

**PROPOSAL**  
**PENELITIAN UNGGULAN FAKULTAS (PUF)**

**Pengembangan *Alstonia scholaris* sebagai Mediator Potensial Regenerasi Sel Pulpa Gigi**

**TIM PENELITI**

Dr. drg. Muhammad Ihsan Rizal, M.Kes.	(0326078203)
drg. Ferry Sandra, Ph.D., M.IPM, PBO.	(0311037302)
Fatwanissa Ariestha Putri	040002000134

Ketua
Anggota
Anggota



**MAGISTER ILMU KEDOKTERAN GIGI**  
**Fakultas Kedokteran Gigi**  
**UNIVERSITAS TRISAKTI**  
**2023/2024**



# UNIVERSITAS TRISAKTI

## LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT

Jl. Kyai Tapa No. 1 Grogol, Jakarta Barat 11440, Indonesia

Telp. 021-5663232 (hunting), ext. 8141, 8161, Fax. 021-5684021

<http://lppm.trisakti.ac.id/>

[lppm@trisakti.ac.id](mailto:lppm@trisakti.ac.id)

### LEMBAR PENGESAHAN USULAN PROGRAM PENELITIAN TAHUN AKADEMIK 2023/2024 0681/PUF/FKG/2023-2024

1. **Judul Penelitian** : Pengembangan Alstonia scholaris sebagai Mediator Potensial Regenerasi Sel Pulpa Gigi
2. **Skema Penelitian** : Penelitian Unggulan Fakultas (PUF)
3. **Ketua Tim Pengusul**
  - a. Nama : Dr. drg. Muhammad Ihsan Rizal, M.Kes.
  - b. NIDN : 0326078203
  - c. Jabatan/Golongan : Asisten Ahli/III-B
  - d. Program Studi : MAGISTER ILMU KEDOKTERAN GIGI
  - e. Perguruan Tinggi : Universitas Trisakti
  - f. Bidang Keahlian : Biokimia dan Biologi Molekuler  
Jl. Duta Indah II no. 17, RT 001 RW 014, Kelurahan. Pondok Pinang, Kecamatan. Kebayoran Lama, Kota Jakarta Selatan, Propinsi DKI Jakarta, Indonesia.  
+628558006161  
[ihsan.rizal@trisakti.ac.id](mailto:ihsan.rizal@trisakti.ac.id)
  - g. Alamat Kantor/Telp/Fak/surel
4. **Anggota Tim Pengusul**
  - a. Jumlah anggota : Dosen 1 orang
  - b. Nama Anggota 1/bidang keahlian : drg. Ferry Sandra, Ph.D., M.IPM, PBO./biomedical science, cancer biology, stem cell, signal transduction, molecular biology
  - c. Jumlah mahasiswa yang terlibat : 1 orang
  - d. Jumlah alumni yang terlibat : 0 orang
  - e. Jumlah laboran/admin : 0 orang
5. **Waktu Penelitian**
  - Bulan/Tahun Mulai : Juli 2023
  - Bulan/Tahun Selesai : Mei 2024
6. **Luaran yang dihasilkan**
  - Publikasi di Jurnal
  - Hak Kekayaan Intelektual
7. **Biaya Total** : Rp0,-  
(0)

Ketua Program Studi



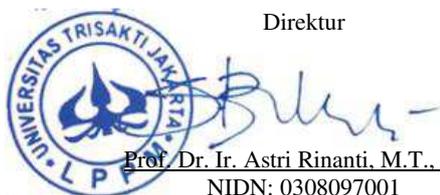
Dr. drg. Muhammad Ihsan Rizal, M.Kes.  
NIDN: 0326078203

Jakarta,  
Ketua Tim Pengusul



Dr. drg. Muhammad Ihsan Rizal, M.Kes.  
NIDN: 0326078203

Direktur



Prof. Dr. Ir. Astri Rinanti, M.T., IPM  
NIDN: 0308097001

Dekan



drg. Wiwiek Poedjiastoeti, M.Kes., Sp.B.M., Ph.D.  
NIDN: 0306056502

## IDENTITAS PENELITIAN

Skema Penelitian	: Penelitian Unggulan Fakultas (PUF)
Judul Penelitian	: Pengembangan <i>Alstonia scholaris</i> sebagai Mediator Potensial Regenerasi Sel Pulpa Gigi
Fokus Penelitian	: Green Healthy Life
Rumpun Penelitian	: Precision Medicine
Mata Kuliah yang terkait	: Biokimia
Topik Pengabdian kepada Masyarakat yang terkait	: Pelatihan Pemeliharaan Kesehatan Gigi dan Mulut dalam Mencegah Kepikunan pada Komunitas Pra-Lansia

### Tim Peneliti

Peneliti	NIK/ NIM	Posisi	Status	Program Studi	Fakultas
Dr. drg. Muhammad Ihsan Rizal, M.Kes.	2975	Ketua	Dosen Trisakti	MAGISTE R ILMU KEDOKT ERAN GIGI	FKG
drg. Ferry Sandra, Ph.D., M.IPM, PBO.	3027	Anggota	Dosen Trisakti	MAGISTE R ILMU KEDOKT ERAN GIGI	FKG
Fatwanissa Ariestha Putri	04000200 0134	Anggota	Mahasiswa Trisakti	PENDIDI KAN DOKTER GIGI	FKG

Lokasi dan atau Tempat Penelitian	:
Masa Penelitian	
Mulai	: Juli 2023
Berakhir	: Mei 2024
Dana diusulkan	: Rp0,-
Sumber Pendanaan	: 5.2.03.08.01
Target Kesiapterapan Teknologi	: TKT 2
Produk Inovasi	:
Luaran	: Publikasi di Jurnal Hak Kekayaan Intelektual

## DAFTAR ISI

Halaman Judul .....	i
Halaman Pengesahan .....	ii
Identitas Dan Uraian Umum .....	iii
DAFTAR ISI.....	1
RINGKASAN PROPOSAL.....	2
BAB 1. PENDAHULUAN.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....	5
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN .....	16
BAB 4. JADWAL PENELITIAN.....	23
BAB 5. RENCANA ANGGARAN BIAYA (RAB).....	24
DAFTAR PUSTAKA .....	25
LAMPIRAN 1. ROAD MAP PENELITIAN .....	27
LAMPIRAN 2. SURAT KESEDIAAN BERKOMITMEN .....	28

## RINGKASAN PROPOSAL

*Alstonia scholaris* merupakan bahan alam yang sering digunakan untuk pengobatan karena memiliki efek anti-inflamasi, analgesik, antibakteri, antikanker, dan antifungal. Apabila dikaitkan dengan bidang kedokteran gigi, tanaman ini memiliki potensi efek anti nyeri pula Kerusakan lapisan dentin yang dalam menyebabkan peradangan pulpa gigi Pulpa gigi adalah jaringan vital yang terlindung di dalam dentin gigi berisi saraf, pembuluh darah, jaringan ikat, dan berbagai macam sel. Apabila karies telah mencapai pulpa, dapat menyebabkan rasa nyeri dan penderitaan yang luar biasa bagi pasien hingga mengganggu aktivitas sehari-hari. Paparan molekul pensinyalan bahan tertentu terhadap pulpa gigi sangat penting untuk mengendalikan penentuan nasib sel, proliferasi, dan diferensiasi dalam produksi dentin reparatif. Migrasi sel pulpa secara *in vitro* merupakan kemampuan sel pulpa gigi untuk bergerak dari satu lokasi ke lokasi lain dalam lingkungan seluler buatan di laboratorium pada fase proliferasi. Penggunaan bahan alam *Alstonia scholaris* diharapkan dapat menjadi bahan alternatif dalam meregenerasi kompleks dentin pulpa dan memulihkan fungsi gigi selain sel punca, *scaffold*, dan *growth factor*. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh ekstrak daun *Alstonia scholaris* terhadap viabilitas dan kecepatan migrasi sel pulpa secara *in vitro*. Manfaat penelitian ini adalah dapat menjadi landasan teori yang dibutuhkan mengenai alternatif biomaterial *Alstonia scholaris* yang dapat menginduksi regenerasi sel pulpa. Penelitian ini merupakan perlakuan di laboratorium dengan metode uji MTT dan uji *migrasi Transwell* untuk mengetahui proliferasi sel pulpa terhadap *Alstonia scholaris*. Eksperimen dilakukan pada bahan biologik tersimpan sel pulpa gigi manusia yang *unlinked* diperoleh dari gigi molar ketiga impaksi parsial yang diekstraksi. Pulpa dibiakkan dan dipindahkan, kemudian dilihat proliferasinya setelah diberi perlakuan ekstrak *A. scholaris* dengan konsentrasi 10, 50, 200, dan 1000 µg/mL dan dibaca nilai absorbansinya sehingga dapat dikonversikan menjadi jumlah sel yang hidup, Migrasi hDPC (*human dental pulp cells*) dievaluasi menggunakan uji *Transwell*. Penelitian tanaman obat *Alstonia scholaris* ini berkaitan dengan end point road map penelitian peneliti, yaitu: *precision medicine*, serta obat suplemen dan produk biologi. Hal tersebut berhubungan dengan road map penelitian fakultas bidang unggulan *Green Healthy Life*. Luaran yang direncanakan adalah hak kekayaan intelektual dan publikasi di jurnal internasional bereputasi.

