

**Ekspresi Receptor Activator Of Nuclear Factor-Kappa B Ligand (RANKL)
Pasca Pemberian Kalsium Karbonat dari Cangkang Kerang Mutiara (*Pinctada
Maxima*) Non-Budidaya pada Tindakan Socket Preservation**

**Expression Receptor Activator of Nuclear Factor-Kappa B Ligand (RANKL)
Post Application Calcium Carbonat from Non-Cultivated Pearl Shells
(*Pinctada Maxima*) in Socket Preservation**



AINUN ISNAENI ILHAM

J035212007

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



Optimized using
trial version
www.balesio.com

**Ekspresi *Receptor Activator of Nuclear Factor-Kappa B Ligand (RANKL)*
Pasca Pemberian Kalsium Karbonat dari Cangkang Kerang Mutiara (*Pinctada Maxima*) Non-Budidaya pada Tindakan *Socket Preservation***

AINUN ISNAENI ILHAM

J035212007



Dosen Pembimbing 1: Dr. Arni Irawaty Djais, drg., Sp. Perio., Subsp. R.P.I.D (K)

Dosen Pembimbing 2: Dr. Asdar Gani, drg., M.Kes

Dosen Penguji 1: Prof. Dr. Sri Oktawati, drg., Sp. Perio., Subsp. R.P.I.D (K)

Dosen Penguji 2: Dian Setiawati, drg., Sp.Perio., Subsp.M.P (K)

Dosen Penguji 3: Surijana Mappangara, drg., M.Kes, Sp.Perio (K)



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

**Eksresi *Receptor Activator of Nuclear Factor-Kappa B Ligand (RANKL)*
Pasca Pemberian Kalsium Karbonat dari Cangkang Kerang Mutiara (*Pinctada
Maxima*) Non-Budidaya pada Tindakan *Socket Preservation***

Tesis

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar Spesialis
Program Studi Periodonsia

Disusun dan diajukan oleh

AINUN ISNAENI ILHAM

J035212007

kepada

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



TESIS

Ekspresi *Receptor Activator of Nuclear Factor-Kappa B Ligand* (RANKL) Pasca Pemberian Kalsium Karbonat Dari Cangkang Kerang Mutiara (*Pinctada Maxima*) Non-Budidaya pada Tindakan Socket Preservation

AINUN ISNAENI ILHAM
J035212007

telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Profesi Spesialis-1 pada tanggal 4 Oktober 2024 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

pada

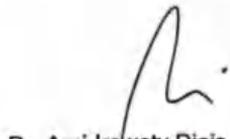
PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER GIGI SPESIALIS

**PROGRAM STUDI PERIODONSIA
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

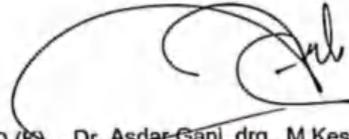
Mengesahkan:

Pembimbing Utama

Pembimbing Pendamping



Dr. Arni Irawaty Djais, drg., Sp. Perio., Subsp. R.P.I.D (K)
NIP.19750130 200812 2 002



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

Ketua Program Studi (KPS)
PPDGS Periodonsia FKG-UNHAS



drg., Sp.Perio., Subsp. R.P.I.D (K)
: 2 001

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi
UNIVERSITAS HASANUDDIN



Irfan Sugianto, drg., M.Med.Ed., PhD
NIP. 19810215 200801 1 009

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, tesis berjudul "Ekspresi *Receptor Activator of Nuclear Factor-Kappa B Ligand* (RANKL) Pasca Pemberian Kalsium Karbonat dari Cangkang Kerang Mutiara (*Pinctada Maxima*) Non-Budidaya pada Tindakan Socket Preservation" adalah benar karya saya dengan arahan dari tim pembimbing (Dr. Ami Irawaty Djais, drg., Sp. Perio., Subsp. R.P.I.D (K) sebagai Pembimbing Utama dan Dr. Asdar, drg., M.Kes. sebagai Pembimbing Pendamping). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. 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, 4 Oktober 2024



