

PENGARUH PEMBERIAN KOMBINASI SEL PUNCA PULPA GIGI DAN RECOMBINANT HUMAN BONE MORPHOGENETIC PROTEIN-2 TERHADAP KADAR FOSFATASE ALKALI PADA PULPA GIGI TIKUS TERINFLAMASI

(COMBINATION OF RECOMBINANT HUMAN BONE MORPHOGENETIC PROTEIN-2 AND DENTAL PULP STEM CELLS ENHANCED EXPRESSION OF ALKALINE PHOSPHATASE ON INFLAMED RAT'S PULP)

Endang W Bachtiar, Mindya Yuniastuty, Aimee Monica, Boy M Bachtiar

Departemen Biologi Oral
Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Indonesia
Jl. Salemba Raya No 4. Jakarta 10430
E-mail: endang04@ui.ac.id

Abstract

Pulp irritation will form reparative dentin as a defense mechanism. Currently, the materials used to help the defense pulp still have many shortcomings. Therefore, the effect of dental pulp stem cells (DPSC) and rhBMP-2 combination on alkaline phosphatase (ALP) expression in rat's dental pulp was analyzed in this research. Lipopolysaccharide was used to irritate the pulp of 12 Sprague-Dawley rats. Materials were then applied to each group and ALP expression was performed on the first and second week. The result showed that in the first week, giving a combination of pulp stem cells with recombinant BMP-2 had not been visible to increase expression of alkaline phosphatase (ALP), a biomarker regeneration of pulp, but the increase in ALP expression occurred in the second week. In conclusion, a combination of pulp stem cells and rhBMP-2 can increase the expression of ALP on inflamed rat's pulp.

Key words: bone morphogenetic protein-2, alkaline phosphatase, pulp regeneration, dental pulp stem cells

PENDAHULUAN

Pulpa gigi merupakan jaringan ikat yang terdiri atas sel, substansi dasar, dan serat.¹ Sel yang terdapat pada pulpa antara lain: fibroblas, preodontoblas, odontoblas, sel-sel imun dan sel mesenkim tak terdiferensiasi. Fibroblas sering ditemui pada jaringan ikat dan berperan terutama dalam penyembuhan luka. Preodontoblas terdapat pada zona kaya sel dan ketika terjadi cedera pulpa mereka akan bermigrasi ke area di mana mereka dibutuhkan dan berdiferensiasi secara penuh menjadi odontoblas. Odontoblas dapat mensekresi matriks yang akan termineralisasi menjadi dentin. Sel mesenkim tak terdiferensiasi dapat berubah menjadi beberapa macam sel saat dibutuhkan.² Dengan adanya sel-sel tersebut, pulpa dapat berfungsi sebagai penyokong dan pembentuk dentin.

Pulpa juga memiliki fungsi memberikan nutrisi untuk dentin, karena dentin tidak memiliki pasokan

darah. Nutrisi diperoleh melalui tubuli dentin dan koneksinya dengan odontoblas.³ Pulpa gigi memiliki kemampuan untuk mengidentifikasi keberadaan substansi asing atau iritan. Apabila terjadi iritasi, pulpa akan mengeluarkan respons imun sebagai perlawanan dan terjadilah apa yang disebut dengan pulpitis atau peradangan pulpa. Iritan tersebut dapat berupa iritan biologik, mekanik, serta kimia. Iritan ini dapat menyebabkan cedera pada pulpa meskipun tidak mengalami kontak langsung dengan pulpa.⁴

Lipopolisakarida (LPS) merupakan komponen dinding sel bakteri gram negatif.⁵ LPS bakteri pertama yang telah dikenali secara kimiawi adalah LPS yang berasal dari kelompok bakteri *Enterobacteriaceae*, seperti *Salmonella* dan *Escherichia*. LPS terdiri atas kompleks lipid A yang berikatan dengan rantai polisakarida. Komponen lipid A pada LPS merupakan komponen yang menyebabkan toksisitas dari LPS. Komponen lipid A ini akan mengaktivasi makrofag dan sistem komplemen sehingga akan

menyebabkan terjadinya inflamasi.⁶ Penelitian oleh Kawashima, *et al.* menyatakan bahwa level tertinggi mediator inflamasi pulpa tikus dicapai 6 jam setelah pemberian 10 mg/ml LPS.⁷

