

**EFEKTIVITAS *BONE GRAFT* YANG MENGANDUNG CANGKANG
KERANG MUTIARA (*PINCTADA MAXIMA*) TERHADAP EKSPRESI
BMP-2 PADA REGENERASI TULANG**

TESIS



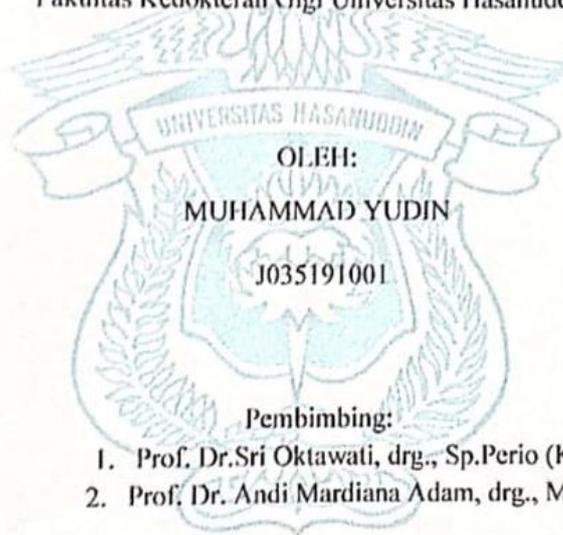
**MUHAMMAD YUDIN
J035191001**

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER GIGI SPESIALIS
PROGRAM STUDI PERIODONSIA
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2022**

**EFEKTIVITAS *BONE GRAFT* YANG MENGANDUNG
CANGKANG KERANG MUTIARA (*PINCTADA
MAXIMA*) TERHADAP EKSPRESI BMP-2 PADA
REGENERASI TULANG**

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk
Memperoleh gelar Profesi Spesialis-I dalam bidang ilmu Periodonsia
Pada Program Pendidikan Dokter Gigi Spesialis
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hasanuddin



PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER GIGI SPESIALIS
PROGRAM STUDI PERIODONSIA
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN

2022

**EFEKTIVITAS *BONE GRAFT* YANG MENGANDUNG
CANGKANG KERANG MUTIARA (*PINCTADA MAXIMA*)
TERHADAP EKSPRESI BMP-2 PADA REGENERASI TULANG**

OLEH:

MUHAMMAD YUDIN

J035191001

Setelah membaca tesis ini dengan seksama, menurut pertimbangan kami,
Tesis ini telah memenuhi persyaratan ilmiah

Makassar, 1 Maret 2022

Pembimbing 1

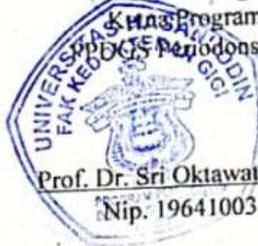
Prof. Dr. Sri Oktawati, drg., Sp.Perio (K)
Nip. 19641003 199002 2 001

Pembimbing 2

Prof. Dr. Andi Marciana Adam, drg., M.S
Nip. 19551021 198503 2 001

Mengetahui

Kelas Program Studi (KPS)
PPDCIS Periodonsia IKG-UNHAS



Prof. Dr. Sri Oktawati, drg., Sp. Perio (K)
Nip. 19641003 199002 2 001

PENGESAHAN UJIAN TESIS

**EFEKTIVITAS *BONE GRAFT* YANG MENGANDUNG
CANGKANG KERANG MUTIARA (*PINCTADA MAXIMA*)
TERHADAP EKSPRESI BMP-2 PADA REGENERASI
TULANG**

OLEH:

MUHAMMAD YUDIN

J035191001

Setelah membaca tesis ini dengan seksama, menurut pertimbangan kami,
Tesis ini telah memenuhi persyaratan ilmiah

Makassar, 1 Maret 2022

Pembimbing 1

Pembimbing 2


Prof. Dr. Sri Oktawati, drg., Sp.Perio (K)
Nip. 19641003 199002 2 001


Prof. Dr. Andi Marsiana Adam, drg., M.S.
Nip. 195811101986091002

Kepala Program Studi (KPS)
Departemen Perawatan
Oral dan Maxillofacial
FKG-UNHAS

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Hasanuddin


Prof. Dr. Sri Oktawati, drg., Sp. Perio (K)
Nip. 19641003 199002 2 001


Prof. Muhammad Ruslin, drg., M.Kes., Ph.D., Sp.BM(K)
Nip. 19730702 200112 1 001

TESIS

EFEKTIVITAS *BONE GRAFT* YANG MENGANDUNG CANGKANG KERANG MUTIARA (*PINCTADA MAXIMA*) TERHADAP EKSPRESI BMP-2 PADA REGENERASI TULANG

OLEH:

MUHAMMAD YUDIN

J035191001

Telah disetujui

Makassar, 1 Maret 2022

1. Pembimbing I : Prof. Dr. Sri Oktawati, drg., Sp.Perio (K)
2. Pembimbing II : Prof. Dr. A. Mardiana Adam, drg., MS.
3. Penguji I : Prof. Dr. Hasanuddin Thahir, drg., MS., Sp.Perio (K)
4. Penguji II : Prof. Dr. Rasmidar Samad, drg., MS.
5. Penguji III : Dr. Arni Irawaty Djais, drg., Sp.Perio (K)

.....
.....
.....
.....
.....

Mengetahui

Ketua Program Studi (KPS)
PPTD Sp. Perio, Fakultas FKG-UNHAS

Prof. Dr. Sri Oktawati, drg., Sp. Perio (K)

Nip. 196410031990022001



PERNYATAAN KEASLIAN KARYA TULIS AKHIR

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Muhammad Yudin

Stambuk : J035191001

Program studi : Pendidikan Dokter Gigi Spesialis Periodonsia

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa tesis yang saya tulis ini merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil alihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan karya tulis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 1 Maret 2022

Menyatakan
10000
METERAI
TEMPEL
A1DFCAJX659469210
Muhammad Yudin



KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim. Dengan memanjatkan puji dan syukur kehadiran Allah SWT atas segala berkah dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan karya tulis akhir pada waktunya sebagai salah satu persyaratan dalam menyelesaikan Pendidikan Dokter Gigi Spesialis Periodonsia Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hasanuddin Makassar.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa dalam proses penelitian dan penulisan ini banyak mendapat bimbingan, arahan dan dorongan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, perkenankanlah penulis menyampaikan banyak terima kasih, penghargaan dan rasa hormat saya kepada bapak, ibu, dan kerabat yaitu:

1. Ibu Prof. Dr. Dwia Ariestina Pulubuhu, MA selaku Rektor Universitas Hasanuddin
2. Prof. Muhammad Ruslin, drg., M. Kes, Ph.D, Sp. BM(K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hasanuddin
3. Prof. Dr. drg. Sri Oktawati, Sp. Perio(K) sebagai Ketua Program Studi PPDGS Periodonsia dan sebagai pembimbing pertama yang selama ini telah meluangkan waktu untuk membimbing dan mengarahkan hingga selesainya penulisan tesis ini
4. Prof. Dr. Andi Mardiana Adam, drg., MS sebagai pembimbing kedua tesis yang selama ini sudah meluangkan waktunya untuk membimbing, mengarahkan dan mendorong penulis menyelesaikan tesis ini

5. Prof. Dr. drg. Hasanuddin Thahir, MS, Sp. Perio(K), Prof. Dr. Rasmidar Samad, drg., MS, Dr. Arni Irawaty Djais, drg., Sp. Perio(K), sebagai tim penguji yang telah banyak memberikan masukan dan koreksi dalam proses perbaikan tesis ini
6. dr. Isra Wahid, Ph.D, selaku kepala lab Animal-Entomologi. Pabbenteng, S.T., M.Ling kepala laboratorium politeknik kimia universitas hasanuddin. Heryanto,S.Si,M.Si selaku analis Besar Laboratorium Kesehatan Makassar dan Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Sains FMIPA UNHAS, yang telah membantu proses penelitian ini.
7. Kepada drh. Andi Fitrah A sebagai tim dokter hewan yang telah membantu selesainya penelitian ini
8. Seluruh staf pengajar pada program pendidikan dokter gigi spesialis yang telah memberikan ilmunya
9. Senior-senior terbaik drg. Heri Siswanto, drg. Ingrid Neormansyah, drg. Fatmawaty Madjid, drg. Rahma medikawati, drg. Patimah, drg. Trisantoso Rezdy Asalui atas semua masukan dan bimbingannya
10. drg. Sitti Raoda Juanita Ramadhan dan drg. Gustivanny Dwipa A terimakasih atas dukungan dan kerjasama yang solid serta memberikan semangat selama proses penelitian berlangsung.
11. Kepada teman-teman seperjuangan TiTU drg. Afdalia Annisa, drg. Sri Wahyu Putri, drg. Dian Eka Satya, drg. Azizah, drg. Sherly Endang, drg. Jennifer Tjokro, drg. Ayu Rahayu Feblina, drg. Nir Etriyani, drg.