AINUN ISNAENI ILHAM
J035212007



UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian yang saya lakukan dapat terlaksana dengan sukses dan disertasi ini dapat terampungkan atas bimbingan, diskusi dan arahan Dr. Arni Irawaty Djais, drg., Sp. Perio., Subsp. R.P.I.D (K) sebagai promotor dan Dr. Asdar, drg., M.Kes. sebagai ko-promotor-1. Saya mengucapkan berlimpah terima kasih kepada mereka. Penghargaan yang tinggi juga saya sampaikan kepada Dr. Asdar, drg., M.Kes bimbingan dan masukannya mengenai penelitian yang sedang saya lakukan. Terima kasih juga saya sampaikan kepada Pulau Bontosua, Laboratorium Terpadu Teknik Kimia PNUP, Laboratorium Mikrostruktur Fakultas Teknik Universitas Muslim Indonesia, Klinik Dokter Hewan *Doc Pet*, Laboratorium Patologi Anatomi RSP UNHAS dan Laboratorium Biokimia-Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah membantu dalam proses penelitian.

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 Dr. Arni Irawaty Djais, drg., Sp. Perio., Subsp. R.P.I.D (K), 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 Kak Ersan sebagai rekan dalam tim penelitian serta teman-teman angkatan saya Venom (Kak Uul, Kak Meilin, Kak Isaura, Kak Kiki, Kak Venda) yang saling support selama masa pendidikan. Kepada kakak dan adek junior (Phoenix, Falcon, Vision, Scarlet, Ultron), saya ucapkan terima kasih telah memberikan dukungan dan selamat selama menempuh pendidikan.

Akhirnya, kepada kedua orang tua tercinta saya Ayah Dr. Ir. H. Ilham Rasyid, M.Si., IPM., ASEAN Eng dan Bunda Prof. Dr. Hj. Nirwana Dalle, SE., M.Si., Ak., CA, saya mengucapkan limpah terima kasih dan sembah sujud atas doa, pengorbanan dan motivasi mereka selama saya menempuh pendidikan. Terima kasih kepada saudara saya dr. Ahmad Zuliansyah dan Istri dr. Amaliah Hakim atas motivasi dan dukungan yang tak ternilai.

Penulis

Ainun Isnaeni Ilham



AINUN ISNAENI ILHAM. EKSPRESI RECEPTOR ACTIVATOR OF NUCLEAR FACTOR-KAPPA B LIGAND (RANKL) PASCA PEMBERIAN KALSIUM KARBONAT DARI CANGKANG KERANG MUTIARA (*Pinctada Maxima*) NON-BUDIDAYA PADA TINDAKAN SOCKET PRESERVATION (dibimbing oleh Arni Irawaty Djais dan Asdar Gani)

Latar Belakang : Biota laut yang dapat dijadikan sebagai alternatif untuk regenerasi tulang salah satunya adalah cangkang kerang mutiara (*Pinctada Maxima*). "Mother of Pearl" atau *Nacre* merupakan lapisan yang ditemukan pada cangkang kerang mutiara yang memiliki kandungan utama kalsium karbonat yang memiliki sifat biokompatibilitas, biodegradabilitas, dan osteogenik sehingga memiliki potensi sebagai alternatif terhadap biomaterial lain yang umum digunakan dalam rekayasa jaringan. **Tujuan:** mengetahui apakah Kalsium Karbonat dari Cangkang Kerang Mutiara (*Pinctada Maxima*) sebagai bahan Bone Graft dapat menurunkan ekspresi RANKL pada proses regenerasi tulang. **Metode:** Menggunakan uji penelitian eksperimen laboratoriumis dan uji klinis dengan rancangan penelitian post test only control group design. Pencabutan gigi anterior kanan mandibula dilakukan pada 27 ekor *Cavia Cobaya* kemudian dibagi menjadi tiga kelompok yaitu kelompok perlakuan yang diberi kalsium karbonat cangkang kerang mutiara (*Pinctada maxima*) non-budidaya, kontrol positif diberikan xenograft BATAN, dan kontrol negatif tidak diberikan *bone graft*. Hewan coba disacrifice pada hari ke 7,14, dan 21 kemudian dilakukan pemeriksaan imunohistokimia dengan indikator pemeriksaan yaitu RANKL. Hasil uji statistik menggunakan uji ANOVA dan uji Posthoc Tukey. **Hasil:** Ekspresi RANKL menurun secara signifikan pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol positif pada hari ke 7, 14, dan 21 dan sebaliknya sedikit mengalami peningkatan pada kelompok kontrol negatif. Namun, tidak ada perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan (*Pinctada maxima* non-budidaya) **Kesimpulan:** Kalsium karbonat cangkang kerang mutiara (*Pinctada maxima*) non-budidaya dapat menurunkan ekspresi RANKL dalam regenerasi tulang

Kata Kunci : Cangkang Kerang Mutiara (*Pinctada maxima*), xenograft, Regenerasi tulang alveolar, *Socket preservation*.



