

BUKTI KORESPONDENSI

ARTIKEL JURNAL NASIONAL TERAKREDITASI

Judul Artikel : Judul: Cytotoxicity test of apple cider vinegar as a root canal irrigant against fibroblast cells

Jurnal : Odonto Dental journal

Penulis : Sylvia Bunga Lesmana, Rudy Djuanda, Vinna Kurniawati Sugiaman

No	Perihal	Tanggal
1.	Register pada Odonto dental Journal	Agustus 2021
2.	Bukti konfirmasi submit artikel dan artikel yang disubmit	31 Agustus 2021
3.	Bukti melakukan review yang pertama	13 April 2022
4.	Bukti konfirmasi submit revisi pertama yang telah direvisi	13 April 2022
5.	Bukti melakukan review yang kedua	09 Juni 2022
6.	Bukti konfirmasi submit artikel yang telah revisi kedua	19 Juni 2022
7.	Bukti konfirmasi artikel diterima	26 Oktober 2022
8.	Bukti Galery Proof Manuscript	Desember 2022
9.	Bukti Publikasi Online Artikel	Desember 2022

Register pada Odonto dental Journal (Agustus 2021)

Bukti konfirmasi submit artikel dan artikel yang disubmit (31 Agustus 2021)

The screenshot shows the submission details for article #17460. The page title is "Odonto : Dental Journal". The navigation menu includes HOME, ABOUT, USER HOME, SEARCH, CURRENT, ARCHIVES, and ANNOUNCEMENTS. The breadcrumb trail is "Home > User > Author > Submissions > #17460 > Summary". The article title is "#17460 Summary". The submission details are as follows:

Submission	
Authors	Sylvia Bunga Lesmana, Rudy Djuanda, Vinna Kurniawati Sugiaman
Title	Cytotoxicity test of apple cider vinegar as a root canal irrigant against fibroblast cells
Original file	17460-28416-1-5M.DOCX 2021-08-31
Supp. files	None
Submitter	Vinna Kurniawati Sugiaman
Date submitted	August 31, 2021 - 09:16 AM
Section	Original Article
Editor	Muhammad Firdausy
Abstract Views	1191

CYTOTOXICITY TEST OF APPLE CIDER VINEGAR AS A ROOT CANAL IRRIGANT AGAINST FIBROBLAST CELLS

1 Faculty of Dentistry, Universitas Kristen Maranatha, Bandung, 40164, Indonesia

2 Department of Conservative Dentistry, Faculty of Dentistry, Universitas Kristen Maranatha Bandung, 40164, Indonesia

3 Department of Oral Biology, Faculty of Dentistry, Universitas Kristen Maranatha, Bandung, 40164, Indonesia

*Korespondensi: vinnakurniawati@yahoo.co.id

ABSTRACT

Introduction: Apple cider vinegar potentially can be used as an alternative to irrigation solutions because of its antibacterial compounds that can inhibit *Enterococcus faecalis*, a pioneer bacteria that cause root canal treatment failure. One of the ideal irrigation solution requirements is that it isn't toxic to oral cavity tissues, so it's necessary to run a cytotoxicity test on apple vinegar solution. Cytotoxicity test is the initial part of the evaluation of a dental material before it can be used by humans. Cytotoxicity test was performed on fibroblast cells because the irrigation solution can contact with fibroblast, which are the main cells in the periodontal ligament around the apical.

Aim: The purpose of this study was to determine the in vitro cytotoxicity effect of ACV on fibroblast cells.

Method: Apple vinegar with concentrations of 0.31%, 0.63%, 1.25%, 2.5%, and 5% was tested using the MTS assay method.

Result: The results showed that there was a cytotoxicity effect of apple vinegar solution as a root canal irrigation agent against fibroblasts cell. Apple cider vinegar with concentrations of 1.25%, 2.5%, and 5% are potentially toxic because the percentage of cell viability is less than 70%.

Conclusion: There is a cytotoxicity effect of apple cider vinegar solution as a root canal irrigant on fibroblast cells.

Keywords: *apple cider vinegar, cytotoxicity test, fibroblast cells, irrigation*

PENDAHULUAN

Irigasi saluran akar adalah salah satu kunci dalam keberhasilan perawatan endodontik. Zat irigasi saluran akar dibuat dari bahan kimia sintetis dan juga bahan alami.¹ Larutan irigasi yang paling umum adalah NaOCl atau sodium hipoklorit. NaOCl dapat membersihkan debris dan material organik pada saluran akar, juga dapat melarutkan jaringan nekrotik. Larutan irigasi dapat berkontak dengan pulpa dan jaringan periapikal. Pulpa merupakan jaringan yang mengisi ruang pulpa dan saluran akar yang terdiri dari komponen sel, termasuk sel fibroblas. Foramen apikal menghubungkan pulpa gigi dan jaringan periapikal yang terdiri dari sementum, tulang alveolar, dan ligamen periodontal.² Sel fibroblas merupakan sel utama pada ligamen periodontal, sehingga larutan irigasi yang keluar dari foramen apikal akan menimbulkan efek sitotoksik pada sel fibroblas dan komplikasi pada jaringan periapikal.^{3,4}

Efek sitotoksik bahan irigasi dapat menyebabkan kerusakan dan iritasi yang menyebabkan degenerasi jaringan periapikal dan keterlambatan penyembuhan luka.³ Penelitian yang dilakukan oleh Karkehabadi tentang uji sitotoksisitas larutan irigasi NaOCl pada sel fibroblas ligamen periodontal manusia (HPdLfc) ditemukan bahwa NaOCl bersifat toksik pada konsentrasi 0,025%, sedangkan pada konsentrasi 0,4% menyebabkan

kematian semua sel.⁵ Masuknya NaOCl ke dalam jaringan periapikal dapat terjadi karena foramen apikal yang lebar, kurangnya penyempitan atau konstriksi apikal, serta tekanan yang tinggi saat irigasi saluran akar.⁶

NaOCl dengan konsentrasi 5,25% dapat menyebabkan kerusakan pada jaringan periapikal karena dapat menyebabkan rasa sakit, pendarahan periapikal, dan pembengkakan.⁷ Beberapa bahan alami diketahui memiliki potensi antibakteri, sehingga dapat digunakan sebagai alternatif untuk menghindari efek sitotoksik bahan irigasi kimia, salah satunya yaitu larutan cuka apel. Cuka apel memiliki kandungan asam organik, yaitu asam asetat dan asam amino, flavonoid, polifenol serta kaya vitamin dan mineral. Kandungan asam asetat yang dimiliki cuka apel bertindak sebagai antimikroba yang dapat menyebabkan hilangnya integritas sel.⁸

Pada penelitian sebelumnya telah didapatkan bahwa cuka apel berpotensi digunakan sebagai alternatif larutan irigasi karena mengandung senyawa antibakteri yang mampu menghambat *Enterococcus faecalis* yang merupakan bakteri pionir penyebab kegagalan perawatan saluran akar.⁹ Salah satu syarat larutan irigasi yang ideal adalah tidak toksik terhadap jaringan di rongga mulut, maka peneliti bermaksud melakukan uji sitotoksisitas larutan cuka apel terhadap sel fibroblas agar data yang didapatkan dari penelitian ini diharapkan dapat dimanfaatkan sebagai dasar penggunaan larutan cuka apel sebagai bahan alternatif untuk irigasi saluran akar.¹⁰

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek sitotoksisitas larutan cuka apel terhadap sel fibroblas secara *in vitro*.

METODE PENELITIAN

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan penelitian *post-test only control group design*. Penelitian dilakukan di Aretha Medika Utama *Biomolecular and Biomedical Research Center*, Bandung.

Larutan cuka apel menggunakan merk B dan sel fibroblas 3T3 BALB/C didapatkan dari Aretha Medika Utama Laboratorium *Biomolecular and Biomedical Research Center*.

Prosedur Kerja *Thawing* Sel 3T3 BALB/C adalah sebagai berikut: Sel 3T3 BALB/C diambil dari tangki nitrogen cair (-196°C), kemudian dicairkan di dalam *ultrasonic cleanser* dengan suhu 37°C selama 2 menit hingga mencair. Sel 3T3 BALB/C dimasukkan ke dalam *centrifuge tube* 15ml yang berisi medium kultur 4 ml. Medium kultur sel fibroblas 3T3 BALB/C dibuat dengan mencampurkan 10% *bovine serum*, 1% ABAM, medium basal MEM, 1% Amphotericin B, 1% Nanomycopolitine, dan 0,01% Gentamicin hingga 100% dari total volume di dalam tube 50 mL. Sel 3T3 BALB/C disentrifugasi pada kecepatan 1600 rpm selama 5 menit. *Supernatan* dibuang dan *pellet* sel 3T3 BALB/C diresuspensikan dengan 5 ml medium kultur. *Suspensi* sel 3T3 BALB/C dimasukkan ke dalam *flask* T25. Sel 3T3 BALB/C diinkubasi di dalam *incubator* pada kondisi suhu 37°C dan 5% CO₂. Sel yang telah tumbuh pada *flask* T25 diamati di bawah mikroskop inverted hingga konfluen sekitar 70-80%.

