontoblasts. The quantitative research used experimental laboratory design. Based on the research findings, it can be concluded that a) NMT increased cells proliferation and was not toxic to DPSC and SHED; b) NMT increased ALP activities, especially on SHED; c) NMT increased OC activities, especially on DPSC; d) NMT increased DSPP activities on DPSC and SHED; e) NMT increased the quantity of calcium deposit and extracellular matrix on DPSC and SHED.

Keywords:

dental pulp stem cells, nanoparticle, odontoblast marker

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR SINGKATAN	xviii
DAFTAR RUMUS KIMIA	xix
DAFTAR LAMPIRAN.....	xx
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.1.1. Efektivitas Mineral Trioxide Aggregate dan Portland Cement	2
1.1.2. Modifikasi MTA Menjadi Nanopartikel untuk Meningkatkan Bioaktivitasnya.....	6
1.1.3. Odontoblas dan Sel Punca Pulpa Gigi	7
1.1.3.1.Odontoblas	7
1.1.3.2.Sel Punca Mesensimal Pulpa Gigi	8
1.1.3.3.Deposit Kalsium	9
1.2. Perumusan Masalah	10
1.3. Pertanyaan Penelitian	11
1.3.1. Pertanyaan Umum	11
1.3.2. Pertanyaan Khusus	11
1.4. Tujuan dan Manfaat Penelitian	11
1.4.1. Tujuan Umum	11
1.4.2. Tujuan Khusus	12
1.4.3. Manfaat Penelitian	12
1.4.3.1.Bidang Kedokteran Gigi	12
1.4.3.2.Masyarakat	13

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	14
2.1. Komposisi Kimia Mineral Trioxide Aggregate	14
2.1.1. Mineral Trioxide Aggregate dan Portland Cement	14
2.2. Aplikasi Nanomaterial pada Mesenchymal Stem Cells	16
2.2.1. Nanomaterial	16
2.2.1.1. Nanomaterial Anorganik.....	17
2.2.1.2. Nanomaterial Organik.....	17
2.2.2. Nano ACP dan Nano HAP.....	21
2.3. Stem Cell (Sel Punca)	23
2.3.1. Jenis-Jenis Stem Cell	23
2.3.1.1. Early Embryonic Stem Cell	23
2.3.1.2. Blastocis Embryonic Stem Cell.....	23
2.3.1.3. Fetal Stem Cell	24
2.3.1.4. Umbilical Cord Stem Cell.....	24
2.3.1.5. Adult (Posnatal) Stem Cell	24
2.3.2. Sel Progenitor	25
2.3.3. Dental Pulp Stem Cells (DPSCs).....	25
2.3.4. Stem Cells Human Exfoliated Deciduous (SHED)	28
2.3.5. Isolasi dan Identifikasi Sel Punca dari Sel Pulpa Gigi	30
2.4. Marker Fenotip Odontoblas	32
2.4.1. Odontoblas	32
2.4.2. Pengamatan Proliferasi dan Viabilitas Sel	34
2.4.3. Pengamatan Diferensiasi Sel	35
2.4.4. Alkaline phosphatase (ALP)	35
2.4.5. Dentin sialophosphoprotein (DSPP)	36
2.4.6. Dentin Matrix Protein-1 (DMP-1)	37
2.4.7. Osteocalcin (OC)	41
2.4.8. Osteonectin (ON)	44
2.5. Pengamatan Deposit Kalsium	46
2.6. Kerangka Teori	47
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	49
3.1. Kerangka Konsep	49

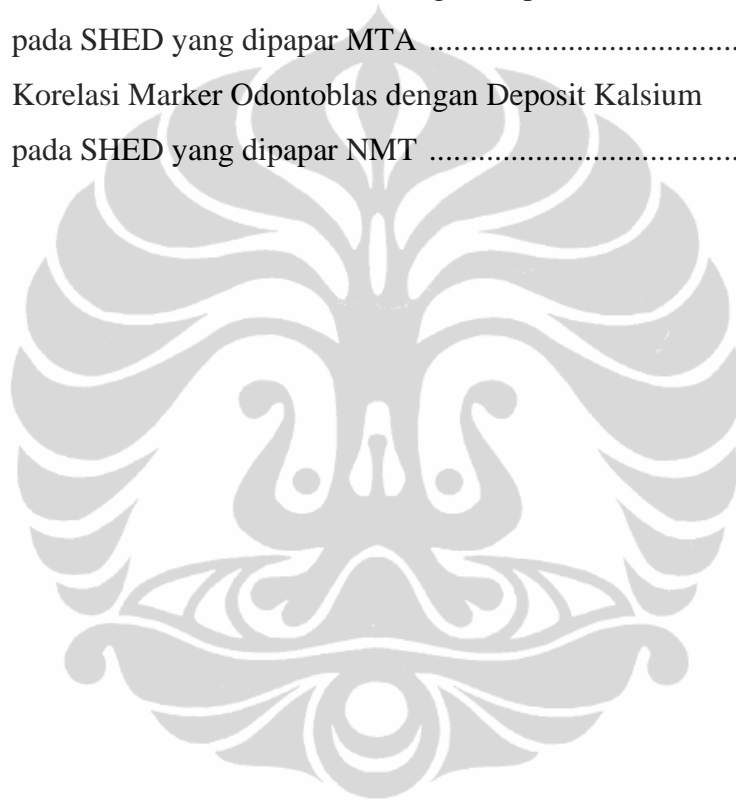
3.2.	Identifikasi Variabel	50
3.3.	Hipotesis Mayor.....	50
3.4.	Hipotesis Minor	50
BAB 4 METODA PENELITIAN		52
4.1.	Jenis Penelitian	52
4.1.1.	Tahap 1 : Modifikasi MTA Menjadi NMT dengan cara Milling	52
4.1.2.	Tahap 2 : Pengujian NMT	52
4.2.	Tempat dan Waktu Pelaksanaan Penelitian	52
4.3.	Sampel Penelitian.....	52
4.3.1.	Kriteria Sampel.....	53
4.3.1.1.	Kriteria Inklusi.....	53
4.3.1.2.	Kriteria Eksklusi	53
4.4.	Bahan dan Alat penelitian	53
4.4.1.	Bahan dan Alat Tahap 1	53
4.6.1.1.	Bahan Pembuatan NMT.....	53
4.6.1.2.	Alat Pembuatan NMT	53
4.4.2.	Bahan dan Alat Tahap 2	54
4.4.2.1.	Bahan Uji Viabilitas Sel (Uji MTT).....	54
4.4.3.	Bahan dan Alat Tahap 3	54
4.4.3.1.	Bahan Kultur Sel.....	54
4.4.3.2.	Alat Kultur Sel.....	54
4.4.3.3.	Bahan Identifikasi Sel Punca dengan Teknik Imunositokimia	55
4.4.3.4.	Bahan Deteksi Deposit Kalsium	55
4.4.3.5.	Bahan Pemeriksaan untuk Aktivitas <i>Alkaline Phosphatase (ALP)</i>	55
4.4.3.5.	Bahan untuk Pemeriksaan Aktivitas Osteokalsin	55
4.4.3.6.	Bahan untuk Pemeriksaan Aktivitas Dentin Sealophosphoprotein	56
4.5.	Definisi Operasional	57
4.6.	Cara Kerja	58
4.6.1	Sterilisasi Alat Penelitian.....	58

4.6.2	Tahap 1.....	59
4.6.2.1.	Modifikasi MTA Menjadi NMT	59
4.6.2.2.	Pengukuran Komposisi NMT	60
4.6.3	Tahap 2	60
4.6.3.1.	Isolasi dan Identifikasi Sel Punca dengan Teknik Imunositokimia.....	60
4.6.3.2.	Pengamatan Proliferasi, Diferensiasi Sel Punca dan Maturasi Sel Ke Arah Odontoblas yang Dipapar Bahan NMT dan MTA.....	61
4.6.3.3.	Pengamatan Proliferasi Sel Punca Mesensimal Pulpa Gigi dengan Uji MTT.....	62
4.6.3.4.	Pengamatan Diferensiasi Sel Punca Mesensimal Pulpa Gigi dan Maturasi Sel Ke Arah Odontoblas ..	62
4.7	Manajemen dan Analisis Data	65
4.7.1	Manajemen Data	65
4.7.2	Analisis Data	65
4.8	Alur Penelitian	66
BAB 5 HASIL PENELITIAN		69
5.1.	Modifikasi MTA Menjadi NMT.....	69
5.2.	Kultur Sel Pulpa Gigi dan Sel Punca Pulpa Gigi	72
5.3.	Efek MTA dan NMT Terhadap Proliferasi Sel Punca Mesensimal Pulpa Gigi	76
5.4.	Efek MTA dan NMT Terhadap Diferensiasi Sel Punca Mesensimal Pulpa Gigi	80
5.4.1.	Hasil Pengamatan Aktivitas ALP pada DPSC dan SHED	80
5.4.2.	Hasil Pengamatan Aktivitas OC pada DPSC dan SHED	84
5.4.3.	Hasil Pengamatan Aktivitas DSPP pada DPSC dan SHED ..	89
5.5.	Efek MTA dan NMT Terhadap Maturasi Sel Ke Arah Odontoblas	94
5.6.	Korelasi Marker Odontoblas dengan Deposit Kalsium pada DPSC dan SHED yang dipapar MTA dan NMT	101
BAB 6 PEMBAHASAN		106
6.1.	Modifikasi MTA Menjadi NMT.....	106

6.2.	Analisis Efek MTA dan NMT Terhadap Proliferasi Sel Punca Mesensimal Pulpa Gigi	107
6.3.	Analisis Efek MTA dan NMT Terhadap Diferensiasi Sel Punca Mesensimal Pulpa Gigi	108
	6.3.1. Analisis Alkaline Phosphatase (ALP)	108
	6.3.2. Analisis Osteocalcin (OC)	112
	6.3.3. Analisis Dentin Sialophospho Protein (DSPP)	114
6.4.	Analisis Efek MTA dan NMT Terhadap Maturasi Sel Ke Arah Odontoblas.....	116
6.5.	Analisis Korelasi Marker Odontoblas dengan Deposit Kalsium Pada DPSC.....	119
6.7.	Analisis Korelasi Marker Odontoblas dengan Deposit Kalsium Pada SHED	120
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN		123
7.1.	Kesimpulan	123
7.2.	Saran	123
DAFTAR REFERENSI		125
LAMPIRAN		133

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1.	Definisi Operasional.....	57
Tabel 5.1.	Korelasi Marker Odontoblas dengan Deposit Kalsium pada DPSC yang dipapar MTA	102
Tabel 5.2.	Korelasi Marker Odontoblas dengan Deposit Kalsium pada DPSC yang dipapar NMT	103
Tabel 5.3.	Korelasi Marker Odontoblas dengan Deposit Kalsium pada SHED yang dipapar MTA	104
Tabel 5.4.	Korelasi Marker Odontoblas dengan Deposit Kalsium pada SHED yang dipapar NMT	105



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Perbandingan Materi Berukuran Makro,Mikro dan Nano.....	20
Gambar 2.2.	Perbandingan antara Materi Alam dengan Buatan Manusia.....	20
Gambar 2.3.	Sel Progenitor Terdapat dalam Pulpa Gigi yang Sudah Mengalami Maturasi.....	26
Gambar 2.4.	Cytoarchitecture dari Sel Punca Gigi Permanen	27
Gambar 2.5.	Kerangka Teori.....	48
Gambar 3.1.	Kerangka Konsep Pembuatan NMT	49
Gambar 3.2.	Kerangka Konsep Uji Marker Odontoblas dan Deposit Kalsium .	50
Gambar 4.1.	Skema alur penelitian tahap 1	66
Gambar 4.2.	Skema alur penelitian tahap 2	67
Gambar 4.3.	Skema alur penelitian tahap 3	68
Gambar 5.1.	Hasil SEM dan EDAX dari MTA dan NMT.....	70
Gambar 5.2.A	Hasil Pengukuran PSA terhadap MTA	71
Gambar 5.2.B	Hasil Pengukuran PSA terhadap NMT	71
Gambar 5.3.	A. Hasil XRD MTA dan B. Hasil XRD NMT	72
Gambar 5.4.	Gambaran Mikroskopik Sel Pulpa Gigi Permanen.....	73
Gambar 5.5.	Gambaran Mikroskopik Sel Pulpa Gigi Disidui	73
Gambar 5.6.	Identifikasi DPSC dengan Teknik Imunositokimia.....	74
Gambar 5.7.	Identifikasi SHED dengan Teknik Imunositokimia	75
Gambar 5.8	Gambaran Mikroskopik Sel Punca Gigi Permanen.....	75
Gambar 5.9.	Gambaran Mikroskopik Sel Punca Gigi Disidui	76
Gambar 5.10.	Viabilitas DPSC Hari ke 1, 2, 3	77
Gambar 5.11.	Viabilitas SHED Hari ke 1, 2, 3.....	78
Gambar 5.12.	Viabilitas DPSC dan SHED yang Dipapar MTA Hari ke 1, 2, 3 .	79
Gambar 5.13.	Viabilitas DPSC dan SHED yang Dipapar NMT Hari ke 1, 2, 3 .	79
Gambar 5.14.	Aktivitas ALP pada DPSC Hari ke 3, 7, 14, 21	80
Gambar 5.15.	Aktivitas ALP pada DPSC Total 21 Hari	81
Gambar 5.16.	Aktivitas ALP pada SHED Hari ke 3, 7, 14, 21	82
Gambar 5.17.	Aktivitas ALP pada SHED Total 21 Hari	83
Gambar 5.18.	Aktivitas ALP pada DPSC dan SHED yang Dipapar MTA.....	83

Gambar 5.19. Aktivitas ALP pada DPSC dan SHED yang Dipapar NMT	84
Gambar 5.20. Aktivitas OC pada DPSC Hari ke 3, 7, 14, 21	85
Gambar 5.21. Aktivitas OC pada SHED Hari ke 3, 7, 14, 21	86
Gambar 5.22. Aktivitas OC pada DPSC Total 21 Hari	87
Gambar 5.23. Aktivitas OC pada SHED Total 21 Hari	87
Gambar 5.24. Aktivitas OC pada DPSC dan SHED yang Dipapar MTA	88
Gambar 5.25. Aktivitas OC pada DPSC dan SHED yang Dipapar NMT	89
Gambar 5.26. Aktivitas DSPP pada DPSC Hari ke 3, 7, 14, 21	90
Gambar 5.27. Aktivitas DSPP pada SHED Hari ke 3, 7, 14, 21	91
Gambar 5.28. Aktivitas DSPP pada DPSC Total 21 Hari	91
Gambar 5.29. Aktivitas DSPP pada SHED Total 21 Hari	92
Gambar 5.30. Aktivitas DSPP pada DPSC dan SHED yang Dipapar MTA	93
Gambar 5.31. Aktivitas DSPP pada DPSC dan SHED yang Dipapar NMT	93
Gambar 5.32.A Deposit Kalsium pada DPSC yang Dipapar NMT, MTA dan Kelompok Kontrol	95
Gambar 5.32.B Deposit Kalsium pada SHED yang Dipapar NMT, MTA dan Kelompok Kontrol	96
Gambar 5.33. Deposit Kalsium pada DPSC Hari ke 7, 14, 21	97
Gambar 5.34. Deposit Kalsium pada SHED Hari ke 7, 14, 21	98
Gambar 5.35. Deposit Kalsium pada DPSC dan SHED yang Dipapar MTA	99
Gambar 5.36. Deposit Kalsium pada DPSC dan SHED yang Dipapar NMT	100

DAFTAR SINGKATAN

ACP	: Amorphous Calcium Phosphates
ALP	: Alkaline Phosphatase
BAG	: Bioactive Glass
BMP	: Bone Morphogenic Protein
BMSC	: Bone Marrow Stem Cell
BO	: Bismuth Oxide
CH	: Calcium Hydroxide
Col-1	: Collagen tipe 1
CSH	: Calcium Silicate Hydrate
DMEM	: Dulbecco's Modification of Eagle's Medium
DMP-1	: Dentin Matrix Protein-1
DPSC	: Dental Pulp Stem Cell
DSPP	: Dentin Sialophospho Protein
EDAX	: Energy Dispersive Analysis with X-ray
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FBS	: Fetal Bovine Serum
FC	: Formocresol
FCS	: Fetal Calf Serum
FITC	: Fluorescein Isothiocyanate
HAP	: Hydroxyapatite
HEM	: High Energy Milling
MSC	: Mesenchymal Stem Cell
MTA	: Mineral Trioxide Aggregate
MTT	: Dimethylthiazol-2-Yl)-2-5-Diphenyl Tetrazolium Bromide
NM	: Nano Meter
NMT	: Nanopartikel Mineral Trioksida
OC	: Osteocalcin
ON	: Osteonectin
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PC	: Portland Cement
PDLSC	: Periodontal Ligament Stem Cell
PSA	: Particle Size Analysis
SCAP	: Stem Cell Apical Papillae
SEM	: Scanning Electron Microscopy
SHED	: Stem Cell Human Exfoliated Deciduous
STRO-1	: Stromal Precursor Antigen-1
TGF	: Transforming Growth Factor
XRD	: X-ray Diffraction

DAFTAR RUMUS KIMIA

$3\text{CaO}-\text{SiO}_2$:	Kalsiumoksida silikodioksida
Bi_2O_3	:	Bismut oksida
$\text{Ca}(\text{OH})_2$:	Kalsium hidroksida
$2\text{Ca}_3\text{OSiO}_4+6\text{H}_2\text{O}$:	Trikalsiumoksida silikat + Air
$3\text{CaO}.2\text{SiO}_2.3\text{H}_2\text{O}+3\text{Ca}(\text{OH})_2$:	Kalsiumoksida di silikodioksida trihidrat + kalsium hidroksida
$2\text{Ca}_2\text{SiO}_4+4\text{H}_2\text{O}$:	Dikalsium silikat +Air
$3\text{CaO}.2\text{SiO}_2.3\text{H}_2\text{O}+\text{Ca}(\text{OH})_2$:	Kalsiumoksida di silikodioksida trihidrat + Kalsium hidroksida
$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6\text{H}_2\text{O}_\text{NaHCO}_3_\text{H}_2\text{O}$:	Sodium Calcium Hydrogen Carbonate Phosphate Hydrate
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$:	Hydroxiapatite

DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1. Fantastic Report on MTA (PANalytical)
- Lampiran 2. Fantastic Report on NMT (PANalytical)
- Lampiran 3. Contoh Gambar Gigi Permanen dan Gigi Disidui yang Diisolasi Sel Pulpanya



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Karies gigi adalah penyakit infeksi yang prevalensinya sangat tinggi, sering dijumpai di klinik gigi/mulut anak dan menjadi masalah kesehatan anak di Indonesia. Prevalensi karies gigi pada anak balita sebesar 85% sedang prevalensi secara umum di Indonesia mencapai 90,05%.¹ Berdasarkan Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) tahun 2007, prevalensi karies aktif pada penduduk kelompok umur di atas 12 tahun di Indonesia sebesar 46,5% dan yang bebas karies sebesar 27,9%.² Data dari Bank WHO (2000) yang diperoleh dari enam wilayah WHO (AFRO, AMRO, EMRO, EURO, SEARO, WPRO) menunjukkan bahwa rerata pengalaman karies (DMFT) pada anak usia 12 tahun berkisar 2.4. Indeks karies di Indonesia sebagai salah satu negara SEARO (South East Asia Regional Offices) saat ini berkisar 2.2, untuk kelompok usia yang sama. Kelompok 12 tahun ini merupakan indikator kritis, karena sekitar 76.97% karies menyerang pada usia tersebut.³ Karies gigi pada anak dapat menyebabkan terganggunya fungsi pengunyahan dan selanjutnya dapat mengganggu tumbuh kembang anak.⁴ Penanganan paling utama rasa nyeri oleh karena karies gigi atau trauma adalah menjaga atau mempertahankan pulpa gigi agar tetap vital, dan mencegah terjadinya nekrosa jaringan pulpa dan pembentukan abses. Gigi yang nonvital akan mempermudah terjadinya fraktur pada gigi yang menyebabkan rasa nyeri berulang dan kehilangan gigi. Karies gigi juga bisa menjadi infeksi fokal pada tubuh manusia dan menyebabkan penyakit sistemik misalnya bakterial endokarditis dan infeksi ginjal (pyelonefritis).

Karies gigi dapat menyebabkan peradangan pulpa. Perawatan peradangan pulpa reversibel yang sering dilakukan di bidang kedokteran gigi anak adalah pulpotomi vital baik terhadap gigi disidui maupun gigi permanen muda dengan apek gigi yang masih terbuka. Pulpotomi vital merupakan salah satu macam perawatan pulpa (*pulp therapy*). Perawatan pulpa merupakan perawatan gigi dengan cara melindungi, mengambil atau mengeluarkan jaringan pulpa gigi dan menggantinya atau mengisinya dengan obat-obatan atau pasta pengisi yang

sifatnya lembam.⁵ Tujuannya adalah untuk mempertahankan gigi selama mungkin dalam rongga mulut dan berfungsi secara normal dan sehat sehingga DMFT pada anak tidak meningkat. Perawatan pulpa pada gigi disidui berbeda dengan perawatan gigi permanen khususnya dalam penggunaan material pengisi saluran akar gigi. Ada beberapa jenis perawatan pulpa yang dilakukan pada gigi anak yaitu: apeksifikasi disebut juga *root induction* dilakukan pada gigi permanen muda non vital dengan apek yang masih terbuka, *pulpcapping* yang digolongkan dalam perawatan pulpa vital untuk melindungi vitalitas pulpa terdiri dari *direct* dan *indirect pulpcapping*, pulpotomi terdiri dari pulpotomi vital, devital atau sering disebut mumifikasi dan nonvital, pulpektomi atau *root canal treatment* terdiri dari vital, devital dan nonvital.⁵

Perawatan pulpotomi vital adalah pengambilan jaringan pulpa pada bagian koronal untuk menghilangkan jaringan pulpa yang terinfeksi dan meninggalkan jaringan pulpa yang masih sehat dan dalam keadaan vital, berbeda dengan *pulpcapping* yang tidak melakukan pengambilan jaringan pulpa bagian koronal. Mengingat tanduk pulpa gigi disidui dekat dengan permukaan mahkota gigi, maka *pulpcapping* tidak dilakukan terhadap gigi disidui vital.⁵ Oleh karena itu pulpotomi vital pada gigi disidui merupakan perawatan yang lebih baik dibanding *pulpcapping*, sedangkan *pulpcapping* gigi permanen tetap dilakukan terhadap anak-anak.

1.1.1 Efektivitas Mineral Trioxide Aggregate (MTA) dan Portland Cement (PC)

Prinsip dasar kedokteran gigi restoratif adalah memelihara agar pulpa dentin yang mengalami defeks tetap sehat dan fungsional sehingga dapat menyebabkan suksesnya penyembuhan pulpa yang terbuka akibat karies atau trauma. Jaringan pulpa adalah jaringan ikat yang memiliki potensi untuk menyembuhkan. Karakteristik penyembuhan dari pulpa yang terbuka termasuk reorganisasi jaringan lunak yang rusak karena adanya regenerasi *odontoblast-like cells* dari sel subodontoblas dan perbaikan (reparatif) terhadap dentin yang terbuka dengan terbentuknya reparatif jembatan dentin (*dentinal bridge formation*). Salah satu faktor berpengaruh terhadap kesembuhan pulpa adalah penetrasi bakteri melalui permukaan bahan pengisi pulpa.⁶⁻⁹ Bahan pengisi pulpa yang

sering digunakan dalam perawatan pulpa vital yang mengalami peradangan reversibel pada anak adalah *formocresol*, *ferric sulphate*, *calcium hydroxide* dan *mineral trioxide aggregate*.¹⁰

Formocresol (FC) pertama kali digunakan pada tahun 1930 dan tingkat keberhasilannya mencapai 97%.¹¹ Saat ini penggunaan FC dalam perawatan pulpotomi dianggap sebagai bahan yang toksik dan potensial menyebabkan kanker (karsinogenik) pada manusia.¹² sehingga menimbulkan kontroversi para ahli di bidang kedokteran gigi. Survei yang dilakukan baru-baru ini terhadap 184 ahli dan dokter gigi anak di Inggris, 54% di antaranya sangat memperhatikan keamanan penggunaan *formocresol*. Pada bulan Juni tahun 2004, pemberitahuan dari *International Agency of Research on Cancer* (IARC) menyatakan bahwa penggunaan *formocresol* bisa menyebabkan kanker mulut/gigi pada manusia.¹⁰ Oleh karena itu perlu dicari cara atau bahan alternatif lainnya untuk menjaga vitalitas gigi dan tidak bersifat karsinogenik yang mempunyai efektifitas lebih baik dibanding FC, antara lain *glutaraldehyde*, *ferric sulfat* (FS) dan *mineral trioxide aggregate* (MTA).

Bahan yang sekarang banyak diteliti untuk perawatan pulpotomi gigi disidui sebagai pengganti FC adalah MTA. *Mineral trioxide aggregate* (MTA) adalah bahan yang biasa digunakan pada perawatan endodontic.¹⁰ dan pertama kali dikembangkan di Universitas Loma Linda, California, Amerika Serikat sebagai *root-end filling* material pada perawatan bedah endodontik. Setelah bertahun-tahun berkembang MTA banyak digunakan untuk perawatan klinis termasuk di bidang kedokteran gigi anak, sering digunakan sebagai perawatan apeksifikasi dan apeksogenesis pada gigi permanen muda, pulpotomi gigi disidui dan *pulpcapping* gigi permanen.¹³ Komposisi MTA terdiri dari *tricalcium silicate*, *dicalcium silicate*, *tricalcium aluminate*, *tetracalcium aluminoferrite*, *calcium sulphate* dan *bismuth oxide*. Bahan dasar MTA adalah *Portland* semen yang terdiri dari Kapur (CaO dan MgO) 65%, Silica (SiO₂) 20%, Oksida besi (Fe₂O₃) dan Alumina (Al₂O₃) 10% dan lainnya 5%.¹⁴ Produk komersil MTA seperti ProRoot MTA (Tulsa Dental Products, Tulsa, OK,USA) dan MTA Angulus (Industria de Produtos Odontologicos Ltda, Londrina, Brazil) adalah sebuah campuran yang terdiri dari Portland Cement (PC), *gypsum* dan *bismuth oxide*

(BO).¹⁴ dengan perbandingan PC: BO adalah 4:1. Tujuan pemberian BO agar MTA lebih bersifat radiopak.¹⁵ Bahan MTA ini memiliki kandungan bioaktif yang secara esensial bisa menstimulasi pelepasan bakteri dalam pulpa.¹⁵ Saat digunakan MTA harus dicampur dengan air yang steril agar bisa merekat dengan baik pada jaringan pulpa gigi. *Mineral trioxide aggregate* (MTA) bersifat hidropilik yang bisa mengeras (*setting time*) dalam waktu 3-4 jam.^{10, 14}

Sejak diperkenalkan tahun 1993, MTA merupakan salah satu bahan kedokteran gigi yang serbaguna dan biokompatibel. *Mineral trioxide aggregate* (MTA) adalah bahan yang paling banyak direkomendasikan untuk menggantikan formocresol dan dirancang dengan komponen fisik yang cocok untuk perawatan pulpotomi serta relatif mudah digunakan dalam kondisi apapun. Sebagai bahan yang mempunyai *sealing ability*, MTA mampu memperbaiki perforasi pada furkasi di saluran akar gigi dan mampu mengurangi kontaminasi bakteri. *Mineral trioxide aggregate* (MTA) juga merupakan bahan dengan biokompatibel yang tinggi serta dapat menginduksi reaksi penyembuhan jaringan dengan sangat baik.^{16, 17} *Mineral trioxide aggregate* (MTA) mempunyai daya penetrasi terhadap mikroorganisme tinggi. Selama ini MTA sudah banyak direkomendasikan sebagai salah satu prosedur yang digunakan dalam pulpotomi selain itu juga digunakan untuk melapisi pulpa (*pulpcapping*).

Pertama kali MTA diujikan penggunaannya terhadap gigi anjing dan pendapat respon positif.¹⁸ Penelitian yang dilakukan oleh Nathanael *et al* yang dianalisis secara histologis terhadap molar pertama gigi tikus yang membandingkan penggunaan *Bioactive glass* (BAG), FC, FS dan MTA sebagai bahan pulpotomi menunjukkan bahwa MTA adalah bahan yang ideal untuk perawatan pulpotomi.¹⁸ Sedangkan penelitian dan laporan kasus lainnya menjelaskan bahwa MTA dapat digunakan untuk perawatan *pulpcapping*, apeksifikasi, pulpotomi, dan untuk *retrograde filling*. Kandungan fisik dan kimia dari MTA ini ternyata lebih baik dibandingkan *Zinc Oxide Eugenol*.¹⁹ Uji klinik terhadap beberapa bahan dalam perawatan pulpotomi gigi molar disidui diperoleh hasil bahwa FC sukses terhadap 76,9% gigi yang dirawat, FS 73,3%, CH 46,1% dan MTA 66.6%. Hasil ini menunjukkan efektifitas FC lebih baik dari MTA,

sedang FC dan FS memperlihatkan efektifitas yang sama pada perawatan pulpotomi.²⁰

Penggunaan *calcium hydroxide* (CH) pada perawatan pulpotomi vital gigi disidui merupakan kontra indikasi dapat menyebabkan internal resorpsi pada akar gigi dan sering menyebabkan kegagalan dalam perawatan,²¹ maka bahan MTA diharapkan dapat sebagai pengganti CH pada perawatan pulpotomi vital gigi disidui. Penelitian klinis yang membandingkan efektifitas MTA, FC dan CH dilakukan terhadap empat puluh tiga gigi molar disidui rahang bawah dan diperoleh hasil bahwa kelompok FC dan MTA, 100% dari gigi yang diteliti secara klinis dan radiografis berhasil sukses, sedangkan pada kelompok CH, 64% dari gigi yang diteliti secara klinis dan radiografis mengalami kegagalan serta ditemukan resorpsi internal dalam gambaran radiografis.²² Kesimpulan dari penelitian ini MTA lebih baik dari CH tetapi efektifitasnya sama dengan FC setelah evaluasi selama 24 bulan.²² Sedangkan penelitian klinis lainnya yang membandingkan efektifitas MTA dengan *portland cement* (PC) dalam perawatan pulpotomi vital pada gigi molar disidui, menyatakan keduanya sama efektif untuk digunakan dalam perawatan pulpotomi vital gigi disidui.²³

Perawatan pulpotomi juga dilakukan terhadap gigi permanen muda yang masih vital (apeksogenesis) dengan apeks gigi yang masih terbuka. Bahan pengisi konvensional yang sering digunakan dan secara luas di klinik sebagai bahan pengisi pulpotomi vital permanen muda adalah *calcium hydroxide* (CH).²⁴ Meskipun terlihat sukses dalam terapi pulpa vital, tetapi sebetulnya bahan ini banyak merusak jaringan pulpa apabila diletakkan dan kontak langsung dengan pulpa.²⁵ Suatu penelitian menunjukkan bahwa CH sangat toksik bagi sel dalam kultur jaringan.²⁶ Oleh karena itu, diperlukan bahan yang lebih biokompatibel yang dapat merangsang pembentukan jembatan dentin dan penutupan apikal gigi permanen muda yang masih vital sebagai pengganti CH.²⁷ tetapi MTA secara statistik tidak berbeda bermakna dibanding CH pada perawatan apeksogenesis gigi permanen muda.²⁸ Berbagai penelitian telah melaporkan hasil yang sangat baik untuk MTA bila digunakan sebagai bahan *pulpcapping* dibanding Dycal dan Propolis.²⁹⁻³¹ Dalam penelitian lain diketahui bahwa PC dapat digunakan untuk

perawatan *pulpcapping* yang mampu merangsang respon mineral pulpa, namun demikian masih diperlukan penelitian lebih lanjut.³²

Berdasarkan uraian dan beberapa hasil penelitian tersebut diketahui bahwa:

Ada beberapa penelitian klinik menggunakan MTA pada perawatan pulpotomi vital gigi disidui yang hasilnya membuktikan kurang efektifnya MTA dibanding FC dan CH. Satu penelitian menunjukkan efektifitas MTA sama dengan efektifitas FC²² dan secara statistik MTA tidak berbeda dengan CH.²⁸ Penelitian klinik yang lain diketahui bahwa perawatan pulpotomi dengan MTA hanya efektif 66,6% dan berbeda bermakna dengan efektifitas FC (76,9%) pada gigi molar disidui yang dirawat.²⁰ MTA ternyata sama efektifnya dengan PC untuk perawatan pulpotomi vital gigi disidui.²³

Mineral trioxide aggregate (MTA) juga mengandung ion kalsium yang menyebabkan sifat pH basa dan berpengaruh terhadap jaringan. Lepasnya ion kalsium terjadi beberapa hari setelah inisiasi hidrasi dan *setting* pada MTA. Ion kalsium ini mengalir ke dentin yang mengalami jejas yang konsentrasinya terus meningkat.³³

Berdasarkan latar belakang tersebut, diasumsikan bahwa untuk meningkatkan efektifitas MTA, maka ukuran partikel MTA perlu dimodifikasi misalnya dalam bentuk nanopartikel yaitu nanopartikel mineral trioksida (NMT). Pada ukuran nano (1-100 nm) diharapkan MTA yang telah dimodifikasi tersebut lebih efektif melakukan rangsangan (*excited*) dalam sistem sel karena material yang partikelnya berukuran nano (nanopartikel) lebih mudah melewati membran sel dalam organisme dan berinteraksi dengan sistem biologis.³⁴ **Modifikasi MTA**

Menjadi Nanopartikel untuk Meningkatkan Bioaktivitasnya

Salah satu teknologi yang sedang berkembang saat ini adalah teknologi nanopartikel. Nano teknologi begitu penting karena sifat-sifat material yang meliputi sifat fisik, kimiawi, dan biologi berubah secara drastis ketika dimensi material tersebut masuk ke dalam skala nanometer.³⁵ Nanopartikel bisa lebih efektif penggunaannya akibat luas permukaan partikel meningkat secara signifikan. Nanopartikel adalah material yang berukuran 1-100 nm yang memiliki luas permukaan yang sangat tinggi dibanding rasio volumenya. Hal ini membuat

partikel-partikelnya sangat reaktif atau katalitik. Materi konvensional (bulk) memiliki ukuran bubuk dari ratusan mikron sampai sentimeter, sedangkan nanomaterial yang disebut nanopowder (bubuk nano) mempunyai ukuran bubuk 1-100 nm.³⁵ Nanomaterial dapat dibuat secara sederhana dengan metoda ball milling.³⁵

Pada saat ini pemanfaatan nanoteknologi di bidang kesehatan menunjukkan kemajuan yang pesat, antara lain adanya terobosan baru di bidang terapi dengan memanfaatkan nanopartikel. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa sifat-sifat material berubah secara dramatis ketika ukuran partikelnya berkurang ke kisaran nanometer (nm). Penelitian tentang nanopartikel pada kelompok logam oksida (ZnO, CaO, MgO) efektif sebagai antimikroba yang menghambat pertumbuhan *staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.³⁶ Universitas Princeton membuat nanopartikel berukuran 100-300 nm dengan tujuan agar partikel tersebut dapat dipakai sebagai media untuk obat yang dapat sampai ke jaringan dalam tubuh seperti paru atau sel-sel kanker dan tidak merusak sel normal lainnya.

Mineral trioxide aggregate (MTA) juga kelompok logam oksida (CaO, MgO, SiO, FeO dan AlO) yang lebih tinggi tingkat anti bakterinya apabila ukurannya diubah dalam bentuk nanopartikel sehingga tingkat proliferasi, diferensiasi dan maturasi sel pulpa dapat lebih cepat. Setelah berubah ke ukuran nano selanjutnya MTA disebut sebagai nanopartikel mineral trioksida (NMT). Pada ukuran 1-100 nm diharapkan NMT dapat bekerja melakukan rangsangan (*excited*) dalam sistem sel yang ada karena ukuran permukaan nanopartikel lebih luas sehingga efektif meningkatkan bioaktivitas bahan tersebut untuk merangsang pertumbuhan sel, termasuk sel odontoblas yang menjadi pengamatan dalam penelitian ini.

1.1.3 Odontoblas dan Sel Punca Pulpa Gigi

1.1.3.1 Odontoblas

Secara histologis pulpa terdiri dari tiga bagian yaitu bagian paling luar yang dekat dengan predentin terdapat odontoblas, bagian kedua yang dekat dengan lapisan ini adalah daerah yang bebas sel atau *cell free zone*, lebih ke dalam lagi adalah daerah yang kaya akan sel atau disebut *cell rich zone*.³⁷ Di pusat pulpa

terdapat banyak mengandung sel pulpa dan cabang utama dari pembuluh darah serta saraf yang disebut sebagai inti pulpa.^{38, 39} Sel pulpa terdiri dari odontoblas, preodontoblas, fibroblas dan sel-sel imun. Odontoblas adalah sel pulpa yang paling khas. Morfologi odontoblas koronal berbeda dari odontoblas yang ditemukan dalam akar (radikuler). Morfologi odontoblas koronal berbentuk memanjang dan seperti piramida dengan inti apikal, sedangkan yang radikuler lebih berbentuk kubus, yang mempunyai indikasi aktivitas seluler secara signifikan lebih rendah. Fakta ini jarang diperhitungkan, tetapi hal ini dapat menjelaskan mengapa terapi pulpa yang dilakukan pada bagian koronal (seperti *pulpcapping*) akan sering gagal ketika diterapkan pada terapi pulpa radikuler (pulpotomi).⁴⁰ Odontoblas dapat membentuk lapisan tunggal dan mensintesis matriks yang selanjutnya membentuk dentin. Formasi matrik dentin selama proses mineralisasi dapat diidentifikasi dan dikwantifikasi pada level protein atau ekspresi gen.⁴¹ Beberapa protein yang disekresikan oleh odontoblas dan sering dijadikan biomarker untuk menganalisis aktivitas odontoblas adalah:^{17, 42} *Alkaline phosphatase* (ALP) sebagai enzim yang merangsang kalsifikasi. ALP dalam pulpa terdapat di odontoblas dan lapisan sub odontoblas. Enzim ini berperan dalam mineralisasi dentin,^{43, 44} *Dentin sialophospho protein* (DSPP) adalah suatu sialic acid yang merangsang kolagen pembentukan dentin sekunder. DSPP disekresi secara selektif oleh odontoblas.⁴⁵ 3) *Osteocalcin* (OC), sebagai salah satu tipe protein yang disekresi oleh osteoblas. Pada daerah jejas OC disekresi dan secara cepat dari odontoblas untuk membentuk predentin dari dentin reaksioner.^{46, 47}

1.1.3.2 Sel Punca Mesensimal Pulpa Gigi

Selama beberapa tahun ini banyak peneliti mencoba memahami tentang sel dalam tubuh manusia yang mampu melaksanakan fungsi regeneratif. Penelitian difokuskan pada sel punca yang memberikan banyak pengetahuan tentang organisme yang berkembang dari sel tunggal dan sel yang sehat menggantikan sel yang rusak pada organisme yang dewasa.

Sel punca adalah suatu sel yang bersifat *clonogenic*, yang mempunyai kemampuan atau potensi untuk proliferasi dan diferensiasi atau menjadi berbagai jenis sel yang spesifik yang membentuk berbagai jaringan tubuh. Sebenarnya sel

punca adalah sel yang selalu dalam keadaan tidak terdiferensiasi sampai ada rangsangan untuk berdiferensiasi menjadi sel jenis tertentu.^{48, 49} Sel punca mempunyai dua sifat yaitu: 1) Diferensiasi adalah kemampuan untuk berkembang menjadi berbagai jenis sel yang spesifik. 2) Regenerasi adalah kemampuan untuk memperbarui atau meregenerasi dirinya sendiri dengan membuat salinan sel yang sama dengan dirinya. Berdasarkan asalnya terdapat sel punca embrionik dan sel punca post-natal (adult).

Sel punca mesensimal pulpa gigi (Dental Pulp *Stem Cells*/DPSCs) berasal dari post natal yang terdapat dalam daerah yang kaya akan sel atau disebut *cell rich zone*.⁵⁰ Dari beberapa eksperimen *in vitro* dapat diketahui bahwa sel punca asal pulpa (DPSCs) dapat diisolasi dari gigi molar impaksi khususnya dari individu muda usia 14-28 tahun.^{51, 52} Sel punca dapat pula diisolasi dari gigi disidui (*Stem Cells Human Exfoliated Deciduous*/SHED) yang hampir tanggal, namun karakteristik fenotipnya berbeda.⁵³ Sel punca yang berasal dari jaringan pulpa memiliki potensi untuk berdiferensiasi, baik ke galur sel odontoblas (*odontoblast-like cell*) maupun galur fibroblas.⁵⁴ Oleh karena DPSCs dan SHED ini mempunyai kapasitas berdiferensiasi ke arah galur odontoblas maka penelitian *in vitro* untuk mengetahui pengaruh NMT terhadap diferensiasi sel punca ke arah galur odontoblas dapat diamati dari formasi matrik dentin selama proses mineralisasi yang diidentifikasi dan dikwantifikasi pada level protein.⁴¹ yaitu melalui analisis penanda (*marker*) fenotip odontoblas antara lain: ALP, OC dan DSPP. Di samping itu dalam penelitian ini juga ingin diketahui kemampuan NMT terhadap peningkatan pertumbuhan (proliferasi) sel punca pulpa gigi dan maturasi sel ke arah odontoblas.

1.1.3.3 Deposit Kalsium.

Pada tahap akhir maturasi sel akan terjadi suatu proses biologis berupa pembentukan deposit kalsium dan matrik ekstraselluler. Deposit kalsium membuktikan terjadinya suatu proses regenerasi tulang⁵⁵. Ion kalsium biasanya mulai ditemukan pada hari ke 12 dengan pewarnaan Von Kossa, sedangkan deposit kalsium ditemukan pada matrik ekstraselluler pada hari ke 14 dan 21 yang menandakan terjadinya maturasi sel odontoblas. Pada penelitian lainnya menyebutkan bahwa absorpsi kalsium dan serum leptin yang meningkat

mempunyai hubungan bermakna dengan deposit kalsium. Dengan demikian ada hubungan yang positif antara absorpsi kalsium, serum leptin dan osteocalcin dengan deposit kalsium.⁵⁶

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas, maka perlu kajian yang komprehensif untuk menjelaskan pengaruh pemberian NMT terhadap potensi proliferasi, diferensiasi sel punca mesensimal dari pulpa gigi dan maturasi ke arah odontoblas secara *in vitro*. Aspek labolatoris yang perlu dikaji adalah apakah modifikasi ukuran MTA menjadi ukuran nano (NMT) dapat meningkatkan dan mempercepat proliferasi dan diferensiasi sel punca mesensimal pulpa gigi melalui kuantifikasi protein penanda diferensiasi serta maturasi sel ke arah odontoblas. Kajian tersebut meliputi:

- 1.2.1 Proliferasi sel punca mesensimal pulpa gigi yang diamati melalui uji viabilitas sel, apabila suatu bahan atau obat tersebut dapat merangsang kelangsungan hidup dan pertumbuhan sel (proliferasi sel) maka bahan atau obat tersebut tidak toksik.
- 1.2.2 Diferensiasi sel punca mesensimal pulpa gigi yang diamati melalui aktivitas: (1) *Alkaline phosphatase* (ALP). Aktivitas enzim ini berhubungan dengan pembentukan jaringan keras gigi yang digunakan secara luas sebagai marker sel-sel turunan jaringan kalsifikasi seperti odontoblas. (2) *Osteocalcin* (OC). Osteocalcin dianggap sebagai pangkal marker diferensiasi odontoblas. Pada daerah jejas osteocalcin disekresi secara cepat dari odontoblas untuk membentuk preentin dari dentin reaksioner. (3) *Dentin sialophospho protein* (DSPP). Aktivitas DSPP merupakan marker penanda diferensiasi dentin-pulpa kompleks dan disekresi secara selektif oleh odontoblas, yang merangsang kolagen pada saat pembentukan dentin sekunder.
- 1.2.3 Maturasi sel yang ditandai dengan meningkatnya jumlah deposit kalsium dan meningkatkan regeneratif dentin yang dapat ditemukan pada matrik ekstraselluler dentin setelah hari ke 14 dan 21.

Oleh karena itu dalam penelitian ini akan dibuktikan bahwa:

Mineral trioxide aggregate (MTA) dapat dimodifikasi menjadi NMT dengan cara *milling*. Nanopartikel mineral trioksida (NMT) dapat meningkatkan proliferasi dan tidak bersifat toksik pada sel punca pulpa gigi (DPSC dan SHED) dan berpotensi meningkatkan diferensiasi sel punca pulpa gigi (DPSC dan SHED) serta meningkatkan deposit kalsium dan pembentukan matrik ekstraselluler ke arah odontoblas.

1.3 Pertanyaan Penelitian

Untuk menjawab permasalahan atas modifikasi MTA menjadi NMT dan kemampuan NMT dalam meningkatkan proliferasi dan diferensiasi sel punca pulpa gigi yang diisolasi dari DPSC dan SHED serta maturasi sel ke arah odontoblas, dirumuskan pertanyaan penelitian sebagai berikut:

1.3.1 Pertanyaan Umum

Apakah MTA dapat dimodifikasi menjadi biomaterial ukuran nano yang tidak bersifat toksik dan dapat menginduksi peningkatan proliferasi dan diferensiasi sel punca pulpa gigi serta maturasi sel ke arah odontoblas ?

1.3.2 Pertanyaan Khusus

- 1.3.2.1. Apakah ukuran partikel MTA dapat dimodifikasi menjadi nanopartikel mineral trioksida (NMT) berukuran < 100 nm dengan cara *milling* ?
- 1.3.2.2. Apakah NMT yang dipaparkan pada sel punca pulpa gigi dapat meningkatkan proliferasi ke arah odontoblas dan tidak bersifat toksik terhadap sel punca pulpa gigi ?
- 1.3.2.3. Apakah NMT yang dipaparkan pada sel punca pulpa gigi dapat merangsang peningkatan diferensiasi ke arah odontoblas ?
- 1.3.2.4. Apakah NMT yang dipaparkan pada sel punca pulpa gigi dapat meningkatkan jumlah deposit kalsium dan pembentukan matrik ekstraselluler ke arah odontoblas ?

1.4 Tujuan dan Manfaat Penelitian

1.4.1 Tujuan Umum

Memodifikasi ukuran partikel MTA menjadi partikel berukuran nano dalam bentuk nanopartikel mineral trioksida (NMT) dan menentukan

potensi NMT tersebut dengan cara menganalisis aktivitas proliferasi dan diferensiasi sel punca pulpa gigi serta maturasi sel ke arah odontoblas.

1.4.2. Tujuan Khusus

- 1.4.2.1. Memodifikasi ukuran partikel MTA menjadi bentuk partikel berukuran nano (< 100 nm) dengan cara *milling*.
- 1.4.2.2. Menetapkan potensi NMT untuk menginduksi proliferasi dan sifat toleran sel punca pulpa gigi dengan cara menganalisis viabilitas sel punca pulpa gigi.
- 1.4.2.3. Menetapkan potensi NMT untuk menginduksi diferensiasi sel punca pulpa gigi ke arah odontoblas dengan cara:
 1. Menganalisis perbedaan antara pengaruh pemberian MTA dan NMT terhadap aktivitas ALP oleh sel odontoblas.
 2. Menganalisis perbedaan antara pengaruh pemberian MTA dan NMT terhadap aktivitas OC oleh sel odontoblas.
 3. Menganalisis perbedaan antara pengaruh pemberian MTA dan NMT terhadap aktivitas DSPP oleh sel odontoblas.
- 1.4.2.4. Menganalisis potensi NMT dalam meningkatkan jumlah deposit kalsium dan pembentukan matrik ekstrasellular yang terdapat pada sel punca pulpa gigi dibanding MTA.

1.4.3 Manfaat Penelitian

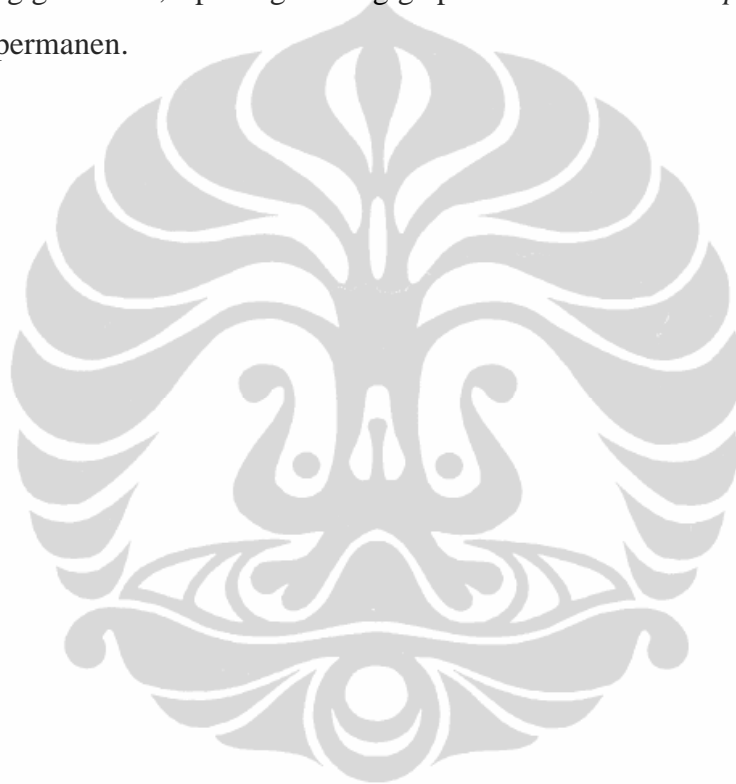
1.4.3.1. Bidang Kedokteran Gigi.

1. Penggunaan material biologis berukuran nano (NMT) diharapkan dapat menggantikan FC yang bersifat toksik dan karsinogenik dan menjadi awal dari pengembangan material berukuran nano di bidang kedokteran gigi khususnya kedokteran gigi anak di Indonesia.
2. Diperoleh landasan ilmiah bahan NMT yang dapat memicu proliferasi dan diferensiasi sel punca pulpa gigi serta maturasi sel ke arah odontoblas sehingga dapat digunakan di klinik sebagai bahan yang aman dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah.

3. Hasil penelitian ini diharapkan menambah informasi tentang peran dental material khususnya material berukuran nano dalam praktik kedokteran gigi.