Nurhadijah Raja atas segala dukungan dan perhatiannya hingga dapat terselesaikannya pendidikan spesialis ini bersama-sama

12. Seluruh staf dan karyawan bagian periodonsia dan RSGM Halimah dg. Sikati yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu atas bantuannya selama menjalani pendidikan

Pada saat yang berbahagia ini, saya ingin menyampaikan terima kasih yang tak terhingga kepada kedua orang tua yang sangat saya sayangi dan cintai **Amboku Hasbi** dan **Emmaku Rusmawati**, untuk semua cinta, kasih sayang, pengorbanan dan doa demi kesehatan, keselamatan, kelancaran, dan kesuksesan selama saya menjalani Pendidikan ini, dan juga kepada **istriku apt. Sugiarti, S.Si** dan **anak gadisku Khairina Alamahyra Yudin**, terima kasih atas dukungan dan pengertiannya selama ayah menempuh pendidikan.

Semoga penelitian ini memberikan manfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan terkhusus pada bagian periodontologi

Makassar, 1 Maret 2022

Muhammad Yudin

EFEKTIVITAS *BONE GRAFT* YANG MENGANDUNG CANGKANG KERANG MUTIARA (*PINCTADA MAXIMA*) TERHADAP EKSPRESI BMP-2 PADA REGENERASI TULANG

Abstrak

Pendahuluan: Kesehatan jaringan periodontal merupakan salah satu faktor penting untuk menjaga kesehatan gigi agar dapat menjalankan fungsinya dengan baik. Kerusakan pada tulang alveolar menunjukkan tingkat keparahan penyakit periodontal. Berbagai penelitian dilakukan untuk membuat bahan yang dapat meregenerasi cacat tulang akibat penyakit periodontal. Bone graft merupakan salah satu bahan kedokteran gigi yang mampu meregenerasi tulang karena sifatnya yang osteokonduksi, osteoinduksi dan osteogenesis. Penelitian medis di bidang biomolekuler berkembang pesat salah satunya dengan memanfaatkan biota laut sebagai bahan dasar pengobatan yang diyakini memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan bahan kimia. Kerang mutiara *Pinctada Maxima* tersebar luas di laut Indonesia khususnya di Sulawesi Selatan, salah satunya di pulau Bontosua Kabupaten Pangkep dan memiliki struktur yang mirip dengan tulang dengan kandungan kalsium tinggi, bahan utamanya adalah kalsium karbonat. Beberapa penelitian menyebutkan kalsium karbonat mampu mempercepat regenerasi tulang. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas *bone graft* yang mengandung cangkang kerang mutiara (*Pinctada maxima*) terhadap regenerasi tulang.

Bahan dan metode: Penelitian menggunakan bahan cangkang mutiara *Pinctada Maxima* yang diolah menjadi serbuk Kalsium karbonat dan ditanamkan ke dalam defek femur 30 ekor marmut jantan. Secara acak dibagi menjadi tiga kelompok dengan masing-masing 5 sampel. Setelah 14 dan 21 hari pengamatan, regenerasi tulang terlihat melalui evaluasi imunohistokimia ekspresi Bone Morphogenetic Protein (BMP2)

Hasil : Data dianalisis dengan one way ANOVA untuk membandingkan masing-masing kelompok dan menunjukkan data dengan nilai $p < 0,05$ yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok. Namun, pada kelompok kontrol uji dengan kelompok positif pada hari ke 21 tidak memiliki perbedaan yang signifikan.

Kesimpulan: Hasil penelitian menunjukkan *bone graft* yang mengandung cangkang kerang Mutiara (*Pinctada maxima*) efektif dapat meningkatkan ekspresi BMP-2 pada hari ke 14 dan hari ke 21 sehingga dapat dijadikan bahan alternative bone graft pada perawatan regenerasi tulang. Pada pengamatan hari ke 21 kelompok uji memiliki efek yang sama dengan bahan bone graft hidroksiapatit.

Kata Kunci: BMP-2, Bone graft, cangkang kerang mutiara, defek periodontal, *Pinctada maxima*

EFFECTIVENESS OF BONE GRAFT CONTAINING PEARL SHELLS (PINCTADA MAXIMA) ON BMP-2 EXPRESSION ON BONE REGENERATION

Abstract

Introduction: Periodontal tissue health is one of the important factors to maintain dental health in order to carry out its function properly. Damage to the alveolar bone indicates the severity of periodontal disease. Various studies have been carried out to make materials that can regenerate bone defects due to periodontal disease. Bone graft is one of the dental materials that can regenerate bone because of its properties of osteoconduction, osteoinduction and osteogenesis. Medical research in the biomolecular field is growing rapidly, one of which is by utilizing marine biota as the basis for treatment which is believed to provide better results than chemicals. *Pinctada Maxima* pearl oysters are widely distributed in Indonesian seas, especially in South Sulawesi, one of which is on Bontosua Island, Pangkep Regency and has a structure similar to bone with high calcium content, the main ingredient is calcium carbonate. Some studies say calcium carbonate can accelerate bone regeneration. This study aims to determine the effectiveness of bone graft containing pearl oyster shells (*Pinctada maxima*) on bone regeneration.

Materials and methods: This study used *Pinctada Maxima* pearl shell material which was processed into Calcium carbonate powder and implanted into the femur defects of 30 male guinea pigs. Randomly divided into three groups with 5 samples each. After 14 and 21 days of observation, bone regeneration was seen through immunohistochemical evaluation of Bone Morphogenetic Protein (BMP2) expression.

Results: Data were analyzed by one way ANOVA to compare each group and showed data with p value <0.05 , which means there are significant differences between groups. However, the test control group with the positive group on day 21 did not have a significant difference.

Conclusion: The results showed that bone graft containing pearl oyster shells (*Pinctada maxima*) could effectively increase BMP-2 expression on day 14 and day 21 so that it could be used as an alternative bone graft material in bone regeneration treatment. On the 21st day of observation, the test group had the same effect as the hydroxyapatite bone graft material.

Keywords: Bone graft, pearl oyster shell, periodontal defect, *pinctada maxima*, BMP-2

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN KEASLIAN KARYA TULIS AKHIR	vi
KATA PENGANTAR	vii
ABSTRAK	x
ABSTRACT	xi
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR SINGKATAN	xvi
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.3.1 Tujuan Umum.....	5
1.3.2 Tujuan Khusus	5
1.4 Manfaat Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Struktur Tulang	7
2.2 Pola Kerusakan Tulang Pada Penyakit Periodontal	11
2.3 Terapi Bone Graft	12
2.4 Remodeling tulang	16
2.5 Bone Morphogenetik Protein (BMP) Remodeling Tulang	19
2.6 Kalsium Karbonat dan Remodeling Tulang.....	23
2.7 Pinctada maxima Xenograft.....	24
2.8 Bovine Xenograft	26

	2.9 Pemeriksaan Imunohistokimia	26
BAB III	KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	
	3.1 Kerangka Teori.....	28
	3.2 Kerangka Konsep	30
	3.3 Hipotesis.....	31
	3.4 Keterbatasan Penelitian	31
BAB IV	METODE PENELITIAN	
	4.1 Rancangan Penelitian	32
	4.2 Waktu dan lokasi Penelitian.....	32
	4.3 Populasi dan Teknik Sampel	33
	4.4 Identifikasi Variabel dan Defenisi Operasional Penelitian	35
	4.5 Persiapan dan Tahapan Penelitian.....	36
	4.6 Analisa Data	45
	4.7 Masalah Etika.....	45
	4.8 Alur Penelitian	46
BAB V	HASIL DAN PEMBAHASAN	
	5.1 Uji kandungan dan karakteristik bahan.....	47
	5.2 Pemeriksaan ekspresi BMP-2 dan uji statistik.....	50
	5.3 Pembahasan.....	56
BAB VI	PENUTUP	
	6.1 Kesimpulan	60
	6.2 Saran.....	60
	DAFTAR PUSTAKA	61
	LAMPIRAN.....	69