Subkultur Sel 3T3 BALB/C adalah sebagai berikut: Sel 3T3 BALB/C yang telah tumbuh pada *flask* T25 diamati di bawah mikroskop *inverted* hingga tingkat *confluent* sekitar 70-80%. Medium kultur pada *flask* T25 dibuang, kemudian dibilas dengan PBS 1 kali sebanyak 2 ml untuk menghilangkan sisa medium. Sel yang menempel dilepaskan dengan bantuan 2 ml 0,25% Trypsin-EDTA, kemudian diinkubasi selama 3 menit pada suhu 37°C. Pastikan sel sudah benar-benar terlepas dari dasar *flask* dengan melakukan pengecekan

menggunakan mikroskop *inverted*. Setelah semua sel telah terlepas, tambahkan 4 ml medium pertumbuhan untuk menghentikan kerja tripsin. Sel kemudian dimasukkan ke dalam *centrifuge tube* 15 ml, dan disentrifugasi dengan kecepatan 1600 rpm selama 5 menit. *Supernatan* dibuang dan *pellet* diresuspensi dengan 2 ml medium kultur. Suspensi sel dibagi ke dalam 2 buah *flask* T25 kemudian sel diinkubasi di dalam inkubator CO₂ 5% dengan suhu 37°C. Selama perawatan sel, medium pertumbuhan diganti atau ditambah setiap 2-3 hari sekali.

Preparasi sampel dilakukan untuk memperoleh konsentrasi akhir dari cuka apel yang digunakan dalam uji sitotoksitas. Perbandingan antara jumlah medium sel dengan konsentrasi sampel yang digunakan dalam uji sitotoksitas adalah 10:1, sehingga dibutuhkan larutan cuka apel dengan konsentrasi 0,312%, 0,625%, 1,25%, 2,5%, dan 5%. Prosedur preparasi sampel tersebut adalah sebagai berikut: (1) Pembuatan Larutan Stok: Sebanyak 1 ml larutan cuka apel dilarutkan dalam 9 ml DMSO 10%, menghasilkan larutan stok cuka apel sebanyak 10 ml dengan konsentrasi 10%; (2) Pembuatan Seri *Working Solution* (WS): CA 5% : 500 µL larutan stok + 500 µL DMSO 10% (Larutan A), CA 2.5% : 500 µL larutan A + 500 µL DMSO 10% (Larutan B), CA 1.25% : 500 µL larutan B + 500 µL DMSO 10% (Larutan C), CA 0.625% : 500 µL larutan C + 500 µL DMSO 10% (Larutan D), dan CA 0.313% : 500 µL larutan D + 500 µL DMSO 10% (Larutan E); (3) Filtrasi sampel: *Working solution* difilter dengan menggunakan *syringe filter tissue culture* pori 0,22 µm, sehingga diperoleh sampel yang steril.

Uji Sitotoksitas Larutan Cuka Apel dilakukan sebagai berikut: Sel dipanen dan dihitung menggunakan *hemocytometer*. Sel ditanam dengan kepadatan 5000 (5x10³) sel/*well* dalam 96-*wellplate*. Sel diinkubasi selama 24 jam di dalam inkubator CO₂ 5% dengan suhu 37°C. Setelah diinkubasi selama 24 jam, medium lama dibuang kemudian digantikan dengan medium kultur baru dengan konsentrasi sampel berbeda pada setiap *well*, kemudian diinkubasikan di dalam inkubator 5% CO₂ dengan suhu 37°C. Setelah perlakuan selama 24 jam, MTS *reagent* ditambahkan sebanyak 20µl pada masing-masing *well*, kemudian diinkubasi selama 20 menit pada inkubator dengan suhu 37°C dan 5% CO₂. Absorbansi diukur dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 490 nm.

Cara menghitung persentase viabilitas dan IC₅₀ adalah sebagai berikut:

$$\%Viabilitas = \frac{Absorbansi\ sampel}{Absorbansi\ kontrol} \times 100\%$$

$$IC_{50} = \frac{Absorbansi\ kontrol - Absorbansi\ sampel}{Absorbansi\ kontrol} \times 100\%$$

Pengujian analisis data dilakukan menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* untuk melihat data terdistribusi normal dan uji homogenitas dengan *Levene Statistic*, dimana sebelumnya hasil pengukuran ditabulasi terlebih dahulu menurut kelompok masing-masing, setelah itu dilakukan uji *Post Hoc Dunnett T3*.

HASIL PENELITIAN

Uji sitotoksitas cuka apel dilakukan dengan uji MTS pada sel fibroblas 3T3 BALB/C. Sel fibroblas 3T3 BALB/C diberi perlakuan sampel cuka apel sebanyak lima konsentrasi, yaitu 5%, 2,5%, 1,25%, 0,63%, dan 0,31%, kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometri yang dibaca pada panjang gelombang 490nm. Hasil dari uji sitotoksitas dapat dilihat berdasarkan jumlah sel yang hidup, persentase viabilitas sel, dan persentase inhibisi. Data hasil uji sitotoksitas cuka apel terhadap sel fibroblas 3T3 BALB/C dapat dilihat pada tabel 1.

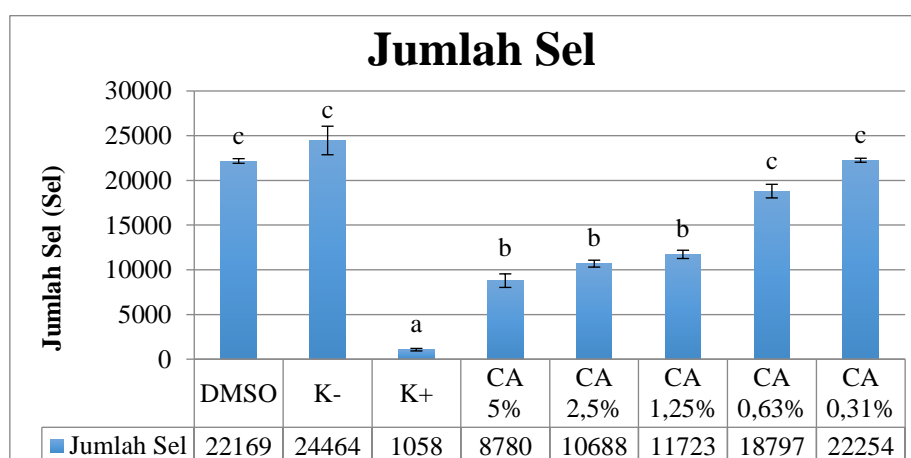
Tabel 1. Hasil Uji Sitotoksitas Larutan Cuka Apel pada Sel 3T3 BALB/C

Sampel	Jumlah Sel	Viabilitas Sel (%)	Inhibisi (%)
K DMSO	22169 ± 262 ^c	90.62 ± 1.07 ^c	9.38 ± 1.07 ^c
K-	24464 ± 1598 ^c	100.00 ± 6.53 ^c	0.00 ± 6.53 ^c
K+	1058 ± 143 ^a	4.33 ± 0.58 ^a	95.67 ± 0.58 ^a
CA 5%	8780 ± 757 ^b	35.89 ± 3.10 ^b	64.11 ± 3.10 ^b
CA 2,5%	10688 ± 387 ^b	43.69 ± 1.58 ^b	56.31 ± 1.58 ^b
CA 1,25%	11723 ± 464 ^b	47.92 ± 1.90 ^b	52.08 ± 1.90 ^b
CA 0,63%	18797 ± 763 ^c	76.83 ± 3.12 ^c	23.17 ± 3.12 ^c
CA 0,31%	22254 ± 224 ^c	90.96 ± 0.91 ^c	9.04 ± 0.91 ^c

Keterangan: Data disajikan dalam rata-rata ±SD. Tanda superskrip yang berbeda (a,b,c) menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) berdasarkan uji post hoc Dunnet T3.