Kata Kunci :

*Alstonia scolaris*; sel pulpa; proliferasi; regenerasi

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

*Alstonia scholaris* dapat disebut juga dengan *blackboard tree*, *devil tree*, dan *milkwood pine*.<sup>1</sup> Tumbuhan ini memiliki berbagai efek berupa anti-inflamasi, analgesik, antibakteri, antikanker, antifungal, serta mempercepat penyembuhan luka.<sup>2</sup> Apabila dikaitkan dengan bidang kedokteran gigi, tanaman ini memiliki potensi efek anti nyeri pula. Gigi yang mengalami karies menimbulkan rasa tidak nyaman karena adanya sensasi nyeri oleh infeksi bakteri yang mencederai pulpa. Kerusakan lapisan dentin yang dalam menyebabkan peradangan pulpa gigi (pulpitis).<sup>3</sup>

Pulpa gigi adalah jaringan vital yang terlindung di dalam dentin gigi berisi saraf, pembuluh darah, jaringan ikat, dan berbagai macam sel. Apabila karies telah mencapai pulpa, dapat menyebabkan rasa nyeri dan penderitaan yang luar biasa bagi pasien hingga mengganggu aktivitas sehari-hari.<sup>4</sup> Penatalaksanaan pada kasus pulpitis umumnya diberikan bahan *pulp capping* bertujuan pembentukan dentin reparatif dan mencegah terjadinya inflamasi pulpa lebih lanjut. Sinyal molekul yang terdapat pada bahan tersebut harus memiliki pengaruh yang kuat terhadap kualitas dentin reparatif. Saat ini material bahan tersebut dianggap masih memiliki jangka waktu proteksi yang pendek.<sup>5,6</sup>

Sel pulpa gigi dapat berkembang menjadi sel seperti odontoblas dan menghasilkan produksi dentin reparatif sebagai respons terhadap cedera dentin. Kemampuan ini menunjukkan bahwa jaringan pulpa mengandung progenitor odontogenik atau sel induk yang mampu berdiferensiasi menjadi berbagai sel seperti odontoblas, osteoblas, dan adiposit.<sup>7,8</sup> Oleh karena itu, paparan molekul pensinyalan bahan tertentu terhadap pulpa gigi sangat penting untuk mengendalikan penentuan nasib sel, proliferasi, dan diferensiasi dalam produksi dentin reparatif.

Penggunaan sel punca, *scaffold*, dan *growth factor* dapat meregenerasi kompleks dentin pulpa dan memulihkan fungsi gigi dalam proses regenerasi gigi. Tahap awal regenerasi dimulai dengan adhesi, proliferasi, migrasi, dan diferensiasi sel punca mesenkimal menjadi sel odontoblas dan fibroblas, serta ekspresi *growth factor* yang terjadi di daerah yang mengalami kerusakan dan dilindungi oleh barier matriks. Proses regenerasi jaringan gigi melibatkan perkembangan sel dan pensinyalan kompleks untuk membentuk berbagai macam molekul pensinyalan yang mempengaruhi reseptor pada permukaan sel dan sistem transkripsi.<sup>9</sup>

Migrasi sel pulpa secara *in vitro* merupakan kemampuan sel pulpa gigi untuk bergerak dari satu lokasi ke lokasi lain dalam lingkungan seluler buatan di laboratorium pada fase proliferasi.<sup>4</sup> Migrasi sel pulpa ini dapat dipengaruhi oleh banyak faktor, termasuk konsentrasi nutrien, kepadatan sel, suhu,

kelembaban, serta faktor pertumbuhan seluler. Selain itu, adanya faktor stres berupa cedera atau infeksi pada gigi juga dapat mempengaruhi migrasi sel pulpa.<sup>10-12</sup>

## **1.2. Perumusan Masalah**

Penggunaan ekstrak daun *A. scholaris* pada sebagai molekul mediator induksi regenerasi sel pulpa gigi manusia masih perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk memastikan mekanisme proliferasi sel pulpa tersebut. Dari latar belakang masalah tersebut dapat dirumuskan masalah penelitian:

1. Bagaimana pengaruh ekstrak daun *A. scholaris* terhadap viabilitas sel pulpa secara *in vitro*?
2. Bagaimana pengaruh ekstrak daun *A. scholaris* terhadap kecepatan migrasi sel pulpa secara *in vitro*?

## **1.3. Tujuan Penelitian**

1. Menganalisis pengaruh ekstrak daun *Alstonia scholaris* terhadap viabilitas sel pulpa secara *in vitro*.
2. Menganalisis pengaruh ekstrak daun *Alstonia scholaris* terhadap kecepatan migrasi sel pulpa secara *in vitro*.

## **1.4. Batasan Penelitian**

Analisis pengaruh ekstrak dilakukan *Alstonia scholaris* terhadap viabilitas sel pulpa dan kecepatan migrasi sel pulpa dilakukan secara *in vitro* uji MTT dan Uji Migrasi Transwell

## **1.5. Kaitan Penelitian dengan Road Map Penelitian Pribadi dan Road Map Penelitian Fakultas**

Penelitian tanaman obat *Alstonia scholaris* ini berkaitan dengan *end point road map* penelitian yaitu: *precision medicine*, serta obat suplemen dan produk biologi. Hal tersebut berhubungan dengan *road map* penelitian fakultas bidang unggulan *Green Healthy Life*.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Tumbuhan *Alstonia scholaris*

*A. scholaris* adalah pohon dengan tinggi sekitar 40 m atau lebih dan diameter pohon sekitar 125 cm.<sup>13</sup> Kulit batang pohon halus bersisik atau pecah-pecah dangkal dan terkelupas dalam persegi panjang, berwarna abu-abu dengan sayatan berwarna krem hingga kekuningan dan mengeluarkan banyak getah berwarna putih yang mengalir saat dipotong.<sup>14</sup> Daun berbentuk lonjong dengan ujung daun membulat atau meruncing pendek ke arah pangkal, tersusun melingkar, panjang dan lebar daun masing-masing  $\pm 12 - 15$  cm dan  $\pm 4 - 5$  cm, panjang tangkai daun 1,5 – 3 cm. Bunga berbentuk malai yang letaknya di ujung batang dan majemuk. Kelopak bunga berbentuk bulat telur, panjang 7 – 10 mm, berwarna putih hingga putih kekuningan, berambut, dan memiliki aroma yang harum.<sup>2,13</sup>

Tumbuhan yang awalnya bernama *Echites scholaris* ini tidak dapat tumbuh di tempat yang bersuhu kurang dari 8 °C sehingga sering dijumpai di dataran rendah dan pesisir dengan curah hujan tahunan 1.000 – 3.800 mm serta di daerah dengan ketinggian mencapai 1.000 mdpl.<sup>13</sup> Persebaran tumbuhan ini cukup luas, meliputi Asia Pasifik mulai dari India dan Sri Lanka hingga daratan Asia Tenggara dan Cina Selatan termasuk di Indonesia.<sup>14</sup> Klasifikasi *A. scholaris* dapat dilihat pada tabel 1.