1.4.3.2. Masyarakat

Nanopartikel mineral triokasida (NMT) adalah bahan yang sangat menarik untuk dikembangkan di bidang medik dan menciptakan peluang baru untuk aplikasi klinis sebagai biomaterial dalam perawatan pulpotomi vital gigi disidui, apeksogenesis gigi permanen muda dan *pulpcapping* gigi permanen.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Komposisi kimia Mineral Trioxide Aggregate

Bahan yang banyak dipakai untuk perawatan pulpa adalah MTA, tetapi efektifitas MTA tidak lebih baik dari FC dan pada perawatan tertentu secara statistik tidak berbeda dengan CH.^{20, 28} *Mineral trioxide aggregate* (MTA) adalah campuran dari portland cement (PC) ditambah bismut oksida (BO) dengan perbandingan 4:1. Penambahan BO agar MTA lebih bersifat radiopak. *Portland cement* (PC) itu sendiri mengandung kalsium, silikon dan aluminium. Paten MTA menyebutkan bahwa MTA terdiri dari 50-75% kalsium oksida dan 15-25% silikon oksida. Kedua komponen tersebut merupakan 70-95% dari komposisi semen (PC). Apabila semua komponen tersebut dicampur maka akan menghasilkan trikalsium silikat, dikalsium silikat, trikalsium aluminat dan tetrakalsium aluminoferrit. Pada saat dicampur dengan air, semen akan terhidrasi dan membentuk silikat hidrat gel. *Mineral trioxide aggregate* (MTA) yang ada saat ini berasal dari PC tipe I yang mempunyai tingkat kehalusan antara 4500-4600 cm²/g.⁵⁷ Perbedaan MTA abu-abu dan putih terletak pada kandungan besi (Fe), MTA abu-abu lebih banyak mengandung Fe yang dapat menyebabkan kerusakan jaringan pulpa, MTA putih sangat sedikit mengandung Fe.⁵⁸

2.1.1 Mineral Trioxide Aggregate dan Portland Cement

Dilaporkan bahwa MTA dan PC mempunyai kemiripan. Penelitian yang membandingkan MTA putih dan PC putih menunjukkan bahwa semen ada di dalamnya mempunyai isi yang sama kecuali kandungan BO yang ada di MTA.⁵⁹

Keduanya mempunyai biokompatibilitas yang sama karena komposisi material yang terkandung mirip.⁶⁰ Penelitian selanjutnya membuktikan bahwa ada perbedaan antara material yang ada dalam MTA dan PC. Melalui *scanning electron microscopy* (SEM), fase aluminat secara normal ada di dalam PC tetapi tampak sedikit di dalam MTA. Kandungan trikalsium silikat dalam MTA lebih rendah dari PC tetapi dikalsium silikatnya lebih tinggi.⁶¹ Kalsium sulfat di dalam MTA lebih rendah dari PC. *Portland cement* (PC) mengandung 4,9% kalsium

sulfat dalam bentuk dihidrat, hemihidrat dan anhidrat. Sedangkan MTA mengandung 2,2% kalsiumsulfat tetapi dihidratnya tidak ada.⁶² Defisiensi alumina tampak di dalam MTA.⁶¹ Rendahnya alumina dalam MTA mempengaruhi produksi ettringite dan monosulfat, yang biasanya terbentuk pada saat hidrasi dari PC. Reaksi antara trikalsium silikat dan dikalsium silikat dengan air menghasilkan kalsium silikat hidrat gel, dan derajat kristalinitasnya masih rendah dan kalsium hidroksida (CH). Pada *setting* bismut oksida di dalam MTA menurun menjadi 8,4% yang sebelumnya *setting* jumlah bismut sebanyak 21,6%.⁶² Terbentuknya CH yang menyebabkan sifat pH basa dan berpengaruh terhadap jaringan. Beberapa hari setelah terjadi inisiasi hidrasi dan *setting* terjadi pelepasan ion kalsium. Ion kalsium ini mengalir ke dentin yang mengalami jejas yang konsentrasinya terus meningkat. Fisikokimia dari MTA ini dihubungkan juga dengan terbentuknya hidksiapatit (HA) jika ion kalsium yang dihasilkan MTA tersebut kontak dengan cairan jaringan menghasilkan *amorphous calcium phosphate* merupakan kunci terjadinya kalsifikasi. Dilaporkan juga bahwa MTA dapat meningkatkan *alkaline phosphatase* (ALP), *osteocalcin* (OC), *interleukin production* (IL-6, IL-8), ligamen periodontal, pertumbuhan semetum dan formasi jembatan dentin.³³

Sedangkan PC adalah bubuk halus yang dihasilkan dengan cara menggiling *cement clinker*. *Portland cement* (PC) dapat dikategorikan sebagai jenis semen hidrolik, yang secara normal tersusun dari 65% kapur, 20% silika, 10% alumina dan ferri oksida, dan 5% adalah campuran lainnya. Sedangkan bahan kapur tersebut, tersusun dari kalsium dan magnesium oksida.¹⁴ Dua bahan utama yang terdapat dalam PC adalah trikalsium silikat (3CaO-SiO₂) dan dikalsium silikat (2CaO-SiO₂), bila ditambah air akan terjadi *setting*, mengeras secara perlahan-lahan sampai berubah bentuk menjadi gel, dan lama-kelamaan mengkristal dan memadat. Reaksi kimia yang terjadi pada proses tersebut disebut dengan *alite* dan *belite*. Reaksi sederhana *alite* yang ditambah dengan air bisa dirumuskan sebagai berikut :¹⁴



Proses reaksi kimia di atas berlangsung cepat menyebabkan terjadinya *setting* dan menguat pada minggu-minggu pertama.

Selanjutnya reaksi kimia sederhana pada *belite* adalah :



Reaksi di atas secara relatif dan perlahan-lahan bertambah cepat setelah satu minggu.

Sekitar 1/3 volume dari produk-produk ini mengandung kalsium hidroksit (CH) dan kandungan bentuknya mirip seperti gel yang kenyal atau mengkristal. Terdapat pula sebuah fase *calcium-silicate-hydrate* (C-S-H) dan sebuah fase *sulphatic hydrates* (AFt). Hidrasi dari bubuk PC menghasilkan trikalsium silikat, trikalsium posfat, trikalsium oksida dan lainnya.¹⁴

Mineral trioxide aggregate (MTA) memiliki aluminat yang kurang dibanding PC. Hal ini disebabkan karena PC dibuat melalui *rotary kiln*, sedangkan MTA tidak. Pada hidrasi hal ini mempengaruhi produksi *ettringite* dan *monosulphate* biasanya terbentuk pada hidrasi PC. Bismut yang terdapat dalam MTA mempengaruhi mekanisme hidrasi MTA, dan merupakan bagian dari struktur C-S-H, juga mempengaruhi pengendapan kalsium hidroksida (CH) dalam pasta hasil hidrasi. MTA memiliki mikrostruktur dengan partikel yang lebih lemah dibandingkan dengan PC.⁶¹

Dari uraian tersebut di atas diketahui bahwa MTA maupun PC pada proses *setting* menghasilkan CH. Terbentuknya CH yang menyebabkan sifat pH basa dan berpengaruh terhadap jaringan. Dapat disimpulkan bahwa MTA maupun PC dapat berpengaruh terhadap jaringan karena pelepasan ion kalsium yang mengalir ke dentin yang mengalami jejas dan terjadi kalsifikasi.

2.2 Aplikasi Nanomaterial pada *Mesenchymal Stem Cell*

2.2.1 Nanomaterial

Nanoteknologi berasal dari bahasa Yunani: nano yang berarti kerdil atau cebol. Secara teknis nano berarti benda-benda yang berukuran sangat kecil dengan ukuran sepermiliar (10^{-9}). Nanomaterial diklasifikasikan menjadi nanostruktur dan material nanofase atau nano partikel. Nanomaterial merupakan jembatan yang menghubungkan satu elemen dengan satu struktur kristal massal. Nanomaterial dapat dibagi dua yaitu nanomaterial anorganik dan organik nanomaterial.⁶³

2.2.1.1. Nanomaterial Anorganik

Nanomaterial anorganik adalah nanostruktur dimana karbon tidak terdapat di dalamnya dan dikombinasikan dengan elemen lainnya. Ada 4 jenis nanostruktur anorganik yaitu: (1) *fullerenes* dan *carbontubes*, (2) *nanowires*, (3) *semi conductor nano crystals*, (4) nanopartikel. Nanopartikel memiliki luas permukaan yang berlipat ganda yang mempunyai peluang meningkatkan terjadinya reaksi kimia yang lebih banyak, aktivitas biologi dan sifat karakteristik lainnya dibanding material yang berukuran besar, meskipun keduanya berasal dari bahan yang sama. Nanopartikel juga lebih mudah memasuki bagian-bagian tubuh atau *bioavailability* dibanding dengan yang berukuran besar. Oleh karena itu nanopartikel lebih mudah diserap oleh sel-sel secara individu dan organ tubuh. Menurut Garnette dan Kallinteri (2006), materi-materi yang berukuran lebih kecil dari 300 nm dapat menembus dan masuk ke dalam sel-sel individu. Sedangkan menurut Chen dan Mikezy (2005), nanomaterial yang berukuran lebih kecil dari 70 nm dapat dengan mudah diserap oleh inti sel, dan secara teori dapat menyebabkan kerusakan berat secara genitis.⁶³

Nanopartikel adalah bahan kecil yang berukuran <100 nm yang memiliki luas permukaan yang sangat tinggi dibanding rasio volumenya. Hal ini membuat partikel-partikelnya sangat reaktif atau katalitik. Nanopartikel lebih mudah melewati membran sel dalam organisme dan berinteraksi dengan sistem biologis.³⁴ Bahan ini sangat menarik untuk dikembangkan di bidang medik. Nanopartikel dapat bereaksi pada sel hidup dan menghasilkan efek biologis yang diinginkan dan bahan ini telah menciptakan peluang baru dalam penelitian medik dan aplikasi klinis. Banyak *nanoassays* baru yang mempunyai sensitivitas yang tinggi, selektivitas dan *throughput* dibanding metoda bioanalitikal konvensional. Saat ini nanomaterial seperti *nanotube*, *nanowire*, derivatif *fullerene* dan *quantum dots* telah mendapatkan perhatian besar untuk mendapatkan tipe baru alat-alat analitik untuk bioteknologi, ilmu-ilmu alam dan aplikasi terbaru nanopartikel dalam penelitian sel punca.³⁴

2.2.1.2. Nanomaterial Organik

Nanomaterial organik adalah senyawa yang mengandung elemen karbon. Jenis nanomaterial organik adalah DNA yang bertindak sebagai *building block*,

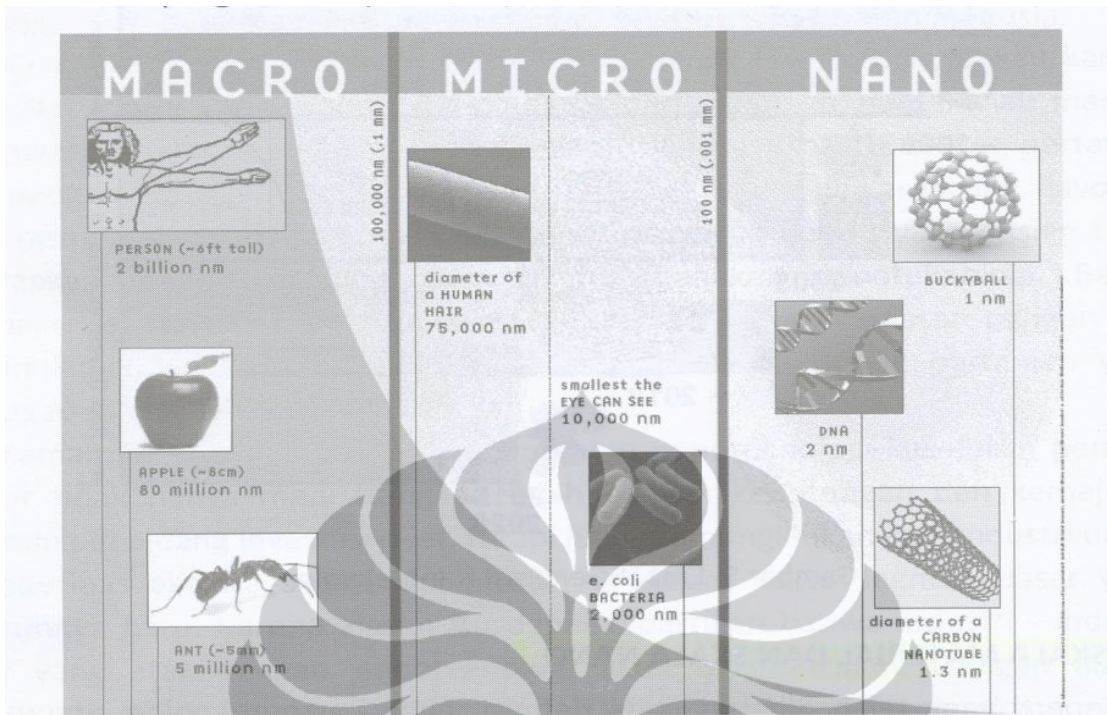
molekulnya relatif kaku dan beberapa strand DNA dapat dimodifikasi sehingga memiliki kekakuan (*stiffness*) yang lebih tinggi. DNA *sequence* secara artifisial dapat diulang dan dipabrikasi secara geometrik. Beberapa peneliti telah berhasil membentuk struktur kubus dan struktur dengan 8 bidang dengan sisi yang sangat responsif terhadap kloning dan cepat melakukan replikasi. Protein merupakan materi dasar dari makhluk hidup dan DNA merupakan *blue print* dari protein yang menggabungkan asam amino yang terdapat di alam. Para ahli telah dapat memproduksi memodifikasi protein yang berbentuk nanostruktur yang berbeda untuk menghasilkan protein dari asam amino yang tidak terdapat di alam.⁶³

Saat ini pemanfaatan nano teknologi di bidang kesehatan telah menunjukkan perkembangan yang sangat pesat.^{64, 65} Nano adalah satuan panjang sebesar sepertriliun meter ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$). Ukuran tersebut 1000x lebih kecil dari diameter rambut manusia ($80 \frac{1}{4} \text{ m}$). Diameter sel darah merah dan virus hanya sebesar masing-masing $7 \frac{1}{4} \text{ m}$ dan 150 nm. Bahan berstruktur nano merupakan bahan yang memiliki paling tidak salah satu dimensinya (panjang, lebar, atau tinggi) berukuran 1-100 nm. Bahan nano merupakan jembatan antara atom/molekul dan bahan berukuran mikrometer. Gen atau DNA merupakan bahan nano alami dengan lebar pita gen sebesar 2 nm.⁶⁶ Nanoteknologi adalah desain, fabrikasi, karakterisasi dan pemanfaatan atas material, struktur dan piranti yang memiliki ukuran kurang dari seratus nanometer ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ sampai dengan $100 \text{ nm} = 10^{-7} \text{ m}$).⁶⁷ Material dengan ukuran nanometer (nm) yang disebut sebagai nanomaterial mempunyai sifat yang tidak dimiliki oleh material yang berukuran besar.

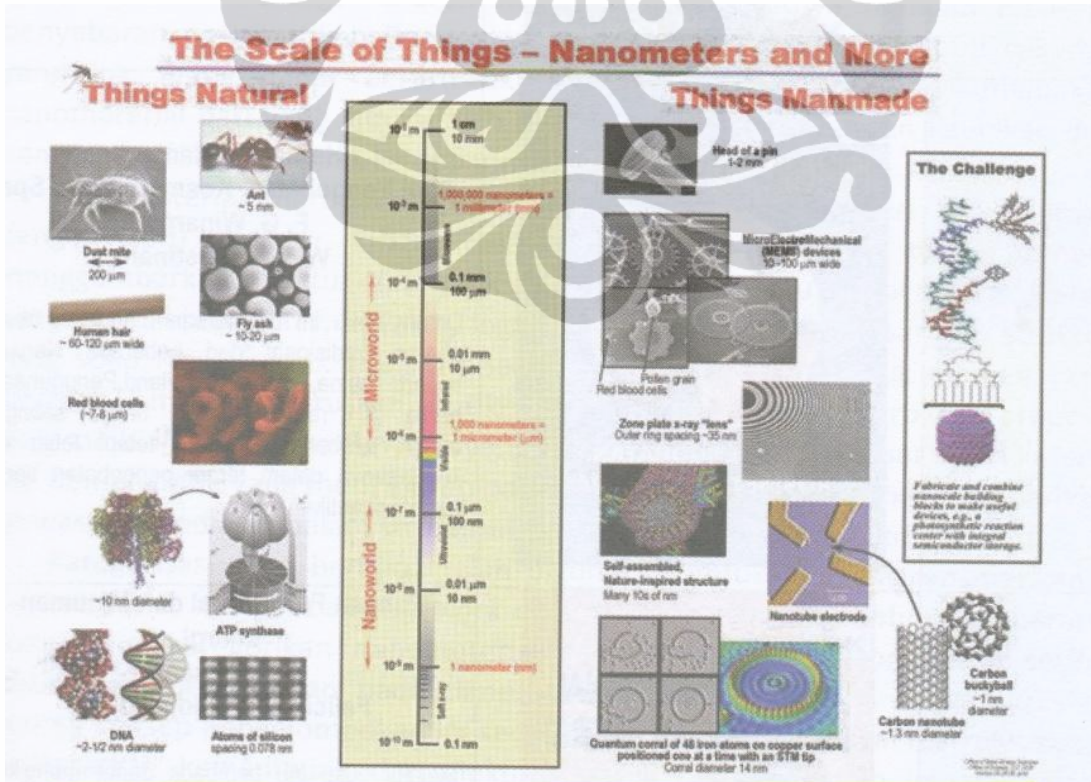
Seperti telah disebutkan sebelumnya material yang berukuran nano disebut juga sebagai nanomaterial yang terdiri dari bubuk yang tersusun dari banyak atom. Bubuk ini tidak bisa dilihat dengan mata telanjang. Tetapi apabila bubuk tersebut membentuk kumpulan dengan ukuran mencapai μm dapat dilihat mata telanjang dari warnanya yang berbeda. Materi konvensional (bulk) memiliki ukuran bubuk dari ratusan mikron sampai sentimeter, sedangkan nanomaterial yang disebut nanopowder (bubuk nano) mempunyai ukuran 1-100 nm.³⁵ Tipikal mayoritas atom nanomaterial terletak pada permukaan partikelnya yang berukuran nano yang disebut nanopartikel, sedangkan materi konvensional atom-atomnya

terletak pada keseluruhan bagiannya. Oleh karena itu sifat-sifat intrinsik nanomaterial berbeda dengan materi konvensional karena atom-atomnya terletak pada lingkungan yang berbeda. Nanomaterial menggambarkan kelebihan area permukaan yang meningkat.³⁵ Nanomaterial telah menciptakan peluang-peluang baru dalam penelitian biomedis dan aplikasi klinis.⁶⁸ Cukup mudah sebenarnya untuk memahami mengapa materi nano lebih fleksibel. Masing-masing nanopartikel bisa bergerak melewati satu sama lain sehingga mudah diregangkan. Partikel berukuran nano bisa mempertinggi tingkat kekerasannya. Partikel bisa berkumpul menjadi satu sepanjang batas makrokristal dan mencegah strukturnya terlepas. Nanopartikel bisa juga digunakan untuk membentuk magnet yang kuat.³⁵ Penggunaan lain tentang nanopartikel di bidang kedokteran adalah pemanfaatan nanopartikel besi oksida (Fe_3O_4) yang mempunyai ukuran rentang 5-100 nm yang bersifat magnetis sehingga bisa diikuti magnet dalam tubuh dalam penggunaan *Magnetic Resonance Imaging* (MRI). Nanopartikel emas yang berukuran 50 nm juga digunakan dalam Respon Awal tes kehamilan yang menggunakan partikel lateks. Struktur nano bisa membentuk lapisan biomaterial yang baru yang dapat berfungsi baik untuk mencegah sel-sel terikat ke permukaan lainnya (misalnya untuk mencegah pembekuan darah) atau untuk meningkatkan daya rekat dan biokompatibilitas dalam perbaikan kulit dan jaringan lain yang rusak.³⁵ Penelitian di Universitas Princeton membuat nanopartikel berukuran 100-300 nm dengan tujuan agar partikel tersebut dapat dipakai sebagai media untuk obat yang dapat sampai ke jaringan dalam tubuh seperti paru atau sel-sel kanker dan tidak merusak sel normal lainnya.⁶⁹

Pada Gambar 2.1 adalah perbandingan ukuran besar (makro), mikro dan nano, sedang kan Gambar 2.2 adalah perbedaan antara ukuran mikro dan nano alami dibanding dengan ukuran materi nano buatan manusia.⁶³



Gambar 2.1. Perbandingan materi berukuran Makro, Mikro dan Nano⁶⁴



Gambar 2.2. Perbandingan antara Materi Alami dengan Buatan Manusia

Di samping itu nanomaterial memberikan peluang luar biasa dalam rekayasa sel punca dan obat-obatan regeneratif berbasis sel dan perlu untuk dieksplorasi lebih lanjut dalam upaya meningkatkan diferensiasi, pemeliharaan dan petunjuk biologis serta menyediakan petunjuk untuk diagnosis human *Mesenchymal Stem Cells* (hMSCs).³⁴

2.2.2 Nano ACP dan Nano HA

Penelitian sebelumnya tentang aplikasi nanopartikel *amorphous calcium phosphates* (ACP) dan *hydroxyapatite* (HA) ke dalam sel punca pernah dilakukan terhadap sumsum tulang (*bone marrow*) yang mempunyai dua sumber utama dari populasi sel punca yaitu *human hematopoietic stem cells* (hHSCs) dan *stromal mesenchymal stem cells* (MSCs). MSCs adalah populasi sel yang heterogen dan menunjukkan diferensiasi dalam tulang, tulang rawan, jaringan lemak dan fibros (ikat). MSCs mempunyai potensi luar biasa untuk perbaikan dan regenerasi jaringan dan organ yang rusak dengan poliferasi yang luas.³⁴ *Amorphous calcium phosphates* (ACP) dan *hydroxyapatite* (HA) adalah sumber yang paling disukai untuk bahan perubah dalam rekayasa jaringan keras, karena berat bahan tersebut ringan dan sifat kimianya yang stabil. Selain itu, keduanya diterima sebagai bahan biomedis yang cocok karena sifat kimia dan strukturnya mirip dengan tulang. Dalam aplikasi klinis, HA digunakan dalam berbagai bentuk seperti pelapis, mengisi kesenjangan tulang atau terutama untuk obat tulang-terkait dalam bedah ortopedi dan perawatan gigi (*dental surgery*). *Hydroxyapatite* (HA) merupakan komponen utama dan unsur penting pada tulang normal dan gigi. *Hydroxyapatite* (HA) membentuk mineral tulang dan matriks gigi. Berdasarkan hasil penelitian Zairin N *et al* komposisi kristal HA pada tulang normal adalah $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6\text{H}_2\text{O}\cdot\text{NaHCO}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ (*sodium calcium hydrogen carbonate phosphate hydrate*).⁷⁰ Kristal HA pada gigi normal adalah $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.^{71,72}

Kemiripan kimia HA dengan tulang secara alami menyebabkan bahan tersebut sangat baik biokompatibilitas dan biomimikrinya. *Hydroxyapatite* (HA) juga digunakan sebagai teknik rekayasa jaringan, sebagai material *scaffold* dan bahan pelapis untuk beberapa logam *bio-inert* seperti titanium dan zirkonia.³⁴ Material *amorphous* adalah material yang susunan atomnya acak mirip seperti susunan atom benda cair, sedangkan kristalin mempunyai susunan atom yang

teratur dengan elemen terkecil yang terulang dalam tiga dimensi berbentuk kristal.⁷³ Jika HA berukuran nano (nano HA) digunakan sebagai bio material untuk aplikasi *mesenchymal stem cell* (MSC) akan didapat biomimikri supermikrostruktural dan osteokonduktif yang lebih baik. *Amorphous calcium phosphates* (ACP) juga mempunyai karakteristik biokompatibilitas dan osteokonduktif yang sangat baik. Di antara semua turunan ACP, HA dianggap sebagai komponen anorganik model tulang dan enamel gigi karena stabilitasnya tinggi dan nilai kelarutannya sedikit. Selanjutnya, ACP diperlakukan sebagai suatu prekursor apatite biologis selama pembentukan tulang karena nilai kelarutannya tinggi dan bioavailabilitasnya mudah. Seperti diketahui bahwa osteoblas dan sumsum tulang sel punca mesenchymal (BMSCs) memainkan peran paling penting dalam proses mineralisasi biologi. Namun, mekanisme yang tepat pada pengaruh lapisan ACP terhadap respon tulang masih belum jelas. Dalam studi *vitro* terlihat diferensiasi osteogenik yang lebih tinggi pada substrat ACP dibandingkan dengan kristal HA. Juga terjadi peningkatan adhesi osteoblas pada nano ACP dibandingkan dengan nanokristalin HA.³⁴ Ukuran *nanoamorphous calcium phosphates* (nano CP) dan nanokristalin HA adalah masing-masing ~13 dan ~ 31 nm. Dengan demikian ukuran HA sangat mempengaruhi adhesi dan proliferasi dari BMSCs dan sel osteosarcoma. Selain itu, efek ACP dan HA pada proliferasi, absorpsi, dan diferensiasi BMSCs telah dibuktikan, dengan ukuran partikel yang sama, yaitu ~ 20 nm. Beberapa temuan menarik yang pernah dilaporkan adalah: 1. terjadi hambatan adhesi BMSCs pada nanoACP dibandingkan dengan yang terjadi pada fase nano HA. 2. proliferasi BMSCs meningkat pada nano HA dibanding nano ACP. 3. lebih tinggi tingkat diferensiasi BMSCs untuk osteoblas pada fase kristal *calcium phosphate* (nano HA) dibanding *amorphous calcium phosphate* (nano ACP). Oleh karena itu, bahan ini menjadi bahan yang menjanjikan untuk aplikasi biomedis. Studi terhadap sifat biologi dan aplikasi potensi yang diturunkan MSC sumsum tulang memainkan peran penting dalam dunia kedokteran regeneratif dan terapi berbasis sel, yang mirip dengan *embryonic stem cells* (ESCs) tapi bebas dari persoalan etika dan risiko tumorigenesis.³⁴

Mekanisme yang mendasari rekayasa MSC yang dimediasi nanomaterial masih belum cukup jelas. Nanomaterial menawarkan janji signifikan dan layak untuk eksplorasi selanjutnya dalam upaya meningkatkan diferensiasi, pemeliharaan dan petunjuk biologis serta menyediakan petunjuk untuk diagnosis hMSCs.. Secara keseluruhan, nanomaterials memberikan peluang luar biasa dalam rekayasa sel punca dan obat-obatan regeneratif berbasis sel.³⁴

2.3 Stem Cell (Sel Punca)

Sel punca dianggap sebagai sel yang paling penting untuk melaksanakan fungsi regeneratif. Penelitian yang dilakukan tentang sel punca memberikan banyak pengetahuan tentang organisme yang berkembang dari sel tunggal dan sel yang sehat menggantikan sel yang rusak pada organisme yang dewasa. Sel punca juga memiliki kemampuan untuk secara terus menerus membelah membuat salinan sel yang persis sama dengan dirinya (regeneratif), serta dapat berkembang menghasilkan sel yang spesifik yang memberikan ciri beda atau memiliki efek diferensiasi jaringan.⁷⁴

2.3.1 Jenis-Jenis Sel Punca

2.3.1.1 Early Embryonic Stem Cell

Tahap pertama dalam perkembangan manusia terjadi saat fertilisasi (bertemuinya sperma dengan sel telur) menghasilkan sel punca baru yang disebut embrio. Sel punca ini sifatnya totipoten yang mempunyai kemampuan berdiferensiasi menjadi semua jenis sel dalam tubuh manusia.⁷⁵

2.3.1.2 Blastocis Embryonic Stem Cell

Lima hari setelah fertilisasi embrio ini akan membentuk struktur bola berongga yang disebut blastula. Embrio pada tahapan blastula ini memiliki 2 jenis sel : tropoblas yang memiliki permukaan luar yang nantinya akan membentuk plasenta dan kelompok bagian dalam yang akan berkembang menjadi organisme dewasa. Sel punca embrionik ini sifatnya pluripoten yang artinya bisa berdiferensiasi menjadi 3 lapisan sel yaitu *ectoderm*, *mesoderm* dan *endoderm*. Sel punca embrionik masih kontroversial karena berbenturan dengan etika dan hukum.^{48,75}

2.3.1.3 *Fetal Stem Cell*

Setelah delapan minggu perkembangan, embrio ini disebut fetus atau janin. Pada saat ini maka embrionya sudah memiliki bentuk menyerupai manusia. Sel punca pada fetus atau janin ini sangat berperan dalam tahapan awal perkembangan jaringan sebelum kelahiran. Seperti sel punca embrio, sel punca fetal sifatnya pluripoten.⁷⁵

2.3.1.4 *Umbilical Cord Stem Cell*

Tali pusat ini adalah tali yang berfungsi memberikan penghidupan karena fungsinya mengangkut sari makanan dan darah yang kaya akan oksigen dari plasenta ke janin. Darah dari tali pusat memiliki sel punca yang secara genetik sama dengan bayi yang baru lahir. Sel punca tali pusat ini sifatnya multipotent yang artinya sel ini bisa berdiferensiasi ke berbagai macam tipe sel. Tali pusat ini dapat disimpan secara *cryogenically* yang akan digunakan untuk tujuan terapi dimasa yang akan datang.⁷⁵

2.3.1.5 *Adult (Postnatal) Stem Cell*

Istilah *adult* kurang tepat karena bayi dan anak-anak juga mempunyai sel punca. Sehingga namanya diganti dengan *post natal stem cell* (sel punca post natal). Sel punca terdapat dalam jaringan yang telah berkembang yang ditujukan untuk pertumbuhan dan menjaga kualitas kehidupan sepanjang hayat. Sel ini sifatnya multipotent. Sel punca orang dewasa ini agaknya mendorong pertumbuhan sel di tempat sel tersebut berada. Beberapa penelitian pada tahun terakhir ini menyebutkan bahwa kemungkinan itu ada karena sel punca itu memiliki sifat *plasticity* sehingga besar kemungkinannya untuk mendorong sel lain di mana sel punca itu berada dan ikut berkembang meskipun dengan bentuk jaringan yang berbeda.^{48,75}

Sel punca post natal ditemukan juga di jaringan tubuh⁷⁶ termasuk jaringan gigi. Sekarang ini telah ada 4 jenis sel punca gigi pada manusia yang telah diisolasi dan diberi ciri masing-masing: 1. *dental pulp stem cell* (DPSCs)⁵¹. 2. *stem cell* dari sel pulpa gigi disidui (SHED).⁵² 3. *stem cell* dari *apical papillae* (SCAP)⁷⁷ dan 4. *stem cell* pada jaringan ligamen periodontal (PDLSCs)⁷⁸. Semua sel punca ini diambil dari gigi permanen kecuali SHED.

2.3.2 *Sel Progenitor*

Sel ini merupakan jenis sel *intermediate* atau sel cadangan sebelum sel tersebut berdiferensiasi ke sel yang sesungguhnya. Sel *intermediate* ini dinamakan dengan precursor atau progenitor. Sel tersebut ditemukan di zona kaya akan sel dan inti pulpa serta dekat sekali dengan pembuluh darah, yang pertama kali membelah saat terjadi cedera.⁷⁹ Sel ini dipercaya akan tumbuh pada saat pertumbuhan sel-sel menuju sel permanen. Secara umum sel-sel yang tidak berdiferensiasi dikategorikan sebagai sel progenitor sampai akhirnya sel-sel ini sampai pada tahap yang terdiferensiasi dan ditetapkan sebagai sel punca.⁷⁵

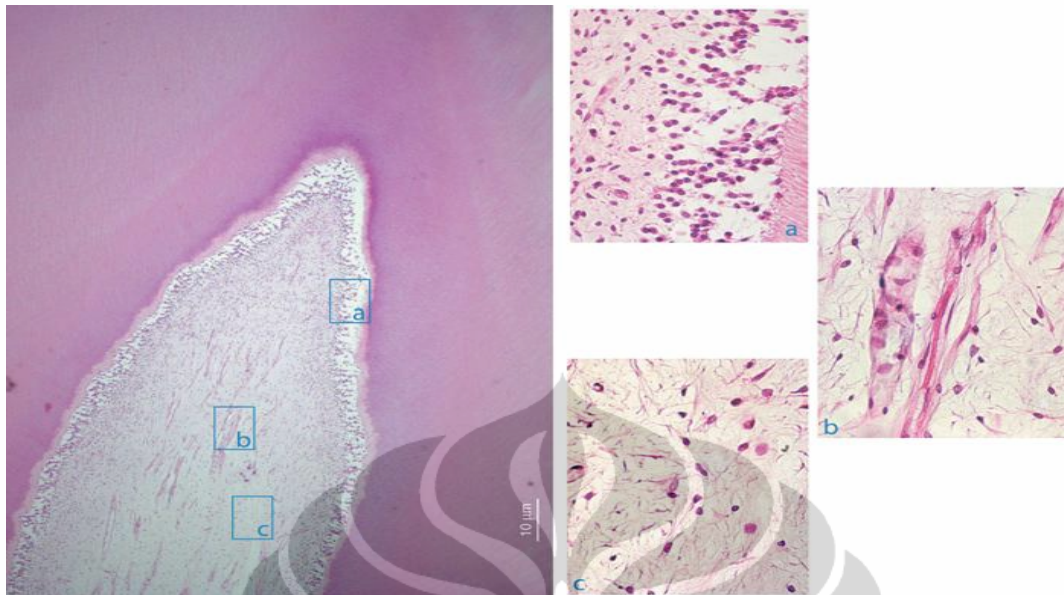
2.3.3 *Dental Pulp Stem Cells (DPSCs)*

Pulpa bagian luar dipisahkan dari dentin oleh odontoblas dan oleh sel *Ho`hl's subodontoblastic* (pra-odontoblast).⁸⁰ Berdekatan dengan lapisan ini ditemukan adanya pulpa kaya serat kolagen dan populasi selnya kurang. Kemudian di lapisan yang lebih dalam ditemukan sel-sel progenitor dan sel terdiferensiasi, beberapa diantaranya dianggap sebagai sel punca.⁸¹ Lapisan yang paling akhir atau yang terdalam adalah inti dari pulpa, daerah ini meliputi pleksus pembuluh darah dan saraf. Penemuan terbaru menyebutkan bahwa sel punca pulpa gigi terdapat pada lapisan ini.^{51,82} (Gambar 2.3).

Dental pulp stem cells (DPSCs) diisolasikan untuk pertama kali pada tahun 2000 oleh Gronthos *et al* didasarkan kemampuannya untuk meregenerasi suatu *dentin pulp-like complex* yang tersusun atas matrik-matrik mineral *tubules* yang dihubungkan dengan odontoblas dan jaringan fibrous lainnya yang terdapat dalam pembuluh darah yang disusun sedemikian rupa sehingga menyerupai *dentin pulp complex* yang ditemukan pada gigi normal manusia.⁵¹

Diketahui bahwa sel-sel ini juga memiliki kapasitas proliferasi, memiliki kemampuan memperbaiki diri dan memiliki tingkat diferensiasi yang tinggi. Sub populasi DPSCs yang telah diseleksi yang disebut stromal bone producing dental pulp stem cells (SBP-DPSCs).⁸³

Sel ini adalah sel multipoten yang bisa memberikan tambahan pada beberapa sel dan jaringan lain termasuk *osteoblast*, *adipocytes*, *myoblast*, *endotheliocytes* dan *melanocyds* dan sel progenitor neural yang nantinya dianggap sebagai asal muasal sel.⁸³

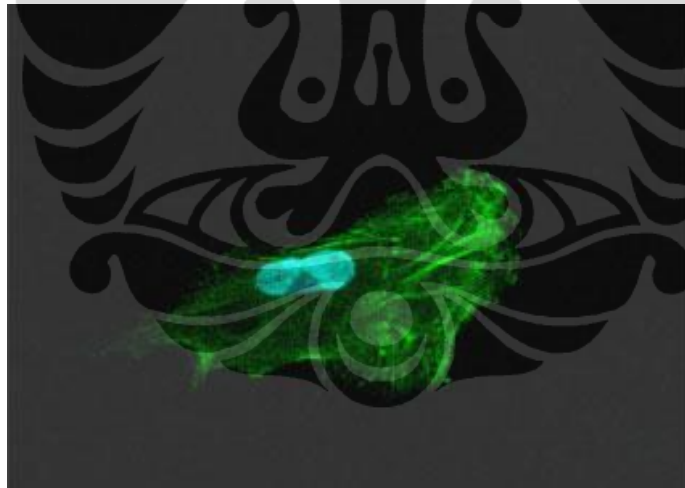


Gambar 2.3. Sel progenitor yang terdapat dalam pulpa gigi yang sudah mengalami maturasi: (a) sel mesensimal yang *undifferentiated* yang disebut sub-odontoblas berada di lapisan kaya sel dekat dengan pasca-mitosis odontoblas; (b) populasi sel perivascular yang berhubungan dengan pembuluh darah pulpa; (c) notch-2 sel populasi positif dalam pusat pulpa stroma.⁸⁴

Beberapa penelitian menunjukkan kalau DPSCs yang merupakan sel stromal multipoten memiliki kemampuan proliferasi yang luas dan dapat diaplikasikan ke berbagai *scaffolds* sehingga memiliki jangkauan hidup yang tahan lama yang memiliki kapasitas immunosupresi (memberikan kemampuan imunitas) sehingga ia mampu menghasilkan jaringan bermineral yang sama dengan dentin.^{85,86} DPSCs memiliki pola penggambaran yang umum yang sama dengan odontoblas asli, tetapi bukti tentang kemampuannya menghasilkan dentin belum terbukti.⁷⁵ Disebutkan pula bahwa sel-sel ini mampu termineralisasi dan membentuk jaringan ektopik, mirip dengan dentin⁵¹, jika dicangkokkan secara *in vivo* atau ketika ditempatkan pada permukaan dentin manusia secara *in vivo*. Sel ini di bawah rangsangan tertentu akan berdiferensiasi menjadi tipe sel, termasuk neuron, sel lemak dan mengalami mineralisasi tulang atau dentin bila dicangkokkan secara *in vivo*.⁸⁷

Karakteristik seluler DPSCs telah dibandingkan dengan sel punca sumsum tulang. Populasi sel punca pulpa gigi dan sumsum tulang mengekspresikan penanda sel punca putatif yang serupa, termasuk CD44, CD106, CD146, 3G5, dan STRO-1. Pada Gambar 2.4. menunjukkan DPSC yang diseleksi

dengan C-Kit1, CD341 dan STRO-1.⁴⁹ Disebutkan pula bahwa protein matriks yang terkait dengan pembentukan jaringan mineral adalah alkali fosfatase, osteokalsin, dan osteopontin. Pola ekspresi serupa juga dicatat untuk sel punca yang diisolasi dari ligamen periodontal. Berbeda dengan sel punca sumsum tulang, DPSCs telah menunjukkan tingkat proliferasi 30% lebih tinggi dan potensi pertumbuhan yang lebih tinggi.⁸⁸ Tingkat proliferasi yang lebih tinggi ini telah dikaitkan dengan peningkatan ekspresi sel pulpa dari peningkatan mediator sel spesifik, yaitu cyclin kinase 6 dan faktor pertumbuhan seperti insulin.⁸⁹ Transplantasi DPSCs dalam sistem kekebalan tikus menghasilkan pembentukan jaringan seperti dentin, sedangkan sel punca tulang sumsum yang menghasilkan jaringan yang menyerupai tulang lamellar. Hal ini menunjukkan bahwa mekanisme pengaturan yang berbeda secara inheren ada dalam dua populasi sel punca, dan dibuktikan oleh peningkatan sintesis protein dentin spesifik selama pembentukan jaringan dentin pada sel transplantasi.⁸⁷



Gambar 2.4. Cytoarchitecture dari Sel Punca Gigi Permanen (DPSC) yang diseleksi dengan C-Kit1, CD341 dan STRO-1. Diamati dari Mikroskop *Confocal* dengan Pembesaran 400x. Fluoresensi Warna Hijau adalah sel *cytoskeleton*⁴⁹

Dental pulp stem cells (DPSCs) yang diisolasi dari gigi yang mengandung bakteri yang mengalami jejas bagian mahkotanya diketahui bahwa sel ini memiliki kemampuan proliferasi yang luar biasa dan memiliki potensi untuk menghasilkan dentin gigi secara *in vivo*. Akan tetapi karakteristik atau penandaan

ini tidak diperuntukkan untuk kultur dalam jangka waktu yang lama karena akan mengalami perubahan gen.⁹⁰

2.3.4 *Stem Cells Human Exfoliated Deciduous (SHED)*

Sel punca post natal diisolasi dari berbagai jaringan termasuk sumsum tulang, otak, kulit, folikel rambut, otot rangka, dan pulpa gigi. Sel punca post natal memiliki kekenyalan yang luar biasa. Sel punca saraf mungkin berkontribusi untuk darah dan otot rangka, dan sel punca sumsum tulang mungkin berkontribusi untuk otot, hati, dan jaringan saraf.

Transisi dari gigi disidui ke gigi permanen orang dewasa adalah proses yang sangat unik dan dinamis di mana perkembangan dan erupsi gigi permanen berhubungan dengan resorpsi dari akar gigi disidui. Diperlukan waktu lebih dari 7 tahun pada manusia untuk menyelesaikan penggantian dari 20 gigi disidui. Penelitian yang dilakukan terhadap SEHD yang berasal dari sisa pulpa gigi disidui yang mengalami resorpsi, ditemukan bahwa sisa pulpa gigi berasal dari gigi disidui ternyata mengandung populasi sel punca multipoten. Penelitian ini menunjukkan bahwa gigi yg secara alami akan tanggal mirip dengan tali pusat, mengandung sel-sel induk yang menawarkan sumber daya sel punca unik dan potensial untuk penerapan uji klinis. Sel punca ini dapat diisolasi dan dikembangkan secara *ex vivo*, dengan cara menyediakan populasi sel punca yang unik dan dapat diperoleh dari sumber jaringan yang tidak diharapkan. Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa jaringan pulpa dari gigi dewasa mengandung populasi DPSCs yang dapat berdiferensiasi menjadi odontoblas dan adiposis sebaik ekspresi dari nestin dan *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) dan membentuk *dentin-pulp like complex* setelah transplantasi *in vivo*. Gigi disidui memiliki perbedaan signifikan dengan gigi permanen dengan memperhatikan pada faktor proses perkembangannya, struktur jaringannya, dan fungsinya. Oleh karena itu SHED berbeda dengan DPSCs dengan memperhatikan faktor rata-rata proliferasi yang tinggi, peningkatan ganda populasi sel, pembentukan kelompok sel, kapasitas osteoinduktif *in vivo*, dan kegagalan untuk menyusun kembali *dentin-pulp like complex*. *Stem cells human exfoliated deciduous* (SHED) tampak mewakili populasi sel punca multipoten yang mungkin lebih dewasa dibandingkan populasi stroma sel punca post natal yang telah lebih dulu diamati.⁵²

Mekanisme yang mengontrol pertumbuhan dan pergantian gigi sebagian besar belum diketahui, khususnya mengenai peranan komponen kraniofacial termasuk tulang dan jaringan lunak disekitar gigi dalam proses perkembangan gigi. *Stem cells human exfoliated deciduous* (SHED) menunjukkan kapasitas yang kuat untuk merangsang sel penerima yang menengahi pembentukan tulang secara *in vivo*. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, SHED tidak dapat berdiferensiasi secara langsung menjadi osteoblas, akan tetapi merangsang pembentukan tulang baru melalui pembentukan suatu *template* osteoinduktif untuk mendapatkan sel osteogenik pada host murin. Hal ini menunjukkan bahwa gigi disidui tidak hanya menyediakan petunjuk tentang erupsi gigi permanen, tetapi juga terlibat pada pembentukan tulang selama erupsi gigi permanen. *Stem cells human exfoliated deciduous* (SHED) terekspresi oleh neuronal dan sel glia yang mungkin berhubungan dengan sel saraf pulpa gigi. Sel neural crest memainkan peranan penting pada pertumbuhan embrio dan memberika peningkatan variasi tipe sel seperti sel saraf, sel pigmen, otot polos, kartilago kraniofacial dan tulang. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa BMSSCs juga mampu berdiferensiasi menjadi *neural-like cell* setelah transplantasi *in vivo*. Sel pulpa gigi diketahui memproduksi faktor-faktor neurotropik dan juga menolong motoneuron setelah cedera tulang belakang. Hal ini menunjukkan bukti-bukti bahwa SHED mewakili suatu populasi sel punca post natal yang mampu berproliferasi secara luas dan berdiferensiasi multipoten. Oleh karena gigi disidui mungkin merupakan sumber yang ideal untuk memperbaiki kerusakan struktur sel punca gigi, merangsang regenerasi tulang, dan memungkinkan perawatan cedera jaringan saraf atau penyakit degeneratif. Namun eksistensi SHED yang signifikan secara biologis tetap harus dijelaskan. Studi ini menyediakan deskripsi suatu populasi sel punca yang terletak pada gigi disidui manusia yang mengalami pengelupasan dan pembentukan dasar untuk studi lebih lanjut untuk menjelaskan keberhasilan dari penggunaan SHED pada terapi berbasis seluler.⁵¹ Diketahui pula bahwa sisa mahkota gigi disidui yang *exfoliated* berisikan sisa-sisa pulpa yang hidup dan jaringan ini terdiri dari pulpa gigi normal termasuk jaringan ikat, pembuluh darah, dan odontoblas.

Stem cells human exfoliated deciduous (SHED) diisolasikan pertama kali tahun 2003 oleh Miura *et al* yang mengatakan bahwa SHED ini akan bisa berdiferensiasi menjadi berbagai macam jenis sel dengan jangkauan yang lebih besar daripada DPSCs, yang mana sel sel yang berkembang ini meliputi sel neural, apocytes, sel mirip osteoblas dan sel menyerupai odontoblas. Tugas utama dari sel sel ini ialah membentuk jaringan berkomposisi mineral yang nantinya akan kita gunakan untuk merangsang regenerasi tulang. SHED berbeda dengan DPSCs, karena SHED ini sifatnya lebih dewasa mampu berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel, yg lebih besar dari batas DPSCs⁵². Kegunaan SHED ini mungkin akan jauh lebih berguna dibanding sel punca gigi permanen karena kemampuan proliferasinya lebih besar dibandingkan dengan yang ada pada gigi permanen dan diambilkan dari jaringan yang sudah akan dibuang dan mudah dijangkau.⁷⁵ Studi yang dilakukan saat ini memperkenalkan mekanisme yang mendasari diferensiasi dari SHED menjadi endotelium fungsional, dan menegaskan aktivitas sebelumnya yang menunjukkan diferensiasi dari SHED ke arah odontoblas. Dengan demikian SHED mengandung multi sel punca ampuh. SHED diketahui sebagai populasi yang sangat proliferaatif, *clonogenic* sel mampu membedakan menjadi berbagai jenis sel termasuk sel saraf, sel lemak, dan odontoblas. Setelah di transplantasi secara *in vivo*, SHED dapat menginduksi pembentukan tulang, menghasilkan dentin, dan bertahan di otak tikus bersama dengan ekspresi penanda saraf. SHED tidak hanya berasal dari jaringan sangat mudah diperoleh sumbernya tetapi juga mampu memberikan sel cukup untuk potensial pada tiap aplikasi klinis.⁵²

2.3.5 Isolasi dan Identifikasi Sel Punca dari Sel Pulpa Gigi

Seperti diketahui bahwa jaringan pulpa merupakan salah satu sumber sel punca mesensimal⁵⁰ dan sel punca ini mempunyai kapasitas untuk berdiferensiasi ke galur odontoblas maupun galur fibroblas⁵³, maka penelitian *in vitro* diperlukan untuk mengkarakterisasi keberadaannya. Hasil karakterisasi *in vitro* tersebut selanjutnya dapat dikembangkan untuk optimalisasi dan mengevaluasi berbagai material bioaktif yang diperlukan dalam proses rekayasa jaringan termasuk jaringan pulpa. Tahap kritis dari prosedur rekayasa jaringan pulpa adalah ketika mengisolasi sel yang berpotensi untuk berdiferensiasi ke arah galur *odontoblas-*

like cells. Dari beberapa eksperimen *in vitro* dapat diketahui bahwa sel punca asal pulpa dapat diisolasi dari pulpa gigi molar impaksi khususnya dari individu muda berusia 14-29 tahun.^{50, 51} Sel punca dapat pula diisolasi dari pulpa gigi disidui, namun karakteristik fenotipnya berbeda. Sel punca asal gigi disidui lebih cepat berproliferasi, dan diferensiasi *in vivo* lebih cenderung ke arah osteogenesis, serta tidak mempunyai kapasitas untuk merekonstruksi *pulp-dentin complex*.⁵² Setelah jaringan pulpa diseparasi dari gigi kemudian diisolasi dan diinkubasi/dikultur dalam inkubator CO₂ dengan atmosfer yang terdiri dari 95% O₂ dan 5% CO₂ pada temperatur 37°C.^{91, 92} Kepadatan sel dapat diamati dengan menggunakan mikroskop *inverted*. Apabila telah *confluent* (padat) maka sel harus dipanen dan dilakukan penanaman kembali (*subculture*). Secara empiris, *subculture* lebih baik dilakukan sebanyak 3-5 kali sebelum sel digunakan untuk keperluan eksperimen.⁹³ Bila diasumsikan sel telah siap untuk diperlakukan sesuai dengan rancangan eksperimen, maka tahapan kerja berikutnya, adalah menghitung jumlah sel yang akan dimasukkan ke dalam *tissue culture plate*.⁹⁴

Untuk memastikan apakah di dalam populasi sel yang dikultur terdapat *undifferentiated cell*, maka identifikasi ini dilakukan dengan cara mendeteksi penanda (*marker*) fenotip sel punca, STRO-1, dengan menggunakan teknik imunositokimia. Sel yang telah dibiak selama waktu tertentu, dipanen dan dilepaskan dari dasar *plate* dengan menggunakan larutan Trypsin-EDTA. Setelah dilakukan penghitungan sel kemudian sel dimasukkan ke dalam *plate* baru dan dicampur dengan antibodi monoklonal anti-STRO-1. Kemudian ditambahkan antibodi sekunder (anti-IgG) yang berlabel *horseradish peroxidase* (HRP). Setelah dilakukan penambahan substrat tetramethyl benzidine/ hydrogen peroxide (TMB/H₂O₂) maka sel dengan fenotip STRO-1 positif diidentifikasi sebagai sel punca mesensimal yang berasal dari jaringan pulpa.⁵¹

Dari berbagai eksperimen *in vitro*.⁹⁵ dapat diketahui bahwa diketahui bahwa selain *growth factor*, matriks ekstraseluler (*scaffold*) juga berperan dalam proses proliferasi dan diferensiasi sel. Dalam konteks ini, pelepasan molekul bioaktif dari matriks ekstraseluler merupakan faktor penting dalam pembentukan organisasi jaringan, sehingga dalam eksperimen rekayasa jaringan pulpa, *relationships* antara *growth factor* dan matriks ekstraseluler harus dirancang dan

dianalisis secara cermat. Misalnya, pemilihan polimer yang akan digunakan sebagai matriks ekstraseluler, tidak hanya berfungsi sebagai *carrier growth factor*, tapi juga berperan dalam mengontrol pelepasan molekul bioaktif tersebut agar dapat masuk ke dalam kompartemen sel yang akan diinduksinya.⁵⁰

2.4 Marker Fenotip Odontoblas

2.4.1 Odontoblas

Kompleks pulpa dentin memiliki potensi regeneratif alami utama dalam pembentukan dentin tersier. Odontoblas mungkin bertahan terhadap cedera ringan, seperti atrisi atau karies awal, dan sekresi matrik dentin reaksioner. Namun, pada trauma dengan intensitas yang lebih besar, seperti karies tingkat lanjut atau prosedur restoratif, dapat menyebabkan kematian odontoblas. Cedera pulpa mengakibatkan kematian dan inflamasi sel. Derajat inflamasinya sebanding dengan intensitas dan keparahan jaringan yang rusak. Cedera ringan seperti karies awal, preparasi kavitas yang dangkal atau trauma ringan mengakibatkan inflamasi yang sedikit atau tidak sama sekali pada pulpa. Karies dalam, prosedur operatif yang luas atau iritasi yang persisten dapat menyebabkan perubahan inflamasi lebih parah. Respon pulpa terhadap cedera berkisar dari inflamasi sementara (pulpitis reversibel) dan pulpitis irreversibel sampai dengan nekrosis pulpa total. Perubahan ini sering muncul tanpa keluhan.⁷⁹ Secara patologis pulpitis (inflamasi pulpa) dibagi dua yaitu pulpitis reversibel dan irreversible.⁹⁶

Odontoblas adalah sel pulpa yang paling khas. Odontoblas ini membentuk lapisan tunggal di periferinya dan mensintesis matrik yang kemudian termineralisasi dan menjadi dentin. Di bagian mahkota ruang pulpa yang jumlahnya paling banyak dan berbentuk kubus serta relatif besar sekitar 45.000 dan 65.000/mm³. Di daerah serviks dan bagian tengah-tengah akar lebih sedikit dan bentuknya lebih gepeng (skuamosa). Odontoblas adalah sel akhir yang tidak mengalami pembelahan sel. Odontoblas masih dapat bertahan terhadap cedera ringan, seperti atrisi atau karies awal, dan sekresi matrik dentin reaksioner. Pada keadaan ini odontoblas dapat membentuk odontoblas baru menggantikan odontoblas lama yang hilang akibat cedera. Tumbuhnya odontoblas baru terjadi jika zona kaya akan sel sudah ada preodontoblas. Preodontoblas adalah sel yang telah terdiferensiasi sebagian sepanjang garis odontoblas. Preodontoblas ini akan

bermigrasi ke tempat terjadinya cedera dan melanjutkan diferensiasinya pada tempat tersebut.³⁸ Proses pergantian di atas belum diketahui faktor penyebabnya, diperkirakan faktor pertumbuhan *bone morphogenic protein* (BMP) dan *transforming growth factor* β (TGF β) berkombinasi dengan jaringan lain mengawali perubahan tersebut.⁷⁹ Untuk merespon dan menstimulasi permukaan pulpa dentin, odontoblas baru dikumpulkan dan didiferensiasikan pada lokasi cedera untuk mensintesis dentin reparatif tubular yang terhubung dengan osteodentin. Dentin reparatif ini akan menyediakan sebuah “jembatan” jaringan termineralisasi dengan segera di bawah jaringan yang mengalami kerusakan secara meluas, sebagai cara untuk menyelamatkan vitalitas pulpa.