Belakangan ini, sel punca dan protein pertumbuhan sedang dikembangkan dalam kedokteran gigi agar kelak dapat menggantikan struktur oral yang rusak atau hilang. Pemanfaatan sel punca pulpa gigi atau dental pulp stem cells (DPSC) merupakan salah satu penerapan teknologi rekayasa jaringan yang diharapkan akan mendukung terjadinya proses regenerasi jaringan pulpa baru. Proses regenerasi pulpa tidak terjadi atau sangat kecil kemungkinan terjadi dengan metode perawatan pulpa konvensional. Dengan perawatan pulpa konvensional proses penyembuhan akan membentuk jaringan reparatif. DPSC adalah sel punca pluripoten, yang memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi beberapa tipe variasi sel, antara lain osteosit, tulang, dan jaringan lain di dalam kavitas oral.⁸ Dalam penelitian Murray, *et al.* dan Iohara, *et al.* disimpulkan bahwa DPSC memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi odontoblas dan berperan dalam proses regenerasi dentin.^{9,10} Oleh karena itu, pemberian DPSC pada pulpa gigi yang terkena pulpitis diharapkan dapat meningkatkan jumlah odontoblas baru sehingga dapat ikut membentuk dentin regeneratif dan mempercepat penyembuhan serta berfungsi secara normal.

Bone morphogenetic protein (BMP) adalah faktor pertumbuhan, protein yang memiliki kemampuan untuk menghasilkan reproduksi tulang.¹¹ BMP memiliki beberapa tipe, di antaranya BMP-2. Secara spesifik, BMP-2 memiliki peranan penting dalam perkembangan tulang dan kartilago. BMP-2 dapat mengarahkan proses perbaikan dan regenerasi tulang pada berbagai bagian dari skeleton. Sandhu HS, dalam artikelnya menyatakan bahwa BMP-2 bersifat osteoinduktif.¹² Iohara, *et al.* juga menyimpulkan bahwa BMP-2 dapat merangsang diferensiasi odontoblas.¹⁰ Issa, *et al.* menyatakan bahwa secara *in vivo*, BMP-2 menstimulasi sel mesenkim untuk berdiferensiasi menjadi kartilago dan sel pembentuk tulang (odontoblas).¹³ *Recombinant* (r) hBMP-2 adalah produk sintesis dari BMP-2. Dengan memberikan rhBMP-2 pada pulpa gigi yang terkena pulpitis, diharapkan sel-sel pulpa dapat terangsang untuk membentuk odontoblas sehingga mempercepat regenerasi dentin.

Salah satu cara untuk mengamati pengaruh DPSC dan rhBMP-2 terhadap pembentukan odontoblas adalah dengan mengamati aktivitas odontoblas yang melalui ekspresi biomarker yaitu fosfatase alkali. Fosfatase alkali adalah suatu enzim yang disekresikan oleh sel odontoblas yang telah terdiferensiasi.¹⁴

Karena itu, pengukuran kadar fosfatase alkali dapat menunjukkan apakah sel odontoblas sudah mulai memasuki tahap diferensiasi sel. Tujuan penelitian adalah menganalisis pengaruh dari DPSC, BMP-2, dan kombinasi keduanya terhadap kadar fosfatase alkali pada pulpa yang terkena pulpitis dalam kaitannya dengan pembentukan dentin reparatif. Selanjutnya diharapkan pemberian sel punca pulpa dengan kombinasi rhBMP-2 pada pulpa gigi tikus terinflamasi dapat mempengaruhi ekspresi enzim fosfatase alkali (ALP).

BAHAN DAN METODE

Dua belas ekor tikus Sprague-Dawley jantan berumur 3 bulan dengan berat badan 400-450 gram yang dipelihara di *Animal House* FKUI dengan standar prosedur operasional *Animal House* FKUI. Penelitian telah lolos kaji etik. Tikus dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan, masing-masing terdiri atas 4 tikus: 1) kelompok kontrol, 2) kelompok yang diberi Sel Punca Pulpa, dan 3) kelompok yang diberi kombinasi dan sel punca pulpa dengan rekombinan BMP-2.

