

Sitotoksitas Kombinasi Seng-oksida dan Ekstrak Curcuma longa Terhadap Fibroblas Gingiva Manusia

Vina Aprilia, Asti Meizarini, Titien Hary Agustantina

Departemen Material Kedokteran Gigi
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga
Surabaya, Indonesia

ABSTRAK

Penggunaan seng oksida - eugenol sebagai dressing periodontal masih dipermasalahkan, karena sifat eugenol yang toksik, dan Curcuma longa Linn sebagai herbal alami yang aman diharapkan dapat menggantikan fungsi eugenol. Penelitian sebelumnya telah membuktikan bahwa kombinasi seng oksida dengan ekstrak Curcuma longa cair, memiliki sifat antibakteri dan penggunaannya sebagai dressing terbukti mempercepat penyembuhan luka in vivo. Bahan yang diaplikasikan dalam rongga mulut harus tidak beracun dan bersifat biokompatibel, oleh karena itu diperlukan uji sitotoksitas. Untuk mengetahui sitotoksitas kombinasi seng oksida dan ekstrak Curcuma longa pada sel fibroblas gingiva manusia. Uji sitotoksitas kombinasi serbuk seng oksida dan ekstrak Curcuma longa dilakukan dengan perbandingan 1: 1 (kelompok A) dan 2: 1 (kelompok B), ekstrak Curcuma longa cair (kelompok C) dan serbuk seng oksida (Kelompok D), yang dilakukan pada sel kultur fibroblas gingiva manusia (kepadatan 3-5x10³) dalam microplate 96 wells. Analisis sitotoksitas dilakukan menggunakan esai MTT dengan parameter IC₅₀. Uji statistik menggunakan oneway Anova dan LSD. Hasil: Jumlah sel hidup dalam kelompok A = 64,819%, kelompok B = 59,452%, kelompok C = 52,859% dan kelompok D = 60,52%. Tidak ada perbedaan yang signifikan antara kelompok A, B, D tetapi berbeda signifikan dengan kelompok C. Kombinasi seng oksida dengan ekstrak Curcuma longa rasio 1: 1 dan 2: 1, serbuk seng oksida dan ekstrak cair Curcuma tidak toksik untuk fibroblas gingiva manusia pada IC₅₀.

Kata kunci: *Curcuma longa, sitotoksitas, seng oksida*

Zinc oxide and Curcuma longa Extract Combination Cytotoxicity Toward Human Gingival Fibroblast

ABSTRACT

The use of zinc oxide - eugenol as periodontal dressing is controversial due to the toxic nature of eugenol and Curcuma longa Linn as a safe natural herbal, is expected to replace eugenol function. Previous research has proven that the combination of zinc oxide with Curcuma liquid extract has an antibacterial properties and the use of those as wound dressing

Korespondensi:

Asti Meizarini
Email: asti-m@fkg.unair.ac.id

through in vivo studies proved to accelerate wound healing. The ingredients applied to the oral cavity must be non-toxic and biocompatible, therefore cytotoxicity testing is required. To determine the cytotoxicity of zinc oxide and Curcuma longa extract combination on human gingival fibroblast cells. Cytotoxicity test of combination of zinc oxide powder with Curcuma liquid extract was done at ratio of 1: 1 (group A) and 2: 1 (group B), Curcuma liquid extract (group C) and zinc oxide powder (group D), which performed on human gingival fibroblast culture-cells (3-5x10³ densities) in 96 wells microplate. MTT essay was used to analyzed with IC50 parameters. Statistical analysis using oneway Anova and LSD. The number of living cells in group A = 64.819%, group B = 59.452%, group C = 52.859% and group D = 60.502%. There was no significant difference between the groups of A, B, D but those groups were significantly different to group C. Combination of zinc oxide with Curcuma extract ratio of 1: 1 and 2: 1, zinc oxide powder and Curcuma liquid extract are not toxic to human gingival fibroblast at IC50.