Dentin reparatif dikenal dengan dentin iregular atau dentin tersier, disusun oleh pulpa sebagai suatu reaksi terhadap rangsangan yang membahayakan. Rangsangan tersebut berupa karies, prosedur operatif, bahan restoratif, abrasi atau trauma yang dapat mencederahi pulpa. Dentin reparatif ditumpuk didaerah yang mengalami cedera. Kecepatan, kualitas dan kuantitas dentin reparatif yang ditumpuk tergantung keparahan dan lamanya cedera yang dialami odontoblas dan biasanya dihasilkan oleh odontoblas baru.⁹⁷ Kompleks pulpa dentin memiliki potensi regeneratif alami utama dalam pembentukan dentin reparatif.. Pada trauma dengan intensitas yang lebih besar, seperti karies tingkat lanjut atau prosedur restoratif, dapat menyebabkan kematian odontoblas.

Pada jaringan sehat, progenitor atau sel punca biasanya bertahan dalam keadaan tidak bergerak (diam), dikarenakan pengaruh dari lingkungan dimana mereka ditemukan. Cedera mengawali kematian dari odontoblas pasca mitosis dalam matrik dentin. Identifikasi sel progenitor dapat diamati dengan baik secara *in situ* mengikuti aktivasinya dalam merespon luka. Penelitian yang dilakukan selama tahun 1980-an mengindikasikan bahwa penggantian odontoblas, disintesis oleh dentin reparatif, berasal dari sel-sel mesensimal. Penandaan sel dengan timidin tritium, pada kasus *pulpcapping*, menunjukkan proliferasi awal sel-sel di daerah pulpa dalam di bawah tempat cedera, diikuti oleh migrasi yang tampak dari sel-sel ini ke situs luka dimana mereka mengalami proliferasi lebih lanjut dan diferensiasi sel-sel seperti odontoblas fungsional. Di masa yang akan datang terapi regeneratif gigi didasarkan pada eksploitasi sel progenitor pada pulpa gigi. Dapat

disimpulkan bahwa terdapat kesempatan untuk membawa restorasi kedokteran gigi ke era yang baru, dengan memanfaatkan aktivitas biologis dari jaringan gigi untuk memfasilitasi penyembuhan luka dan regenerasi jaringan.

Formasi matriks dentin oleh sel galur odontoblas selama proses mineralisasi dapat diidentifikasi dan dikwantifikasi pada level protein atau ekspresi gen.⁴¹ Beberapa protein yang disekresikan oleh sel ini, seperti *alkaline phosphatase* (ALP), kolagen tipe-1 (Col-1), *dentin matrix protein-1* (DMP-1), *dentin sialophospho-protein* (DSPP), *osteonectin* (ON), dan *osteocalcin* (OC), sering dijadikan biomarker untuk menganalisis aktivitas odontoblas.^{17, 42} Ekspresi dari DMP-1 dan DSPP pada odontoblas fungsional di tahap awal dari odontogenesis sesuai dengan hipotesis yang menyatakan bahwa DMP-1 dan DSPP berperan dalam mineralisasi dentin.⁹⁸

2.4.2 Pengamatan Proliferasi dan Viabilitas Sel

Proliferasi sel adalah pertumbuhan atau reproduksi sel yang sama secara multiplikasi. Pengamatan proliferasi sel dapat dilakukan dengan uji viabilitas sel punca pulpa gigi dengan metoda MTT banyak digunakan untuk mempelajari viabilitas sel. Metoda ini dapat mengukur aktivitas metabolisme dari pertumbuhan sel dan sangat berguna untuk menentukan pertumbuhan sel sebagai respon terhadap bahan uji. Uji viabilitas ini menggunakan *Alamar Blue*TM dan *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay*.⁹⁹ Viabilitas sel adalah kemungkinan sel untuk bertahan hidup.^{100, 101} Uji viabilitas juga dapat digunakan untuk menentukan sitotoksitas suatu bahan atau obat yang dapat merangsang atau menghambat pertumbuhan sel.¹⁰² Viabilitas dinyatakan dengan cara membandingkan nilai absorbansi kelompok perlakuan yang dipapar bahan uji dengan nilai absorbansi kelompok kontrol dikalikan 100%. Rumus viabilitas sel (In Vitro Technologies)¹⁰³ sebagai berikut:

$$\text{Viabilitas Sel (\% dari Kontrol)} = \frac{\text{Nilai absorbansi kelompok Perlakuan}}{\text{Nilai absorbansi kelompok Kontrol}} \times 100 \%$$

Bahan atau obat yang dipaparkan tersebut dikatakan toksik apabila prosentasinya dibawah 100%.

2.4.3 Pengamatan Diferensiasi Sel

Dari literatur dapat diketahui, sel punca yang berasal dari jaringan pulpa memiliki potensi untuk berdiferensiasi, baik ke arah galur sel odontoblas (*odontoblas-like cell*) maupun galur fibroblast.^{53, 98} Dengan demikian, untuk mendapatkan galur sel odontoblas, maka deposit kalsium, yang mencirikan maturasi *odontoblas-like cell*, dapat diinduksi dengan menambahkan ke dalam medium kultur (DMEM + 10% FBS/FCS + penisillin/streptomisin) suplemen berikut: dexamethason (10nM), ascorbid acid (50µg/ul), dan glycerophosphate (10mM) atau molekul bioaktif (100-200 ng/ml).¹⁰⁴ Molekul bioaktif adalah *growth factor* atau *signaling molecule* yang berperan dalam meregulasi proliferasi dan diferensiasi sel punca ke arah galur sel yang diperlukan dalam pembentukan jaringan pulpa “baru”. Formasi matriks dentin oleh sel galur odontoblas selama proses mineralisasi dapat diidentifikasi dan dikwantifikasi pada level protein.⁴¹ Beberapa protein yang disekresikan oleh sel ini, antara lain *alkaline phosphatase* (ALP), kolagen tipe-1 (Col-1), *dentin matrix protein-1* (DMP-1), *dentin sialophospho-protein* (DSPP), *osteonectin* (ON), dan *osteocalcin* (OC), sering dijadikan biomarker untuk menganalisis aktivitas odontoblas.⁴²

2.4.4 Alkaline Phosphatase (ALP)

Alkaline phosphatase (ALP) merupakan enzim hidrofilik yang bekerja dengan membebaskan fosfat organik dari ester fosfat. Distribusi dari enzim ini menunjukkan fungsi biologis yang penting terutama pada jaringan yang mengalami mineralisasi, walaupun perannya belum sepenuhnya diketahui. Aktivitas enzim ini berhubungan juga dengan pembentukan jaringan keras gigi dan tulang sehingga ALP digunakan secara luas sebagai penanda sel-sel turunan jaringan kalsifikasi antara lain odontoblas.

Alkaline phosphatase (ALP) dapat melepaskan ester fosforik dan ion fosfat dalam keadaan bebas dan berreaksi dengan ion kalsium dari aliran darah dan membentuk kalsium fosfat di matrik organik yang disebut sebagai unit molekuler hidroksiapatit. Terdapat empat ionenzim ALP yang telah diidentifikasi pada manusia yaitu: non spesifik (hati, tulang, ginjal), intestin, plasenta dan sel bakteri ALP.^{43, 44} *Alkaline phosphatase* (ALP) yang dihasilkan oleh odontoblas adalah tipe non spesifik.

Perubahan aktivitas ALP pernah diteliti pada kultur sel pulpa dan ditemukan bahwa aktivitas ALP tertinggi pada fase proliferasi dan fase diferensiasi. Penelitian ini menunjukkan bahwa aktivitas ALP dapat digunakan sebagai marker dalam diferensiasi awal dari odontoblas. *Alkaline phosphatase* (ALP) dalam pulpa terdapat di odontoblas dan lapisan sub odontoblas. Enzim ini berperan dalam mineralisasi dentin.⁴³ Penelitian lain pernah dilakukan terhadap ALP di dalam sel pulpa manusia, plasenta dan tulang. Sel pulpa yang berasal dari gigi molar tiga yang diekstraksi karena indikasi perawatan ortodonsia. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sel pulpa memperlihatkan aktivitas ALP tertinggi dibanding dengan tulang dan plasenta. Lokasi spesifik dari enzim ALP berada dilapisan sub odontoblas pulpa manusia dan menunjukkan bahwa enzim ini berperan di dalam transportasi ion-ion terutama fosfat.^{43, 44, 105}

2.4.5 Dentin Sialoposphoprotein (DSPP)

Dentin sialoposphoprotein (DSPP) adalah suatu sialic acid yang kaya glycoprotein yang dihasilkan oleh odontoblas.⁴⁵ Protein ini mirip seperti tiga sialoprotein tulang yaitu: osteopontin, sialoprotein tulang dan bone acidic glycoprotein-75. DSPP kaya asam aspartat, asam glutamat, glycine dan serine dengan berat molekul ± 53.000 , dan mempunyai terminal NH₂ tiga asam amino yang dapat diidentifikasi pada osteopontin manusia dan sama dengan osteopontin tikus dan bone acidic glycoprotein-75. Berdasarkan observasi tersebut diperkirakan bahwa DSPP merupakan famili yang sama dengan sialoprotein tulang.^{45, 106}

Salah satu sifat sialoprotein tulang adalah kemampuannya untuk memacu perlekatan dan penyebaran sel-sel secara *in vitro* melalui interaksi sekuen Arg-Gly-asp (RGD) dengan protein-protein membran sel yang disebut integrins. Penelitian Butler dengan menggunakan antibodi *polyclonal* dan prosedur *immunostaining* menunjukkan bahwa DSPP diekspresikan oleh odontoblas yang dimulai dengan pembentukan predentin. Odontoblas matang juga immunopositif dan pewarnaan jelas terlihat berada dalam tonjol odontoblas. Setelah Butler mengobservasi ekspresi DSPP oleh sel-sel pulpa yang aktif pada dentinogenesis. Hal ini dihubungkan dengan ekspresi fenotip menjadi sel-sel odontoblas yang matang.^{45, 106}

Dari uraian tersebut di atas dapat disimpulkan bahwa DSPP disekresikan secara selektif oleh odontoblas dan olah sel-sel pulpa yang berkaitan. Kemungkinan sekresi ke dalam dentin melalui tonjol odontoblas dengan alur sekresi yang sama dengan posforin. Walaupun fungsi DSPP belum diketahui jelas, DSPP terbukti merupakan *marker* untuk identifikasi dan mempelajari diferensiasi sel-sel dentin-pulpa kompleks.^{106, 107}

2.4.6 Dentin Matrix Protein 1 (DMP-1)

Dentin adalah substansi mirip tulang yang terdiri dari matriks ekstraseluler termineralisasi yang disekresi oleh odontoblas. Komponen utama dari matriks ekstraseluler adalah kolagen, sedangkan 10%nya adalah zat non kolagen yang terutama terdiri dari asam *phosphoprotein*. Ketika komponen kolagen sebagian besar mengendapkan kristal hidroksiapatit, komponen non kolagen terlibat dalam inisiasi mineralisasi dan laju pertumbuhan apatit. Komponen protein non kolagen pada matriks dentin saat ini mulai diidentifikasi dan ditandai, terutama pada proses kloning DNA.¹⁰⁸

Salah satu asam phosphoprotein yang teridentifikasi dengan bantuan teknik DNA rekombinan dikenal sebagai AG1, yang kemudian dinamai sebagai matriks dentin protein 1 atau DMP1. Klon dari cDNA DMP1 diperoleh dengan melakukan *screening* cDNA tikus yang disiapkan dari mRNA odontoblas. Klon dikodekan sebagai rantai polipeptida yang terdiri dari 16 residu asam amino rangkaian sinyal dan 473 residu protein dewasa dengan estimasi Mr 53.000. Keasaman protein tersebut diduga berasal dr residu Glu dan Asp dalam jumlah besar, dengan sifat *phosphoprotein* yang muncul >100 residu Ser yang membentuk tempat untuk fosforilasi oleh kasein kinase I dan II. Kehadiran beberapa N-glikosilasi O-glikosilasi menunjukkan bahwa DMP1 adalah glikoprotein dan prediksi ini didukung oleh 61.000 Mr dari molekul immunopresipat 32P-label. Transkrip gen DMP1 awalnya terdeteksi melalui hibridisasi pada odontoblas, namun hibridisasi ini juga dapat terlihat pada jaringan mineral lainnya, termasuk tulang dan sementum.¹⁰⁹

Homolog gen DMP1 atau transkrip telah dikloningkan pada manusia, ternak, dan tikus. DMP1 gen manusia terdiri dari enam ekson yang dipisahkan oleh lima itrans dan berisi kerangka terbuka dari 1539 pasangan basa. Peta gen

manusia DMP1 pada area 4q21-4q22, berdekatan dengan gen dentinogenesis imperfekta tipe 2. Namun, kedua gen ini tidak identik. Fungsi dari DMP1 belum jelas diketahui, tetapi proteinnya diyakini mengikat fibril matrik setelah pengangkutan pada proses pembentukan awal matrik kolagen tipe 1 dan memulai nukleisasi untuk memfasilitasi mineralisasi melalui pengikatan Ca^{2+} .¹⁰⁹

Dentin telah diyakini mempunyai sejarah evolusi yang panjang yang bermula dari asal usul vertebrata, bahkan dianggap sebagai salah satu karakteristik yang unik dari subphylum vertebrata. Hal ini terlihat dengan adanya berbagai jenis dentin yang menggambarkan secara signifikan kesimpulan hubungan phylogenetic diantara vertebrata yang sudah punah hingga yang masih eksis. Perbandingan bentuk dentin telah didasarkan pada pengujian morfologi dan mikroskopis-anatomi, yang dapat menimbulkan kesimpulan yang salah sebagai akibat dari konvergensi fenotipik. Utilitas dari dentin sebagai penanda filogenetik sangat dapat ditingkatkan dengan pesat dengan cara melengkapi morfologi oleh studi molekuler. Selain itu, evolusi molekular dari berbagai protein yang membentuk dentin bisa sangat menarik dalam dirinya sendiri. Penelitian semacam itu selama ini terbatas pada deteksi reaksi silang dengan metode serologi imunologi. Reaksi silang tidak membuat homologi protein terutama yang berasal dari filum yang sangat berbeda.¹⁰⁸

Sebagai sel induk untuk odontoblas, harus ada beberapa populasi sel dalam pulpa gigi/ papilla seperti lapisan sel keturunan odontoblas pada bagian bawah permukaan sel di bawah lapisan pulpa gigi/ sel parenkim papilla. Seluruhnya berisi sel mesensimal yang tidak dibedakan atau dibedakan ulang. Selanjutnya, sel yang mengekspresikan *sialoprotein dentine* (DSP) dan *gen phosphopryn* (DPP), dimana sebagai penanda spesifik untuk pembeda odontoblas, telah menimbulkan dentin matrik protein 1 yang berlebih (DMP1), yang juga telah terdeteksi di dentin, tulang dan dari masing-masing sumber sel. Berdasarkan laporan tersebut, keberadaan sel-sel yang dapat dimasukkan untuk mengungkapkan penanda spesifik dan dapat mendorong odontoblas berdekatan dengan hidroksiapatit/ tricalcium fosfat, sebagian mungkin mencerminkan kenyataan bahwa ketika sel-sel pulpa gigi tersebut yang berdekatan dengan permukaan jaringan mineralisasi, terjadi induksi odontoblas regeneratif. Bagaimanapun jenis

sel yang berasal odontoblas regeneratif kurang dipahami. Selanjutnya, sinyal dan jalur oleh sel subodontoblas dibedakan menjadi odontoblas superfamili TGF- β , faktor pertumbuhan fibroblas (FGFs) dan faktor pertumbuhan insuline-like (IGFs). Dalam suatu sistem organ budaya *microenvironment* tiga dimensi yang menyediakan kondisi yang dibutuhkan untuk pembedaan odontoblas, diduga komponen membran basal TGF- β 1 yang disekresikan. Kemudian bersama-sama dengan penyerapan ECM disekitarnya substratum agar terisolasi oleh papilla gigi yang memainkan peranan yang sama yang mungkin dimainkan oleh membran basal *in vivo*.¹¹⁰

Dentin reparatif, atau disebut juga dentin tersier (generasi sekunder odontoblas diferensiasi), termasuk dentinogenesis reparatif dan reaksioner. Dentin ini terbentuk pada pulpa *ectomesenchymal* gigi, berasal dari ujung saraf kranial, dan tidak memiliki elemen epitel dan membran basal. Sebaliknya, dentin primer (generasi utama odontoblas diferensiasi) dikendalikan oleh interaksi epitel mesensimal yang dimediasi oleh lapisan matriks ekstraseluler (ECM). Pada proses fisiologis, pembentukan sel tubular dentin diinduksi mengikuti pengendapan awal baik dari osteodentin amorf (reparative) atau tubular dentin (dentinogenesis reaksioner). Pada penelitian, dentinogenesis dapat diinduksi oleh anggota superfamili transforming growth factor- β (TGF- β) dengan mengkombinasikan pertumbuhan tertentu, dan diinduksi berdekatan dengan permukaan struktur ECM- penyerapan substrat agar. Dentinogenesis juga dapat diinduksi berdekatan dengan ECM buatan atau hidroksiapatit/ fosfat tricalcium yang di cangkakan. Pulpa gigi/ papilla akan membantu menjaga proses dentinogenesis. Oleh karena itu, sel induk untuk odontoblas regeneratif harus ada dalam pulpa gigi/ papilla sebagai jaringan ikat. Dimana jaringan ini terdiri dari sel-sel mesenchymal yang tidak memiliki perbedaan, fibroblas pulpa, sel-sel yang terkait dengan penyediaan neurovaskular, dan sel-sel sistem imun. Ketika sel-sel endotel vaskular, sel mural (pericytes dan sel otot) dan sel-sel saraf perifer bersebelahan dengan berbagai jenis membran basal, dapat terjadi trans differensial. Populasi sel odontoblastic berada pada zona kaya sel pada pulpa gigi. Lapisan sel turunan odontoblas juga ada di pinggir papila gigi seri. Selain itu, sel-sel imunokompeten pulpa juga dapat berkontribusi untuk dentinogenesis tersier pada replantasi molar. Populasi *stem*

cell mampu merangsang odontoblas yang telah mengisolasi dalam pulpa gigi manusia.¹¹⁰ Matrik ekstraseluler dentin 90% terdiri dari fibril kolagen tipe I, yang menyediakan struktur kerangka yang mendefinisikan ruangan untuk mineral yang dibutuhkan. Kolagen sendiri tidak mempunyai kapasitas untuk menginduksi formasi matrik mineral khusus dari kalsium fosfat yang tidak mengendap secara spontan. Pada protein nonkolagen yang memiliki properti menjepit kalsium dan fungsi seperti peningkat atau penghambat perpindahan mineral ke dalam pada percobaan *vitro*. Mereka terdiri dari *dentin sialophosphoprotein* (DSPP) yang merupakan sebuah induk protein yang besar yang mengalami perpecahan menjadi dua produk, *dentin sialoprotein* (DSP) dan *dentin phosphoprotein* (DPP), dentin matrik protein 1, 2, 3 (DMP 1, DMP 2, dan DMP 3, secara berurutan), dan sedikit dari *osteopontin*, tulang *sialoprotein*, *osteonectin* dan *osteocalcin*.¹¹⁰

Dentin matrik protein 1 adalah sebagian besar matrik asam protein non-kolagen yang pertama kali di gandakan dari proses mineralisasi dentin matrik, dan pada akhirnya dari tulang matrik. Perhatian terfokus pada potensi kemampuan dari protein ini untuk menjepit diri pada kolagen fibril pada jaringan mineral. Protein ini berukuran 66 kDa molekul yang mengandung dua kelopak peptida pada akhiran *carboxyl* yaitu 349DSESSEEDR357 dan 424SEENRDSQDSSR437, yang mana telah mendemonstrasikan daya tarik menarik yang tinggi pada kolagen pada percobaan *vitro*. Oleh karena itu mereka bertanggungjawab pada penjepitan DMP1 pada kolagen monomer. Sebagai tambahan, berdasarkan pada kandungan negatif yang tinggi, DMP1 telah ditetapkan untuk menjalankan sebuah aturan yang penting pada proses mineralisasi jaringan dengan mengawali dan mengatur fase perpindahan mineral. Asumsi ini telah dikonfirmasi lebih jauh oleh penemuan yang memperlihatkan bahwa penggabungan ulang DMP1 dapat mengakibatkan *apatite nucleation* pada *vivo*. Hasil yang sudah ada memverifikasi bahwa DMP1 kolagen kompleks menghasilkan perpindahan mineral pada permukaan kolagen ketika diinkubasi pada penyangga bufer pseudo-physio-logical, dimana tidak ada perpindahan kalsium fosfat terjadi ketika DMP1 menghilang. Hal ini disimpulkan bahwa interaksi kooperatif antara DMP1 dan kolagen tipe I mungkin menjadi tahapan

yang penting dalam proses biomineralisasi pada proses mineralisasi dengan media matrik.¹⁰⁸

Dalam osteoblas, DMP1 menampakkan diri berperilaku sebagai aktivator dari pencatatan jalur tertentu yang mengarahkan pada tanda *alkaline phosphatase*. Ketika dalam ikatan dengan faktor transkripsional osteoblas lainnya, protein ini mungkin meregulasi tanda dari gen osteocalcin. Hal ini telah dilaporkan bahwa sintesa undifferentiated osteoblas DMP1 pertama diangkut ke dalam intinya dengan cara mengikat domain NLS3 aktif dengan faktor pengangkut yang mudah larut seperti importin, asal diregulasi, pengiriman DMP1 yang tidak searah ke dalam inti osteoblas. Di dalam inti, DMP1 bertanggung jawab terhadap regulasi transkripsi gen matriks yang terlibat dalam mineralisasi matriks. Ketika osteoblas dipolarisasi, DMP1 melalui beberapa penyesuaian merubah phosphorylasi dengan kasein kinase II. Seluruh perubahan penyesuaian membuka nuclear export signal (NES) rangkaian peptida dan eksport kompleks DMP1 Ca²⁺ dengan cepat ke dalam matriks ekstraseluler dimana terjadi ikatan khusus pada fibril kolagen, dan memulai nukleisasi hydroxyapatite.¹⁰⁸

2.4.7. Osteocalcin (OC)

Osteocalcin (OC) adalah protein non-kolagen yang ditemukan di tulang dan dentin.^{41, 46} *Osteocalcin* (OC) juga dikenal sebagai asam carboxyglutamik gamma tulang yang mengandung protein (BGLAP). Pada manusia, osteocalcin adalah BGLAP yang dikodekan oleh gen. *Osteocalcin* (OC) hanya disekresi oleh osteoblas dan memainkan peran dalam pengaturan metabolisme tubuh dan pro-osteoblasik atau pembentukan tulang. Osteocalcin juga terlibat dalam mineralisasi tulang dan ion kalsium homeostasis.⁴⁶

Osteocalcin (OC) sebagai salah satu dari beberapa tipe protein yang disekresi oleh osteoblas, memainkan peranan yang penting dalam diferensiasi osteoblas dan pembentukan tulang. Osteocalcin tampak pada tahap diferensiasi paling akhir dari osteoblas dewasa dan merupakan protein non kolagen pada matrik tulang. Pada tikus yang mengalami defisiensi osteocalcin terjadi peningkatan pembentukan tulang. Pola dari ekspresi gen-gen dan protein-protein selama diferensiasi odontoblas memiliki kesamaan dengan osteoblas. Pada pulpa gigi yang normal, ekspresi *osteocalcin* juga terlokalisasi pada organel-organel

intra seluler dari odontoblas. Namun ekspresi osteocalcin pada osteoblas dan pada matrix dentin selama pembentukan dentin tersier belum sepenuhnya terjelaskan.⁴⁶

Menurut Karsenty dan Wagner proses diferensiasi dari turunan osteoblasik dikontrol secara ketat oleh beberapa faktor transkripsi inti. Protein aktivator 1 (AP-1) terikat pada AP-1 binding site dari area tertinggi pada target gen spesifik, seperti fungsi osteocalcin, dan menjadi ekspresi penengah pada osteoblas. Angel dan Karlin menyatakan bahwa protein AP-1 adalah heterodimer dari protein *Fos* (*c-Fos*, *Fos B*, *Fra-1*, *Fra-2*) dan protein *Jun* (*c-Jun*, *Jun B*, *Jun D*). Ekspresi berurutan dari beberapa anggota AP-1 telah diteliti pada osteoblas. Diantara anggota tersebut, mRNA *Fra-2* dan mRNA *Jun D* telah dikenalkan sebagai osteoblas yang berdiferensiasi penuh. Sebagai kebalikannya menurut Kitamura dan Terashita (1997), m-RNA *c-Jun* dan m-RNA *jun B* diekspresikan selama pembentukan dentin fisiologis dan reparatif. Namun keterlibatan anggota AP-1 yang lain dalam pembentukan dentin tersier belum diketahui.⁴⁶

Osteocalcin (OC) dianggap sebagai pangkal marker diferensiasi odontoblas. Berdasarkan pengamatan yang dilakukan menggunakan mikroskop immunoelektron, osteocalcin tidak ditemukan pada sel oval yang memiliki proses sitoplasmik yang pendek dan menonjol kearah permukaan pulpa dentin di bawah kavitas pada hari pertama setelah preparasi. Setelah dua hari, beberapa sel yang memanjang dengan proses sitoplasmik yang panjang memperlihatkan osteocalcin pada badan golgi yang berkembang dan pada vesikel. Menurut Couve, adanya temuan ultra struktur sel ini mengindikasikan bahwa sel oval pada hari pertama setelah preparasi dan sel yang memanjang pada 2 hari setelah preparasi adalah preodontoblas dan odontoblas. Berkebalikan dengan kondisi tersebut, setelah 3 hari, osteocalcin yang berlebih tampak pada perkembangan badan golgi yang pesat dan pada vesikle dari sel columnar ditepi permukaan dentin-pulpa dibawah kavitas. Sel columnar ini juga berkembang dengan baik pada retikulum endoplasmik kasar dan proses sitoplasmik yang panjang yang masuk dalam pembentukan matrix baru.⁴⁶

Berdasarkan klasifikasi odontoblas menurut Couve, sekresi odontoblas menghasilkan perkembangan retikulum endoplasmik kasar dan badan golgi yang baik. Analisis RT-PCR (Reverse Transcription/Polymerase Chain Reaction) juga

mengindikasikan bahwa tingkatan yang lebih tinggi dari mRNA terlihat pada jaringan pulpa pada 2-3 hari setelah preparasi dibandingkan dengan jaringan pulpa yang tidak diberi tindakan (kontrol). Hal ini mengesankan bahwa mRNA osteocalcin terlihat kuat baik pada sel yang memanjang 2 hari setelah preparasi, maupun pada sel columnar 3 hari setelah preparasi di bawah kavitas yang terpreparasi. Hal ini dapat memberikan kesimpulan bahwa sel columnar adalah terminal diferensiasi odontoblas yang aktif mensekresi matrix dentin.⁴⁶

Osteocalcin telah terlokalisir pada lapisan matrix dentin selama pertumbuhan gigi dan pada mineralisasi awal selama pembentukan tulang. Pengamatan menggunakan mikroskop immunoelektron menunjukkan osteocalcin dalam jumlah besar pada odontoblas 3 hari setelah preparasi, dimana sejumlah kecil osteocalcin terdapat pada odontoblas gigi yang tidak dirawat. Osteocalcin yang berlebih juga terdeposit pada fibril kolagen tipe-1 pada predentin dari dentin reaksioner. Pada 10 hari setelah preparasi, dentin reaksioner yang padat diproduksi dibawah kavitas berhubungan dengan dasar kavitas. Hal ini mengindikasikan bahwa osteocalcin dalam jumlah yang banyak tersebut dan kolagen tipe-1 disekresi secara cepat dari odontoblas untuk membentuk predentin dari dentin reaksioner. Hal ini menimbulkan dugaan bahwa osteocalcin mungkin tidak hanya berperan dalam kontrol sekresi, namun juga pada pematangan matrix dentin pada dentinogenesis reaksioner. Secara ultra struktur, tampak bahwa degenerasi osteoblasik terdapat pada tubulus dentin dibawah kavitas setelah dipreparasi dan bahwa tubulus dentin tersebut terisi dengan fibril kolagen tipe-1. Kemudian osteocalcin terdistribusi padat pada tubulus dentin ini. Temuan ini mengindikasikan bahwa fibril kolagen tipe-1 dan osteocalcin yang berjumlah banyak disekresi oleh odontoblas yang diabsorpsi ke dalam ruang tubulus dentin melalui kapiler setelah preparasi gigi. Osteocalcin juga diduga memainkan peran dalam pencegahan invasi eksogen melalui tubulus dentin yang terpapar, dimana membantu menjaga vitalitas pulpa gigi.⁴⁶

Ekspresi selektif dari gen *fos* dan gen *jun* adalah fungsi relevan terhadap tahap pertumbuhan osteoblas dan diferensiasinya. Diketahui juga bahwa *jun D* dan *fra-2* mRNAs terekspresi pada osteoblas yang terdiferensiasi penuh dan hanya kompleks AP-1 yang terdiri dari *Jun D* dan *Fra-2* yang dapat meninggikan

ekspresi osteocalcin pada osteoblas. Pada odontoblas, ekspresi mRNA *jun B* telah dilaporkan menjadi bersifat sementara dan meningkat sebagian selama pembentukan dentin tersier setelah preparasi pada molar tikus. Secara immunohistochemical dan pemeriksaan mikroskop immunelektron menunjukkan bahwa *Jun D* terekspresi secara sementara pada nuclei di beberapa preodontoblas dan hampir semua odontoblas yang ditemukan dibawah kavitas pada sehari dan dua hari setelah preparasi. Hal ini menimbulkan dugaan bahwa lokalisasi yang bersifat sebagian dan sementara dari *jun D* dapat mengontrol diferensiasi dan ekspresi gen osteocalcin pada osteoblas selama pembentukan dentin reaksioner. Namun *Jun D* tidak terekspresi pada nuclei dari sekretori odontoblas.⁴⁶

Dengan menggunakan mikroskop immunoelektron, ditemukan osteocalcin dalam jumlah besar yang tersintesis di odontoblas dan tersekresi ke matrik dentin reaksioner pada 3 hari setelah preparasi. Analisis RT-PCR menunjukkan bahwa ekspresi mRNA osteocalcin jaringan pulpa pada 3 hari setelah preparasi memiliki tingkatan yang sama tinggi dengan pada 2 hari setelah preparasi. Stabilitas osteocalcin mRNA dilaporkan menjadi panjang dengan penambahan vitamin D3 pada kultur osteoblas. Sintesa osteocalcin dapat diperpanjang oleh mekanisme post-transcriptional setelah odontoblas menghentikan ekspresi dari *Jun D* pada hari ketiga setelah preparasi.⁴⁶

2.4.8. Osteonectin (ON)

Osteonectin adalah glikoprotein dalam tulang yang mengikat kalsium. *Osteonectin* disekresi oleh osteoblas selama pembentukan tulang, permulaan mineralisasi dan pembentukan kristal mineral. *Osteonectin* juga menunjukkan afinitas untuk kolagen, di samping mineral kalsium tulang. *Osteonectin* adalah asam yang disekresi oleh matriks ekstraseluler glikoprotein yang memainkan peran penting dalam mineralisasi tulang, interaksi sel-matriks, dan pengikatan kolagen. *Osteonectin* juga meningkatkan produksi dan aktivitas dari metalloproteinases matriks, fungsi penting untuk menyerang sel-sel kanker di dalam tulang.¹¹¹

Ekspresi gen *osteonectin* pada umumnya ditemukan dalam sel yang memiliki tingkat produksi matriks/ proliferasi yang tinggi. Dalam jaringan termineralisasi, sinyal yang kuat diperoleh di osteoblas, odontoblas, dan

chondrocyte dari daerah di atas zona hipertrofi dan proliferasi. Ekspresi osteonectin yang kuat juga ditemukan di osteoblas pada perkembangan gigi. Selain itu, osteonectin mRNA dan protein terdeteksi pada beberapa jaringan non-mineralisasi antara lain steroid (memproduksi sel kelenjar adrenal dan gonad), ginjal (glomeruli), paru-paru (bronchi), kulit, megakaryosit, dan vessel besar.¹¹¹

Secara histokimia, osteonectin terdeteksi pada ekstraselular tulang dan pada zona termineralisasi hanya pada tulang rawan. Lokalisasi osteonectin pada tulang, tulang rawan, dan gigi sesuai dengan peranannya dalam permulaan proses mineralisasi. Namun, distribusi organ spesifik pada jaringan non-mineralisasi memberi kesan adanya peran multifungsi yang penting dari osteonectin terhadap pertumbuhan manusia. Distribusi osteonectin pada jaringan gigi dapat juga dilihat dari *stain* yang kuat pada dentin gigi yang tidak erupsi dan tulang alveolar yang terhubung dengan menggunakan antibodi *affiny-purified* yang dikombinasikan dengan teknik peroxide-antiperoxide. Ringan sampai beratnya *stain* yang timbul diamati pada pulpa gigi, *stratum intermedium*, *stellate reticulum*, dan elemen-elemen retikuler pada endosteum. Pada gigi yang erupsi, *staining* osteonectin pada dentin terkonsentrasi disekitar tubulus dentin dan pada tulang alveolar yang terhubung dengan variasi intensitas. Pada bagian sementum *stain* terlihat sangat sedikit, namun pada ligamen periodontal dan bahan retikuler pada daerah endosteum menunjukkan tingkatan intensitas *stain* dari sedang sampai ke berat. *Stain* yang lebih ringan tampak pada pulpa dan lamina propria gingiva. Sebagai perbandingan, kolagen tipe-1 menunjukkan distribusi osteonectin yang sama pada jaringan fetus dan jaringan dewasa, sedangkan kolagen tipe-3 pada umumnya terbatas pada ligamen periodontal, elemen-elemen retikuler dari daerah endosteal, dan Sharpey's fiber pada tulang dan sementum. Pada kedua lapisan ameloblast dan odontoblas jaringan fetus, tampak *stain* untuk osteonectin dan kolagen tipe-3.¹¹²

Pada manusia *osteocalcin*, *osteonectin* dan *dentin sialophosphoprotein* (DSPP) mRNA dapat dideteksi dengan *Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) pada mandibula fetus dan pada kultur sel primer pulpa gigi. Selain itu, osteocalcin, osteonectin dan protein DSPP terlokalisir pada pembentukan jaringan yang termineralisasi dengan menggunakan

immunohistochemistry. Secara *in vivo*, ekspresi DSPP dihubungkan dengan interaksi terminal epitel mesensimal, amelogenesis dan dentinogenesis. Ekspresi sementara DSPP terlihat pada ameloblast presekretori dengan ekspresi yang terus menerus pada odontoblas. Sebaliknya, baik osteoblas maupun odontoblas menunjukkan celah sementara antara ekspresi osteocalcin dan osteonectin pada perkembangan awal. Osteonectin terekspresi pada tahap awal dari cytodifferentiaton, dimana osteocalcin terekspresi hanya selama tahap selanjutnya, khususnya pada gigi. Pada saat tahap maturasi dari pembentukan enamel, osteocalcin maupun osteonectin terdeteksi pada odontoblas dan prosesnya dalam matrix ekstraseluler. Berkebalikan dengan tulang, osteocalcin tidak terlokalisir ekstraseluler dalam matrik dentin kaya kolagen (predentin atau intertubular dentin), namun ditemukan pada enamel dewasa (mature). Osteonectin terbanyak berada pada predentin yang tidak termineralisasi.⁴⁷

2.5. Pengamatan Deposit Kalsium

Ion kalsium adalah mineral inorganik terdapat di dalam tulang dan hidroksiapatit (HA) yang membentuk tulang. Deposit kalsium menunjukkan terjadinya suatu proses regenerasi pada tulang dan ditemukan pada hari ke 12 melalui pewarnaan Von Kossa, sedang pada matrik ekstraseluler deposit kalsium mulai ditemukan pada hari ke 14 dan 21.^{54,21} Metode penghitungan jumlah deposit kalsium pertama kali dikembangkan oleh Von Kossa dengan berbagai modifikasi. Untuk menghitung jumlah deposit kalsium digunakan pewarnaan von Kossa dengan cara menghitung mineral pada sel kultur dengan menggunakan 1% silver nitrat, sodium thyosulfat dan *nuclei fast red*. Pemeriksaan di bawah mikroskop dapat ditemukan pada sel tersebut terdapat warna bintik hitam menunjukkan adanya ion kalsium, warna merah adalah nucleus dan warna pink adalah sitoplasma. Apabila tidak terdapat bintik hitam berarti sel tersebut tidak mengandung ion kalsium.¹¹³

Pada penelitian lainnya menyebutkan bahwa absorpsi kalsium dan serum leptin meningkat mempunyai hubungan bermakna dengan deposit kalsium. Jadi ada hubungan yang positif antara absorpsi kalsium, serum leptin dan osteokalsin dengan deposit kalsium.⁵⁵ Ini membuktikan bahwa meningkatnya deposit kalsium diikuti pula meningkatnya *osteocalcin*. Penelitian lain menunjukkan bahwa

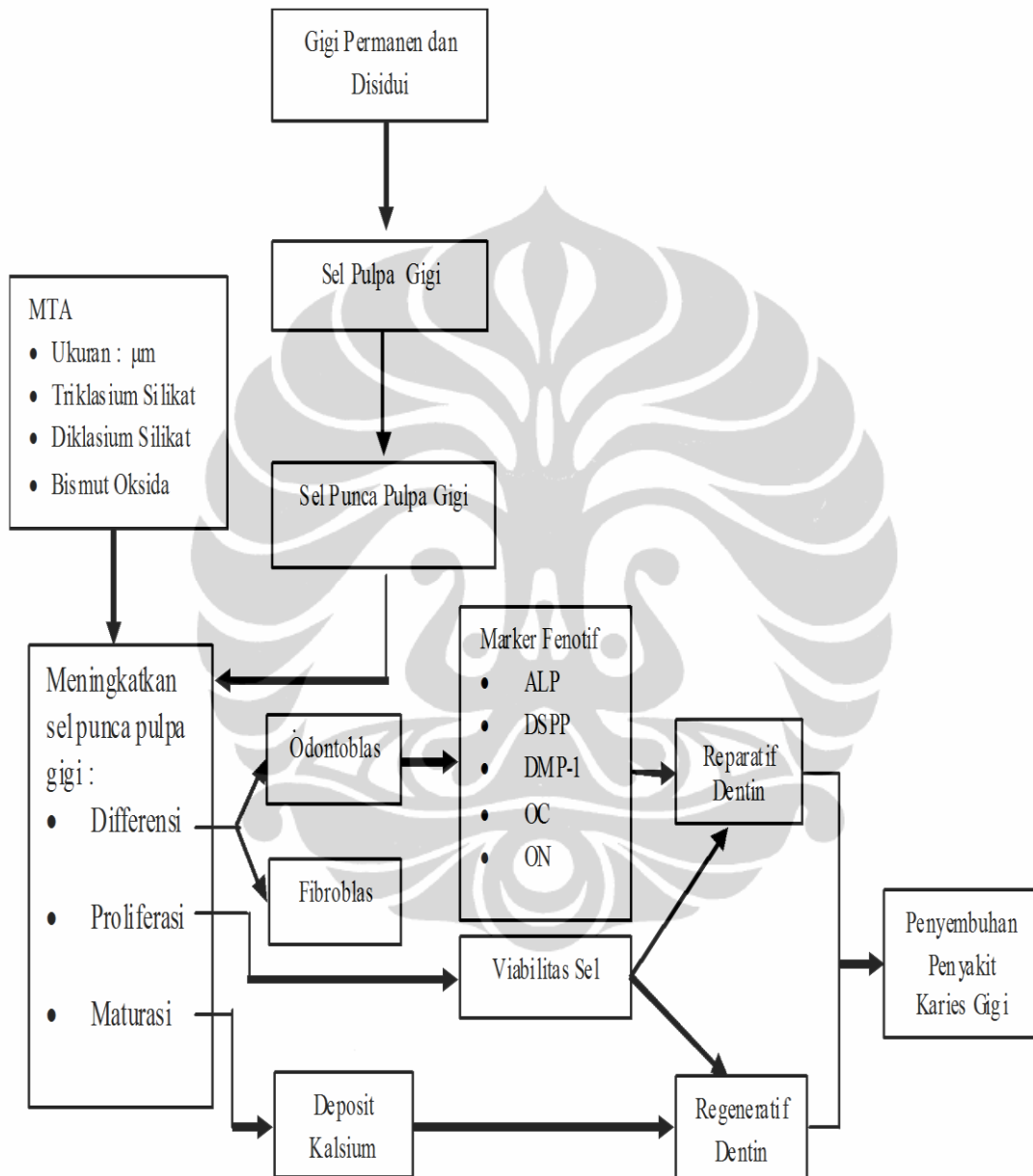
paparan nano *dexamethasone* ditambah *carboxymethylchitosan/poly amidoanime dendrimer (dex-loaded CMChT/PAMAM)* yang dikombinasi dengan HA pada *bone marrow stromal cells* (RBMSCs) pada tikus dapat meningkatkan proses osteogenesis yaitu meningkatnya mineralisasi pada matriks ekstraselluler yang disertai pula meningkatnya ALP.¹¹⁴

Kolagen yang dominan di dalam dentin adalah kolagen tipe I yang disintesis oleh odontoblas dan tercakup di dalam matriks dentin.³⁸ Matriks dentin adalah non kolagen protein yang diekspresikan oleh odontoblas dan disekresi oleh matriks ekstraselluler dan terikat dengan *hydroxyapatite* (HA) dalam bentuk ion kalsium yang dapat meningkatkan proses mineralisasi.^{115,116}

2.6. Kerangka Teori

Berdasarkan teori tersebut di atas dapat disusun suatu kerangka teori sebagai berikut: Gigi permanen dan disidui diambil sel pulpanya kemudian diisolasi dan diseleksi untuk memperoleh sel punca dengan menggunakan kolom magnet dan antibodi penanda sel punca STRO-1. Sel punca mesensimal pulpa gigi (DPSCs dan SHED) dapat berdiferensiasi ke arah odontoblas dan fibroblas. NMT dan MTA sebagai kontrol dalam penelitian ini bahan yang digunakan untuk merangsang sel punca berdiferensiasi, berproliferasi dan maturasi sel.

Protein yang disekresikan oleh odontoblas dan sering dijadikan biomarker untuk menganalisis aktivitas odontoblas adalah: 1. *Alkaline phosphatase* (ALP) 2. *Dentin sialophospho-protein* (DSPP) 3. *Osteocalcin* (OC), 4. *Dentin matrix protein-1* (DMP-1) 5. *Ostenectin* (ON). Untuk melihat maturasi sel bisa dilakukan dengan deposit kalsium Tujuan dari penelitian ini adalah terjadinya efek reparatif dan regenerasi dentin (Gambar 2.5).



Gambar 2.5. Kerangka Teori

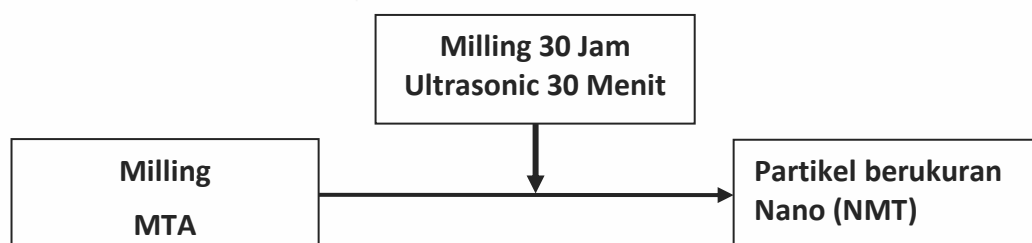
BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka Konsep

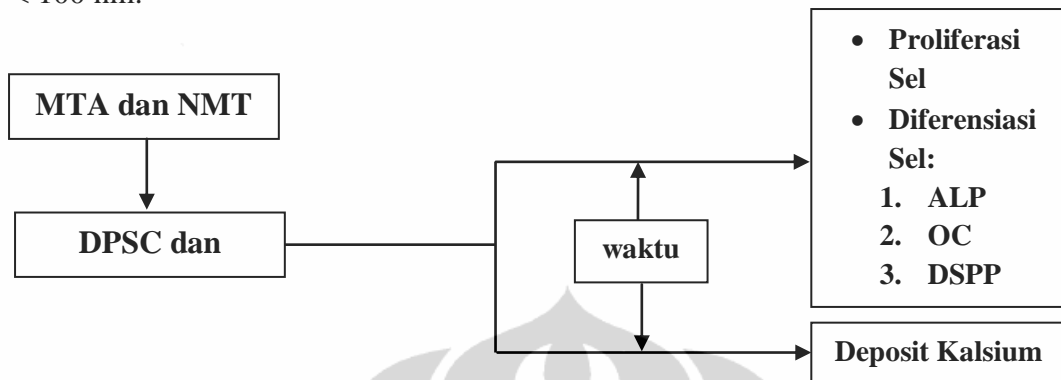
Modifikasi MTA menjadi NMT dilakukan dengan cara *milling* yang dilakukan dengan periode waktu 20 jam, 24 jam dan 30 jam untuk mendapatkan ukuran partikel terkecil. Hasil *milling* kemudian diproses dengan alat *ultrasonic* menggunakan isopropanol 99,8% dan diukur dengan *particle size analysis* (PSA) (Gambar 3.1).

Dalam penelitian ini marker fenotip odontoblas dibatasi pada ALP, OC, dan DSPP. Hal ini didasarkan hasil penelitian bahwa MTA dapat meningkatkan *alkaline phosphatase* (ALP) untuk proses kalsifikasi, *osteocalcin* (OC), interleukin production (IL-6, IL-8), ligamen periodontal, pertumbuhan semetum dan predentin.³³ Sedangkan DSPP marker yang kuat terekspresi dalam odontoblas dan berfungsi terhadap pembentukan dentin sekunder, meskipun protein ini juga dapat ditemukan dalam osteoblas namun dengan tingkatan ekspresi yang lebih rendah.¹¹⁷⁻¹²⁰ Di samping itu ketiga marker tersebut adalah marker yang dominan terhadap reparatif dentin akibat jejas. Deposit kalsium menunjukkan terjadinya suatu proses regeneratif pada tulang dan ditemukan pada hari ke 12 melalui pewarnaan von Kossa, sedang pada matrik ekstraselluler deaposit kalsium mulai ditemukan pada hari ke 14 dan 21.^{54,21} Proses tersebut di atas menunjukkan terjadi dentinogenesis (Gambar 3.2).