Induksi pulpitis dilakukan dengan cara membuat kavitas mencapai pulpa pada gigi insisif tikus, dilanjutkan dengan pemaparan lipopolisakarida 10 ug/ul sebanyak 5 ul pada tiap pulpa gigi tikus. Kavitas ditumpat sementara dengan ZnOE dan ditinggalkan selama 6 jam agar terjadi inflamasi pulpa minimal. Mulai dari tahap induksi pulpitis hingga pengambilan sampel, tikus dianestesi dengan menggunakan eter.

Sel punca pulpa (DPSC) beku diambil dari penyimpanan nitrogen cair di Laboratorium Biologi Oral FKGUI.¹⁵ DPSC dipindahkan ke dalam tabung sentrifuge 15 ml untuk pencucian sel dengan *phosphat buffer saline* (PBS) (SIGMA) sebanyak tiga kali. Selanjutnya suspensi sel dipindahkan ke dalam cawan petri sebanyak 10⁵ sel (NUNC, diameter 100 mm; tinggi 15 mm) yang telah diisi 7 ml DMEM (SIGMA) komplet.¹⁵ Sediaan ini dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu 37°C dengan 5% CO₂. Setelah pertumbuhan tampak konfluen ($\pm 5-7$ hari), dilakukan pemanenan sel punca dengan bantuan trypsin-EDTA. Panen dilakukan dengan *scraping* dasar cawan petri yang merupakan tempat melekatnya sel-sel yang hidup, sedangkan sel yang mati dibuang. Pengamatan dan perhitungan sel yang hidup menggunakan pewarnaan *trypan blue* (SIGMA).

Setelah tumpatan sementara dibuka, material diinjeksikan pada pulpa masing-masing tikus sesuai dengan kelompok perlakuan masing-masing menggunakan *micropipette*. Pada kelompok kontrol tidak

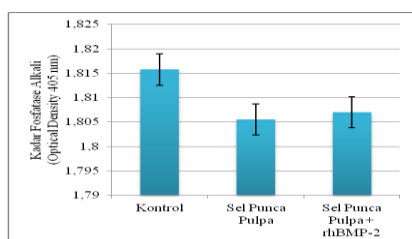
diberikan material apapun dan tumpatan sementara tidak dibuka. Pada kelompok yang diberi sel punca pulpa, setiap tikus mendapatkan DPSC sebanyak 2×10^6 sel, masing-masing 10 μ l. Sementara kelompok yang diberikan sel punca pulpa rekombinan BMP-2 (R&D) mendapatkan campuran antara DPSC (konsentrasi 2×10^6 sel) dan rhBMP-2 (konsentrasi 5 μ g/ml), dengan volume total 10 μ l untuk setiap tikusnya. Kavitas ditumpat kembali dengan ZnOE.

Pengambilan sampel pulpa dilakukan pada hari ke-7 dan ke-14 dengan cara ekstraksi gigi tikus. Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan tang ekstraksi pedodontik, sampel jaringan pulpa diaspirasi kemudian dimasukkan ke dalam berisi larutan PBS steril untuk pengukuran ALP. Uji ini dilakukan dengan cara mereaksikan sampel dengan p-Nitrophenylphosphate (SIGMA) dan Diethanolamine (SIGMA). Tingkat ekspresi ALP diukur dengan bantuan *microplate reader* dengan panjang gelombang 405 nm (Biorad).