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Fase Remodeling tulang	19
Gambar 2. Gambaran nacre dan <i>mesenchymal cell</i> secara metabolik	24
Gambar 3. Senyawa-senyawa yang terkandung di dalam cangkang kerang	48
Gambar 4. FTIR dari Kalsium Karbonat cangkang kerang mutiara	49
Gambar 5. Derajat Kristalisasi X-Ray Diffraction.....	50
Gambar 6. Preparasi jaringan tulang ekspresi BMP-2 pada hari ke 14	54
Gambar 7. Preparasi jaringan tulang ekspresi BMP-2 pada hari ke 21	55
Gambar 8. Diagram batang ekspresi BMP-2	55

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Hasil uji t rerata ekspresi BMP-2.....	51
Tabel 2. Hasil Uji one way ANOVA perbandingan rerata ekspresi BMP-2	52
Tabel 3. Hasil uji Post Hoc LSD Perbedaan rerata ekspresi BMP-2	53

DAFTAR SINGKATAN

BMPs	:	Bone Morphogenic Proteins
IGF	:	Insulin Growth Factor
TGF- β	:	Transforming Growth Factor
FGF	:	Fibroblas Growth Factor
EGF	:	Epidermal Growth Factor
WNTs	:	Wingless And Int-1
CaCO ₃	:	Calcium Carbonat
CaO	:	Calcium Oxide
WSM	:	Water Soluble Matrix
β -TCP	:	β -tricalcium phosphate
ALP	:	Alkaline Phosphatase
BSP	:	Bone Sialoprotein
OC	:	Osteocalcin
CEJ	:	Cemento Enamel Junction
AC	:	Alveolar Crest
RGD	:	Arg-Gly-Asp.
PDGF	:	Platelet-Derived Growth Factor
AAC	:	Amorphous Calcium Carbonat
MSC	:	Mesenchymal Stem Cells
M-CSF	:	Macrophage colony-stimulating factor
RANKL	:	Receptor activator of NFkB ligand
RANK	:	Receptor activator of NFkB
OPG	:	Osteoprotegerin
TNF α	:	Tumor Necrosis Factor α
IL-1:	:	Interleukin 1
IL-6	:	Interleukin 6
IL-11	:	Interleukin 11

IL-25	:	Interleukin 25
VEGF	:	Vascular Endothelial Growth Factor
ECM	:	Ekstraselular matriks
NFkB	:	Receptor activator kappa B
FFB	:	Fresh frozen bone
FDBA	:	Freeze Dried Bone
DFDBA	:	Demineralized freeze-dried bone allograft
DFDBBX	:	Demineralized Freeze-Dried Bovine Bone Xenograft
DBBM	:	Deproteinized bovine bone mineral
WSM	:	Water soluble matrix
MC3T3-E1	:	The murine calvarial pre-osteoblasts cell line
BOSIR	:	Bone Ocular Spherical Implant Radiasi
FDBX	:	Freeze-Dried Bone Xenograft steril radiasi
FDBX-chip	:	Freeze-Dried Bone Allograft Steril Radiasi
ALS-Steril	:	Amnion Liofilisasi steril Radiasi
GRC	:	Glassfibre Reinforced Concrete
AAS	:	Atomic Absorption Spectrophotometry
FTIR	:	Fourier Transform Infra Red
XRF	:	X-Ray Fluoresence
XRD	:	X-Ray Diffraction
PBS	:	Phosphate Buffer Saline

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Berdasarkan the Global Burden of Disease Study 2016 masalah kesehatan gigi dan mulut khususnya penyakit gingiva dan periodontal menjadi urutan ke 11 penyakit yang paling banyak terjadi di dunia sedangkan hasil riset kesehatan dasar (RISKESDA) Kementerian Kesehatan tahun 2018 menyatakan bahwa masalah kesehatan gigi dan mulut pada gingiva dan jaringan periodontal sebesar 74,1 %, salah satu faktor terbesar kedua setelah karies gigi penyebab terjadinya kehilangan gigi.⁽¹⁾

Infeksi jaringan periodontal ditandai dengan terjadinya resorpsi jaringan baik tulang alveolar hingga sementum yang dapat mengakibatkan kehilangan gigi. Infeksi ini dapat menyebabkan terjadinya defek pada tulang, sehingga terbentuk kerusakan tulang yang irregular dan kompleks. Ketika resorpsi melampaui formasi maka baik tinggi tulang ataupun kepadatan tulang berkurang. Regenerasi spontan tidak selalu terjadi, sehingga kehilangan tulang yang parah dapat meningkatkan mobilitas gigi menyebabkan gigi dapat tanggal dengan sendirinya atau harus diekstraksi karena tidak dapat lagi dilakukan perawatan. Terapi regeneratif salah satu tindakan untuk mencegah terjadinya kehilangan gigi yang dapat mempercepat proses penyembuhan dan pembentukan tulang baru.^(2,3,4,5)

Penelitian medis dalam bidang biomolekular telah berkembang pesat, rekayasa jaringan merupakan teknologi biomedis yang dikembangkan untuk membantu regenerasi anggota tubuh yang tidak dapat diperbaiki sendiri oleh

jaringan.^(2,3,4,5) *Bone graft* merupakan salah satu jenis rekayasa jaringan yang diaplikasikan untuk meregenerasi jaringan periodontal dan digunakan untuk merekonstruksi defek *intraosseous* yang terbentuk akibat adanya penyakit periodontal. *Bone graft* dapat membantu regenerasi tulang melalui tiga metode yaitu osteoinduktif, osteokonduktif, dan osteogenesis. Secara garis besar terdapat empat macam *bone graft* yaitu *autograft*, *allograft*, *xenograft* dan material sintesis *alloplastic*. *Autograft* masih menjadi pilihan utama dalam merestorasi defek tulang namun sangat terbatas sehingga dibutuhkan bahan *bone graft* pengganti yang dapat membantu regenerasi tulang.^(6,7,8)

Pemanfaatan hasil laut sebagai sumber bahan dasar *bone graft* pengganti dipercaya memberikan hasil yang lebih baik dari bahan kimia. Beberapa struktur biota laut kandungannya dapat digunakan dalam membangun struktur gigi (tulang, dentin, maupun ligamen periodontal) yang rusak atau hilang akibat suatu penyakit.⁽⁹⁾

Penemuan implan gigi pada tulang tengkorak suku mayan menjadi awal dilakukannya sejumlah penelitian terhadap cangkang kerang. “Nacre” biasa disebut “mother of pearl” merupakan bagian dari cangkang kerang yang memiliki kandungan utama kalsium karbonat (CaCO₃). Cangkang kerang mampu memfasilitasi proliferasi osteoblas, mempercepat produksi matriks ekstraseluler, dan mineralisasi. Selain itu, cangkang kerang juga mengandung bahan inorganik dan organik yang memiliki struktur dasar mirip tulang.^(10,11)

Komposisi kimia cangkang kerang *Pinctada maxima* 97% inorganik dan 3 % organik, yang terdiri dari protein, peptide, glukoprotein, kitin, lipid, dan pigmen.

Komposisi *Pinctada maxima* terdiri dari Ca, Mg, Na, P, Fe, Cu, Ni, B, Zn, dan Si. Kandungan utama dari *nacre* ini adalah kalsium karbonat (Ca_2CO_3). Struktur ini mirip dengan tulang manusia, struktur anorganik memiliki kekuatan yang luar biasa, sedangkan matriks organik mampu meningkatkan osteokonduktivitas bila dibandingkan bahan sintesis lain. Di dalam matriks *organik* cangkang kerang ditemukan molekul biologis yang identik dengan yang ditemukan pada manusia, *Bone Morfogenetik Protein* (BMPs) dan molekul lain mampu mengaktifkan osteoblast melalui sinyal kimiawi osteoblas.^(12,13)

Kalsium karbonat dengan skala nano telah menarik perhatian dalam regenerasi tulang karena fleksibilitasnya dalam preparasi, biodegradasi, dan osteokonduksi. Sebuah penelitian menyebutkan bahwa nano-kalsium karbonat keramik memiliki rasio degradasi yang tinggi bila dibandingkan dengan bahan sintesis pengganti tulang lainnya, meliputi nano- β -tricalcium phosphate dan nano-hydroxyapatite, dan dapat mempercepat ekspresi marker osteogenic spesifik.⁽¹⁴⁾

Berbagai penelitian telah dilakukan yang menunjukkan potensi kandungan cangkang kerang mutiara sebagai bahan baru dalam regenerasi tulang. Beberapa penelitian terdahulu menemukan bahwa *Pinctada maxima* secara simultan *biocompatible* dan osteokonduktif terhadap tulang. Penelitian dengan menggunakan *chip nacre pinctada maxima* pada osteoblas manusia secara *in vitro* menunjukkan terbentuknya matriks osteoid tebal yang terdiri dari foci dengan struktur termineralisasi dan tulang. *Nacre pinctada maxima* memiliki aktivitas osteogenik secara *in vivo*. Selain itu, dilakukan penelitian dengan menggunakan bubuk *nacre* dan darah pada defek tulang 8 pasien yang menderita kehilangan tulang dan hasilnya

menunjukkan bahwa *nacre* memiliki biokompatibilitas yang baik terhadap tulang yang tampak 6 bulan setelah perawatan. Tulang yang terbentuk menyatu baik dengan *nacre* tanpa adanya intervensi jaringan lunak atau fibrous.^(15,16,17)