Gambar 3.1. Kerangka Konsep Pembuatan NMT

Gambar 3.1. adalah pembuatan NMT yang dimodifikasi dari MTA dengan cara milling selama 30 jam kemudian dilakukan ultrasonik sehingga diperoleh ukuran < 100 nm.



Gambar 3.2. Kerangka Konsep Uji Marker Odontoblas dan Deposit Kalsium

Gambar 3.2 terjadinya potensi dentinogenesis yang diamati melalui kelangsungan hidup dan pertumbuhan sel (proliferasi) dan diferensiasi marker odontoblas yaitu ALP, OC dan DSPP serta deposit kalsium yang juga mencirikan terjadinya maturasi sel. Waktu pengamatan untuk proliferasi sel pada hari ke 1, 2 dan 3, diferensiasi pada hari ke 3, 7, 14 dan 21, sedang untuk deposit kalsium dilakukan pada hari ke 7, 14 dan 21.

3.2. Identifikasi Variabel

Variabel bebas : MTA dan NMT

Variabel terikat : ALP, OC, DSPP, dan Deposit Kalsium

Variabel antara : DPSC, SHED

3.3 Hipotesis Mayor

MTA dapat dimodifikasi menjadi biomaterial ukuran nano yang tidak bersifat toksik dapat menginduksi peningkatan proliferasi dan diferensiasi sel punca pulpa gigi serta maturasi sel ke arah odontoblas.

3.4 Hipotesis Minor

3.4.1 *Mineral trioxide aggregate* dapat dimodifikasi ukurannya menjadi ukuran nano (< 100 nm) dengan cara *milling*.

- 3.4.2 Paparan NMT pada sel punca pulpa gigi dapat merangsang peningkatan proliferasi ke arah odontoblas dan tidak bersifat toksik terhadap sel punca pulpa gigi.
- 3.4.3 Paparan NMT pada sel punca pulpa gigi dapat merangsang peningkatan dan diferensiasi ke arah odontoblas.
- 3.4.4 Paparan NMT dapat meningkatkan jumlah deposit kalsium dan pembentukan matrik ekstraselluler ke arah odontoblas.



BAB 4

METODA PENELITIAN

Penelitian ini dirancang untuk memodifikasi ukuran MTA menjadi nanopartikel mineral trioksida (NMT) dan menganalisis efek NMT terhadap proliferasi dan diferensiasi sel punca pulpa gigi permanen (DPSC) dan gigi disidui (SHED) serta maturasi sel ke arah odontoblas. Biomarker diferensiasi dalam hal ini diamati melalui produksi ALP, DSPP dan OC secara *in vitro*. Sebagai kelompok kontrol adalah MTA dan satu kelompok kosong.

4.1 Jenis Penelitian

Jenis Penelitian ini adalah: Eksperimental Laboratorik

4.1.1 Tahap 1: Memodifikasi MTA menjadi NMT dengan cara *milling*

4.1.2 Tahap 2: Pengujian NMT terhadap proliferasi sel dengan menganalisis viabilitas sel punca mesensimal pulpa gigi (DPSC dan SHED), diferensiasi sel punca mesensimal pulpa gigi (DPSC dan SHED) dengan menganalisis *marker* fenotip odontoblas yaitu aktivitas ALP, OC dan DSPP serta maturasi sel ke arah odontoblas dengan menganalisis jumlah deposit kalsium dan pembentukan matrik ekstraselluler.

4.2 Tempat dan Waktu Pelaksanaan Penelitian

4.2.1 Tahap 1. Penelitian dilakukan di laboratorium Fisika Puspittek Serpong pada bulan Oktober-Desember 2010.

4.2.2 Tahap 2. Penelitian dilakukan di laboratorium Oral Biologi FKG UI pada bulan Februari 2011-Januari 2012 dan di Lab Biomedik FKUB pada bulan Maret-April 2012.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah sel punca mesensimal yang diisolasi dari gigi permanen dan disidui. Sel punca pulpa mesensimal dari gigi permanen (DPSC) dan gigi disidui (SHED) setelah 21 hari akan berproliferasi sampai tahap *confluence* disebar ke dalam 48 *well culture plate* yang terdiri dari 24 *well culture plate* DPSC dan 24 *well culture plate* SHED. Untuk memenuhi kebutuhan

48 *well culture platete* diperlukan: 6 (ulangan percobaan) x 48 = 288 atau sekitar 300 x 2 mg = 600 mg NMT dan MTA yang terbagi 300 mg NMT dan MTA untuk 24 *well culture plate* DPSC dan 300 mg NMT dan MTA untuk 24 *well culture plate* SHED.

4.3.1 Kriteria Sampel

4.3.1.1 Kriteria Inklusi

1. Gigi permanen molar 3 impaksi dengan indikasi ekstraksi
2. Gigi permanen premolar 1 dengan indikasi ekstraksi karena perawatan ortodonsi
3. Gigi disidui anterior rahang bawah yang indikasi ekstraksi karena persistensi
4. Resorbsi akar gigi disidui yang persistensi tidak lebih dari 2/3 akar
5. Gigi bebas dari karies
6. Gigi yang ekstraksi tidak lebih dari 3 jam

4.3.1.2 Kreteria Eksklusi

1. Gigi permanen dan disidui yang tidak terindikasi ekstraksi
2. Resorbsi akar gigi disidui yang persistensi lebih dari 2/3 akar
3. Gigi yang menderita karies
4. Gigi yang diekstraksi lebih dari 3 jam dan sudah mengalami kontaminasi

4.4 Bahan dan Alat Penelitian

4.4.1 Bahan dan Alat Tahap 1

4.4.1.1 Bahan Pembuatan NMT:

1. Bubuk MTA (Densply)
2. Isopropanol 99,8%
3. Aquades steril

4.4.1.2 Alat Pembuatan NMT:

1. *Hight Energy Milling* (Hand made, Indonesia)
2. *Particle Size Analysis* (Beckman Coulter, USA)
3. Ultrasonik (Vibra Cell, USA)
4. *Scanning Electron Microscopy* (FEI, Type Inspect S50, Nederland)

5. *Energi Dispersive Analysis with X-Ray* (A METEK, USA)
6. *X-Ray Diffraction* (PANalytical X'pert Pro, Nederland)

4.4.2 Bahan dan Alat Tahap 2

4.4.2.1 Bahan Uji Viabilitas Sel (Uji MTT):

1. Larutan MTT 15 μ l (Sigma USA)
2. Cairan isopropanol 150 μ l (Sigma USA)

4.4.3 Bahan dan Alat Tahap 3

4.4.3.1 Bahan Kultur Sel

1. Medium Kultur sel : DMEM (Gibco, USA)
2. *Phosphate buffer saline* (PBS steril) (Bio Basic Inc, USA)
3. *Trypan blue* (Sigma USA)
4. *Fetal bovine serum* (FBS) (Bio West, South America)
5. *Fungizone* (Gibco, New Zealand)
6. *Milli Q water*
7. *Herpes buffer solution* (Sigma USA)
8. Penisilin streptomisin (Gibco, New Zealand)
9. Sodium bikarbonat (Sigma USA)
10. *L-Glutamine* (Gibco, New Zealand)

4.4.3.2 Alat Kultur Sel:

1. Cawan petri (NUNC Denmark)
2. Pipet mikro (Eppendorf, Jerman)
3. *Cell strainer* 70 μ m (Falcon, USA)
4. Tabung 15 ml dan 50 ml (Falcon, USA)
5. *ELISA microplate reader* (Bio-Rad, USA)
6. Mesin sentrifus (SORVALL, Germany)
7. Inkubator (Memett, Germany)
8. Mortar dan pastle
9. *24 well plate* (NUNC, Denmark)
10. Mikroskop (Axiovert 40CFL, Germany)
11. *Biohazard cabinet* (Esco, Singapore)

12. Glass plate
13. Spatula semen
14. Pinset

4.4.3.3 Bahan Identifikasi Sel Punca dengan Teknik Imunositokimia

1. *Magnetic bead* (Thermo Scientific, USA)
2. Antibodi anti STRO-1 FITC (Santa Cruz Biotech, USA)
3. Antibodi anti hSTRO-1 (R & D System, USA)
4. Larutan *Blotto* terdiri dari 5% *skim milk* (Sunlac, Bun Guan Brothers SDN,BHD, Malaysia) dalam PBS
5. *Wash buffer* terdiri dari PBS dengan 0,1% *Tween 20* (Sigma, USA)
6. *Tris buffer saline* (TBS) 10 mM Tris dan 500 mM NaCl dengan pH 7,4 (Sigma, USA)

4.4.3.4 Bahan Deteksi Deposit Kalsium

1. Larutan Ag Nitrat 1% (Sigma USA)
2. Larutan Na Tiosulfat 5% (Sigma USA)
3. Larutan pewarna yang terdiri dari: larutan Aluminium Sulfat ditambah *nuclei fast red* 0,1 mg (Sigma USA) sehingga menjadi Aluminium Sulfat 5mg dan *nuclei fast red* di dalam 10 ml H₂O

4.4.3.5 Bahan Pemeriksaan untuk Aktivitas *Alkaline Phosphatase* (ALP)

1. Larutan MgCl₂ 1 M (BioAssay, USA) berbentuk 2,03 gr MgCl₂ .6H₂O setiap 10ml H₂O
2. *Buffer* Dietanolamin 1 M ; pH 9,8 (BioAssay, USA), berupa 52,9 gr Dietanolamin / 400 ml ditambahkan 0,2 ml larutan MgCl₂. Kemudian larutan *buffer* dipanaskan pada suhu 37⁰ , dengan pH 9,8 dengan menggunakan larutan *HCL 2N* , ditambah air hingga mencapai 500 ml dan simpan dalam botol gelap.
3. Larutan *p-nitrophenyl phosphate* 0,65 M (247 mg/1 ml H₂O) (BioAssay, USA).

4.4.3.6 Bahan untuk Pemeriksaan Aktivitas Osteokalsin

1. *Human Osteocalcin Instant ELISA Kit* (eBioscience, USA) terdiri dari :

- a. *Microwell Plate* yang telah dicoating dengan antibody monoclonal dan *HRP conjugate*
 - b. *Human Osteocalcin standard*
 - c. *Sample Diluent*
 - d. *Wash Buffer Concentrated 20x (Phosphate-buffered saline with 1% Tween-20)*
 - e. *Tetramethyl-benzidine (TMB) Substrate*
 - f. *Stop Solution (1 M Phosphoric acid)*
 - g. *Adhesive Plate Covers*
2. *Microplate ELISA Reader* (Bio-Rad, USA)
 3. *Micropipette dan Multichannel pipette* (Eppendorf, Gemany)
 4. *Pipette tips* (Eppendorf, Germany)
 5. *Deionized waters*
 6. *Tube* (Falcon, USA)

4.4.3.7 Bahan untuk Pemeriksaan Aktivitas Dentin Sealophosphoprotein

1. Human Dentin Sialophosphoprotein , DSPP ELISA Kit (USCN Life, China) terdiri dari :
 - a) *Assay Plate (96 wells)*
 - b) *Human DSPP standard*
 - c) *Sample Diluent*
 - d) *Assay Diluent A*
 - e) *Assay Diluent B*
 - f) *Detection Reagent A (Biotin-conjugated Polyclonal Antibody)*
 - g) *Detection Reagent B (Avidin-conjugated Horseradish Peroxidase (HRP))*
 - h) *Wash Buffer*
 - i) *TMB Substrate*
 - j) *Stop Solution*
 - k) *Plate Sealer 96 wells*
2. *Microplate ELISA Reader* (Bio-Rad, USA)
3. *Micropipette dan Multichannel pipette* (Eppendorf, Germany)
4. *Pipette tips* (Eppendorf, Germany)
5. *Deionized waters*

6. *Tube* (Falcon, USA)

4.5 Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Konsep	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
1	Mineral trioxide aggregate (MTA)	Bubuk MTA sebagai pengisi gigi yang mempunyai ukuran partikel di atas 1 μm .	Particle Size Analysis (PSA)	Meletakkan bubuk MTA ke dalam kuvet dan memasukkan ke dalam alat PSA kemudian disinari laser yang terdapat dalam PSA hasilnya ditangkap oleh detektor suatu distribusi ukuran partikel, dibaca melalui layar monitor	μm	Kontinyu
2	Nanopartikel mineral trioksida (NMT)	Bubuk yang mempunyai ukuran partikel < 100 nm hasil modifikasi dari bubuk MTA dengan cara <i>milling</i> .	Particle Size Analysis (PSA)	Meletakkan bubuk NMT ke dalam kuvet dan memasukkan ke dalam alat PSA kemudian disinari laser yang terdapat dalam PSA hasilnya ditangkap oleh detektor suatu distribusi ukuran partikel, dibaca melalui layar monitor	nm	Kontinyu
3	Aktivitas ALP pada DPSC dan SHED	Kadar aktivitas ALP pada supernatan hasil kultur DPSC dan SHED yang dipapar NMT dan MTA	Kolorimetri densitas optikal menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 405 nm	Mereaksikan supernatant hasil kultur DPSC dan SHED dengan Subtrat spesifik ALP terjadi perubahan warna di baca dengan Elisa reader	U/ml	Kontinyu

No	Variabel	Definisi Konsep	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
4	Aktivitas OC pada DPSC dan SHED	Kadar aktivitas OC pada supernatan hasil kultur DPSC dan SHED yang dipapar NMT dan MTA	Elisa reader dengan panjang gelombang 450nm	Menggunakan antibodi anti OC yang berlabel HRP dengan menambah substrat terjadi perubahan warna di baca dengan Elisa reader	Nanogram/ml	Kontinyu
5	Aktivitas DSPP pada DPSC dan SHED	Kadar aktivitas DSPP pada supernatan hasil kultur DPSC dan SHED Yang dipapar NMT dan MTA	Elisa reader dengan panjang gelombang 450 nm	Menggunakan anti bodi primer dan sekunder anti human DSPP berlabel biotin perubahan warna dibaca dengan Elisa reader	Nanogram/ml	Kontinyu
6	Deposit Kalsium	Jumlah deposit kalsium DPSC dan SHED yang dipapar dan MTA	Menggunakan Mikroskop untuk melihat jumlah sel yang mengandung kalsium	Diamati dengan pewarnaan Von Kossa kemudian dilihat mikroskop	Prosentasi positif /negative <ul style="list-style-type: none"> • Sel berbintik hitam adalah deposit kalsium • Sel warna merah Nukleus • Sel warna pink sito-plasma 	Kontinyu

4.6 Cara Kerja

4.6.1 Sterilisasi Alat Penelitian

Sebelum dilakukan pekerjaan penelitian *in vitro* ini semua bahan dan alat harus disteril. Bahan dan alat yang harus disteril adalah: tabung 50 ml (3 buah), tabung 15 ml (3 buah) tip biru, kuning dan putih, pipet dari bermacam-macam ukuran, 100 mm *tissue culture disk* (4 biji), 35 mm *tissue culture disk* (2 biji), *Micropipete tube* 2 ml (*Eppendorf*), *Milli Q Water*, botol Scotch,

scalpel, pinset, *mortal* dan *pestle*, *filter satorius minisart* (2 biji) dan *PBS* disteril dengan menggunakan *autoclave* (120⁰C) selama 15 menit dalam *biohazard cabinet* (Esco, Singapore).

4.6.2 Tahap 1

4.6.2.1 Modifikasi MTA Menjadi NMT

Pada pembuatan nanopartikel mineral trioksida (NMT) diperlukan bubuk *mineral trioxide aggregate* (MTA) sebanyak 4 gr (4 bungkus). Tahap kerja modifikasi MTA menjadi NMT sebagai berikut:

1. Sebelum dilakukan *milling* ukuran partikel MTA diukur menggunakan alat *particle size analysis* (PSA).
2. Sekitar 2/3 bungkus MTA diambil kemudian dioleskan ke bagian dalam tabung HEM, tujuannya untuk menghindari tergerusnya lapisan besi (unsur Fe) bagian dalam tabung HEM pada saat *milling* tersebut sehingga tidak tercampurnya Fe dalam bubuk NMT pada saat proses pembuatan nanopartikel NMT.
3. Setelah MTA dimasukkan ke dalam tabung HEM kemudian dilakukan *milling* dengan rentang waktu 20 jam, 24 jam, 30 jam dan 48 jam untuk mendapat ukuran nanopartikel.
4. Untuk mendapatkan ukuran partikel di bawah 100 nm, hasil *milling* tersebut kemudian dilakukan ultrasonik agar diperoleh hasil maksimal. Sebelum dilakukan ultrasonik bubuk hasil *milling* dilarutkan ke dalam isopropanol 99,8% sebagai media perambatan gelombang untuk menyalurkan energi menghancurkan bubuk partikel sehingga ukurannya semakin kecil. Ultrasonik dilakukan dengan beberapa waktu berbeda yaitu selama 30 menit, 1 jam dan 2 jam.
5. Hasil ultrasonik tersebut kemudian dilakukan pengukuran besar partikelnya dengan menggunakan alat PSA, hasilnya dijadikan sampel penelitian yang disebut sebagai bubuk nanopartikel mineral trioksida (NMT)

4.6.2.2 Pengukuran Komposisi NMT

Untuk melihat gambaran distribusi bentuk dan struktur partikel serta kandungan unsurnya digunakan alat SEM dan EDAX, sedangkan komposisi NMT dapat dianalisis dengan XRD. Kuantifikasi ukuran partikel NMT dilakukan dengan PSA

4.6.3 Tahap 2

4.6.3.1 Isolasi dan Identifikasi Sel Punca dengan Teknik Imunositokimia

Sel punca diisolasi dari gigi permanen dan disidui. Gigi permanen dan disidui yang diperoleh dari klinik dimasukkan ke dalam tabung yang mengandung DMEM. Selanjutnya gigi dibersihkan dengan klorheksidin (*minosep*) dan PBS kemudian gigi dipecah menjadi dua di dalam mortal dan pestle. Gigi tersebut kemudian diambil jaringan pulpanya dengan jarum eksterpasi. Selanjutnya jaringan pulpa tersebut dicacah dengan *scalpel* dalam *culture disk* yang berisi PBS sekitar 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung berisi PBS 5 ml. Suspensi sel yang diperoleh selanjutnya disentrifugasi 2000 rpm dalam waktu 10 menit untuk mendapatkan endapan (*pellet*) yang kemudian dilarutkan dalam DMEM. Untuk memperoleh *single cell* digunakan strainer (70 μm). Tahapan berikutnya adalah seleksi sel punca menggunakan *bead* magnet yang dilapisi antibodi anti human STRO-1 penanda sel punca. Selanjutnya sel yang berikatan dengan *bead* magnet yang dilapisi antibodi anti human STRO-1 tersebut di *elute* dengan penambahan *buffer* pencuci untuk melepaskan sel punca yang positif STRO-1 dari *bead* magnet. Hasil isolasi sel punca kemudian diinokulasikan ke dalam tissue *culture plate* yang telah diisi dengan DMEM yang telah diperkaya dengan 10-20 % *fetal calf serum* (FCS) atau *fetal bovine serum* (FBS), 10 μM ascorbid acid 2-phosphate, 2 mM L-glutamine, 100 Units/ml penisilin dan 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomisin.⁹² Sel selanjutnya dimasukkan ke dalam inkubator dan diinkubasi dengan atmosfer yang terdiri dari 95% O₂ dan 5% CO₂ pada temperatur 37⁰C. Medium kultur diganti setiap 2-3 hari.

Identifikasi sel punca gigi permanen dan disidui (DPSC dan SHED) dilakukan konfirmasi dengan teknik imunositokimia sebagai berikut: sebagian kecil sel punca yang telah dibiak dalam waktu 14 hari kemudian dikonfirmasi dengan antibodi anti human STRO-1 penanda sel punca mesensimal dengan cara:

pencucian dengan PBS 3 kali dan dilakukan *blocking* dengan penambahan larutan *blotto* untuk mencegah terjadinya *nonspecific binding* yang terdiri dari 5% *skim milk* dan ditambahkan larutan *tween 20* 0,03%, selanjutnya dicuci lagi dengan menggunakan PBS sebanyak 3 kali. Tahap berikutnya mereaksikan sel punca dengan antibodi anti STRO-1 yang berlabel Fluorecent isothiocyanat (FITC) yang sudah dilarutkan dalam *blotto* 2 µl/ml ke dalam *well* dan diinkubasi selama 20 menit dalam inkubator 37⁰C dan CO₂ 5%. Setelah 20 menit dilakukan pencucian ulang dengan PBS sebanyak 3 kali dan diamati melalui mikroskop dengan pembesaran 200x. Sel yang positif STRO-1 akan berfluoresensi berwarna biru dan diidentifikasi sebagai sel punca mesensimal yang berasal dari sel pulpa gigi permanen dan disidui. Sel punca pulpa gigi (DPSC dan SHED) sebagian dilakukan uji proliferasi sel punca pulpa gigi melalui uji viabilitas dengan metoda MTT menggunakan *trypan blue dye exclusion* yang sebelumnya dipapar dengan MTA dan NMT dan sebagian dilakukan uji diferensiasi sel punca pulpa gigi dan maturasi sel ke arah odontoblas.

4.6.3.2 Pengamatan Proliferasi, Diferensiasi Sel Punca dan Maturasi Sel Ke Arah Odontoblas yang Dipapar bahan NMT dan MTA

Setelah diperoleh sel punca mesensimal yang telah diperbanyak sampai tercapai keadaan *confluent*, kemudian disebar ke dalam 24 *well culture plate* yang berisi sekitar 10⁴ atau 2 X 10⁵ sel per ml dalam medium kultur (DMEM + 10% FBS/FCS + penisillin/streptomisin). Selanjutnya sel di dalam kultur plate tersebut dipapar dexamethason (10nM), ascorbid acid (50 µg/ul), dan glycerophosphate (10 mM) dan molekul bioaktif bubuk NMT dan MTA dengan konsentrasi 100 ng/ml pada setiap *well culture plate*. Pengamatan kemampuan proliferasi sel punca dilakukan dengan uji MTT sedangkan untuk mengamati diferensiasi sel punca ke galur sel odontoblas maka dilakukan uji ELISA untuk mendeteksi konsentrasi ALP, OC dan DSPP, dan untuk mengamati maturasi odontoblas dilakukan pewarnaan Von Kossa untuk mendeterminasi deposit kalsium pada kultur sel. Semua eksperimen di atas dilakukan dengan pengulangan 6 kali dalam 3 periode waktu yang berbeda.

4.6.3.3 Pengamatan Proliferasi Sel Punca Mesensimal Pulpa Gigi dengan Uji MTT

Pengamatan proliferasi sel dapat dilakukan dengan uji viabilitas sel punca mesensimal pulpa gigi dengan metoda MTT setelah dipapar MTA dan NMT. Uji ini banyak digunakan untuk mempelajari viabilitas sel. Uji viabilitas sel adalah untuk mengetahui kemungkinan suatu bahan atau obat dapat merangsang atau menghambat pertumbuhan sel (proliferasi) dan kemampuan sel untuk bertahan hidup. Tahapan tes viabilitas sebagai berikut:

1. Kultur DPSC dan SHED.

Kultur DPSC dan SHED yang digunakan dalam tes viabilitas ini adalah kultur yang telah dipanen, kemudian dihitung jumlah sel/ml dengan *trypan blue exclusion test* dan dihitung dengan *hemocytometer* dibawah mikroskop. Selanjutnya sebanyak 10^4 sel/well dikultur pada 96 well plate dan diinkubasi pada suhu 37°C dan 5% CO_2 selama 24 jam.

2. Pemaparan kultur sel dengan MTA dan NMT sebagai bahan uji.

Setelah 24 jam kultur sel pulpa tersebut dipaparkan dengan 50 μl MTA dan NMT, diamati mulai hari ke 1 sampai hari ke 3. Sebagai kontrol adalah medium (DMEM). Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C dan 5% CO_2 selama 4 jam.

3. Uji viabilitas sel pulpa gigi dengan MTT assay.

Kultur sel pulpa pada tiap *well* ditambah 15 μl MTT assay dan diinkubasi pada suhu 37°C dan 5% CO_2 selama 3 jam. Kemudian masing-masing *well* tersebut ditambahkan 15 μl acidified isopropanol dan dilakukan shaker selama 1 jam. Hasilnya dibaca dengan microplate reader dengan panjang gelombang 405 nm. Nilai absorbansi NMT dihitung prosentasinya dibandingkan dengan nilai absorbansi kelompok kontrol.

4.6.3.4 Pengamatan Diferensiasi Sel Punca Mesensimal Pulpa Gigi dan Maturasi Sel Ke Arah Odontoblas

Untuk mengamati diferensiasi sel punca mesensimal pulpa gigi setelah dipapar MTA dan NMT, dilakukan uji ELISA untuk mendeteksi konsentrasi ALP, OC dan DSPP, sedangkan untuk mengamati maturasi sel ke arah odontoblas

dilakukan pewarnaan Von Kossa untuk mendeterminasi deposit kalsium pada kultur sel, sebagai berikut:

1. Untuk mengukur aktivitas ALP menggunakan reaksi *colorimetri* ALP dengan mereaksikan supernatan MTA dan NMT dengan substratspesifik ALP yang berfluoresensi. Jumlah fluoresensi menunjukkan jumlah aktivitas ALP. Cara kerja pengukuran aktivitas ALP adalah: Masukkan reagen *buffer* 290 μl Dietanolamin 1 M ; dengan pH 9,8 ke dalam *well plate* berukuran 300 μl kemudian ditambahkan larutan *p-nitrophenyl phosphate* 0,65 M (247 mg/1 ml H₂O) sebanyak 5 μl , diinkubasi pada suhu 37^oC selama 5 menit. Masing-masing *well* ditambah sampel (MTA, NMT dan *blank*) 5 μl , dan dicampurkan di dalam *microplate*. Selanjutnya *microplate* tersebut dimasukkan ke dalam mesin *microplate reader/ELISA* dan dibaca pada panjang gelombang 405 nm.
2. Uji ELISA untuk mengukur konsentrasi osteocalcin menggunakan human osteocalcin instant Elisa Kit, dimana pada dasar plate Elisa telah dilapisi antibodi anti human osteocalcin. Dengan *Standard curve human osteocalcin instant ELISA* yang telah ditetapkan. Pemeriksaan ini dilakukan untuk menganalisis aktivitas odontoblas. Cara kerja pengukuran aktivitas OC adalah sebagai berikut : *well plate* yang akan diisikan sampel diisi H₂O 100 μl , sedang *well-well* standar dan *blank* diisi H₂O 150 μl . Selanjutnya masing-masing *well* diisi supernatant kultur sel 25 μl , kemudian digetarkan dengan kecepatan 100 rpm selama 2 jam. Setelah dicuci *well plate* dengan 400 μl wash *buffer* 3 kali, balik *well plate* diatas kertas penyerap air 5 menit, supaya kering. Setelah *well plate* kering, masing-masing *well* diberi cairan TMB substract 100 μl , lalu tutup *well plate* untuk menghindari cahaya secara langsung. Kemudian *well plate* digetarkan dengan kecepatan 100 rpm 15 menit dan masing-masing *well* ditambah 50 μl stop *buffer*. Hasilnya dibaca pada mesin pembaca ELISA dengan panjang gelombang 450 nm. Nilai absorbansi dari masing-masing standard dan sampel sebanding dengan jumlah ikatan antara antigen-antibodi yang terkandung pada masing-masing *well* tersebut. Kurva standard human OC diperoleh dengan memasukkan nilai log absorbansi dan nilai log standard human osteocalcin yang telah diketahui

konsentrasinya (75 ng/ml; 37.5 ng/ml; 18.8 ng/ml; 9.4 ng/ml; 4.7 ng/ml; 2.3 ng/ml; 1.2 ng/ml dan 0 ng/ml) sehingga akan diperoleh sebuah persamaan linier dari kurva tersebut. Konsentrasi masing-masing sampel diperoleh dengan cara memasukkan nilai log absorbansi sampel pada persamaan linier kurva standard human OC tersebut diatas.

3. Uji Elisa untuk mengukur DSPP digunakan human DSPP ELISA Kit dimana pada dasar plate telah dilapisi antibodi anti human DSPP. Secara umum metode pengerjaan Human DSPP ELISA dapat dijelaskan sebagai berikut: sebanyak 100 µl standard human DSPP atau sampel dimasukkan ke masing-masing well plate ELISA yang telah di pre-coat dengan antibodi monoclonal yang spesifik terhadap DSPP. Kemudian ditambahkan 100 µl biotin-conjugated poliklonal antibody dan dilanjutkan dengan penambahan 100 µl avidin-conjugated HRP. Keberadaan ikatan antara antigen-antibodi DSPP dideteksi dengan menambahkan 90 µl TMB substrate yang ditunjukkan dengan adanya perubahan warna menjadi kebiruan pada masing-masing well plate ELISA. Reaksi enzim-substrat tersebut kemudian dihentikan dengan menambahkan 50 µl stop solution yang mengandung asam sulfat dan segera dilakukan pembacaan absorbansi pada panjang gelombang $450\text{nm} \pm 2 \text{ nm}$. Nilai absorbansi dari masing-masing standard dan sampel sebanding dengan jumlah ikatan antara antigen-antibodi yang terkandung pada masing-masing well tersebut. Kurva standard human DSPP diperoleh dengan memasukkan nilai log absorbansi dan nilai log standard human DSPP yang telah diketahui konsentrasinya (20 ng/ml; 10 ng/ml; 5 ng/ml; 2.5 ng/ml; 1.25 ng/ml; 0.625 ng/ml; 0.312 ng/ml dan 0 ng/ml) sehingga akan diperoleh sebuah persamaan linier dari kurva tersebut. Konsentrasi masing-masing sampel diperoleh dengan cara memasukkan nilai log absorbansi sampel pada persamaan linier kurva standard human DSPP tersebut diatas.
4. Untuk mengukur deposit kalsium digunakan pewarnaan von Kossa yang dilakukan setelah kultur sel punca yang dipapar NMT dan MTA. Pemeriksaan di bawah mikroskop jika ditemukan pada sel tersebut terdapat warna bintik hitam menunjukkan adanya ion kalsium, warna merah adalah nucleus dan warna pink adalah sitoplasma. Apabila tidak terdapat bintik

hitam berarti sel tersebut tidak mengandung ion kalsium. Bintik hitam tersebut kemudian dihitung jumlahnya dibandingkan dengan sel yang tidak ada bintik hitam dalam bentuk prosentasi. Cara kerja pengukuran jumlah deposit kalsium sebagai berikut : setelah dilakukan pembiakan DPSC dan SHED yang dipapar NMT dan MTA pada plat kultur, medium pembiakan dibuang, dan dicuci dengan PBS, ditambahkan 1 % silver nitrat , kemudian diletakkan di dalam UV selama 20 menit. Setelah 20 menit dicuci dengan akuades dan ditambahkan *sodium thiosulfat* selama 5 menit. Dilakukan lagi pencucian biakan dengan akuades. Kemudian diwarnai dengan *Nuclei Fast red* selama 5 menit. Cuci dengan akuades dan diperiksa menggunakan mikroskop.

4.7 Manajemen dan Analisis Data

4.7.3 Manajemen Data

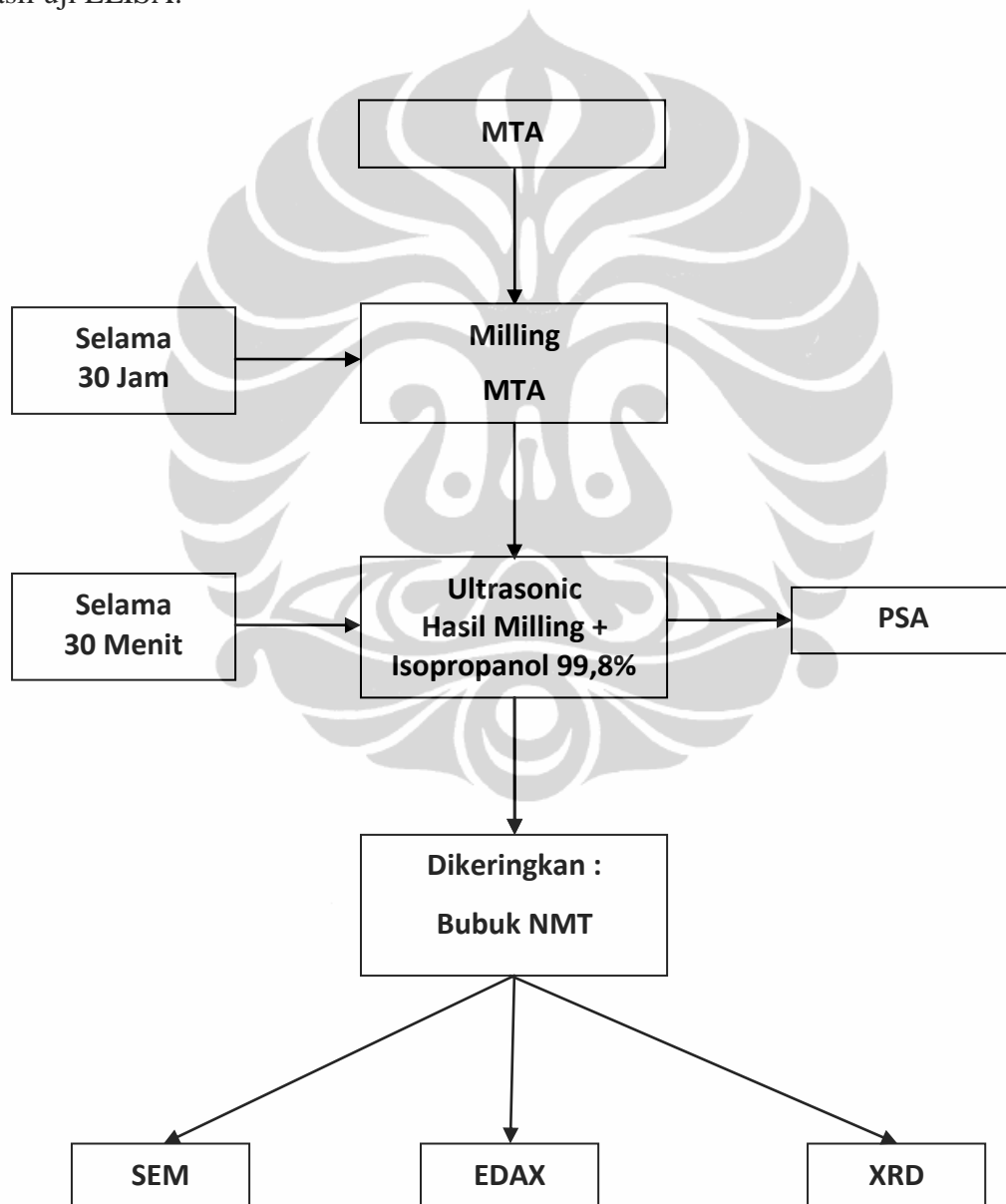
Hasil data uji HEM, PSA, SEM, EDAX, XRD serta hasil uji ELISA disimpan dalam bentuk data digital menggunakan komputer sebagai arsip yang tersimpan sebagai perangkat lunak dan keras (*soft dan hard copy*).

4.7.4 Analisis Data

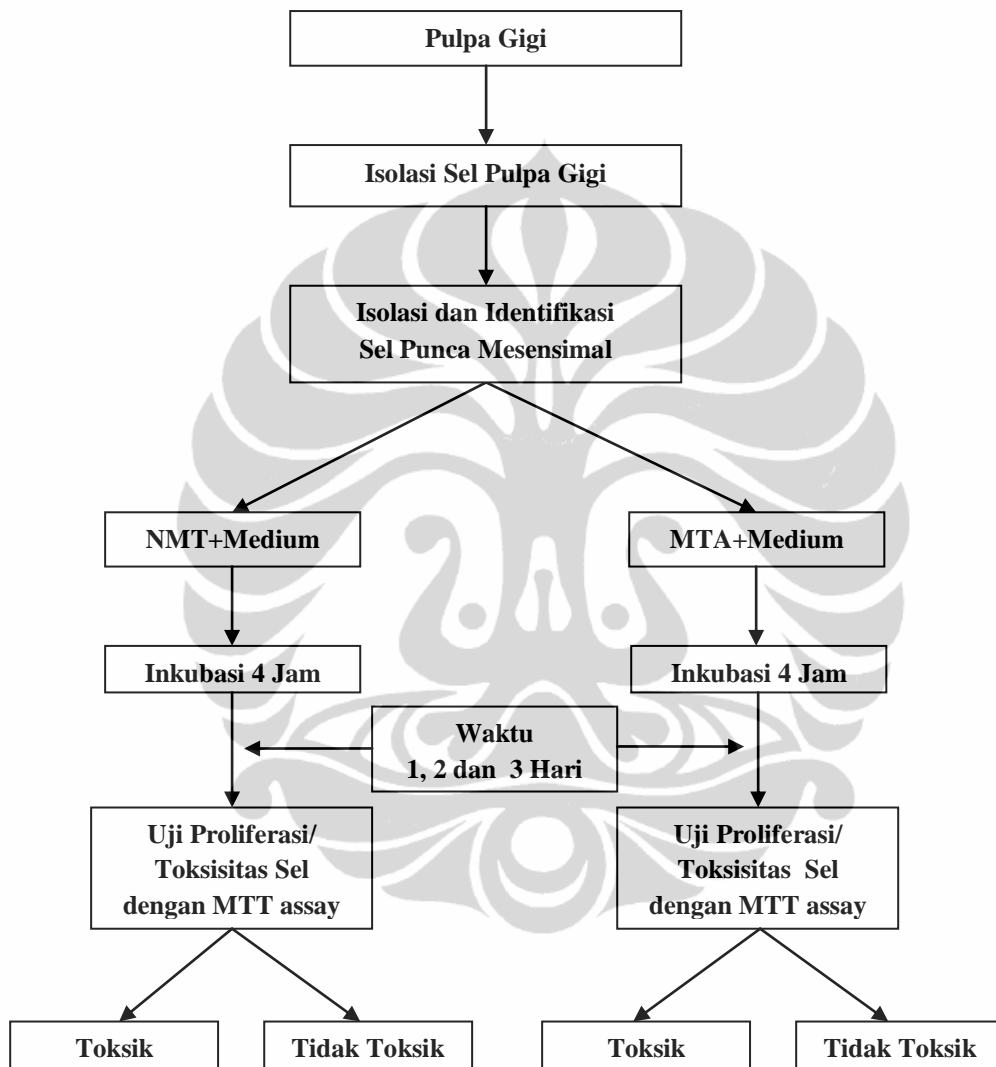
Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini adalah data numerik berdasarkan hasil uji ELISA. Data tersebut akan diuji dengan T test berpasangan dan tidak berpasangan (*independen*) apabila data berdistribusi normal dan variansnya homogen. Bila data tersebut tidak berdistribusi normal dan varians tidak homogen diupayakan melakukan transformasi data agar berdistribusi normal dan varians homogen. Tetapi jika variabel hasil transformasi data tetap tidak berdistribusi normal dan varians tidak homogen maka digunakan uji Wilcoxon untuk berpasangan dan Mann Whitney untuk tidak berpasangan (uji non parametrik).. Untuk mengetahui korelasi antara marker odontoblas dan deposit kalsium digunakan korelasi Pearson jika data berdistribusi normal, Bila data tersebut tidak berdistribusi normal digunakan uji korelasi Spearman (uji non parametrik).

4.8 Alur Penelitian

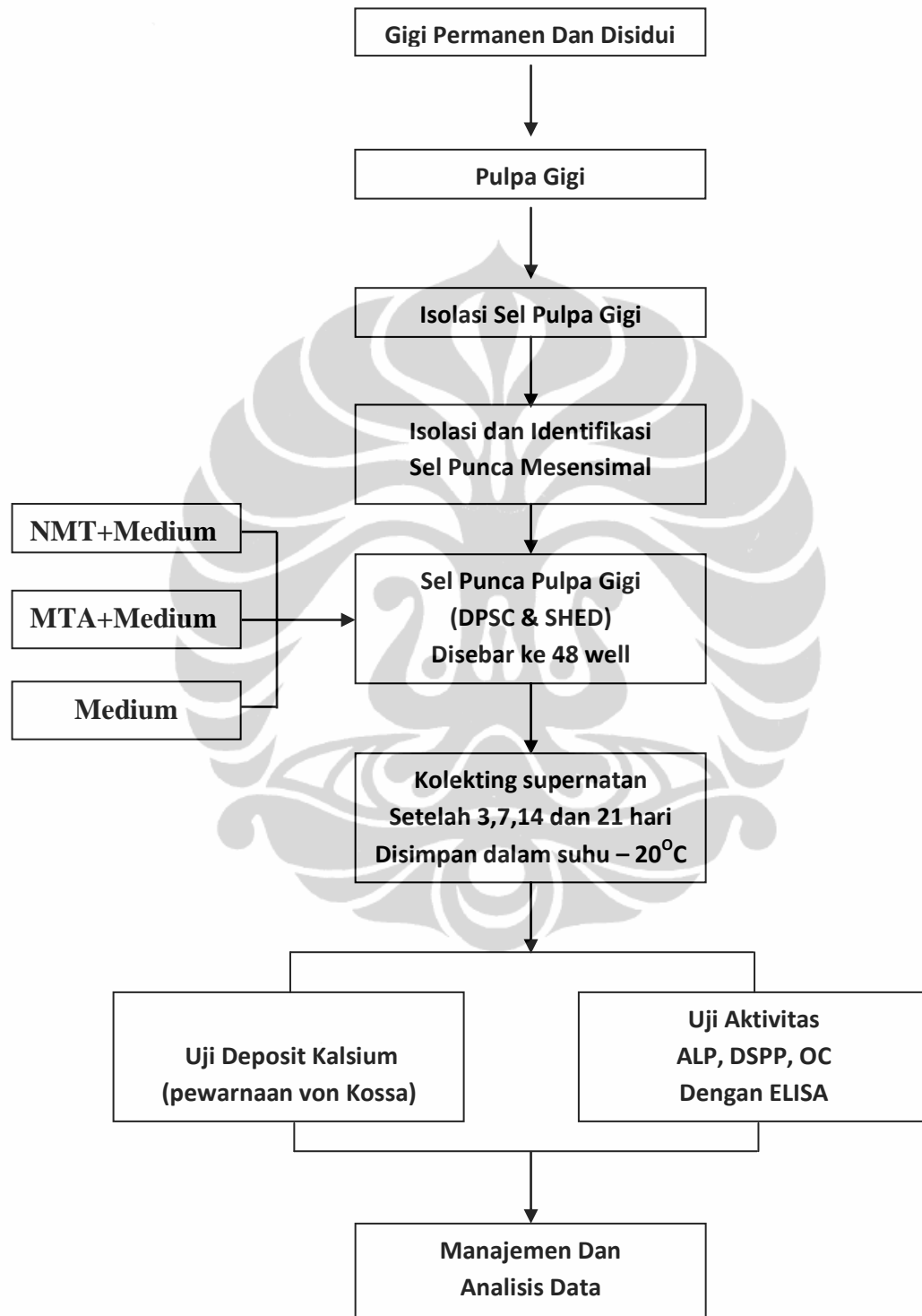
Gambar 4.1, 4.2 dan 4.3 menunjukkan urutan cara kerja penelitian yang meliputi pembuatan nanopartikel dan analisis unsur serta senyawa NMT, tes viabilitas sel dan pembuatan kultur sel pulpa gigi permanen dan disidui, penyortiran sel punca gigi permanen dan disidui (DPSC dan SHED), penambahan medium dan bahan penelitian NMT dan MTA, identifikasi dan kuantifikasi marker odontoblas, yang terakhir adalah uji statistik dari data yang di peroleh dari hasil uji ELISA.



Gambar 4.1. Skema alur penelitian tahap 1



Gambar 4.2. Skema alur penelitian tahap 2



Gambar 4.3. Skema alur penelitian tahap 3

BAB 5

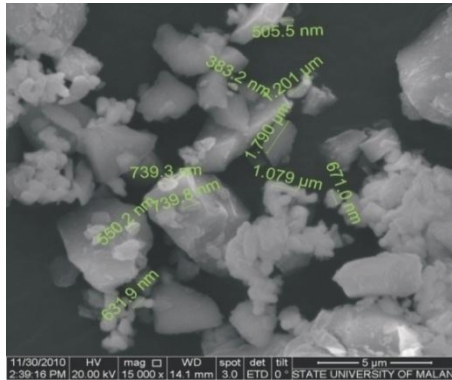
HASIL PENELITIAN

Penelitian ini bertujuan memodifikasi ukuran MTA dengan menggunakan *hight energy milling* (HEM) sehingga menjadi berukuran nano (<100 nm) yang disebut NMT dan menganalisis kemampuan NMT tersebut terhadap: 1) proliferasi sel (pertumbuhan sel) dengan menganalisis uji viabilitas sel 2) diferensiasi sel punca ke arah odontoblas dengan menganalisis aktifitas Alkaline phosphatase (ALP), Osteocalcin (OC), Dentin sialophospho-protein (DSPP) 3) maturasi sel ke arah odontoblas dengan menganalisis peningkatan deposit kalsium dan pembentukan matrik ekstrasellular yang diisolasi dari DPSC dan SHED.

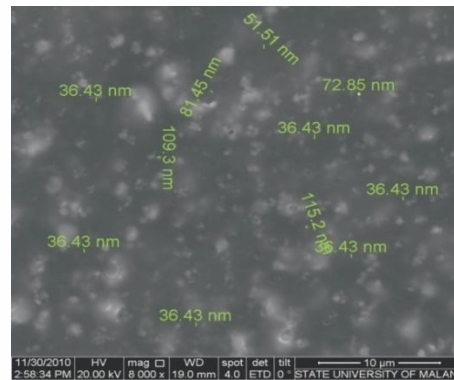
5.1. Modifikasi MTA Menjadi NMT

Mineral trioxide aggregate (MTA) yang diperoleh dari pembelian di pasaran Jakarta dimodifikasi menjadi material berukuran nano. Sampel MTA tersebut kemudian dilakukan *milling* dengan alat *hight energy milling* (HEM) selama 30 jam. Sampel yang diperoleh dari hasil HEM dilarutkan dalam cairan pelarut isopropanol 99,8% dan dilakukan ultrasonic selama 30 menit sehingga diperoleh sampel baru berukuran nano < 100 nm yang kemudian disebut nanopartikel mineral trioksida (NMT). Nanopartikel mineral trioksida (NMT) ini kemudian distribusi dan besar/bentuk partikelnya dilihat gambaran mikro strukturnya dan komposisi permukaannya dengan alat *scanning electron microscopy* (SEM) dan *energy dispersive analysis with X-ray* (EDAX). Komposisi MTA dan NMT dianalisis menggunakan *X-ray diffraction* (XRD).

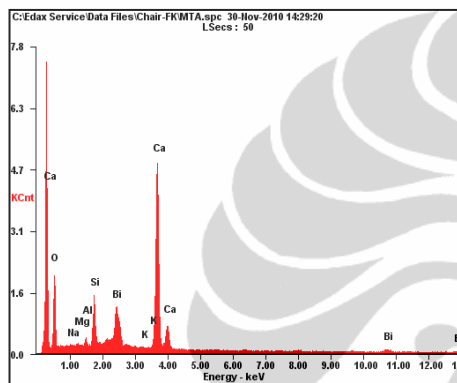
Hasil penelitian menggunakan SEM dan EDAX terhadap MTA dan NMT, menunjukkan bahwa ukuran partikel MTA antara 330 nm - 1 μm (< 1 μm) atau rata-rata 0,508 μm , sedang NMT mempunyai ukuran partikel < 115 nm atau rata-rata 75,8 nm. Komposisi pada permukaan yang dominan pada NMT adalah kalsium dan silikat yang lebih banyak dari MTA (Gambar 5.1: A-D).



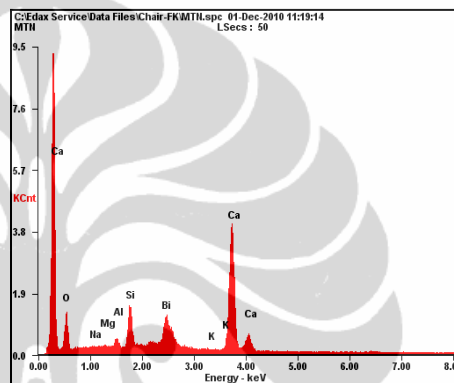
Gambar 5.1 A



Gambar 5.1 B



Gambar 5.1 C

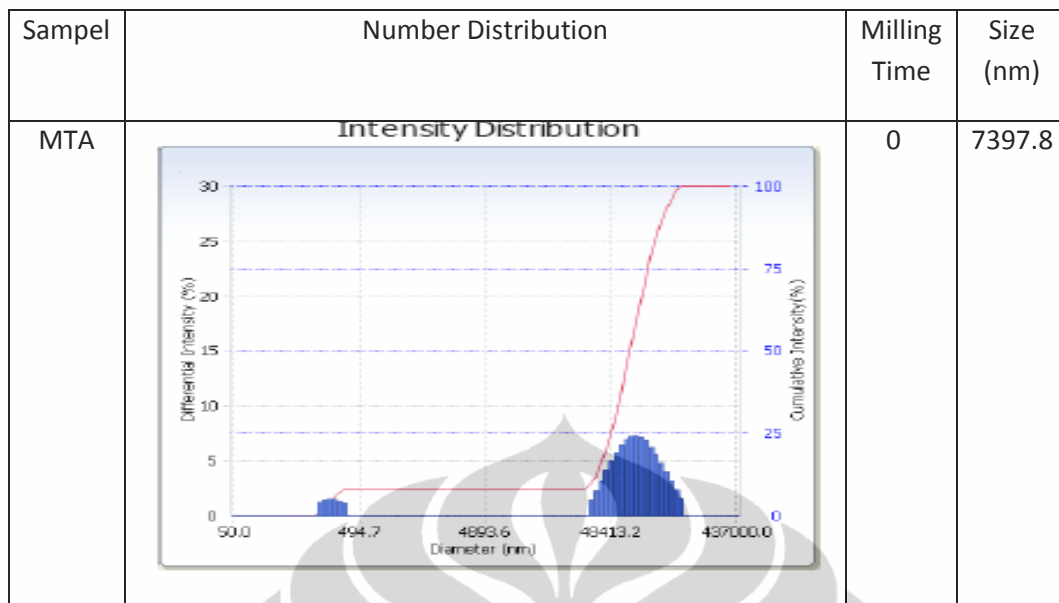


Gambar 5.1 D

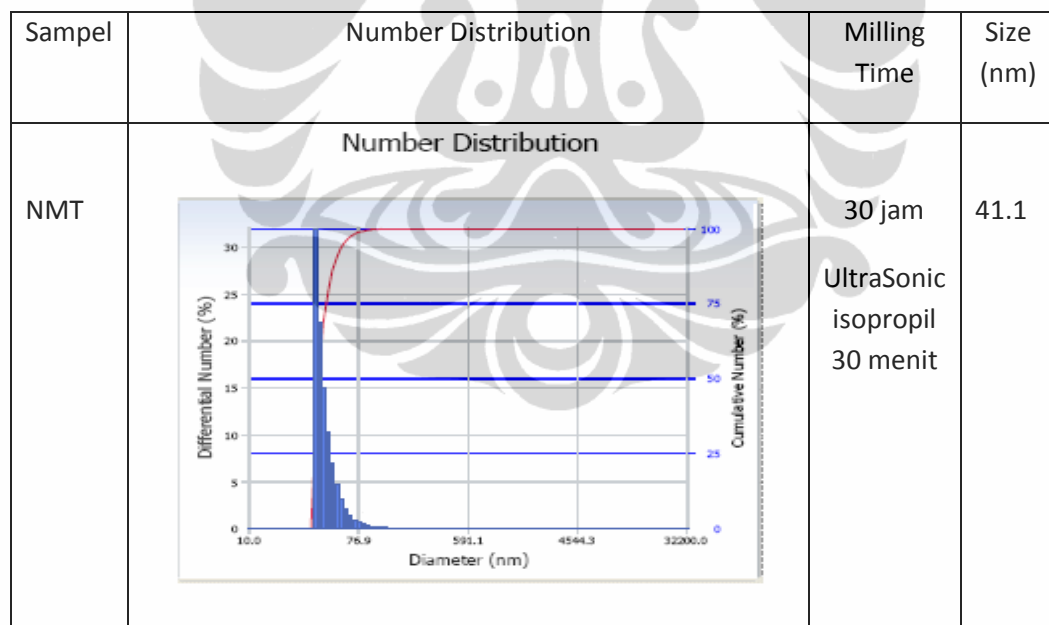
Gambar 5.1. Hasil SEM dan EDAX dari MTA dan NMT (A) Hasil SEM MTA mempunyai ukuran partikel antara 330 nm – 1 µm atau rata-rata 0,508 µm. (B) Hasil SEM NMT mempunyai ukuran partikel nano antara 36 nm - 115 nm atau rata-rata 75,8 nm. (C) Hasil EDAX MTA jumlah kalsium yang tertinggi diikuti oleh oksida, bismuth dan silikat. (D) Hasil EDAX NMT jumlah kalsium dan silikat tertinggi diikuti oksida dan bismuth

Hasil penelitian ini yang membuktikan bahwa MTA mempunyai ukuran partikel antara 330 nm – 1 µm ($< 1 \mu\text{m}$) atau rata-rata 0,508 µm dan NMT mempunyai ukuran partikel $< 115 \text{ nm}$ atau rata-rata 75,8 nm (nano size).