AINUN ISNAENI ILHAM. EXPRESSION OF RECEPTOR ACTIVATOR OF NUCLEAR FACTOR-KAPPA B LIGAND (RANKL) POST APPLICATION CALCIUM CARBONAT FROM NON-CULTIVATED PEARL SHELLS (PINCTADA MAXIMA) IN SOCKET PRESERVATION (Supervised by Arni Irawaty Djais dan Asdar Gani)

Background: One of the marine biota can be used as an alternative bone regeneration is the pearl shell (*Pinctada Maxima*). "Mother of Pearl" or Nacre is a layer found in pearl shells has a main content of calcium carbonate which has biocompatibility, biodegradability, and osteogenic properties has the potential as an alternative to other biomaterials used in tissue engineering. **Objective:** to determine whether Calcium Carbonate from *Pinctada Maxima* as a Bone Graft material can reduce RANKL expression in the bone regeneration process. **Method:** Using experimental laboratory research tests and clinical trials with a post-test only control group design. Mandibular right anterior tooth extraction was carried out on 27 Cavia Cobaya and then divided into three groups, the treatment group given non-cultivated pearl shell calcium carbonate (*Pinctada maxima*), positive control given BATAN xenograft, and negative control not given bone graft. The experimental animals were sacrificed on days 7, 14, and 21 and then immunohistochemical examination with indicator RANKL. The results of the statistical test used ANOVA test and Tukey Posthoc test. **Results:** RANKL expression decreased significantly in the treatment group and the positive control group on days 7, 14, and 21 and conversely slightly increased in the negative control group. However, there was no significant difference between the treatment groups (non-cultivated *Pinctada maxima*) **Conclusion:** Calcium carbonate from non-cultivated pearl shells *Pinctada maxima* can reduce RANKL of bone formation.

Keywords: Pearl shells (*Pinctada maxima*), xenograft, Alveolar bone regeneration, Socket preservation.



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR ISTILAH	xiii
DAFTAR SINGKATAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Teori.....	3
1.2.1 Tulang Alveolar.....	3
1.2.2 Pencabutan Gigi	5
1.2.3 Penyembuhan Luka Pasca Pencabutan Gigi.....	5
1.2.4 Hubungan Ekspresi RANKL dalam <i>Remodelling</i> Tulang	8
1.2.5 <i>Socket Preservation</i>	9
1.2.6 Kerang Mutiara (<i>Pinctada Maxima</i>)	11
1.2.7 Kalsium Karbonat	14
1.2.8 Sintesa Penelitian	15
1.3 Perumusan Masalah	18
1.4 Hipotesa	18
1.5 Tujuan Penelitian.....	19
1.5.1 Tujuan Umum	19
1.5.2 Tujuan Khusus	19
1.6 Manfaat Penelitian.....	19
1.6.1 Manfaat Pengembangan Ilmu.....	19
1.6.2 Manfaat Praktis.....	19
1.7 Teori Konseptual.....	19
1.7.1 Kerangka Teori.....	20
1.7.2 Kerangka Konsep	21
1.7.3 Deskripsi Teori Konseptual	22
BAB II METODE PENELITIAN	
2.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	23
2.1.1 Tempat Penelitian	23
2.1.2 Waktu Penelitian	23
2.2 Bahan dan Alat Penelitian.....	23
Bahan Pembuatan Bubuk Kalsium karbonat	23
Bahan Pemeliharaan Hewan Coba	23
Bahan Perlakuan Hewan Coba.....	23
Alat Penelitian	25
Desain Penelitian.....	25
Penentuan Sumber Data (Penentuan Besar Sampel).....	25
Prosedur Operasional.....	26



