

Efektivitas Hidrogel Kitosan dan Hidroksiapatit dari Cangkang Kepiting Rajungan (*Portunus Pelagicus*) Terhadap Ekspresi *Runt-Related Transcription Factor-2* (RUNX-2) Pada Prosedur *Socket Preservation* Gigi *Cavia Cobaya*

Effectiveness of Chitosan and Hydroxyapatite Hydrogel Materials from Crab Shells (*Portunus Pelagicus*) Waste Toward *Runt-Related Transcription Factor-2* (RUNX-2) Expression in *Socket Preservation* Procedures in *Cavia Cobaya* Teeth



**DITHA ZULISTIANA
J035211005**



**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER GIGI SPESIALIS
PROGRAM STUDI PERIODONSIA
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
2024**

**Efektivitas Hidrogel Kitosan dan Hidroksiapatit dari Cangkang
Kepiting Rajungan (*Portunus Pelagicus*) Terhadap Ekspresi
Runt-Related Transcription Factor-2 (RUNX-2) Pada Prosedur
Socket Preservation Gigi Cavia Cobaya**

**Effectiveness of Chitosan and Hydroxyapatite Hydrogel
Materials from Crab Shells (*Portunus Pelagicus*) Waste Toward
Runt-Related Transcription Factor-2 (RUNX-2) Expression in
Socket Preservation Procedures in Cavia Cobaya Teeth**

**DITHA ZULISTIANA
J035211005**



**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER GIGI SPESIALIS
PROGRAM STUDI PERIODONSIA
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
2024**

**Efektivitas Hidrogel Kitosan dan Hidroksiapatit dari Cangkang
Kepiting Rajungan (*Portunus Pelagicus*) Terhadap Ekspresi
Runt-Related Transcription Factor-2 (RUNX-2) Pada Prosedur
Socket Preservation Gigi Cavia Cobaya**

**Effectiveness of Chitosan and Hydroxyapatite Hydrogel
Materials from Crab Shells (*Portunus Pelagicus*) Waste Toward
Runt-Related Transcription Factor-2 (RUNX-2) Expression in
Socket Preservation Procedures in Cavia Cobaya Teeth**

Tesis

Sebagai salah satu syarat untuk
memperoleh gelar Profesi Spesialis-1 dalam bidang ilmu periodonsia

Disusun dan diajukan oleh:

DITHA ZULISTIANA
J035211005

Kepada

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER GIGI SPESIALIS
PROGRAM STUDI PERIODONSIA
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR, INDONESIA
2024**

TESIS

Efektivitas Hidrogel Kitosan dan Hidroksiapatit dari Cangkang Kepiting Rajungan (*Portunus Pelagicus*) Terhadap Ekspresi *Runt-Related Transcription Factor-2* (RUNX-2) Pada Prosedur *Socket Preservation* Gigi Cavia Cobaya

Effectiveness of Chitosan and Hydroxyapatite Hydrogel Materials from Crab Shells (*Portunus Pelagicus*) Waste Toward *Runt-Related Transcription Factor-2* (RUNX-2) Expression in *Socket Preservation* Procedures in *Cavia Cobaya* Teeth

DITHA ZULISTIANA
J035211005

telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Profesi Spesialis-1 pada tanggal 22 Maret 2024 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

pada

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

Mengesahkan:

Pembimbing Utama

Dr. Asdar, drg., M.Kes.
NIP. 19661229 199702 1 001

Pembimbing Pendamping

Prof. Dr. Sri Oktawan, drg., Sp.Perio., Subsp.R.P.I.D.(K)
NIP. 19641003 199102 2 001

Ketua Program Studi (KPS)
PPDGS Perio. dan KG-UNHAS



Prof. Dr. Sri Oktawan, drg., Sp.Perio., Subsp.R.P.I.D.(K)
NIP. 19641003 199102 2 001

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi
UNIVERSITAS HASANUDDIN



Irfan Subianto, drg., M. Med., Ed., PhD
NIP. 19610215 200501 1 009

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, tesis berjudul "Efektivitas Hidrogel Kitosan dan Hidroksiapatit dari Cangkang Kepiting Rajungan (*Portunus Pelagicus*) Terhadap Ekspresi *Runt-Related Transcription Factor-2* (RUNX-2) Pada Prosedur *Socket Preservation* Gigi Cavia Cobaya" adalah benar karya saya dengan arahan dari tim pembimbing (Dr. Asdar, drg., M.Kes. sebagai Pembimbing Utama dan Prof. Dr. Sri Oktawati, drg., Sp.Perio., Subsp.R.P.I.D (K) sebagai Pembimbing Pendamping). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi manapun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka tesis ini. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku. Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa tesis ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 10 Juni 2024



Ditha Zulistiana
J035211005

Ucapan Terima Kasih

Penelitian yang saya lakukan dapat terlaksana dengan sukses dan tesis ini dapat terampungkan atas bimbingan, diskusi dan arahan sebagai Dr. Asdar, drg.,M.Kes. pembimbing utama dan Prof. Dr. Sri Oktawati, drg., Sp. Perio., Subsp. R.P.I.D (K) sebagai pembimbing pendamping. Saya mengucapkan berlimpah terima kasih kepada mereka. Penghargaan yang tinggi juga saya sampaikan kepada Dr. Asdar, drg.,M.Kes. atas bimbingan dan masukannya mengenai penelitian yang sedang saya lakukan. Terima kasih juga saya sampaikan kepada Laboratorium Biokimia Politani POLTEK Pangkep, Laboratorium Farmasi UNHAS, Laboratorium Terpadu Departemen Kimia-FMIPA UNHAS, Klinik hewan Docpet, dan Laboratorium Patologi Anatomi RSP UNHAS yang telah membantu dalam proses penelitian.

Kepada Kementerian Kesehatan Republik Indonesia saya mengucapkan terima kasih atas beasiswa Kemenkes yang diberikan (No. HK. 01. 07/1/13773/2021) selama menempuh program pendidikan dokter gigi spesialis periodonsia. Ucapan terima kasih juga saya ucapkan kepada pimpinan Universitas Hasanuddin Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc., dekan Fakultas Kedokteran Gigi Irfan Sugianto, drg., M.Med.Ed., Ph.D. dan Kepala Program Studi Periodonsia Prof. Dr. Sri Oktawati, drg., Sp. Perio., Subsp. R.P.I.D (K) yang telah memfasilitasi saya menempuh program pendidikan dokter gigi spesialis periodonsia. Terima kasih kepada para dosen Prof. Dr. A. Mardiana Adam, M.S., Prof. Dr. Hasanuddin Thahir, drg., M.S., Sp. Perio (K), Surijana Mappangara, drg., M. Kes., Sp.Perio (K), Dian Setiawaty, drg., Sp.Perio (K) dan Sitti Raodah Juanita Ramadhan, drg., Sp.Perio serta Dr. Asdar Gani, drg., M. Kes dan Supiaty, drg., M.Kes. Terima kasih kepada Nurul sebagai rekan dalam tim penelitian serta teman-teman angkatan saya Dextra (Adel, Tira, Kak Juli, Ibri, dan Nurul) yang saling support selama masa pendidikan. Kepada kakak dan adek junior (Venom, Phoenix, Falcon, Vision dan Maba), saya ucapkan terima kasih telah memberikan dukungan dan selamat selama menempuh pendidikan.

Akhirnya, kepada kedua orang tua tercinta saya Alm.Tahawing dan Hj.Nurdina, orang tua saya Agung Abimanyu dan Hj.Elya Wahyuni, saya mengucapkan limpahan terima kasih dan sembah sujud atas doa, pengorbanan dan motivasi mereka selama saya menempuh pendidikan. Penghargaan yang besar juga saya sampaikan kepada suami tercinta Candra Wahyu Saputro serta ananda Ghiska Diandra Zaafarani dan Tiara Diandra Ramadhani yang selalu mendukung selama proses pendidikan. Terima kasih kepada seluruh saudara saya Fitriana, Fitriani, Nasrul, Sigit, Yoga, Bagus, dan Andi Arni atas dukungan yang tak ternilai.

Penulis,

Ditha Zulistiana

ABSTRAK

Ditha Zulistiana. **Efektivitas Hidrogel Kitosan dan Hidroksiapatit dari Cangkang Kepiting Rajungan (*Portunus Pelagicus*) Terhadap Ekspresi *Runt-Related Transcription Factor-2* (RUNX-2) Pada Prosedur *Socket Preservation* Gigi *Cavia Cobaya*** (dibimbing oleh Asdar dan Sri Oktawati).

Latar belakang. Saat ini, pemanfaatan biomaterial dari alam sebagai metarial alternatif dalam prosedur *socket preservation* sedang dikembangkan. Penggunaan biomaterial ini bertujuan mempertahankan tinggi tulang sehingga mencegah resorpsi tulang. Kitosan dan hidroksiapatit dapat diproduksi dari limbah cangkang kepiting jenis rajungan (*Portunus pelagicus*). Kombinasi kedua bahan ini dalam sediaan hydrogel memiliki keunggulan sebagai antimikroba, anti inflamasi, biokompatibel, osteokonduktif, dan biodegradasi yang baik sehingga biomaterial ini sangat menjanjikan. **Tujuan.** Penelitian ini bertujuan mengetahui efektivitas hidrogel kitosan dan hidroksiapatit dari cangkang kepiting Rajungan (*Portunus Pelagicus*) terhadap ekspresi *Runt-Related Transcription Factor-2* (RUNX-2) pada tindakan *socket preservation* gigi marmut (*Cavia Cobaya*). **Metode.** Menggunakan uji penelitian eksperimental laboratoris dan uji klinis dengan rancangan penelitian *post test only control group design*. Ekstraksi kitosan dan hidroksiapatit dari limbah cangkang kepiting Rajungan, lalu dilakukan pembuatan hidrogel dari kombinasi kitosan dan hidroksiapatit. Tahap selanjutnya dilakukan uji bahan dengan analisa FTIR dan XRD. Pencabutan gigi anterior kanan mandibula dilakukan pada 27 ekor *Cavia Cobaya* kemudian dibagi menjadi tiga kelompok yaitu kelompok uji yang diberi kombinasi hidrogel kitosan dan hidroksiapatit, kontrol positif diberikan hidroksiapatit BATAN, dan kontrol negatif diberikan gel plasebo. Hewan coba disacrifice pada hari ke 7, 14, dan 21 kemudian dilakukan uji efektifitas terhadap regenerasi jaringan menggunakan pemeriksaan imunohistokimia dengan indikator pemeriksaan yaitu RUNX-2. Uji normalitas menggunakan uji Shapiro-Wilk dan hasil uji statistik menggunakan uji ANOVA dan uji Posthoc Tukey. **Hasil.** Pada hari ke 7, 14, dan 21 terdapat perbedaan yang signifikan dari ekspresi RUNX-2 di antara ketiga kelompok dengan nilai $p < 0,05$. Peningkatan ekspresi RUNX-2 yang paling tinggi terjadi pada kelompok uji dibandingkan kontrol positif dan kontrol negatif. **Kesimpulan.** Hidrogel kitosan dan hidroksiapatit cangkang kepiting Rajungan (*Portunus pelagicus*) terbukti efektif dalam meningkatkan ekspresi RUNX-2 pada hari ke 7, 14, dan 21 sehingga menjadi indikator dari proses osteoblatogenesis dan remodeling tulang pada tindakan *socket preservation*.

Kata Kunci: cangkang kepiting Rajungan; hidrogel kitosan dan hidroksiapatit; *socket preservation*; RUNX-2

ABSTRACT

Ditha Zulistiana. **Effectiveness of Chitosan and Hydroxyapatite Hydrogel Materials from Crab Shells (*Portunus Pelagicus*) Waste Toward Runt-Related Transcription Factor-2 (RUNX-2) Expression in Socket Preservation Procedures in *Cavia Cobaya* Teeth.** (supervised by Asdar and Sri Oktawati).