Penelitian juga dilakukan di Indonesia pada tahun 2018 oleh Rahayu S et al, dengan menggunakan cangkang kerang mutiara (*Pinctada maxima*). Pada penelitian ini peneliti memilih untuk menggunakan teknik presipitasi yang didasarkan dari penelitian-penelitian sebelumnya. Pada penelitian ini diperoleh HAp dan TCp pada serbuk cangkang Mutiara. Sehingga dapat menjadi dasar metoda sintesis cangkang kerang Mutiara untuk dijadikan bahan bone graft yang osteoinduktif, osteokonduktif dan osteogenesis.⁽¹³⁾

Proses regenerasi tulang dipengaruhi oleh factor sistemik dan faktor lokal. Beberapa polipeptida dapat dihasilkan oleh tulang itu sendiri juga oleh jaringan ekstraoseus lain yang bekerja sebagai modulator fungsi seluler, pertumbuhan, diferensiasi dan proliferasi sel-sel tulang, diantaranya adalah IGF-I dan II, TGF- β , PDGF, FGF, EGF, VEGF, GM-CSF, TNF dan BMP.⁽¹⁸⁾

Bone morphogenetic protein (BMP) adalah bagian dari superfamily transforming growth factor- β , merupakan asam polipeptida multifungsional yang sebagian besar disintesis dan disekresikan oleh osteoblas. Saat ini terdapat lebih dari 20 sub tipe BMP telah diidentifikasi, diantaranya BMP-2 yang merupakan faktor pengatur penting dalam osteogenesis. BMP-2 merupakan factor pertumbuhan polipeptida yang mengandung 396 asam amino, yang fungsinya menginduksi sel mesenkim yang tidak terdiferensiasi ke dalam tulang rawan dan jaringan tulang. BMP-2 dapat menyediakan dasar untuk kontruksi tulang pada suatu rekayasa

jaringan, dan mampu menginduksi diferensiasi osteoblast yang berperan untuk mensintesis matriks tulang baru. Ekspresi BMP-2 merupakan salah satu tanda terjadinya proses osteoinduksi pada regenerasi tulang. Hal itu dapat terlihat pada tahap reversal dan tahap formasi.⁽¹⁸⁾

Berdasarkan penelitian-penelitian sebelumnya pada cangkang kerang mutiara (*Pinctada Maxima*) menunjukkan biokompatibilitas, biodegradabilitas, dan osteogenik sebagai bahan pengganti tulang. Cangkang kerang mutiara di Sulawesi Selatan banyak di budidayakan di Kepulauan Pangkep, namun pemanfaatannya sebagai bahan bone graft masih belum diteliti. Oleh karena itu, penulis tertarik untuk meneliti efektivitas bone graft yang mengandung cangkang kerang mutiara (*Pinctada Maxima*) terhadap ekspresi BMP-2 pada regenerasi tulang.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah *Bone Graft* yang mengandung cangkang kerang mutiara (*Pinctada Maxima*) dapat mempengaruhi regenerasi tulang yang ditandai dengan adanya ekspresi BMP-2?

1.3. Tujuan Penelitian

I.3.1 Tujuan Umum

Untuk melihat efektivitas *Bone Graft* yang mengandung cangkang kerang mutiara (*Pinctada Maxima*) pada regenerasi tulang.

I.3.2 Tujuan Khusus

1. Untuk melihat potensi kandungan dan karakteristik *bone graft* yang mengandung cangkang kerang mutiara (*Pinctada Maxima*).

2. Untuk melihat ekspresi BMP-2 setelah aplikasi *bone graft* yang mengandung cangkang kerang mutiara (*Pinctada Maxima*), aplikasi bone graft hidroksiapatit, dan tanpa aplikasi *bone graft* terhadap regenerasi tulang pada hari ke 14 dan 21.
3. Untuk melihat perbandingan efektivitas aplikasi *bone graft* yang mengandung cangkang kerang mutiara (*Pinctada Maxima*), bone graft hidroksiapatit dan tanpa aplikasi bone graft terhadap regenerasi tulang pada hari ke 14 dan 21.

1.4. Manfaat Penelitian

Manfaat pengembangan ilmu

1. Menambah pengetahuan ilmiah tentang potensi limbah cangkang kerang mutiara (*Pinctada Maxima*) sebagai bahan bone graft pada proses regenerasi tulang.
2. Menjadi pertimbangan dalam perawatan regenerasi periodontal sebagai bahan alternatif pengganti tulang yang murah dan mudah diperoleh.

Manfaat penelitian

1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memperkaya ilmu pengetahuan pada umumnya dan dibidang kedokteran gigi khususnya bagian periodonsia.
2. Penelitian ini diharapkan menjadi dasar pengembangan ilmu pengetahuan dan penelitian lebih lanjut.
3. Memberikan informasi terhadap pemanfaatan limbah cangkang kerang mutiara, sebagai salah satu bahan alami yang dapat digunakan sebagai bone graft.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

Tulang merupakan jaringan aktif yang mengalami regenerasi secara terus menerus baik pembentukan (formasi) dan penyerapan (resorpsi) tulang. Proses ini bergantung pada aktivitas osteoklas, osteoblas, dan osteosit. Tulang terdiri dari kristal hidroksiapatit dan berbagai ekstraseluler matriks protein, termasuk kolagen tipe I, osteokalsin, osteopontin, sialoprotein tulang, dan proteoglikan. Sebagian besar protein matriks tulang ini disekresikan dan diendapkan oleh osteoblas dewasa, yang terjadi di permukaan tulang. Pembentukan kristal hidroksiapatit dalam osteoid juga diatur oleh osteoblas. Ekspresi sejumlah protein matriks ekstraseluler tulang, aktivitas enzimatis alkali fosfatase (ALP) yang tinggi, dan responsif terhadap hormon osteotropik dan sitokin diyakini merupakan karakteristik utama osteoblast.⁽¹⁹⁾

2.1 Struktur Tulang

Tulang mengandung komponen selular (osteosit) dan pembuluh darah, sedangkan dentin adalah aseluler, *avascular calcified matrix*. Komponen seluler tulang alveolar terutama terdiri dari 3 tipe sel osteoblas, osteoklas, osteosit dan *bone-lining cells*. Sel sel tulang osteoklas, osteoblas, dan osteosit dibutuhkan untuk remodeling tulang dan beberapa sel sel imun.^(20,21) Adapun sel pembentuk tulang, yaitu:

1. Osteoblas

Osteoblas merupakan sel kuboid yang berada sepanjang permukaan tulang, berukuran (20-30 μm) sekitar 4-6 % dari seluruh sel tulang. Osteoblas

berasal dari sel osteoprogenitor *mesenchymal stem cells* (MSC) dan jaringan ikat lainnya, yang berdiferensiasi dan berkembang biak menjadi osteoblas sebelum membentuk tulang. Beberapa fungsi dari osteoblas adalah mensintesis kolagen dan non-kolagen dari matriks tulang organik, mengarahkan susunan fibril matriks ekstraseluler, mineralisasi osteoid, karena alkalifosfat, memediasi resorpsi osteoblas melalui sintesis sitokin spesifik, dan mensintesis *growth factors*. Diferensiasi sel dimediasi oleh sejumlah besar *bone morphogenic proteins* (BMPs), *growth factors* dan sitokin. Osteoblas bertahan selama 1-10 minggu, memiliki tiga perjalanan perkembangan: osteoblas inaktif menjadi *bone lining cells*, matriks termineralisasi yang dihasilkan akan mengelilingi osteoblas dan menjadi osteosit, menghilang dari tempat pembentukan tulang sebagai hasil dari apoptosis.^(22,23,24)

2. Osteosit (sel tulang utama)

Osteosit merupakan sel yang paling banyak, sekitar 90-95 % dari total sel tulang.⁽²⁵⁾ Osteosit berumur panjang hingga 25 tahun dan terletak di dalam lakuna yang dikelilingi oleh matriks tulang termineralisasi. Jumlah osteosit berbeda tergantung pada jenis tulangnya. Osteosit berasal dari *mesenchymal stem cells* (MSC) melalui diferensiasi osteoblas. Dalam proses ini terdapat 4 tahap osteosit yaitu: Osteoid-osteosit, preosteosit, *young-osteosit*, *mature-osteosit*. Setelah matriks termineralisasi, beberapa osteoblas tetap terperangkap di dalamnya dan berubah menjadi osteosit.^(22,23,24)