2.4 Pelaksanaan Penelitian.....	26
2.4.1 Persiapan Penelitian.....	26
2.4.2 Jalannya Penelitian.....	26
2.4.3 Alur Penelitian.....	29
2.4.4 Etik Penelitian.....	30
2.5 Parameter Pengamatan.....	30
2.5.1 Analisis Data.....	30
BAB III HASIL PENELITIAN	31
BAB IV PEMBAHASAN.....	37
BAB V SIMPULAN DAN SARAN.....	40
DAFTAR PUSTAKA	41
LAMPIRAN.....	46



DAFTAR TABEL

1. Tabel 1. Sintesa penelitian 15
2. Tabel 2. Perbandingan RANKL berdasarkan kelompok perlakuan 32
3. Tabel 3. Uji Posthoc LSD Ekspresi RANKL antara kelompok Perlakuan 33



DAFTAR GAMBAR

1. Gambar 1. Tulang alveolar.....	3
2. Gambar 2. Gambaran interaksi seluler antara osteoklas, osteoblas, dan osteosit dalam remodeling tulang.....	8
3. Gambar 3. Anatomi kerang mutiara	12
4. Gambar 4. Sifat kalsium karbonat dan kegunaannya dalam dunia medis ..	14
5. Gambar 5. Spektrum FTIR Cangkang Kerang Mutiara (<i>Pinctada Maxima</i>)	31
6. Gambar 6. Hasil Uji SEM dengan pembesaran 100x.....	32
7. Gambar 7. Grafik perbandingan ekspresi RANKL antara kelompok perlakuan pada hari ke-7,14, dan 21	34
8. Gambar 8. Hasil pengamatan ekspresi RANKL dengan pemeriksaan imunohistokimia (IHC) pada hari ke-7.....	34
9. Gambar 8. Hasil pengamatan ekspresi RANKL dengan pemeriksaan imunohistokimia (IHC) pada hari ke-14.....	35
10. Gambar 8. Hasil pengamatan ekspresi RANKL dengan pemeriksaan imunohistokimia (IHC) pada hari ke-21.....	35



DAFTAR ISTILAH

Istilah	Arti dan Penjelasan
Agregasi	Pengumpulan atau pengelompokan
<i>Scaffold</i>	Perancah atau suatu struktur sementara yang digunakan untuk menyangga suatu konstruksi
Sel progenitor	Sel dengan kemampuan untuk terdiferensiasi menjadi suatu sel tertentu (sel punca)
Prekursor	Senyawa yang berpartisipasi dalam reaksi kimia yang menghasilkan sen
Ligan	Molekul sederhana yang bertindak sebagai penyusun electron pada senyawa kompleks



DAFTAR SINGKATAN

Singkatan / Lambang	Arti dan Penjelasan
CaCO ³	Kasium Karbonat
RANK	<i>Receptor Activator of Nuclear Factor κB</i>
RANKL	<i>Receptor Activator of Nuclear Factor κB-Ligan</i>
OPG	Osteoprotogerin
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNF α	Tumor Necrosis Factor Alfa
IL-1	Interleukin 1
IL-2	Interleukin 2
NFκB	Nuclear Factor-kappa Beta
BMP-2	Bone Morphogenetic-2
mCS-F	Faktor Stimulasi Koloni Makrofag
CA ²⁺	Ion Kalsium



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pencabutan gigi dianggap sebagai salah satu perawatan yang paling umum dilakukan dalam kedokteran gigi. (Pranskunas, Galindo-Moreno and Padi-al-Molina, 2019). Setelah pencabutan gigi, perdarahan terjadi di dalam soket gigi diikuti oleh inisiasi mediator inflamasi dan produksi gumpalan darah yang akan menutupi soket pencabutan. Perubahan dimensi pada tinggi dan lebar tulang alveolar akan terjadi dalam enam bulan pertama setelah pencabutan gigi, sehingga tidak mendukung untuk penempatan protesa atau implan gigi. Tulang alveolar akan mengalami perubahan tersebut karena *remodelling* dan resorpsi fisiologis. Resorpsi yang terjadi mencapai 50% dari lebar *alveolar ridge* pada tahun pertama. Untuk mempertahankan morfologi *ridge* yang tersisa dan mencegah resorpsi yang berlebihan dapat dilakukan dengan prosedur *alveolar ridge preservation* atau *socket preservation*. (Kondo *et al.*, 2023; Sukpaita *et al.*, 2023). *Socket preservation* merupakan tindakan bedah dengan menambahkan beberapa bahan *graft* ke dalam soket sebagai *scaffold* untuk regenerasi tulang. (Yankov, 2023)