**Tabel 1.** Klasifikasi *Alstonia scholaris*.<sup>2</sup>

Kingdom	Plantae
Divisi	<i>Tracheophyta</i>
Kelas	<i>Dicotyledon</i>
Ordo	<i>Gentianales</i>
Suku	<i>Apocynaceae</i>
Marga	<i>Alstonia</i>
Spesies	<i>Alstonia scholaris</i>



**Gambar 1.** Pohon *Alstonia scholaris*

*A. scholaris* memiliki beberapa senyawa meliputi alkaloid, *phenolic*, flavonoid, glikosida, steroid, terpenoid, saponin, dan *proanthocyanidins*. Salah satu studi yang dilakukan oleh Shafique et al. menunjukkan bahwa daun *A. scholaris* mengandung flavonoid tertinggi, diikuti oleh batang dan kulit kayu.<sup>15</sup> Sebagian besar penelitian menggunakan metanol sebagai pelarut dalam membuat ekstrak *A. scholaris* karena saat melakukan *phytochemical screening* aktivitas dari bahan-bahan tersebut sebagian besar lebih aktif terhadap pelarut metanol.<sup>14</sup>

*A. scholaris* digunakan secara tradisional sebagai pengobatan alternatif oleh masyarakat untuk melawan berbagai penyakit sejak lama seperti asma, malaria, demam, disentri, diare, epilepsi, penyakit kulit, gigitan ular, obat cacing, dan lainnya.<sup>13</sup> *A. scholaris* terutama digunakan untuk mengobati diare dan malaria, sebagai tonikum, obat penurun panas, emmenagogue, anti kolerik, dan rentan.<sup>2</sup> Kulit kayu digunakan sebagai tonik pahit, obat penurun panas, membantu pencernaan, sembelit dan telah ditemukan untuk membantu dalam kasus malaria, diare, dan disentri. Ekstrak daun juga baru-baru ini ditemukan memiliki sifat antimikrobanya sendiri. Daun dari tanaman ini sering digunakan dalam pengobatan maag, rheumatoid arthritis, dan asma.<sup>14</sup>

*A. scholaris* dapat digunakan dengan berbagai cara mulai dari direbus, diremas-remas dalam air, diolah menjadi jus pahit, dicampur dengan susu, ataupun digunakan bersama tanaman obat lain. Perasan air dari daun tanaman ini juga dapat digunakan sebagai obat panas dalam. Daun muda direbus dengan air dalam bambu dan diminum pagi hari akan dapat menyembuhkan beri-beri.<sup>14</sup>

Pengaruh ekstrak etanol daun *A. scholaris* telah di evaluasi terhadap model eksperimental dari rasa sakit dan inflamasi. Pemanfaatan alkaloid dilaporkan memiliki

aktivitas sebagai antikanker meliputi *vinkristin* dan *katarantin* yang diisolasi dari *Cataharanthus roseus*. Melalui penahanan siklus sel (*cell-cycle arrest*), baik *alkaloid* serta *triterpene* atau kombinasinya menginduksi *apoptosis*.<sup>13</sup> Ekstrak metanol dari akar *A. scholaris* untuk memeriksa aktivitas garis sel kanker paru-paru diuji menggunakan uji *sulforhodamine B*. *Villalstonine* yang diisolasi dari *A. scholaris* ternyata lebih aktif daripada kandungan kimia yang diisolasi dari jenis *macrophylla* dan *glaucescens*.<sup>14</sup> Ekstrak metanol daun *A. scholaris* sudah terbukti memiliki efek antikanker secara *in vitro* terhadap kanker payudara dan kanker paru paru<sup>13</sup>.

Aktivitas antibakteri diuji terhadap organisme Gram-positif dan Gram-negatif. Ekstrak metanol daun tanaman ini menunjukkan aktivitas antibakteri spektrum luas terhadap organisme yang diuji.<sup>2,13</sup> Namun, bakteri Gram-negatif lebih kebal terhadap ekstrak dibandingkan dengan Gram-positif. Aktivitas *A. scholaris* sebagai antibakteri berhubungan dengan kandungan alkaloid dan alkaloid paling banyak terdapat pada bagian daun, walaupun terdapat lebih dari 70 jenis alkaloid pada akar, kulit batang, daun, buah dan bunga.<sup>2</sup>

Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa ekstrak *A. scholaris* memiliki efek positif dalam mempercepat penyembuhan luka. Aktivitas penyembuhan luka dari etanol dan ekstrak *A. scholaris* menggunakan model luka eksisi, insisi, dan *dead space*. Penilaian penyembuhan luka meliputi kecepatan kontraksi luka, periode epitelisasi, kekuatan pecah dan granulasi kulit, berat jaringan granulasi kering, kadar hidroksiprolin dan kolagen, dan histopatologi jaringan granulasi. Studi ini menemukan bahwa ekstrak secara signifikan meningkatkan penyembuhan luka pada semua model luka yang diuji, seperti yang ditunjukkan oleh peningkatan laju kontraksi luka, kekuatan pemecahan dan granulasi kulit, dan kolagenasi, serta penurunan periode epitelisasi dan peroksidasi lipid. Penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak tersebut dapat meningkatkan aktivitas enzim kolagenase dan elastase pada jaringan luka, yang membantu mempercepat pembentukan jaringan baru dan penyembuhan luka.<sup>13</sup>

Daun *A. scholaris* digunakan untuk mensintesis nanopartikel perak (ASAENP) dan dievaluasi aktivitas antidiabetes secara *in vitro*. ASAENP yang disintesis ditemukan memiliki potensi aktivitas penghambatan *alfa-amilase* dan *alfa-glukosidase*, yang menunjukkan potensinya sebagai agen antidiabetes alami. Ragasa et al. melaporkan potensi hipoglikemik betulin dan lupeolus asetat dari *A. scholaris*.<sup>16</sup> Bandawane et al.

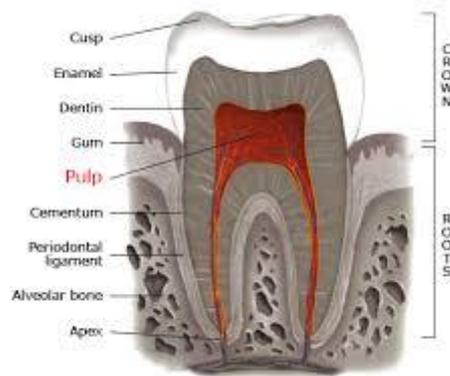
menunjukkan efek hipoglikemik dan antihiperlipidemia dari kulit kayu *A. scholaris* pada tikus diabetes yang diinduksi oleh *streptozotocin*.<sup>17</sup>

Studi lain meneliti kandungan total fenol, total flavonoid, dan aktivitas antioksidan ekstrak kulit kayu Pulaui. Metode *Folin-Ciocalteu* digunakan untuk menentukan jumlah fenol total,  $\text{AlCl}_3$  untuk flavonoid total, dan metode DPPH untuk aktivitas antioksidan *in vitro*. Hasil menunjukkan bahwa ekstraksi dengan etanol 96 % menghasilkan filtrat sebesar 4,19 %. Kandungan fenol total adalah 51,50 mg GAE/g ekstrak dan kandungan flavonoid total adalah 0,35 mg QE/g ekstrak. Nilai  $\text{IC}_{50}$  yang diperoleh dari hasil uji antioksidan ekstrak kulit kayu adalah 211,54  $\mu\text{g/mL}$ . Ekstrak kulit kayu Pulaui memiliki potensi sebagai sumber antioksidan alami.<sup>1</sup>

## **B. Pulpa Gigi**

Pulpa gigi adalah jaringan lunak yang terletak tepat di tengah gigi sebagai jaringan pembentuk, penyokong, dan merupakan bagian integral dari dentin yang mengelilinginya. Pulpa gigi adalah jaringan yang kaya akan vaskuler, saraf, dan sel odontoblas serta berkontribusi dalam menjaga vitalitas gigi dengan mensuplai faktor esensial melalui foramen apikal.<sup>3</sup>