Osteoblas, osteoklas, dan *bone lining cells* berada di permukaan tulang sedangkan osteosit berada di bagian dalam tulang. Osteosit berbentuk bintang

dan ditemukan di bagian dalam lakuna, berkomunikasi satu sama lain melalui kanalikuli tulang yang diisi dengan cairan tulang ekstraseluler. Osteosit mengatur dirinya sendiri menjadi sebuah syncytium dari sel-sel yang saling berhubungan yang membentuk sebuah struktur tunggal yang menjamin suplai oksigen dan nutrisi. Saat trauma terjadi pada tulang, penghentian suplai darah menyebabkan hipoksia dan nekrosis dari osteosit.^(22,23,24)

Osteosit juga berpartisipasi dalam sintesis dan mineralisasi matriks osteoid, mengontrol remodeling tulang, mendeteksi variasi beban mekanis, berkontribusi terhadap regulasi hemostatis kalsium dan fosfat.^(22,23,24) Osteosit merupakan tahap akhir dari osteoblas yang tidak mampu memperbarui diri. Kerusakan pertumbuhan osteosit mengarah pada kerapuhan tulang atau osteoporosis.⁽²⁶⁾

3. Osteoklas

Osteoklas merupakan sel multinuklear dengan ukuran yang besar dan terdapat disepanjang tulang tempat terjadinya resorpsi dan remodeling tulang. Osteoklas berasal dari prekursor makrofag. Selama proses resorpsi osteoklas memproduksi beberapa enzim lisosom yaitu *tartrate-resistant acid phosphatase* (TRAP), *chatepsin K* dan kolagenase yang bekerja dalam degradasi matriks tulang. Selain itu, osteoklas juga mensekresi enzim *carbonic anhydrase* yang akan menurunkan Ph dan selanjutnya melarutkan matriks tulang.⁽²⁷⁾

Literatur lain disebutkan bahwa Osteoklas merupakan sel besar berinti banyak yang berasal dari makrofag hematopoietik dan *monocyte stem-cell line*, Bila distimulasi sel ini berproliferasi dan bergabung membentuk *large*

multinucleated osteoclast, biasanya memiliki 3–20 nukleus dan sejumlah besar mitokondria, lisosom, dan memproduksi asam fosfatase yang berfungsi untuk melarutkan mineral dalam tulang. Faktor-faktor yang mempengaruhi differensiasi sel osteoklas diantaranya *macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)* yang disekresikan oleh osteoprogenitor mesenchymal cells dan osteoblast, RANK ligand yang disekresikan oleh osteoblast, osteosit dan sel stroma. Kedua faktor ini mengaktivasi faktor transkripsi dan ekspresi gen osteoklas. Pembentukan osteoklas terjadi saat RANKL berikatan dengan RANK, dimana proses ini disebut osteoklastogenesis. Di sisi lain osteoprotegerin yang disekresikan oleh osteoblast, sel stroma, gingiva, dan fibroblast periodontal berikatan dengan RANKL, mencegah interaksi RANK/RANKL sehingga menghambat osteoklastogenesis. Sistem RANKL / RANK / OPG adalah mediator kunci dari osteoklastogenesis.^(22,23,24)

4. *Bone-lining cells*

Sel pipih osteoblast yang menutup permukaan tulang, yang merupakan osteoblast tidak aktif yang terdapat pada permukaan tulang. *Bone-lining cells* berperan dalam resorpsi tulang hingga *remodeling* tulang dan pada hemostasis kalsium dan diferensiasi osteoklastik. Sel ini akan diaktivasi menjadi osteoblast pada saat pembentukan sel tulang baru. Fungsi *bone-lining cells* adalah mencegah interaksi langsung antara osteoklas dan matriks tulang, ketika resorpsi tulang seharusnya tidak terjadi, dan juga berpartisipasi dalam diferensiasi osteoklas, memproduksi osteoprotegerin (OPG) dan receptor activator of NFκB ligand (RANKL).^(22,23,24)

2.2 Pola Kerusakan Tulang Pada Penyakit Periodontal^(28,29,30,31)

Kehilangan tulang horizontal merupakan Lesi yang paling umum ditemukan pada penyakit periodontal. Tinggi tulang berkurang tetapi margin tulang tetap kira-kira tegak lurus terhadap permukaan gigi. Defek vertikal atau angular merupakan defek ini terjadi terjadi dalam arah oblik, membentuk celah pada tulang di sepanjang akar. Dasar dari defek tulang berada pada apikal dari tulang sekitar. Pada setiap defek tulang vertical sering terjadi poket infraboni. Defek tulang bersudut diklasifikasikan berdasarkan jumlah tulang yang ada: Defek tulang satu dinding atau hemiseptal dimana terdapat satu dinding, defek tulang dua dinding dengan dua dinding yang masih ada, defek tulang tiga dinding atau infraboni terdapat tiga dinding (umumnya pada permukaan mesial dari molar atas atau bawah). Cacat tulang kombinasi: Jumlah tulang pada bagian apical lebih besar daripada bagian oklusal.

Kawah tulang adalah puncak tulang interdental yang menjadi cekung yang terjepit oleh dinding fasial dan lingual. Kawah tulang terjadi pada dua per tiga cacat tulang mandibular, dan dapat didiagnosa dengan probing transgingival. Hal yang menyebabkan terbentuknya defek ini, antara lain daerah interdental lebih mudah terjadi akumulasi plak dan lebih sulit dibersihkan, bentuk fasiolingual yang normalnya rata atau cekung pada septum interdental molar bawah mempermudah terjadinya kawah, vaskularisasi pada gingiva di tengah puncak tulang dapat menyebabkan terjadinya jalur inflamasi.

Bentuk/arsitektur terbalik Defek tulang yang terbalik terjadi karena kehilangan tulang interdental, termasuk bagian fasial dan lingual tanpa

kehilangan tulang radicular, sehingga terjadi kebalikan dari anatomi normal (lebih sering pada maksila). Ledges adalah tepi tulang berbentuk plate yang terjadi karena resorpsi tulang yang menebal. Keterlibatan furkasi adalah keterlibatan daerah bifurkas atau trifurkasi pada gigi berakar jamak karena penyakit periodontal. Molar pertama mandibula adalah daerah yang paling sering terjadi dan premolar maksila adalah yang paling jarang terjadi. Trauma karena oklusi yang menjadi etiologi keterlibatan furkasi masih kontroversi; ada yang juga menyatakan adanya proyeksi enamel ke daerah furkasi, adanya kanal aksesori pulpa.

2.3 Terapi *Bone Graft*

Terapi *bone graft* adalah prosedur pembedahan yang menggantikan tulang yang hilang dengan bahan dari tubuh pasien sendiri, buatan, sintetis, atau pengganti alami. Terapi *bone graft* dimungkinkan karena jaringan tulang memiliki kemampuan untuk regenerasi.^(28,32)

Graft adalah suatu bagian jaringan yang diambil dari satu tempat dan ditransplantasikan ke tempat lain, baik pada individu yang sama maupun yang berlainan. Tujuannya adalah untuk memperbaiki suatu cacat yang disebabkan oleh penyakit, kecelakaan atau anomali pertumbuhan dan perkembangan. *Bone graft* adalah pilihan yang banyak digunakan untuk memperbaiki kerusakan tulang periodontal, hal ini lebih baik bila dibandingkan dengan cara bedah pembersihan biasa tanpa penambahan bahan *graft*. Pada kasus-kasus yang regenerasinya kurang diharapkan, misalkan karena tulang alveolar sudah banyak yang hilang maka dapat dilakukan *bone grafting*. Tujuan dari *bone grafting* adalah mengurangi kedalaman poket periodontal, peningkatan perlekatan klinis, pengisian tulang di daerah defek

dan regenerasi tulang baru, sementum dan ligamentum periodontal sehingga diharapkan akar gigi dapat terdukung dengan baik.⁽³³⁾

Mekanisme biologis *bone graft* antara lain yaitu bersifat: Osteokonduksi artinya bahan cangkok tulang berfungsi sebagai scaffold untuk pertumbuhan tulang baru. Osteoinduksi dimana melibatkan stimulasi sel-sel osteoprogenitor untuk berdiferensiasi menjadi osteoblas yang kemudian membentuk tulang baru. Mediator sel yang diketahui bersifat osteoinduktif adalah Bone Morphogenetic Proteins (BMPs). Osteoinduksi merupakan proses menstimulasi osteogenesis, melepaskan substansi yang menstimulasi pembentukan tulang.^(34,35)