Background. Currently, the use of biomaterials from nature as an alternative material in socket preservation procedures is being developed. The use of this biomaterial aims to maintain bone height so as to prevent bone resorption. Chitosan and hydroxyapatite can be produced from crab shells waste (*Portunus pelagicus*). The combination of these two ingredients in hydrogel preparations has the advantage of being antimicrobial, anti-inflammatory, biocompatible, osteoconductive, and biodegradable so that this biomaterial is very promising. **Purpose.** This study aims to determine the effectiveness of chitosan and hydroxyapatite hydrogels from crab shells (*Portunus Pelagicus*) on Runt-Related Transcription Factor-2 (RUNX-2) expression in socket preservation of *Cavia Cobaya*. **Method.** Using laboratory experimental research tests and clinical trials with a post test only control group design. Extraction of chitosan and hydroxyapatite from Rajungan crab shell waste, then the manufacture of hydrogel from a combination of chitosan and hydroxyapatite was carried out. The next stage is to test the material with FTIR and XRD analysis. The extraction of the right mandibular anterior tooth was carried out on 27 *Cavia Cobaya* and then divided into three groups, namely the treatment group given a combination of chitosan hydrogel and hydroxyapatite, the positive control was given BATAN hydroxyapatite, and the negative control was given placebo gel. The animals were sacrificed on days 7, 14, and 21 and then tested for the effectiveness of tissue regeneration using immunohistochemical examinations with an examination indicator, namely RUNX-2. The normality test used the Shapiro-Wilk test and the results of the statistical test used the ANOVA test and the Posthoc Tukey test. **Result.** On days 7, 14, and 21, there were significant differences in RUNX-2 expression between the three groups with a $p < 0.05$ value. The highest increase in RUNX-2 expression occurred in the test group compared to the positive control and negative control. **Conclusion.** Chitosan hydrogel and hydroxyapatite of crab shell crab (*Portunus pelagicus*) were shown to be effective in increasing the expression of RUNX-2 on days 7, 14, and 21 so that it became an indicator of osteoblastogenesis and bone remodeling in socket preservation.

Keywords: crab shells; chitosan and hydroxyapatite hydrogels; socket preservation; RUNX-2

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	iv
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
ABSTRAK	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN	xiv
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Teori	4
1.2.1. Tulang Alveolar	4
1.2.2. Pencabutan Gigi dan Penyembuhan Soket Tulang Alveolar Setelah Pencabutan Gigi	7
1.2.3. <i>Socket Preservation</i>	12
1.2.4. <i>Bone Graft</i>	12
1.2.5. Runt Related Transcription Factor-2 (RUNX-2)	14
1.2.6. Cangkang Kepiting Rajungan	15
1.2.7. Hidroksiapatit	16
1.2.8. Kitosan	17
1.3. Rumusan Masalah	20
1.4. Hipotesa	20
1.5. Tujuan	21
1.5.1. Tujuan Umum	21
1.5.2. Tujuan Khusus	21
1.6. Manfaat Penelitian	21
1.6.1. Kontribusi Terhadap Ilmu Pengetahuan	21
1.6.2. Manfaat Praktis	21
1.7. Teori Konseptual	22
1.7.1. Deskripsi Teori Konseptual	23
1.8. Tabel Sintesa Penelitian	24
BAB II. METODE PENELITIAN	28
2.1. Jenis dan Desain Penelitian	28
2.2. Lokasi dan Waktu Penelitian	28
2.2.1. Lokasi Penelitian	28
2.2.2. Waktu Penelitian	28
2.3. Subjek Penelitian.....	28
2.4. Variabel Penelitian.....	29

2.5. Defenisi Operasional	29
2.6. Alat dan Bahan Penelitian	30
2.6.1. Alat	30
2.6.2. Bahan	31
2.7. Prosedur Penelitian	31
2.7.1. Pemeliharaan Hewan Coba	31
2.7.2. Persiapan Sediaan	33
2.7.3. Pelaksanaan Penelitian	35
2.8. Analisis Data.....	35
2.9. Kerangka Konsep	37
2.10. Alur Penelitian	38
BAB III. HASIL	39
3.1. Hasil Penelitian.....	39
3.2. Uji Kandungan Bahan	39
3.2.1. Uji FTIR	39
3.2.2. Uji X-Ray Diffraction	40
3.3. Pemeriksaan Ekspresi RUNX-2 dan Uji Statistik	41
BAB IV. PEMBAHASAN	46
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	50
5.1. Kesimpulan	50
5.2. Saran	50
DAFTAR PUSTAKA.....	51
LAMPIRAN	57

DAFTAR TABEL

Nomor urut	Halaman
1. Tabel Sintesa Penelitian	24
2. Perbandingan serapan FTIR kitosan standar dan kitosan sampel	40
3. Hasil uji one way ANOVA perbandingan rerata RUNX-2	41
4. Hasil uji Pos Hoc LSD perbedaan rerata RUNX-2	42

DAFTAR GAMBAR

Nomor Urut	Halaman
1. Komponen penyusun tulang	5
2. Fase penyembuhan luka soket gigi	8
3. Skema remodeling tulang	11
4. Proliferasi osteoblast oleh RUNX2	14
5. Differensiasi osteoblast oleh RUNX2	15
6. Cangkang kepiting rajungan	15
7. Struktur kristal hexagonal hidroksiapatit	16
8. Deasetilasi kitin menjadi kitosan	18
9. Struktur karboksimetil kitosan	20
10. Hidrogel kitosan	20
11. Spektrum infra merah kitosan	39
12. Spektrum XRD bubuk hidroksiapatit cangkang kepiting	40
13. Grafik perbandingan ekspresi RUNX-2 masing-masing kelompok	43
14. Diagram perbandingan ekspresi RUNX-2 masing-masing kelompok	43
15. Hasil pemeriksaan imunohistokimia dengan pembesaran 400x	44
16. Hasil pemeriksaan imunohistokimia pembesaran 1000x	44

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor urut	Halaman
1. Lembar etik penelitian	57
2. Lembar perbaikan ujian seminar hasil	58
3. Skema alur penelitian	59
4. Foto-foto proses penelitian	60
5. Output uji statistik RUNX-2	65

DAFTAR SINGKATAN

RUNX-2	: Runt Related Transcription Factor-2 (RUNX-2)
CBFA-1	: Core Binding Factor-1
DFDBBX	: Demineralize Freeze Bone Bovine Xenograft
PVA	: Polivinil Alkohol
BMPs	: Bone Morphogenetic Proteins
TGF	: Transforming Growth Factor
IGF	: Insulin-like Growth Factor
PDGF	: Platelet-Derived Growth Factor
FGF	: Fibroblast Growth Factor
OSE	: Osteoblast Specific cis acting Element
PTH	: Paratiroid Hormon
ALP	: Alkalin Fosfatase
RANKL	: Receptor Activator Of NFkB Ligand
TNF- α	: Tumor Necrosis Factor α
VEGF	: Vascular Endotelial Growth Factor
GM-CSF	: Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
CTGF	: Connective Tissue Growth Factor
PMN	: Polymorphonuclear Neutrophilic
MMPs	: Matriks Metaloproteinase
IL-1	: Interleukin-1
PGE2	: Prostaglandin E2
GAG	: Glikosaminaglikan
OPG	: Osteoprotegerin
NFATc1	: Nuclear Factor of Activated T Cell
IL-6	: Interleukin-6
HA	: Hidroksiapatit
CaCO ₃	: Kalsium Karbonat
PPM	: Part Per Million
FTIR	: Fourier Transform Infra Red
XRD	: X-Ray Diffraction

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Pencabutan gigi merupakan prosedur yang sering menjadi konsekuensi terakhir pada kondisi gigi yang sudah tidak dapat dipertahankan lagi. Secara fisiologis, pencabutan gigi memicu respon inflamasi dan resorpsi tulang alveolar pada daerah edentulous. (Klokevold, 2019; Juodzbals et al., 2019) Setelah prosedur pencabutan gigi, proses resorpsi tulang mulai terjadi dan mengakibatkan kehilangan ridge alveolar sekitar 30%. Proses resorpsi tulang alveolar yang lebih cepat terjadi selama tiga bulan setelah pencabutan gigi, setelah itu kecepatan resorpsi meningkat rata-rata 0,5-1% setiap tahun dan menunjukkan hingga 50% pengurangan lebar ridge alveolar hingga 12 bulan. Pada periode 8 minggu setelah pencabutan gigi, ketebalan tulang pada bagian dinding labial dilaporkan sebagai faktor paling kritis dalam resorpsi tulang. (Juodzbals et al., 2019; Binderman, et al., 2019)

Solusi yang direkomendasikan untuk proses perbaikan dan regenerasi tulang setelah pencabutan gigi adalah prosedur *socket preservation*. Prosedur *socket preservation* dapat mencegah resorpsi tulang alveolar, mempertahankan volume tulang dan struktur tulang sehingga dapat berfungsi optimal dan estetik yang baik. (Agustina dkk., 2018) Setiap tulang terus-menerus mengalami remodeling dan regenerasi sebagai respon terhadap perubahan metabolisme untuk membantunya beradaptasi dengan perubahan kekuatan biomekanik. Dalam mencapai kebutuhan fungsionalnya, tulang terus mengubah struktur internalnya. Perubahan ini terjadi melalui aktivitas osteoklas dan osteoblas. Proses remodeling tulang digambarkan dengan keseimbangan aktivitas sel osteoklas dan osteoblas. (Rahardjo dkk., 2018)

Osteoklas berperan dalam resorpsi tulang dan meningkatkan massa tulang dengan menstimulasi osteoblas melalui sekresi osteoid sehingga terjadi proses *bone repair*. (Fogelman et al., 2012) Osteoblas berfungsi mensintesis dan mensekresi berbagai protein yang terlibat dalam pembentukan tulang (protein matriks ekstraseluler, sitokin, kolagen, dan *growth factor*) dan mengatur perubahan elektrolit cairan ekstraseluler pada proses mineralisasi. (Rahardjo dkk., 2018; Chang Y et al., 2019) Faktor transkripsi runt domain yang berperan penting sebagai regulator dini bagi diferensiasi osteoblas adalah *Runt Related Transcription Factor-2* (RUNX-2) atau yang dikenal juga dengan *Core Binding Factor-1* (CBFA-1). RUNX-2 merupakan salah satu kandidat gen yang mempunyai peranan pada fase awal pembentukan tulang. Sejumlah gen penyandi matriks tulang membutuhkan RUNX-2 untuk ekspresinya, diantaranya *alkaline phosphatase*, *osteopontin*, *bone sialoprotein*, dan *collagen type I α* . (Bruderer et al., 2014)

Ekspresi RUNX-2 sebagai regulator dini dalam regenerasi tulang mulai terlihat pada tahap akhir fase inflamasi dan awal dari tahap proliferasi. Beberapa penelitian

menunjukkan peningkatan pada hari ke-7 untuk menginisiasi proses proliferasi sel mesenkim (*stem cells*) menjadi preosteoblas dan terus meningkat sampai hari ke-14, diregulasi terus sampai pada tahapan osteoblastogenesis dan fase remodelling pada hari ke-21. RUNX-2 berperan dalam proses maturasi tulang dan diferensiasi dari *immature osteoblast* menjadi *mature osteoblast*. Ekspresi RUNX-2 menurun setelah pembentukan tulang matur. (Komori T, 2019)

Melalui prosedur *socket preservation* diharapkan terjadinya percepatan dalam proses pembentukan tulang matur dan regenerasi tulang serta menghasilkan dimensi tulang orofasial yang lebih besar dibandingkan dengan penyembuhan secara fisiologis tanpa prosedur preservasi. (Puspita S. dkk., 2022; Fee L, 2017) Oleh karena itu, diperlukan penggunaan biomaterial yang berperan sebagai *scaffold* untuk menstimulasi pembentukan jaringan tulang yang mengalami kerusakan melalui proses osteogenesis, osteokonduksi dan osteoinduksi. (Rahardjo dkk., 2018) Biomaterial yang sering digunakan adalah *xenograft* yang memiliki kandungan hidroksiapatit seperti *bovine* hidroksiapatit dengan struktur mineral yang sama dengan tulang dan gigi manusia, akan tetapi bahan ini memiliki kekurangan seperti sifat mekanis yang cukup buruk. Material lain seperti jenis *allograft* maupun *alloplast* juga berpotensi menimbulkan reaksi autoimun dan kemungkinan terjadinya transfer penyakit dan tergolong cukup mahal bagi para pasien yang kurang mampu. (Turco G. et al., 2018)

Atas dasar pertimbangan tersebut, saat ini banyak peneliti yang mulai berinovasi dengan menggunakan bahan alternatif yang berasal dari alam karena dianggap lebih sederhana, murah, dan potensi untuk memberikan efek samping yang sangat minim. Indonesia sebagai negara maritim dengan potensi kekayaan biota laut yang menjanjikan, salah satunya adalah pembudidayaan kepiting rajungan (*Portunus Pelagicus*) yang merupakan komoditas andalan yang umumnya dalam diekspor dalam bentuk olahan. Potensi produksi kepiting di Indonesia dari tahun ke tahun mengalami peningkatan. Menurut data dari Kementerian Kelautan dan Perikanan (KKP), pada tahun 2022 income dari komoditi ini mencapai USD 5,71 miliar termasuk diantaranya dari ekspor kepiting rajungan sebesar USD 450,55 juta.