Hasil pada tabel 1 menunjukkan bahwa semakin banyak jumlah sel yang bertahan hidup setelah diberi perlakuan, maka semakin besar persentase viabilitas sel dan semakin rendah persentase inhibisinya. Persentase viabilitas sel menunjukkan jumlah rata-rata persen sel yang hidup, sedangkan persentase inhibisi sel merupakan efek penghambatan cuka apel terhadap pertumbuhan sel. Persentase viabilitas sel dapat diperoleh dari hasil pengurangan persentase sel hidup sebelum diberi perlakuan dengan persentase inhibisi sel.

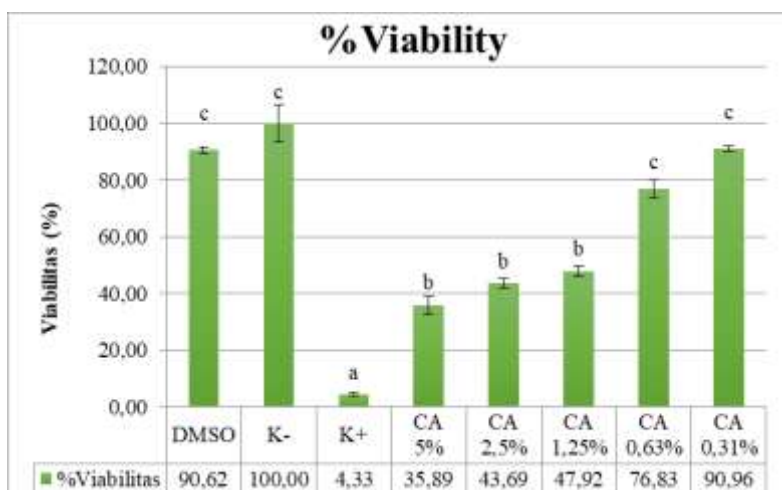
Semakin rendah persentase viabilitas sel, maka sitotoksitas suatu material semakin tinggi. Cuka apel dengan konsentrasi 5% memiliki persentase viabilitas yang terendah dan cuka apel dengan konsentrasi 0,31% memiliki persentase viabilitas yang tertinggi. Hal ini menunjukkan bahwa cuka apel 5% lebih sitotoksik dibandingkan dengan cuka apel dengan konsentrasi lainnya dan cuka apel yang paling rendah sitotoksiknya adalah cuka apel dengan konsentrasi 0,31%.



Grafik 1. Jumlah Sel 3T3 BALB/C setelah Diberi Larutan Cuka Apel pada Berbagai Konsentrasi

Grafik 1 menunjukkan bahwa semakin rendah konsentrasi cuka apel, maka semakin banyak jumlah sel yang dapat bertahan hidup. Jumlah sel hidup terbanyak terdapat pada konsentrasi cuka apel 0,31%. Jumlah sel yang bertahan hidup dapat diketahui dari pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometri yang dibaca pada panjang gelombang 490 nm. Semakin pekat warna yang terlihat, maka semakin tinggi nilai absorbansi dan semakin banyak jumlah sel fibroblas yang hidup. Jumlah sel hidup dapat dihitung menggunakan rumus:

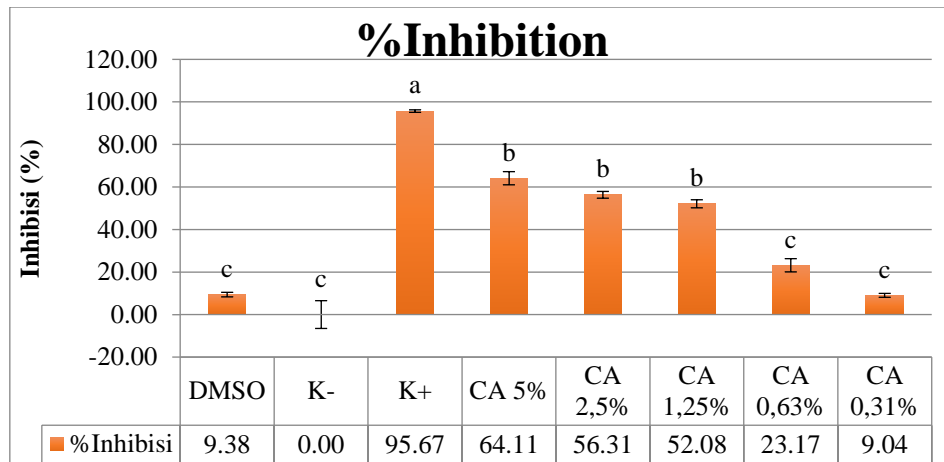
$$\text{Sel hidup} = 5000 \text{ sel} \times \text{nilai viabilitas (\%)}$$



Grafik 2. Viabilitas Sel 3T3 BALB/C setelah Diberi Larutan Cuka Apel pada Berbagai Konsentrasi

Viabilitas sel adalah kemungkinan sel untuk dapat bertahan hidup setelah terpapar suatu bahan. Grafik 2 menunjukkan perbandingan persentase viabilitas sel fibroblas setelah diberi perlakuan cuka apel dengan konsentrasi yang berbeda-beda. Sel fibroblas yang diberi perlakuan cuka apel 0,31% menunjukkan viabilitas sel yang tertinggi, sedangkan yang terendah adalah cuka apel 5%. Persentase viabilitas sel semakin meningkat dengan konsentrasi cuka apel yang semakin rendah.

Berdasarkan ISO 10993-5: *Biological Evaluation of Medical Device* tentang uji sitotoksitas secara *in vitro*, suatu senyawa dianggap toksik jika memiliki viabilitas sel kurang dari 70%. Semakin rendah persentase viabilitas sel, maka potensi sitotoksitas senyawa tersebut semakin tinggi. Hasil pada grafik 2 menunjukkan bahwa cuka apel dengan konsentrasi 0,63% dan 0,31% tidak toksik terhadap sel fibroblas. Cuka apel dengan konsentrasi 5%, 2,5%, dan 1,25% memiliki sifat toksik terhadap sel fibroblas karena persentase viabilitas sel pada konsentrasi-konsentrasi tersebut kurang dari 70%.



Grafik 3. Inhibisi Sel 3T3 BALB/C setelah Diberi Larutan Cuka Apel pada Berbagai Konsentrasi

Grafik 3 menunjukkan bahwa semakin rendah konsentrasi cuka apel, maka semakin rendah persentase inhibisinya. Semakin rendah persentase inhibisi sel, maka sel yang bertahan hidup akan semakin banyak dan persentase viabilitas sel semakin tinggi. Selain perhitungan jumlah sel hidup, persentase viabilitas sel, dan persentase inhibisi sel, dilakukan perhitungan IC_{50} yang merupakan konsentrasi penghambatan setengah maksimal.

IC_{50} (*Half-Maximal Inhibitory Concentration*) didefinisikan sebagai konsentrasi yang diperlukan untuk menghambat proliferasi sel sebanyak 50%.⁷⁸ IC_{50} menunjukkan nilai persentase inhibisi sebesar 50%, maka pada konsentrasi tersebut, persentase viabilitas sel adalah 50%. Berdasarkan hasil analisis regresi probit didapatkan estimasi nilai IC_{50} , yaitu 3,096%, sehingga pada konsentrasi tersebut, terjadi penghambatan proliferasi sel atau inhibisi sebesar 50% dan nilai persentase viabilitas sel adalah 50%.

Data-data yang diperoleh kemudian ditabulasi dan dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas. Uji normalitas dilakukan untuk mengetahui apakah data yang diperoleh terdistribusi normal. Berdasarkan uji normalitas *Kolmogorov-smirnov* yang dapat dilihat pada lampiran 3, didapatkan nilai $p > 0,05$, sehingga data terdistribusi normal. Hasil uji homogenitas dengan *Levene statistic* pada lampiran 4 menunjukkan nilai signifikansi 0,003, sehingga dapat dinyatakan bahwa varian antar kelompok tidak homogen karena $p < 0,05$.

Data hasil penelitian terdistribusi normal, tetapi tidak homogen, maka dilakukan analisa data dengan uji *Post Hoc* menggunakan metode *Dunnnett T3* untuk mengetahui perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan. Data hasil uji *Post Hoc Dunnnett T3* dapat dilihat pada lampiran 5. Perbedaan nilai rata-rata yang disajikan dalam rata-rata \pm SD dapat dilihat pada tabel 1. Tanda superskrip yang berbeda (a,b,c) menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) berdasarkan uji *Post Hoc Dunnnett T3*.