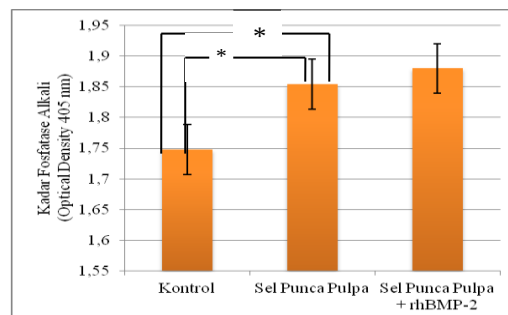
Analisis data secara statistik dilakukan dengan menggunakan SPSS 17.0. Pertama, data dianalisis distribusinya dengan menggunakan uji normalitas Shapiro-Wilk, karena jumlah sampel yang kurang dari 40. Uji ini menunjukkan sebaran data normal kecuali pada kelompok sel punca pulpa rekombinan BMP-2 pada minggu kedua ($p=0.029$). Karena itu, analisis data selanjutnya dilakukan dengan metode non-parametrik. Uji non-parametrik yang digunakan adalah Kruskal-Wallis. Uji ini dilakukan untuk membuktikan hipotesis tentang signifikansi dari tiga hal, yakni: perbedaan antar kelompok pada minggu pertama, perbedaan antar kelompok pada minggu kedua, dan kenaikan atau penurunan kadar fosfatase alkali dalam suatu kelompok perlakuan.

HASIL

Pada minggu pertama, kadar fosfatase alkali kelompok kontrol lebih tinggi dibandingkan dua kelompok lainnya. Di antara dua kelompok itu, sel punca pulpa rekombinan BMP-2 menghasilkan kadar fosfatase alkali yang lebih tinggi. (Gambar 1)



Gambar 1. Tingkat ekspresi fosfatase alkali pada minggu pertama



* menunjukkan perbedaan bermakna pada $p < 0.05$

Gambar 2. Tingkat ekspresi alkali fosfatase pada minggu kedua

Hasil analisis statistik Kruskal-Wallis menggambarkan bahwa kenaikan atau penurunan yang dialami oleh kelompok kontrol, sel punca pulpa, dan sel punca pulpa rekombinan BMP-2 dari minggu pertama ke minggu kedua adalah tidak bermakna secara statistik (Gambar 1,2). Selanjutnya dilakukan lagi uji Kruskal-Wallis untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan pada minggu pertama dan minggu kedua. Hasilnya, perbedaan antara ketiga kelompok perlakuan pada minggu pertama adalah tidak signifikan ($p=0.944$). Namun, perbedaan antar kelompok perlakuan pada minggu kedua adalah bermakna ($p=0.044$). Untuk itu, selanjutnya dilakukan uji post hoc Mann-Whitney. Uji Mann-Whitney menunjukkan bahwa perbedaan bermakna berlaku pada kelompok kontrol dengan kelompok yang diberi sel punca pulpa saja, serta pada kelompok kontrol dengan kelompok sel punca pulpa rekombinan BMP-2 ($p=0.043$). Namun, seperti yang dapat dilihat pada Gambar 2, perbedaan bermakna ini tidak berlaku pada kelompok sel punca pulpa dengan kelompok sel punca pulpa rekombinan BMP-2 ($p=0.248$).

PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan pada minggu pertama kadar fosfatase alkali pada kelompok yang diberi sel punca saja maupun kelompok sel punca rekombinan BMP-2, lebih rendah daripada kelompok kontrol. Hal ini kemungkinan kedua kelompok tersebut masih berada dalam tahap proliferasi, sementara kelompok kontrol telah memasuki tahap diferensiasi. Kemungkinan ini diperkuat oleh penelitian Riccio, *et al.* yang mengemukakan bahwa sel punca pulpa masih berada dalam tahap proliferasi pada hari ke-8.¹⁶

Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Yang, *et al.* yang menyatakan bahwa penggunaan rhBMP-2 dalam penelitian mereka sedikit menghambat proliferasi tahap awal.¹⁷ Namun, penelitian oleh

Iohara, *et al.* menyatakan bahwa rhBMP-2 tidak mempengaruhi proliferasi.¹⁰ Perbedaan hasil ini dimungkinkan karena Yang, *et al.* juga menggunakan tikus sebagai hewan percobaan, sementara Iohara, *et al.* menggunakan anjing.