Kepiting rajungan menjadi salah satu fokus komoditas yang akan dikembangkan dalam program terobosan KKP dalam rangka peningkatan ekspor berbasis budidaya. (Wulandari, 2022) Umumnya limbah dari proses olahan kepiting tersebut berupa cangkang 70-80%. Limbah ini berpotensi mencemari lingkungan dan membahayakan kesehatan manusia jika dibiarkan dan tidak dimanfaatkan. Kandungan limbah cangkang kepiting rajungan antara lain protein (15,60% - 23,90%), kalsium karbonat (53,70% - 78,40%) dan kitin (18,70% - 32,20%). Kandungan limbah tersebut dapat bernilai guna jika dikembangkan dan dimanfaatkan. (Alfian NM., 2017, Musbir LF., 2010)

Beberapa penelitian telah mengkaji mengenai manfaat ini. Kandungan kalsium karbonat pada cangkang kepiting rajungan dapat diolah menjadi hidroksiapatit yang

memiliki karakteristik struktur kristal yang identik dengan tulang, bersifat *biocompatible* dan *bioactive* sehingga dapat menjadi alternatif bahan implan tulang. Sifat *bioactive* memungkinkan bahan ini dapat berikatan dengan tulang dan memberikan respon biologis spesifik yaitu dapat menstimulasi sel osteoblast untuk membentuk jaringan tulang baru sehingga dapat membantu proses regenerasi tulang.²³ (Supangat D. dkk., 2017) Penelitian yang dilakukan Kamadjaja dkk (Kamadjaja dkk., 2019) menunjukkan kandungan hidroksiapatit dari cangkang kepiting rajungan pada konsentrasi 100 ppm, 50 ppm, dan 25 ppm dapat diklasifikasikan sebagai material bioaktif dan memiliki biokompatibilitas yang baik. (Kamadjaja dkk., 2019)

Kitosan mempunyai sifat osteokonduktifitas tinggi, teknik aplikasi yang mudah dan biodegradasi bertahap untuk regenerasi tulang. Kitosan telah terbukti dapat meningkatkan regenerasi tulang. Kitosan telah banyak diteliti dalam bidang biomedis, bedah, dan regenerasi jaringan karena sifat biokompabilitas, biodegradasi, adhesif dengan mukosa, antibakteri, anti-inflamasi, serta mempercepat penyembuhan luka sehingga sering dimanfaatkan sebagai terapi genetic (*drug /gene delivery*), pembalut luka, bahan regenerasi jaringan lunak dan keras, bahan hemostasis, agen hipokolestolemik, agen anti thrombogenik, biomaterial regenerasi tulang, dan agen antimikroba.²⁹⁻³² (Matica MA. Et al., 2019; Georgopoulou A. et al., 2018)

Kekurangan material kitosan diantaranya solubilitas air yang rendah pada pH netral atau tinggi dan sifat mekanis yang rendah. Oleh karena itu, kitosan sering dikombinasikan dengan bahan polimer atau bahan alami lainnya, biomaterial, atau molekul bioaktif antara lain hidroksiapatit untuk meningkatkan sifat mekanisnya (Gaihre B. et al., 2018; Elango J. et al., 2019)

Inovasi terkait pengembangan teknologi material telah banyak menjadi perhatian dari peneliti, salah satunya adalah material hidrogel kitosan yang menjadi komersial karena pemanfaatannya sebagai dalam penyembuhan luka. Hidrogel sebagai absorben alami adalah jaringan polimer hidrofilik yang terikat silang serta dapat menyerap air dalam jumlah besar maupun cairan biologis hingga lebih dari 99%. Gugus fungsi hidrofilik yang terdapat pada hidrogel diantaranya -OH, -COOH, -CONH₂, yang dapat menyerap air tanpa larut didalamnya.

Hidrogel memiliki kemampuan *self healing* sehingga dapat menyatu kembali ketika ruptur, *biodegradable*, dan lebih lama terdegradasi. (Fadiana dkk., 2021) Beberapa penelitian tentang efektivitas bahan hidrogel kitosan antara lain penelitian yang dilakukan oleh Chamidah dkk (Chamidah dkk, 2022) mengemukakan bahwa daun sirih dan madu dari bahan hidrogel kitosan/ Polivinil Alkohol (PVA) sebagai plester luka hidrogelalami pada konsentrasi 15 wt% efektif menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* sebesar (16,8 ± 0,47) mm dan (18,4± 0,35) mm dan termasuk antibakteri yang kuat. (Chamidah dkk, 2022) Sartika dkk (Sartika dkk., 2019) melaporkan bahwa penambahan *plasticizer* gliserol terhadap karakteristik hidrogel kitosan-glutaraldehyd efektif dalam penutupan luka. (Sartika dkk., 2019)

Berdasarkan keunggulan dari sediaan hidrogel tersebut, penulis tertarik untuk melakukan penelitian menggunakan kombinasi bahan hidrogel kitosan dan hidroksiapatit dari limbah cangkang kepiting rajungan. Tujuan penelitian ini adalah menilai efektivitas kombinasi material tersebut dalam proses regenerasi tulang pada tindakan *socket preservation* *Cavia* *Cobaya* melalui analisis ekspresi RUNX-2.

1.2. Teori

1.2.1. Tulang Alveolar

Tubuh manusia memiliki empat jaringan dasar pembentuk organ berdasarkan fungsinya, yaitu jaringan epitel, jaringan otot, jaringan saraf, dan jaringan ikat. Asal mula sel-sel tulang berasal dari stem sel tulang yang berkembang menjadi mesoderm progenitor kemudian membentuk jalur mesenkim (preosteoblas, osteoblas, osteosit dan *bone lining cells*) dan jalur hemopoetik (preosteoklas, osteoklas). *Stem sel* ini definisinya masih sulit dipahami, beberapa pendapat mendefinisikan *stem sel* merupakan *unspecified* dan *undifferentiated cells* yang berfungsi memperbaharui sel-sel tubuh termasuk di dalamnya sel-sel darah, kulit, intestinal, dan seterusnya. (Murshed M, 2018; Bonucci E, 2012)

Pada awal pembentukannya diawali oosit teraktifasi, menjadi zigot membelah berbentuk blastokis yang berisi DNA donor. Blastokis akan terurai menghasilkan sel-sel embrionik / *stem cell embryonic*, sel-sel inilah yang terdiri beberapa tipe sel sel pluripoten terbagi menjadi tiga yaitu endoderm, mesoderm (progenitor sel mesoderm dan progenitor sel hematopoiesis) dan ektoderm yang akan berdiferensiasi sebagai sel-sel progenitor dan mempunyai kapabilitas berdiferensiasi menjadi berbagai jaringan tubuh nantinya, seperti proses pembentukan sumsum tulang. (Murshed M, 2018; Bonucci E, 2012)

Tulang alveolar adalah jaringan ikat yang termineralisasi yang merupakan bagian dari maksila dan mandibula dan membentuk soket gigi serta menampung akar gigi didalamnya. Tulang alveolar terbentuk untuk memungkinkan perlekatan tulang dari serat PDL di sekitar akar dan resorpsi saat gigi tanggal. Struktur tulang alveolar terdiri dari *alveolar bone proper*, *supporting cancellous bone*, *external cortical plate*, *inter-radicular bone*, *interdental bone*, dan *alveolar crest*. (Klokkevold, 2019)

Komponen penyusun tulang alveolar terdiri atas:

a. Matriks tulang (Chatterjee K., 2006)

Matrik tulang ini terdiri dari komponen organik, non-organik dan air.

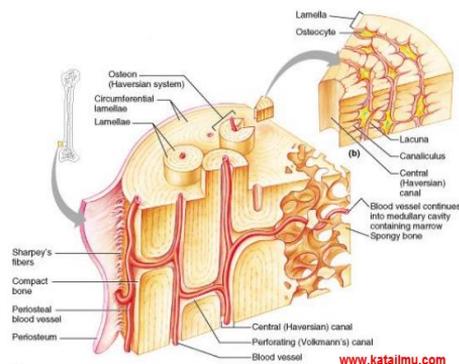
1. Non organik

Komponen anorganik penyusun tulang sebesar 69%, 99%nya berupa *calcium hidroksiapatit* dan sisanya berupa *osteocalcium phosphate* Komposisi kalsium dan fosfor ditemukan lebih banyak daripada bikarbonat, sitrat, potassium, magnesium, dan sodium. Bentuk mineralnya adalah hidroksiapatit $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ berbentuk kristalit.

2. Organik

Komponen organik sejumlah 22%, terdiri dari serat kolagen tipe 1 sebanyak 90% dan protein non kolagen termasuk proteoglikan dan glikoprotein.² Substansi dasar terdiri atas proteoglikan dan sejumlah kecil protein lain seperti osteocalcin, osteonectin dan osteopontin.³⁷

b. Secara makroskopis tulang dibedakan menjadi dua macam yaitu tulang spongiosa (cancellous) dan tulang kompakta (cortical). Tulang spons terdiri dari lamella yang tersusun satu sama lain membentuk trabekula. Kanal nutrient yang berisi pembuluh darah dan saraf dijumpai pada tulang spons. Tulang spons terdiri dari osteosit di interior dan osteoblast atau osteoklas pada permukaan trabekula. Tulang kortikal menutupi tulang spons dan dibentuk oleh tulang berlamella yang memiliki lakuna yang tersusun dalam lingkaran konsentrik disekeliling kanal sentra yang disebut system havers. Pada septum interdental terdapat *lubang canal of Zukerkandl* dan pada septum interradicular terdapat *canal of hirschfel* tempat arteri interdental dan interradicular, vena, pembuluh getah bening dan saraf. (Chatterjee K., 2006)



Gambar 1. Komponen Penyusun Tulang . (Sumber : www.katailmu.com)

c. Sel Tulang

Selain bahan ekstraseluler atau yang dikenal dengan matriks tulang, tulang juga terdiri atas sel-sel tulang. Tulang dewasa dan yang sedang berkembang mengandung empat jenis yaitu: (Clarke B., 2008)

1. Osteoprogenitor

Osteoprogenitor merupakan sel-sel induk pluripotent yang belum berdiferensiasi, berasal dari jaringan ikat mesenkim. Sel ini biasanya ditemukan pada permukaan tulang di lapisan dalam periosteum, pada endosteum serta dalam saluran vascular dari tulang kompakta. Terdapat dua jenis sel osteoprogenitor yaitu preosteoblas yang memiliki sedikit retikulum endoplasma dan menghasilkan osteoblast dan preosteoklas yang mengandung lebih banyak mitokondria dan ribosom bebas menghasilkan osteoklas. (Clarke B., 2008).