Key words: *Curcuma longa, cytotoxicity, zinc oxide*

PENDAHULUAN

Salah satu manifestasi penyakit periodontal adalah gingival enlargement. Perawatan periodontal yang dapat dilakukan pada gingival enlargement adalah subgingival scaling dan supragingival scaling. Apabila setelah dilakukan scaling dan pembesaran gingiva tidak kunjung sembuh, maka dilakukan tindakan bedah periodontal yaitu gingivektomi atau periodontal flap. Tahap akhir dari tindakan bedah periodontal adalah pemberian periodontal dressing. Penggunaan dressing bertujuan untuk meminimalkan infeksi paska operasi, pendarahan dan membantu proses penyembuhan dengan cara melindungi permukaan luka selama pengunyahan, serta memberi perlindungan terhadap rasa sakit. Periodontal dressing umumnya terbuat dari seng oksida eugenol

atau seng oksida non-eugenol. Kandungan eugenol pada periodontal dressing dapat menyebabkan reaksi alergi dengan warna kemerahan (iritasi) dan rasa terbakar pada daerah sekitar luka.¹ Untuk menanggulangi sifat iritasi tersebut, dilakukan penelitian penggantian eugenol dengan ekstrak Curcuma longa.² sebagai periodontal dressing alternatif.

Penelitian secara in vitro telah membuktikan bahwa campuran seng oksida dengan ekstrak Curcuma longa 1:1 dan 2:1 mempunyai sifat anti bakteri yang dapat menghambat pertumbuhan Streptococcus mutans.³ dan Porphyromonas gingivalis.⁴ yang menunjukkan efektivitas terhadap bakteri rongga mulut. *Keunggulan pemberian dressing campuran seng oksida dengan ekstrak Curcuma longa pada penelitian in vivo perbandingan 1:1, dapat mempercepat proses inflamasi.*² tetapi belum ada penelitian mengenai toksisitas dari bahan tersebut. Ada penelitian yang menyatakan bahwa seng oksida dalam keadaan tertentu dapat berpotensi toksik terhadap tubuh. Seng oksida larut dalam media, mengalami proses disosiasi, sehingga ion Zn²⁺ dapat merusak lisosom dan mitokondria, yang dapat menyebabkan kematian sel.⁵ *Ekstrak Curcuma longa memiliki senyawa kurkuminoid.* Kurkuminoid yang terkandung dalam kunyit mempunyai aktivitas yang sangat luas antara lain sebagai antioksidan, antihepatotoksik, antiinflamasi, antibakteri, antivirus, antijamur, dan antikoagulan.⁶ Berdasarkan latar belakang di atas penulis ingin melakukan uji sitotoksitas kombinasi seng oksida dan ekstrak Curcuma longa terhadap sel fibroblas gingiva manusia.

Sel fibroblas banyak ditemukan pada jaringan ikat. Sel fibroblas gingiva manusia terlibat dalam mempertahankan matriks jaringan ikat, dan memiliki fungsi khusus dalam proses perbaikan sel, remodeling, serta regenerasi dari tulang alveolar dan cementum yang melekat pada gingiva.⁷ Metode yang biasa digunakan untuk uji sitotoksitas adalah dengan uji enzimatik menggunakan pereaksi 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), yaitu

dengan melihat aktivitas enzim mitokondria secara fotometrik melalui reaksi perubahan warna, pewarna akan memberi warna sel-sel yang vital, sedangkan sel-sel dengan kerusakan membran tidak akan terwarnai.⁸ Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui sitotoksitas kombinasi seng oksida dan ekstrak Curcuma longa perbandingan 1:1 dan 2:1, juga bahan dasarnya, yaitu seng oksida dan ekstrak Curcuma terhadap sel fibroblas gingiva manusia.

BAHAN DAN METODE

Bahan: Bubuk seng oksida 99,8 % (Merck Germany, cat 1.08849.0500). Ekstrak Curcuma longa cair, yang dimaserasi menggunakan etanol 96% (Balai Materia Medica, Batu).