Bahan *Bone graft* yang osteokonduktif dan osteoinduktif tidak hanya menyediakan kerangka untuk osteoblast yang ada tetapi juga akan memicu pembentukan osteoblast baru, yang mendorong integrasi *graft* lebih cepat. Osteogenesis terjadi ketika osteoblast yang berasal dari bahan cangkok tulang berkontribusi pada pertumbuhan tulang baru. Sel osteogenic tersebut dapat mendorong pembentukan tulang dalam jaringan lunak atau mengaktifkan pertumbuhan tulang yang lebih cepat pada daerah tulang yang rusak.^(6,35)

Bone graft digunakan untuk menggantikan jaringan tulang rusak dengan bahan tertentu yang dapat diperoleh dari tubuh pasien sendiri, orang lain, bahan sintesis atau bahan alami.. Bahan *graft* harus memiliki karakteristik ideal yakni tidak beracun, tidak menyebabkan infeksi, mudah beradaptasi dan dapat merangsang perlekatan baru. Terdapat berbagai jenis *bone graft*, antara lain.^(6,36)

A. Autograft

Graft autologous atau autogenous melibatkan pemanfaatan tulang yang diperoleh dari individu yang sama yang menerima *graft*. Tulang dapat diambil dari daerah krista iliaka, simfisis mandibula (daerah dagu), dan ramus mandibula anterior (proses koronoid). Bahan *graft* ini memiliki sifat osteoinduktif, osteogenik, dan osteokonduktif. Kelemahan dari *graft* autologus adalah diperlukannya daerah bedah tambahan, lokasi potensial lain untuk nyeri dan komplikasi pasca operasi.^(6,36)

B. Allograft^(6,36,37)

Graft alogenik tulang biasanya diperoleh dalam waktu dua belas jam setelah kematian donor dan ditempatkan di bank jaringan. Empat jenis *graft* alogenik telah digunakan dalam terapi rekonstruktif periodontal:

1. *Frozen iliac allograft* telah menunjukkan hasil yang menguntungkan. Namun, kebutuhan untuk pencocokan silang yang luas untuk mengurangi kemungkinan penularan penyakit dan penolakan *graft* telah membatasi penggunaannya secara luas dalam perawatan periodontal .
2. *Freeze-dried bone allograft (FDBA)*. Jenis *graft* telah dilaporkan efektif sebagai perancah yang dapat membentuk ikatan baru .
3. *Demineralized freeze-dried bone allograft (DFDBA)*. Telah dilaporkan bahwa asam hidroklorat dan pengeringan beku *graft*

tulang kortikal dapat mengekspos protein morfogenetik dalam matriks tulang, dan karenanya meningkatkan potensi osteogeniknya. DFDBA telah dianggap sebagai salah satu graftan "standar emas" dalam regenerasi periodontal, dengan hasil yang menguntungkan.

C. Xenograft⁽³⁷⁾

Graft ini menunjukkan sifat osteokonduktif dan telah dianggap bebas risiko penularan penyakit. Xenografts tersedia dalam dua jenis:

1. *Bovine derived bone replacement grafts*. Tulang sapi diproses untuk menghilangkan bagian organiknya yang menyisakan kerangka hidroksiapatit dari struktur mikro tulang kortikal dan kancellus, mirip dengan tubuh manusia. Jenis *graft* ini bertindak sebagai perancah osteokonduktif dan memungkinkan pertumbuhan tulang dengan integrasi berikutnya dengan tulang inang. Bio-Oss (Geistlich, Wolhusen, Swiss) adalah produk yang paling terkenal dan tersedia secara komersial dalam kategori dan telah dikaitkan dengan keberhasilan manajemen kerusakan *intraony* dan *interradicular*.
2. *Coralline calcium carbonate*. Biocoral (Inoteb, Saint Gonnery, Prancis) adalah bahan resorbable kalsium karbonat, yang diperoleh dari karang alami dan terutama terdiri dari anagorit (> 98% CaCO₃). Porositas material (> 45%) mirip dengan tulang alami dan tampaknya tidak memerlukan transformasi ke fase karbonat, sehingga memungkinkan resorpsi cepat dan penggantian tulang. Sejumlah

penelitian telah menunjukkan hasil yang menjanjikan dengan penggunaan Biocoral pada cacat tulang manusia.

D. Alloplastic graft⁽³⁷⁾

Bahan-bahan ini berfungsi terutama sebagai pengisi tulang (3rd World Workshop in Periodontics 1996). *Graft* sintesis tersedia dalam partikel berdiameter 300-500 μm dan dapat menawarkan keuntungan dari kuantitas yang tidak terbatas, tidak ada risiko penularan penyakit dan tidak ada tempat bedah tambahan.

2.4 Remodeling Tulang

Remodeling tulang adalah proses yang terjadi secara kontinyu di mana tulang lama akan diresorpsi dan tulang baru akan dibentuk. Proses remodeling mengontrol pembentukan kembali atau penggantian tulang selama pertumbuhan tulang. Proses remodeling tulang merupakan suatu siklus yang meliputi beberapa tahapan, diantaranya:^(38,39)

1. *Quiescent phase*

Merupakan keadaan fase tulang saat istirahat. Faktor yang menginisiasi proses ini belum diketahui secara pasti.

2. Tahap aktivasi (*activation phase*) adalah tahap interaksi antara prekursor osteoblas dan osteoklas, kemudian terjadi proses diferensiasi, migrasi, dan fusi multinuklear osteoklas yang terbentuk kemudian akan melekat pada permukaan matrik tulang dan akan dimulai tahap berikutnya yaitu tahap resorpsi. Sebelum migrasi ke

matrik tulang osteoklas tersebut akan melewati sederetan lining sel osteoblas pada permukaan tulang untuk dapat mengeluarkan enzim proteolitik. Interaksi sel antara stromal cell (sel stroma) dan hematopoietic cell (sel hematopoietik) menjadi faktor penentu perkembangan osteoklas. Perkembangan osteoklas dari prekursor hematopoietik tidak bisa diselesaikan jika tidak ada kehadiran sel stroma. Oleh karena itu hormon sistemik dan lokal yang mempengaruhi perkembangan osteoklas disediakan oleh stromal-osteoblastic lineage (sel stroma).

3. Tahap resorpsi (*resorption phase*) adalah tahap pada waktu osteoklas akan mensekresi ion hydrogen dan enzim lisosom terutama cathepsin K dan akan mendegradasi seluruh komponen matriks tulang termasuk kolagen. Setelah terjadi resorpsi maka osteoklas akan membentuk lekukan atau cekungan tidak teratur yang biasa disebut lakuna howship pada tulang trabekular dan saluran haversian pada tulang kortikal. Resorpsi tulang yang dimediasi oleh osteoklas hanya memakan waktu sekitar 2-4 minggu selama setiap siklus remodeling.

4. Tahap reversal (*reversal phase*)

Pada akhir proses resorpsi tulang, pada rongga hasil resorpsi akan dipenuhi oleh sel mononuklear, termasuk monosit, osteosit yang dilepaskan dari matriks tulang, dan preosteoblas yang direkrut untuk memulai pembentukan tulang baru. Sinyal kopling yang menghubungkan antara resorpsi ke awal pembentukan tulang antara

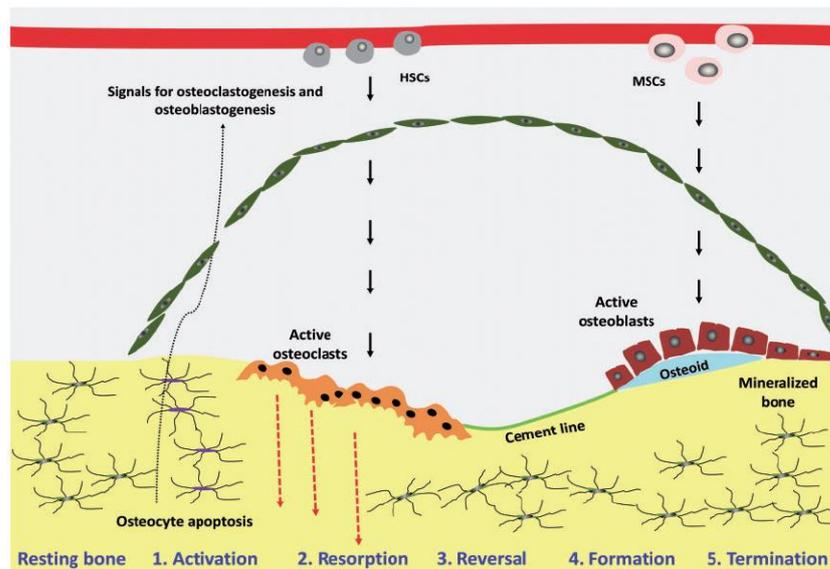
lain termasuk sinyal yang berasal dari matriks tulang faktor seperti TGF- β , IGF-1, IGF-2, BMP, PDGF atau FGF.