2. Osteoblas

Osteoblas berasal dari jaringan mesenkim, merupakan sel utama dalam pembentukan tulang. Osteoblas membuat tulang baru untuk mengisi lubang yang dibuat oleh osteoklas. (Kini U. dkk., 2012) Osteoblas diturunkan dari prekursor yang dihasilkan dari sumsum tulang. Osteoblas memproduksi osteoid atau matriks tulang, berbentuk bulat, oval atau polihedral, terpisah dari matriks yang telah mengalami mineralisasi. (Clarke B., 2008) Progenitor osteoblas tidak hanya dari progenitor di sumsum, akan tetapi juga bersumber dari sel perisit dan mesenkimal yang menempel pada lapisan endotel pembuluh darah. Rerata hidup osteoblas adalah sekitar 3 minggu. Osteoblas yang berdiferensiasi penuh memproduksi dan menyekresi protein untuk matriks tulang, mengatur perubahan elektrolit cairan ekstraselular pada proses mineralisasi. Produk utama tulang dibentuk oleh osteoblas adalah kolagen tipe 1. (Manolagas, 2000)

Osteoblas mensintesis dan mensekresikan matriks ekstraselular tulang termasuk kolagen tipe 1, osteokalsin, osteopontin, osteonektin, alkalin fosfatase, proteoglikan dan *growth factors*. Banyak faktor yang dapat memengaruhi perkembangan osteoblas dari sel progenitor mesenkimal pada ligament periodontal, antara lain *bone morphogenetic proteins* (BMPs), *transforming growth factor* (TGF- β I dan II), *insulin-like growth factor* (IGF-I dan II), *platelet-derived growth factor* (PDGF), *fibroblast growth factor* (FGF), *core binding factor-1* (CBFA-1)/ *Runt Related Transcription Factor-2* (RUNX2) dan *osteoblast specific cis acting element* (OSE- 2). Osteoblas memiliki reseptor estrogen, sitokin, paratiroid hormon (PTH), *insulin derived growth factor* (IGF), dan Vitamin D3 dan saling berhubungan melalui *gap junction*. Osteoblas yang menetap pada permukaan tulang bentuknya pipih yang dinamakan *bone lining cells / resting osteoblast*. (Clarke B., 2008)

Osteoblas berperan penting dalam proses deposisi matriks tulang dan regulasi osteoklas, mononuklear dan berakhir dengan diferensiasi sel yang sangat spesifik. Osteoblas bertanggung jawab terhadap proses mineralisasi matriks tulang melalui proses sintesis kolagen tipe I serta melepaskan kalsium, magnesium, dan ion fosfat. Selama perkembangan dan maturasi, osteoblas mengekspresikan gen-gen yang spesifik dan selalu tampak dalam kelompok-kelompok sel kuboid di sepanjang permukaan sel. Osteoblas yang matang akan mensekresi osteoid, kolagen tipe I, faktor pertumbuhan, dan alkalin fosfatase. (Krishnan V. dkk., 2015)

Pembentukan osteoblast berlangsung dalam tiga fase yaitu produksi (proliferasi), maturasi matriks osteoid, kemudian dilanjutkan dengan mineralisasi. Selama fase proliferasi beberapa protein matriks ekstraseluler (*procollagen* I, TGF β , dan fibronektin) dapat dideteksi. Fase maturasi matriks ditandai dengan adanya ekspresi *alkalin fosfatase* (ALP). Melalui metode pewarnaan dapat divisualisasikan deposisi kalsium. (Zainal A. dkk., 2011)

3. Osteosit

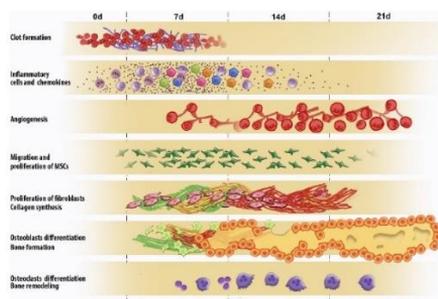
Osteosit merupakan 90% dari sel tulang terletak diantara matriks tulang yang mengalami mineralisasi. Osteosit berasal dari osteoblas yang pada akhir proses mineralisasi terhimpit oleh ekstraselular matriks, berperan dalam pemeliharaan massa dan struktur tulang. Secara mikroskopis osteosit tidak melekat langsung pada matriks sekitarnya, terpisah dari dinding lakuna dan kanalikuli daerah amorf tipis. Daerah ini berfungsi sebagai medium pertukaran metabolit. (Clarke B., 2008)

4. Osteoklas

Osteoklas berasal dari jalur hematopoetik yang juga membuat makrofag dan monosit. Osteoklas merupakan sel multinuklear besar yang terdapat di sepanjang permukaan tulang tempat terjadinya resorpsi, remodeling dan perbaikan tulang. Osteoklas sering terdapat dalam sebuah lekuk dangkal pada tulang yang teresorpsi atau terkikis secara enzimatik yang disebut lakuna *Howship*. Osteoklas dalam sitoplasmanya akan terisi oleh mitokondria guna menyediakan energi untuk proses resorpsi tulang. Osteoklas merusak matriks tulang, melekat pada permukaan tulang, memisahkan sel dengan matriks, menurunkan pH7 menjadi pH4. Keasaman ini akan melarutkan mineral dan merusak matriks sel sehingga protease keluar. Osteoklas memiliki reseptor yaitu *RANK-ligand* (RANK-L) untuk maturasi sel dan mengalami apoptosis. Sesudah proses resorpsi rampung, osteoklas menghilang mungkin berdegenerasi menjadi sel asalnya. (Clarke B., 2008)

1.2.2. PENCABUTAN GIGI DAN PENYEMBUHAN SOKET TULANG ALVEOLAR SETELAH PENCABUTAN GIGI

Pencabutan gigi merupakan suatu prosedur yang dapat menimbulkan trauma minimal dengan meninggalkan luka pada soket gigi. Proses penyembuhan luka pasca pencabutan gigi memiliki prinsip yang sama dengan penyembuhan luka pada umumnya. Proses renovasi linggir residual berlangsung segera setelah pencabutan gigi melalui aktivasi dari reaksi inflamasi. Penyembuhan luka adalah proses biologis yang kompleks yang terdiri dari proses-proses seluler terjadi secara bersamaan yang mengarah pada perbaikan atau regenerasi jaringan yang rusak. (Vieira dkk., 2015) Empat aspek penyembuhan luka sejak itu telah digambarkan sebagai komponen kunci untuk keberhasilan regenerasi jaringan manusia termasuk 1) fase hemostasis, 2) fase inflamasi, 3) fase proliferasi, dan 4) fase remodeling tulang. Setiap fase mencakup berbagai jenis sel. (Choukroun J. et al., 2017)



Gambar 2. Fase penyembuhan luka soket gigi. (Vieira et al.,2015)

1. Fase Hemostasis

Pada fase awal setelah terjadi luka, trombosit akan menempel pada luka dan menjadi aktif serta melepaskan sinyal kimiawi yang dapat meningkatkan pembekuan darah dan mengaktifkan fibrin. Trombosit saling mengikat satu sama lain membentuk koagulum pada pembuluh darah yang berperan mengontrol perdarahan. Fase ini juga dikenal sebagai fase koagulasi. Aktivasi trombosit selama hemostasis melepaskan sejumlah sitokin (misalnya kemokin dan interleukin) dan faktor pertumbuhan (misalnya *tumor necrosis factor α* (TNF- α), *transforming growth factor β* (TGF- β), *fibroblast growth factor* (FGF), *epidermal growth factor* (EGF), dan faktor individu seperti *platelet-derived growth factor* (PDGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *granulocyte macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF), dan *connective tissue growth factor* (CTGF) yang berperan dalam memodulasi proses seluler selanjutnya (migrasi sel, proliferasi, dan diferensiasi) yang penting dalam menstimulasi angiogenesis dan regenerasi tulang. (Jayaprakash R., 2017; Gomes et al., 2019)

2. Fase Inflamasi

Fase inflamasi berlangsung sejak terjadinya luka hingga hari ke-5. Fase ini didominasi oleh sel neutrofil atau *polymorphonuclear neutrophilic* (PMN) untuk melawan infeksi serta membersihkan debris matriks seluler dan benda asing. Dalam keadaan normal, jumlah neutrofil akan menurun dan dilanjutkan proses fagositosis diikuti oleh makrofag. Adanya sel makrofag meningkatkan aktivitas osteoklas yang akan mengikis permukaan dinding soket. Makrofag mengeluarkan sitokin proinflamasi, anti inflamasi dan faktor pertumbuhan seperti TNF- α , TGF- β , *interleukin 1* (IL-1), *interleukin 6* (IL-6), *interleukin 8* (IL-8), *proteinase* (enzim kolagenase), *matriks metaloproteinase* (MMPs) dan prostaglandin E2 (PGE2) yang berperan dalam proses degradasi matriks ekstraseluler yang tersisa, menstimulasi pergerakan, diferensiasi dan proliferasi sel untuk pemulihan jaringan yang rusak. (Sjuhada dkk., 2020; Ismardianita dkk., 2019)

3. Fase Proliferasi

Fase proliferasi dimulai dari hari ke-3 hingga ke-14 dan terdiri dari 2 tahap yaitu fibroplasia dan pembentukan tulang immatur (*woven bone*), ditandai dengan matriks yang didominasi oleh trombosit dan jaringan granulasi (pembuluh darah baru, fibroblas, dan makrofag). Setelah pembentukan jaringan terjadi, migrasi dan

proliferasi sel endotel menurun, sel yang berlebih akan mengalami apoptosis. Selama proses angiogenesis, sel keratinosit akan berproliferasi, bermigrasi membentuk epitel yang menutupi area luka. Pada fase ini, makrofag menghasilkan faktor pertumbuhan PDGF, FGF dan TGF- β yang menginduksi proliferasi fibroblas, bermigrasi, dan menghasilkan matriks ekstraseluler (kolagen, serat elastin dan serat retikuler) yang akan mengisi ruang luka dan menyediakan jalur untuk migrasi sel keratinosit dan osteoblas. Kemudian fibroblas akan mendegradasi matriks fibrin dan diganti dengan *glikosaminoglikan* (GAG). Dalam waktu 7 hari, mulai terbentuk *woven bone* dari osteoblas dan matriks tulang. (Shah dkk., 2020)

4. Fase Remodeling Tulang

Proses remodeling tulang melibatkan osteoblas dan osteoklas melalui proses pensinyalan parakrin dan endokrin. Osteoklas merupakan sel dengan beberapa inti sel, berkembang dari *hematopoietic stem cells* serta memiliki fungsi dalam meresorpsi tulang, sedangkan osteoblas berperan sebagai penghasil matriks organik yang terdiri atas protein kolagen dan non-kolagen serta mengatur proses mineralisasi kalsium fosfat pembentuk osteoid. Osteoblas berkembang dari osteoprogenitor yang terdapat di bagian dalam periosteum dan sumsum tulang. Proses diferensiasi osteoblas merupakan salah satu faktor penting dalam proses remodeling tulang. Pada proses proliferasi dan diferensiasi, osteoblas diatur oleh *growth factor* yang dihasilkan oleh osteoblas diantaranya *Insulin Growth Factor* (IGF I dan II), *Bone Morphogenic Proteins* (BMPs), *Fibroblas Growth Factor* (FGF), dan *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF) yang bekerja secara autokrin dan parakrin. (Kenkre dkk., 2018)

Osteoblas mengekspresikan dua sitokin yang berperan penting dalam proses osteoklastogenesis yaitu *Macrophage Colony-Stimulating Factor* (M-CSF) dan ekspresi *Receptor Activator of Nuclear Faktor- $\kappa\beta$ Ligand* (RANKL) dan menghasilkan OPG, reseptor umpan untuk RANKL, yang menghambat interaksi antara RANKL dan RANK, reseptor RANKL. Faktor-faktor perangsang resorpsi tulang bekerja pada osteoblas untuk mengatur ekspresi RANKL dan OPG. *Nuclear factor of Activated T Cell* (NFATc1) adalah faktor transkripsi master untuk diferensiasi osteoklas. (Kenkre dkk., 2018)

Osteoklas muncul oleh bergabungnya *myeloid hematopoietic precursors* yang terbentuk pada sumsum tulang. Prekursor osteoklas precursor ditarik dari sumsum tulang ke aliran darah oleh chemokines (seperti M-CSF, RANKL) dan disirkulasi hingga osteoklas precursor tertarik kembali ke tulang. (Immunol dkk., 2013) Jalur dominan yang mengatur proses diferensiasi dari osteoklas adalah jalur RANKL / RANK / OPG. Jalur ini didasarkan pada osteoblas yang menstimulasi diferensiasi osteoklas melalui membran RANKL dan pengikatan faktor ini dengan reseptor membran RANK pada prekursor osteoklas mononuklear. Diferensiasi osteoklas juga dimodulasi oleh M-CSF. Diferensiasi osteoklas oleh RANKL dihambat oleh *decoy reseptor osteoprotegerin* (OPG) yang diproduksi oleh osteoblas. (Raggatt et al., 2010)