Metode: Penelitian eksperimental laboratoris ini merupakan post test only group design. Spesimen yang digunakan adalah bubuk seng oksida, ekstrak Curcuma longa cair dan kombinasi keduanya, yang dibagi dalam 4 kelompok. Spesimen A menggunakan bubuk seng oksida 0,1 g dan ekstrak Curcuma longa Linn 0,1 g (rasio 1:1). Spesimen B menggunakan bubuk seng oksida 0,2 g dan ekstrak Curcuma longa Linn 0,1 g (rasio 2:1). Spesimen C menggunakan ekstrak Curcuma longa Linn cair dan spesimen D menggunakan bubuk seng oksida.

Pembuatan Spesimen A dan B

Spesimen dibuat dalam cetakan teflon diameter 5 mm, tinggi 2 mm, sisi dasar diberi matriks strip dan diletakkan di atas glass slab. Setelah bahan ditimbang, diaduk di atas mixing pad menggunakan spatula semen selama 60 detik hingga homogen, dimasukkan dalam cetakan menggunakan plastic filling instrument, ditunggu hingga setting selama 45 menit, baru kemudian dilepas.

Tahap Persiapan Sampel

Sepuluh spesimen masing-masing ditimbang 0,1 g dimasukkan ke dalam conical tube, ditambah 100 µL media Alpha MEM disimpan selama 24 jam dalam lemari es. Media Alpha MEM hasil perendaman dikumpulkan dan disterilisasi menggunakan

filter Milipore ukuran 0,2 µm dalam laminar flow. Hasil penyaringan ditampung dalam conical tube steril untuk digunakan sebagai sampel dalam uji sitotoksitas setelah dilakukan pengenceran seri sampai dengan 5%.

Persiapan Sel Fibroblas Gingiva Manusia

Proses splitting merupakan proses peremajaan dan memperbanyak sel yang diambil dari sel primer fibroblas gingiva manusia. Proses splitting dilakukan di Stem Cell Research Development Center Universitas Airlangga, Surabaya. Sel fibroblas monolayer dengan kondisi 80-90% dimasukkan ke dalam inkubator CO₂. Selanjutnya media Alpha MEM yang ada di dalam petri dish dibuang. Sel fibroblas dicuci dengan PBS sebanyak 1 kali, ditambahkan trypsin EDTA pada petri dish, dimasukkan inkubator CO₂ selama 5 menit dengan suhu 37°C. Setelah sel fibroblas membulat dan terpisah, ditambahkan media Alpha MEM, dilakukan resuspensi menggunakan pipet aid, dimasukkan dalam conical tube ukuran 15 mL dan di centrifuge dengan kecepatan 1600 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, sel fibroblas dalam media kultur Alpha MEM dilakukan resuspensi menggunakan pipet aid, dimasukkan ke dalam petri dish dan disimpan di dalam inkubator CO₂ dengan suhu 37°C selama 24 jam. Sel fibroblas gingiva manusia di dalam petri dish diamati menggunakan mikroskop inferted, kemudian disimpan dalam inkubator CO₂.

Tahap pengujian sitotoksitas

Microplate 96 well disiapkan. Well pada kolom ke-1 dan kolom ke-8 microplate diisi media kultur Alpha MEM menggunakan mikropipet sebanyak 150 µL sebagai kontrol media, dianggap persentase sel hidup 100%. Well pada kolom ke-2 hingga ke-7 yang diisi 100 µL sel fibroblas gingiva manusia (kepadatan sel 3-5 x 10³) dalam media kultur Alpha MEM. Well pada kolom 2 dan 7 merupakan kontrol sel, dianggap persentase sel hidup 0%. Well pada kolom 3 hingga 6 ditambahkan 150 µL cairan sampel sesuai kelompok. Microplate diinkubasi dalam inkubator CO₂ dengan suhu 37°C selama 24

jam.