Fungsi primer pulpa adalah formatif yaitu membentuk odontoblas yang tidak hanya membentuk dentin, melainkan berinteraksi juga dengan epitelium dentalis untuk memulai pembentukan email di awal perkembangan gigi. Setelah pembentukan gigi, jaringan pulpa menjalankan fungsi sekunder yaitu fungsi yang berkaitan dengan sensitivitas gigi, hidrasi, dan pertahanan.<sup>3,4</sup>



**Gambar 2.** Anatomi gigi

### 1. Topografi Kamar Pulpa

Bagian mahkota dan akar merupakan dua bagian anatomi utama gigi yang bertemu di daerah servikal. Begitu pula dengan jaringan pulpa terdapat pulpa mahkota dan pulpa akar. Secara umum, bentuk dan ukuran ruang pulpa ditentukan bentuk dan ukuran permukaan gigi. Pulpa mahkota terbagi menjadi tanduk dan kamar pulpa. Tanduk pulpa berjalan dari daerah cusp ke kamar pulpa yang terletak di tengah-tengah mahkota dan batang akar.<sup>3</sup> Dentin membentuk atap kamar pulpa yang menutupi bagian oklusal atau insisal dari kamar pulpa. Sejajar dengan atap tersebut, terdapat dasar kamar pulpa yang terdiri dari dentin dan membatasi kamar pulpa di dekat servikal, terutama pada daerah furkasi.

Orifis saluran adalah lubang pada dasar kamar pulpa yang berhubungan dengan saluran akar. Saluran akar adalah bagian kavitas pulpa yang terbentang dari orifis hingga ke foramen apikal. Ragam bentuk saluran akar bergantung pada bentuk, lengkung, dan besarnya akar, selain umur dan keadaan gigi. Meskipun terdapat anggapan bahwa saluran akar membulat, saluran akar sering berbentuk oval panjang atau bahkan berbentuk pita ke arah apeks.<sup>4</sup> Saluran akar aksesori/lateral adalah percabangan lateral yang dari saluran akar utama yang membentuk hubungan anatar pulpa dan peridontium yang umumnya terjadi pada sepertiga apikal atau daerah furkasi akar.<sup>3,4</sup>

Foramen apikal adalah suatu lubang terletak pada atau dekat apeks akar yang berfungsi sebagai jalan masuk dan keluar bagi pembuluh darah dan saraf pulpa. Foramina aksesori adalah lubang-lubang pada permukaan akar sebagai saluran aksesori dan saluran lateral.<sup>5</sup>

## **2. Morfologi Pembentukan Pulpa**

Pulpa gigi merupakan jaringan lunak yang terletak di dalam ruang pulpa di tengah gigi dan terdiri dari vena yang besar, arteri, dan serabut saraf yang dikelilingi oleh fibroblas dan serat kolagen halus dalam matriks interseluler.<sup>3</sup> Jaringan pulpa akan teridentifikasi apabila sel ektomesenkim dari papila dentalis sudah matang dan telah terbentuk dentin. Selama proses perkembangan gigi, hanya sel-sel yang berlokasi di sebelah lamina basalis yang mengalami replikasi penuh menjadi odontoblas. Proses pembentukan dentin oleh odontoblas merupakan tahap yang menandai transformasi papilla dentalis menjadi pulpa.<sup>5</sup> Morfologi pembentukan pulpa gigi melibatkan beberapa tahap, antara lain:<sup>18</sup>

- a. Tahap proliferasi, yaitu sel-sel mesenkim yang berasal dari papila dentin pada gigi yang masih dalam proses pembentukan akan membelah dan berkembang menjadi jaringan pulpa.
- b. Tahap diferensiasi, yaitu sel-sel mesenkim akan berdiferensiasi menjadi sel-sel odontoblas yang memproduksi dentin dan sel-sel lain seperti sel-sel fibroblas, sel-sel osteoblas, dan sel-sel makrofag.
- c. Tahap maturasi, yaitu sel-sel odontoblas akan membesar dan membentuk dentin dengan cara mengeluarkan matriks dentin dan mineralisasi.
- d. Tahap regenerasi, yaitu sel-sel pulpa akan beregenerasi dan memperbaiki kerusakan akibat infeksi atau trauma.

## **3. Komponen Pulpa**

### **a. Sel-sel Pulpa Gigi**

#### **1) Odontoblas**

Odontoblas adalah sel dalam pulpa gigi sel yang menghasilkan protein kolagen dan nonkolagen untuk mensintesis matriks ekstraseluler dentin.<sup>18</sup> Odontoblas yang lebih besar memiliki kapasitas untuk mensintesis lebih banyak matriks. Fungsi utama odontoblas yaitu memproduksi dan mendeposisi dentin. Odontoblas merupakan sel akhir yang tidak mengalami pembelahan sel setelah masa perkembangannya dan

mengalami fase fungsional, transisi, dan istirahat selama hidupnya yang sejalan dengan vitalitas pulpa gigi.

Odontoblas memiliki dua komponen struktural dan fungsional utama yang terdiri dari badan sel dan prosesus sel. Badan sel berada di dekat matriks dentin yang belum termineralisasi (predentin), sementara prosesus sel memanjang ke luar menuju tubulus di dentin dan predentin. Badan sel memiliki peran dalam mensintesis dan mengandung nukleus yang terletak di basal serta struktur organel seperti retikulum endoplasma dan apparatus golgi. Badan sel odontoblas memiliki kompleks pertemuan, seperti pertemuan celah yang mempersatukan se-sel dan pertukaran metabolit.<sup>19</sup> Produk sekresi dari odontoblas dilepas ke dalam membran sel di ujung perifer badan sel dan ujung basal dari prosesus sel. Odontoblas paling aktif bekerja selama dentinogenesis primer dan selama pembentukan dentin reparatif.<sup>19</sup>

#### 2) Preodontoblas

Odontoblas baru hanya dapat tumbuh setelah odontoblas lama hilang akibat cedera. Namun, pertumbuhan odontoblas baru hanya terjadi jika ada preodontoblas pada zona yang kaya akan sel. Preodontoblas merupakan sel yang sudah sedikit terdiferensiasi sepanjang garis odontoblas dan akan bermigrasi ke tempat cedera terjadi untuk melanjutkan diferensiasi.<sup>19</sup>

#### 3) Fibroblas

Fibroblas adalah jenis sel yang berperan dalam tahap proliferasi dan memiliki kemampuan untuk menghasilkan matriks ekstraseluler dari pembuatan zat dasar dan serabut kolagen ketika terjadi kerusakan jaringan sehingga sel ini dapat menjadi salah satu indikator dalam proses penyembuhan luka.<sup>18,19</sup> Fibroblas dapat berasal dari bagian fibroblas yang ada atau sel mesenkimal pulpa yang tidak berkembang. Namun, berbeda dengan odontoblas, sel-sel fibroblas mengalami kematian apoptosis dan dapat diganti oleh maturasi sel-sel yang kurang terdiferensiasi jika diperlukan.<sup>19</sup>

#### 4) Sel cadangan (sel tak terdeferensiasi)

Sel prekursor merupakan sumber utama bagi sel jaringan ikat di dalam pulpa gigi. Lokasi sel prekursor terdapat di zona kaya akan sel dan dekat inti pulpa, serta berdekatan dengan pembuluh darah. Pada saat terjadi cedera, sel prekursor adalah jenis sel yang pertama kali melakukan pembelahan sel. Seiring dengan meningkatnya kalsifikasi dan berkurangnya aliran darah, jumlah sel prekursor dalam pulpa gigi akan

berkurang dan kemampuannya untuk melakukan regenerasi juga turut menurun.<sup>19</sup> Ciri pluripotensial tetap dimiliki sel tersebut dan dapat berkembang menjadi odontoblast, fibroblast, atau makrofag karena fungsinya dalam perbaikan dan regenerasi.<sup>19</sup>