5. Tahap formasi (*formation phase*), adalah tahap pada waktu resorpsi matriks tulang menyebabkan lepasnya beberapa faktor pertumbuhan, meliputi *bone morphogenetic proteins* (BMPs), *fibroblast growth factors* (FGFs) and *transforming growth factor β* (BMP-2), yang berperan dalam menarik osteoblas ke daerah tereasorpsi. Tahap awal, osteoblast menghasilkan matriks tulang baru yang tidak terkalsifikasi (osteoid) dan kemudian merangsang mineralisasi, terjadi proliferasi dan diferensiasi prekursor osteoblas yang dilanjutkan dengan pembentukan matriks tulang yang baru dan akan mengalami mineralisasi. Tahap formasi akan berakhir ketika defek (cekungan) yang dibentuk oleh osteoklas telah diisi.

6. Fase mineralisasi

Proses mineralisasi dimulai 30 hari setelah pengendapan osteoid, berakhir 90 hari pada tulang trabekular dan pada 130 hari pada tulang kortikal. Selanjutnya fase Euiscent akan dimulai lagi.

Gangguan proses remodeling tulang dapat terjadi karena ketidakseimbangan fase resorpsi dan fase formasi. Hal ini akan mempengaruhi massa tulang dan menyebabkan kondisi patologis.^(38,39)



Gambar 1. Fase Remodeling tulang⁽⁴⁰⁾

2.5 Bone Morphogenetic protein (BMP) dan remodeling tulang

Rekayasa jaringan telah lama dilirik sebagai alternatif yang menjanjikan untuk standar perawatan saat ini dan berpotensi menghindari banyaknya keterbatasan dari bahan cangkok tulang autogenus konvensional yang melibatkan prosedur bedah tambahan. Rekayasa jaringan menggunakan sel precursor pasien sendiri, matriks, dan factor pertumbuhan untuk meregenerasi jaringan yang hilang. Sejak awal penelitian di bidang ini, regenerasi tulang telah mendapat lebih banyak perhatian, karena tulang adalah salah satu jaringan dengan potensi regenerasi tertinggi dalam tubuh manusia. Regenerasi tulang dapat dianggap sebagai rekapitulasi perkembangan tulang embrionik karena tulang sembuh melalui pembentukan tulang baru alih-alih pembentukan jaringan parut. Proses penyembuhan atau regenerasi tulang ini melibatkan jaringan molekul yang rumit termasuk protein morfogenik tulang (BMPs).⁽⁴¹⁾

Pada tahun 1938, Levander menemukan bahwa jaringan mesenkim yang mengelilingi bahan cangkok bertanggung jawab atas regenerasi tulang. Lacroix pada tahun 1945 menamakan zat ini sebagai osteogenin. Urist dkk. pada tahun 1965, melakukan percobaan inovatif dan dengan hasil yang sangat menjanjikan, di mana jaringan otot ditanamkan pada kaki kelinci dalam matriks tulang terdeminalisasi. Setelah 3 minggu diamati pembentukan tulang ektopik. Hal ini memunculkan hipotesis baru pembentukan tulang melalui autoinduksi, di mana zat penginduksi dari dalam sel penginduksi bekerja pada sel yang diinduksi sehingga menyebabkannya berdiferensiasi menjadi sel osteoprogenitor atau sel kondroprogenitor. Urist menamakan zat penginduksi tulang ini sebagai, "BMP"^(42,43)

BMP merupakan glikoprotein signaling dan termasuk dalam family factor pertumbuhan (TGF-) yang mampu membentuk sel-sel osteoprogenitor pada pembentukan tulang dan makromolekulnya berperan penting pada proses perbaikan dan pertumbuhan tulang. Proses osteoinduktif tulang dan demineralisasi graft matriks tulang juga berkaitan dengan BMP. Oleh karena itu BMP dapat digunakan dalam merekonstruksi jaringan tulang karena mampu mendorong migrasi, proliferasi dan diferensiasi mesenchymal stem sel menjadi osteoblast sehingga pembentukan tulang terjadi. Beberapa penelitian menemukan bahwa morfogenik protein berhasil merekonstruksi defek rahang dan defek yang luas pada wajah. Terapi dengan menggunakan morfogenik protein memiliki keuntungan yang besar karena hanya membutuhkan satu kali operasi saja di bandingkan graft autogenus yang membutuhkan dua kali

pembedahan sehingga waktu operasi dan pengambilan graft dari bagian tubuh yang lain dapat dikurangi seperti pada iliaka,tibia.^(44,45)

Pada tulang, BMPs diproduksi oleh sel osteoprogenitor, osteoblas, chondrocytes, dan platelet. Setelah dilepas, matriks ekstraseluler menjadi tempat penyimpanan sementara BMP. Efek regulasi dari BMP bergantung pada tipe sel target, tahap diferensiasi, konsentrasi lokal BMP itu sendiri, dan interaksi dengan protein yang disekresi lainnya. BMP menginduksi sekuensial pembentukan chondrogenesis, osteogenesis, angiogenesis, dan kontrol sintesis matriks ekstraseluler. Secara umum fungsi BMPs adalah mengatur berbagai aktivitas mesenkim/osteoblas seperti: kemositaksis, perlekatan sel (fibronectin), replikasi sel (mitosis), diferensiasi osteoblas, aktivitas alkalin fosfatase serta sintesis/mineralisasi osteokalsin.⁽⁴¹⁾ Anggota *superfamily* ini dapat memberikan efek penghambat atau stimulasi pada sel, tergantung pada tahap diferensiasi seluler di mana mereka mulai bekerja.⁽⁴⁶⁾

BMP-1, berfungsi dalam pematangan kolagen sebagai prokolagen C-proteinase dan dilaporkan mampu menginduksi perkembangan tulang dan tulang rawan. BMP-2 meregulasi penghambat ekspresi gen diferensiasi dan mendorong ekspresi fenotipik spesifik dalam sel osteoblas. Bersama-sama dengan BMP-4, BMP-6, BMP-7, dan BMP-9, BMP-2 menunjukkan aktivitas penginduksi tulang yang kuat dan disebut sebagai BMP osteogenik.⁽⁴⁷⁾ Namun, sebaliknya, Bahamonde dan Lyons⁽⁴⁸⁾ mendemonstrasikan efek penghambatan BMP-3 pada osteogenesis. BMP-3 adalah pengatur kepadatan tulang yang negatif, dan BMP-13 adalah penghambat kuat pembentukan

tulang.⁽⁴⁷⁾Spektrum luas sel sensitif terhadap BMP termasuk fibroblas, sel jaringan ikat mesenkim, sel jaringan ikat yang diturunkan dari otot, osteoblas, kondroblas, dan banyak lagi. Dengan demikian, BMP mungkin dapat mempengaruhi baik pembentukan tulang endokondral dan pembentukan tulang intramembran dengan mempengaruhi proliferasi sel osteogenik dan kondrogenik.⁽⁴⁹⁾ Ia juga dapat menginduksi diferensiasi sel-sel progenitor mesenkim menjadi osteoblas dan kondroblas.