DISKUSI

Hasil uji sitotoksitas larutan cuka apel terhadap sel fibroblas menunjukkan bahwa cuka apel dengan konsentrasi 0,31%, 0,63%, 1,25%, 2,5%, dan 5% memiliki efek sitotoksitas terhadap sel fibroblas. Cuka apel dengan konsentrasi 1,25%, 2,5%, dan 5% berpotensi toksik karena persentase viabilitas sel kurang dari 70%. Persentase viabilitas sel mengalami penurunan dengan meningkatnya konsentrasi cuka apel. Hal ini terjadi karena prinsip uji MTS didasarkan pada konversi garam tetrazolium menjadi formazan berwarna oleh aktivitas mitokondria sel hidup. Jumlah formazan yang dihasilkan bergantung pada jumlah sel yang viabel dan absorbansi yang berbanding lurus dengan jumlah sel viabel dapat diukur dengan spektrofotometri pada 490 nm.^{xi}

Cuka apel memiliki efek sitotoksitas yang cukup tinggi. Penelitian Gopal, dkk. (2015) menyatakan bahwa cuka apel memiliki potensi toksisitas bahkan pada konsentrasi 0,7%.^{xii} Faktor yang berperan dalam sitotoksitas suatu material antara lain dosis agen sitotoksik, durasi paparan suatu senyawa, dan mekanisme sitotoksitas senyawa.^{xiii} Kematian sel dapat disebabkan karena penipisan kadar ATP dan defek pada membran sel.^{xiv} Uji viabilitas dan sitotoksitas sel didasarkan pada berbagai fungsi sel, seperti permeabilitas membran sel, aktivitas enzim, produksi ATP, produksi ko-enzim, dan aktivitas penyerapan nukleotida.^{xv}

Pada penelitian ini didapatkan bahwa penambahan konsentrasi cuka apel berbanding terbalik dengan jumlah sel yang dapat bertahan hidup, sehingga semakin tinggi konsentrasi cuka apel maka akan lebih banyak sel fibroblas 3T3 BALB/C yang mati. Sel mengalami kerusakan dan kematian karena sudah tidak mampu beradaptasi terhadap rangsang. Rangsangan bahan toksik dapat menyebabkan jejas pada sel fibroblas dengan merusak membran sel, mitokondria, dan mengganggu substrat endogen sel.^{xvi}

Kematian sel fibroblas dapat disebabkan oleh kandungan zat aktif dalam suatu material yang memiliki efek toksik. Kandungan biologi aktif dalam cuka apel yang dapat meningkatkan persentase kematian sel fibroblas 3T3 BALB/C adalah asam organik dan senyawa fenol dan turunannya. Penelitian Zubaidah (2015) menyatakan bahwa cuka apel mengandung 135,38mg/L fenol.^{xvii} Senyawa fenol dan turunannya dapat menyebabkan perubahan permeabilitas sel dengan mendenaturasi protein di membran sel. Perubahan permeabilitas sel mengakibatkan komponen-komponen di dalam sel tidak dapat dipertahankan, sehingga dapat mengakibatkan kematian sel.^{xvi}

Kelompok terbesar dari turunan senyawa fenol pada cuka apel adalah flavonoid.⁹ Flavonoid bersifat prooksidan pada konsentrasi yang tinggi karena dapat memicu pembentukan ROS (*Reactive Oxygen Species*). ROS merupakan salah satu jenis oksigen yang berasal dari radikal bebas yang berperan penting dalam kerusakan sel. ROS diproduksi secara normal dalam respirasi mitokondria tetapi akan didegradasi oleh sistem kekebalan tubuh.^{1,xviii}

Radikal bebas berlebihan yang disebut sebagai stres oksidatif biasanya terlibat dalam kerusakan sel. Adanya radikal bebas menyebabkan reaksi peroksidasi lipid pada membran plasma dan organel. Ikatan antara asam lemak dan radikal bebas yang tidak stabil dapat menyebabkan kerusakan membran yang lebih parah. Radikal bebas juga dapat menyebabkan oksidasi rantai asam amino, pembentukan ikatan kovalen protein, dan oksidasi protein. Hal ini akan menyebabkan kerusakan struktur protein dan meningkatkan degradasi protein proteasom. Selain itu, radikal bebas dapat menyebabkan kerusakan DNA dan rantai DNA yang berikatan silang. Mekanisme ini menyebabkan kematian sel yang terjadi akibat sitotoksitas suatu material.^{1,xix}

Hasil penelitian Hung, dkk (2015) menyatakan bahwa polifenol apel mengandung prosianidin, flavonoid, epikatekin, dan katekin yang secara signifikan menekan sel kanker usus besar.^{xx} Kao, dkk (2015) dalam penelitiannya menyatakan bahwa polifenol yang ada pada cuka apel memiliki efek sitotoksitas pada sel kanker kandung kemih manusia (TSGH-8301) yang terkait dengan apoptosis dan stres oksidatif.^{xxi} Kandungan lain polifenol pada cuka apel adalah tanin. Tanin pada konsentrasi tinggi dapat menyebabkan terjadinya genotoksik. Ikatan antar senyawa polar pada tanin dengan lipoprotein sel dapat menyebabkan terjadinya penimbunan senyawa dan pemecahan lemak, sehingga mengakibatkan permeabilitas sel fibroblas menjadi terganggu dan sel menjadi nekrosis.^{xviii}

Fungsi normal enzim dan mekanisme berbasis protein di dalam sel bekerja pada kisaran pH yang sangat sempit, yaitu sekitar 7,0.^{xxii} Larutan cuka apel memiliki keasaman yang cukup tinggi dengan pH sekitar 2,0-3,0. Hal ini memungkinkan terjadinya kerusakan atau kematian sel akibat komponen asam organik dalam cuka apel. Asam organik yang paling dominan dalam cuka apel adalah asam asetat dan

asam laktat.^{xxiii} Kerusakan sel akibat asam organik dapat terjadi karena pH internal sel (biasanya sekitar 7,6) lebih tinggi daripada pH asam organik di luar sel, maka asam asetat akan berdisosiasi dan mengasamkan sitoplasma, sehingga dapat menyebabkan pembongkaran protein yang diinduksi asam, membran, dan kerusakan DNA.^{xxiv}

Asam asetat dapat menjadi penyebab kerusakan sel. Selain karena tingkat keasamannya, asam asetat dapat menyebabkan stress oksidatif pada sel. Asam asetat masuk ke dalam sel melalui transporter membran, *monocarboxylic transporter* (MCT), kemudian menjadi substrat dari asetil-KoA, dan digunakan dalam siklus asam trikarboksilat (TCA). *Reactive oxygen species* (ROS), seperti radikal superoksida, diproduksi melalui siklus TCA, dan ROS yang dihasilkan kemudian menginduksi apoptosis pada sel. ROS dapat menyebabkan efek buruk pada sel, terutama bila mekanisme pertahanan antioksidan intrinsik berkurang.^{xxv,xxvi}

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa NaOCl sebagai kontrol positif lebih sitotoksik dibandingkan cuka apel. Hal ini terjadi karena NaOCl merupakan larutan dengan pH tinggi yang dapat mengganggu integritas sitoplasma. Larutan natrium hipoklorit dalam fungsinya sebagai larutan irigasi akan melepaskan ion klorin dan ion hidroksil. Ion klorin akan menyebabkan peningkatan pembentukan radikal bebas yang akan meningkatkan ROS (*Reactive Oxygen Species*). Pelepasan ion hidroksil dapat menyebabkan kematian sel melalui dua mekanisme, yaitu dengan meningkatkan ROS secara langsung atau dengan menurunkan ATP.¹

Larutan cuka apel diketahui memiliki banyak manfaat bagi tubuh. Larutan cuka apel juga memiliki kemampuan untuk menghambat bakteri *Enterococcus faecalis*. Namun, penggunaan larutan cuka apel sebagai alternatif bahan irigasi saluran akar masih harus dipertimbangkan dan diuji lebih lanjut karena larutan cuka apel memiliki efek sitotoksik bahkan pada konsentrasi yang rendah.

Cuka apel dengan konsentrasi 5%, 2,5%, dan 1,25% disebut toksik karena berdasarkan ISO 10993-5: *Biological Evaluation of Medical Device* tentang uji sitotoksitas secara *in vitro*, suatu senyawa dianggap toksik jika memiliki viabilitas sel kurang dari 70%. Semakin rendah konsentrasi cuka apel, maka sitotoksitasnya semakin rendah. Hal ini terjadi karena proses pengenceran menyebabkan berkurangnya kandungan bioaktif dalam cuka apel dan mengurangi tingkat keasamannya, sehingga menurunkan potensi kerusakan sel. Untuk penelitian selanjutnya, dapat dilakukan uji sitotoksitas larutan cuka apel dengan menggunakan metode yang berbeda, seperti MTT assay dan metode pewarnaan eksklusi dengan *PrestoBlue*. Juga dapat dilakukan uji sitotoksitas larutan cuka apel terhadap sel lain yang terdapat di rongga mulut, seperti *human periodontal ligament cells* (hPDL), *human periodontal ligament fibroblast cells* (HPDLFc), *human gingival fibroblast cell* (HGF), dan sel lain yang berpotensi terkena larutan irigasi.