#### 5) Sel-sel sistem imun

Makrofag, limfosit T, dan sel dendritik adalah sel-sel yang biasa ditemukan di pulpa gigi. Sel dendritik dan prosesusnya tersebar di seluruh lapisan odontoblas dan berinteraksi dengan elemen saraf dan pembuluh darah. Kelompok sel ini bertindak sebagai bagian dari sistem pemantau awal dari pulpa dan dapat menangkap dan mengekspresikan antigen untuk sel T dan makrofag.<sup>19</sup>

#### b. Komponen Ekstra Sel

##### 1) Serat

Dalam pulpa terdapat kolagen tipe I dan tipe III. Odontoblas hanya dapat mensintesis kolagen tipe I yang terdapat dalam matriks dentin, sedangkan fibroblas dapat menghasilkan keduanya, yaitu kolagen tipe I dan tipe III dalam pulpa. Kolagen tipe V juga terdeteksi dalam jumlah kecil dalam pulpa. Serat retikulum halus dapat ditemukan dalam keadaan normal, tetapi serat elastik dan oksitalan tidak ada. Proporsi tipe kolagen dalam pulpa tetap stabil, tetapi seiring bertambahnya usia, jumlah total kolagen dalam pulpa meningkat dan serat kolagen menjadi lebih terorganisasi.<sup>19</sup>

##### 2) Zat dasar

Zat dasar (*ground substance*) pulpa adalah campuran glukosaminoglikan, glikoprotein, dan air yang membentuk bentuk sol-gel. Zat dasar ini memiliki fungsi untuk mendukung sel dan berperan sebagai medium bagi pengangkutan nutrisi dan metabolit. Komposisi zat dasar dapat berubah karena usia atau penyakit, dan hal ini dapat mengganggu aktivitas sel normal serta menyebabkan ketidakaturan fungsi sel dan deposisi mineral. Zat dasar pulpa mirip dengan zat dasar jaringan ikat longgar yang lain.<sup>19</sup>

##### 3) Kalsifikasi

Dentikel dikategorikan menjadi dua jenis, yaitu batu pulpa murni atau palsu, tergantung pada keberadaan struktur tubular di dalamnya. Batu pulpa juga dapat diklasifikasikan berdasarkan lokasinya, yaitu *free stone* yang terdapat di sekitar jaringan pulpa, *attached stone* yang melekat pada dentin, dan *embedded stone* yang sepenuhnya dikelilingi oleh dentin. Kalsifikasi biasanya terjadi pada pulpa yang sudah

tua atau terinflamasi kronis dan ditemukan melalui radiograf. Batu pulpa yang besar dapat menyumbat akses ke saluran akar atau apeks selama perawatan saluran akar.<sup>19</sup>

### c. Pembuluh Darah

Pembuluh darah yang matang pada pulpa memiliki pola vaskular yang sangat khas dan meluas. Fungsi pembuluh darah yaitu untuk membawa bahan gizi, cairan, dan oksigen ke jaringan untuk mengangkutl pembuangan metabolik dari jaringan dengan memprtahankan aliran darah yang cukup melalui kapiler.<sup>19</sup>

#### 1) Pembuluh darah aferen (arteriol)

Pada umumnya, saluran akar memiliki satu atau dua pembuluh darah aferen yang memasukinya melalui foramen apikalis. Pembuluh-pembuluh ini memiliki diameter yang mirip dengan arteriol dan berasal dari arteri alveolaris inferior, arteri alveolaris superior posterior, atau arteri infraorbitalis, yang merupakan cabang dari arteri maksilaris interna.<sup>19</sup>

Setelah arteriol memasuki saluran akar, otot polos yang menutupinya berkurang sehingga volume lumen arteriol meningkat dan kecepatan aliran darah menurun. Arteriol kemudian bercabang menjadi metarteriol dan prekapiler saat mengarah ke pulpa korona, dan percabangan paling banyak terjadi di lapisan subodontoblas pulpa korona (pembuluh berakhir dalam sistem kapiler). Sistem kapiler ini memiliki *loop* di antara odontoblas dan berlanjut sebagai venul.<sup>19</sup>

Otot halus bertanggung jawab dalam mengatur diameter pembuluh darah melalui kontraksi dan relaksasi sehingga mempengaruhi aliran darah ke jaringan. Pengaturan vasodilatasi dan vasokonstriksi menjelaskan perubahan bed kapiler selama periode ketidakaktifan metabolik.<sup>20</sup> Terdapat juga sistem pirau yang luas, terdiri dari anastomosis arteri-vena dan vena-vena, yang aktif setelah terjadi cedera dan reparasi pulpa.<sup>19</sup>

#### 2) Pembuluh darah eferen (venul)

Venul adalah bagian dari sistem sirkulasi pulpa yang mengalir ke arah luar (eferen) dan memiliki ukuran yang sedikit lebih besar daripada arteriol yang sebanding, terdiri dari venula pasca-kapler dan venula penampung (*collecting venules*).<sup>19</sup> Venul akan semakin membesar saat bergabung dan mendekati foramen apikalis. Setelah keluar dari foramen, venul akan bergabung dan membuang isinya ke arah posterior ke dalam

vena maksilaris melalui pleksus pterigoideus atau ke arah anterior ke dalam vena fasialis.<sup>19</sup>

Pembuluh eferen merupakan jenis pembuluh darah yang memiliki dinding yang tipis dan tidak banyak mengandung otot polos. Akibat tidak tersarafi, pembuluh ini cenderung bersifat pasif dan tidak mengalami konstriksi seperti pembuluh darah lainnya.<sup>19</sup> Terdapat mekanisme tambahan yang mempengaruhi aliran darah ke dalam bed kapiler, yaitu adanya hubungan langsung antara arteriola dan venula yang disebut anastomosis arteriovenus atau *shunt*. Melalui anastomosis ini, aliran darah dapat diarahkan langsung dari arteriola ke venula sehingga menghindari melewati bed kapiler. Mekanisme ini dapat mengurangi aliran darah ke kapiler, terutama pada daerah yang mengalami cedera serta membantu mencegah perdarahan dan trombosis.<sup>20</sup>

#### d. Persarafan

Persarafan utama untuk pulpa gigi maksila berasal dari divisi kedua saraf trigeminus (V2), sedangkan untuk gigi-gigi mandibula berasal dari divisi ketiga (V3). Namun, premolar mandibula juga dapat menerima persarafan sensoris dari cabang saraf milohioid dari V yang awalnya adalah saraf motoris. Persarafan ini mencapai gigi melalui foramen kecil di aspek lingual mandibula. Molar mandibula kadang-kadang menerima persarafan sensoris dari saraf spinalis servikal kedua dan ketiga (C2 dan C3), yang dapat menyebabkan kesulitan dalam melakukan anestesi hanya dengan menggunakan injeksi blok saraf alveolaris inferior saja.<sup>19</sup>

Badan sel saraf trigeminus berada di dalam ganglion trigeminus. Dendrit dari saraf-saraf ini bersinapsis dengan neuron nukleus trigeminus di dasar otak dan korda spinalis atas, dan kemudian menyeberang ke pusat-pusat yang lebih tinggi.<sup>20</sup>

Jaringan pulpa menerima persarafan simpatik dari saraf T dan, dalam batas tertentu, dari saraf C dan T, yang berasal dari ganglion servikalis superior. Saraf-saraf ini memasuki ruang pulpa bersama dengan pembuluh darah utama pulpa. Terdapat cabang-cabang lain dari ganglion servikalis superior yang memasok periodontium, mukosa oral, dan kulit. Saat saraf-saraf ini diaktifkan, akan terjadi vasokonstriksi dan aliran darah pulpa akan menurun. Sebaliknya, jika tidak diaktifkan, hanya terjadi vasodilatasi pasif.<sup>19</sup>

#### 4. Proliferasi Sel-sel pada Jaringan Pulpa

Dalam penelitian Piva et al. menunjukkan bahwa *dental pulp stem cells* (DPSC) dapat diisolasi dan diperluas ke nomor skala klinis di media tanpa serum hewan atau faktor pertumbuhan eksogen dan masih mempertahankan sifat regeneratif pulpa. Implikasi dari temuan ini signifikan untuk pengembangan lebih lanjut dari protokol klinis menggunakan DPSC dalam terapi sel.<sup>20</sup> Penelitian lain dari Eramo et al. mengenai percobaan dengan regenerasi pulpa gigi menggunakan strategi *cell homing*. Eksperimen *in vitro* menunjukkan bahwa berbagai sitokin dapat menginduksi migrasi, proliferasi, dan diferensiasi sel punca pulpa gigi yang penting untuk regenerasi pulpa.<sup>21</sup>

## BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

### 3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan November 2023 – Januari 2024 di Laboratorium BioCORE

### 3.2. Metode Penelitian

#### Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratorium secara *in vitro*.