Dalam beberapa dekade terakhir, bahan pengganti tulang dengan penggunaan *bone graft* semakin umum digunakan dalam tindakan bedah. berbagai macam bahan telah dikembangkan dan tersedia di pasaran. Bahan *graft* yang menjadi *gold standard* adalah tulang autologus karena mengandung sel dari pasien sendiri, faktor pertumbuhan, dan biomolekul yang dibutuhkan untuk osteogenesis serta memiliki biokompatibilitas, dan sifat mekanik yang sesuai untuk penyembuhan dan regenerasi tulang. Namun dalam praktiknya, keterbatasan seperti kebutuhan lokasi bedah sekunder untuk mengambil *graft*, morbiditas donosit yang signifikan, keterbatasan kuantitas, dan potensi komplikasi telah mendorong pengembangan dan studi bahan *graft* alternatif. Bahan *graft* tulang alternatif meliputi xenograft, allograft, dan alloplast. Xenograft diperoleh dari spesies yang berbeda salah satunya dapat berasal dari biota laut.

Di Indonesia bahan baku alami terutama yang berasal dari biota laut mudah ditemukan, relatif murah dan proses produksinya sederhana. Beberapa kandungan bahan aktif dari biota laut dapat dimanfaatkan untuk regenerasi jaringan keras dan



dentin, maupun ligamen periodontal yang rusak atau hilang odontal. (Chandha *et al.*, 2022; Montanhini *et al.*, 2023; Cruz *et al.*, 2024). Biota laut yang dapat dijadikan sebagai terasi tulang salah satunya adalah cangkang kerang mutiara Cangkang kerang mutiara telah dibudidayakan di Kepulauan Selatan dan memiliki sejarah panjang dalam penelitian ., 2022).

“*Mother of Pearl*” atau *Nacre* merupakan lapisan yang ditemukan pada cangkang kerang mutiara yang berfungsi sebagai proteksi apabila benda asing atau *foreign bodies* masuk. *Nacre* memiliki kandungan utama kalsium karbonat yang memiliki sifat biokompatibilitas, biodegradabilitas, dan osteogenik sehingga memiliki potensi sebagai alternatif terhadap biomaterial lain yang umum digunakan dalam rekayasa jaringan. *Nacre* telah terbukti memfasilitasi proliferasi osteoblas dan mempercepat produksi dan mineralisasi matriks ekstraseluler. (Gerhard *et al.*, 2017; Alakpa *et al.*, 2018; Chandha *et al.*, 2022; Patty *et al.*, 2022)

Cangkang kerang mutiara budidaya memiliki perbedaan dari cangkang kerang mutiara non-budidaya, yaitu kualitas dari *nacre* yang cenderung lebih rendah jika dibandingkan non-budidaya karena telah melalui proses panen yang cenderung mengawinkan populasi yang sama secara berulang kali. Kualitas *nacre* yang lebih rendah akan berdampak pada kualitas dan kuantitas dari aragonite yang ditemukan pada cangkang kerang, yang berimbas pada kurangnya kalsium karbonat yang disintesa. (Lind *et al.*, 2009; Blay *et al.*, 2014; Homkrajae *et al.*, 2021)

Cangkang kerang mutiara merupakan bahan biogenik yang tinggi kalsium karbonat. (Patty *et al.*, 2022) Kalsium karbonat mampu meningkatkan biokompatibilitas dengan mengaktifkan sinyal kimiawi osteoblas sehingga mendorong pembentukan tulang. Oleh karena itu, cangkang kerang mutiara berpotensi untuk dijadikan sebagai bahan alternatif yang dapat mempercepat proses regenerasi tulang. (Biomimetic *et al.*, 2024)