Peningkatan BMP-2 dapat menginduksi osteokalsin dan ekspresi jangka pendek BMP-2 diperlukan untuk menginduksi tulang secara irreversible. Hilangnya BMP-2 dan BMP-4 mengakibatkan kerusakan parah pada osteogenesis. Tikus yang tidak mampu menghasilkan BMP-2 mengalami patah tulang spontan yang tidak sembuh dalam waktu lama.⁽⁴⁴⁾

Selain BMP-2, kapasitas induktif dan stimulasi osteogenik BMP-3, BMP-4, BMP-5, dan BMP-7 juga telah dilaporkan. Meskipun analog dari BMP ini menunjukkan pembentukan tulang, namun perjalanan pembentukan tulang secara signifikan tertunda, dan juga jumlah yang dibutuhkan kira-kira dua kali lipat dari BMP-3, BMP-4, dan BMP-5 dibandingkan dengan BMP-2. Terapi rehabilitasi dengan BMP yang dihasilkan oleh rekayasa genetika juga telah memberikan hasil yang menjanjikan di sekitar implan gigi dengan menginduksi pembentukan tulang di situs yang dikompromikan yang dilaporkan dalam berbagai studi *in vivo* dan *in vitro*, sehingga meningkatkan osseointegrasi.⁽⁵⁰⁾

Bowers dkk menjelaskan penggunaan BMP pertama kalinya yang berhasil untuk regenerasi periodontal. Mereka melaporkan tentang protein induktif tulang, osteogenin, yang diisolasi dari tulang panjang manusia dan menyarankan bahwa osteogenin yang dikombinasikan dengan matriks yang diisolasi dari tulang dapat menjanjikan sebagai bahan graft tulang. Faktor mirip amelogenin dan faktor pertumbuhan dan BMP menunjukkan efek pleotrofik pada stimulasi beberapa peristiwa penting yang diperlukan untuk regenerasi jaringan, termasuk sintesis DNA, kemotaksis, diferensiasi, dan sintesis matriks.⁽⁴⁸⁾ Beberapa tes telah dilakukan, menunjukkan keefektifan BMP-2 untuk mengoreksi defek intra-tulang, supra-alveolar, furkasi, dan fenestrasi.^(51,52)

2.6 Kalsium karbonat dan remodeling tulang

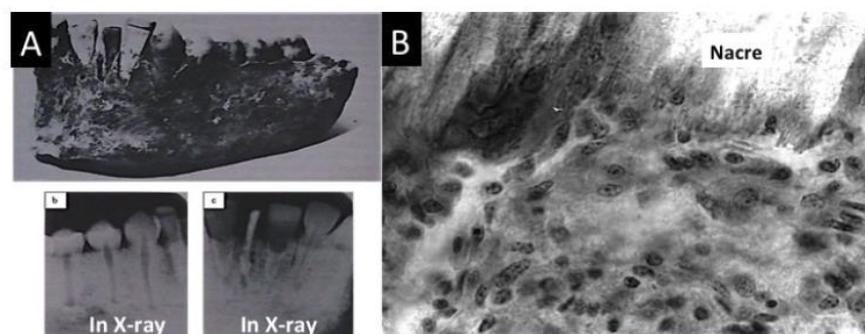
Kalsium karbonat dengan skala nano telah menarik perhatian dalam regenerasi tulang karena fleksibilitasnya dalam preparasi, biodegradasi, dan osteokonduksi. Sebuah penelitian menyebutkan bahwa nano-kalsium karbonat keramik memiliki rasio degradasi yang tinggi bila dibandingkan dengan bahan sintetis pengganti tulang lainnya, meliputi nano- β -tricalcium phosphate dan nano-hydroxyapatite, dan dapat mempercepat ekspresi marker osteogenic spesifik.⁽¹⁴⁾

Kalsium karbonat, merupakan reservoir karbon geokemikal terbesar, yang terdapat dalam tiga polimorf kristalin yaitu kalsit, aragonite, dan vaterite. Deposisi mineral kalsium karbonat pada tahap pertumbuhan tulang dapat dibagi kedalam tiga fase. Fase 1: benih *amorphous calcium carbonate* (AAC) terbentuk,

proses ini dimediasi oleh membrane-associated CA-IX. Fase II: polyp dilepaskan dari platelet ALP-mediated hidrolisis dibawah pembentukan ortho-phosphate yang bereaksi sebagai donor phosphate untuk reaksi transfer carbonate-phosphate. Fase III: phosphate digunakan untuk pembentukan (carbonated) calcium phosphate.⁽⁵³⁾

2.7 Pinctada Maxima Xenograft

Nacre atau cangkang kerang, merupakan bagian dalam kerang, tersusun atas kalsium karbonat aselular yang banyak diproduksi oleh *bivalves*, *gastropods*, dan *cephalopods*. *Nacre* terdiri dari tablet kristal *aragonite* yang dilapisi matriks *organik*. *Aragonit* dan kalsit adalah dua kalsium karbonat polimorf yang merupakan penyusun cangkang moluska dan memberi kekuatan dan ketahanan terhadap keseluruhan arsitektur cangkang. Sebagian kecil cangkang invertebrata terdiri dari matriks *organik* yang bertanggung jawab terhadap proses nukleasi, pertumbuhan dan inhibisi kalsium karbonat.^(11,12,13,16)



Gambar 2. Gambaran nacre dan *mesenchymal cell* secara metabolic bergerak kedalam osteoprogenitor⁽⁹⁾

Struktur khusus dari cangkang kerang mutiara tersusun dari dinding berbentuk seperti bata yang mengandung tablet *aragonite pseudo-hexagonal*

dengan ketebalan sekitar 0,5 mm dan diameter 5-15 mm. Tablet tersebut diatur dalam lamina paralel dan dipisahkan oleh lembaran *interlamellar* matriks organik. *P.Maxima* merupakan spesies cangkang kerang dengan ukuran maksimal dapat mencapai 20-25 cm. Partikel mikro dan komponen berlapis pada cangkang kerang dapat memberikan tegangan tekanan yang sangat baik dan lebih baik dari tulang.^(12,16)

Cangkang kerang merupakan bahan yang memiliki beberapa kelebihan yaitu murah, desain modern, struktur dan arsitektur hirerarki, fungsi biologis intrinsik, imogenitas rendah, toksisitas rendah, penyimpanan aman dan mudah. Cangkang kerang dan tulang memiliki beberapa kesamaan, struktur aselular cangkang kerang dibentuk oleh skeleton luar moluska, sedangkan struktur aselular dari tulang dibentuk oleh skeleton internal invertebrate. Kedua struktur ini berbagi matriks organik yang terdeposit oleh sel khusus (sel tulang pada vertebrata dan sel *matle epithelial* pada moluska), bentuk organiknya membentuk *scaffold* untuk kristalisasi dan mineralisasi langsung. Komposisi kimia cangkang kerang *Pinctada maxima* 97% inorganik dan 3 % organik, yang terdiri dari protein, peptide, glukoprotein, kitin, lipid, dan pigmen. Komposisi *Pinctada maxima* Ca, Mg, Na, P, Fe, Cu, Ni, B, Zn, dan Si. Kandungan utama dari *nacre* ini adalah kalsium karbonat (Ca_2CO_3). Hidroksiapatit merupakan senyawa yang mengandung ion kalsium (Ca^{2+}) yang mengubah ion logam beracun dan menyerap unsur kimia organik dalam tubuh. Struktur ini mirip dengan tulang manusia, struktur anorganik memiliki kekuatan yang luar biasa, sedangkan matriks organik mampu meningkatkan osteokonduktivitas bila

dibandingkan bahan sintesis lain. Di dalam matriks *organik* cangkang kerang ditemukan molekul biologis yang identic dengan yang ditemukan pada manusia, BMPs (bone morphogenetic protein) dan molekul lain mampu mengaktifkan osteoblast melalui sinyal kimiawi osteoblas.^(12,13)

2.8 Bovine Xenograft

Bovine xenograft adalah *xenografts* pertama yang diterapkan pada pasien, yang tersedia secara komersial dalam berbagai produk dan dianggap sebagai bahan yang paling terdokumentasi dari kategori ini. Mereka dicirikan oleh sifat-sifat osteokonduktif, yang dideproteinisasi dan diliofilisasi, tidak menyebabkan respon imun. Namun, butiran dari bahan ini dianggap mengalami penyerapan yang buruk atau lambat, dikelilingi oleh jaringan tulang neoplastik daripada memasuki proses remodeling tulang normal. Pemrosesan pada suhu tinggi untuk menghindari reaksi kekebalan, alergi dan penyakit menular seperti spongiform encephalopathy dianggap bertanggung jawab untuk memodifikasi struktur hidroksiapatit yang selanjutnya mengarah pada pengurangan potensi penyerapan.⁽⁵⁴⁾

2.9 Pemeriksaan Imunohistokimia

Imunohistokimia merupakan proses untuk mendeteksi antigen (protein, karbohidrat, dsb) pada sel dari jaringan dengan prinsip reaksi antibodi yang berikatan terhadap antigen pada jaringan. Imunohistokimia seringkali digunakan untuk mengukur dan mengidentifikasi proses proliferasi sel dan apoptosis sel. Imunohistokimia juga sering digunakan untuk penelitian dasar

dalam rangka mengetahui distribusi dan lokasi biomarker ataupun protein terekspresi pada berbagai macam jaringan pada tubuh.⁽⁵⁵⁾

Slide imunohistokimia dinilai dengan melihat ekspresi akhir osteocalcin, dimana hasil akhir ekspresinya adalah persentasi yang terwarnai positif dengan maksimum scoring 100%.⁽⁵⁶⁾