#### Sampel Penelitian

- Ekstrak daun *A. scholaris*
- Bahan Biologis Tersimpan (BBT) sel pulpa gigi manusia yang *unlinked* diperoleh dari gigi molar ketiga impaksi parsial yang diekstraksi.
- Besar sampel dihitung untuk mendapatkan nilai pengulangan. Rumus analitik numerik tidak berpasangan digunakan untuk mendapatkan nilai tersebut.<sup>31</sup>

$$n = 2 \left[ \frac{(Z\alpha + Z\beta) \times S}{X_1 - X_2} \right]^2$$
$$n = 2 \left[ \frac{(1,96 + 0,84) \times 2,26}{16 - 7} \right]^2$$
$$n = 2 \left[ \frac{2,8 \times 2,26}{9} \right]^2$$
$$n = 0,9887 = 1 \sim 3$$

Keterangan:

- n = besar sampel  
 $Z\alpha$  = deviat baku alfa = 1,96  
 $Z\beta$  = deviat baku alfa = 0,84  
 $X_1 - X_2$  = selisih minimal yang dianggap bermakna  
S = simpangan baku

$$S = \sqrt{\frac{S_1^2 \times (n_1 - 1) + S_2^2 \times (n_2 - 1)}{n_1 + n_2 - 2}}$$
$$S = \sqrt{\frac{(2,5)^2 \times (5 - 1) + (2^2) \times (5 - 1)}{5 + 5 - 2}}$$

$$S = \sqrt{\frac{(6,25 \times 4) + (4 \times 4)}{8}}$$

$$S = \sqrt{\frac{25 + 16}{8}} = \sqrt{5,125} = 2,26$$

## Variabel Penelitian

1. Variabel bebas: Ekstrak *A. scholaris* (L.) R.Br. dengan konsentrasi 10, 50, 200, dan 1000  $\mu\text{g/mL}$
2. Variabel tergantung: Viabilitas sel pulpa dan migrasi sel pulpa

## Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi Operasional Variabel	Skala
<b>Ekstrak <i>Alstonia scholaris</i></b>	Ekstrak daun yang diperoleh melalui proses ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol. Dalam penelitian ini konsentrasi yang digunakan adalah 10, 50, 200, dan 1000 $\mu\text{g/mL}$ .	Nominal
<b>Viabilitas Sel Pulpa</b>	Viabilitas yang diukur menggunakan metode uji MTT. Metode ini melibatkan pembacaan absorbansi hasil reaksi garam MTT dan enzim mitokondria dehidrogenase yang menghasilkan formazan dibawah panjang gelombang 540 nm menggunakan <i>microplate reader</i> .	Rasio
<b>Migrasi Sel Pulpa</b>	Migrasi sel yang diukur menggunakan metode <i>tranwell assay</i> . Metode ini menghitung jumlah sel yang bermigrasi ke chamber yang mengandung <i>chemoattractant</i> yang diinginkan.	Rasio

## Bahan dan Alat

### Bahan

- Simplisia *A. scholaris*
- FBS
- PBS
- DMEM
- Metanol 80%
- MTT
- DMSO

- PenStrep
- Air steril
- Trypsin
- Trypan Blue
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Isopropanol
- HCL
- Triton X-100

#### **Alat**

- Timbangan
- Sendok dan mortar
- Bolot *Duran* 100 mL dan 500 mL
- *Syringe* 5 mL dan filter *syringe*
- *Coffee plunger*
- *Rotary vacuum evaporator*
- *Vortex*
- *Clean warp*
- *Freeze dry*
- *Conical Tube* 15 mL dan 50 mL
- Inkubator
- Tabung *Eppendorf*
- *Micropipet*
- *Gun pipet*
- 96 *microwell*-plate
- Cawan petri
- Sentrifugator
- *Autoclave*
- *Biosafety cabinet*
- *Aluminium foil*
- *Beaker glass*
- *Microplate reader*
- *Hemocytometer*
- Label dan alat tulis
- Masker dan *gloves*
- Mikroskop *inverted*

## **Cara Kerja**

### **Ekstraksi *Alstonia scholaris***

Ekstrak ini didapatkan dari daun *A. scholaris* yang telah dikeringkan dan digiling sehingga terbentuk serbuk-serbuk kasar dengan metode Maserasi. Sebanyak 100 g serbuk daun *A. scholaris* dimasukkan kedalam botol Duran berukuran 500 mL yang sebelumnya sudah diisi dengan 500 mL larutan Metanol konsentrasi 80 %. Botol kemudian ditutup rapat dan dikocok secara konstan selama 5 menit, dan selanjutnya didiamkan selama 24 jam.

Setelah proses maserasi selama 24 jam, larutan hasil maserasi dituangkan ke dalam botol Duran 100 mL. Kemudian menggunakan *coffee plunger*, sisa serbuk daun yang basah diperas untuk mengeluarkan sisa cairan yang tertinggal. Untuk memisahkan Metanol dari hasil maserasi dilakukan penguapan dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 40 °C sehingga diperoleh ekstrak yang lebih pekat. Tujuannya adalah mendapatkan ekstrak dalam bentuk bubuk dan memastikan bahwa metanol sudah tertarik secara keseluruhan. Oleh karena itu, dilakukan *Freeze Dry* selama 8 jam. Setelah hasil ekstrak mengering, ekstrak tersebut dikerok dan ditumbuk menggunakan mortar untuk menghasilkan ekstrak dalam bentuk bubuk.

### **Kultur dan Subkultur Sel Pulpa**

Penelitian ini merupakan percobaan di laboratorium dengan metode uji MTT dan uji *scratch wound healing* untuk mengetahui proliferasi sel pulpa terhadap *A. scholaris*. Eksperimen dilakukan pada BBT sel pulpa gigi manusia yang *unlinked* diperoleh dari gigi molar ketiga impaksi parsial yang diekstraksi. Pulpa dipindahkan ke laboratorium dalam tabung *microcentrifuge* yang berisi medium dan dikultur, kemudian dilihat proliferasinya setelah diberi perlakuan ekstrak *A. scholaris* dengan konsentrasi 10, 50, 200, dan 1000 µg/mL dan dibaca nilai absorbansinya sehingga dapat dikonversikan menjadi jumlah sel yang hidup.

Langkah awal dilakukan pembuatan medium lengkap dengan mencampurkan DMEM, FBS 2 %, dan PenStrep 1 % sebelum melakukan subkultur sel. Cawan petri yang berisi sel pulpa gigi manusia dan ligamen periodontal yang diperoleh dari gigi molar ketiga impaksi parsial yang sudah siap disubkultur, diambil dari dalam inkubator. Medium sel dibuang menggunakan *micropipette*, kemudian sel dicuci menggunakan PBS sebanyak 3 mL. Setelah itu, cawan petri ditutup lalu digerakan perlahan di atas meja dengan hati-hati menggunakan gerakan melingkar atau membentuk angka delapan. Tujuannya adalah untuk melepaskan sel yang telah menempel pada *plate* digunakan tripsin sebanyak 2 mL. Setelah diberikan tripsin, gerakan perlahan dilakukan di atas dengan arah

memutar atau membentuk angka delapan lalu dimasukkan ke dalam inkubator selama 5 menit. Setelah itu, cawan petri dikeluarkan dari inkubator dan perubahan warna terlihat menjadi lebih keruh yang mengindikasikan bahwa sel telah terlepas dari dasar *plate*.