Pada penelitian ini juga dilakukan analisis ukuran partikel (*particle size analysis/ PSA*) terhadap MTA dan NMT. Hasil PSA menunjukkan ukuran partikel MTA sebesar 7,4 µm. Pengukuran partikel NMT dengan PSA menunjukkan ukuran partikelnya sebesar 41,1nm. Hasil PSA lebih akurat dibanding SEM dan EDAX karena PSA alat untuk mengetahui kuantifikasi ukuran partikel, sedangkan SEM dan EDAX untuk mengetahui gambaran mikro struktur, ukuran dan komposisi partikel pada permukaan. Pada penelitian ini ukuran partikel yang digunakan adalah hasil pengukuran dengan PSA. (Gambar 5.2 A-B).



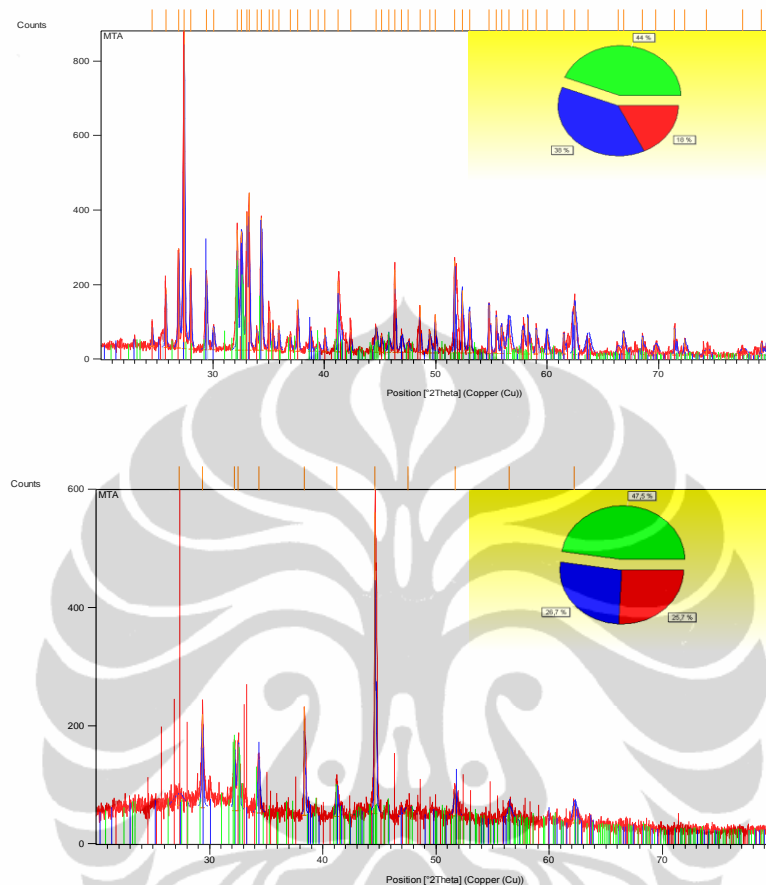
Gambar 5.2 A. Hasil Pengukuran PSA terhadap MTA dengan Ukuran Partikel 7397,8 nm atau 7,4 μm



Gambar 5.2 B. Hasil Pengukuran PSA terhadap NMT dengan Ukuran Partikel 41,1 nm (*nano size*)

\Analisis XRD yang dilakukan pada penelitian ini terhadap MTA dan NMT menemukan komposisi MTA terdiri dari trikalsium silikat (38%), dikalsium silikat (44%) dan bismut oksida (18%), sedangkan komposisi NMT terdiri dari

trikalsium silikat (26,7%), dikalsium silikat (47,5%) dan bismut oksida (25,7%) (Gambar 5.3 A-B)



Gambar 5.3. A. Hasil XRD MTA dan B. Hasil XRD NMT.

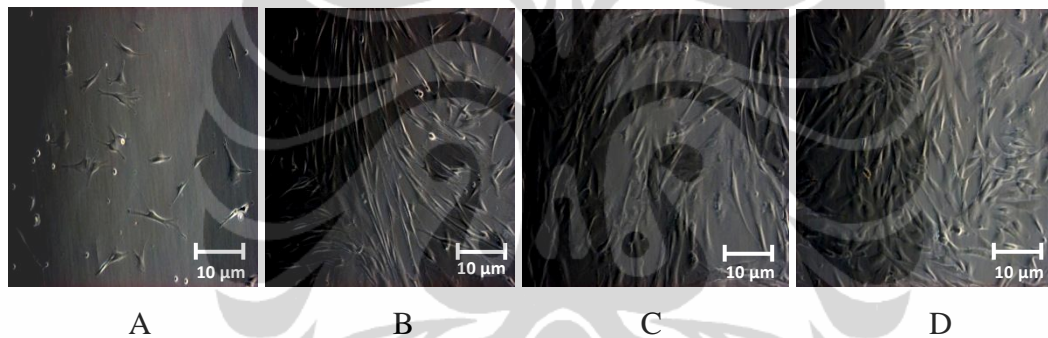
Pada Gambar 5.3 A dan B menunjukkan tidak terjadi perubahan komposisi namun terjadi perubahan jumlah masing-masing komposisi dan juga penurunan derajat kristalinitas pada MTA setelah menjadi NMT yang artinya keteraturan susunan atom menurun menjadi tidak teratur, yang berarti material NMT bersifat *amorphous*.

5.2. Kultur Sel Pulpa Gigi dan Sel Punca Pulpa Gigi

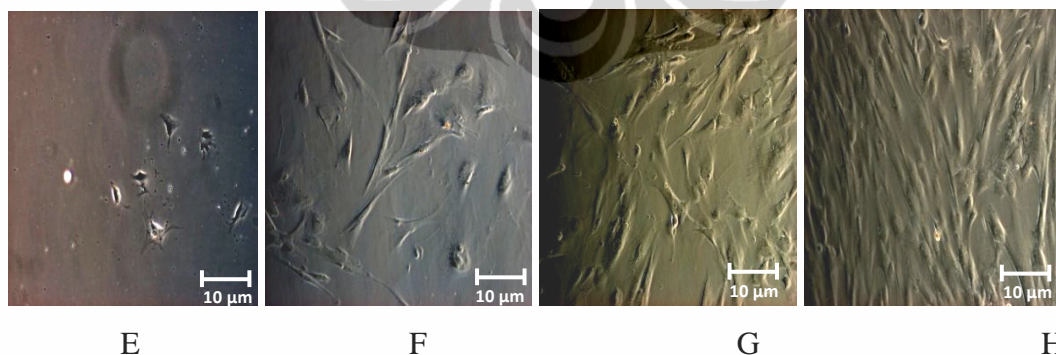
Sel punca dalam penelitian ini diperoleh dari sel pulpa gigi permanen dan gigi disidui. Sampel sel pulpa gigi permanen diperoleh dari gigi molar 3 karena impaksi dan gigi premolar yang indikasi ekstraksi untuk perawatan ortodonsi, bebas karies yang baru diekstraksi di klinik Bedah Mulut FKG UI dan gigi disidui persistensi yang baru diekstraksi di klinik IKGA FKG UI. Gigi direndam DMEM

komplit 3-5 ml selama 1-2 menit kemudian dicuci dengan PBS 3x a 2 ml. Gigi tersebut kemudian dipecah menjadi dua dengan mortar jaringan pulpanya diambil dan suspensi sel yang diperoleh disentrifugasi untuk mendapatkan endapan (pellet) dimasukkan ke DMEM. Selanjutnya menghitung jumlah sel yang akan dimasukkan ke dalam *tissue culture plate*. Densitas sel yang diperlukan sekitar 10^4 atau 2×10^5 sel per ml. Untuk menghitung sel digunakan *haemocytometer*. Sel yang diperoleh tersebut diinkubasi dalam inkubator dengan atmosfir terdiri dari 95% O_2 dan 5% CO_2 temperatur $37^{\circ}C$ selama 48 jam.

Kultur sel pulpa baru berhasil setelah 2 bulan, setelah dilakukan kultur berulang-ulang dengan sampel gigi yang berbeda-beda. Hambatan yang dijumpai saat kultur sel pulpa gigi dalam penelitian ini karena terjadi kontaminasi.



Gambar 5.4. Gambaran mikroskopik sel pulpa gigi permanen: (A) Sel pulpa gigi permanen hari ke 1. (B) Sel pulpa gigi permanen hari ke 7. (C) Sel pulpa gigi permanen hari ke 14. (D) Sel pulpa gigi permanen hari ke 21. (Pembesaran 100x)

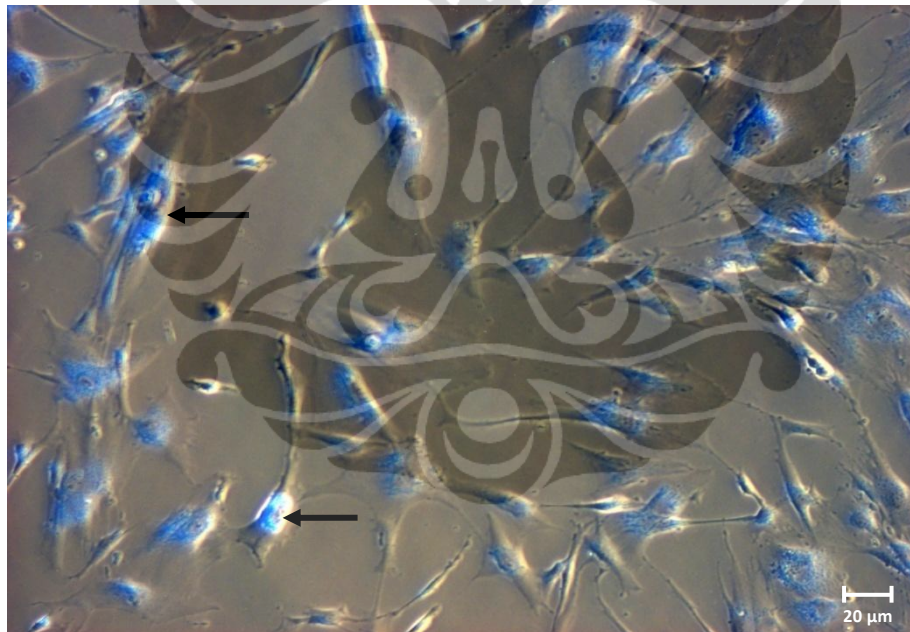


Gambar 5.5. Gambaran mikroskopik sel pulpa gigi disidui: (E) Sel pulpa gigi disidui hari ke 1. (F) Sel pulpa gigi disidui hari ke 7. (G) Sel pulpa gigi disidui hari ke 14. (H) Sel pulpa gigi disidui hari ke 21. (Pembesaran 100x)

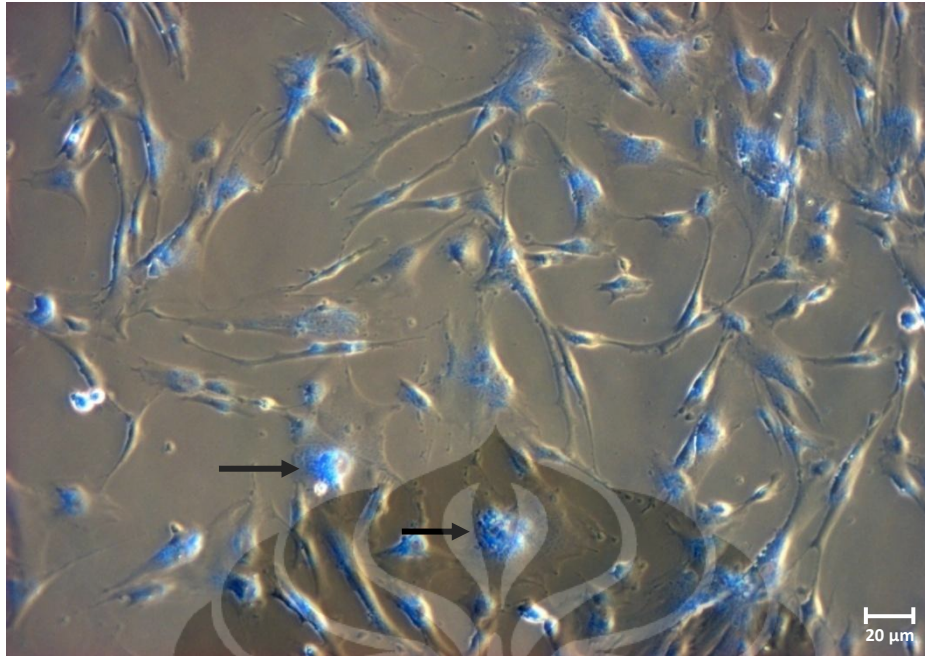
Gambaran mikroskopik hasil kultur sel pulpa gigi disidui pada hari ke 1 dan ke 7 terlihat berbeda dengan sel pulpa gigi permanen. Hal ini disebabkan jumlah sel pulpa yang diambil dari gigi disidui lebih sedikit dari gigi permanen.

Gigi disidui berasal dari gigi anterior yang sebagian akarnya sudah mengalami resorpsi (maksimal 2/3 akar yang mengalami resorpsi) . Sedangkan sel pulpa gigi permanen diambil dari gigi posterior yaitu premolar dan molar dengan akar masih utuh dan jumlah sel pulpanya lebih banyak. Selanjutnya hari ke 14 dan ke 21 morfologi sel pulpa gigi permanen dan gigi disidui sudah terlihat sama dan pada hari ke 21 sudah mencapai keadaan *confluent* (Gambar 5.4 dan 5.5)..

Setelah dilakukan kultur sel pulpa kemudian dilakukan isolasi sel punca mesensimal menggunakan *magnetic bead* dan antibioti anti STRO-1 (penanda sel punca mesensimal). Selanjutnya hasil isolasi tersebut dilakukan identifikasi sel punca dengan teknik imunositokimia menggunakan antibodi anti STRO-1 berlabel FITC. Hasil isolasi sel punca menunjukkan 100% positif STRO-1 (Gambar 5.6 dan 5.7).

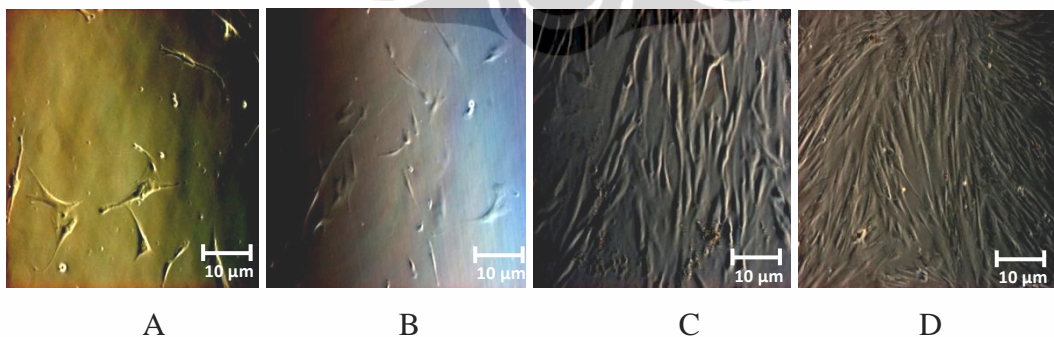


Gambar 5.6. Identifikasi DPSC dengan Teknik Imunositokimia. Sel Punca yang Positif STRO-1 Berfluoresensi Warna Biru Diidentifikasi sebagai Sel Punca Mesensimal (DPSC) Tanda Panah Menunjukkan DPSC (Pembesaran 200x)

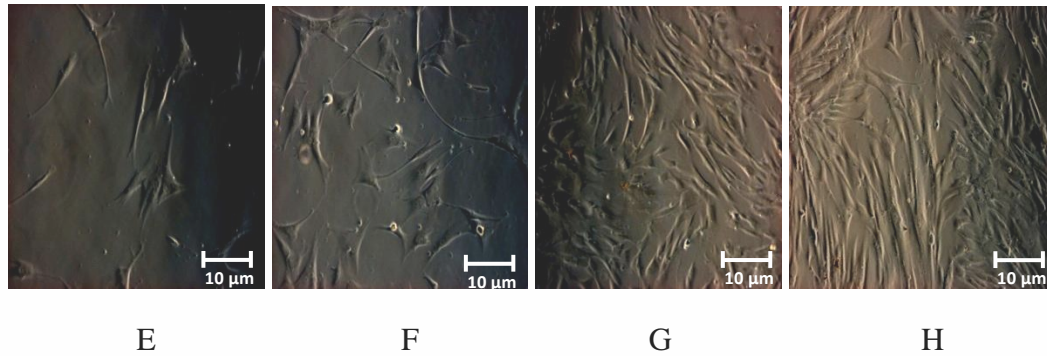


Gambar 5.7. Identifikasi SHED dengan Teknik Imunositokimia. Sel Punca yang Positif STRO-1 Berfluoresensi Warna Biru Diidentifikasi sebagai Sel Punca Mesensimal (SHED). Tanda Panah Menunjukkan SHED. (Pembesaran 200x)

Hasil kultur sel punca mesensimal yang berasal dari sel pulpa gigi setelah diidentifikasi dengan STRO-1 merupakan sampel penelitian ini. Kultur sel punca yang positif STRO-1 *confluent* pada hari ke 17. Sampel sel punca (DPSC dan SHED) selanjutnya sebagian digunakan untuk uji viabilitas, pengukuran aktivitas kadar ALP, OC, DSPP dan deposit kalsium (Gambar 5.8 dan 5.9)



Gambar 5.8. Gambaran mikroskopik sel punca gigi permanen (DPSC): (A) DPSC hari ke 1. (B) DPSC hari ke 5. (C) DPSC hari ke 14. (D) Kultur DPSC hari ke 17. (Pembesaran 100x)

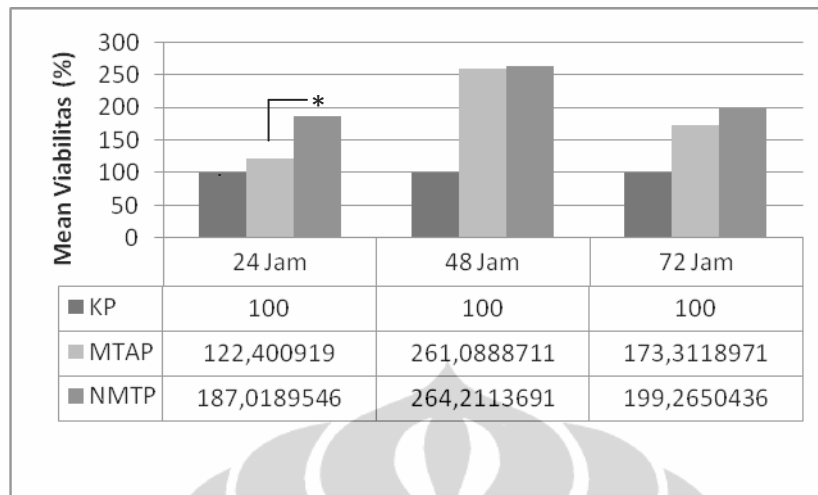


Gambar 5.9. Gambaran mikroskopik sel punca gigi disidui (SHED): (E) SHED hari ke 1. (F) SHED hari ke 5. (G) SHED hari ke 14. (H) SHED hari ke 17. (Pembesaran 100x)

5.3. Efek MTA dan NMT Terhadap Proliferasi Sel Punca Mesensimal Pulpa Gigi

Proliferasi adalah laju pertumbuhan sel punca pulpa gigi yang mengindikasikan viabilitas sel setelah dipapar MTA dan NMT. Pengamatan proliferasi sel dapat dilakukan dengan uji viabilitas sel punca mesensimal pulpa gigi dengan metoda MTT banyak digunakan untuk mempelajari viabilitas sel. Metoda ini dapat mengukur aktivitas metabolisme dari pertumbuhan sel dan sangat berguna untuk menentukan pertumbuhan sel sebagai respon terhadap bahan uji. Uji viabilitas digunakan untuk menganalisis toksisitas NMT yang mungkin dapat merangsang atau menghambat viabilitas DPSC dan SHED. Bahan NMT yang dipaparkan tersebut dikatakan toksik apabila prosentasinya dibawah 100%. Viabilitas sel membuktikan terjadinya respon sel dalam waktu pendek seperti perubahan permiabilitas membran. Viabilitas sel merupakan salah satu tanda toksik/tidaknya suatu bahan atau obat.¹⁰¹ Uji viabilitas dengan metoda MTT yang dilakukan dalam penelitian ini terhadap DPSC dan SHED yang dipapar NMT dan MTA sebanyak 2 mg. Hasilnya menunjukkan bahwa NMT maupun MTA pada hari ke 1 (24 jam) sampai dengan hari ke 3 (72 jam) di atas 100%., artinya kedua bahan tersebut tidak toksik terhadap sel pulpa gigi permanen maupun disidui.

Pada Gambar 5.10 terlihat bahwa viabilitas DPSC yang terpapar MTA dan NMT mempunyai nilai mean di atas kontrol pada hari ke 1, 2 dan 3. Nilai mean tertinggi terjadi pada hari ke 2. Hal ini menunjukkan bahwa NMT maupun MTA tidak toksik terhadap DPSC. Nilai NMT terlihat lebih tinggi dari MTA.

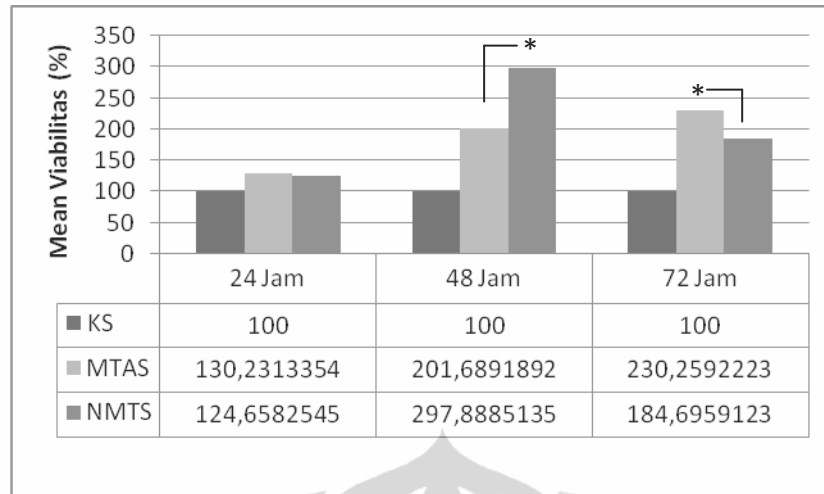


Gambar 5.10. Viabilitas DPSC Hari ke 1, 2, 3
 **) $p < 0,01$; *) $p < 0,05$; Error bar = Standar deviasi

Setelah dilakukan analisis secara statistik diperoleh hasil bahwa pada hari ke 1, terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,01$) viabilitas DPSC yang dipapar NMT dengan kontrol. Viabilitas DPSC yang terpapar NMT dengan MTA berbeda bermakna ($p < 0,05$)

Pada hari ke 2 uji viabilitas DPSC ternyata terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,01$) antara viabilitas DPSC yang dipapar NMT dengan kontrol dan antara viabilitas DPSC yang terpapar MTA dengan kontrol. Sedangkan antara viabilitas DPSC yang dipapar NMT dan MTA pada hari ke 2 tidak berbeda bermakna ($p > 0,05$). Pada hari ke 3 terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,01$), antara viabilitas DPSC yang dipapar MTA dengan kontrol dan antara NMT dengan kontrol juga terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,01$), sedangkan antara NMT dan MTA pada hari ke 3 tidak berbeda bermakna ($p > 0,05$).

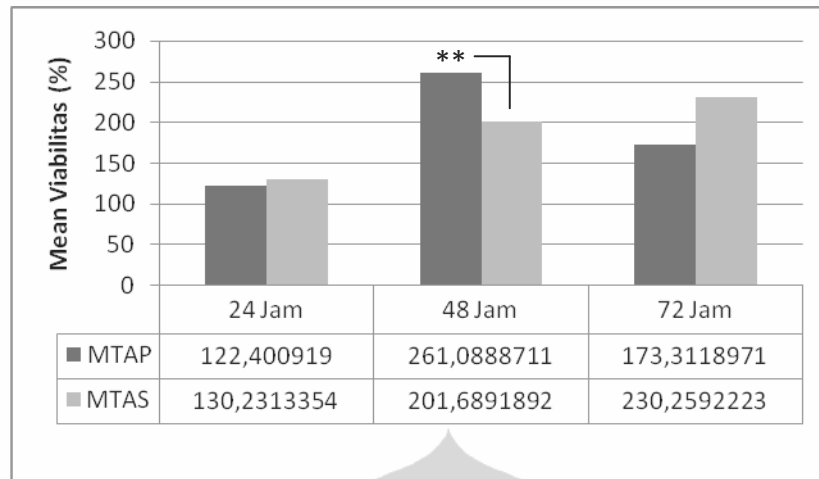
Uji viabilitas SHED, terlihat bahwa viabilitas SHED hasil uji MTT yang dipapar MTA dan NMT mempunyai nilai mean di atas kontrol, baik pada hari ke 1, ke 2 maupun ke 3. Nilai mean tertinggi terjadi pada hari ke 2. Hal ini menunjukkan bahwa NMT maupun MTA tidak toksis terhadap SHED. Nilai NMT terlihat lebih tinggi dari nilai MTA hanya pada hari ke 2, sedangkan pada hari ke 1 dan ke 3 nilai mean MTA lebih tinggi dari NMT (Gambar 5.11).



Gambar 5.11. Viabilitas SHED Hari ke 1, 2, 3
 (***) $p < 0,01$; (*) $p < 0,05$; Error bar = Standar deviasi

Hasil analisis statistik pada hari ke 1 diketahui bahwa ada perbedaan bermakna ($p < 0,05$) antara viabilitas SHED yang dipapar NMT dengan kontrol dan antara MTA dengan kontrol. Sedangkan antara viabilitas SHED yang dipapar NMT dengan MTA tidak bermakna ($p > 0,05$). Pada hari ke 2 terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,01$) antara NMT dengan kontrol dan MTA dengan kontrol. Begitu pula antara viabilitas SHED yang dipapar NMT dengan MTA terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$). Uji viabilitas SHED pada hari ke 3 terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,01$), antara NMT dengan kontrol dan antara MTA dengan kontrol. Viabilitas SHED yang dipapar MTA dengan NMT terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$)

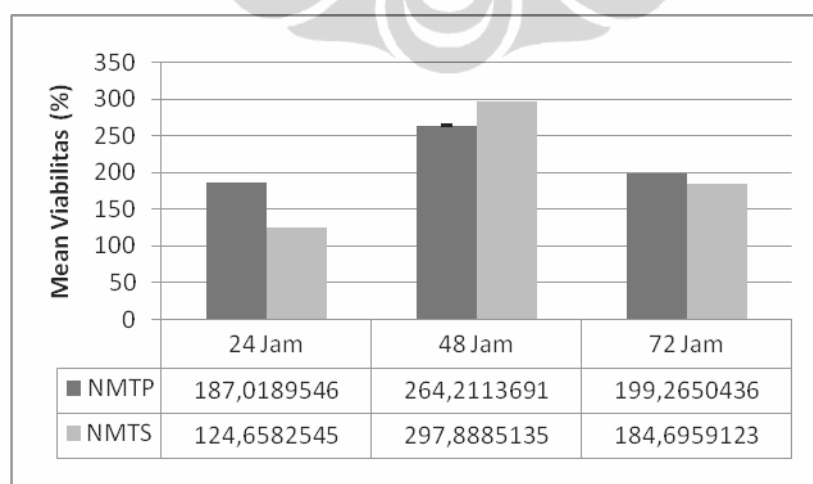
Hasil uji viabilitas DPSC dan SHED terlihat bahwa viabilitas SHED yang dipapar MTA terus meningkat dari hari ke 1 sampai ke 3, sedangkan viabilitas DPSC yang dipapar MTA tertinggi pada hari ke 2 dan menurun lagi pada hari ke 3 (Gambar 5.12).



Gambar 5.12. Viabilitas DPSC dan SHED yang Dipapar MTA Hari ke 1, 2, 3
 **) $p < 0,01$; *) $p < 0,05$; Error bar = Standar deviasi

Pada hari ke 1 (24 jam) dan ke 3 (72 jam) tingkat viabilitas DPSC lebih tinggi dari SHED tetapi hasil uji uji statistik pada hari ke 1 dan ke 3 tidak terdapat perbedaan bermakna antara tingkat viabilitas SHED dengan viabilitas DPSC yang dipapar MTA ($p > 0,05$). Viabilitas DPSC lebih tinggi dari SHED yang dipapar MTA terjadi pada hari ke 2 (48 jam) dan terdapat perbedaan bermakna antara ($p < 0,01$).

Tingkat viabilitas DPSC yang terpapar NMT pada hari ke 1 dan ke 3 lebih tinggi dari viabilitas SHED, kecuali pada hari ke 2, tingkat viabilitas SHED yang dipapar NMT lebih tinggi dari viabilitas DPSC (Gambar 5.13).



Gambar 5.13. Viabilitas DPSC dan SHED yang Dipapar NMT Hari ke 1, 2, 3
 **) $p < 0,01$; *) $p < 0,05$; Error bar = Standar deviasi

Berdasarkan hasil uji statistik ternyata tidak ada perbedaan yang bermakna antara tingkat viabilitas DPSC dengan SHED pada hari ke 1, 2 dan 3 yang dipapar NMT ($p > 0,05$).

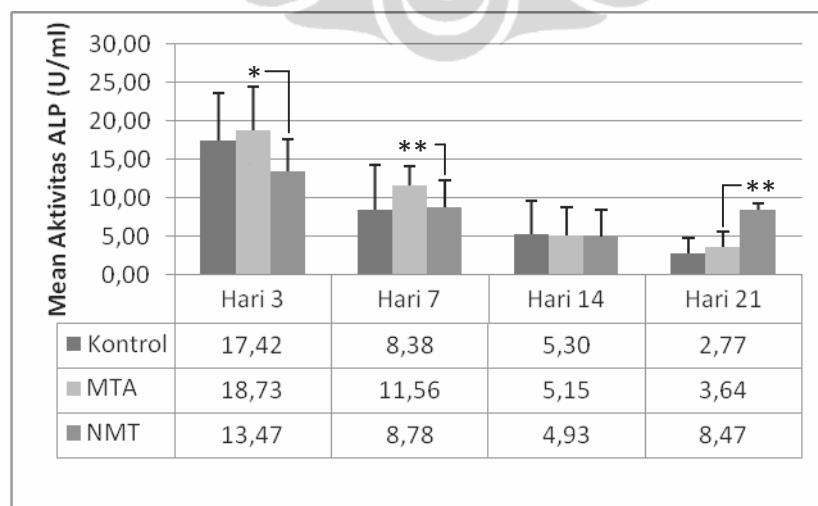
5.4. Efek MTA dan NMT Terhadap Diferensiasi Sel Punca Mesensimal

Pulpa Gigi

Kadar biomarker yang diamati pada sel punca mesensimal dari gigi permanen (DPSC) dan gigi disidui (SHED) adalah: 1) aktivitas kadar *Alkaline phosphatase* (ALP) dengan teknik Elisa, 2) aktivitas *osteocalcin* (OC) dengan teknik Elisa, 3) aktivitas *dentin sialophospho protein* (DSPP) dengan teknik Elisa,

5.4.1. Hasil Pengamatan Aktivitas ALP pada DPSC dan SHED

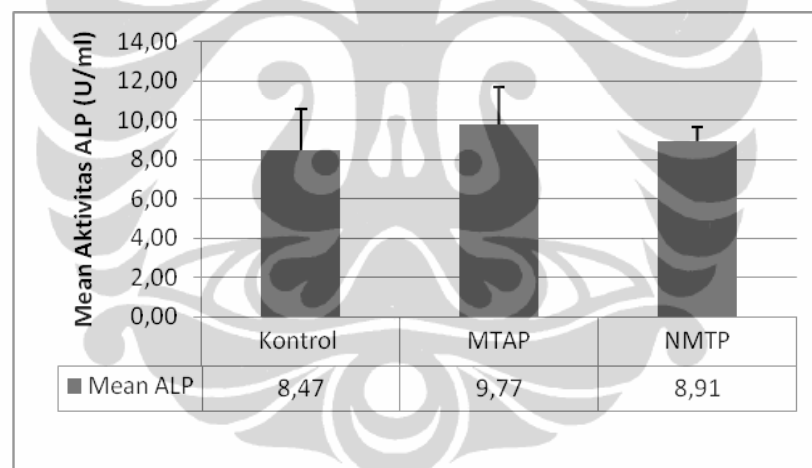
Pengamatan aktivitas ALP sebagai marker odontoblas pada DPSC ternyata pada hari ke 3 paling tinggi di antara hari yang lain. Aktifitas ALP pada DPSC yang dipapar MTA pada hari ke 3 menunjukkan paling tinggi dibanding kelompok kontrol dan NMT. Selanjutnya pada hari ke 7 sampai hari ke 21 aktivitas ALP pada DPSC yang dipapar MTA terus menurun. Hal ini juga terjadi pada kelompok kontrol. Sedangkan kelompok NMT juga menurun tetapi pada hari ke 21 aktivitas ALP naik dan hampir sama dengan aktivitas ALP pada hari ke 7. Pada hari ke 21 aktivitas ALP pada DPSC yang dipapar NMT lebih tinggi dibanding kelompok MTA dan kontrol (Gambar 5.14).



Gambar 5.14. Aktivitas ALP pada DPSC Hari Ke 3, 7, 14, 21
 **) $p < 0,01$; *) $p < 0,05$; Error bar = Standar deviasi

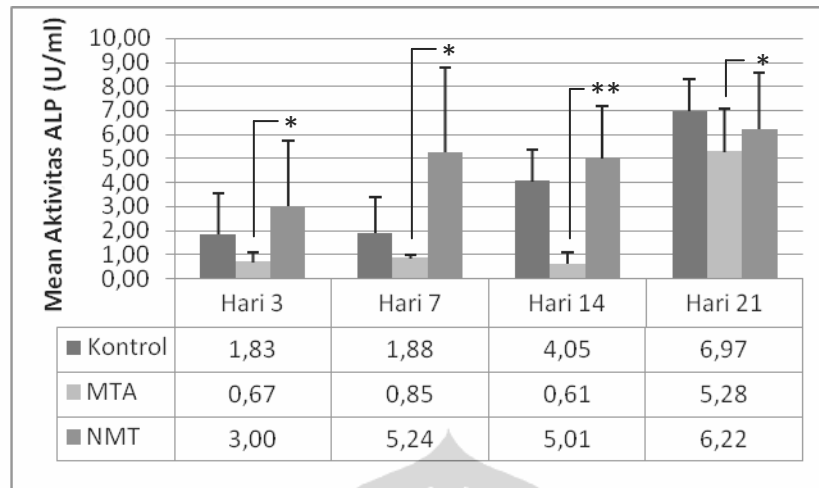
Berdasarkan analisis statistik pada hari 3 terdapat perbedaan bermakna antara aktivitas ALP pada DPSC yang dipapar MTA dengan NMT ($p < 0,05$) dan antara kontrol dengan NMT ($p < 0,01$). Pada hari ke 7 juga terdapat perbedaan bermakna antara aktivitas ALP yang dipapar MTA dengan NMT ($p < 0,01$). Sedang pada hari ke 14 tidak terdapat perbedaan bermakna antara kontrol, MTA dan NMT ($p > 0,05$). Tetapi pada hari ke 21 terdapat perbedaan bermakna antara aktivitas ALP yang dipapar NMT dan MTA ($p < 0,01$), antara NMT dengan kontrol ($p < 0,05$), dan antara MTA dengan kontrol ($p < 0,05$).

Secara diskriptif aktivitas ALP pada DPSC yang dipapar MTA selama 21 hari lebih tinggi dari NMT dan kontrol. Hasil analisis statistik, aktivitas total ALP pada DPSC selama 21 hari, ternyata antara kelompok kontrol, NMT dan MTA tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$) di antara ketiganya (Gambar 5.15)



Gambar 5.15. Aktivitas ALP pada DPSC Total 21 hari
 **) $p < 0,01$; *) $p < 0,05$; Error bar = Standar deviasi

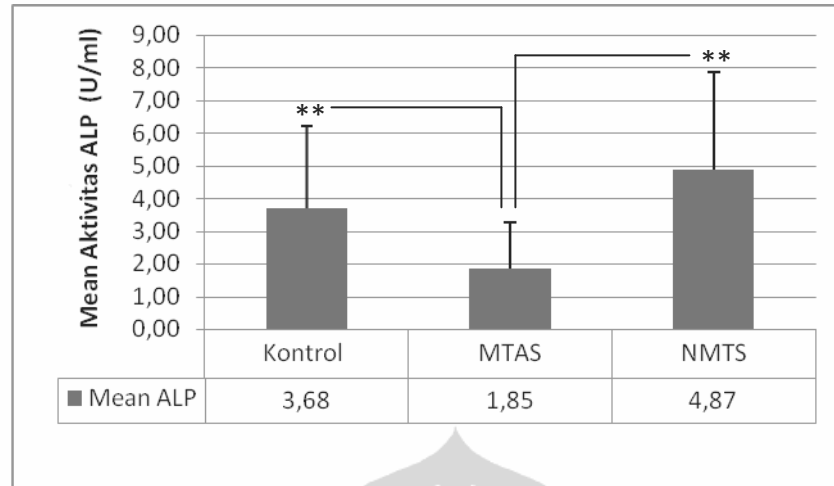
Aktivitas ALP pada SHED yang dipapar NMT sangat tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol dan yang dipapar MTA. Aktivitas ALP pada SHED yang terpapar NMT terus meningkat mulai hari ke 3 sampai hari ke 21, tetapi sedikit menurun pada hari ke 14. Aktivitas ALP pada SHED hari ke 21 baik kelompok kontrol maupun kelompok yang dipapar NMT dan MTA meningkat dan paling tinggi dibanding hari sebelumnya (Gambar 5.16).



Gambar 5.16. Aktivitas ALP pada SHED Hari Ke 3, 7, 14, 21
 (***) $p < 0,01$; (*) $p < 0,05$; Error bar = Standar deviasi

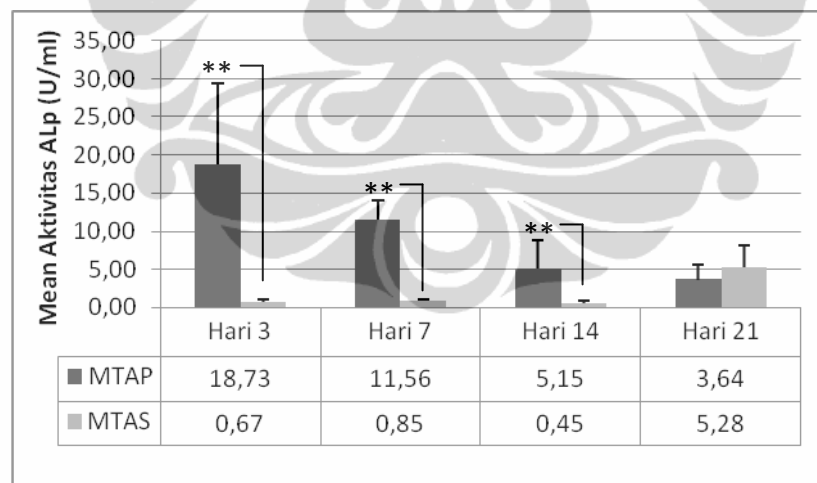
Berdasarkan hasil uji statistik pada hari 3 terdapat perbedaan bermakna antara aktivitas ALP pada SHED yang dipapar NMT dengan MTA ($p < 0,05$) dan antara kontrol dengan MTA ($p < 0,05$), sedang antara kontrol dan NMT tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$). Pada hari ke 7 terdapat perbedaan bermakna antara aktivitas ALP pada SHED yang dipapar dengan NMT dengan MTA dan antara NMT dengan kontrol ($p < 0,05$), tetapi antara kontrol dengan MTA tidak ada perbedaan bermakna ($p > 0,05$). Pada hari ke 14 terdapat perbedaan bermakna antara aktivitas ALP yang dipapar NMT dengan MTA, antara NMT dengan kontrol dan antara kontrol dengan MTA ($p < 0,01$). Pada hari ke 21 aktivitas ALP pada SHED yang dipapar NMT lebih tinggi dari MTA dan berbeda bermakna ($p < 0,05$), tetapi antara NMT dengan kontrol dan antara MTA dengan kontrol tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$).

Pada Gambar 5.17, aktivitas total ALP pada SHED selama 21 hari, yang dipapar NMT ternyata lebih tinggi dibanding MTA dan kontrol. Aktivitas ALP pada SHED selama 21 hari yang dipapar NMT berbeda bermakna dengan kontrol ($p < 0,05$), sedangkan aktivitas ALP pada SHED yang dipapar NMT dengan MTA dan antara kontrol dengan MTA berbeda secara bermakna ($p < 0,01$).



Gambar 5.17. Aktivitas ALP pada SHED Total 21 Hari
 (***) $p < 0,01$; (*) $p < 0,05$; Error bar = Standar deviasi

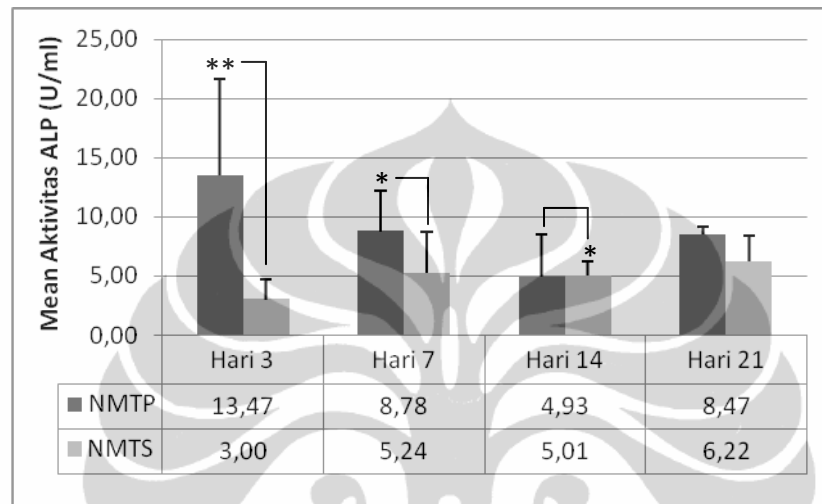
Apabila dibandingkan aktivitas ALP pada DPSC yang dipapar MTA ternyata lebih tinggi dibanding aktivitas ALP pada SHED yang dipapar MTA pada hari ke 3, 7, 14, tetapi pada hari ke 21 aktivitas ALP pada SHED sedikit lebih tinggi dibanding pada DPSC (Gambar 5.18).



Gambar 5.18. Aktivitas ALP pada DPSC dan SHED yang Dipapar MTA
 (***) $p < 0,01$; (*) $p < 0,05$; Error bar = Standar deviasi

Berdasarkan hasil uji statistik aktivitas ALP pada DPSC pada hari ke 3, 7 dan 14 yang dipapar MTA berbeda secara bermakna dengan aktivitas ALP pada SHED yang dipapar MTA ($p < 0,01$). tetapi pada hari ke 21 keduanya tidak ada perbedaan yang bermakna.

Perbedaan aktivitas ALP pada DPSC dengan SHED yang dipapar NMT hampir sama dengan yang dipapar MTA. Aktivitas ALP pada DPSC yang dipapar NMT lebih tinggi dari SHED yang dipapar NMT pada hari ke 3, 7, dan 21, tetapi pada hari ke 14 aktivitas ALP pada antara keduanya hampir sama, ALP pada SHED sedikit lebih tinggi (Gambar 5.19).

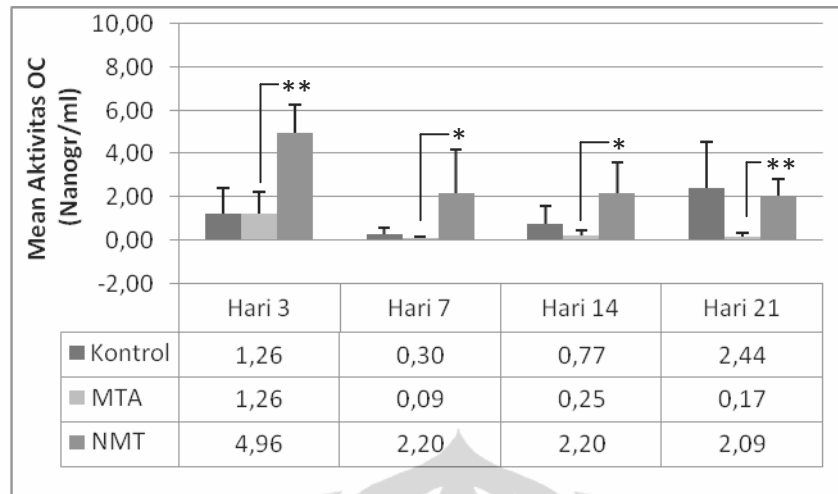


Gambar 5.19. Aktivitas ALP pada DPSC dan SHED yang Dipapar NMT
 **) $p < 0,01$; *) $p < 0,05$; Error bar = Standar deviasi

Berdasarkan hasil uji statistik, terdapat perbedaan yang bermakna antara aktivitas ALP pada DPSC yang dipapar NMT lebih tinggi dibanding aktivitas ALP pada SHED pada hari ke 3 ($p < 0,01$) sedang hari 7 berbeda bermakna ($p < 0,05$). Pada hari ke 14 terdapat perbedaan bermakna antara aktivitas ALP pada SHED yang lebih tinggi dari DPSC yang dipapar NMT ($p < 0,05$), tetapi pada hari ke 21 keduanya tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$).

5.4.2. Hasil Pengamatan Aktivitas OC pada DPSC dan SHED

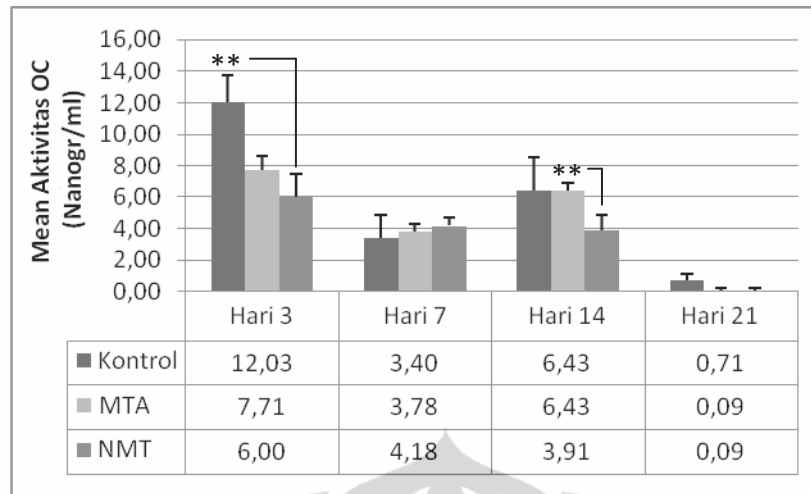
Aktivitas OC sebagai marker odontoblas pada DPSC secara diskriptif yang terpapar NMT lebih tinggi dibanding MTA mulai dari hari ke 3 sampai hari ke 21. Aktivitas OC pada kelompok NMT tertinggi pada hari ke 3 dan menurun tetapi tetap stabil hingga hari ke 21. Berbeda dengan aktivitas OC yang dipapar MTA yang terus menurun hingga hari ke 21 dan sangat kecil (Gambar 5.20).