Serbuk MTT dilarutkan dalam Phosphate Buffered Saline 10% sebanyak 5 mg/mL. Larutan MTT ditambahkan sebanyak 10 µL pada setiap well, kemudian dimasukkan dalam inkubator CO₂, suhu 37°C selama 4 jam. Seluruh media dan bahan uji dibuang, kemudian ditambahkan 50 µL Dimethyl Sulfoxide (DMSO) setiap well. Nilai optical density formazan dihitung menggunakan ELISA reader dengan panjang gelombang 595 nm. Makin pekat warnanya, makin tinggi nilai absorbansinya maka semakin banyak jumlah sel fibroblas gingiva manusia yang hidup.

Persentase sel hidup dihitung dengan rumus:
% Sel Hidup = Persentase jumlah kehidupan sel setelah perlakuan

OD Perlakuan = Nilai OD (optical density) formazan setiap sampel setelah pengujian

OD Media = Nilai OD (optical density) formazan pada rerata setiap kontrol media

OD Kontrol sel = Nilai OD (optical density) formazan pada rerata kontrol sel

HASIL

Hasil pengamatan dan perhitungan mengenai uji sitotoksitas kombinasi seng oksida dan ekstrak Curcuma longa terhadap sel fibroblas gingiva manusia, dapat dilihat pada tabel 1

Tabel 1. Besar sampel, rerata, standar deviasi dan persentase sel hidup

Kelompok	n	Rerata		
		OD	SD	Sel Hidup
A	4	0,315	0,012111	64,819
B	4	0,292	0,005099	59,452
C	4	0,263	0,004856	52,859
D	4	0,296	0,007937	60,502
Kontrol Sel	4	0,465	0,004573	100,00
Kontrol media	4	0,037	0,000957	0,00

Keterangan:

A = Kombinasi seng oksida dan ekstrak Curcuma longa 1:1

B = Kombinasi seng oksida dan ekstrak Curcuma longa 2:1

C = Ekstrak Curcuma longa

D = Seng oksida

n = Besar sampel

OD = Optical density

SD = Standar deviasi

Uji normalitas distribusi dilakukan menggunakan Kolmogrov-Smirnov didapatkan nilai 0,964 ($p > 0,05$), dilanjutkan dengan uji homogenitas menggunakan Levene test didapatkan hasil 0,684 ($p > 0,05$). Data yang berdistribusi normal dan homogen, merupakan syarat untuk uji parametrik oneway Anova. Uji Anova didapatkan signifikansi 0,000 ($p < 0,05$), terdapat perbedaan signifikan pada kelompok sampel. Untuk mengetahui kelompok yang berbeda, maka dilanjutkan dengan uji Least Significant Difference (LSD), yang dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Uji LSD terhadap sel fibroblas gingiva manusia

Kelompok	A	B	C	D
A	-	0,100	0,000*	0,638
B		-	0,000*	0,738
C				0,001*
D				-

Keterangan:

* = Perbedaan signifikan

A = Kombinasi seng oksida dan ekstrak Curcuma longa 1:1

B = Kombinasi seng oksida dan ekstrak Curcuma longa 2:1

C = Ekstrak Curcuma longa

D = Seng oksida

PEMBAHASAN

Setiap bahan yang digunakan dalam bidang kedokteran gigi harus memenuhi syarat biokompatibilitas. Salah satu syarat biokompatibilitas adalah bahan yang akan digunakan bersifat tidak toksik terhadap jaringan tubuh. Uji sitotoksitas adalah tahap awal dari uji biokompatibilitas. Uji sitotoksitas dilakukan untuk menentukan

apakah suatu material mengandung bahan yang berbahaya secara biologis terhadap jaringan tubuh, sebelum bahan tersebut dapat digunakan.⁹ Parameter yang digunakan pada penelitian ini adalah parameter Inhibitory Concentration 50% (IC50). Parameter IC50 merupakan konsentrasi suatu bahan yang mampu menghambat proliferasi sel hingga 50% dari populasi.¹⁰ Persentase sel fibroblas gingiva manusia yang masih hidup setelah diberi perlakuan dapat menunjukkan tingkat toksisitas dari setiap kelompok sampel. Jika bahan yang dipaparkan tidak bersifat toksik, maka dehidrogenase akan aktif sehingga akan terproduksi kristal formazan.¹¹ Apabila kristal formazan diproduksi, maka sel fibroblas akan terwarnai menjadi biru keunguan. Sel yang hidup akan terwarnai, sedangkan sel dengan kerusakan membran tidak akan terwarnai.¹²