Tripsin memiliki sifat yang dapat menyebabkan kematian sel jika reaksinya tidak dihentikan. Oleh karena itu, diberikan medium komplit dalam perbandingan 1:1 dengan tripsin yaitu sebanyak 2 mL untuk menghentikan reaksi tripsin. Suspensi sel kemudian dipindahkan ke dalam *conical tube* berukuran 15 mL lalu dimasukkan ke dalam sentrifugator dan selanjutnya disentrifuse selama 5 menit dengan kecepatan 1000 rpm. Setelah proses tersebut selesai, akan terlihat adanya *supernatant* dan *pellet* yang mengendap dibawah.

Supernatant dibuang dan ditambahkan medium komplit sebanyak 1 mL. Untuk membuat sel menjadi homogen, dilakukan resuspensi dan *tapping*. Setelah mendapatkan sel yang homogen, dilakukan perhitungan sel menggunakan *hemacytometer*. Pewarnaan *tryphan blue* digunakan dalam perbandingan 1:1 terhadap suspensi sel. Sebanyak 10  $\mu$ L *tryphan blue* dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 0,2 mL. Selanjutnya, 10  $\mu$ L suspensi sel dipipetkan dan dicampurkan ke dalam tabung *eppendorf* yang sudah berisi *tryphan blue*. Suspensi sel yang sudah dicampur dengan *tryphan blue* kemudian dimasukkan ke dalam *hemocytometer* dan diamati di bawah mikroskop *inverted* dengan perbesaran 20 $\times$ . Sel yang masih hidup dihitung menggunakan *improved Neubauer hemocytometer*.

$$\text{Jumlah sel/mL} = \frac{\text{Jumlah sel hidup} \times 10.000}{\text{Jumlah kotak besar} \times \text{faktor delusi}}$$

Setelah mendapatkan hasilnya, dilakukan *plating* pada *96-well plate* dan masukan ke dalam inkubator selama satu malam dengan suhu 37  $^{\circ}$ C dan konsentrasi CO<sub>2</sub> sebesar 5 %.

## Uji MTT

Sebelum melakukan perlakuan, ekstrak *A. scholaris* dan diencerkan terlebih dahulu untuk mendapatkan konsentrasi yang diinginkan. Medium lengkap untuk pengenceran ekstrak *A. scholaris* dibuat dan ditambahkan DMSO 0,1 % yang digunakan untuk pembuatan stok *A. scholaris*. Bubuk ekstrak *A. scholaris* sebanyak 0,1 g dicampur dengan 2 mL medium lengkap yang sudah ditambah DMSO 0,1 %, menghasilkan stok dengan konsentrasi 50.000  $\mu$ g/mL. Selanjutnya, dilakukan pengenceran untuk mendapatkan konsentrasi 10, 50, 200, dan 1000  $\mu$ g/mL. Setelah ekstrak *A. scholaris* dengan berbagai konsentrasi telah disiapkan, dilakukan pengenceran H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hingga diperoleh

perbandingan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dengan medium komplit 1:10.000. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> digunakan sebagai kontrol positif dalam pengujian migrasi ini. Sebagai kontrol negative, suspensi sel dengan jumlah 5000 sel/well digunakan tanpa diberikan perlakuan.

Setelah persiapan ekstrak *A. scholaris* dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dengan konsentrasi yang diinginkan, sel-sel yang sebelumnya telah di-*plating* kedalam 96-*well* diambil dari inkubator. Medium dibuang menggunakan *micropipete* 200 µL. Sebagai kontrol positif, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang telah diencerkan sebelumnya diberikan, sedangkan sebagai kontrol negatif hanya medium komplit yang digunakan. Selanjutnya, suspensi sel yang telah dipersiapkan untuk perlakuan diberikan ekstrak *A. scholaris* dengan konsentrasi 10, 50, 200, dan 1000 µg/mL. Sel yang telah diberikan perlakuan kembali dimasukkan kedalam inkubator. Selanjutnya, dilakukan pembuatan larutan stok MTT dengan konsentrasi 5 mg/mL dalam PBS. Bubuk MTT sebanyak 20 mg dicampurkan kedalam 4 mL PBS dalam *conical tube* 50 mL kemudian di *vortex*. Seluruhan campuran diaspirasi menggunakan *syringe* 5 mL lalu *syringe* dipasangkan filter kemudian seluruh cairan di pindahkan ke dalam *conical tube* 15 mL. Sebanyak 2,5 mL campuran MTT dipipet lalu ditambahkan dengan 22,5 mL medium komplit sehingga menghasilkan sebanyak 25 mL *working solution*. Suspensi sel yang ada di dalam *plate* diambil dari dalam inkubator untuk diberikan perlakuan. Medium dibuang lalu diberikan *working solution* MTT sebanyak 100 µL/well kemudian dimasukan kembali ke dalam inkubator selama 4 jam.

Untuk menetralkan efek MTT, diberikan MTT *solubilization solution* (0,1N HCL didalam isopropano, 10 % Triton X-100) sebanyak 100 µL/well. Selanjutnya, *plate* ditutup dan dipindahkan ke *microplate reader* untuk dibaca dengan panjang gelombang 540 nm. Sebelum dimasukkan ke dalam *microplate reader* tutup *plate* dibuka kembali. Hal ini dilakukan untuk mencegah kontaminasi, jika letak alat beada jauh setelah *plate* ditutup, perlu dibungkus dengan alumunium *foil* untuk menghindari cahaya. Seluruh tahap yang melibatkan MTT dilakukan dalam kondisi ruangan yang gelap. Penting untuk diingat bahwa seluruh tahap yang melibatkan sel dilakukan di dalam *biosafety cabinet*.

Untuk mendapatkan jumlah sel yang akan dikonversikan dalam perhitungan total sel dengan menggunakan kurva standar, dilakukan perhitungan sel yang hanya diberikan medium tanpa MTT. Suspensi sel yang telah diletakkan dalam *well* dan diinkubasi selama 24 jam mediumnya dibuang. Selanjutnya, diberikan 25 µL tripsin agar sel tidak terlalu tersebar. Sebanyak 20 µL suspensi di pipet lalu dimasukkan ke setiap sisi *hemocytometer*. Kemudian jumlah sel dihitung dengan mengamati 10 µL suspensi pada *hemocytometer*.

### **Uji Migrasi *Transwell***

Migrasi hDPC (*human dental pulp cells*) dievaluasi menggunakan uji *Transwell*. hDPC pada  $5 \times 10^4$  sel/cm<sup>2</sup> diletakkan ke dalam 24-well plates dan diinkubasi dengan kondisi *starving* pada suhu 37 °C selama 24 jam. Siapkan cell migration assay yang mengandung *Alstonia scholaris* pada chamber bawah. Inkubasi selama 24-48 jam. Persiapkan kurva standar dari sel, pindahkan sel yang bermigrasi, lalu berikan pewarnaan dan hitung sel yang bermigrasi.

### **3.3. Metode Analisis**

Analisis Uji yang dilakukan adalah MTT assay untuk menganalisis viabilitas sel, serta Uji Migrasi *Transwell* dalam menganalisis kecepatan migrasi sel pulpa. Semua data dilakukan uji statistik numerik dengan uji normalitas serta uji komparasi ANOVA

### **3.4. Indikator Capaian Penelitian**

Indikator Capaian Penelitian ini adalah ekstrak daun *Alstonia scholaris* dapat meningkatkan viabilitas sel pulpa secara *in vitro* dan ekstrak daun *Alstonia scholaris* dapat meningkatkan kecepatan migrasi sel pulpa secara *in vitro*.