Gambar 5.20. Aktivitas OC pada DPSC Hari Ke 3, 7, 14, 21
 **) $p < 0,01$; *) $p < 0,05$; Error bar = Standar deviasi

Berdasarkan hasil uji statistik aktivitas OC pada DPSC yang dipapar NMT berbeda bermakna dengan yang dipapar MTA dan kontrol. Pada hari ke 3 aktivitas OC yang dipapar NMT berbeda bermakna dengan yang dipapar MTA ($p < 0,01$), dan berbeda bermakna dengan kontrol ($p < 0,05$), sedangkan antara MTA dengan kontrol tidak terdapat perbedaan bermakna ($p > 0,05$). Pada hari ke 7 dan 14 terdapat perbedaan bermakna antara aktivitas OC yang dipapar NMT dengan MTA ($p < 0,05$) tetapi tidak berbeda bermakna dengan kontrol ($p > 0,05$). Pada hari ke 21 aktivitas OC pada DPSC yang dipapar NMT hampir sama dengan kelompok kontrol dan tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$), tetapi aktivitas OC yang dipapar NMT lebih tinggi dari MTA dan berbeda bermakna ($p < 0,01$). Hal ini juga terjadi pada aktivitas OC kelompok kontrol berbeda bermakna dengan yang dipapar MTA ($p < 0,05$).

Secara diskriptif aktivitas OC pada SHED ternyata berbeda dengan aktivitas OC pada DPSC yang dipapar NMT. Aktivitas OC pada SHED yang dipapar NMT lebih rendah dari aktivitas OC yang dipapar MTA pada hari ke 3 dan ke 14, sedangkan pada hari ke 7 aktivitas OC yang dipapar NMT lebih tinggi dari MTA dan pada hari ke 21 aktivitas OC yang dipapar NMT sama dengan MTA (Gambar 5.21).

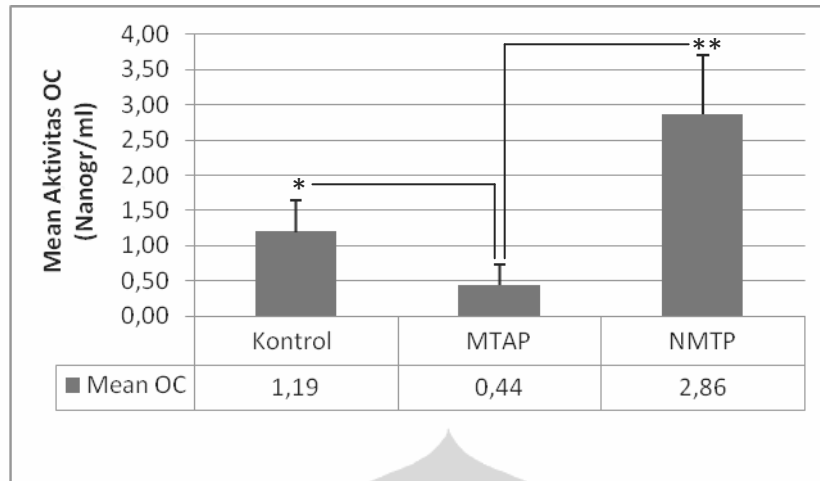


Gambar 5.21. Aktivitas OC pada SHED Hari ke 3, 7, 14, 21
 **) $p < 0,01$; *) $p < 0,05$; Error bar = Standar deviasi

Hasil uji statistik aktivitas OC pada SHED hari ke 3 terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok yang dipapar NMT dan MTA ($p < 0,01$), sedangkan antara aktivitas OC yang dipapar NMT dengan MTA tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$). Pada hari ke 7 aktivitas OC pada SHED yang dipapar NMT walaupun lebih tinggi dari kelompok kontrol dan MTA tetapi tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$). Aktivitas OC yang dipapar MTA pada hari ke 14 sama dengan kelompok kontrol dan lebih tinggi dari kelompok yang dipapar NMT. Hasil uji statistik menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara aktivitas OC yang dipapar MTA dengan NMT ($p < 0,01$) dan antara kelompok kontrol dengan NMT ($p < 0,01$), tetapi tidak terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dengan MTA ($p > 0,05$).

Pada hari ke 21 aktivitas OC pada SHED yang dipapar NMT sama dengan MTA dan tidak terdapat perbedaan bermakna ($p > 0,05$), sedang aktivitas OC pada kelompok kontrol lebih tinggi dari NMT maupun MTA dan berbeda secara bermakna ($p < 0,05$).

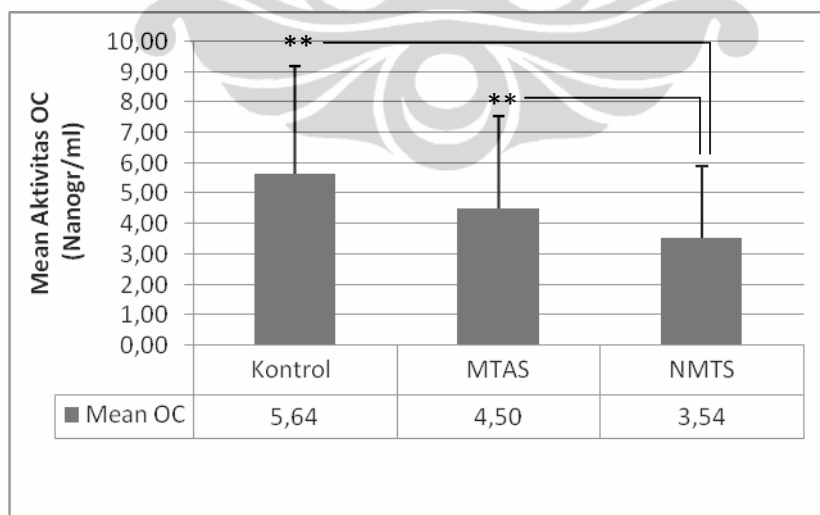
Aktivitas OC pada DPSC selama 21 hari secara diskriptif kelompok yang dipapar NMT lebih tinggi dibanding kelompok kontrol dan MTA. Aktivitas OC pada DPSC yang dipapar MTA paling rendah dibandingkan yang dipapar NMT maupun kontrol (Gambar 5.22).



Gambar 5.22. Aktivitas OC pada DPSC Total 21 Hari
 **) $p < 0,01$; *) $p < 0,05$; Error bar = Standar deviasi

Hasil uji statistik aktivitas OC sebagai marker odontoblas pada DPSC selama 21 hari dipapar NMT lebih tinggi dari kelompok kontrol dan berbeda bermakna ($p < 0,01$). Kelompok yang dipapar NMT lebih tinggi dari MTA dan antara kontrol dengan MTA berbeda bermakna ($p < 0,01$).

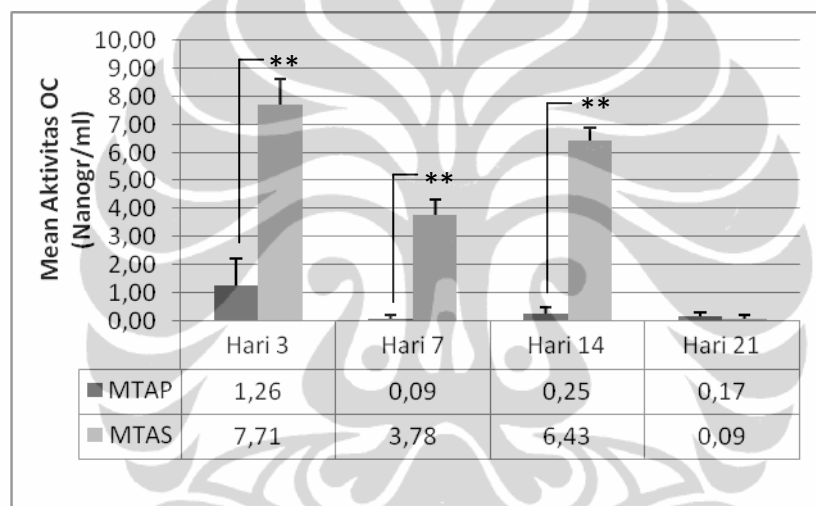
Aktivitas OC pada SHED selama 21 hari ternyata kelompok yang dipapar NMT lebih rendah dari MTA dan kontrol. Aktivitas OC kelompok kontrol secara diskriptif paling lebih tinggi dibanding MTA dan NMT. (Gambar 5.23).



Gambar 5.23. Aktivitas OC pada SHED Total 21 Hari
 **) $p < 0,01$; *) $p < 0,05$; Error bar = Standar deviasi

Berdasarkan uji statistik aktivitas OC pada SHED selama 21 hari kelompok kontrol berbeda bermakna dengan kelompok yang dipapar NMT ($p < 0,01$). Sedangkan aktivitas OC yang dipapar MTA tidak berbeda bermakna dengan kelompok kontrol ($p > 0,05$), tetapi aktivitas OC yang dipapar MTA dibanding dengan NMT berbeda secara bermakna ($p < 0,05$).

Secara diskriptif aktivitas OC pada DPSC dibanding dengan aktivitas OC pada SHED yang dipapar MTA, ternyata aktivitas OC pada SHED lebih tinggi dibanding DPSC pada hari ke 3 sampai dengan hari ke 14, kecuali pada hari ke 21 aktivitas OC hampir sama (Gambar 5.24)

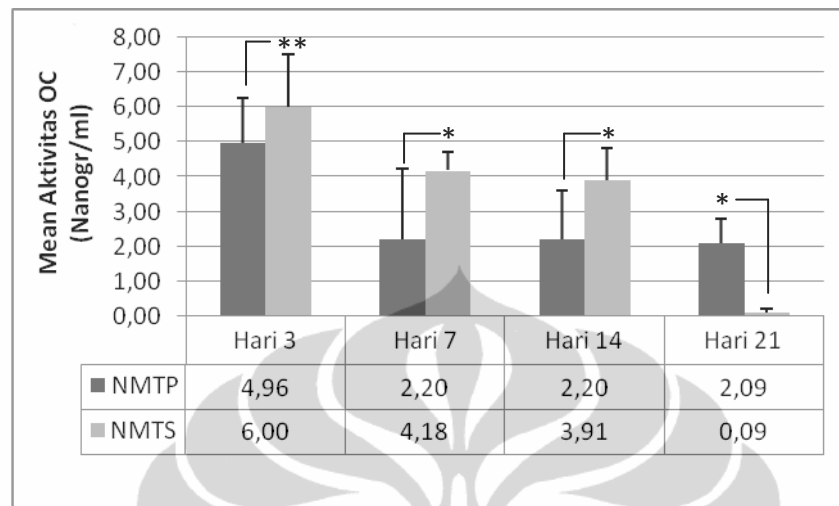


Gambar 5.24. Aktivitas OC pada DPSC dan SHED yang Dipapar MTA
 **) $p < 0,01$; *) $p < 0,05$; Error bar = Standar deviasi

Berdasarkan uji statistik pada hari ke 3, 7, dan 14 terdapat perbedaan bermakna antara aktivitas OC pada SHED dibanding dengan DPSC yang dipapar MTA ($p < 0,01$). Aktivitas OC pada SHED lebih tinggi dari DPSC, kecuali pada hari ke 21 aktivitas OC pada SHED dan DPSC tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$). Pada hari ke 21 mean aktivitas OC pada SHED dan DPSC sangat rendah.

Aktivitas OC pada DPSC dan SHED yang dipapar NMT sama seperti aktivitas OC pada DPSC dan SHED yang dipapar MTA. Pada hari ke 3 sampai hari ke 14 aktivitas OC pada SHED yang dipapar NMT lebih tinggi dari DPSC,

sedangkan pada hari ke 21 aktivitas OC pada DPSC lebih tinggi dari SHED (Gambar 5.25)

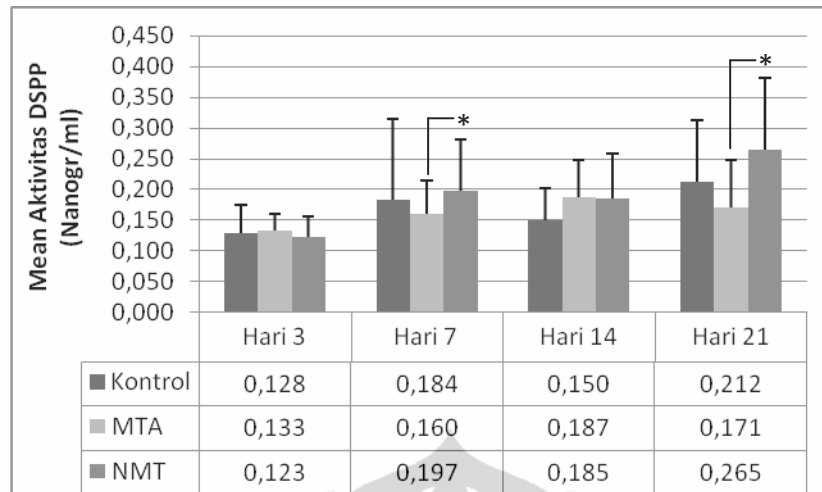


Gambar 5.25. Aktivitas OC pada DPSC dan SHED yang Dipapar NMT (***) $p < 0,01$; *) $p < 0,05$; Error bar = Standar deviasi

Hasil uji statistik aktivitas OC pada SHED yang dipapar NMT pada hari ke 3 lebih tinggi dari DPSC dan berbeda bermakna ($p < 0,01$). Pada hari ke 7 dan 14 aktivitas OC yang dipapar NMT pada SHED juga lebih tinggi dari DPSC dan berbeda bermakna antara keduanya ($p < 0,05$). Pada hari ke 21 ternyata berbeda dengan hari lainnya yaitu aktivitas OC pada DPSC lebih tinggi dari SHED yang dipapar NMT terdapat perbedaan yang bermakna antara keduanya ($p < 0,05$).

5.4.3 Hasil Pengamatan Aktivitas DSPP pada DPSC dan SHED

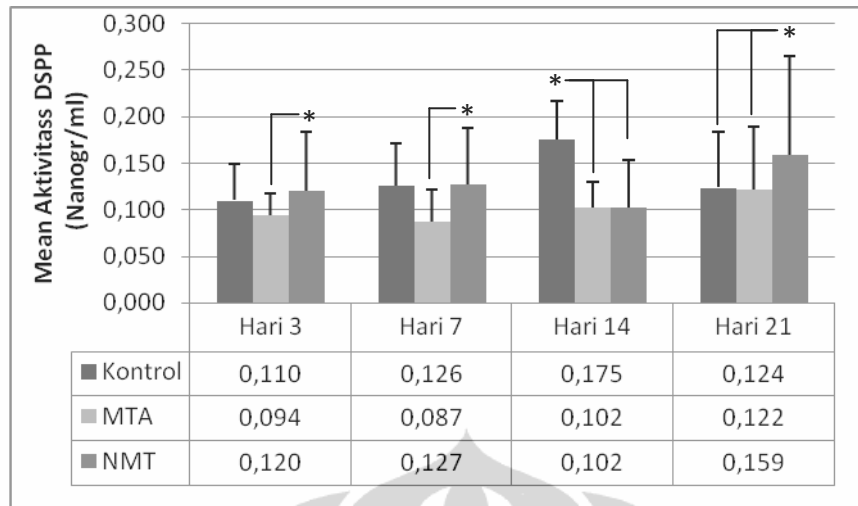
Secara deskriptif aktivitas DSPP pada DPSC yang dipapar MTA dan NMT pada hari ke 3 dan 14 hampir sama tetapi lebih tinggi dari kelompok kontrol, kecuali pada hari ke 7 dan 21 aktivitas NMT lebih tinggi dari MTA dan kontrol. Aktivitas DSPP yang dipapar NMT terus meningkat dari ke 3 sampai hari ke 21. Berbeda dengan MTA yang meningkat sampai hari ke 14, kemudian menurun pada hari ke 21. (Gambar 5.26)



Gambar 5.26. Aktivitas DSPP pada DPSC Hari Ke 3, 7, 14, 21
 **) $p < 0,01$; *) $p < 0,05$; Error bar = Standar deviasi

Berdasarkan hasil uji statistik ternyata aktivitas DSPP pada DPSC pada hari ke 3 dan 14 tidak terdapat perbedaan bermakna antara NMT dengan MTA dan kontrol ($p > 0,05$). Pada hari ke ke 7 dan 21 aktivitas NMT lebih tinggi dari MTA dan kontrol dan berbeda secara bermakna ($p < 0,05$), sedangkan antara MTA dengan kontrol tidak terdapat perbedaan bermakna ($p > 0,05$)

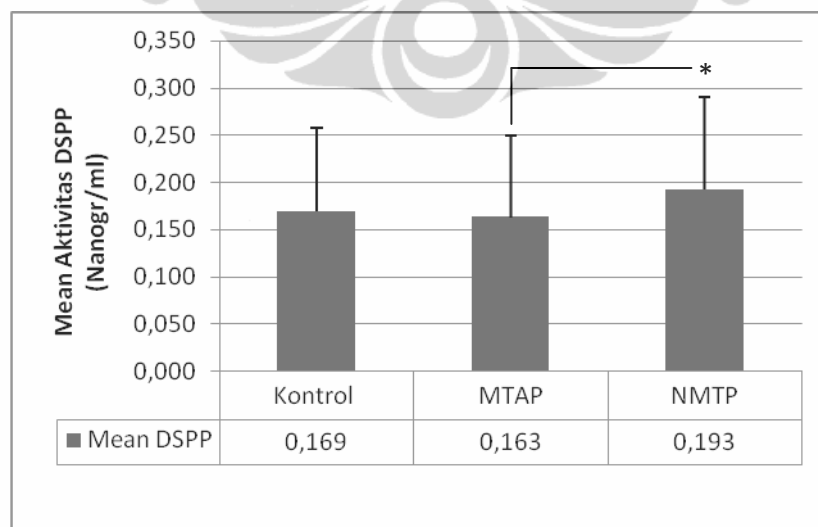
Aktivitas DSPP pada SHED berbeda dengan DPSC, aktivitas DSPP pada SHED yang dipapar NMT lebih tinggi dari MTA dan kontrol kecuali pada hari ke 14. Pada hari ke 14 aktivitas DSPP pada kelompok kontrol mempunyai nilai tertinggi dibanding NMT dan MTA, sedang aktivitas DSPP yang dipapar NMT dan MTA mempunyai nilai yang sama. Seperti halnya pada DPSC, aktivitas DSPP pada SHED yang dipapar NMT terus meningkat dari hari ke 3, tetapi menurun sedikit pada hari ke 14 dan meningkat lagi pada hari ke 21. yang merupakan nilai aktivitas tertinggi dibanding MTA dan kontrol. (Gambar 5.27)



Gambar 5.27. Aktivitas DSPP pada SHED Hari Ke 3, 7, 14, 21
 **) $p < 0,01$; *) $p < 0,05$; Error bar = Standar deviasi

Hasil uji statistik ternyata aktivitas DSPP pada SHED pada hari ke 3, 7 dan 21 terdapat perbedaan bermakna antara NMT dengan MTA dan kontrol ($p < 0,05$), sedangkan pada ke 14 aktivitas NMT sama tingginya dengan MTA tidak ada perbedaan bermakna ($p > 0,05$), tetapi antara kontrol dengan NMT dan MTA berbeda bermakna ($p < 0,05$).

Hasil pengamatan aktivitas DSPP selama 21 hari pada DPSC yang dipapar NMT mempunyai nilai lebih tinggi dibanding MTA dan kontrol (Gambar 5.28).

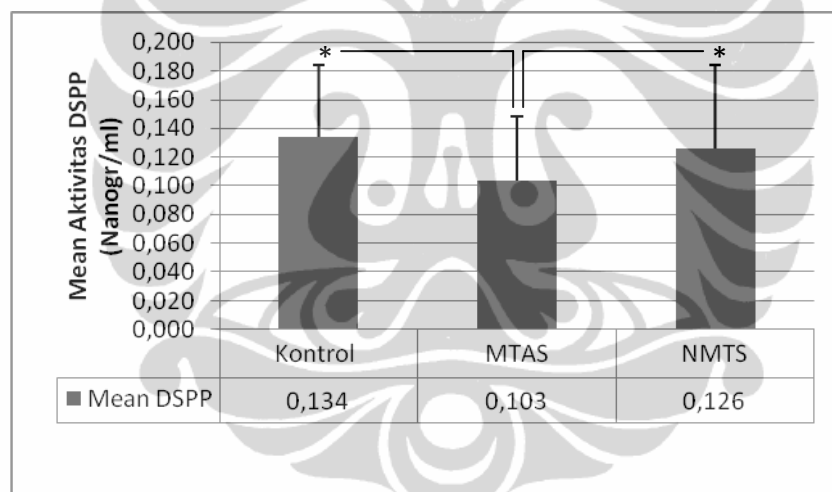


Gambar 5.28. Aktivitas DSPP pada DPSC Total 21 Hari
 **) $p < 0,01$; *) $p < 0,05$; Error bar = Standar deviasi

Berdasarkan hasil uji statistik ternyata terdapat perbedaan bermakna antara aktivitas DSPP yang dipapar NMT dengan MTA ($p \leq 0,05$), tetapi tidak ada perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dengan MTA dan antara kontrol dengan NMT ($p > 0,05$).

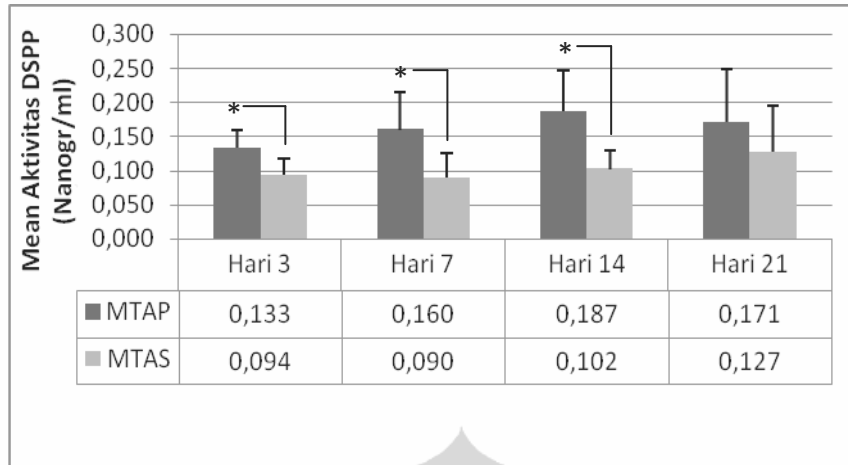
Secara deskriptif total aktivitas aktivitas DSPP selama 21 hari pada SHED kelompok kontrol mempunyai nilai aktivitas DSPP tertinggi dibanding kelompok yang dipapar NMT dan MTA. Aktivitas DSPP yang dipapar MTA paling rendah dibanding kelompok lainnya (Gambar 5.29).

Hasil uji statistik ternyata terdapat perbedaan bermakna antara aktivitas DSPP pada SHED yang dipapar NMT dengan MTA dan antara kontrol dengan MTA ($p < 0,05$), tetapi tidak terdapat perbedaan bermakna antara aktivitas DSPP yang dipapar NMT dengan kelompok kontrol.



Gambar 5.29. Aktivitas DSPP pada SHED Total 21 Hari
 **) $p < 0,01$; *) $p < 0,05$; Error bar = Standar deviasi

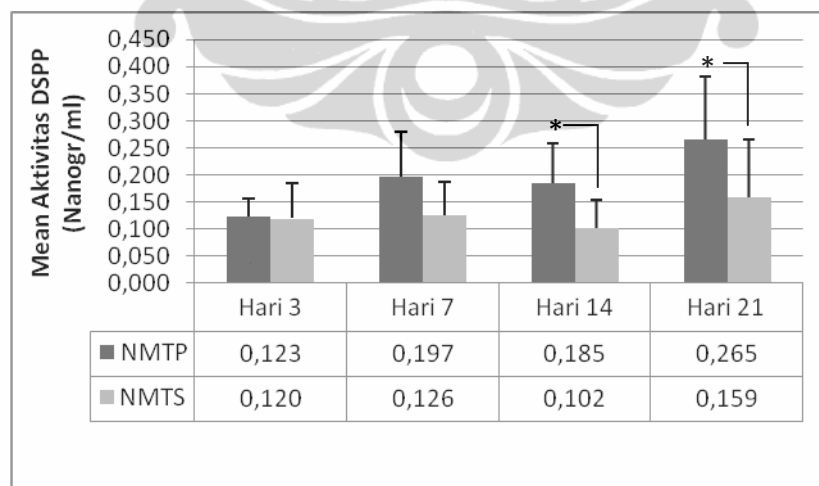
Apabila dibandingkan aktivitas DSPP pada DPSC dan SHED yang dipapar MTA, ternyata nilai DSPP pada DPSC lebih tinggi dari SHED mulai hari ke 3 sampai hari ke 21 (Gambar 5.30). Keadaan ini sama dengan aktivitas ALP pada DPSC dan SHED, yang menunjukkan bahwa aktivitas ALP lebih tinggi pada DPSC dibanding pada SHED. Hal ini berbeda dengan aktivitas OC yang menunjukkan bahwa aktivitas OC lebih tinggi pada SHED dibanding DPSC.



Gambar 5.30. Aktivitas DSPP pada DPSC dan SHED yang Dipapar MTA
 **) $p < 0,01$; *) $p < 0,05$; Error bar = Standar deviasi

Bedasarkan hasil uji statistik terdapat perbedaan bermakna antara aktivitas DSPP pada DPSC dengan SHED yang dipapar MTA pada hari ke 3, 7 dan 14 ($p < 0,05$). Pada hari ke 21 tidak terdapat perbedaan bermakna antara aktivitas DSPP pada DPSC dengan SHED yang dipapar MTA ($p > 0,05$).

Secara deskriptif aktivitas DSPP pada DPSC dan SHED yang dipapar NMT sama dengan yang dipapar MTA. Aktivitas DSPP pada DPSC yang dipapar NMT lebih tinggi dari aktivitas DSPP pada SHED yang dipapar NMT (Gambar 5.31).



Gambar 5.31. Aktivitas DSPP pada DPSC dan SHED yang Dipapar NMT
 **) $p < 0,01$; *) $p < 0,05$; Error bar = Standar deviasi

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa perbedaan bermakna aktivitas DSPP pada DPSC dibanding SHED yang dipapar NMT terjadi pada hari ke 14 dan 21 ($p < 0,05$), sedang pada hari ke 3 dan 7, tidak terdapat perbedaan bermakna ($p > 0,05$).

5.5. Efek MTA dan NMT Terhadap Maturasi Sel Ke Arah Odontoblas

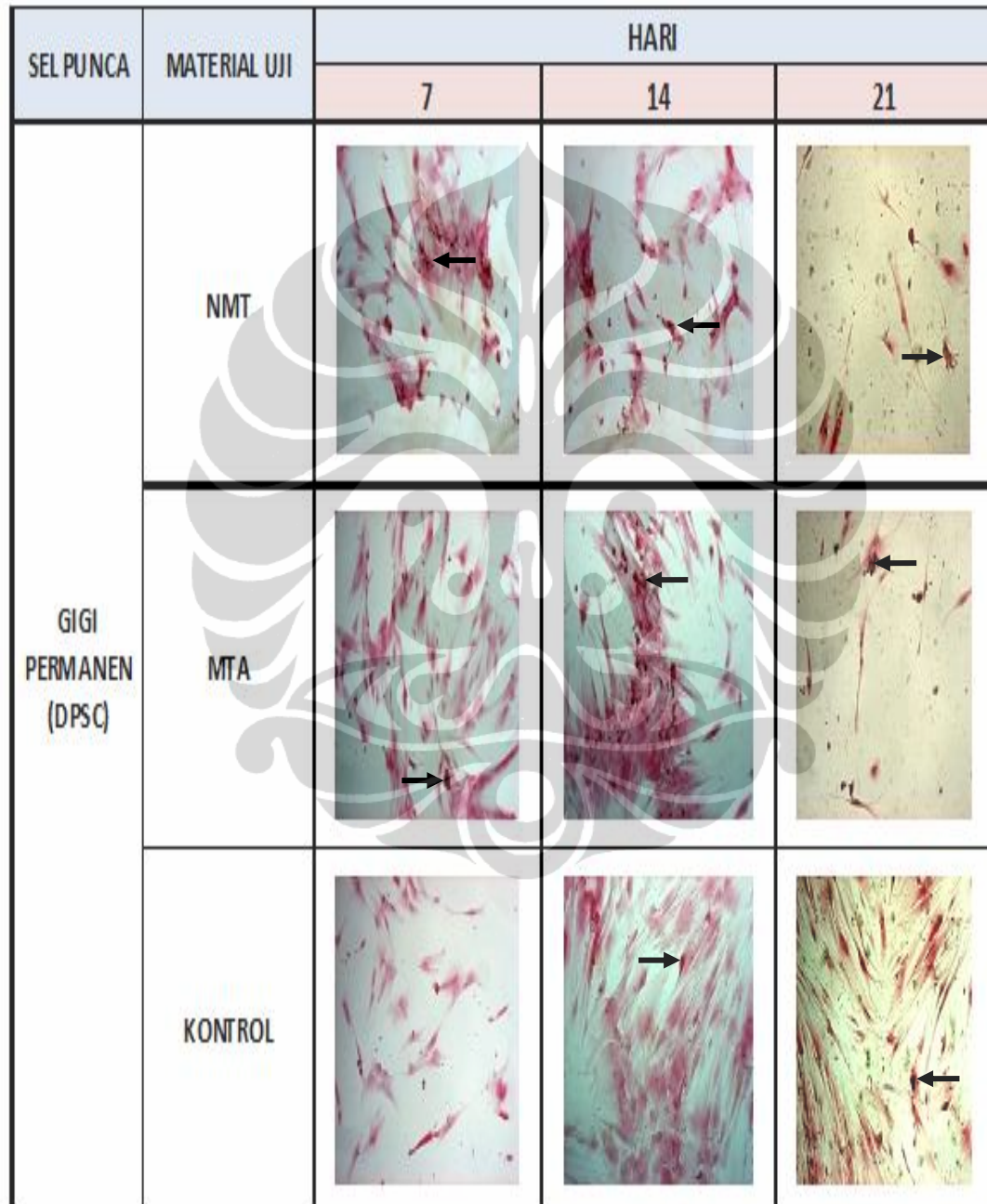
Maturasi sel ditandai dengan meningkatnya jumlah deposit kalsium dan meningkatkan regeneratif dentin. Deposit kalsium menunjukkan terjadinya suatu proses regenerasi tulang (dentin) dan ditemukan pada hari ke 12 sedang pada matrik ekstraselluler deposit kalsium mulai ditemukan pada hari ke 14 dan 21.^{54,21}

Pada pengamatan deposit kalsium pada DPSC yang dipapar NMT pada hari ke 7 telah terjadi pembentukan matrik ekstraselluler, sedangkan pada DPSC yang dipapar MTA pembentukan matrik ekstraselluler terjadi pada hari ke 14 dan pada kontrol sampai dengan hari ke 21 belum terlihat pembentukan matrik ekstraselluler. Pada hari ke 21 terjadi penurunan jumlah sel tetapi deposit kalsium hampir 100% ditemukan pada DPSC yang dipapar NMT dan MTA, kecuali pada kelompok kontrol jumlah sel sama sejak hari ke 7 sampai hari ke 21 tetapi dengan jumlah deposit kalsium yang lebih sedikit.



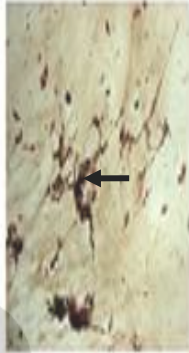
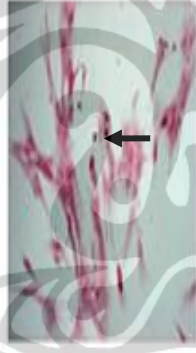

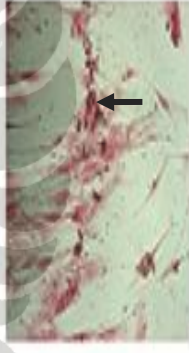

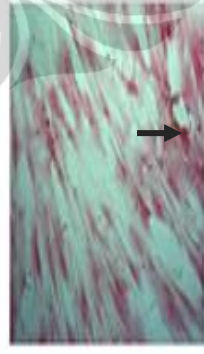
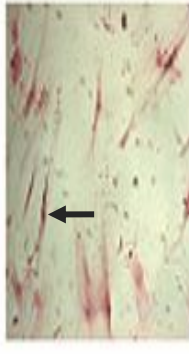
Pengamatan deposit kalsium pada SHED yang dipapar NMT dan MTA ternyata berbeda hasilnya dengan DPSC. Pada hari ke 7 jumlah deposit kalsium pada SHED yang dipapar NMT maupun MTA lebih sedikit dari deposit kalsium pada DPSC yang dipapar NMT dan MTA, sedangkan pada hari ke 14 deposit kalsium pada SHED sedikit lebih rendah dari DPSC. Sebaliknya pada hari ke 21 deposit kalsium pada SHED yang dipapar NMT maupun MTA lebih tinggi dari DPSC. Hal ini disebabkan jumlah SHED pada hari ke 21 lebih banyak dari DPSC dan jumlah deposit kalsiumnya juga lebih banyak. Pembentukan matrik ekstraselluler pada SHED yang dipapar NMT terjadi pada hari ke 14, sedangkan matrik ekstraselluler pada SHED yang dipapar MTA baru terjadi pada hari ke 21, pada kelompok kontrol tidak terjadi pembentukan matrik ekstraselluler sampai dengan hari ke 21. Penelitian ini membuktikan bahwa deposit kalsium telah ditemukan pada hari ke 7 baik pada DPSC maupun SHED yang paparan NMT dan MTA, kecuali pada kelompok kontrol deposit kalsium belum ditemukan. Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa matrik ekstraselluler sudah

terbentuk pada hari ke 7 pada DPSC yang dipapar NMT, sedangkan pada SHED yang dipapar NMT terjadi pada hari ke 14 dan lebih cepat dibanding yang dipapar

MTA, sedangkan pada kelompok kontrol yang tidak mendapat perlakuan matrik ekstrasellular tidak terbentuk hingga hari ke 21 (Gambar 5.32 A-B).



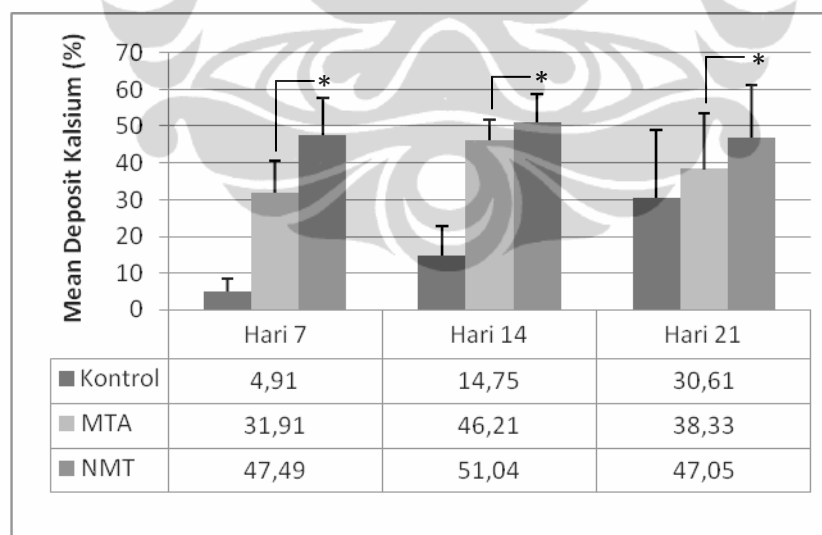
Gambar 5.32 A. Deposit kalsium pada DPSC yang Dipapar NMT, MTA dan Kelompok Kontrol: (1) Deposit kalsium hari ke 7 (2) Deposit kalsium pada hari ke 14 (3) Deposit kalsium hari ke 21. Tanda Panah Menunjukkan Deposit Kalsium. (Pembesaran 100x)

SEL PUNCA	MATERIAL UJI	HARI		
		7	14	21
GIGI DISIDI UI (SHED)	NMT			
	MTA			
	KONTROL			

Gambar 5.32 B. Deposit kalsium pada SHED yang Dipapar NMT, MTA dan Kelompok Kontrol: (1) Deposit kalsium hari ke 7 (2) Deposit kalsium pada hari ke 14 (3) Deposit kalsium hari ke 21. . Tanda Panah Menunjukkan Deposit Kalsium. (Pembesaran 100x)

Pengamatan deposit kalsium menggunakan pewarnaan VonKossa dilakukan selama 3 kali pengamatan yaitu hari ke 7, 14 dan 21 dengan 3 kali pengulangan. Pengukuran dilakukan setelah DPSC yang dipapar MTA dan NMT serta satu kelompok kontrol (tanpa perlakuan). Apabila pada sel tersebut terdapat warna bintik hitam menunjukkan adanya kalsium, warna merah adalah nucleus dan warna pink adalah sitoplasma. Sama seperti pengamatan deposit kalsium menggunakan pewarnaan VonKossa pada DPSC, pengamatan deposit kalsium pada SHED juga dilakukan selama 3 kali pengamatan yaitu hari ke 7, 14 dan 21 dengan 3 kali pengulangan. Pengukuran dilakukan setelah SHED dipapar MTA dan NMT serta satu kelompok kontrol. Apabila pada sel tersebut terdapat warna bintik hitam menunjukkan adanya kalsium, warna merah adalah nucleus dan warna pink adalah sitoplasma (Gambar 5.32)

Hasil pengamatan deposit kalsium pada DPSC secara diskriptif ternyata DPSC yang dipapar NMT lebih tinggi dari yang dipapar MTA dan kelompok kontrol. Pada hari ke 21 deposit kalsium yang dipapar NMT dan MTA menurun dibanding hari ke 14, kecuali kelompok kontrol yang meningkat, tetapi deposit kalsium yang dipapar NMT tetap yang tertinggi (Gambar 5.33).

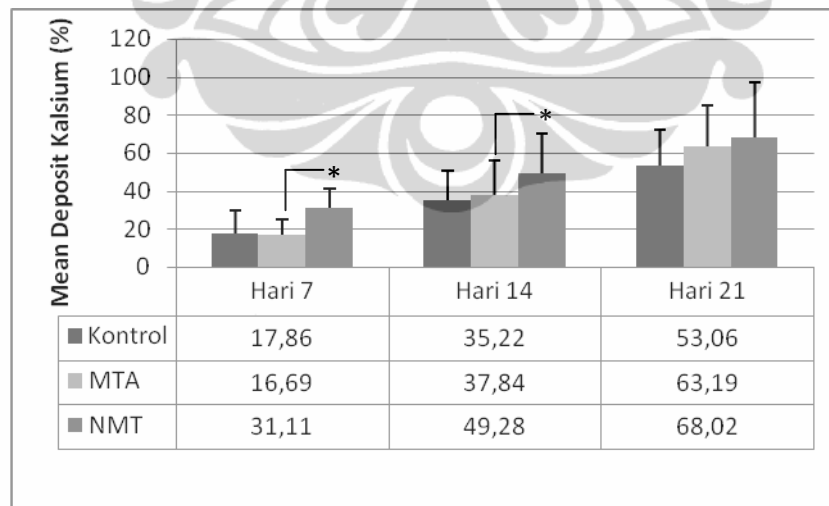


Gambar 5.33. Deposit Kalsium pada DPSC Hari ke 7, 14, 21
 **) $p < 0,01$; *) $p < 0,05$; Error bar = Standar deviasi

Hasil uji statistik pada hari ke 7, terdapat perbedaan bermakna antara deposit kalsium DPSC yang dipapar NMT dengan MTA ($p < 0,05$), juga terdapat

perbedaan bermakna antara deposit kalsium yang dipapar NMT dengan kontrol dan antara deposit kalsium yang terpapar MTA dengan kontrol ($p < 0,05$). Pada hari ke 14 hasilnya tidak berbeda dengan hari ke 7 yaitu, ternyata ada perbedaan bermakna antara deposit kalsium pada DPSC yang terpapar NMT dengan MTA ($p < 0,05$) dan antara NMT dengan kontrol ($p < 0,01$). Begitu pula deposit kalsium DPSC pada kelompok yang dipapar MTA dengan kontrol terdapat perbedaan bermakna antara keduanya ($p < 0,01$). Berbeda dengan hari ke 7 dan ke 14, pada hari ke 21 deposit kalsium kelompok yang dipapar NMT lebih tinggi dibanding MTA dan berbeda bermakna ($p < 0,05$), sedangkan antara NMT dengan kontrol dan antara MTA dengan kontrol ternyata tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$). Kemaknaan pada uji statistik juga dipengaruhi oleh standar deviasi, semakin lebar deviasi dari sampel, semakin kecil kemungkinan terjadi perbedaan yang bermakna antara kedua sampel yang diuji.

Secara diskriptif deposit kalsium pada SHED yang dipapar NMT lebih tinggi dibanding yang dipapar MTA dan kelompok kontrol. Deposit kalsium terus meningkat mulai dari ke 7 sampai hari ke 21 (Gambar 5.34). Hal ini berbeda dengan deposit kalsium pada DPSC yang dipapar NMT dan MTA menurun pada hari ke 21.

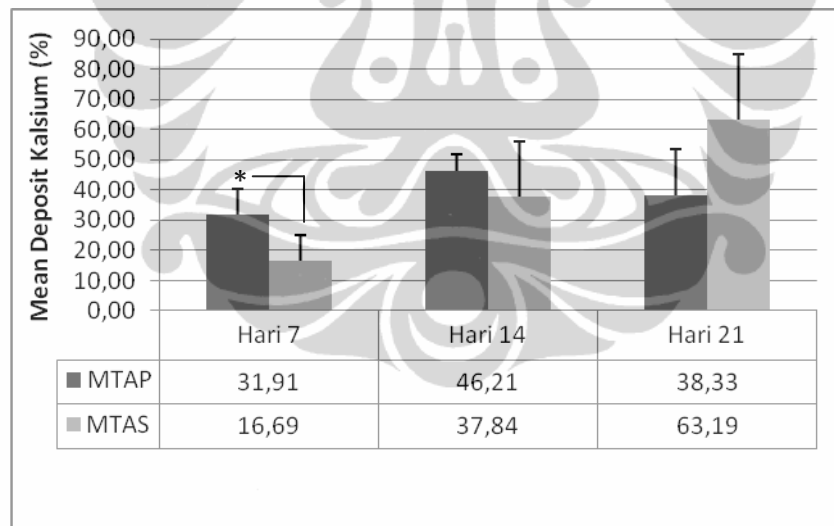


Gambar 5.34. Deposit Kalsium pada SHED Hari ke 7, 14, 21
 **) $p < 0,01$; *) $p < 0,05$; Error bar = Standar deviasi

Deposit kalsium pada SHED hampir sama dengan DPSC, perbedaannya adalah pada hari 21 yang menunjukkan deposit kalsium pada SHED meningkat

dibanding hari ke 7 dan ke 14. Analisis statistik pada hari ke 7, ada perbedaan bermakna antara deposit kalsium pada SHED antara kelompok yang dipapar NMT dengan MTA ($p < 0,05$), juga deposit kalsium yang dipapar NMT dengan kontrol berbeda secara bermakna ($p < 0,05$), tetapi antara kelompok yang dipapar MTA dengan kontrol tidak berbeda bermakna ($p > 0,05$). Pada hari ke 14 ada perbedaan bermakna antara kelompok yang dipapar NMT dengan MTA dan kontrol ($p < 0,05$), sedang hari ke 21, walaupun deposit kalsium yang dipapar NMT lebih tinggi dari MTA dan kontrol tetapi di antara tiga kelompok tersebut tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$).

Secara diskriptif deposit kalsium pada DPSC dibanding dengan deposit kalsium pada SHED yang dipapar MTA, ternyata deposit kalsium pada DPSC lebih tinggi dibanding DPSC pada hari ke 7 dan ke 14, kecuali pada hari ke 21 deposit kalsium pada SHED lebih tinggi dari deposit kalsium pada DPSC. Apabila diamati ternyata deposit kalsium pada SHED yang dipapar MTA semakin meningkat dari hari ke 7 sampai dengan hari ke 21 (Gambar 5.35)

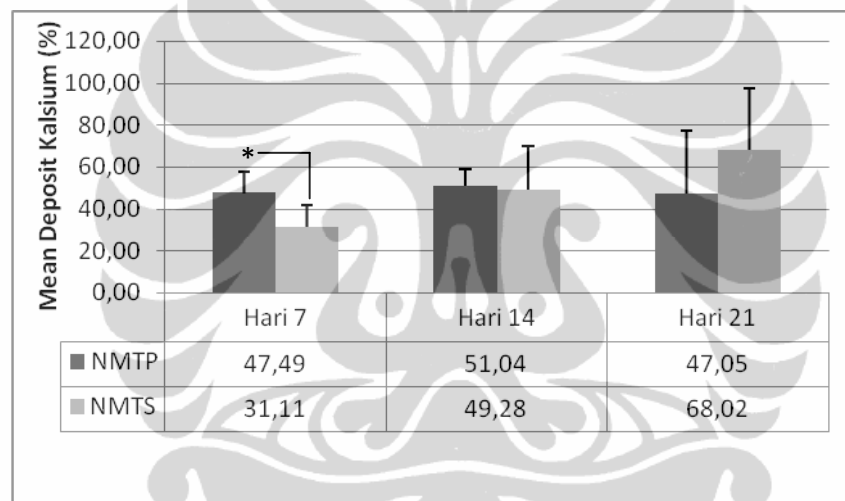


Gambar 5.35. Deposit Kalsium pada DPSC dan SHED yang Dipapar MTA (***) $p < 0,01$; *) $p < 0,05$; Error bar = Standar deviasi

Berdasarkan uji statistik, deposit kalsium yang dihasilkan DPSC dibanding dengan SHED yang dipapar MTA pada hari ke 7 terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$), sedangkan pada hari ke 14 deposit kalsium pada DPSC yang dipapar MTA tidak berbeda bermakna dengan deposit kalsium pada SHED ($p > 0,05$). Pada hari ke 21 walaupun deposit kalsium pada SHED yang dipapar MTA jauh

lebih tinggi dari deposit kalsium pada DPSC ternyata tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$). Ini terjadi karena standar deviasi keduanya nilainya besar, sehingga mempengaruhi nilai kemaknaan (p).

Deposit kalsium pada DPSC dan SHED yang dipapar NMT sama seperti deposit kalsium pada DPSC dan SHED yang dipapar MTA. Pada hari ke 7 deposit kalsium pada DPSC yang dipapar NMT lebih tinggi dari SHED, dan pada hari ke 14 deposit kalsium pada DPSC dan SHED hampir sama. Sedangkan pada hari ke 21 deposit kalsium pada SHED lebih tinggi dari DPSC. Hasil ini membuktikan bahwa deposit kalsium semakin meningkat pada SHED yang dipapar NMT (Gambar 5.36).



Gambar 5.36. Deposit Kalsium pada DPSC dan SHED yang Dipapar NMT
 **) $p < 0,01$; *) $p < 0,05$; Error bar = Standar deviasi

Pada hari ke 7 deposit kalsium pada DPSC yang lebih tinggi dari SHED yang dipapar NMT dan secara statistik berbeda secara bermakna ($p < 0,05$). Pada hari ke 14 deposit kalsium DPSC hampir sama dengan deposit kalsium pada SHED dan tidak berbeda secara bermakna ($p > 0,05$).. Hal yang sama terjadi pada hari ke 21, walaupun deposit kalsium SHED lebih tinggi dari DPSC yang terpapar NMT ternyata tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$). Uji probabilitas (kemaknaan) dipengaruhi juga oleh besarnya standar deviasi pada sampel.

5.6. Korelasi Marker Odontoblas dengan Deposit Kalsium pada DPSC dan SHED yang Dipapar MTA dan NMT

Korelasi antara aktivitas ALP dengan deposit kalsium pada DPSC yang dipapar MTA ternyata tidak ada yang bermakna mulai hari ke 7 sampai hari ke 21 ($p > 0,05$) dan kekuatan korelasinya sangat lemah (0,00-0,199), kecuali hari ke 7 lemah (0,20-0,399). Pada hari ke 7 dan 14 arah korelasinya negatif, artinya semakin besar nilai ALP semakin kecil nilai deposit kalsium atau sebaliknya, sedang hari ke 21 arah korelasinya positif, artinya semakin besar nilai ALP semakin besar pula nilai deposit kalsiumnya, walaupun kekuatannya sangat lemah.

Korelasi antara aktivitas OC dengan deposit kalsium pada DPSC yang dipapar MTA juga tidak terdapat perbedaan yang bermakna mulai hari ke 7 sampai hari ke 21 ($p > 0,05$). Berbeda dengan korelasi antara ALP dengan deposit kalsium pada DPSC, korelasi OC dengan deposit kalsium pada DPSC yang dipapar MTA pada hari 7 dan hari ke 14 mempunyai kekuatan korelasi sedang (0,400-0,599) dengan arah korelasi positif, artinya semakin besar nilai OC semakin besar pula nilai deposit kalsiumnya. Pada hari ke 21 kekuatan korelasi menurun menjadi lemah (0,00-0,199) dengan arah korelasi negatif.

Korelasi antara aktivitas DSPP dengan deposit kalsium pada DPSC yang dipapar MTA, tidak ada yang bermakna mulai hari ke 7 sampai hari ke 21 ($p > 0,05$) dan mempunyai arah korelasi negatif, artinya semakin besar nilai DSPP semakin kecil nilai deposit kalsium atau sebaliknya. Pada hari ke 7 mempunyai kekuatan korelasi paling kuat (0,600-0,799) dan kekuatan korelasinya terus menurun, dan pada hari ke 21 kekuatan korelasinya sangat lemah (0,00-0,199). Tabel 5.1. menunjukkan korelasi antara marker odontoblas dengan deposit kalsium pada DPSC yang dipapar MTA.

Tabel. 5.1. Korelasi Marker Odontoblas dengan Deposit Kalsium pada DPSC yang Dipapap MTA

Marker Odontoblast	Deposit Kalsium		
	H7	H14	H21
ALP (r)	-0,303 (lemah)	-0,155 (sangat lemah)	0,158 (sangat lemah)
OC (r)	0,442 (sedang)	0,565 (sedang)	-0,168 (sangat lemah)
DSPP (r)	-0,714 (kuat)	-0,361 (lemah)	-0,154 (sangat lemah)

Pada Tabel 5.2. korelasi antara aktivitas ALP dengan deposit kalsium pada DPSC yang dipapar NMT tidak berbeda dengan yang dipapar MTA yaitu tidak terdapat perbedaan yang bermakna mulai hari ke 7 sampai hari ke 21 ($p > 0,05$). Pada hari ke 7 kekuatan korelasinya sangat lemah (0,00-0,199) dengan arah korelasi negatif, artinya semakin besar nilai ALP semakin kecil nilai deposit kalsium atau sebaliknya, begitu pula pada hari ke 21 walupun kekuatan korelasi sedang (0,400-0,599) tetapi arah korelasinya negatif, sedang hari ke 14 arah korelasinya positif, artinya semakin besar nilai ALP semakin besar pula nilai deposit kalsiumnya tetapi kekuatan korelasinya lemah (0,200-0,399).