Pada minggu kedua, kadar fosfatase alkali tertinggi dicapai oleh kelompok perlakuan sel punca pulpa rekombinan BMP-2, diikuti oleh kelompok yang diberi sel punca pulpa saja, kemudian kontrol. Perbedaan antara kontrol dengan kelompok sel punca pulpa adalah bermakna secara statistik, begitu pula perbedaan antara kontrol dengan kelompok sel punca pulpa rekombinan BMP-2. Perbedaan yang bermakna ini membuktikan bahwa pemberian sel punca pulpa dan rhBMP-2 pada pulpa gigi tikus terinflamasi dapat meningkatkan kadar fosfatase alkali. Hal ini sejalan dengan banyak penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, antara lain Gronthos, *et al.* Oh, *et al.* dan lain-lain.^{18,19} Hasil ini juga mengindikasikan bahwa minggu kedua adalah waktu yang lebih optimal untuk pemberian sel punca pulpa dan rhBMP-2 dibandingkan dengan minggu pertama. Di lain pihak, perbedaan antara kelompok yang diberi sel punca pulpa saja dengan yang diberi rhBMP-2 adalah tidak bermakna secara statistik. Meskipun demikian, baik pada minggu pertama maupun kedua kelompok sel punca pulpa rekombinan BMP-2 memiliki kadar fosfatase alkali yang lebih tinggi daripada kelompok yang diberi sel punca saja. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian kombinasi sel punca pulpa dengan rhBMP-2 cenderung lebih baik daripada pemberian sel punca pulpa saja.

Apabila diamati secara individual, kelompok kontrol mengalami penurunan pada minggu kedua. Hal ini dapat menunjukkan bahwa kontrol telah mengalami mineralisasi yang merupakan tahap lanjutan dari diferensiasi yang telah terjadi pada minggu pertama. Ketika memasuki tahap mineralisasi, maka kadar fosfatase alkali akan turun, sesuai dengan pernyataan oleh Stucki, *et al.*¹⁶ Min, *et al.* juga menyimpulkan bahwa kadar fosfatase alkali pada keadaan inflamasi pulpa akan menurun dari hari ke-7 ke hari ke-14.²¹

Sementara itu, kelompok yang hanya diberi sel punca pulpa mengalami kenaikan kadar fosfatase alkali pada minggu kedua. Kemungkinan sel punca pulpa telah mulai memasuki tahap diferensiasi sehingga menaikkan kadar fosfatase alkali. Hasil ini didukung penelitian oleh Di Silvio, *et al.*¹⁷ Penelitian ini juga menggunakan sel punca pulpa yang diambil dari pulpa gigi molar tiga. Sel ini dikultur dan diamati pada hari ke-7, 14, 21, dan 28. Kadar fosfatase alkali juga meningkat hingga hari ke-28 di mana kultur telah membentuk nodul termineralisasi.

Ini berarti pemberian sel punca pulpa pada pulpa gigi tikus terinflamasi dapat meningkatkan kadar fosfatase alkali.

Kelompok sel punca pulpa rekombinan BMP-2 pun mengalami kenaikan kadar fosfatase alkali. Sama seperti kelompok yang diberi sel punca saja, ini berarti kelompok sel punca pulpa rekombinan BMP-2 telah memasuki tahap diferensiasi. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Iohara, *et al.* yang juga menggunakan terapi sel punca pulpa rekombinan BMP-2 pada anjing.¹⁰ Pada penelitiannya, ekstraksi dilakukan pada pulpa gigi insisif atas anjing. Pulpa ini kemudian dikultur dan ditambahkan dengan rhBMP-2. Setelah itu, kultur pulpa ditransplantasikan secara autogenus pada gigi kanin anjing. Uji fosfatase alkali dilakukan pada hari ke-7, 14, dan 21. Pada hari ke-14, kadar fosfatase alkali meningkat dibandingkan dengan hari ke-7.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian sel punca pulpa serta kombinasinya dengan rhBMP-2 dapat meningkatkan kadar fosfatase alkali pada pulpa gigi tikus *Sprague-Dawley* terinflamasi. Peningkatan ini bermakna secara statistik jika dibandingkan dengan kontrol di minggu kedua. Hal ini mengindikasikan bahwa baik pemberian sel punca pulpa saja maupun kombinasinya dengan rhBMP-2 memiliki potensi yang baik untuk digunakan sebagai biomaterial dalam rekayasa jaringan pulpa.