Fase remodelling disebut juga sebagai fase pematangan. Terjadi dari hari ke 21 hingga 1 tahun. Segera setelah matriks ekstrasel terbentuk dimulailah reorganisasi. Kolagen membentuk ikatan silang yang erat dengan kolagen lain dan meningkatkan kekuatan tarik bekas luka. Selama proses penyembuhan, spesies oksigen reaktif diproduksi di lokasi luka dan aktif melawan invasi bakteri. Gangguan penyembuhan luka umumnya terjadi akibat meningkatnya konsentrasi spesies oksigen reaktif. Stres oksidatif disebabkan adanya ketidakseimbangan antara granulasi spesies oksigen reaktif dan antioksidan endogen. (Elok, 2019)

Kolagen berkembang cepat menjadi faktor utama dalam pembentukan matriks. Serabut kolagen pada awalnya terdistribusi secara acak membentuk persilangan dan beragregasi menjadi bundel fibril yang secara perlahan mengakibatkan penyembuhan jaringan dan meningkatkan kekakuan dan kekuatan ketegangan. Setelah 5 hari periode jeda terjadi peningkatan cepat dari kekuatan tahanan luka akibat fibrogenesis kolagen. Pencapaian kekuatan tegangan luka berjalan lambat. Setelah 3 minggu, kekuatan penyembuhan luka mencapai 20% dari kekuatan akhir. Kekuatan akhir luka tetap lebih lemah dibanding dengan kulit utuh, dengan kekuatan tahanan maksimal jaringan parut hanya 70 % dari kulit utuh. (Elok, 2019)

Proses remodeling tulang merupakan suatu siklus yang meliputi tahapan yang kompleks yaitu: (Morjaria dkk., 2021)

1. Fase Aktivasi (*Activation phase*).

Pada fase awal terjadi aktivasi pada permukaan tulang sebelum resorpsi melalui retraksi sel-sel lapisan tulang (osteoblas dewasa memanjang yang ada di permukaan endosteal) dan aksi kolagenase dengan penghancuran membran endosteal. Fase ini melibatkan perekrutan dan aktivasi prekursor osteoklas monosit-makrofag mononuklear dari sirkulasi, menghasilkan interaksi sel-sel prekursor osteoklas dan osteoblas. Tahapan ini mengarah pada diferensiasi, migrasi, dan fusi dari osteoklas berinti banyak yang besar. Sel-sel ini menempel pada permukaan tulang yang termineralisasi dan memulai resorpsi dengan sekresi ion hidrogen dan enzim lisosom, terutama cathepsin K dengan kemampuan menurunkan semua komponen matriks tulang, termasuk kolagen, pada pH rendah.

2. Fase Resorpsi (*Resorption phase*).

Pada fase ini, osteoklas mulai melarutkan matriks mineral dan menguraikan matriks osteoid. Proses ini diselesaikan oleh makrofag dan terjadi pelepasan *growth factor* yang terkandung dalam matriks dan terjadi perubahan pada *transforming growth factor- β* (TGF- β), *platelet-derived growth factor* (PDGF), dan *insulin-like growth factor* I dan II (IGF-I dan II). Resorpsi osteoklastik menghasilkan rongga dengan *scallop* tidak teratur pada permukaan tulang trabekuler, yang disebut *lacunae Howship*, atau kanal Haversian silinder di tulang kortikal. Pada setiap siklus *remodeling*, resorpsi tulang oleh osteoklas hanya membutuhkan waktu sekitar 2-4 minggu.

3. Fase Pembalikan (*Reversal phase*)

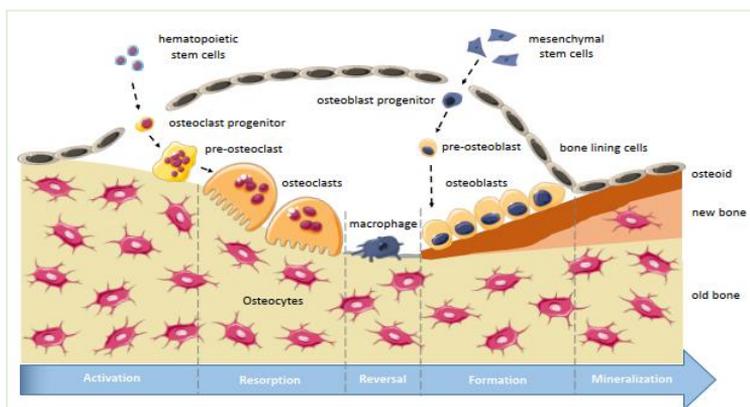
Pada tahap ini, resorpsi tulang bertransisi ke pembentukan tulang. Pada akhir resorpsi tulang, berbagai sel mononuklear akan mengisi rongga resorpsi, termasuk monosit, osteosit yang dilepaskan dari matriks tulang, dan preosteoblas, untuk memulai pembentukan tulang baru. Pensinyalan yang memediasi akhir resorpsi tulang ke awal pembentukan tulang masih belum diketahui, tetapi kemungkinan besar sinyal ini berasal faktor-faktor yang diturunkan dari matriks tulang seperti TGF- β /3, IGF-1, IGF-2, *Bone Morphogenetic Protein* (BMP), PDGF, atau faktor pertumbuhan fibroblas.

4. Fase Pembentukan (*Formation phase*).

Setelah proses resorpsi tulang oleh osteoklas, osteoklas akan lepas dari permukaan tulang dan digantikan oleh sel-sel turunan osteoblas yang akan menginduksi pembentukan tulang. Fenomena pengelompokan preosteoblas dihasilkan dan ditarik oleh faktor pertumbuhan yang dibebaskan dari matriks yang bertindak sebagai kemotaktik dan merangsang proliferasinya. Pre-osteoblas mensintesis zat *cementing* di mana jaringan baru melekat dan mengekspresikan *Bone Morphogenetic Protein* (BMP) yang bertanggung jawab untuk diferensiasi. Beberapa hari kemudian, osteoblas yang telah berdiferensiasi mensintesis matriks osteoid yang mengisi area berlubang (rongga resorpsi). Osteoblas yang tersisa akan terus mensintesis tulang sampai akhirnya berhenti dan berubah menjadi sel lapisan "diam" yang sepenuhnya menutupi permukaan tulang yang baru terbentuk dan terhubung dengan osteosit dalam matriks tulang melalui jaringan kanalikuli.

5. Fase Mineralisasi (*mineralization phase*)

Fase ini dimulai 30 hari setelah pengendapan osteoid, berakhir pada 90 hari di trabekular dan 130 hari pada tulang kortikal. Ketika siklus selesai, jumlah tulang yang terbentuk harus sama dengan jumlah tulang yang diserap kembali.



Gambar 3. Skema remodeling tulang (Morjaria dkk., 2021)

1.2.2. SOCKET PRESERVATION

Tulang alveolar seringkali mengalami kehilangan fungsi pendukungnya setelah prosedur pencabutan gigi, akibatnya volume tulang yang tersisa menjadi tidak adekuat dalam mendukung penempatan protesa pada posisi yang benar serta mengganggu estetika. (Pranskusnas et al., 2019) Penyembuhan secara alami atau tanpa pemberian intervensi mengakibatkan hilangnya lebar *ridge* yang signifikan (-2,6 hingga 4,6 mm) dan hilangnya tinggi *ridge* tulang yang signifikan secara statistik (-0,55 hingga 3,3 mm). (Nardiatmo dkk., 2019)

Sebagai solusinya, beberapa tahun terakhir dikembangkan teknik pengisian soket dengan aplikasi biomaterial dan rekonstruksi tulang. Regenerasi tulang tentunya membutuhkan migrasi sel tertentu ke area penyembuhan untuk berproliferasi dan menyediakan substrat biologis untuk pembentukan jaringan baru. Proses migrasi, proliferasi, serta diferensiasi sel ini diatur oleh sejumlah faktor yang berkoordinasi dengan sinyal ekstraseluler, *scaffold*, dan suplai darah yang memadai. (Pranskusnas et al., 2019)

Prosedur *socket preservation* dapat mempercepat proses pembentukan tulang matur dan regenerasi tulang serta menghasilkan dimensi tulang orofasial yang lebih besar dibandingkan dengan penyembuhan secara fisiologis tanpa prosedur preservasi. (Fee L, 2017) Beberapa pertimbangan dalam melakukan preservasi soket alveolar segera setelah pencabutan gigi yaitu:

1. Menstabilkan koagulum di dalam soket dan menghindari kemungkinan pengurangan volume jaringan keras yang diperlukan untuk regenerasi tulang.
2. Menempatkan *graft* ke dalam soket ekstraksi dengan menyediakan *scaffold* ke dalam komponen seluler dan vaskular untuk membentuk tulang baru. (Pranskusnas et al., 2019)

1.2.3. BONE GRAFT

Graft didefinisikan sebagai suatu bagian jaringan yang diambil dari satu tempat dan ditransplantasikan ke tempat lain, baik pada individu yang sama maupun yang berlainan. *Bone graft* adalah pilihan yang banyak digunakan untuk memperbaiki kerusakan tulang periodontal. Tujuan dari *bone grafting* adalah peningkatan perlekatan klinis, pengisian tulang di daerah defek dan regenerasi tulang baru, sementum dan ligamen periodontal. (Wallace, 2019) Idealnya, *bone graft* harus memiliki sifat biokompatibel, aman, karakteristik permukaan yang ideal, penanganan dan geometri yang sesuai serta sifat mekanis yang baik. Regenerasi tulang dapat terjadi dengan lengkap melalui tiga mekanisme yang berbeda yaitu osteogenesis, osteoinduksi, dan osteokonduksi. (Wallace, 2019)

Osteokonduksi

Osteokonduksi adalah proses yang menyediakan fondasi atau rangka sementara/perancah biologi, atau matrix fisik sebagai *scaffold* tempat deposisi tulang baru, yang sesuai dengan komposisi bentuk tulang baru di sekitar tulang mendukung diferensiasi sel-sel mesenkim untuk tumbuh di sepanjang permukaan bahan cangkok

tulang. *Scaffold* juga memfasilitasi vaskularisasi dalam pembentukan tulang baru. *Graft* osteokonduktif dapat merangsang pertumbuhan tulang dan menyebabkan aposisi tulang dari tulang yang telah ada. Osteokonduksi memfasilitasi dimensi dari *scaffold* untuk osteoblast, dan memberikan tempat migrasi dari sel-sel host dengan aktivitas osteogenik. Sifat osteokonduksi memungkinkan matriks bone graft membentuk rangka untuk membentuk tulang baru. (Atasoy et al., 2016)

Osteoinduksi

Osteoinduksi merupakan transformasi stem sel-sel mesenkimal yang tidak berdiferensiasi ke dalam osteoblast atau kondroblast melalui factor-faktor pertumbuhan yang ada hanya pada tulang hidup, mengandung berbagai sitokin seperti *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β), *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), *Insulin-like Growth Factor* (IGF), *Fibroblast Growth Factor* (FGF), *Bone Morphogenetic Protein* (BMP) yang berfungsi menarik, menstimulasi osteoprogenitor sel untuk berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi osteoblas yang selanjutnya akan memproduksi tulang yang baru. (Atasoy et al., 2016)

Osteogenesis

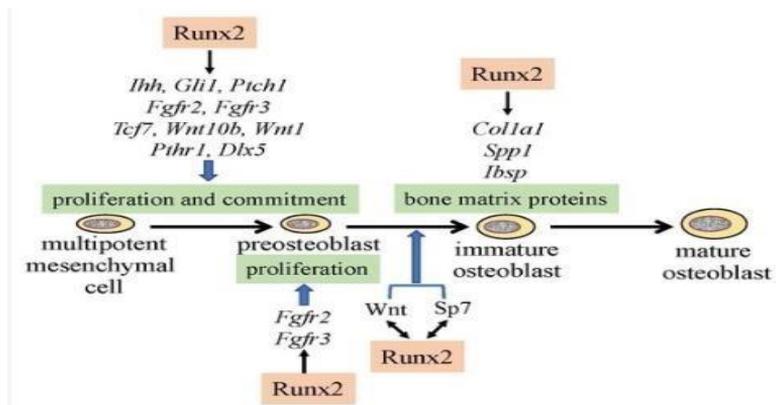
Osteogenesis merupakan proses pembentukan tulang baru oleh sel-sel osteoprogenitor donor yang berasal dari *host* atau bone graft. Sel-sel tersebut yaitu MSCs, osteoblas dan osteosit. Hanya bahan *autograft* yang terlibat dalam osteogenesis karena memiliki sel-sel osteoblas dan prekursorinya. (Roberts et al., 2012)