Korelasi antara OC dengan deposit kalsium pada DPSC yang dipapar NMT tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$) dan kekuatan korelasinya sangat lemah, kecuali pada hari ke 21 kekuatan korelasi sedang (0,400-0,599) dengan arah korelasi negatif, artinya semakin besar nilai ALP semakin kecil nilai deposit kalsium atau sebaliknya.

Korelasi antara aktivitas DSPP dengan deposit kalsium pada DPSC yang dipapar NMT sangat lemah mulai hari ke 7 sampai ke 21 dan tidak terdapat korelasi yang bermakna. Pada hari ke 7 sama dengan hari ke 21 arah korelasinya negatif dengan kekuatan korelasi sangat lemah (0,00-0,199) tetapi arah korelasi hari ke 21 positif yang artinya semakin besar nilai DSPP semakin besar pula nilai deposit kalsiumnya. Pada hari ke 14 arah korelasinya negatif dan sangat lemah (0,00-0,199).

Tabel 5.2. Korelasi Marker Odontoblas dengan Deposit Kalsium pada DPSC yang Dipapar NMT

Marker Odontoblast	Deposit Kalsium		
	H7	H14	H21
ALP (r)	-0,128 (sangat lemah)	0,206 (lemah)	-0,450 (sedang)
OC (r)	0,189 (sangat lemah)	0,141 (sangat lemah)	-0,405 (sedang)
DSPP (r)	-0,086 (sangat lemah)	-0,155 (sangat lemah)	0,086 (sangat lemah)

Pada Tabel 5.3 menunjukkan korelasi antara aktivitas ALP dengan deposit kalsium pada SHED yang dipapar MTA tidak berbeda yaitu tidak ada perbedaan bermakna mulai hari ke 7 sampai hari ke 21 ($p > 0,05$). Pada hari ke 7 korelasi ALP dengan deposit kalsium yang dipapar MTA mempunyai kekuatan korelasi yang kuat (0,600-0,799) dengan arah korelasi positif sedang pada hari ke 14 kekuatan korelasinya sedang (0,400-0,599) juga dengan arah korelasi positif, yang artinya semakin tinggi nilai aktivitas ALP semakin tinggi jumlah deposit kalsiumnya, kecuali pada hari ke 21 arah korelasinya negatif dengan kekuatan korelasi sedang (0,400-0,599). Korelasi antara aktivitas OC dengan deposit kalsium pada SHED yang dipapar MTA tidak terdapat korelasi bermakna ($p > 0,05$) dengan kekuatan korelasi sangat lemah pada hari ke 7 dan 14, kecuali hari ke 14 arah korelasinya negatif. Pada hari ke 21 kekuatan korelasi sedang (0,200-0,399) dengan arah korelasi positif yang berarti semakin tinggi nilai aktivitas OC semakin tinggi jumlah deposit kalsiumnya atau sebaliknya.

Korelasi antara aktivitas DSPP dengan deposit kalsium pada SHED yang dipapar MTA tidak terdapat korelasi yang bermakna ($p > 0,05$) dengan kekuatan korelasi lemah sampai sedang. Pada hari ke 7 arah korelasinya positif yang berarti semakin besar nilai DSPP semakin besar pula deposit kalsium tetapi kekuatan korelasinya lemah (0,200-0,399). Pada hari ke 14 arah korelasinya negatif dengan kekuatan korelasi sedang (0,400-0,599), sedang pada hari ke 21 arah korelasinya negatif dengan kekuatan korelasi lemah (0,200-0,399).

Tabel 5.3. Korelasi Marker Odontoblas dengan Deposit Kalsium pada SHED yang Dipapar MTA

Marker	Deposit Kalsium		
	H7	H14	H21
ALP (r)	0,667 (kuat)	0,502 (sedang)	-0,402 (sedang)
OC (r)	0,104 (sangat lemah)	-0,019 (sangat lemah)	0,388 (lemah)
DSPP (r)	0,316 (lemah)	-0,414 (sedang)	-0,324 (lemah)

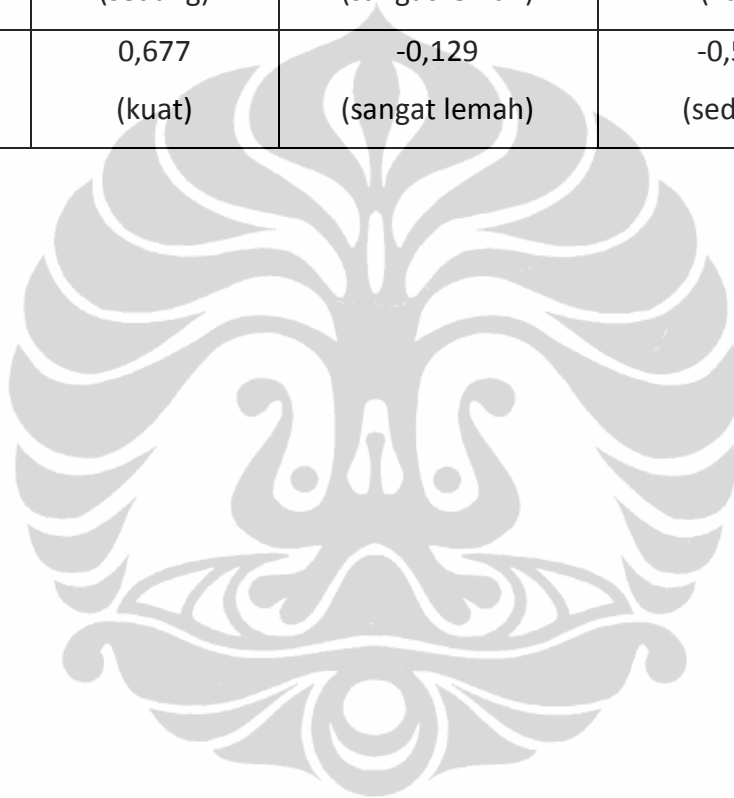
Korelasi antara ALP dengan deposit kalsium yang dipapar NMT pada SHED tidak terdapat perbedaan bermakna mulai hari ke 7 sampai hari ke 21 ($p > 0,05$) dengan kekuatan korelasi yang lemah (0,400-0,599) kecuali pada hari ke 14 kekuatan korelasi sangat lemah (0,00-0,199). Pada hari ke 7 arah korelasinya negatif, sedang pada hari ke 14 dan ke 21 arah korelasinya positif yang berarti semakin besar nilai ALP semakin besar pula nilai deposit kalsiumnya, atau sebaliknya.

Korelasi antara OC dengan deposit kalsium yang dipapar NMT pada SHED juga tidak terdapat perbedaan yang bermakna mulai hari ke 7 sampai ke 21 ($p > 0,05$). Kekuatan korelasinya pada hari ke 7 adalah sedang (0,400-0,599) dengan arah korelasi positif, tetapi pada hari ke 14 kekuatan korelasinya sangat lemah (0,00-0,199) dengan arah korelasi negatif. Seding pada hari ke 21 kekuatan korelasinya kuat (0,600-0,799) dengan arah korelasi positif yang berarti semakin besar nilai OC semakin besar pula nilai deposit kalsiumnya atau sebaliknya.

Korelasi antara aktivitas DSPP dengan deposit kalsium pada SHED yang dipapar NMT tidak terdapat korelasi yang bermakna ($p > 0,05$). Pada hari ke 7 kekuatan korelasi yang kuat (0,600-0,799) dengan arah positif yang berarti semakin besar nilai DSPP semakin besar pula nilai deposit kalsiumnya. Pada hari ke 14 arah korelasinya menjadi negatif dengan kekuatan korelasi yang sangat lemah (0,00-0,199). Pada hari ke 21 kekuatan korelasinya naik menjadi sedang tetapi arah korelasinya tetap negatif (0,400-0,599) (Tabel 5.4).

Tabel 5.4. Korelasi Marker Odontoblas dengan Deposit Kalsium pada SHED yang Dipapar NMT

Marker Odontoblast	Deposit Kalsium		
	H7	H14	H21
ALP (r)	-0,314 (lemah)	0,031 (sangat lemah)	-0,319 (lemah)
OC (r)	0,525 (sedang)	-0,043 (sangat lemah)	0,619 (kuat)
DSPP (r)	0,677 (kuat)	-0,129 (sangat lemah)	-0,555 (sedang)



BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Modifikasi MTA Menjadi NMT

Modifikasi MTA menjadi NMT dilakukan *milling* secara berulang-ulang untuk mendapatkan ukuran nano < 100 nm. *Milling* tersebut dilakukan sebanyak 3 kali dengan periode waktu yang berbeda yaitu *milling* selama 20 jam, 24 jam dan 30 jam. Hasil *milling* selama 30 jam mendekati ukuran 100 nm (105 nm). Untuk memperoleh ukuran dibawah 100 nm dilakukan ultrasonik selama 30 menit dengan cairan pelarut isopropanol 99,8%. Hasil SEM menunjukkan bahwa NMT mempunyai ukuran 75,8 nm dan MTA mempunyai ukuran 0,508 μm . Untuk mengetahui kuantifikasi partikel dilakukan PSA ternyata ukuran MTA sebesar 7,4 μm dan NMT mempunyai ukuran sebesar 41,1 nm. Hasil EDAX menunjukkan NMT mengandung unsur terbanyak adalah kalsium dan silikat diikuti oksida dan bismuth. Untuk mengetahui komposisi yang terkandung di dalam MTA dan NMT dilakukan XRD dan ditemukan bahwa MTA terdiri dari trikalsium silikat (38%), dikalsium silikat (44%) dan bismut oksida (18%) dan NMT terdiri dari senyawa trikalsium silikat (26,7%), dikalsium silikat (47,5%) dan bismut oksida (25,7%). Hasil XRD ini menunjukkan bahwa tidak terjadi perubahan senyawa dan pembentukan senyawa baru, tetapi terjadi perubahan jumlah komposisi pada NMT yaitu dikalsium silikat dan bismut oksida lebih tinggi dibanding MTA sedangkan trikalsium silikat lebih rendah dari MTA. Perubahan prosentase komposisi pada NMT kemungkinan disebabkan karena panas yang timbul pada saat dilakukan *milling* pada MTA. Hasil XRD dapat diketahui bahwa *bismuth* yang merupakan logam berat terikat menjadi senyawa *bismuth oxide*. Hasil XRD membuktikan bahwa terjadi perubahan intensitas relatif dari material NMT yang artinya terjadi perubahan susunan atom yang mengarah ke sifat *amorphous* dibandingkan MTA. Material yang *amorphous* ikatan atomnya tidak teratur dan mempunyai energi permukaan yang lebih besar sehingga lebih mudah bereaksi dengan senyawa lain.

Bubuk MTA dan NMT yang diperoleh tersebut kemudian dijadikan bahan uji viabilitas (proliferasi), diferensiasi sel punca pulpa gigi permanen (DPSC) dan gigi disidui (SHED) ke arah odontoblas dan maturasi sel odontoblas. Dalam uji tersebut digunakan bubuk NMT dan MTA tanpa dicampur dengan air steril. Tujuannya agar: 1) dapat diketahui reaksi antara sel punca dengan senyawa yang terkandung dalam NMT dan MTA 2) air steril yang digunakan dikuatirkan akan menyebabkan perubahan medium kultur sel punca.

6.2 Analisis Efek MTA dan NMT Terhadap Proliferasi Sel Punca Mesensimal Pulpa Gigi

Hasil uji viabilitas diketahui bahwa viabilitas DPSC yang dipapar NMT lebih tinggi dari MTA terutama pada hari ke 1 dan ke 3, sedangkan hari ke 2 viabilitasnya hampir sama dengan paparan MTA. Secara statistik pada hari ke 1 hasil uji viabilitas DPSC yang dipapar NMT berbeda bermakna dengan MTA, tetapi pada hari ke 2 dan ke 3 tidak ada perbedaan bermakna (Gambar 5.10). Tingginya viabilitas DPSC yang dipapar NMT dibanding MTA disebabkan karena unsur kalsium dan silikat yang terkandung dalam NMT lebih tinggi dari MTA (Gambar 5.1D). Hal ini dapat mempengaruhi biokompatibilitas suatu bahan. Tingginya kalsium dapat meningkatkan sifat basa yang menyebabkan aktivitas sel semakin meningkat.^{58,121} Pada hari ke 2 merupakan viabilitas tertinggi dibanding hari ke 1 dan ke 3. Ini terjadi karena hari ke 2 merupakan puncak dari meningkatnya kalsium, kemudian menurun pada hari ke 3 seperti terlihat dari hasil penelitian ini (Gambar 5.10). Penurunan viabilitas pada hari ke 3 disebabkan karena telah selesainya reaksi trikalsium silikat yang terkandung dalam NMT maupun MTA yang menyebabkan produksi kalsium juga menurun.¹²² Namun demikian pada penelitian ini ditemukan bahwa viabilitas DPSC yang dipapar NMT masih lebih tinggi dari MTA. Hasil ini membuktikan bahwa modifikasi MTA menjadi NMT berdampak pada viabilitas sel lebih baik dari MTA, yang berarti NMT dapat menginduksi peningkatan proliferasi pada DPSC dibanding MTA.

Hasil uji viabilitas SHED yang dipapar NMT berbeda dengan uji viabilitas DPSC. Pada hari pertama tingkat viabilitas pada SHED yang dipapar MTA lebih tinggi dari NMT, tetapi pada hari ke 2 viabilitas SHED yang dipapar NMT jauh

lebih tinggi dibanding MTA. Pada hari ke 2 viabilitas SHED yang dipapar NMT dan MTA mencapai puncak tertinggi dan sama seperti pada DPSC. Uji viabilitas SHED yang dipapar NMT berbeda bermakna dengan MTA pada hari ke 2, tetapi pada hari ke 3 terjadi penurunan viabilitas SHED. Viabilitas SHED yang dipapar NMT lebih rendah dibanding MTA dan perbedaan viabilitas tersebut berbeda bermakna (Gambar 5.11). Hasil ini membuktikan bahwa NMT maupun MTA memproduksi kalsium yang tinggi pada hari ke 2 baik terhadap DPSC maupun SHED, dan memurun pada hari ke 3 karena reaksi trikalsium silikat telah selesai sehingga kandungan kalsiumnya juga mulai menurun.¹²² Penurunan viabilitas SHED yang dipapar NMT dibanding MTA pada hari ke 3 kemungkinan disebabkan karena NMT mengandung trikalsium silikat lebih sedikit dibanding MTA dan sudah selesai pada hari ke 2. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa NMT berdampak pada peningkatan proliferasi SHED yang sangat tinggi pada hari ke 2.

Hasil uji beda antara viabilitas DPSC dengan SHED yang dipapar MTA tingkat viabilitasnya tidak berbeda bermakna pada hari ke 1 dan ke 3, tetapi berbeda bermakna pada hari ke 2 (viabilitas DPSC lebih tinggi dari viabilitas SHED). Hasil uji beda antara viabilitas DPSC dengan SHED yang dipapar gigi NMT tidak terdapat perbedaan bermakna mulai hari ke 1 sampai dengan hari ke 3. Secara umum dapat diketahui bahwa biokompatibilitas NMT dan MTA apabila bereaksi dengan SHED maupun dengan sel pulpa gigi permanen adalah sama. Penelitian ini juga mengindikasikan bahwa NMT dapat meningkatkan proliferasi yang sama baik terhadap DPSC maupun SHED (Gambar 5.12 dan 5. 13).

6.3 Analisis Efek MTA dan NMT Terhadap Diferensiasi Sel Punca Mesensimal Pulpa Gigi

6.3.1 Analisis Alkaline Phosphatase (ALP)

Pengukuran marker odontoblas ALP dilakukan dengan mereaksikan antara hasil koleksi supernatan yang diambil dari kultur sel odontoblas secara periodik mulai hari ke 3, 7, 14 dan 21 sebanyak 5 µl dengan substrat ALP (kit ALP). Nilai absorbansi diukur dengan menggunakan *microplate reader*/ELISA dengan panjang gelombang 405 nm.

Alkaline phosphatase (ALP) merupakan enzim hidrofilik yang bekerja dengan membebaskan fosfat organik dari ester fosfat. Aktivitas enzim ini berhubungan juga dengan pembentukan jaringan keras gigi dan tulang sehingga ALP digunakan secara luas sebagai penanda sel-sel turunan jaringan kalsifikasi seperti odontoblas^{17, 42} : 1) Alkaline phosphatase (ALP) sebagai enzim yang merangsang kalsifikasi. ALP dalam pulpa terdapat di odontoblas dan lapisan sub odontoblas. Enzim ini berperan dalam mineralisasi dentin.^{43,44} 2) ALP dapat melepaskan ester fosforik dan ion fosfat dalam keadaan bebas dan berreaksi dengan ion kalsium dari aliran darah dan membentuk kalsium fosfat di matrik organik yang disebut sebagai unit molekul *hydroxyapatite*. 3) Terdapat empat isoenzim ALP yang telah diidentifikasi pada manusia yaitu: non spesifik (hati, tulang, ginjal), intestin, plasenta dan sel bakteri ALP.^{43,44} *Alkaline phosphatase* (ALP) yang dihasilkan oleh odontoblas adalah tipe non spesifik.

Berdasarkan hasil pengamatan kadar ALP pada sel punca gigi permanen (DPSC), aktivitas ALP tertinggi terjadi pada hari ke 3 baik pada DPSC yang terpapar NMT maupun MTA. Aktivitas ALP hari ke 3 pada DPSC yang terpapar MTA tertinggi dibandingkan dengan NMT diikuti pada hari ke 7. Pada hari ke 14 aktivitas ALP pada DPSC yang dipapar MTA dan NMT hampir sama. Dari penelitian ini dapat diketahui bahwa aktivitas ALP pada DPSC yang dipapar MTA terus menurun mulai hari ke 7 sampai hari ke 21, sedangkan pada hari ke 21 tingkat aktivitas ALP pada DPSC yang dipapar NMT kembali naik hampir sama dengan hari ke 7 dan lebih tinggi dari MTA. Perbedaan aktivitas ALP pada DPSC pada hari ke 3 yang dipapar NMT lebih rendah dari MTA dan berbeda secara bermakna, begitu pula pada hari ke 7, sedangkan pada hari ke 14 tidak terdapat perbedaan yang bermakna. Sebaliknya pada hari ke 21 aktivitas ALP pada DPSC yang dipapar NMT lebih tinggi dari MTA dan berbeda secara bermakna. Penelitian ini juga menunjukkan bahwa aktivitas ALP lebih stabil pada DPSC yang dipapar NMT dibanding MTA. Total aktivitas ALP pada DPSC selama 21 hari tidak ada perbedaan bermakna antara kelompok dipapar NMT dengan MTA walaupun pada hari ke 3 dan ke 7 aktivitas ALP yang dipapar MTA lebih tinggi dari NMT (Gambar 5.14 dan 5.15). Kemungkinan ini terjadi karena sifat NMT yang mengandung ion kalsium lebih banyak sehingga mempengaruhi aktivitas

ALP yang mampu stabil selama 21 hari. Ion kalsium yang dihasilkan jika kontak dengan cairan jaringan akan menghasilkan *amorphous calcium phosphate* (ACP) adalah kunci terjadinya kalsifikasi.³³

Fenotip odontoblas selalu dihubungkan dengan sel-sel pembentuk tulang osteoblas. Seperti halnya osteoblas, odontoblas menunjukkan suatu rangkaian diferensiasi yang spesifik untuk pembentukan dentin primer dan dentin reparatif yang ditandai dengan aktivitas marker odontoblas seperti ALP, OC, DSPP, DMP-1 dan Osteonectin (ON).⁵⁰ Penelitian ini juga sama dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Bigia yang menggunakan *human osteoblast* mengamati aktivitas ALP, dan menemukan bahwa kadar (aktivitas) ALP selalu lebih tinggi dari kontrol mulai hari ke 3 sampai dengan hari ke 21.¹²³ Aktivitas ALP terus menurun kecuali aktivitas ALP pada DPSC yang dipapar NMT yang naik pada hari ke 21. Kemungkinan lain penyebabnya karena NMT merupakan material yang lebih bersifat *amorphous calcium phosphates* (ACP) dan *hydroxyapatite* (HA) adalah sumber yang paling disukai untuk bahan perubah dalam rekayasa jaringan keras, karena berat bahan tersebut ringan dan sifat kimianya yang stabil, apalagi NMT mempunyai ukuran *nanoamorphous calcium phosphates* (nano ACP) dan nanokristalin HA adalah masing-masing 41,1nm, sehingga lebih *excited* dalam sel sehingga aktivitas ALP menjadi stabil sampai dengan hari ke 21 (Gambar 5.14) dan dapat memicu terjadinya kalsifikasi yang dapat mempercepat terjadinya reparatif dentin yang mengalami jejas. Dengan demikian ukuran HA sangat mempengaruhi adhesi, proliferasi dan diferensiasi DPSC dan SHED. Efek ACP dan HA pada proliferasi, adsorpsi, dan diferensiasi BMSCs telah dibuktikan, dengan ukuran nanopartikel yang sama, yaitu 20 nm³⁴ (ukuran nano partikel). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa NMT dan MTA mempunyai kemampuan yang sama terhadap proses kalsifikasi dentin gigi permanen.

Aktivitas ALP pada SHED sangat berbeda dengan DPSC. Aktivitas ALP pada SHED yang dipapar NMT lebih tinggi dari MTA maupun kontrol mulai hari ke 3 sampai dengan hari ke 21. Pada hari ke 3 sampai hari ke 21 tingkat aktivitas ALP pada SHED yang dipapar NMT lebih tinggi dari MTA maupun kontrol dan terdapat perbedaan bermakna antara NMT dengan MTA. Hasil ini membuktikan bahwa aktivitas ALP pada SHED yang dipapar NMT lebih lebih baik dibanding MTA dan paparan NMT lebih baik pada SHED dibanding DPSC (Gambar 5.16).

Kemungkinan ini terjadi karena partikel NMT sangat reaktif atau katalitik. Nanopartikel lebih mudah melewati membran sel dalam organisme dan berinteraksi dengan sistem biologis.³⁴ dan SHED mempunyai kapasitas yang kuat untuk merangsang sel penerima.⁵² Kelebihan SHED dibanding DPSC adalah karena SHED ini sifatnya lebih dewasa mampu berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel, yg lebih besar dari batas DPSCs.⁵² sehingga berpengaruh terhadap aktivitas ALP pada SHED yang dipapar NMT. Hasil ini menunjukkan bahwa NMT lebih baik dari MTA terhadap reparatif dentin pada gigi disidui dibanding pada gigi permanen, karena NMT memicu aktivitas ALP yang lebih tinggi dibandingkan MTA. Hal ini juga terlihat pada pengamatan aktivitas ALP selama 21 hari, ternyata total aktivitas ALP pada SHED yang dipapar NMT lebih tinggi dari MTA dan kontrol serta berbeda secara bermakna (Gambar 5.17). Di samping itu, kemungkinan lain yang terjadi karena jumlah material HA yang terkandung dalam gigi disidui lebih sedikit dari gigi permanen¹²⁴, sehingga dapat meningkatkan aktifitas ALP pada SHED dibanding DPSC karena NMT banyak mengandung ion kalsium yang dapat mengisi kekurangan HA pada gigi disidui. Dentin terdiri dari 70% mineral HA, 18% bahan organik dan 12% adalah air.¹¹⁸

Hasil penelitian ini menjelaskan bahwa paparan MTA pada DPSC lebih merangsang aktivitas ALP dibanding aktivitas MTA pada SHED mulai hari ke 3 sampai dengan hari ke 14 dan berbeda secara bermakna, kecuali pada hari ke 21 tidak ada perbedaan yang bermakna (Gambar 5.18). Hasil ini membuktikan bahwa pada proses kalsifikasi, MTA lebih baik digunakan pada gigi permanen dibanding gigi disidui. Sedangkan paparan NMT merangsang aktivitas ALP pada DPSC lebih tinggi dari SHED pada hari ke 3 dan ke 7, sedangkan hari ke 14 aktivitas ALP pada SHED lebih tinggi dari DPSC dan berbeda bermakna kecuali hari 21 tidak berbeda bermakna (Gambar 5.19). Apabila dibandingkan aktivitas ALP pada DPSC dan pada SHED yang dipapar NMT, ternyata aktivitas ALP pada DPSC lebih tinggi dari SHED kecuali pada hari ke 14. Berdasarkan hasil tersebut ternyata NMT dan MTA lebih banyak meningkatkan aktivitas ALP pada DPSC dibanding SHED, tetapi total aktivitas ALP selama 21 hari pada SHED yang dipapar NMT lebih tinggi dari MTA sedangkan pada DPSC tidak ada bedanya antara NMT dengan MTA. Hasil ini mendukung hasil sebelumnya bahwa NMT lebih merangsang aktivitas ALP pada SHED dibanding DPSC dan menunjukkan

NMT lebih efektif dari MTA untuk memicu pada proses reparatif dentin yang mengalami jejas karena meningkatkan proses kalsifikasi pada gigi disidui.

6.3.2 Analisis Osteocalcin (OC)

Osteocalcin (OC) adalah salah satu tipe protein yang disekresi oleh osteoblas. Pola dari ekspresi gen-gen protein selama diferensiasi odontoblas mempunyai kesamaan dengan osteoblas. 1) Pada daerah jejas osteocalcin disekresi secara cepat dari odontoblas untuk membentuk predentin dari dentin reaksioner.^{46,47} 2) Osteocalcin (OC) dianggap sebagai pangkal marker diferensiasi odontoblas. 3) Setelah 3 hari preparasi, osteocalcin yang berlebih tampak pada perkembangan badan golgi yang pesat dan pada vesikle dari sel columnar ditepi permukaan dentin-pulpa dibawah kavitas.⁴⁶

Aktivitas OC sebagai marker odontoblas pada DPSC secara diskriptif yang terpapar NMT lebih tinggi dari MTA mulai hari ke 3 sampai hari ke 21. Aktivitas OC pada DPSC yang terpapar NMT tertinggi pada hari pertama dan menurun tetapi stabil mulai hari ke 7 sampai hari ke 21. Sedangkan aktivitas OC yang terpapar MTA jauh lebih rendah dan terus menurun hingga hari ke 21. Berdasarkan analisis statistik terdapat perbedaan bermakna antara aktivitas OC pada DPSC yang dipapar NMT dengan MTA maupun kontrol kecuali hari ke 21 tidak berbeda bermakna antara NMT dengan kontrol (Gambar 5.20). Aktivitas OC selama 21 hari pada DPSC yang terpapar NMT lebih tinggi dari MTA dan berbeda secara bermakna (Gambar 5.22). Apabila dibandingkan antara aktivitas OC selama 21 hari pada DPSC yang dipapar NMT lebih tinggi dari MTA dan berbeda secara bermakna. Osteocalcin (OC) adalah salah satu protein yang disekresi oleh odontoblas. Osteocalcin (OC) diperlukan oleh dentin yang mengalami jejas untuk membentuk predentin dari dentin reaksioner. Osteocalcin (OC) ditemukan jumlah yang besar pada odontoblas 3 hari setelah dipreparasi, dan ditemukan sejumlah kecil pada karies gigi yang tidak dirawat. Predentin adalah matrik organik dentin yang dihasilkan oleh odontoblas yang belum mengalami kalsifikasi, yang membentuk lapisan dalam dari dentin dan pada saatnya akan berubah menjadi dentin. Tingginya aktivitas OC pada DPSC yang dipapar NMT menunjukkan bahwa NMT lebih baik dari MTA pada proses reparatif dentin yang mengalami jejas pada gigi permanen.

Hasil tersebut di atas tidak terjadi pada SHED, karena aktivitas OC pada SHED yang terpapar NMT lebih rendah dari MTA, kecuali pada hari ke 7 aktivitas OC yang dipapar NMT sedikit lebih tinggi dari MTA. Aktivitas OC yang terpapar NMT ini terus menurun hingga hari ke 21, bahkan hampir tidak ada aktivitas OC baik pada SHED yang dipapar NMT maupun MTA. Keadaan ini dapat dijelaskan bahwa berdasarkan analisis statistik NMT tidak sebaik MTA dalam meningkatkan aktivitas OC pada SHED walaupun secara diskriptif sebetulnya aktivitas OC pada SHED yang dipapar NMT maupun MTA nilai mean keduanya tidak banyak berbeda yaitu pada hari ke 3, 7 dan 21 (Gambar 5.21).

Perbedaan bermakna aktivitas OC pada SHED yang dipapar NMT dengan MTA terjadi pada hari ke 3 dan ke 14, sedang pada hari ke 7 dan 21 tidak ada perbedaan yang bermakna (Gambar 5.21). Tetapi aktivitas OC selama 21 hari pada SHED yang dipapar MTA lebih tinggi dari NMT dan terdapat perbedaan bermakna. Tingginya aktivitas OC yang dipapar MTA dibanding NMT pada SHED menunjukkan bahwa pembentukan predentin pada gigi disidui yang mengalami jejas dan proses reparatif dentin pada gigi disidui tidak terpengaruh oleh ukuran partikel dari mineral trioksida.

Analisis statistik menunjukkan aktivitas OC yang dipapar MTA pada DPSC dan SHED berbeda bermakna. Aktivitas OC yang dipapar MTA pada SHED lebih tinggi dari DPSC sejak hari ke 3 sampai hari ke 14 periode eksperimen. Pada DPSC aktivitas MTA sangat rendah, sedangkan pada hari ke 21 aktivitas OC pada DPSC maupun SHED yang dipapar MTA hampir tidak terdeteksi. Ini menunjukkan bahwa MTA merangsang aktivitas OC pada DPSC dan SHED sampai hari ke 14 saja. Hasil ini mengindikasikan bahwa MTA lebih efektif bila digunakan untuk memicu pembentukan predentin pada gigi disidui. Sebaliknya kurang efektif diaplikasikan pada gigi permanen. Perbandingan aktivitas OC pada DPSC dengan SHED yang dipapar NMT hampir sama dengan yang dipapar MTA, kecuali pada hari ke 21. Temuan ini menunjukkan bahwa pembentukan predentin untuk membantu proses reparatif dentin masih lebih baik NMT dibanding MTA baik pada gigi permanen maupun disidui karena aktivitas OC terus terjadi sampai hari ke 21.

Perbedaan aktivitas ALP pada SHED yang dipapar NMT lebih tinggi dari yang dipapar MTA, sedangkan aktivitas ALP pada DPSC yang dipapar MTA lebih tinggi dari pada yang dipapar NMT. Sebaliknya aktivitas OC pada DPSC yang dipapar NMT lebih tinggi dari yang dipapar MTA, sedang aktivitas OC pada SHED yang dipapar MTA lebih tinggi dari NMT. Kemungkinan ini terjadi karena SHED berbeda dengan DPSCs dengan memperhatikan faktor rata-rata proliferasi yang tinggi, peningkatan ganda populasi sel, pembentukan kelompok sel, kapasitas osteoinduktif *in vivo*, dan kegagalan untuk menyusun kembali *dentin-pulp like complex*.⁵² Gigi disidui berbeda dari gigi permanen dalam struktur jaringannya dan fungsinya. Diketahui bahwa gigi disidui tidak hanya memandu erupsi gigi permanen, tetapi juga terlibat pada pembentukan tulang selama erupsi gigi permanen.⁵² Oleh karena itu gigi disidui mungkin merupakan sumber yang ideal untuk memperbaiki kerusakan struktur sel punca gigi, merangsang regenerasi tulang, dan memungkinkan perawatan cedera jaringan saraf atau penyakit degeneratif. Eksistensi SHED yang signifikan secara biologis tetap harus dijelaskan. Penelitian lainnya menyebutkan bahwa DPSC dari gigi molar ketiga paling tepat untuk digunakan dalam eksperimen praklinik dan klinik.¹²⁵ Seperti disebutkan sebelumnya bahwa ini terjadi karena jumlah HA pada gigi permanen dan gigi disidui¹¹⁸ dan apakah struktur kimia predentin pada gigi permanen sama dengan disidui. Predentin adalah dentin yang belum mengalami kalsifikasi. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa NMT yang merupakan material berukuran nano lebih mudah bereaksi dengan predentin pada gigi permanen dibanding gigi disidui. Hasil ini menjelaskan, struktur kimia antara predentin gigi permanen yang mungkin berbeda dengan struktur predentin gigi disidui¹²⁶ yang lebih mudah bereaksi dengan NMT daripada MTA.

6.3.3 Analisis Dentin Sialophospho Protein (DSPP)

Dentin sialophospho protein (DSPP). adalah suatu sialic acid yang kaya glycoprotein yang dihasilkan oleh odontoblas.⁴⁵ 1) Merupakan marker untuk identifikasi dan mempelajari diferensiasi dentin-pulpa kompleks^{45,56,106} dan disekresi secara selektif oleh odontoblas. 2) DSPP diekspresikan oleh odontoblas yang dimulai dengan pembentukan predentin dan ekspresi DSPP oleh sel-sel

pulpa yang aktif pada saat dentinogenesis.^{45,56} 3) DSPP adalah suatu sialic acid yang merangsang kolagen pembentukan dentin sekunder.⁴⁵

Aktivitas DSPP sebagai marker odontoblas pada DPSC secara diskriptif aktivitas DSPP pada DPSC yang dipapar MTA dan NMT pada hari ke 3 dan 14 hampir sama tetapi lebih tinggi dari kelompok kontrol. Pada hari ke 7 dan 21 aktivitas NMT lebih tinggi dari MTA dan kontrol dan berbeda bermakna. Aktivitas DSPP yang dipapar NMT terus meningkat dari ke 3 sampai hari ke 21. Berbeda dengan MTA yang meningkat sampai hari ke 14, kemudian menurun pada hari ke 21 (Gambar 5.26). Jumlah aktivitas DSPP pada DPSC selama 21 hari menunjukkan bahwa nilai aktivitas NMT lebih tinggi dari MTA dan berbeda secara bermakna (Gambar 5.28). Telah diketahui bahwa pembentukan dentin, yang dikenal sebagai dentinogenesis, dimulai sebelum pembentukan enamel dan dimulai oleh odontoblas.. Dentin sialophospho protein (DSPP) berperan penting terhadap pembentukan dentin sekunder terutama pada saat perawatan *pulpcapping* (reparatif dentin). Nilai aktivitas DSPP pada DPSC yang dipapar NMT yang lebih tinggi dari MTA, seperti diindikasikan melalui penelitian ini menunjukkan bahwa NMT lebih *excited* terhadap DPSC dibanding MTA. Diasumsikan, NMT lebih baik untuk perawatan *pulpcapping* namun perlu penelitian lebih lanjut.

Aktivitas DSPP pada SHED pada hari ke 3, 7 dan 21 terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok yang dipapar NMT dengan MTA dan kontrol, juga antara kontrol dengan MTA, tetapi pada hari ke 14 aktivitas DSPP yang dipapar NMT sama dengan MTA dan lebih rendah dari kontrol (Gambar 5.27). Jumlah nilai aktivitas DSPP selama 21 hari pada SHED kelompok kontrol mempunyai nilai aktivitas DSPP paling tinggi dibanding NMT dan MTA. Secara statistik terdapat perbedaan bermakna antara aktivitas DSPP yang dipapar NMT dengan yang dipapar MTA, tetapi terdapat perbedaan tidak bermakna antara pemberian NMT dengan kontrol selama 21 hari (Gambar 5.29). Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian NMT meningkatkan pembentukan dentin sekunder pada DPSC dan SHED dibanding dengan pemberian MTA.

Apabila dibandingkan antara aktivitas DSPP pada DPSC dan SHED ternyata nilai aktivitas DSPP pada DPSC lebih tinggi dari SHED yang dipapar MTA dan berbeda bermakna mulai hari ke 3, 7 sampai hari ke 14 (Gambar 5.30). Hasil ini membuktikan bahwa MTA lebih merangsang pembentukan dentin

sekunder pada DPSC dibanding SHED mulai hari ke 3 sampai hari ke 21. Perbedaan aktivitas DSPP antara DPSC dengan SHED yang dipapar NMT terbukti bahwa aktivitas DSPP pada DPSC lebih tinggi dari SHED. dan terdapat perbedaan bermakna pada hari ke 14 dan 21 (Gambar 5.31) dan membuktikan bahwa NMT lebih merangsang pembentukan dentin sekunder pada DPSC dibanding SHED mulai hari ke 7 sampai hari ke 21. Hasil penelitian ini sesuai dengan data sebelumnya membuktikan bahwa NMT sama efektifnya untuk meningkatkan pembentukan dentin sekunder pada gigi permanen dan gigi disidui, sedang MTA lebih efektif pembentukan dentin sekunder pada gigi permanen daripada gigi disidui.

6.4 Analisis Efek MTA dan NMT Terhadap Maturasi Sel Ke Arah Odontoblas

Deposit ion kalsium pengukurannya menggunakan pewarnaan Von Kossa. Pada pewarnaan ini ditemukan tiga warna yaitu apabila sel berwarna hitam menunjukkan deposit kalsium, warna merah adalah nukleus dan warna pink adalah sitoplasma. Apabila terdapat sel yang tidak ada titik hitam berarti sel tersebut tidak mengandung ion kalsium.¹¹³

Perhitungan deposit kalsium ini dimulai hari ke 7 sampai hari ke 21. Pada Gambar 5.33 terlihat bahwa deposit kalsium pada DPSC yang dipapar NMT lebih tinggi dari MTA mulai hari ke 7 sampai hari ke 21. Berdasarkan analisis statistik hanya pada hari ke 7, 14 dan 14 yang berbeda bermakna antara deposit kalsium pada DPSC yang dipapar NMT dengan MTA. Peranan NMT yang berukuran nano membuktikan bahwa material nano ini lebih reaktif dan katalitik merangsang sel dan kandungan kalsium. Nano HA yang terkandung dalam NMT memungkinkan untuk meningkatkan deposit kalsium pada DPSC. Hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan Carnes *et al* bahwa deposit kalsium baru bisa ditemukan pada hari ke 14.¹²⁷ Penelitian ini menunjukkan bahwa deposit kalsium sudah ditemukan pada hari ke 7 dan secara optimal ditemukan pada hari ke 14, mulai menurun pada hari ke 21. Keadaan ini belum diketahui secara pasti, tetapi kemungkinan karena pada hari ke 21 pertumbuhan sel gigi permanen mulai menurun sehingga kemampuan untuk membentuk ion kalsium juga mulai menurun. Di samping itu kandungan kalsium yang ada dalam NMT dan MTA

juga menurun karena telah selesainya reaksi trikalsium silikat. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa NMT lebih baik dari MTA pada proses regeneratif dentin pada gigi permanen.

Deposit kalsium pada SHED berbeda dengan DPSC. Deposit kalsium mulai hari ke 7 terlihat masih sedikit, namun pada hari ke 14 dan ke 21 terus meningkat. Secara diskriptif jumlah deposit kalsium pada hari ke 7 sampai ke 21 lebih banyak pada SHED yang dipapar NMT dibanding MTA. Pada hari ke 21 jumlah deposit kalsium pada SHED merupakan jumlah deposit kalsium tertinggi dibanding hari ke 7 dan ke 14 (Gambar 5.34). Pada hari ke 7 dan 14 deposit kalsium SHED yang dipapar NMT berbeda bermakna dengan yang dipapar MTA, sedangkan pada hari ke 21 deposit kalsium SHED yang dipapar NMT dan MTA tidak terdapat perbedaan yang bermakna. Keadaan ini menunjukkan bahwa deposit kalsium pada SHED masih terus bertumbuh dan SHED masih terus membentuk deposit kalsium sampai hari ke 21. Ini berbeda dengan DPSC yang mulai menurun pada hari ke 21. Paparan NMT yang mengandung nano HA ikut mendukung pembentukan deposit kalsium SHED sampai hari ke 21. Penelitian ini mengindikasikan bahwa NMT adalah bahan yang ideal untuk perawatan saluran pulpa pada gigi disidui dan gigi permanen, karena jumlah deposit kalsium merupakan indikator terjadinya proses regeneratif pada dentin.⁵⁴

Pengamatan terhadap deposit kalsium pada DPSC yang dipapar NMT pada hari ke 7 ternyata telah terjadi pembentukan matrik ekstrasellular, sedangkan pada DPSC yang dipapar MTA pembentukan matrik ekstrasellular terjadi pada hari ke 14 dan pada kontrol sampai dengan hari ke 21 belum terlihat pembentukan matrik ekstrasellular. Pembentukan matrik ekstrasellular pada SHED yang dipapar NMT terjadi pada hari ke 14, sedangkan matrik ekstrasellular pada SHED yang dipapar MTA baru terjadi pada hari ke 21, pada kelompok kontrol tidak terjadi pembentukan matrik ekstrasellular sampai dengan hari ke 21. Hasil ini membuktikan bahwa NMT lebih cepat dalam pembentukan matrik ekstrasellular dibanding MTA baik terhadap DPSC maupun SHED. Hal ini terjadi karena ion kalsium yang terkandung dalam NMT lebih tinggi dibanding MTA dan NMT adalah material berukuran nano yang mempunyai sifat lebih reaktif dan katalitik serta lebih mudah menembus dan masuk ke dalam sel.³⁴ Penelitian lain yang

dilakukan oleh Carnes et al menemukan bahwa ion kalsium pada matrik ekstrasellular baru terbentuk pada hari ke 14 dan 21,¹²⁷ sedangkan pada penelitian ini matrik ekstra sellular sudah mulai terbentuk pada hari ke 7 khususnya pada DPSC yang dipapar NMT. Pengamatan di atas menunjukkan peranan NMT dalam pembentukan matrik ekstrasellular baik pada DPSC maupun SHED. lebih baik dibandingkan dengan MTA.

Apabila dibedakan antara deposit kalsium pada DPSC dengan SHED yang dipapar MTA ternyata deposit kalsium pada DPSC lebih tinggi dari SHED pada hari ke 7 dan 14. Deposit kalsium pada DPSC pada hari ke 14 yang tertinggi dibanding hari ke 7 dan 21. Pada hari ke 21 deposit kalsium pada DPSC yang dipapar MTA menurun dan lebih rendah dari deposit kalsium pada SHED, sedang deposit kalsium pada SHED yang dipapar MTA terus meningkat mulai hari ke 7 sampai hari ke 21 (Gambar 5.35).

Jumlah deposit kalsium pada DPSC yang dipapar NMT lebih tinggi dari SHED pada hari ke 7 berbeda bermakna tetapi pada hari ke 14 hampir sama, sedangkan pada hari ke 21 deposit kalsium pada SHED yang dipapar NMT lebih tinggi dari DPSC (Gambar 5.36). Penelitian ini membuktikan deposit kalsium pada SHED yang dipapar NMT terus meningkat mulai hari ke 7 sampai hari ke 21, sedangkan deposit kalsium pada DPSC tertinggi pada hari ke 14 dan menurun pada hari ke 21.

Pengamatan deposit kalsium di atas sesuai dengan hasil penelitian Schulze et al, yang menyatakan bahwa absorpsi kalsium berkorelasi positif dengan deposit kalsium.⁵⁵ Seperti diketahui dari data sebelumnya, unsur kalsium yang terkandung dalam NMT lebih tinggi dari MTA dapat memicu peningkatan nilai deposit kalsium, baik pada gigi permanen maupun gigi disidui sehingga meningkatkan proses regeneratif dentin gigi permanen dan disidui.

Hasil penelitian tersebut membuktikan bahwa modifikasi MTA menjadi NMT dapat meningkatkan proses reparatif dan regeneratif dentin gigi permanen dan disidui. Meningkatnya proses reparatif dan regeneratif dentin tersebut dapat mempertahankan pulpa gigi tetap vital, mencegah terjadinya nekrosa pulpa dan pembentukan abses serta infeksi fokal pada tubuh manusia.

6.5 Analisis Korelasi Marker Odontoblas dengan Deposit Kalsium pada DPSC

Korelasi antara aktivitas ALP dengan deposit kalsium pada DPSC yang dipapar MTA maupun NMT mempunyai kekuatan yang lemah bahkan cenderung sangat lemah dengan arah korelasi yang negatif, kecuali korelasi dengan deposit kalsium yang dipapar NMT pada hari ke 14 yang arah korelasinya positif walaupun kekuatan korelasinya lemah. Hasil ini tidak berbeda jauh dengan korelasi aktivitas ALP dengan deposit kalsium pada DPSC yang dipapar MTA yang mempunyai kekuatan korelasi sangat lemah dengan arah korelasi positif. Kemungkinan ini disebabkan karena NMT lebih banyak mengandung unsur kalsium dan nano HA dibanding MTA sehingga mempunyai kekuatan korelasi yang sedikit lebih baik dari MTA. Arah korelasi yang positif menunjukkan bahwa semakin besar nilai ALP semakin besar pula nilai deposit kalsium. Hasil penelitian menjelaskan bahwa deposit kalsium pada DPSC yang dipapar NMT dengan yang dipapar MTA tidak terdapat perbedaan bermakna kecuali pada hari ke 7 (Gambar 5.38)

Korelasi antara aktivitas OC dengan deposit kalsium pada DPSC yang dipapar MTA menunjukkan kekuatan korelasi yang sedang dengan arah korelasi yang positif pada hari ke 7 dan ke 14, tetapi kekuatan korelasi menjadi sangat lemah dengan arah korelasi yang negatif pada hari ke 21. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Schulze *at al*, yang melaporkan bahwa deposit kalsium berhubungan dengan absorpsi kalsium, osteocalcin dan leptin⁵⁵ terutama pada hari ke 7 dan ke 14. Berbeda dengan penelitian Schulze *at al* ini adalah hasil korelasi aktivitas OC dengan deposit kalsium pada DPSC yang dipapar NMT. Korelasinya sangat lemah pada hari ke 7 dan ke 14 dengan arah korelasi yang positif. Sifat nano ACP dan kandungan nano HA tidak berhubungan langsung dengan aktivitas OC dan absorpsi kalsium. *Osteocalcin* (OC) diperlukan untuk pembentukan pre-dentin akibat terjadinya jejas pada dentin dan belum mengalami kalsifikasi. *Alkaline phosphatase* (ALP) adalah enzim yang bertugas merangsang terjadinya kalsifikasi pada dentin. Hasil korelasi aktivitas OC dengan deposit kalsium pada DPSC yang dipapar NMT berbeda dengan data hasil temuan penelitian ini sebelumnya, bahwa aktivitas OC pada DPSC yang dipapar NMT

lebih tinggi dari MTA dan berbeda bermakna mulai hari ke 3 sampai hari ke 21 (Gambar 5.17). Begitu pula analisis deposit kalsium pada SHED yang dipapar NMT lebih tinggi daripada kalsium yang dipapar MTA, mulai hari ke 7 sampai hari ke 21 (Gambar 5.42). Hasil ini membuktikan bahwa tingginya nilai aktivitas OC dan deposit kalsium pada SHED yang dipapar NMT ternyata tidak ada korelasi yang bermakna antar keduanya dan kekuatan korelasinya juga lemah.

Korelasi antara aktivitas DSPP dengan deposit kalsium pada DPSC yang dipapar MTA tidak terdapat korelasi yang bermakna mulai hari ke 7 sampai ke 21 dengan kekuatan korelasi yang kuat pada hari ke 7 dan menurun sampai sangat lemah pada hari ke 21 dengan arah korelasi yang negatif. Ini membuktikan bahwa tidak terdapat hubungan antara aktivitas DSPP yang berfungsi memicu pembentukan dentin sekunder dengan deposit kalsium pada DPSC yang dipapar MTA. Sedangkan korelasi antara aktivitas DSPP pada DPSC yang dipapar NMT mempunyai kekuatan korelasi yang sangat lemah dengan arah korelasi negatif, Seperti halnya material MTA, ternyata NMT juga tidak ada korelasi antara aktivitas DSPP pada DPSC yang dipapar NMT, yang berarti bahwa aktivitas DSPP akibat paparan MTA maupun NMT tidak ada hubungan dengan deposit kalsium (Gambar 5.23). Diasumsikan pembentukan dentin sekunder tidak terkait dengan deposit kalsium pada gigi permanen. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk menjelaskan asumsi ini.

6.6 Analisis Korelasi Marker Odontoblas dengan Deposit Kalsium pada SHED

Korelasi antara aktivitas ALP dengan deposit kalsium pada SHED yang dipapar MTA mempunyai kekuatan korelasi yang sedang sampai kuat. Pada hari ke 7 korelasi ALP dengan deposit kalsium pada SHED yang dipapar MTA mempunyai korelasi kuat dengan arah korelasi positif, tetapi kekuatan korelasi pada hari ke 14 menurun ke tingkat sedang dan pada hari ke 21 arah korelasinya menjadi negatif. Apabila dibandingkan dengan korelasi aktivitas ALP dengan deposit kalsium pada SHED yang dipapar NMT dengan MTA, ternyata yang dipapar MTA mempunyai kekuatan korelasi yang lebih kuat. Korelasi aktivitas ALP dengan deposit kalsium yang dipapar NMT pada hari ke 7, kekuatan korelasinya lemah dengan arah korelasi negatif pada hari ke 21 kekuatan

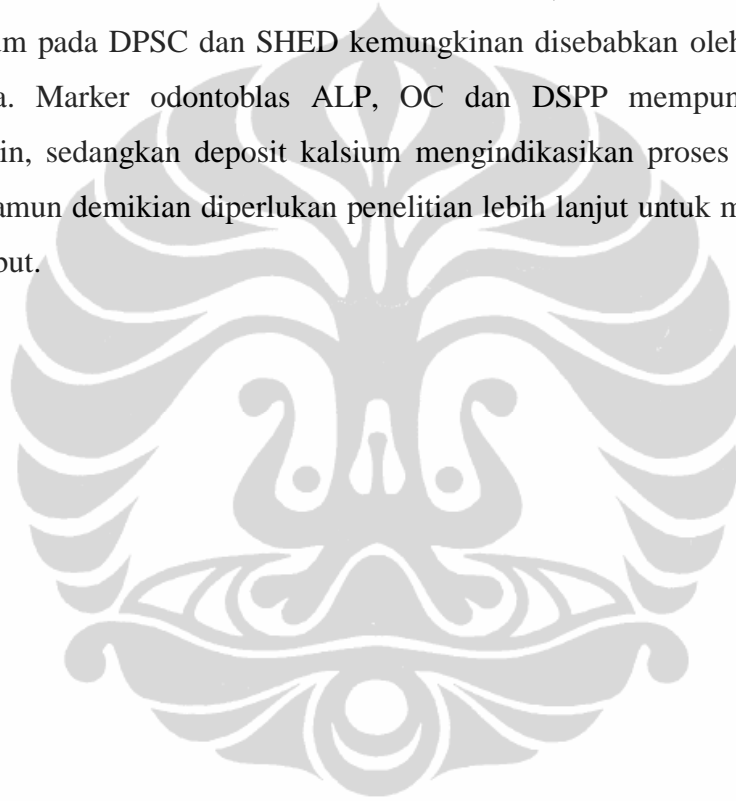
korelasinya lemah dengan arah korelasi yang positif dan pada hari ke 14 kekuatan korelasinya sangat lemah dengan arah yang positif. Hal ini berbeda dengan hasil analisis terhadap aktivitas ALP pada SHED yang dipapar NMT, yang menunjukkan aktivitas MTA lebih tinggi mulai hari ke 3 sampai ke 21 (Gambar 5.13). Dengan demikian dapat diketahui bahwa aktivitas ALP pada SHED yang dipapar NMT tidak berhubungan dengan deposit kalsium pada SHED yang dipapar NMT walaupun deposit kalsium pada SHED yang dipapar NMT lebih tinggi dari MTA mulai hari ke 7 sampai hari ke 21 (Gambar 5.42).