Hasil uji sitotoksitas (Tabel 1) dapat dilihat bahwa sel hidup fibroblas gingiva manusia dengan nilai lebih dari 50% terdapat pada semua kelompok. Hal ini menunjukkan bahwa seng oksida, ekstrak Curcuma longa dan kombinasinya tidak bersifat sitotoksik terhadap sel fibroblas gingiva manusia. Hasil analisis data oneway Anova menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan pada kelompok sampel. Hal tersebut menunjukkan ada perbedaan sitotoksitas diantara kelompok. Perbedaan hasil sitotoksitas tersebut dipengaruhi oleh kandungan yang terdapat dalam masing-masing bahan. Hasil analisis data penelitian dengan uji LSD (tabel 2) dapat diketahui bahwa jumlah sel fibroblas gingiva manusia yang hidup pada kelompok A (64,819%) tidak berbeda signifikan dengan kelompok B (59,452%), dan kelompok D (60,502). Hal ini kemungkinan disebabkan adanya kandungan seng oksida pada kelompok tersebut, meskipun ada penelitian yang menyatakan seng oksida dalam keadaan tertentu berpotensi toksik⁵ Seng oksida memiliki peranan penting dalam mengendalikan apoptosis, yang membuat sel fibroblas dapat bertahan hidup lebih lama. Terdapat dua fungsi antiapoptotik Zn²⁺ dapat mencegah terganggunya proses oksidasi dan kerusakan yang disebabkan

oleh toksin dengan bertindak langsung pada regulator apoptosis terutama pada enzim yang termasuk famili caspase. Mengurangi kerusakan yang disebabkan oleh toksin dengan mencegah terjadinya proses apoptosis melalui penghambatan aktivitas induksi caspase yang dipicu saat konsentrasi Zn²⁺ intraselular menurun.¹³

Kelompok A, B, D berbeda signifikan dengan kelompok C. Persentase sel hidup pada kelompok C, lebih rendah, hanya sebesar 52,859% atau dapat diartikan mendekati sitotoksik dibandingkan dengan kelompok lain. Hasil uji laboratoris di Unit Layanan Pengujian Kampus B Universitas Airlangga menyatakan bahwa, ekstrak Curcuma longa yang digunakan dalam percobaan ini mengandung 36,876% kurkuminoid, yang terdiri dari kurkumin, desmetoksi-kurkumin, dan bis-desmetoksi-kurkumin. Kandungan senyawa aktif kurkuminoid dapat mempercepat proses inflamasi, sebagai anti oksidan yang dapat menghambat ROS (Reactive Oxygen Species) dan seharusnya tidak menyebabkan kematian sel pada keadaan sel normal.¹⁴ Efek ekstrak Curcuma longa Linn sampai dengan dosis 200 mg/kgBB selama 31 hari tidak menyebabkan toksik pada hati tikus Wistar.¹⁵ Persentase sel hidup fibroblas gingiva manusia yang rendah pada kelompok C, kemungkinan karena faktor dosis yang diberikan pada sel primer fibroblas gingiva manusia terlalu besar. Mekanisme kurkumin menginduksi terjadinya apoptosis sangat bervariasi, dan diduga melalui penghambatan beberapa cell-signaling pathway. Penelitian terdahulu juga melaporkan bahwa kurkumin menyebabkan kematian sel sebanyak separuh dari jumlah sel yang diinduksinya, meskipun mekanismenya belum jelas.¹⁶ Kematian sel dapat dipengaruhi oleh sifat dari suatu bahan kemurnian, struktur kristal, komposisi kimia, media yang digunakan dan kelarutan atau kemampuan bahan melepaskan suatu ion.¹⁷

SIMPULAN

Hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan kombinasi seng oksida dan

ekstrak *Curcuma longa* 1:1 dan 2:1 bersifat tidak toksik terhadap sel fibroblas gingiva manusia pada IC50.