KESIMPULAN


Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa terdapat efek sitotoksitas larutan cuka apel sebagai bahan irigasi saluran akar terhadap sel fibroblas.

DAFTAR PUSTAKA

- 1 Mooduto L, Fredline C, Sampoerno G, Goenharto S. *Cytotoxicity of Sodium Hypochlorite, Chlorhexidine and Propolis on Human Periodontal Ligament Fibroblast Cell*. Journal of International Dental and Medical Research. 2019;12(2):476–480
 - 2 Rukmo M. *Perkembangan Metode Penilaian Kesembuhan Penyakit Periapikal Setelah Perawatan Endodontik*. Kongres Ikatan Konservasi Gigi Indonesia (IKORGI) IX dan Seminar Ilmiah Nasional. 2011;9:402-414
 - 3 Yuanita T, Ristyawati D, Samadi K. *Cytotoxicity test of NaOCl and Mangosteen (Garcinia Mangostin L.) peel extract used as an irrigation solution in human periodontal ligament fibroblast cells (HPdLFC)*. Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi). 2018;51(5):133-137
 - 4 Nanci A. *Ten Cate's Oral Histology: development, structure, and function*. 9th ed. Canada:Elsevier Health Sciences. 2017
 - 5 Karkehabadi H, Yousefifakhr H, Zadsirjan S. *Cytotoxicity of endodontic irrigants on human periodontal ligament cells*. Iran Endod J. 2018;13(3):390–394
 - 6 Basrani B, Haapasalo M. *Update on Endodontic Irrigating Solutions*. Endodontic Topics. 2012;27:74-102
 - 7 Garg N, Garg A. *Textbook of Endodontics*. 2nd ed. New Delhi: Jaypee Brothers. 2010
 - 8 Yagnik D, Serafin V, Shah AJ. *Antimicrobial activity of apple cider vinegar against Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Candida albicans; downregulating cytokine and microbial protein expression*. Sci Rep. 2018;8(1):1–12
 - 9 Djuanda R, Helmika VA, Christabella F, Pranata N, Sugiaman VK. *Potensi Herbal Antibakteri Cuka Sari Apel terhadap Enterococcus faecalis sebagai Bahan Irigasi Saluran Akar*. SONDE. 2019;4(2):24–40
 - 10 Hargreaves K, Berman L. *Cohens Pathways of the Pulp*. 6th ed. St.Louis: Mosby. 2011
 - xi Aslantürk ÖS. *In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages*. Intech. 2018;32(July):137–144
 - xii Gopal J, Anthonydhasan V, Muthu M, Gansukh E, Jung S, Chul S, et al. *Authenticating Apple Cider Vinegar's Home Remedy Claims:Antibacterial, Antifungal, Antiviral Properties and Cytotoxicity Aspect*. Nat Prod Res. 2019;33(6):906–910
 - xiii Van Tonder J. *Development of An In Vitro Mechanistic Toxicity Screening Model Using Cultured Hepatocytes*. 2011;29–41
 - xiv Emilda Y, Budipramana E, Kuntari S. *Uji Toksisitas Ekstrak Bawang Putih (Allium sativum) terhadap Kultur Sel Fibroblast (Garlic (Allium Sativum) Extract Toxicity Test on Fibroblast Cell Culture)*. Dent J (Majalah Kedokt Gigi). 2014;47(4):215–219
 - xv Li W, Zhou J, Xu Y. *Study of The in Vitro Cytotoxicity Testing of Medical Devices*. Biomedical reports. 2015;3(5):617-620
 - xvi Harsini H, Febri A. *Pengaruh Variansi Konsentrasi Ekstrak Kulit Batang Jambu Mete terhadap Sitotoksikitas Sel Fibroblas*. Maj Kedokt Gigi Indones. 2017;2(1):6-12
 - xvii E Zubaidah E. *Efek Cuka Apel dan Cuka Salak terhadap Penurunan Glukosa Darah dan Histopatologi Pankreas Tikus Wistar Diabetes*. Jurnal Kedokteran Brawijaya. 2015;28(4):297-301
 - xviii Fitriani F, Soetojo A, Subiwahjudi A, Yuanita T. *Sitotoksitas Ekstrak Kulit Kakao (Theobroma cacao) terhadap Kultur Sel Fibroblas BHK-21*. Conserv Dent J. 2019;9(1):54-65
 - xix Kumar V, Abbas AK, Aster JC. *Robbins Basic Pathology*. 9th ed. Philadelphia: Elsevier. 2015
 - xx Hung CH, Huang CC, Hsu LS, Kao SH, Wang CJ. *Apple polyphenol inhibits colon carcinoma metastasis via disrupting Snail binding to focal adhesion kinase*. J Funct Foods. 2015;12(110):80–91
 - xxi Kao YL, Kuo YM, Lee YR, Yang SF, Chen WR, Lee HJ. *Apple polyphenol induces cell apoptosis, cell cycle arrest at G2/M phase, and mitotic catastrophe in human bladder transitional carcinoma cells*. J Funct Foods. 2015;14:384–394
 - xxii Miller MA, Zachary JF. *Mechanisms and Morphology of Cellular Injury, Adaptation, and Death*. Pathologic basis of veterinary disease. 2017:2-43
 - xxiii Ren M, Wang X, Tian C, Li X, Zhang B, Song X, et al. *Characterization of Organic Acids and Phenolic Compounds of Cereal Vinegars and Fruit Vinegars in China*. J Food Process Preserv. 2016;41(3):1–8
-

- xxiv Halstead FD, Rauf M, Moiemien NS, Bamford A, Wearn CM, Fraise AP, et al. *The Antibacterial Activity of Acetic Acid Against Biofilm-producing Pathogens of Relevance to Burns Patients*. PLoS One. 2015;10(9):1–15
- xxv Terasaki M, Ito H, Kurokawa H, Tamura M, Okabe S, Matsui H, et al. *Acetic Acid Is An Oxidative Stressor in Gastric Cancer Cells*. J Clin Biochem Nutr. 2018;63(1):36–41
- xxvi Tyszka-Czochara M, Paško P, Reczyński W, Szłósarczyk M, Bystrowska B, Opoka W. *Zinc and Propolis Reduces Cytotoxicity and Proliferation in Skin Fibroblast Cell Culture: Total Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Propolis*. Biol Trace Elem Res. 2014;160(1):123–131.

Bukti melakukan review yang pertama (13 April 2022)



DR. drg. Sandy Christiono, Sp.KGA
Dari: odontodentaljournal@unissula.ac.id
Kepada: Sylvia Bunga Lesmana, Vinna Kurniawati Sugiaman

Rab, 13 Apr 2022 jam 09:19 ☆


Assalamuallaikum

*Berdasarkan hasil TURNITIN team ODONTO Dental Journal, terdapat plagiarsm sebesar 26% mohon agar dapat segera di perbaiki Paling lambat 19 April 2022.Artikel yang sudah di Revisi dapat di Upload Ulang sesuai dengan panduan ODONTO Dental Journal berikut

<https://drive.google.com/drive/folders/1ct8uOLwVY0yQ9Wh8MunUfrShT98F180G>

terima kasih

ODONTO Dental Journal
<http://jurnal.unissula.ac.id/index.php/odj>



CYTOTOXICL... .pdf
1.8MB

Bukti konfirmasi submit revisi pertama yang telah direvisi (13 April 2022)



Bukti melakukan review yang kedua (09 Juni 2022)



CYTOTOXICITY TEST OF APPLE CIDER VINEGAR AS A ROOT CANAL IRRIGANT AGAINST FIBROBLAST CELLS

Komentar:

- Hasil penelitian menunjukkan efek sitotoksik rendah (<70%) pada konsentrasi 0.312% dan 0.625%. Hasil penelitian sebelumnya telah menunjukkan nilai sitotoksitas cuka apel pada konsentrasi 0.7%.

Pengujian efek sitotoksitas pada konsentrasi tertinggi toksik (0.7%) hingga non toksis, dapat memberikan kontribusi yang lebih bermanfaat.