Berdasarkan sumbernya *bone graft* terbagi atas 4 jenis yaitu *autograft*, *allograft*, *xenograft* dan *alloplast*. *Autograft* (autogenous) diperoleh dari individu yang sama yang menerima cangkokan. Tulang *autogenous* merupakan *gold standar* karena memiliki semua karakteristik ideal dari bahan graft dan juga bersifat biokompatibel dengan potensi alergi yang sangat minim. Autograft ini kebanyakan diperoleh dari krista iliaka. Kekurangan dari autograft adalah memperpanjang prosedur pembedahan karena dibutuhkan penambahan lokasi bedah sehingga rentan terjadi komplikasi dan komplikasi *pasca-operasi*, jumlah *graft* mungkin tidak mencukupi, atau bentuknya tidak sesuai. *Allograft* bersumber dari individu yang sama, mempunyai sifat osteokonduksi dan kemungkinan osteoinduksi, tetapi tidak osteogenesis. *Xenograft* berasal dari spesies lain selain manusia, seperti sapi. *Xenograft* umumnya hanya didistribusikan sebagai matriks kalsifikasi. *Alloplast* dapat dibuat dari hidroksiapatit, mineral alami yang juga merupakan komponen mineral utama tulang, yang mungkin terbuat dari kaca bioaktif. Hidroksiapatit adalah *bone graft* sintesis, yang paling banyak digunakan sekarang di antara bahan sintesis lainnya karena sifat osteokonduksi, kekerasan dan biokompatibel. *Xenograft* dan *alloplastik* graft hanya mempunyai sifat utama sebagai osteokonduksi. (Roberts et al., 2012)

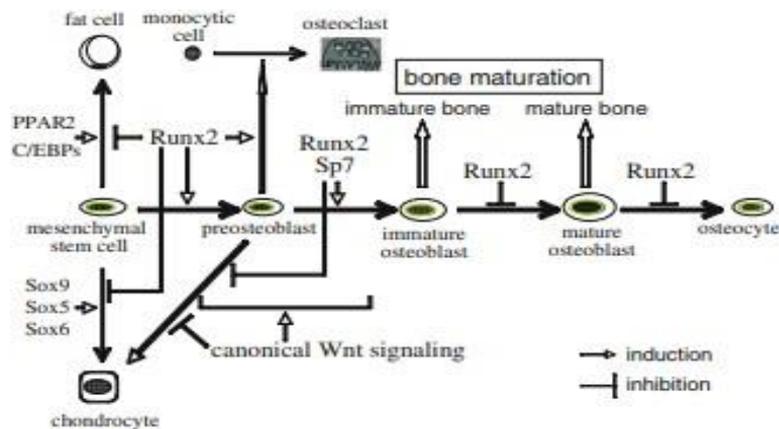
1.2.4. *RUNT-RELATED TRANSCRIPTION FACTOR-2 (RUNX-2)*

Dalam pembentukan osteoblas membutuhkan differensiasi dari sel progenitor menjadi proliferasi preosteoblasts, osteoblas menghasilkan matriks tulang, dan akhirnya menjadi osteosit atau sel pelapis tulang/ *bone-lining cells*. Marker osteoblas yang paling awal adalah *Runt-related Transcription Factor 2 (RUNX-2)* atau yang juga dikenal sebagai *Core-Binding Factor A1 (CBFA1)*, yang dibutuhkan untuk differensiasi sel progenitor sepanjang garis turunan osteoblas. Peningkatan ekspresi RUNX2 menstimulasi sel mesenkimal untuk berdiferensiasi menjadi osteoblas dan merupakan indikasi peningkatan pembentukan tulang. (Carbonare et al., 2012; Ma'arif dkk., 2022) Selain itu, RUNX-2 berperan dalam mengatur keseimbangan osteogenesis. Dengan demikian, salah satu jalur molekuler terbaik yang mengatur osteogenesis adalah faktor transkripsi RUNX-2. Penyempurnaan ekspresi RUNX-2 dan aktivitas transkripsi sangat penting untuk pembentukan tulang fisiologis dan patologis. (Kim JM. et al., 2020)

Osteoblas memiliki kemampuan berdiferensiasi menjadi adipocytes, myocytes, chondrocytes dibawah pengaturan faktor transkripsi. Diferensiasi osteoblas dikontrol oleh transcription factor RUNX-2. RUNX-2 bertanggungjawab terhadap hipertrofi kondrosit, pembentukan tulang endokondral, invasi pembuluh darah ke kartilago, mengatur kontrol fisiologis responsif gen skeletal, serta mengatur diferensiasi pluripoten sel mesenkimal menjadi osteoblas. Selama rangkaian proliferasi seluler RUNX-2 mengatur ekspresi gen gen yang mengkode osteokalsin. (Kim JM. et al., 2020)



Gambar 4. Proliferasi osteoblast oleh RUNX2 (Komori T, 2019)



Gambar 5. Diferensiasi osteoblast oleh RUNX2 (Komori T, 2019)

Untuk mendeteksi RUNX2, dapat dilakukan metode imunohistokimia. Metode ini digunakan dalam menentukan ekspresi biomarker pada jaringan melalui identifikasi konstituen jaringan (antigen) pada interaksi antigen-antibodi. Antigen/protein target dalam jaringan dikenali oleh antibodi yang sangat spesifik terhadap antigen tersebut. (Ma'arif dkk., 2022)

1.2.6. CANGKANG KEPITING RAJUNGAN

Kepiting Rajungan (*Portunus pelagicus*) merupakan salah satu anggota filum crustacea yang memiliki tubuh beruas-ruas. Dilihat dari sistematiknya rajungan termasuk ke dalam:

Kelas	: Crustasea
Sub Kelas	: Malacostraca
Ordo	: Decapoda
Sub Ordo	: Reptantia
Famili	: Portunidae
Genus	: Portunus
Spesies	: Portunus pelagicus



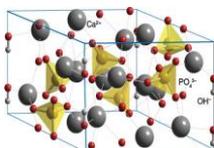
Gambar 6. Cangkang Kepiting Rajungan (<https://news.detik.com/d-3931295/>)

Cangkang Rajungan merupakan bagian terkeras dari semua komponen rajungan dan kaya kandungan mineral, terutama kalsiumnya yang cukup tinggi. Selain itu, cangkang rajungan mengandung kitin, protein, CaCO_3 sertasedikit MgCO_3 dan pigmen astaxanthin. Indonesia sebagai negara kepulauan dengan wilayah maritim yang luas dan kekayaan biota laut, salah satunya adalah kepiting rajungan. (Afriani dkk., 2016)

Di pulau Sulawesi khususnya, distribusi produksi berasal dari perairan Selat Makassar, Laut Flores, serta Teluk Bone. Kabupaten yang termasuk lima besar produsenkepiting rajungan adalah Wajo 34,0 %, Bone 23,6 %, Pangkep 17.4 %, Maros 13 % dan Jeneponto 5,7 %. (Aris B., 2009) Kepiting rajungan umumnya diekspor dalam bentuk kepiting beku, daging yang diambil yaitu daging jumbo yang dihasilkan dari daging paha, daging lump dihasilkan dari daging badan, dan daging capit yang dihasilkan di capit. Pengolahan dilakukan pada pabrik pembekuan kepiting (*cold storage*). (Younes dkk., 2015) Secara umum cangkang kepiting mengandung protein (15,6%-23,9%), kalsium karbonat (53,7%-78,4%) dan kitin (18,7%-32,2%) sehingga sangat potensial untuk diteliti dan dikembangkan manfaatnya dalam berbagai bidang. (Aprilia, 2020; Maidin, 2017)

1.2.7. HIDROKSIAPATIT

Hidroksiapatit (HA) atau disebut pula hidroksilapatit, adalah suatu bentuk mineral yang terdapat di alam dari kalsium apatit dengan rumus $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3$, akan tetapi biasanya ditulis sebagai $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ untuk menyatakan bahwa sel satuan kristal terdiri dari dua entitas. HA memiliki sifatbiokompatibilitas yang baik, karena secara kimia dan fisika kandungan mineralnya sama dengan tulang dan gigi pada manusia. (Musbir LF., 2010) Kristal HA mempunyai ukuran yang sama dengan kristal HA tulang, yaitu berkisar 20 – 50nm. Hidroksiapatit memiliki struktur kristal heksagonal dengan dimensi selnya $a = b = 9,42 \text{ \AA}$ dan $c = 6,88 \text{ \AA}$ ($1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$). Secara stokiometri Ca/P hidroksiapatit mempunyai rasio 1,67 dan secara kimia sama dengan mineral tulang manusia. Hidroksiapatit adalah komponen anorganik utama penyusun jaringan tulang. Karena memiliki kesamaan struktur kimia dengan mineral jaringan tulang manusia sehingga hidroksiapatit sintetik menunjukkan daya afinitas yang baik yaitu dapat berikatan secara kimiawi dengan tulang. (Rocha et al., 2005) Kelebihan HA adalah berpori, bioaktif, biokompatibel, dan tidak korosif. (Musbir LF., 2010)



Gambar 7: Struktur kristal hexagonal Hidroksiapatit.
(<https://www.chemtube3d.com/sshydroxyapatite/>)

Hidroksiapatit merupakan komposisi utama penyusun tulang dan gigi dengan kandungan senyawa kalsium fosfat yang paling stabil. Pemanfaatan hidroksiapatit sangat berkembang diantaranya dalam aplikasi medis antara lain untuk reparasi tulang yang mengalami kerusakan, pelapisan logam protesa (implan) untuk meningkatkan sifat biologi dan mekanik dan juga sebagai media penghantaran obat (*drug delivery*). Secara termodinamik HA sangat stabil pada pH, temperatur dan komposisi fisiologi fluida.⁷⁹ (Peroos et al., 2006)

Peneliti sering mengkaji sumber-sumber kalsium sintetis dan alami. Sumber kalsium sintetis yang umumnya digunakan untuk sintesis HA yaitu CaO, Ca(NO₃)₂, Ca(OH)₂, CaCO₃, dan CaCl₂. Sumber kalsium alami yang digunakan untuk sintesis HA umumnya mempunyai kadar kalsium yang tinggi diantaranya gypsum alam, tulang sapi, cangkang telur ayam ras dan ayam kampung, cangkang kerang rangga, dan cangkang kepiting. Sintesis HA dari bahan alami lebih baik karena bahan tersebut dapat meningkatkan sifat bioaktif dan biokompatibel. (Musbir LF., 2010)

1.2.8. KITOSAN

Kitosan pertama kali ditemukan oleh Rouget pada tahun 1859. Kitosan atau poly-β-1,4- glucosamine merupakan biopolimer alami yang terdapat di alam setelah selulosa yang memiliki rantai linier dengan rumus kimia (C₆H₁₁NO₄)_n. Kitosan adalah polisakarida alami turunan N-deasetilasi kitin dan polisakarida semikristalin yang terdiri dari unit glukosamin dan N-asetil glukosamin dalam ikatan β-(1-4)-2-asetamida-2-deoksi-D- glukopiranol. (Firdaus dkk., 2019)

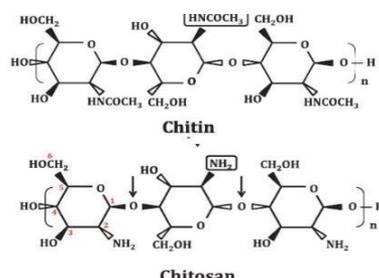
Komposisi kitosan adalah hidrogen (5,83%), karbon (40,30%), dan nitrogen (6,35%) dengan karakteristik tidak toksik, antibakteri, biodegradabel, biokompatibel, serta bioaktivitas sehingga potensial untuk dikombinasikan dengan berbagai bahan bioaktif untuk osteokonduktivitas. Kitosan dapat digunakan sebagai obat, pengantar *growth factor*, dan sebagai bahan *scaffold* untuk regenerasi tulang. (Hartomo dkk., 2019; Husain dkk., 2017)