#### BAB 4. JADWAL PENELITIAN

No.	Kegiatan	2023			2024							
		10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	
1.	Studi Pustaka	√										
2.	Persiapan	√	√									
3.	Eksperimen		√	√	√							
4.	Pengumpulan data			√	√							
5.	Pengolahan data				√							
6.	Seminar hasil/Monev					√						
7.	Penulisan manuskrip						√	√				
8.	Publikasi jurnal								√	√		
9.	Laporan akhir											√

## **BAB 5. RENCANA ANGGARAN BIAYA (RAB)**

<b>No</b>	<b>Komponen</b>	<b>Total</b>
<b>I. Biaya Langsung</b>		
A	Tenaga Ahli dan Tenaga Penunjang	14.250.000
B.1	Biaya bahan habis, peralatan, sewa peralatan	48.225.000
B.2	Perjalanan dan transport lokal	1.275.000
	Sub Total	63.750.000
<b>II. Biaya Tidak Langsung</b>		
A	Laporan, Seminar, dan Publikasi	11.249.999
B	Forum Group Discussion	0
	Sub Total	11.249.999
	<b>TOTAL</b>	<b>74.999.999</b>

## DAFTAR PUSTAKA

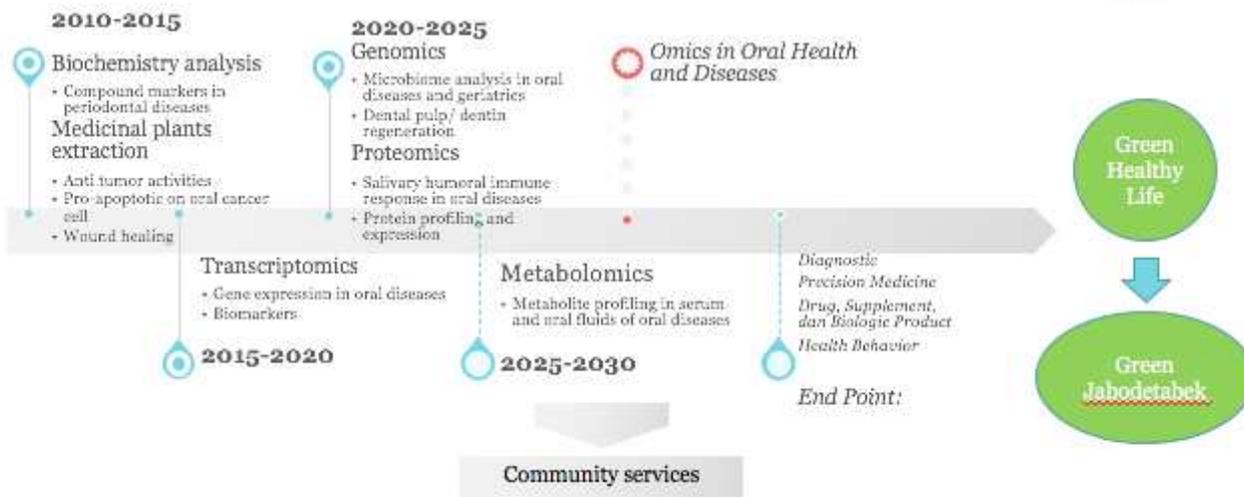
1. Chhajed M, Jain A, Pagariya A, Dwivedi S, Jain N, Taile V. *Alstonia scholaris* Linn. R. Br.: an assessment of its botany, conventional utilization, phytochemistry and pharmacology. *Pharmacogn Rev.* 2023;17(33):184–203.
2. Oktavia R, Misfadhila S, Rivai H. Overview of traditional, phytochemical, and pharmacological uses of pulai (*Alstonia scholaris*). *World J Pharm Pharm Sci.* 2020 Aug 1;9(8):334–54.
3. Kearney M, Cooper PR, Smith AJ, Duncan HF. Epigenetic approaches to the treatment of dental pulp inflammation and repair: opportunities and obstacles. *Front Genet.* 2018. 9:311. doi: 10.3389/fgene.2018.00311
4. Kwack KH, Lee HW. Clinical potential of dental Pulp stem cells in pulp regeneration: current endodontic progress and future perspectives. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10:1–18.
5. Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *J Dent.* 2000. 28:77–92.
6. Tziafas D. Characterization of odontoblast-like cell phenotype and reparative dentin formation in vivo: a comprehensive literature review. *J Endod.* 2019. 45:241–9.
7. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci.* 2000. 97:13625.
8. Rodas-Junco BA, Canul-Chan M, Rojas-Herrera RA, De-la-Pena C, Nic-Can GI. Stemcells from dental pulp: what epigenetics can do with your tooth. *Front Physiol.* 2017. 8:999.
9. Nakashima M, Iohara K, Murakami M, Nakamura H, Sato Y, Aiji Y, et al. Pulp regeneration by transplantation of dental pulp stem cells in pulpitis: a pilot clinical study. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(61):1–13.
10. Jin R, Song G, Chai J, Gou X, Yuan G, Chen Z. Effects of concentrated growth factor on proliferation, migration, and differentiation of human dental pulp stem cells in vitro. *J Tissue Eng.* 2018;9:1–10.
11. Doğan A, Demirci S, Apdik H, Apdik EA, Şahin F. Dental pulp stem cells (DPSCs) increase prostate cancer cell proliferation and migration under in vitro conditions. *Tissue Cell.* 2017;49(6):711–8.
12. Huang GTJ, Sonoyama W, Chen J, Park SH. In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell Tissue Res.* 2006;324(2):225–36.
13. Pratap B, Chakraborty GS, Mogha N. Complete aspects of *alstonia scholaris*. *Int J PharmTech Res.* 2013;5(1):17–26.
14. Chaudhary R. A review on versatile herbal medicament *Alstonia scholaris*. *Innov Pharm Pharmacother.* 2022;10(2):1–7.
15. Shafique S, Akram W, Anjum T, Ahmad A, Shafique S. Comparative studies on phytochemistry, antibacterial and antifungal properties of *Alstonia scholaris* and *Millettia pinnata*. *Australas Plant Dis Notes.* 2014;9(132):1–5.
16. Ragasa, C.Y., Lim, K.F., Shen, CC. *et al.* Erratum to: Hypoglycemic Potential of Triterpenes from *Alstonia scholaris*. *Pharm Chem J* **49**, 144 (2015).
17. Bandawane DD, Jadhav SB, Juvekar AR. Exploration Of Protective Effect Of Hydroalcoholic Extract Of *Alstonia Scholaris* Bark In Stz-Induced Early Diabetic Nephropathy Model In Rats. *Indian Drugs* **2019**, 56 (08) , 69-78
18. Baldión PA, Velandia-Romero ML, Castellanos JE. Odontoblast-like cells differentiated from dental pulp stem cells retain their phenotype after subcultivation. *Int J Cell Biol.* 2018;1–12
19. Walton RE, Torabinejad M. Prinsip & praktik ilmu endodonsia. edisi 3. Juwono L, editor. EGC. Jakarta: EGC; 2008
20. Piva E, Tarlé SA, Nör JE, Zou D, Hatfield E, Guinn T, et al. Dental pulp tissue regeneration using

- dental pulp stem cells isolated and expanded in human serum. *J Endod.* 2017;43(4):568–74.
21. Eramo S, Natali A, Pinna R, Milia E. Dental pulp regeneration via cell homing. *Int Endod J.* 2018;51:405–19.

# LAMPIRAN 1. ROAD MAP PENELITIAN



## Research Roadmap Dr. drg. Muhammad Ihsan Rizal, M.Kes



## LAMPIRAN 2. SURAT KESEDIAAN BERKOMITMEN

### SURAT PERNYATAAN BERKOMITMEN PELAKSANAAN PENELITIAN TH. AKAD. 2023/2024

---

Yang bertanda tangan dibawah ini

Nama : Dr. drg. Muhammad Ihsan Rizal, M.Kes.  
NIK/NIDN/NIDK : 2975 / 0326078203  
Judul Penelitian : Pengembangan *Alstonia scholaris* sebagai Mediator Potensial  
Regenerasi Sel Pulpa Gigi  
No. rekening BNI : 0136189275

Menyatakan

#### **Bersedia/Berkomitmen**

untuk menyusun dan menyerahkan Laporan Kegiatan Penelitian dengan Luaran sebagai berikut:

1. Publikasi di Jurnal - Internasional Bereputasi
2. Hak Kekayaan Intelektual - Hak Cipta

Demikian, pernyataan ini dibuat dengan sebenarnya dengan penuh tanggung jawab.

Jakarta, 13 Oktober 2023

Mengetahui  
Ketua DRPM Fakultas



(Dr. drg. Yohana Yusra, M.Kes)

Yang menyatakan  
Ketua Peneliti



(Dr. drg. Muhammad Ihsan Rizal, M.Kes. )