- Tidak ada informasi tentang perlakuan pada kelompok kontrol dan jumlah konsentrasi NaOCl yang digunakan pada kontrol positif.
- Tidak ada gambar yang menunjukkan perubahan absorbansi warna pada penelitian ini yang menunjang grafik hasil.
- Tidak dijelaskan spesifikasi alat dan bahan yang digunakan.
- Konsentrasi DMSO yang digunakan dalam penelitian ini cukup besar (10%) dan menurunkan viabilitas hampir 10% pada kelompok kontrol DMSO. Hal ini dapat menambah efek toksis yang mempengaruhi viabilitas sel. Sebaiknya menggunakan DMSO konsentrasi rendah sebagai bahan pelarut sehingga tidak menimbulkan bias pada hasil.

Penulisan:

- Terdapat pengulangan penulisan kalimat yang sama (auto-plagiasi) pada naskah.
- Terdapat beberapa tanda baca (spasi) yang perlu diperbaiki.

Bukti konfirmasi submit artikel yang telah revisi kedua (19 Juni 2022)

CYTOTOXICITY TEST OF APPLE CIDER VINEGAR AS A ROOT CANAL IRRIGANT AGAINST FIBROBLAST CELLS

Sylvia Bunga Lesmana, Rudy Djuanda**, Vinna Kurniawati Sugiaman****

ABSTRACT

Background: *Apple cider vinegar potentially can be used as an alternative to irrigation solutions because of its antibacterial compounds that can inhibit Enterococcus faecalis, a pioneer bacteria that cause root canal treatment failure. One of the ideal irrigation solution requirements is that it isn't toxic to oral cavity tissues, so it's necessary to run a cytotoxicity test on apple vinegar solution. Cytotoxicity test is the initial part of the evaluation of a dental material before it can be used by humans. Cytotoxicity test was performed on fibroblast cells because the irrigation solution can contact with fibroblast, which are the main cells in the periodontal ligament around the apical. The purpose of this study was to determine the in vitro cytotoxicity effect of ACV on fibroblast cells.*

Method: *Apple vinegar with concentrations of 0.31%, 0.63%, 1.25%, 2.5%, and 5% was tested using the MTS assay method.*

Result: *The results showed that there was a cytotoxicity effect of apple vinegar solution as a root canal irrigation agent against fibroblasts cell. Apple cider vinegar with concentrations of 1.25%, 2.5%, and 5% are potentially toxic because the percentage of cell viability is less than 70%.*

Conclusion: *There is a cytotoxicity effect of apple cider vinegar solution as a root canal irrigant on fibroblast cells.*

PENDAHULUAN

Irigasi saluran akar adalah salah satu kunci dalam keberhasilan perawatan endodontik. Zat irigasi saluran akar dibuat dari bahan kimia sintetis dan juga bahan alami.^{xxvi} Larutan irigasi yang paling umum adalah NaOCl atau sodium hipoklorit. NaOCl dapat membersihkan debris dan material organik pada saluran akar, juga dapat melarutkan jaringan nekrotik. Larutan irigasi dapat berkontak dengan pulpa dan jaringan periapikal. Pulpa merupakan jaringan yang mengisi ruang pulpa dan saluran akar yang terdiri dari komponen sel, termasuk sel fibroblas. Foramen apikal menghubungkan pulpa gigi dan jaringan periapikal yang terdiri dari sementum, tulang alveolar, dan ligamen periodontal.^{xxvi} Sel fibroblas merupakan sel utama pada ligamen periodontal, sehingga larutan irigasi yang keluar dari foramen apikal akan menimbulkan efek sitotoksik pada sel fibroblas dan komplikasi pada jaringan periapikal.^{xxvi,xxvi}

Efek sitotoksik bahan irigasi dapat menyebabkan kerusakan dan iritasi yang menyebabkan degenerasi jaringan periapikal dan keterlambatan penyembuhan luka.³ Penelitian yang dilakukan oleh Karkehabadi tentang uji sitotoksisitas larutan irigasi NaOCl pada sel fibroblas ligamen periodontal manusia (HPdLFC) ditemukan bahwa NaOCl bersifat toksik pada konsentrasi 0,025%, sedangkan pada konsentrasi 0,4%

menyebabkan kematian semua sel.^{xxvi} Masuknya NaOCl ke dalam jaringan periapikal dapat terjadi karena foramen apikal yang lebar, kurangnya penyempitan atau konstiksi apikal, serta tekanan yang tinggi saat irigasi saluran akar.^{xxvi}

NaOCl dengan konsentrasi 5,25% dapat menyebabkan kerusakan pada jaringan periapikal karena dapat menyebabkan rasa sakit, pendarahan periapikal, dan pembengkakan.^{xxvi} Beberapa bahan alami diketahui memiliki potensi antibakteri, sehingga dapat digunakan sebagai alternatif untuk menghindari efek sitotoksik bahan irigasi kimia, salah satunya yaitu larutan cuka apel. Cuka apel memiliki kandungan asam organik, yaitu asam asetat dan asam amino, flavonoid, polifenol serta kaya vitamin dan mineral. Kandungan asam asetat yang dimiliki cuka apel bertindak sebagai antimikroba yang dapat menyebabkan hilangnya integritas sel.^{xxvi}

Pada penelitian sebelumnya telah didapatkan bahwa cuka apel berpotensi digunakan sebagai alternatif larutan irigasi karena mengandung senyawa antibakteri yang mampu menghambat *Enterococcus faecalis* yang merupakan bakteri pionir penyebab kegagalan perawatan saluran akar.^{xxvi} Salah satu syarat larutan irigasi yang ideal adalah tidak toksik terhadap jaringan di rongga mulut, maka peneliti bermaksud melakukan uji sitotoksisitas larutan cuka apel terhadap sel fibroblas agar data yang didapatkan dari penelitian ini diharapkan dapat dimanfaatkan sebagai dasar penggunaan larutan cuka apel sebagai bahan alternatif untuk irigasi saluran akar.^{xxvi}

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek sitotoksisitas larutan cuka apel terhadap sel fibroblas secara *in vitro*.

METODE PENELITIAN

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan penelitian *post-test only control group design*. Penelitian dilakukan di Aretha Medika Utama *Biomolecular and Biomedical Research Center*, Bandung.

Larutan cuka apel menggunakan merk B dan sel fibroblas 3T3 BALB/C didapatkan dari Aretha Medika Utama Laboratorium *Biomolecular and Biomedical Research Center*.

Prosedur Kerja *Thawing* Sel 3T3 BALB/C adalah sebagai berikut: Sel 3T3 BALB/C diambil dari tangki nitrogen cair (-196°C), kemudian dicairkan di dalam *ultrasonic cleanser* dengan suhu 37°C selama 2 menit hingga mencair. Sel 3T3 BALB/C dimasukkan ke dalam *centrifuge tube* 15ml yang berisi medium kultur 4 ml. Medium kultur sel fibroblas 3T3 BALB/C dibuat dengan mencampurkan 10% *bovine serum*, 1% ABAM, medium basal MEM, 1% Amphotericin B, 1% Nanomycopultine, dan 0,01% Gentamicin hingga 100% dari total volume di dalam tube 50 mL. Sel 3T3 BALB/C disentrifugasi pada kecepatan 1600 rpm selama 5 menit. *Supernatan* dibuang dan *pellet* sel 3T3 BALB/C diresuspensikan dengan 5 ml medium kultur. *Suspensi* sel 3T3 BALB/C dimasukkan ke dalam *flask* T25. Sel 3T3 BALB/C diinkubasi di dalam *incubator* pada kondisi suhu 37°C dan 5% CO₂. Sel yang telah tumbuh pada *flask* T25 diamati di bawah mikroskop inverted hingga konfluen sekitar 70-80%.

Subkultur Sel 3T3 BALB/C adalah sebagai berikut: Sel 3T3 BALB/C yang telah tumbuh pada *flask* T25 diamati di bawah mikroskop *inverted* hingga tingkat *confluent* sekitar 70-80%. Medium kultur pada *flask* T25 dibuang, kemudian dibilas dengan PBS 1 kali sebanyak 2 ml untuk menghilangkan sisa medium. Sel yang menempel dilepaskan dengan bantuan 2 ml 0,25% Trypsin-EDTA, kemudian diinkubasi selama 3 menit pada suhu 37°C. Pastikan sel sudah benar-benar terlepas dari dasar *flask* dengan melakukan pengecekan menggunakan mikroskop *inverted*. Setelah semua sel telah terlepas, tambahkan 4 ml medium pertumbuhan untuk menghentikan kerja tripsin. Sel kemudian dimasukkan ke dalam *centrifuge tube* 15 ml, dan disentrifugasi dengan kecepatan 1600 rpm selama 5 menit. *Supernatan* dibuang dan *pellet* diresuspensi dengan 2 ml medium kultur. *Suspensi* sel dibagi ke dalam 2 buah *flask* T25 kemudian sel diinkubasi di dalam inkubator CO₂ 5% dengan suhu 37°C. Selama perawatan sel, medium pertumbuhan diganti atau ditambah setiap 2-3 hari sekali.