Dalam penggunaannya, kitosan lebih mudah dimodifikasi daripada kitin dan bersifat hidrofilik yang dapat mendukung adhesi dan proliferasi sel. (Levengood et al., 2014) Kekurangan kitosan antara lain larut dalam asam dengan pH dibawah 6,0 dan sifat mekanis yang rendah. Atas pertimbangan tersebut, saat ini banyak penelitian yang mengarah ke pengembangan kombinasi material kitosan dengan bahan anorganik bioaktif (hidroksiapatit, trikalsium fosfat) atau polimer sintetis poli (vinil alkohol) dan poli (etilen glikol) dan polimer alami (kolagen) dengan tujuan meningkatkan resistensi mekanik, absorpsi protein, dan biomineralisasi. (Keller et al., 2017; Geogopoulou et al., 2018)

Kitosan merupakan deasetilasi kitin yang diperoleh secara alami dan merupakan polisakarida yang banyak ditemukan pada eksoskeleton berbagai kelas invertebrata, termasuk krustasea. Krustasea termasuk ke dalam filum arthropoda atau hewan beruas-ruas dengan eksoskeleton yang keras dan darikitin yang berlendir. Beberapa hewan krustasea termasuk udang, lobster, dan kepiting atau rajungan. (Firdaus dkk., 2019)

Kitin adalah polisakarida putih, keras, tidak elastis, dan nitrogen, bersifat hidrofobik dan tidak larut dalam air dan sebagian besar pelarut organik. Sintesis kitin melalui reduksi dua komponen besar yaitu protein dan mineral. Proses pembuatan kitin menjadi kitosan melalui tiga tahap yaitu demineralisasi (menghilangkan kandungan mineral), deproteinasi (menghilangkan protein), dan deasetilasi (menghilangkan gugus asetil). Derajat deasetilasi kitosan menunjukkan adanya jumlah gugus aminodi sepanjang rantai kimia, dihitung sebagai rasio d-glukosamin dan n-asetil d-glukosamin. Derajat deasetilasi dan berat molekul memiliki pengaruh yang kuat terhadap sifat fisikokimia dan sifat kitosan lain seperti kristalinitas, kelarutan, dan degradasi. (Hossain dkk., 2014)

Beberapa senyawa kimia yang digunakan dalam proses deproteinasi secara kimiawi yaitu NaOH, Na₂CO₃, NaHCO₃, KOH, K₂C₂O₃, KOH, K₂CO₃, Ca(OH)₂, Na₂SO₃, NaHSO₃, CaHSO₃, Na₃PO₄ dan Na₂S. NaOH dengan rentang konsentrasi 0,125-5 M merupakan senyawa kimia yang paling sering digunakan. Kandungan mineral dieliminasi melalui pengasaman menggunakan HCl. Proses pemisahan ini terlihat dengan terbentuknya gas CO₂ berupa gelembung udara pada saat larutan HCl ditambahkan dengan cangkang terdeproteinasi. (Afriani dkk., 2016) Kitin diubah menjadi kitosan dengan cara merubah gugus asetamida (-NHCOCH₃) pada kitin menjadi gugus amina (-NH₂). Kemurnian kitosan sangat bergantung pada derajat deasetilasi, semakin banyak gugus asetil yang dapat dieliminasi maka semakin tinggi nilai derajat deasetilasinya. (Ibrahim dkk., 2009)



Gambar 8. Deasetilasi Kitin Menjadi Kitosan (Ibrahim, 2009)

Pemanfaatan kitosan dalam bidang medis memang sudah terbukti. Gupta dkk melaporkan bahwa kitosan efektif dalam mempercepat penyembuhan luka dan osteogenesis awal pada soket pasca ekstraksi. (Gupta et al., 2019) Efek anti-inflamasi dari kitosan melalui proses penghambatan ekspresi protein *prostaglandin E2* dan *siklooksigenase-2*, melemahkan sitokin faktor TNF- α dan IL-1 β , serta meningkatkan ekspresi sitokin anti-inflamasi IL-10. (Djais dkk., 2021)

Dalam pemanfaatannya, material biopolimer kitosan dapat diolah dalam berbagai bentuk seperti larutan, gel, pasta, campuran, spons, membran, tablet, dan butiran mikro. Saat ini, pengembangan material hidrogel kitosan juga banyak mendapat perhatian. Kitosan dapat membentuk hidrogel superabsorben melalui ikatan silang secara kovalen dan nonkovalen. Gugus amino yang terdapat dalam kitosan menyebabkan molekul ini dapat dimodifikasi untuk menghasilkan sifat yang diinginkan. Selain itu, gugus hidroksil pada kitosan dapat berperan pada modifikasi kimia yang sesuai untuk meningkatkan kelarutan. (Wivanius dkk., 2015)

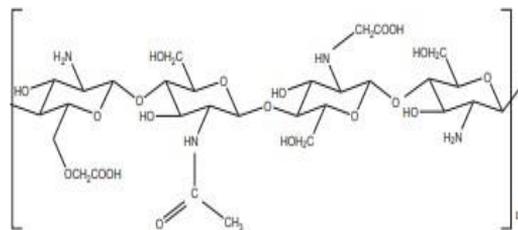
Hidrogel sebagai absorben alami adalah jaringan polimer hidrofilik yang terikat silang serta dapat menyerap air dalam jumlah besar maupun cairan biologis hingga lebih dari 99%. Gugus fungsi hidrofilik yang terdapat pada hidrogel diantaranya $-OH$, $-COOH$, $-CONH_2$, yang dapat menyerap air tanpa larut didalamnya. Hal ini disebabkan molekul-molekulnya terikat silang secara kimia maupun fisika dari rantai polimer hidrofilik. Karakteristik material polimer untuk menyusun hidrogel yaitu harus dapat mengembang (*swell*) dan mempertahankan fraksi air pada strukturnya, tetapi tidak larut dalam air. Baik material alami maupun sintetik telah banyak digunakan untuk mensintesis hidrogel. (Wivanius dkk., 2015)

Berdasarkan teknik pengkait-silang yang digunakan, teknik sintesis hidrogel dapat dikategorikan menjadi empat metode, meliputi: metode polimerisasi radikal bebas, metode fisik dengan zat pengompleks, metode kimia menggunakan crosslinker, dan melalui metode radiasi berenergi tinggi. (Fadiana dkk., 2021) Pembentukan ikatan silang pada kitosan ini berpotensi untuk meningkatkan karakteristik kitosan seperti kelarutan dalam air, atau pelarut organik, efek bakteriostatik, kemampuan pengkelat dan pengkompleks. (Wivanius dkk., 2015)

Hidrogel memiliki banyak karakteristik sehingga merupakan material yang sangat baik untuk aplikasi biomedis termasuk *drug delivery*, penyembuhan luka, regenerasi jaringan, dan terapi sel. (Singha et al., 2022) Ahsan dkk (Ahsan dkk., 2020) melaporkan efektivitas *thermosensitive chitosan* yang berbasis injeksi hidrogel sebagai *anticancer drug carrier*. (Ahsan dkk., 2020) Karakteristik lunak dan elastis meminimalkan iritasi setelah implantasi, sedangkan ketegangan interfasial yang rendah meminimalkan adhesi sel dan absorpsi protein. Karakteristik sifat biomimetik hidrogel memungkinkan hidrogel kitosan bertindak sebagai bahan pendukung untuk regenerasi jaringan dan membantu memberikan muatan obat dengan metode adsorpsi atau enkapsulasi. Ukuran hidrogel bervariasi mulai dari nanometer ke sentimeter dan dapat dengan mudah berpenetrasi ke dalam bentuk apa pun yang membatasinya. (Singha et al., 2022)

Sebagai agen *drug delivery* yang baik, "*smart hydrogel*" dapat merespon perubahan kecil dalam rangsangan lingkungan termasuk suhu, pH, enzim, cahaya, ultrasound, dan medan magnet. Struktur berpori memungkinkan untuk dapat bersinergi dengan semua jenis obat, dan dengan menyesuaikan lingkungan internal dan eksternal, *smart hydrogel* sangat potensial digunakan untuk mengontrol *drug delivery*. (Singha et al., 2022)

Dalam pembuatan hidrogel, kitosan terlebih dahulu diubah menjadi karboksimetil kitosan. Pada pembentukan karboksimetil kitosan, kitosan terlebih dahulu dibentuk dalam suasana alkali dengan menggunakan NaOH, kitosan akan mengikat ion Na^+ sehingga pada waktu direaksikan dengan asam monokloroasetat terjadi pertukaran ion. Kadar air karboksimetil kitosan sebesar 11,86% sehingga karboksimetil kitosan mempunyai kemampuan mengikat molekul air lebih kuat dibandingkan kitosan. Hal ini juga disebabkan oleh adanya gugus karboksimetil pada struktur karboksimetil kitosan. Adanya gugus karboksimetil menyebabkan lebih banyak kemungkinan terbentuknya ikatan hidrogen dengan molekul-molekul air, sehingga menyebabkan molekul-molekul air terhidrat yang mengelilingi rantai karboksimetil kitosan akan lebih banyak dibandingkan yang mengelilingi rantai kitosan. (Putra dkk., 2013)



Gambar 9. Struktur karboksimetil kitosan (Putra dkk, 2013)



Gambar 10. Hidrogel Kitosan (Wivanius dkk, 2015)

1.3. Rumusan Masalah

Apakah kombinasi material hidrogel kitosan dan hidroksiapatit dari limbah cangkang kepiting rajungan (*Portunus pelagicus*) efektif dalam meningkatkan ekspresi gen remodeling *Runt Related Transcription Factor-2* (RUNX-2) sel osteoblas pada tindakan *socket preservation* gigi *Cavia Cobaya*?

1.4. Hipotesa

Terjadi peningkatan ekspresi RUNX-2 pada soket pencabutan gigi *Cavia cobaya* pada hari ke 7, 14, dan 21 setelah aplikasi kombinasi hidrogel kitosan dan hidroksiapatit dari cangkang kepiting rajungan (*Portunus pelagicus*).

1.5. Tujuan

1.5.1. Tujuan Umum

Mempelajari efektivitas kombinasi material hidrogel kitosan dan hidroksiapatit dari limbah cangkang kepiting rajungan (*Portunus pelagicus*) dalam meningkatkan ekspresi gen remodeling *Runt Related Transcription Factor-2* (RUNX-2) sel osteoblas pada tindakan *socket preservation* gigi *Cavia Cobaya*.

1.5.2. Tujuan Khusus

Mempelajari peningkatan ekspresi gen remodeling *Runt Related Transcription Factor-2* (RUNX-2) sel osteoblas pada hari ke 7, 14, dan 21 setelah pemberian kombinasi material hidrogel kitosan dan hidroksiapatit dari limbah cangkang kepiting rajungan (*Portunus pelagicus*) pada tindakan *socket preservation* gigi *Cavia Cobaya*.