DAFTAR PUSTAKA

1. Klokkevold PR, Takei H, Carranza FA. General principles of periodontal surgery. In: Newman M, Takei H, Klokkevold P, Carranza F, editors. *Carranza's Clinical Periodontology*. 12th ed. St. Louis: Elsevier Saunders; 2015:569–72.
2. Meizarini A, Siswandono, Yuliati A. The role of TLR2, NF- κ B, TNF α as an inflammation markers of wound dressing combination of zinc oxide with turmeric liquid extract. *J Int Dent Med Res* 2016; 9 173 2016;177.
3. Indrastie N, Yogyarti S, Meizarini A. Daya hambat campuran Zinc oxide dengan ekstrak *Curcuma longa* Linn terhadap *Streptococcus mutans*. *Dent J (Maj Ked Gigi)* 2015;6:58–54.
4. Jessica NF, Yogyarti S, Meizarini A. Daya hambat campuran Zinc oxide dengan ekstrak *Curcuma longa* Linn terhadap pertumbuhan bakteri *phorphyromonas gingivalis*. *Dent J (Maj Ked Gigi)* 2016;7:61–5.
5. Xia T, Kovochich M, Liong M, Mädler L, Gilbert B, Shi H, et al. Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS Nano* 2008;2:2121–34.
6. NMandrolis PS, Bhat K. An in-vitro evaluation of antibacterial activity of curcumin against common endodontic bacteria. *J Appl Pharm Sci* 2013;3:16.
7. Zhang Q, Shi S, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Shi S, et al. Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *J Immunol* 2009;183:7787–98.
8. Mueller H, Kassack MU, Wiese M. Comparison of the usefulness of the MTT, ATP, and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines. *J Biomol Screen* 2004;9:506–15.
9. Swetha B, Mathew S, Murthy B V, Shruthi N, Bhandi SH. Determination of biocompatibility: A review. *Int Dent Med J Adv Res* 2015;1:1–6.
10. Nevozhay D. Cheburator software for automatically calculating drug inhibitory concentrations from in vitro screening assays. *PLoS One* 2014;9:e106186.
11. Ariani MD, Yuliati A, Adiarto T. Toxicity testing of chitosan from tiger prawn shell waste on cell culture. *Dent J (Majalah Kedokt Gigi)* 2009;42:15–20.
12. Schmalz G, Arenholt-Bindslev D. *Biocompatibility of Dental Materials*. Vol 1. Springer; 2009.
13. John E, Laskow TC, Buchser WJ, Pitt BR, Basse PH, Butterfield LH, et al. Zinc in innate and adaptive tumor immunity. *J Transl Med* 2010;8:118.
14. Syng-ai C, Kumari AL, Khar A. Effect of curcumin on normal and tumor cells: role of glutathione and bcl-2. *Mol Cancer Ther* 2004;3:1101–8.
15. Maharani HW, Saiful MS. Subchronic effect of tumeric rhizome (*Curcuma longa* Linn) on rat liver. *Media Farm* 2015;12:213–22.
16. Hutomo S, Susilowati H, Suryanto YI, Kurniawan C. Perubahan morfologi sel HeLa setelah paparan ekstrak etanolik *Curcuma longa*. *Maj Kedokt Gigi Indones* 2017;2:1–5.
17. Djurišić AB, Leung YH, Ng AMC, Xu XY, Lee PKH, Degger N, et al. Toxicity of metal oxide nanoparticles: mechanisms, characterization, and avoiding experimental artefacts. *Small* 2015;11:26–44.