Preparasi sampel dilakukan untuk memperoleh konsentrasi akhir dari cuka apel yang digunakan dalam uji sitotoksitas. Perbandingan antara jumlah medium sel dengan konsentrasi sampel yang digunakan dalam uji sitotoksitas adalah 10:1, sehingga dibutuhkan larutan cuka apel dengan konsentrasi 0,312%, 0,625%, 1,25%, 2,5%, dan 5%. Prosedur preparasi sampel tersebut adalah sebagai berikut: (1) Pembuatan Larutan Stok: Sebanyak 1 ml larutan cuka apel dilarutkan dalam 9 ml DMSO 10%, menghasilkan larutan stok cuka apel sebanyak 10 ml dengan konsentrasi 10%; (2) Pembuatan Seri *Working Solution* (WS): CA 5% : 500 µL larutan stok + 500 µL DMSO 10% (Larutan A), CA 2.5% : 500 µL larutan A + 500 µL DMSO 10% (Larutan B), CA 1.25% : 500 µL larutan B + 500 µL DMSO 10% (Larutan C), CA 0.625% : 500 µL larutan C + 500 µL DMSO 10% (Larutan D), dan CA 0.313% : 500 µL larutan D + 500 µL DMSO 10% (Larutan E); (3) Filtrasi sampel: *Working solution* difilter dengan menggunakan *syringe filter tissue culture* pori 0,22 µm, sehingga diperoleh sampel yang steril.

Uji Sitotoksitas Larutan Cuka Apel dilakukan sebagai berikut: Sel dipanen dan dihitung menggunakan *hemocytometer*. Sel ditanam dengan kepadatan 5000 (5x10³) sel/*well* dalam 96-*wellplate*. Sel diinkubasi selama 24 jam di dalam inkubator CO₂ 5% dengan suhu 37°C. Setelah diinkubasi selama

24 jam, medium lama dibuang kemudian digantikan dengan medium kultur baru dengan konsentrasi sampel berbeda pada setiap *well*, kemudian diinkubasikan di dalam inkubator 5% CO₂ dengan suhu 37°C. Setelah perlakuan selama 24 jam, MTS *reagent* ditambahkan sebanyak 20µl pada masing-masing *well*, kemudian diinkubasi selama 20 menit pada inkubator dengan suhu 37°C dan 5% CO₂. Absorbansi diukur dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 490 nm.

Cara menghitung persentase viabilitas dan IC₅₀ adalah sebagai berikut:

$$\%Viabilitas = \frac{Absorbansi\ sampel}{Absorbansi\ kontrol} \times 100\%$$

$$IC_{50} = \frac{Absorbansi\ kontrol - Absorbansi\ sampel}{Absorbansi\ kontrol} \times 100\%$$

Pengujian analisis data dilakukan menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* untuk melihat data terdistribusi normal dan uji homogenitas dengan *Levene Statistic*, dimana sebelumnya hasil pengukuran ditabulasi terlebih dahulu menurut kelompok masing-masing, setelah itu dilakukan uji *Post Hoc Dunnett T3*.

HASIL PENELITIAN

Uji sitotoksitas cuka apel dilakukan dengan uji MTS pada sel fibroblas 3T3 BALB/C. Sel fibroblas 3T3 BALB/C diberi perlakuan sampel cuka apel sebanyak lima konsentrasi, yaitu 5%, 2,5%, 1,25%, 0,63%, dan 0,31%, kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometri yang dibaca pada panjang gelombang 490nm. Hasil dari uji sitotoksitas dapat dilihat berdasarkan jumlah sel yang hidup, persentase viabilitas sel, dan persentase inhibisi. Data hasil uji sitotoksitas cuka apel terhadap sel fibroblas 3T3 BALB/C dapat dilihat pada tabel 1

IC₅₀ (*Half-Maximal Inhibitory Concentration*) didefinisikan sebagai konsentrasi yang diperlukan untuk menghambat proliferasi sel sebanyak 50%.⁷⁸ IC₅₀ menunjukkan nilai persentase inhibisi sebesar 50%, maka pada konsentrasi tersebut, persentase viabilitas sel adalah 50%. Berdasarkan hasil analisis regresi probit didapatkan estimasi nilai IC₅₀, yaitu 3,096%, sehingga pada konsentrasi tersebut, terjadi penghambatan proliferasi sel atau inhibisi sebesar 50% dan nilai persentase viabilitas sel adalah 50%.

Data-data yang diperoleh kemudian ditabulasi dan dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas. Uji normalitas dilakukan untuk mengetahui apakah data yang diperoleh terdistribusi normal. Berdasarkan uji normalitas *Kolmogorov-smirnov* yang dapat dilihat pada lampiran 3, didapatkan nilai p>0,05, sehingga data terdistribusi normal. Hasil uji homogenitas dengan *levene statistic* pada lampiran 4 menunjukkan nilai signifikansi 0,003, sehingga dapat dinyatakan bahwa varian antar kelompok tidak homogen karena p<0,05.

Data hasil penelitian terdistribusi normal, tetapi tidak homogen, maka dilakukan analisa data dengan uji *Post Hoc* menggunakan metode *Dunnett T3* untuk mengetahui perbedaan signifikan antar kelompok

perlakuan. Data hasil uji *Post Hoc Dunnett T3* dapat dilihat pada lampiran 5. Perbedaan nilai rata-rata yang disajikan dalam rata-rata \pm SD dapat dilihat pada tabel 1. Tanda superskrip yang berbeda (a,b,c) menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) berdasarkan uji *Post Hoc Dunnett T3*.

DISKUSI

Hasil uji sitotoksisitas larutan cuka apel terhadap sel fibroblas menunjukkan bahwa cuka apel dengan konsentrasi 0,31%, 0,63%, 1,25%, 2,5%, dan 5% memiliki efek sitotoksisitas terhadap sel fibroblas. Cuka apel dengan konsentrasi 1,25%, 2,5%, dan 5% berpotensi toksik karena persentase viabilitas sel kurang dari 70%. Persentase viabilitas sel mengalami penurunan dengan meningkatnya konsentrasi cuka apel. Hal ini terjadi karena prinsip uji MTS didasarkan pada konversi garam tetrazolium menjadi formazan berwarna oleh aktivitas mitokondria sel hidup. Jumlah formazan yang dihasilkan bergantung pada jumlah sel yang viabel dan absorbansi yang berbanding lurus dengan jumlah sel viabel dapat diukur dengan spektrofotometri pada 490 nm.^{xxvi}

Cuka apel memiliki efek sitotoksisitas yang cukup tinggi. Penelitian Gopal, dkk. (2015) menyatakan bahwa cuka apel memiliki potensi toksisitas bahkan pada konsentrasi 0,7%.^{xxvi} Faktor yang berperan dalam sitotoksisitas suatu material antara lain dosis agen sitotoksik, durasi paparan suatu senyawa, dan mekanisme sitotoksisitas senyawa.^{xxvi} Kematian sel dapat disebabkan karena penipisan kadar ATP dan defek pada membran sel.^{xxvi} Uji viabilitas dan sitotoksisitas sel didasarkan pada berbagai fungsi sel, seperti permeabilitas membran sel, aktivitas enzim, produksi ATP, produksi ko-enzim, dan aktivitas penyerapan nukleotida.^{xxvi}

Pada penelitian ini didapatkan bahwa penambahan konsentrasi cuka apel berbanding terbalik dengan jumlah sel yang dapat bertahan hidup, sehingga semakin tinggi konsentrasi cuka apel maka akan lebih banyak sel fibroblas 3T3 BALB/C yang mati. Sel mengalami kerusakan dan kematian karena sudah tidak mampu beradaptasi terhadap rangsang. Rangsangan bahan toksik dapat menyebabkan jejas pada sel fibroblas dengan merusak membran sel, mitokondria, dan mengganggu substrat endogen sel.^{xxvi} Kematian sel fibroblas dapat disebabkan oleh kandungan zat aktif dalam suatu material yang memiliki efek toksik. Kandungan biologi aktif dalam cuka apel yang dapat meningkatkan persentase kematian sel

Cuka apel dengan konsentrasi 5%, 2,5%, dan 1,25% disebut toksik karena berdasarkan ISO 10993-5: *Biological Evaluation of Medical Device* tentang uji sitotoksisitas secara *in vitro*, suatu senyawa dianggap toksik jika memiliki viabilitas sel kurang dari 70%. Semakin rendah konsentrasi cuka apel, maka sitotoksisitasnya semakin rendah. Hal ini terjadi karena proses pengenceran menyebabkan berkurangnya kandungan bioaktif dalam cuka apel dan mengurangi tingkat keasamannya, sehingga menurunkan potensi kerusakan sel. Untuk penelitian selanjutnya, dapat dilakukan uji sitotoksisitas larutan cuka apel dengan menggunakan metode yang berbeda, seperti MTT assay dan metode pewarnaan eksklusi dengan *PrestoBlue*. Juga dapat dilakukan uji sitotoksisitas larutan cuka apel terhadap sel lain yang terdapat di rongga mulut, seperti *human periodontal ligament cells* (hPDL), *human periodontal ligament fibroblast cells* (HPDLFc), *human gingival fibroblast cell* (HGF), dan sel lain yang berpotensi terkena larutan irigasi.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa terdapat efek sitotoksisitas larutan cuka apel sebagai bahan irigasi saluran akar terhadap sel fibroblas.