Penelitian sebelumnya yang telah menggunakan cangkang kerang mutiara diantaranya Chandha MH *et al* melakukan penelitian dengan cangkang kerang mutiara yang diproses menjadi bubuk dan diimplantasikan pada defek tulang yang dibuat pada marmut dan menunjukkan potensi osteogenik dari hidroksiapatit cangkang kerang mutiara dengan adanya peningkatan ekspresi dari *Osteoprotegerin* (OPG) dan *Bone Morphogenetic Protein* (BMP2). (Chandha *et al.*, 2022)

Penggunaan *bone graft* sebagai bahan pengisi dan *scaffolds* di dalam defek tulang mendukung terjadinya *remodelling* tulang alveolar dan membantu mempercepat proses penyembuhan melalui berbagai tahapan diferensiasi osteoblas. Di sisi lain, untuk memodulasi diferensiasi monosit ke osteoklas, osteoblas akan melepaskan OPG dan *Receptor Activator of Nuclear Factor-Kappa β Ligand* (RANKL) serta *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF). (Kondo *et al.*, 2023)

RANK, RANKL, dan osteoprotegerin (OPG) adalah 3 komponen penting dalam komunikasi antar sel osteoblas serta mempengaruhi kepadatan massa tulang melalui interaksi antara sel osteoblas dan osteoklas. RANKL dan OPG adalah faktor penyembuhan tulang yang memainkan peran penting dalam komunikasi antar sel. RANKL akan berikatan dengan RANK, sehingga menginduksi diferensiasi osteoklas. Ikatan RANK-RANKL akan menginisiasi diferensiasi osteoklas menjadi osteoklas matang, menstimulasi kapasitas resorpsi tulang, dan meningkatkan apoptosis osteoklas. Dalam proses ini, OPG bertindak



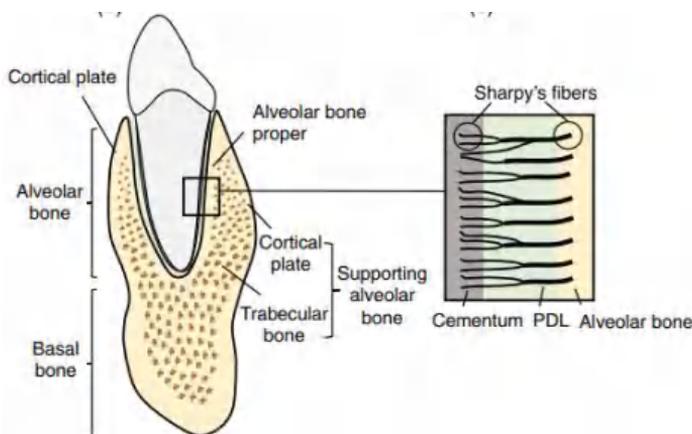
sebagai inhibitor, mencegah RANKL berikatan dengan RANK dengan cara berikatan dengan RANKL. (Tobeiha *et al.*, 2020; Kresnoadi, Laksono and Dahlan, 2023)

Berdasarkan uraian di atas, maka penulis tertarik untuk meneliti regenerasi tulang menggunakan kalsium karbonat dari cangkang kerang mutiara (*pinctada maxima*) non-budidaya melalui analisis ekspresi RANKL pada tindakan *socket preservation*.

1.2 Teori

1.2.1 Tulang Alveolar

Tulang alveolar merupakan struktur kompleks yang terdapat pada tulang basal rahang atas dan rahang bawah serta membentuk soket gigi. Tulang alveolar melekat pada gigi melalui serat jaringan ikat yang disebut ligamen periodontal. (Omi and Mishina, 2022)



Gambar 1. Struktur Tulang Alveolar.

Tulang alveolar bertumpu pada tulang basal rahang bawah dan rahang atas, dan terdiri dari *alveolar bone proper* dan *supporting alveolar bone*. Tulang trabekula terletak di antara tulang alveolar dan tulang kortikal. Serabut *Sharpey* merupakan kumpulan serabut kolagen ligamen periodontal yang tepat berada pada tulang alveolar dan sementum. (Omi and Mishina, 2022)

Tulang alveolar terdiri dari dua komponen dasar, yaitu matriks ekstraseluler (Nayak, Uppoor and Abhay, 2021)



morphogenetic protein, sialoprotein, osteokalsin, osteonektin, proteoglikan, dan fosfoprotein