Dapat disimpulkan, pemberian sel punca pulpa saja maupun kombinasinya dengan rhBMP-2 pada pulpa gigi tikus *Sprague-Dawley* terinflamasi dapat meningkatkan kadar fosfatase alkali.

UCAPAN TERIMA KASIH

Sebagian penelitian ini didukung oleh Hibah Riset Unggulan Universitas Indonesia (RUUI 2009). Penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada Bapak Dino (Animal House, Fakultas Kedokteran UI), Sdri. Maysyarah (Laboratorium Biologi Oral FKGUI) atas bantuan teknis selama berlangsungnya penelitian ini.

Daftar Pustaka

1. Petrovic V, Stefanovic V. Dental tissue-new source for stem cells. *Scientific World J* 2009; 14: 1167-77.
2. Peng L, Ye L, Zhou XD. Mesenchymal stem cells and tooth engineering. *Int J Oral Sci* 2009; 1: 6-12.
3. Rosenthal MW. Historic review of the management of tooth hypersensitivity. *Dent Clin North Am* 1990 ; 34: 403-27.
4. Matsumoto N, Sato T, Ooe M, Suzuki TA. The projection pathway from the tooth pulp to the ipsi-

- lateral first somatosensory cortex (SI) in the cat. *Arch Oral Biol* 1988; 33: 251-6.
5. Casagrande L, Cordeiro MM, Nör SA, Nör JE. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology* 2011; 99: 1-7.
 6. Botero TM, Mantellini MG, Song W, Hanks CT, Nor JE. Effect of lipopolysaccharides on vascular endothelial growth factor expression in mouse pulp cells and macrophages. *European J of Oral Sciences* 2003; 111: 228-34.
 7. Kawashima N, Nakano-Kawanishi H, et al. Effect of NOS Inhibitor on Cytokine and COX2 Expression in Rat Pulpitis. *J of Dent Res* 2005;84:762.
 8. Lei G, Yan M, Wang Z, Yu Y, Tang C, Wang Z, Yu J, Zhang G. Dentinogenic capacity: immature root papilla stem cells versus mature root pulp stem cells. *Biol Cell* 2011;103:185-96.
 9. Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: A review of current status and a call for Action. *J of Endodontic* 2007; 33: 377-90.
 10. Iohara K, Nakashima M, Ito M, De Ishikawa M, Ito M, Tomokiyo, A. Tanaka T, Akamine A. Dentin Regeneration by Dental Pulp Stem Cell Therapy with Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 2. *J of Dental Res* 2004; 83: 590-5.
 11. Arosarena OA, Del Carpio-Cano FE, Dela Cadena RA, Rico MC, Nwodin E, Safadi FF. Comparison of bone morphogenetic protein-2 and osteoactivin for mesenchymal cell differentiation: Effects of bolus and continuous administration. *J Cell Physiol* 2011; 22: 2943-52.
 12. Sandhu H Spinal fusion using bone morphogenetic proteins. *Orthopedics* 2004; 27: 717-8.
 13. Issa JP, do Nascimento C, Lamano T, Iyomasa MM, Sebald W, de Albuquerque RF Jr. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on bone formation in the acute distraction osteogenesis of rat mandibles. *Clin Oral Implants Res* 2009; 20: 1286-92.
 14. Narayanan K, Srinivas R, Ramachandran A, Hao J, Quinn B, George A. Differentiation of embryonic mesenchymal cells to odontoblast-like cells by overexpression of dentin matrix protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 10: 4516-21.
 15. Bachtar E. Alkaline phosphatase activity of chitosan-treated dental pulp stem-cells http://iadr.confex.com/iadr/sea07/preliminaryprogram/abstract_97446.htm. (2011 November 4rd).
 16. Stucki U, Schmid J, Hammerle CF, Lang NP. Temporal and local appearance of alkaline phosphatase activity in early stages of guided bone regeneration: A descriptive histochemical study in humans. *Clin Oral Impl Res* 2001; 12: 121-7.
 17. Silvio LD, Sarinnaphakorn L, Koller G, 0916 Human Dental Pulp Stem Cell model for studying odontoblast differentiation. Available from: http://iadr.confex.com/iadr/pef08/techprogram/abstract_111551.htm (2010 November 23rd).