1.6. Manfaat Penelitian

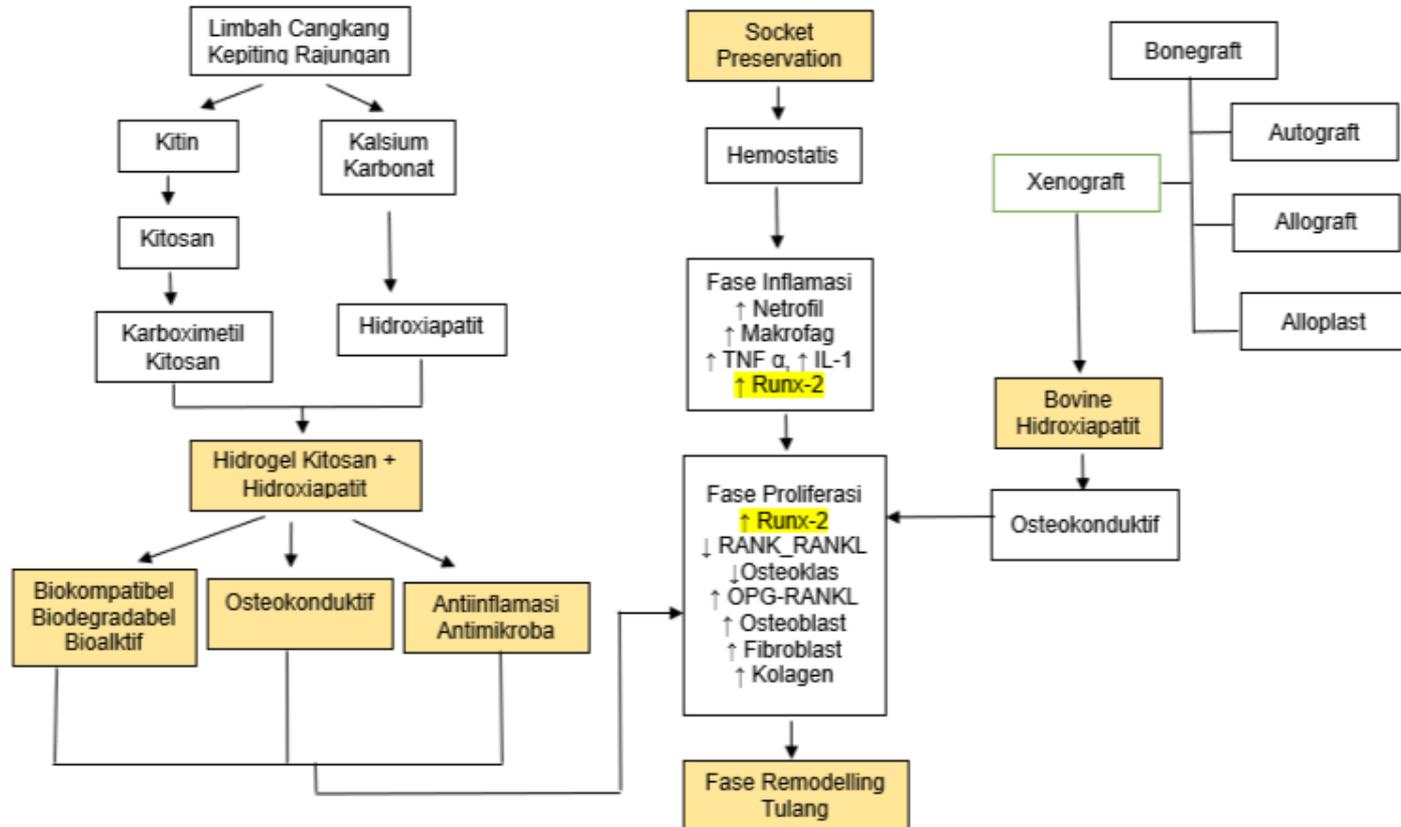
1.6.1. Kontribusi Terhadap Ilmu Pengetahuan

1. Meningkatkan pengetahuan ilmiah mengenai potensi penggunaan limbah cangkang kepiting rajungan pada bidang periodontal.
2. Meningkatkan pemanfaatan dan daya guna dari limbah cangkang kepiting rajungan sebagai komoditas biota laut di Indonesia.
3. Meningkatkan pengetahuan mengenai bahan alternatif yang dapat dimanfaatkan dalam terapi regeneratif tulang khususnya pada tindakan *socket preservation*.

1.6.2. Manfaat Praktis

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi secara klinis dan aplikatif pada bidang kedokteran gigi melalui penemuan bahan alternatif yang berasal dari bahan alami yaitu limbah cangkang kepiting rajungan dalam bentuk material hidrogel kitosan dan hidroksiapatit.

1.7. Teori Konseptual



1.7.1. Deskripsi teori konseptual

Pencabutan gigi akan melalui tahapan penyembuhan luka secara fisiologis. Prosedur *socket presevation* merupakan tindakan penambahan material regeneratif ke dalam soket gigi dengan tujuan meningkatkan dan mempercepat tahapan penyembuhan dibandingkan dengan penyembuhan secara fisiologis. Bahan alam seperti kepingan rajungan sangat potensial digunakan sebagai biomaterial regeneratif, kandungan cangkangnya yaitu kitin dapat diolah menjadi kitosan dan kalsium karbonat dapat diolah menjadi hidroksiapatit dan kemudian dikombinasikan dalam bentuk sediaan hidrogel kitosan dan hidroksiapatit.

Kombinasi bahan tersebut memiliki sifat biokompatibel, biodegradabel, bioaktif, anti inflamasi, antimikroba dan osteokonduktif yang baik. Bahan regeneratif yang umum digunakan adalah bone graft dapat berasal dari *autograft*, *allograft*, *aloplast*, dan *xenograft*. Xenograft yang mudah didapat dan sering digunakan antara lain adalah bahan *bovine hydroxiapatite* yang juga memiliki sifat osteokonduktif.

Setelah pencabutan gigi akan terjadi proses penyembuhan yang diawali oleh fase hemostasis. Pada fase tersebut terjadi pembentukan gumpalan darah mengisi soket yang kemudian digantikan dengan jaringan granulasi. Selanjutnya fase inflamasi akan berlangsung dan mengakibatkan peningkatan neutrofil, makrofag, TNF- α , IL-1, dan RUNX-2 sebagai regulator dini proses osteoblastogenesis. Fase proliferasi akan terjadi 4 hari setelah pencabutan. Pada tahap ini, terjadi peningkatan pada ekspresi RUNX-2, fibroblast, kolagen, penurunan ikatan RANK-RANKL sehingga terjadi osteoklastogenesis, dan peningkatan ikatan OPG-RANKL yang menginisiasi osteoblastogenesis.

Pemberian bahan regeneratif dan hidrogel kitosan dan hidroksiapatit yang memiliki sifat osteokonduktif akan meningkatkan ekspresi RUNX-2 sehingga dapat mempercepat proses *remodelling* tulang.

1.8. Tabel Sintesa Penelitian

No.	Author, Tahun	Metode	Hasil
1.	Shavandi A. et al, 2016	<p>Bio-perancah dikembangkan menggunakan kitosan iradiasi dari berbagai sumber - squid pen (RS) dan cangkang kepiting (RC) - dengan hidroksiapatit / β-tricalcium fosfat (HA / β-TCP) pada rasio kitosan / HA / β-TCP 50/30/20. Bio-perancah disiapkan pada dua suhu beku yang berbeda (-20°C dan -80°C) diikuti oleh liofilisasi. Untuk meningkatkan sifat mekanik, bio-perancah dihubungkan silang menggunakan natrium tripolifosfat (TPP) diikuti oleh liofilisasi. Komposisi dan morfologi bio-perancah dikarakterisasi menggunakan XRD, SEM, TEM dan μ-CT. Ukuran pori perancah berpori berkisar antara 90 hingga $220\mu\text{m}$ dan perancah memiliki porositas 70-80%. Perancah memiliki rasio penyerapan air lebih dari 10, dan biodegradasi terkontrol dalam kisaran 30-40%.</p>	<p>Tes viabilitas sel dengan selosteoblas memperlihatkan biosafon dari kitosan iradiasi tidak beracun dan biokompatibel sehingga dapat bermanfaat dalam rekayasa jaringan tulang di bidang biomedis</p>
2.	Fadhilah ND.dkk, 2016	<p>Penelitian ini menggunakan kelinci New Zealand dewasa yang dibagi menjadi dua kelompok yaitu kelompok perlakuan dan kontrol, kemudian dibuat defek pada area kondil tulang femur. Defek pada kelompok perlakuan menerima implantasi</p>	<p>Skor histologis kelompok perlakuan adalah 4 yang menandakan tulang sudah termineralisasi dan penyatuan tulang yang sempurna. Sementara itu, skor kelompok kontrol adalah 2 yang menandakan tulang</p>

		<p>scaffold IHAK dan kelompok kontrol tidak menerima apapun. Kelinci dikorbankan pada minggu ke-4 lalu dilakukan pengamatan histologis menggunakan skoring Salkeld yang telah dimodifikasi.</p>	<p>masih berbentuk kalus dengan gambaran sel kondrosit dan fibroblas. Oleh karena itu, Scaffold IHAK efektif dalam mempercepat regenerasi defek tulang femur kelinci.</p>
3.	Kamadjaja dkk, 2019	<p>Kultur sel fibroblast gingiva manusia dibagi menjadi kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan penambahan bubuk hidroksiapatit dari cangkang keping (<i>Portunus pelagicus</i>) pada konsentrasi 100 ppm, 50 ppm, dan 25 ppm. Proses sintesis hidroksiapatit dilakukan dengan pemanasan pada suhu 1000 ° C kemudian dikarakterisasi senyawa dengan SEM-EDX. Semua sampel diinkubasi dalam medium α-MEM, lalu diberikan materi MTT. Kultur di piring diperiksa menggunakan pembacaan ELISA. Hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan One-way Anova.</p>	<p>Bubuk graft hidroksiapatit dari <i>Portunus Pelagicus</i> memiliki sifat biokompatibel pada kultur sel HGF dan padakonsentrasi terendah 25 ppm memiliki biokompatibilitas yang optimal dibandingkan dengan dua konsentrasi lainnya.</p>

4.	Dahlan A. dkk, 2020	<p>Enam tikus Wistar dibagi menjadi 4 kelompok yang terdiri dari kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pada hari ke 14 dan hari ke 28. HA dari cangkang kepiting diaplikasikan pada soket tikus setelah ekstraksi gigi seri kiri bawah. Setelah hari ke-14 dan ke-28, mandibula dipotong dan set slide mikroskop HPA dibuat dengan pewarnaan Masson's Trichrome (MT). Serat kolagen terlihat menggunakan mikroskop cahaya binokular pada pembesaran 400x. Data penelitian dianalisis menggunakan uji Kruskal Wallis dan Mann-Whitney</p>	<p>Aplikasi gel hidroksiapatit dari cangkang kepiting (<i>Portunus pelagicus</i>) menunjukkan peningkatan yang signifikan dalam kepadatan serat kolagen, jumlah serat kolagen meningkat secara substansial hingga 28 hari setelah ekstraksi.</p>
5.	Djais Al. dkk, 2022	<p>Penelitian ini menggunakan sisik ikan bandeng (<i>chanos chanos</i>) kemudian di proses menjadi kitosan. Uji derajat deasetilasi dengan spektrofotometer UV-Vis, DDA diperoleh antara 92,43-92,71%. Pengujian bahan dilakukan pada marmut jantan dengan jumlah sampel 27 ekor dibagi menjadi 3 kelompok. Kelompok perlakuan di berikan kombinasi kitosan sisik ikan bandeng dengan bovine hidroksiapatit, kelompok kontrol positif di</p>	<p>Hasil penelitian menunjukkan bahwa kitosan dari sisik bandeng menghambat produksi sitokin pro-inflamasi TNF-α dan IL-6. Kitosan dari sisik bandeng meningkatkan dampak anti-inflamasi dengan menurunkan tingkat IL-6, memperpendek proses peradangan, serta mempercepat tahap proliferasi dan remodeling.</p>

		<p>beri bovine hidroksiapatit dan kontrol negatif diberi placebo. Setiap kelompok dibagi 3 berdasarkan waktu pengamatan 7, 14 dan 28 hari. Data hasil penelitian kemudian dianalisis dengan program analisis data IBM SPSS Statistic versi 21 dengan nilai signifikan $p < 0,05$</p>	
6.	Gani A. dkk, 2020	<p>Dua puluh tujuh tikus Wistar dibagi menjadi tiga kelompok. Kemudian dibuat defek tulang femur, kelompok kontrol positif diberi gel placebo, kelompok kontrol positif diberi hidroksiapatit BATAN, dan kelompok uji diberi kombinasi gel kitosan dan cangkang kepiting hidroksiapatit. Tikus Wistar dikorbankan pada hari ke 7, 14, dan 21, dan tulang paha kemudian diambil untuk analisis imunohistokimia untuk menentukan kadar IL-1 dan BMP-2. Tes Kolmogorov-Smirnov, tes Levine, dan ANOVA satu arah menganalisis data.</p>	<p>Terdapat perbedaan signifikan tingkat ekspresi IL-1 dan BMP-2 antara kelompok kitosan/hidroksiapatit, kontrol positif dan kontrol negatif pada hari ke 7, 14, dan 21, dan dapat disimpulkan bahwa kombinasi gel kitosan dan hidroksiapatit menghambat produksi sitokin proinflamasi dan meningkatkan produksi BMP-2.</p>