DAFTAR PUSTAKA

1. Mooduto L, Fredline C, Sampoerno G, Goenharto S. *Cytotoxicity of Sodium Hypochlorite, Chlorhexidine and Propolis on Human Periodontal Ligament Fibroblast Cell*. Journal of International Dental and Medical Research. 2019;12(2):476–480
 2. Rukmo M. *Perkembangan Metode Penilaian Kesembuhan Penyakit Periapikal Setelah Perawatan Endodontik*. Kongres Ikatan Konservasi Gigi Indonesia (IKORGI) IX dan Seminar Ilmiah Nasional. 2011;9:402-414
 3. Yuanita T, Ristyawati D, Samadi K. *Cytotoxicity test of NaOCl and Mangosteen (Garcinia Mangostin L.) peel extract used as an irrigation solution in human periodontal ligament fibroblast cells (HPdLFC)*. Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi). 2018;51(5):133-137
 4. Nanci A. *Ten Cate's Oral Histology: development, structure, and function*. 9th ed. Canada:Elsevier Health Sciences. 2017
 5. Karkehabadi H, Yousefifakhr H, Zadsirjan S. *Cytotoxicity of endodontic irrigants on human periodontal ligament cells*. Iran Endod J. 2018;13(3):390–394
 6. Basrani B, Haapasalo M. *Update on Endodontic Irrigating Solutions*. Endodontic Topics. 2012;27:74-102
 7. Garg N, Garg A. *Textbook of Endodontics*. 2nd ed. New Delhi: Jaypee Brothers. 2010
 8. Yagnik D, Serafin V, Shah AJ. *Antimicrobial activity of apple cider vinegar against Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Candida albicans; downregulating cytokine and microbial protein expression*. Sci Rep. 2018;8(1):1–12
 9. Djuanda R, Helmika VA, Christabella F, Pranata N, Sugiaman VK. *Potensi Herbal Antibakteri Cuka Sari Apel terhadap Enterococcus faecalis sebagai Bahan Irigasi Saluran Akar*. SONDE. 2019;4(2):24–40
 10. Hargreaves K, Berman L. *Cohens Pathways of the Pulp*. 6th ed. St.Louis: Mosby. 2011
 11. Aslantürk ÖS. *In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages*. Intech. 2018;32(July):137–144
 12. Gopal J, Anthonydhasan V, Muthu M, Gansukh E, Jung S, Chul S, et al. *Authenticating Apple Cider Vinegar's Home Remedy Claims:Antibacterial, Antifungal, Antiviral Properties and Cytotoxicity Aspect*. Nat Prod Res. 2019;33(6):906–910
 13. Van Tonder J. *Development of An In Vitro Mechanistic Toxicity Screening Model Using Cultured Hepatocytes*. 2011;29–41
 14. Emilda Y, Budipramana E, Kuntari S. *Uji Toksisitas Ekstrak Bawang Putih (Allium sativum) terhadap Kultur Sel Fibroblast (Garlic (Allium Sativum) Extract Toxicity Test on Fibroblast Cell Culture)*. Dent J (Majalah Kedokt Gigi). 2014;47(4):215–219
 15. Li W, Zhou J, Xu Y. *Study of The in Vitro Cytotoxicity Testing of Medical Devices*. Biomedical reports. 2015;3(5):617-620
 16. arsini H, Febri A. *Pengaruh Variansi Konsentrasi Ekstrak Kulit Batang Jambu Mete terhadap Sitotoksikitas Sel Fibroblas*. Maj Kedokt Gigi Indones. 2017;2(1):6-12
 17. E Zubaidah E. *Efek Cuka Apel dan Cuka Salak terhadap Penurunan Glukosa Darah dan Histopatologi Pankreas Tikus Wistar Diabetes*. Jurnal Kedokteran Brawijaya. 2015;28(4):297-301
 18. Fitriani F, Soetojo A, Subiwahjudi A, Yuanita T. *Sitotoksisitas Ekstrak Kulit Kakao (Theobroma cacao) terhadap Kultur Sel Fibroblas BHK-21*. Conserv Dent J. 2019;9(1):54-65
 19. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. *Robbins Basic Pathology*. 9th ed. Philadelphia: Elsevier. 2015
 20. Hung CH, Huang CC, Hsu LS, Kao SH, Wang CJ. *Apple polyphenol inhibits colon carcinoma metastasis via disrupting Snail binding to focal adhesion kinase*. J Funct Foods. 2015;12(110):80–91
-

21. Kao YL, Kuo YM, Lee YR, Yang SF, Chen WR, Lee HJ. *Apple polyphenol induces cell apoptosis, cell cycle arrest at G2/M phase, and mitotic catastrophe in human bladder transitional carcinoma cells.* J Funct Foods. 2015;14:384–394
22. Miller MA, Zachary JF. *Mechanisms and Morphology of Cellular Injury, Adaptation, and Death.* Pathologic basis of veterinary disease. 2017:2-43
23. Ren M, Wang X, Tian C, Li X, Zhang B, Song X, et al. *Characterization of Organic Acids and Phenolic Compounds of Cereal Vinegars and Fruit Vinegars in China.* J Food Process Preserv. 2016;41(3):1–8
24. Halstead FD, Rauf M, Moiemmen NS, Bamford A, Wearn CM, Fraise AP, et al. *The Antibacterial Activity of Acetic Acid Against Biofilm-producing Pathogens of Relevance to Burns Patients.* PLoS One. 2015;10(9):1–15
25. Terasaki M, Ito H, Kurokawa H, Tamura M, Okabe S, Matsui H, et al. *Acetic Acid Is An Oxidative Stressor in Gastric Cancer Cells.* J Clin Biochem Nutr. 2018;63(1):36–41
26. Tyszka-Czochara M, Paśko P, Reczyński W, Szlósarczyk M, Bystrowska B, Opoka W. *Zinc and Propolis Reduces Cytotoxicity and Proliferation in Skin Fibroblast Cell Culture: Total Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Propolis.* Biol Trace Elem Res. 2014;160(1):123–131.

Bukti konfirmasi artikel diterima (26 Oktober 2022)

The screenshot shows a web interface for a journal submission review. The URL is jurnal.unissula.ac.id/index.php/odj/author/submissionReview/17460. The page displays the following information:

- Uploaded file:** Reviewer A 17460-31043-1-ES.DOCX, 2022-06-19
- Editor Decision:**
 - Decision: Accept Submission 2022-10-26
 - Notify Editor: Editor/Author Email Record 2022-10-26
 - Editor Version: 17460-31043-1-ES.DOCX 2022-06-09
 - Author Version:
 - 17460-47321-1-ES.DOCX 2022-03-10 DELETE
 - 17460-47321-3-ES.DOCX 2022-04-13 DELETE
 - 17460-47321-3-ES.DOCX 2022-08-22 DELETE
 - 17460-47321-4-ES.DOCX 2022-10-01 DELETE
 - 17460-47321-5-ES.DOCX 2022-10-19 DELETE
 - 17460-47321-6-ES.DOCX 2022-10-19 DELETE
 - Upload Author Version: | No file chosen |

At the bottom, there is a Creative Commons Attribution-ShareAlike license logo and contact information for the journal: Odonto Dental Journal, Jl. Raya Kaligawe Km 4, PO BOX 1054/SM Semarang, Central Java, Indonesia, 50112. Email: odontodentaljournal@unissula.ac.id.