Pada hari ke 7 korelasi aktivitas OC dengan deposit kalsium pada SHED yang dipapar MTA tidak berhubungan secara bermakna serta mempunyai kekuatan yang sangat lemah dengan arah positif dan pada hari ke 14 kekuatan korelasi juga sangat lemah dengan arah korelasi yang negatif. Sedangkan pada hari ke 21 kekuatan korelasinya lemah dengan arah korelasi positif. Sebaliknya korelasi OC dengan deposit kalsium pada SHED yang dipapar NMT mempunyai nilai korelasi yang lebih tinggi dari MTA. Pada hari ke 7 kekuatan korelasinya sedang dan pada hari ke 21 kekuatan korelasinya kuat dengan arah korelasi yang positif, kecuali pada hari ke 14 kekuatan korelasinya sangat lemah dengan arah korelasi yang negatif. Hasil ini berbeda dengan aktivitas OC pada SHED yang dipapar MTA lebih tinggi dari NMT (Gambar 5.18), tetapi sesuai dengan temuan bahwa deposit kalsium pada SHED yang dipapar NMT yang lebih tinggi dari MTA (Gambar 5.42). Hasil ini juga mendukung hasil penelitian Scheluze *et al* bahwa absorpsi kalsium berhubungan dengan aktivitas OC.⁵⁵

Korelasi aktivitas DSPP dengan deposit kalsium pada SHED yang dipapar MTA mempunyai kekuatan korelasi yang lemah sampai sedang dengan arah korelasi positif pada hari ke 7 dan negatif pada hari ke 14 dan 21. Berbeda dengan korelasi antara aktivitas DSPP dengan deposit kalsium pada SHED yang dipapar NMT. Kedua variable tersebut mempunyai kekuatan korelasi kuat dan positif pada hari ke 7, tetapi korelasinya tidak bermakna. Pada hari ke 14 kekuatan korelasinya sangat lemah dengan arah korelasi yang negatif dan naik kembali kekuatannya menjadi sedang pada hari ke 21 dan arah korelasinya tetap negatif. Hasil tersebut menunjukkan, bahwa korelasi NMT dengan deposit kalsium pada SHED lebih kuat dibandingkan dengan MTA terutama pada hari ke 7. Hasil ini

sesuai dengan temuan bahwa deposit kalsium pada SHED yang dipapar NMT lebih tinggi dari MTA (Gambar 5.42) yang berkorelasi juga dengan aktivitas DSPP pada SHED yang menunjukkan bahwa aktivitas DSPP yang dipapar NMT lebih tinggi dari MTA walaupun tidak ada perbedaan yang bermakna. Dengan demikian dapat dikatakan NMT berdampak positif pada pembentukan dentin sekunder gigi disidui tetapi dampak yang sama tidak ditemukan pada pembentukan dentin sekunder gigi permanen.

Korelasi lemah antara marker odontoblas ALP, OC dan DSPP dengan deposit kalsium pada DPSC dan SHED kemungkinan disebabkan oleh fungsinya yang berbeda. Marker odontoblas ALP, OC dan DSPP mempunyai fungsi reparatif dentin, sedangkan deposit kalsium mengindikasikan proses regeneratif dentin.^{54,50} Namun demikian diperlukan penelitian lebih lanjut untuk menjelaskan korelasi tersebut.



BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dibuktikan tersebut di atas dapat disimpulkan sebagai berikut:

- 7.1.1 Mineral trioxide aggregate (MTA) dapat dimodifikasi ukurannya menjadi nanopartikel mineral trioksida (NMT) mempunyai ukuran 41,1 nm (*nano size*) setelah dilakukan *milling* selama 30 jam dan dilakukan ultrasonik selama 30 menit.
- 7.1.2 Nanopartikel mineral trioksida (NMT) meningkatkan proliferasi dan tidak bersifat toksik serta tidak berdampak menghambat viabilitas sel punca pulpa gigi (DPSC dan SHED).
- 7.1.3 Nanopartikel mineral trioksida (NMT) dapat meningkatkan diferensiasi sel punca ke arah odontoblas karena: 1) meningkatkan aktivitas ALP khususnya pada SHED lebih baik dibanding MTA, 2) meningkatkan aktivitas OC khususnya pada DPSC dibanding MTA, 3) meningkatkan aktivitas DSPP pada DPSC dan SHED dibanding MTA.
- 7.1.4 Nanopartikel mineral trioksida (NMT) meningkatkan maturasi sel ke arah odontoblas karena dapat meningkatkan jumlah deposit kalsium dan pembentukan matrik ekstrasellular pada DPSC dan SHED dibanding MTA. Pembentukan matrik ekstrasellular sudah terbentuk pada hari ke 7 pada DPSC yang dipapar NMT, sedang yang dipapar MTA terbentuk pada hari ke 14. Pembentukan matrik ekstrasellular terbentuk pada hari ke 14 pada SHED yang dipapar NMT, sedang yang dipapar MTA terbentuk pada hari ke 21.

7.2. Saran

- 7.2.1 Penelitian ini adalah penelitian *in vitro* dengan menggunakan bubuk NMT yang diaplikasikan pada DPSC dan SHED dan dapat dilanjutkan dengan bekerjasama dengan lembaga lain untuk membuat kemasan NMT dalam bentuk pasta yang kemudian diuji secara *in vivo* terhadap binatang coba..

- 7.2.2 Untuk memperoleh bahan yang lebih murah perlu dilakukan pembuatan material nano dari bahan dasar MTA yang banyak ditemui di Indonesia yaitu portland semen putih lokal.
- 7.2.3 Penelitian ini disarankan untuk diajukan mendapat hak paten (HAKI) kepada Pemerintah RI atas nama FKGUI dan FKUB serta instansi lain yang terlibat dalam pembuatan NMT.



DAFTAR REFERENSI

1. Yuyus R, Magdarina D, Sintawati F. Karies Gigi Pada Anak Balita di 5 Wilayah DKI Tahun 1993. *Cermin Dunia Kedokteran* 2002;134:39-42.
2. Badan Litbang Kesehatan. *Riset Kesehatan Dasar*. Departemen Kesehatan RI 2007. In 2007.
3. Karies Gigi. Pengukuran risiko dan evaluasi. [http://www. google.co.id](http://www.google.co.id) (9 Nopember 2010)
4. Finn, S.B. *Clinical pedodontics* 4th ed. W.B Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto 1973.
5. Whitworth JM, Nunn. JH. Paediatric endodontic. In: Welbury RR (Editor) *Paediatric dentistry*. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press 1997; 138-69.
6. Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *J Dent* 2000;28:77-92.
7. Cox CF, Keall HJ, Ostro E, Bergenhottz G. Biocompatibility of surface-sealed materials against exposed pulps. *J Prosthet Dent* 1987;57: 1-8.
8. Stanley HR. Pulp capping: conserving the dental pulp – can it be done ? Is it worth it ? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1989;68:628-639.
9. Murray PE, Stanley HR, Matthews JB, Sloan AJ, Smith AJ. Age-related odontometric changes of human teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;93:474-482.
10. Rood HD, Waterhouse PJ, Fuks AB, Fayle SA, Moffat MA. Pulp therapy for primary molar. *Int J of Paed Dent* 2006;16:15-26.
11. Pallares MA, Caballero A, Ricardo LM. Mineral trioxide aggregate in primary teeth pulpotomy. A systematic literature review. *Med Oral Pathol Oral Cir Bucal-AHEAD OF PRINT* 2010.
12. Eidelman E, et al. Mineral trioxide aggregate Vs formocresol in pulpotomized primary molars. . *Am Acad Pediatr Dent* 2001;23:250-4.
13. Srinivasan V, Patchett C, Waterhaouse PJ., Is there life after Buckley's Formocresol ? Part I - A narrative review of alternative interventions and materials. *Int J of Paed Dent* 2006;16:117-127.
14. Steffen R, v. Waes H. Understanding mineral trioxide aggregate/Portland-cement: A review of literature and background factors. *European Archives of Paed Dent* 2009;10 (2): 93-7.
15. Torabinejad M, Hong. CU, Lee SJ, Monsef M, Pitt Ford TR. Investigation of mineral trioxide aggregate for root-end filling in dogs.. *J Endod* 1995;21:603-8.

16. Torabinejad M, Watson. TF, Pitt Ford TR. Sealing Ability of Mineral Trioxide Aggregate a Retrogate Root Filling Material. *J Endod* 1993;19:591-5.
17. Torabinejad M, Pitt Ford TR, Abedi HR, Kariyawasam SP, Tang HM. Tissue reaction to Implanted Root-End Filling Materials in The Tibia and Mandible of Guinea Pigs. *J Endod* 1998;24:468-71.
18. Nathanael S, et al. Comparison of bioactive glass, mineral trioxide aggregate, ferric sulfat, formocresol as pulpotomy agent in rat molar.. Online <http://www.google.com> html (14 Februari 2009).
19. Naik S, Hegde A, Mineral Trioxide Aggregate as a Pulpotomy Agent in Primary Molar: An in Vivo Study. *J Indian Soc Pedo Prev Dent* 2005;13-6.
20. Sonmez D, et. al. A Comparison of Four Pulpotomy Techniques in Primary Molars: a Long-Term Follow-Up. *J Endod* 2008; 34(8):950-55.
21. Mathewson RJ, Primosch R. *Fundamentals of pediatric dentistry*. 3th ed. Chicago, Berlin, London: Quintessence Publishing Co Inc 1995;257-80.
22. Moretti ABS, Sakai VT, Oliveira TM, Fornetti APC, Santos CF, Machado MAAM, Abdo RCC. The effectiveness of mineral trioxide aggregate, calcium hydroxide and formocresol for pulpotoomies in primary teeth. *Int J Endod* 2008; 41:547-55.
23. Sakai VT, Moretti ABS, Oliveira TM, Fornetti APC, Santos CF, Machado MAAM, Abdo RCC, . Summary of: Pulpotomy of human primary molars with MTA and Portland cement: a randomised controlled trial. *British Dent J* 2009; 207:128-30.
24. McDonald RE, Avery DR, Dean JA. Treatment of deep caries, vital pulp exposure and pulpless teeth. In: *Dentistry for the Child and Adolescent*. 8th ed. St. Louis Mo: Mosby Co 2004;389-412.
25. Andersen M, Lund A, Andreasen JO, Andreasen FM. In vitro solubility of human pulp tissue in calcium hydroxide and sodium hypochlorite. *Endod Dent Traumatol* 1992; 8:104-8. .
26. Barnes IE, Kidd EA. Disappearing Dycal. *Br Dent J* 1979;147(5):111.
27. Guideline on pulp therapy for primary and young permanent teeth. *Pediatr Dent* 2008;30(7 Suppl):170-4.
28. Omar AS, El-Meligy, David RA. Comparison of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide as pulpotomy agents in young permanent teeth (apexogenesis). *Pediatr Dent* 2006;28 (5):399-404.
29. Faraco IM Jr, Holland R. Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide cement. *Dent Traumatol* 2001; 17(4):163-6.
30. Tziafas D, Pantelidou O, Alvano, A, Belibasaki, G, Papadimitrio, S. The dentinogenic effect of mineral trioxide aggregate (MTA) in short-term capping experiments. *Int Endod J* 2002;35(3):245-54.

31. Parolia A, Kundabala M, Rao NN, Acharya SR, Agrawal P, Mohan M, Thomas M. A comparative histological analysis of human pulp following direct pulp capping with Propolis, mineral trioxide aggregate and Dycal. *Aust Dent J* 2010;55(1):59-64.
32. Barbos AVH, Sampaio GC, Gomes FA, de Oliveira DP, de Albuquerque DS, Sobral AP. Short-term analysis of human dental pulps after direct capping with portland cement. *Open Dent J* 2009;3:31-5.
33. Sarkar NK, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyeva R, Kawashima I. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2005;31(2):97-100.
34. Mishra VK, Mishra S, Alok JHA, .Application of nanomaterials in mesenchymal stem cell engineering. *Digest J of Nanomater and Biostr* 2008;3(4):203-8.
35. Wilson W, Kannangara K., Smith G, Simmons M, Raguse B, *Nanotechnology. Basic science and emerging technologies.* 2nd ed University of New South Wales Pres Ltd. 2004;26-255.
36. Nanoteknologi Bidang Kedokteran. <http://www.google.com> html (30 Nopember 2010)
37. Smith AJ, Cassidy N, Perry H, Begue-Kirn C, Victor RJ, Lesot H. Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol* 1995;39(1):273-80.
38. Torneck DC, Torabinejad M. Biologi jaringan pulpa gigi dan jaringan periradikuler. Dalam: Walton RE, Torbinejad M (Eds). *Prinsip dan Praktik Ilmu Endodonsia.* 3rd. Terj. Sumawinata N. Jakarta: EGC 2003:4-15. .
39. Trownbridge H, Kim S, Suda H. Structure and functions of the dentin and pulp complex. In: Cohen S, Burn RC (Eds). *Pathway of the pulp.* 8th ed. Missiouri: Mosby 2002:411-18.
40. Simon S, Cooper P, Berdal A, Lumley P, Tomson P, Smith AJ. *Understanding pulp biology for routine clinical Practice.* ENDO(Lond Engl). 2009;3:171-84.
41. Shi S and Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res* 2003;18(4):696-704.
42. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* 2001;189(1):54-63.
43. Goseki M, Oida S, Nifuji A, Sasaki S. Properties of alkaline phosphatase of the human dental pulp. *J Dent Res* 1990; 69(3):909-12.
44. Miao D and Scutt M. Histochemical localization of alkaline phosphatase activity in decalcified bone and cartilage. *J Histochem Cytochem* 2002;50(3); 333-40.
45. Buttler WT. Sealoprotein of Bone and Dentin. *J de Biologie Buccale* 1991; 19:83-9.

46. Hirata M, Yamaza T, Mei YF, Akamine A. Expression of osteocalcin and Jun D in the early period during reactionary dentin formation after tooth preparation in rat molars. *Cell Tissue Res* 2005;319(3):455-65.
47. Papagerakis P, Berdal A, Mesbah M, Peuchmaur M, Malaval L, Nydegger J, Simmer J, Macdougall M. Investigation of osteocalcin, osteonectin, and dentin sialophosphoprotein in developing human teeth. *Bone* 2002;30(2):377-85.
48. Jusuf AA. Sel punca (Stem cell) dan perannya di masa depan. . *Bag. Histologi FKUI* 2009; 1-14.
49. d'Aquino R, De Rosa A, Laino G, Caruso F, Guida L, Rullo R, Checchi, V, Laino L, Tirino V, Papaccio G. Human dental pulp stem cells: from biology to clinical applications. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 2009;312B(5):408-15.
50. Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4(5): 679-728.
51. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(25):13625-30.
52. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(10):5807-12.
53. Nakamura Y, Slaby I, Matsumoto K, Ritchie HH, Lyngstadaas SP. Immunohistochemical characterization of rapid dentin formation induced by enamel matrix derivative. *Calcif Tissue Int* 2004;75(3):243-52.
54. Syafril Y, Endang WB. Prospek pemberian Poly-N-Acetyl glycosaminoglycan (chitosan) dari limbah kulit udang pada osteogenesis stem sel ligamen periodontal (*Unpublished*) 2009.
55. Schulze KJ, O'Brien KO, Germain-Lee EL, Booth SL, Leonard A, Rosenstein BJ. Calcium kinetics are altered in clinically stable girls with cystic fibrosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(7):3385-91.
56. Butler WT. Dentin extracellular matrix and dentinogenesis. *Oper Dent* 1992;Suppl 5:18-23.
57. Camilleri J. The chemical composition of mineral trioxide aggregate. *J Conserv Dent* 2008;11(4):141-3.
58. Camilleri J, Montesin FE, Di Silvio L, Pitt Ford TR. The chemical constitution and biocompatibility of accelerated Portland cement for endodontic use. *Int Endod J* 2005;38(11):834-42.
59. Asgary S, Parirokh M, Eghbal MJ, Brink F. A comparative study of white mineral trioxide aggregate and white Portland cements using X-ray microanalysis. *Aust Endod J* 2004;30(3):89-92.
60. Saidon J, He J, Zhu Q, Safavi K, Spangberg LS. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;95(4):483-9.

61. Camilleri J. Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J* 2007;40(6):462-70.
62. Camilleri J. Characterization of hydration products of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J* 2008;41(5):408-17.
63. Winarno FG, Fenandes IE. *Nanoteknologi bagi industri pangan dan kemasan. 1st ed.* M-BRIO Press 2010:1-19.
64. Wagner V, Dullaart A, Bock AK, Zweck A. The emerging nanomedicine landscape. *Nat Biotechnol* 2006;24(10):1211-7.
65. Minchin R. Nanomedicine: sizing up targets with nanoparticles. *Nat Nanotechnol* 2008;3(1):12-3.
66. Dunia Nano: Sejarah dan definisi (Part 1).<http://www.forumsains.com>. *Indonesian Science Forum* (20 Nopember 2010).
67. Hanantasena B. Nanoteknologi & industri telekomunikasi. <http://www.pati.or.id> (20 Nopember 2010).
68. Alivisatos AP. *Nat. Biotechnol* 2004;22: 47-52.
69. Nanopartikel: Kecil-kecil cabe rawit. <http://www.forumsains.com>. *Indonesian Science Forum* (20 Nopember 2010).
70. Noor Z, Sumitro S, Hidayat M, Rahim AH. Mikrostruktur karakterisitik atom kristal hidroksiapatit pada osteoporosis. 1st ed. *Universitas Brawijaya Press* (UB Press) 2011:63.
71. Hillton S. *Dental Anthropology. 3rd ed.* Press Syndicate of the University of Cambridge 2002.
72. Low I, Duraman N, Fulton J, Tezuka N, Davie, I. A comparative study of the microstructure-property relationship in human adult and baby teeth. *Ceram. Eng.Sci* 2005;26(6):145-52.
73. Scintag. *Basic X-ray diffraction. Buub Road* 1999.
74. Rao MS. Stem sense: a proposal for the classification of stem cells. *Stem Cells Dev* 2004;13(5):452-5.
75. El-Din M, Saber S. Tissue engineering in endodontics. *J Oral Sci* 2009;51(4):495-507.
76. Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy* 2003;5:362-9.
77. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, Liu, H, Gronthos S, Wang CY, Wang S, Shi, S. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLos One* 2006; 1 e79.
78. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004;364:149-55.

79. Torneck DC, Torabinejad M. Biologi jaringan pulpa gigi dan jaringan periradikuler. Dalam: Walton RE, Torbinejad M (Eds). *Prinsip dan Praktik Ilmu Endodonsia*. 3rd.Terj. Sumawinata N. Jakarta:EGC 2008:12-38.
80. Goldberg M, Smith AJ. Cells and Extracellular Matrices of Dentin and Pulp: A Biological Basis for Repair and Tissue Engineering. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15:13-27.
81. Jo YY, Lee HJ, Kook SY, Choung HW, Park JY, Chung JH, Choung YH, Kim ES, Yang HC, Choung PH. Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Eng* 2007;13(4):767-73.
82. d'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, Pirozzi G, De Ros, A, Papaccio G. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death Differ* 2007;14(6):1162-71.
83. Laino G, Graziano A, d'Aquino R, Pirozzi G, Lanza V, Valiante S, De Rosa A, Nar F, Vivarelli E, Papaccio G. An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering. *J Cell Physiol* 2006;206(3):693-701.
84. Sloan A, Waddington R. Dental pulp stem cells: what, where. how ? *Int J of Paed Dent* 2009;19:61-70.
85. Kitagawa M, Ueda H, Iizuka S, Sakamoto K, Oka H, Kudo Y, Ogawa I, Miyauchi M, Tahara H, Takata T. Immortalization and characterization of human dental pulp cells with odontoblastic differentiation. *Arch Oral Biol* 2007;52(8): 727-31.
86. Wang HG, Xiao MZ, Zhao SL, Hao JJ, Zhang M. Immortalized human odontoblast-like cell line expressed dentin extracellular matrix in vitro. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2005;23(6):518-21.
87. Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, Robey PG, Shi S. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res* 2003;82(12):976-81.
88. Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res* 2005;8(3):191-9.
89. Shi S, Robey PG, Gronthos S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone* 2001;9(6):532-9.
90. Abe S, Yamaguchi S, Watanabe A, Hamada K, Amagasa T. Hard tissue regeneration capacity of apical pulp derived cells (APDCs) from human tooth with immature apex. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;371(1):90-3.
91. Laino G, Carinci F, Graziano A, d'Aquino R, Lanza V, De Rosa A, Gombos F, Caruso F, Guida L, Rullo R, Menditti D, Papaccio G. In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp. *J Craniofac Surg* 2006;17(3):511-5.

92. Laino G, d'Aquino R, Graziano A. Dental pulp stem cells can be detected in aged humans: an useful source for living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res* 2005;20:1394-1402.
93. Papaccio G, Laino G. First International Meeting on "Stem Cell Applications in the Craniofacial Region. *J Cell Physiol* 2006;208(3):473-5.
94. Suchanek J, Soukup T, Ivancakova R, Karbanova J, Hubkova V, Pytlik R, Kucerova L. Human dental pulp stem cells--isolation and long term cultivation. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2007;50(3):195-201.
95. Nakashima M, Iohara K, Ishikawa M, Ito M, Tomokiyo A, Tanak T, Akamine A. Stimulation of reparative dentin formation by ex vivo gene therapy using dental pulp stem cells electrotransfected with growth/differentiation factor 11 (Gdf11). *Hum Gene Ther* 2004;15(11):1045-53.
96. Nakanishi T. et al. Bacterial Irritation and Pulpa Response in Pulpitis. ;. *Shikoku Dent Research* 2002;14(2):255-63.
97. Grossman LI, Oliet S, Del Rio CE. *Ilmu endodontik dalam praktek*. 11th. Sutatmi S (Ed). Alih bahasa: Rafiah Abyono. Jakarta: EGC 1995:40-8
98. Ye L, MacDougall M, Zhang S, Xie Y, Zhang J, Li Z, Lu Y, Mishina Y, Feng JQ. Deletion of dentin matrix protein-1 leads to a partial failure of maturation of predentin into dentin, hypomineralization, and expanded cavities of pulp and root canal during postnatal tooth development. *J Biol Chem* 2004;279(18):19141-8.
99. Camilleri J. A review of the methods used to study biocompatibility of Portland cement derived material use in dentistry. *Malta Med J* 2006;18:9-14.
100. Freshney RI. *Culture of animal. A manual of basic technique*. 4th ed. New York Willey-Liss 2000.
101. MTT cell proliferation assay.
www.protocol-online.org/prot/Cell_Biology/Cell_Growth_Cytotoxicity/MTT_Cell_Proliferation_Assay (20 Nopember 2010).
102. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity aassays. *J of Immunological Methods* 1983;65(1-2):55-63.
103. Cryopreserved human hepatocyte high-throughput screening protocol: 96 well MTT Cytoyoxicity aasay. <http://www.invitrotech.com> (20 Nopember 2010).
104. Iohara K, Nakashima M, Ito M, Ishikawa M, Nakasima A, Akamine A. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J Dent Res* 2004;83(8):590-5.
105. Linde A, Magnusson BC. Inhibition studies of alkaline phosphatase in hard tissue-forming cells. *J Histochem Cytochem* 1975;23(5):342-7.

106. Rabie AM, Veis A. An immunocytochemical study of the routes of secretion of collagen and phosphoporyn from odontoblasts into dentin. *Connect Tissue Res* 1995;31(3):197-209.
107. Koh ET, MacDonald F, Pitt Ford TR, Torabinejad M. Cellular Response to Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod* 1998;23:543-7.
108. Toyosawa S, O'HUigin C, Klein J. The dentin matrix protein 1 gene of prototherian and metatherian mammals. *J Mol Evol* 1999;48(2):160-7.
109. Massa LF, Ramachandran A, George A, Arana-Chavez VE. Developmental appearance of dentin matrix protein 1 during the early dentinogenesis in rat molars as identified by high-resolution immunocytochemistry. *Histochem Cell Biol* 2005;124(3-4):197-205.
110. Kikuchi H, Suzuki K, Sakai N, Yamada S. Odontoblasts induced from mesenchymal cells of murine dental papillae in three-dimensional cell culture. *Cell Tissue Res* 2004;317(2):173-85.
111. Mundlos S, Schwahn B, Reichert T, Zabel B. Distribution of osteonectin mRNA and protein during human embryonic and fetal development. *J Histochem Cytochem* 1992;40(2):283-91.
112. Tung PS, Domenicucci C, Wasi S, Sodek J. Specific immunohistochemical localization of osteonectin and collagen types I and III in fetal and adult porcine dental tissues. *J Histochem Cytochem* 1985;33(6):531-40.
113. Kossa V. Ueber die im organismus kunsrlich erzeugbaren Verkalkungen. *Beit Path Anat* 1901:163.
114. Oliveira JM, Sousa RA, Kotobuki N, Tadokoro M, Hirose M, Mano JF, Reis RL, Ohgushi H. The osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells cultured with dexamethasone-loaded carboxymethylchitosan/poly(amidoamine) dendrimer nanoparticles. *Biomaterials* 2009;30(5):804-13.
115. Feng JQ, Huang H, Lu Y, Ye L, Xie Y, Tsutsui TW, Kunieda T, Castranio T, Scott G, Bonewald LB, Mishina Y. The Dentin matrix protein 1 (Dmp1) is specifically expressed in mineralized, but not soft, tissues during development. *J Dent Res* 2003;82(10):776-80.
116. Butler WT, Ritchie H. The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. *Int J Dev Biol* 1995;39(1):169-79.
117. Ritchie HH, Pinero GJ, Hou H, Butler WT. Molecular analysis of rat dentin sialoprotein. *Connect Tissue Res* 1995;33(1-3):73-9.
118. MacDougall M, Simmons D, Luan X, Nydegger J, Feng J, Gu TT. Dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleavage products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4. Dentin phosphoprotein DNA sequence determination. *J Biol Chem* 1997;272(2):835-42.
119. Begue-Kirn C, Krebsbach PH, Bartlett JD, Butler WT. Dentin sialoprotein, dentin phosphoprotein, enamelysin and ameloblastin: tooth-specific

- molecules that are distinctively expressed during murine dental differentiation. *Eur J Oral Sci* 1998;106(5):963-70.
120. Qin C, Brunn JC, Cadena E, Ridall A, Tsujigiwa H, Nagatsuka H, Nagai N, Butler WT. The expression of dentin sialophosphoprotein gene in bone. *J Dent Res* 2002;81(6):392-4.
 121. Witherspoon DE, Small JC, Harris GZ. Mineral trioxide aggregate pulpotomies: a case series outcomes assessment. *J Am Dent Assoc* 2006;137(5): 610-8.
 122. Camilleri J, Montesin FE, Papaioannou S, McDonald F, Pitt Ford TR. Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J* 2004;37(10):699-704.
 123. Bigi A, Bracci B, Cuisinier F, Elkaim R, Fini M, Mayer I, Mihailescu IN, Socol G, Sturba L, Torricelli P. Human osteoblast response to pulsed laser deposited calcium phosphate coatings. *Biomaterials* 2005;26(15):2381-9.
 124. Olivera M, Torres CP, Gomes-Silva J, Chinelatti MA, De Menezes FC, Palma-Dibb RG, Borsatto MC. Microstructure and mineral composition of dental enamel of permanent and deciduous teeth. *Microsc Res Tech* 2010;73(5):572-7.
 125. Eslaminejad, BMR, Vahabi S, Shariati M, Nazarian H. In vitro Growth and Characterization of Stem Cells from Human Dental Pulp of Deciduous Versus Permanent Teeth. *J Dent (Tehran)* 2010;7(4):185-95.
 126. Waddington RJ, Hall RC, Embery G, Lloyd DM. Changing profiles of proteoglycans in the transition of predentine to dentine. *Matrix Biol* 2003;22(2):153-61.
 127. Carnes DL Jr, De La Fontaine J, Cochran DL, Mellonig JT, Keogh B, Harris SE, Ghosh-Choudhury N, Dean DD, Boyan BD, Schwartz Z. Evaluation of 2 novel approaches for assessing the ability of demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation. *J Periodontol* 1999;70(4):353-63.

X'Pert HighScore	X'Pert HighScore Report	date: 07/05/12
PANalytical		for internal use only

Fantastic report on MTA



Distribution:

Name	Function	0.1	0.5	1.0
N.N.-999	Masterking Group Manager (MGM)	✓		
N.N.-998	Product Ontwikkelt Manager (POM)	✓		
N.N.-1	(AS)			✓
N.N.-2	(DS)			✓
N.N.-3	(BS)			✓
T.P.	Supervisor All Coding			✓

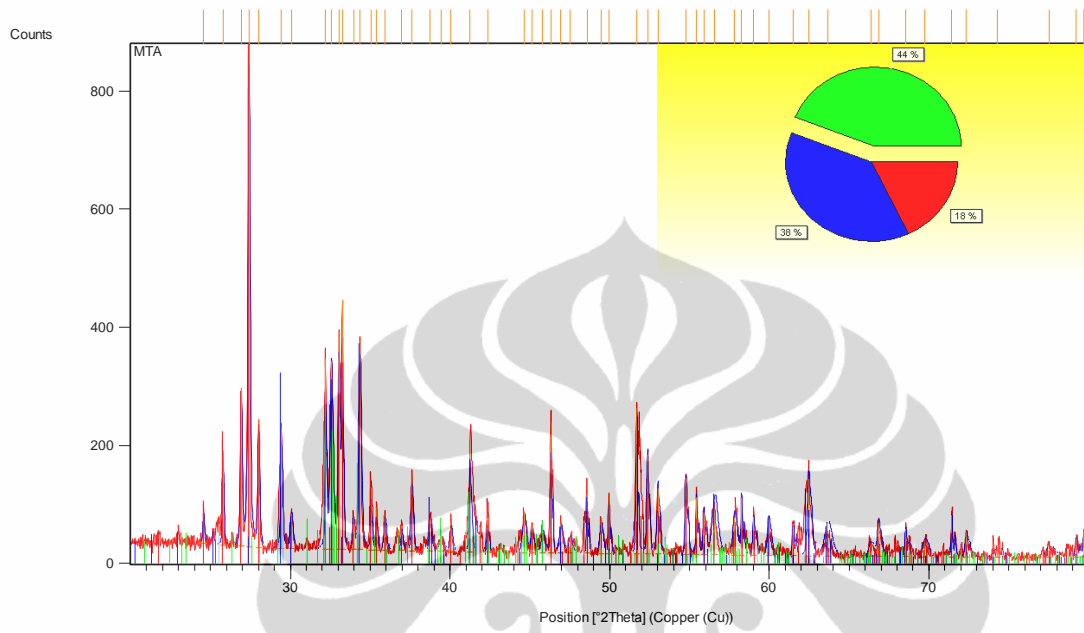
Table of Contents:

TABLE OF CONTENTS:	136
ANCHOR SCAN PARAMETERS: (BOOKMARK1)	137
GRAPHICS: (BOOKMARK2)	138
PEAK LIST: (BOOKMARK 3)	139
IDENTIFIED PATTERNS LIST: (BOOKMARK4)	143
PLOT OF IDENTIFIED PHASES: (BOOKMARK 5)	143
DOCUMENT HISTORY: (BOOKMARK 6)	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

Anchor Scan Parameters: (Bookmark1)

Dataset Name	MTA
File name	C:\Documents and Settings\A Taufiq\Desktop\9 de xrd data\Data November 2010\MTA\MTA.rd
Sample Identification	3
Comment	untuk mineral
Measurement Date / Time	09/12/2010 13:56:00
Raw Data Origin	PHILIPS-binary (scan) (.RD)
Scan Axis	Gonio
Start Position [°2Th.]	20,0100
End Position [°2Th.]	79,9900
Step Size [°2Th.]	0,0200
Scan Step Time [s]	0,5000
Scan Type	Continuous
Offset [°2Th.]	0,0000
Divergence Slit Type	Fixed
Divergence Slit Size [°]	1,0000
Specimen Length [mm]	10,00
Receiving Slit Size [mm]	0,1000
Measurement Temperature [°C]	-273,15
Anode Material	Cu
K-Alpha1 [Å]	1,54060
K-Alpha2 [Å]	1,54443
K-Beta [Å]	1,39225
K-A2 / K-A1 Ratio	0,50000
Generator Settings	30 mA, 40 kV
Diffractometer Type	XPert MPD
Diffractometer Number	1
Goniometer Radius [mm]	200,00
Dist. Focus-Diverg. Slit [mm]	91,00
Incident Beam Monochromator	No
Spinning	No

Graphics: (Bookmark2)



Peak List: (Bookmark 3)

Pos. [°2Th.]	Height [cts]	FWHM [°2Th.]	d-spacing [Å]	Rel. Int. [%]	Tip width [°2Th.]	Matched by
24,5592	54,42	0,1181	3,62482	6,40	0,1417	01-071-2274
25,7808	160,70	0,0984	3,45577	18,90	0,1181	01-071-2274
26,9217	266,47	0,1181	3,31186	31,34	0,1417	01-071-2274
27,3973	850,34	0,1378	3,25544	100,00	0,1653	01-071-2274; 01-073-0599
28,0121	215,59	0,1181	3,18537	25,35	0,1417	01-071-2274; 01-083-0461
29,4308	204,84	0,1181	3,03497	24,09	0,1417	01-073-0599
30,0631	60,11	0,1968	2,97256	7,07	0,2362	01-073-0599
32,2053	322,39	0,0787	2,77956	37,91	0,0945	01-073-0599; 01-083-0461
32,5649	318,62	0,1968	2,74969	37,47	0,2362	01-071-2274; 01-073-0599; 01-083-0461
33,0476	370,27	0,1181	2,71062	43,54	0,1417	01-071-2274; 01-073-0599; 01-083-0461
33,2552	422,34	0,0787	2,69417	49,67	0,0945	01-071-2274; 01-073-0599
33,9558	56,03	0,1181	2,64017	6,59	0,1417	01-071-2274
34,3560	355,67	0,1574	2,61033	41,83	0,1889	01-073-0599; 01-083-0461
35,0475	105,91	0,0787	2,56040	12,46	0,0945	01-071-2274
35,3998	73,22	0,0787	2,53572	8,61	0,0945	01-071-2274; 01-083-0461
35,9165	60,81	0,1574	2,50041	7,15	0,1889	01-071-2274; 01-083-0461

Report		X'Pert HighScore				
36,9661	43,66	0,1181	2,43180	5,13	0,1417	01-071-2274
37,6240	136,38	0,1181	2,39077	16,04	0,1417	01-071-2274
38,7409	52,78	0,1574	2,32438	6,21	0,1889	01-073-0599; 01-083-0461
39,4650	22,12	0,3149	2,28339	2,60	0,3779	01-073-0599; 01-083-0461
40,0556	49,89	0,1574	2,25107	5,87	0,1889	01-071-2274
41,2551	189,76	0,1181	2,18835	22,32	0,1417	01-073-0599; 01-083-0461
42,3557	59,34	0,0984	2,13400	6,98	0,1181	01-071-2274; 01-073-0599; 01-083-0461
44,6295	68,74	0,2362	2,03041	8,08	0,2834	01-083-0461
45,1320	46,82	0,1574	2,00897	5,51	0,1889	01-071-2274
45,7970	38,51	0,2362	1,98133	4,53	0,2834	01-073-0599; 01-083-0461
46,3235	221,84	0,0787	1,96004	26,09	0,0945	01-071-2274
46,9388	50,55	0,2362	1,93577	5,94	0,2834	01-071-2274; 01-073-0599
47,5192	28,19	0,2362	1,91347	3,32	0,2834	01-071-2274; 01-083-0461
48,5782	127,58	0,0787	1,87420	15,00	0,0945	01-071-2274
49,4487	58,88	0,1968	1,84323	6,92	0,2362	01-071-2274; 01-083-0461
49,9531	102,95	0,0787	1,82579	12,11	0,0945	01-071-2274; 01-073-0599; 01-083-0461
51,6795	247,42	0,0984	1,76879	29,10	0,1181	01-071-2274; 01-073-0599; 01-083-0461
52,3724	168,18	0,1200	1,74556	19,78	0,1440	01-071-

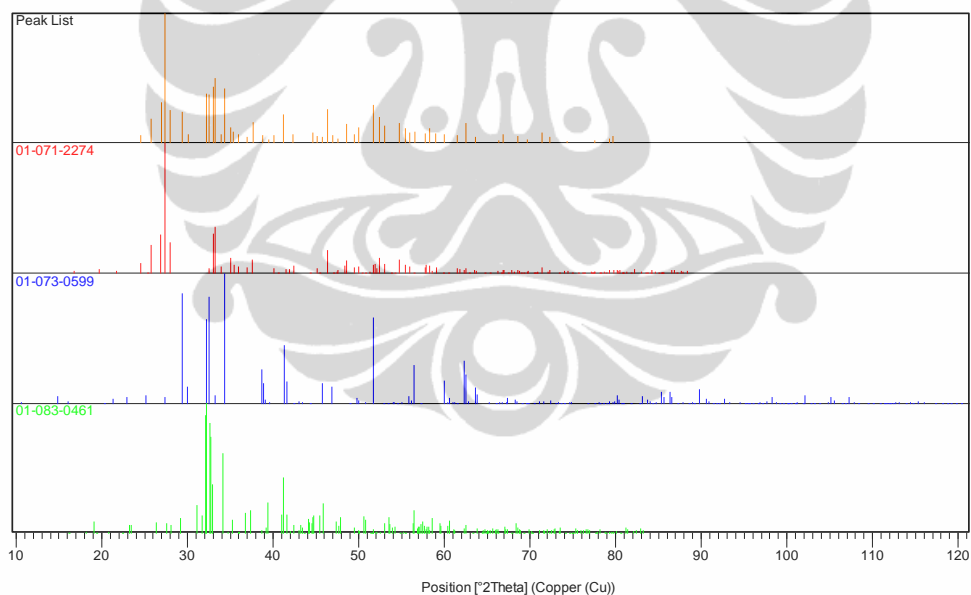
Report						X'Pert HighScore
53,0278	112,20	0,1440	1,72552	13,19	0,1728	2274; 01-083-0461 01-071-2274; 01-073-0599; 01-083-0461
54,7741	129,38	0,1200	1,67457	15,21	0,1440	01-071-2274; 01-083-0461
55,4353	98,20	0,0960	1,65615	11,55	0,1152	01-071-2274; 01-083-0461
55,9082	71,23	0,1200	1,64326	8,38	0,1440	01-071-2274; 01-073-0599
56,5633	74,61	0,3840	1,62577	8,77	0,4608	01-071-2274; 01-073-0599; 01-083-0461
57,8165	63,12	0,2400	1,59347	7,42	0,2880	01-071-2274; 01-083-0461
58,2732	98,22	0,0960	1,58207	11,55	0,1152	01-071-2274; 01-083-0461
59,0192	65,13	0,1440	1,56384	7,66	0,1728	01-071-2274
59,9645	60,82	0,1920	1,54142	7,15	0,2304	01-071-2274; 01-073-0599
61,5050	54,25	0,1200	1,50646	6,38	0,1440	01-071-2274; 01-073-0599
62,4802	130,83	0,1920	1,48527	15,39	0,2304	01-071-2274; 01-073-0599; 01-083-0461
63,6469	43,74	0,4800	1,46083	5,14	0,5760	01-071-2274; 01-073-0599
66,3481	21,24	0,2880	1,40775	2,50	0,3456	01-071-2274; 01-073-0599; 01-083-0461
66,8437	57,56	0,1920	1,39851	6,77	0,2304	01-071-2274; 01-073-0599
68,5533	48,12	0,1440	1,36774	5,66	0,1728	01-071-

Report						X'Pert HighScore
						2274; 01-073-0599; 01-083-0461
69,7218	24,17	0,3840	1,34765	2,84	0,4608	01-071-2274; 01-073-0599; 01-083-0461
71,4372	70,79	0,0960	1,31945	8,32	0,1152	01-071-2274; 01-073-0599; 01-083-0461
72,3534	41,75	0,1920	1,30498	4,91	0,2304	01-071-2274; 01-073-0599; 01-083-0461
74,2859	13,36	0,5760	1,27574	1,57	0,6912	01-071-2274; 01-083-0461
77,5488	15,96	0,5760	1,23001	1,88	0,6912	01-071-2274; 01-073-0599; 01-083-0461
79,2341	32,27	0,1440	1,20802	3,79	0,1728	01-071-2274; 01-073-0599; 01-083-0461
79,7239	45,66	0,1440	1,20183	5,37	0,1728	01-071-2274; 01-073-0599; 01-083-0461

Identified Patterns List: (Bookmark4)

Visible	Ref. Code	Score	Compound Name	Displacement [°2Th.]	Scale Factor	Chemical Formula
*	01-071-2274	73	á-Bi ₂ O ₃	-0,008	1,022	Bi ₂ O ₃
*	01-073-0599	51	tricalcium silicate oxide	-0,052	0,397	Ca ₃ (Si O ₄) O
*	01-083-0461	23	dicalcium silicate	0,021	0,273	Ca ₂ (Si O ₄)

Plot of Identified Phases: (Bookmark 5)



X'Pert HighScore	X'Pert HighScore Report	date: 07/05/12
PANalytical		for internal use only

Fantastic report on NMT



Distribution:

Name	Function	0.1	0.5	1.0
N.N.-999	Masterking Group Manager (MGM)	✓		
N.N.-998	Product Ontwikkelt Manager (POM)	✓		
N.N.-1	(AS)			✓
N.N.-2	(DS)			✓
N.N.-3	(BS)			✓
T.P.	Supervisor All Coding			✓

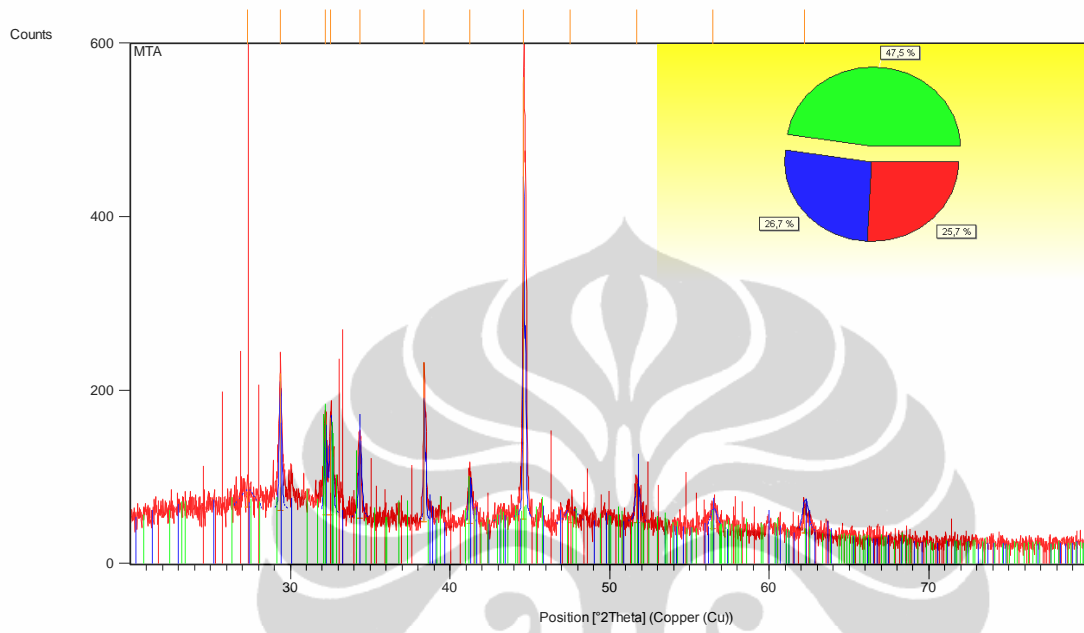
Table of Contents:

TABLE OF CONTENTS:	144
ANCHOR SCAN PARAMETERS: (BOOKMARK1)	145
GRAPHICS: (BOOKMARK2)	146
PEAK LIST: (BOOKMARK 3)	147
IDENTIFIED PATTERNS LIST: (BOOKMARK4)	149
PLOT OF IDENTIFIED PHASES: (BOOKMARK 5)	149
DOCUMENT HISTORY: (BOOKMARK 6)	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

Anchor Scan Parameters: (Bookmark1)

Dataset Name	NMT
File name	C:\Documents and Settings\A Taufiq\Desktop\choir
FKUB\MTA.rd	
Comment	untuk mineral
Measurement Date / Time	Configuration=Stage Flat Samples, Owner= 14/01/2011 12:56:00
Raw Data Origin	PHILIPS-binary (scan) (.RD)
Scan Axis	Gonio
Start Position [°2Th.]	20,0100
End Position [°2Th.]	79,9900
Step Size [°2Th.]	0,0200
Scan Step Time [s]	0,5000
Scan Type	Continuous
Offset [°2Th.]	0,0000
Divergence Slit Type	Fixed
Divergence Slit Size [°]	1,0000
Specimen Length [mm]	10,00
Receiving Slit Size [mm]	0,1000
Measurement Temperature [°C]	-273,15
Anode Material	Cu
K-Alpha1 [Å]	1,54060
K-Alpha2 [Å]	1,54443
K-Beta [Å]	1,39225
K-A2 / K-A1 Ratio	0,50000
Generator Settings	30 mA, 40 kV
Diffractometer Type	XPert MPD
Diffractometer Number	1
Goniometer Radius [mm]	200,00
Dist. Focus-Diverg. Slit [mm]	91,00
Incident Beam Monochromator	No
Spinning	No

Graphics: (Bookmark2)



Peak List: (Bookmark 3)

Pos. [°2Th.]	Height [cts]	FWHM [°2Th.]	d-spacing [Å]	Rel. Int. [%]	Tip width [°2Th.]	Matched by
27,3009	18,17	0,9446	3,26671	3,57	1,1336	01-071-2274; 01-073-0599; 01-083-0461
29,3600	157,48	0,1378	3,04213	30,92	0,1653	01-073-0599; 01-083-0461
32,1933	104,36	0,1574	2,78057	20,49	0,1889	01-071-2274; 01-073-0599; 01-083-0461
32,5364	113,08	0,1968	2,75203	22,20	0,2362	01-071-2274; 01-073-0599; 01-083-0461
34,3524	90,80	0,1968	2,61059	17,83	0,2362	01-073-0599; 01-083-0461
38,3913	183,43	0,0787	2,34474	36,02	0,0945	01-083-0461
41,2357	56,07	0,1968	2,18933	11,01	0,2362	01-071-2274; 01-073-0599; 01-083-0461
44,6135	509,32	0,0984	2,03110	100,00	0,1181	01-071-2274; 01-073-0599; 01-083-0461
47,5166	16,56	0,7872	1,91357	3,25	0,9446	01-071-2274; 01-083-0461
51,7164	45,45	0,3149	1,76761	8,92	0,3779	01-071-2274; 01-073-0599; 01-083-0461
56,4705	22,36	0,4723	1,62957	4,39	0,5668	01-071-2274; 01-073-0599; 01-083-0461

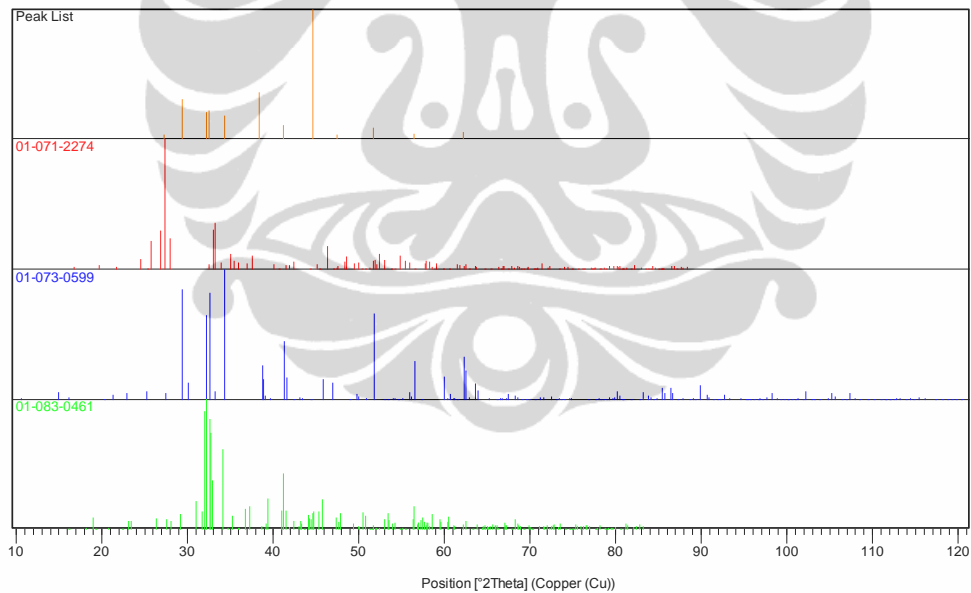
Report						X'Pert HighScore	
62,2158	28,89	0,3840	1,49094	5,67	0,4608	0461	01-071-2274; 01-073-0599; 01-083-0461



Identified Patterns List: (Bookmark4)

Visible	Ref. Code	Score	Compound Name	Displacement [°2Th.]	Scale Factor	Chemical Formula
*	01-071-2274	0	á-Bi ₂ O ₃	0,000	2,121	Bi ₂ O ₃
*	01-073-0599	42	tricalcium silicate oxide	0,000	0,199	Ca ₃ (Si O ₄) O
*	01-083-0461	17	dicalcium silicate	0,000	0,214	Ca ₂ (Si O ₄)

Plot of Identified Phases: (Bookmark 5)



Lampiran 3: Gambar Gigi yang Diisolasi Sel Pulpanya



Gigi Molar 3 Permanen Rahang Atas



Gigi Premolar 1 Permanen Rahang Atas



Gigi Insisif 1 Disidui Rahang Atas



Gigi Kaninus Disidui Rahang Atas



Gigi Insisif 1 Disidui Rahang Bawah