Komponen Seluler

Tulang alveolar terdiri dari jenis sel khusus yang terlibat dalam berbagai fungsi dan proses remodeling. Sel-sel tersebut adalah sebagai berikut:

1. Osteoblas

Osteoblas bertanggung jawab atas pembentukan tulang melalui sintesis matriks tulang, kolagen tipe I, dan regulasi mineralisasi hingga maturasi. Sel-sel ini ditemukan pada permukaan tulang yang baru terbentuk dan biasanya berbentuk memanjang atau berbentuk kubus. Osteoblas adalah sel yang berkembang dengan baik, tidak berinti, dengan retikulum endoplasma yang tidak beraturan, aparatus golgi agak besar, dan beberapa vesikula sekretori. Osteoblas biasanya bekerja bersama untuk membangun tulang baru yang disebut osteoid. Setelah pembentukan tulang baru di tempat tertentu selesai, sel-sel ini menjadi berbentuk pipih melapisi permukaan tulang. Sel-sel ini juga disebut sebagai sel pelapis yang mengatur pengangkutan kalsium dari dan ke dalam tulang. Pada beberapa kesempatan, sel-sel ini dipengaruhi oleh hormon yang memungkinkannya mengeluarkan protein khusus yang menyebabkan aktivasi osteoklas.

2. Osteoklas (sel pemecah tulang)

Osteoklas adalah sel terpenting pada resorpsi tulang. Sel-sel berinti banyak, berbentuk oval, dan bercabang. Osteoklas berasal dari sirkulasi monosit atau sumsum tulang. Sel-sel ini terletak di permukaan tulang yang berdekatan dengan rongga yang disebut sebagai lakuna Howship. Bagian sel yang berdekatan dengan permukaan tulang menunjukkan batas-batas yang tidak beraturan yang mengindikasikan zona aktivitas resorpsi di mana pertukaran ion dan sekresi protein terjadi. Di sekeliling batas yang tidak beraturan tersebut terdapat zona yang jelas yang menggambarkan bagian tulang alveolar yang sehat dan tidak terlibat yang mengandung sitoplasma yang secara eksklusif diyakini berhubungan dengan pengikatan sel.

Aktivasi dan diferensiasi osteoklas dikendalikan oleh dua sitokin penting diantaranya *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) dan RANKL. Kedua faktor ini mengaktifasi faktor transkripsi dan Level gen osteoklas. Pembentukan osteoklas terjadi saat *Receptor Activator of Nuclear Factor-Kappa β Ligan* (RANKL) berikatan dengan *Receptor Activator of Nuclear Factor-Kappa β* (RANK), dimana steoklastogenesis. Di sisi lain OPG yang disekresikan oleh gingiva, dan fibroblast periodontal berikatan dengan RANKL, RANK/RANKL sehingga menghambat osteoklastogenesis. (Omi



3. Osteosit

Osteosit berasal dari osteoblas. Ketika osteoblas selama *remodelling* tulang mengeluarkan matriks tulang baru, beberapa di antaranya terjebak ke dalam matriks dan membentuk osteosit. Pada pembentukan osteosit, ukuran sel-sel ini berkurang karena ketidakmampuan untuk mensintesis matriks baru. Ruang dalam matriks tulang yang ditempati oleh osteosit disebut lakuna osteositik. Osteosit memiliki proses radiasi yang meluas ke kanalikuli dan berfungsi sebagai sumber untuk mengambil oksigen dan nutrisi untuk sel melalui darah dan sebagai tambahan juga membantu membuang sisa metabolisme. Meskipun sel utama yang terlibat dalam resorpsi tulang adalah osteoklas, dalam situasi tertentu yang jarang terjadi, osteosit juga dilaporkan dapat menyebabkan resorpsi tulang dan proses ini disebut sebagai osteolisis osteositik.

1.2.2 Pencabutan Gigi

Pencabutan gigi menyebabkan resorpsi tulang alveolar yang dimulai dengan cepat dan berlanjut selama bertahun-tahun. Kehilangan tulang alveolar selama 12 bulan pertama setelah pencabutan gigi adalah 11 - 22% dari tinggi tulang alveolar dan 29 - 63% dari lebarnya, sedangkan dua pertiga dari *ridge* mengalami penurunan selama 3 bulan pertama setelah pencabutan gigi. Tulang bukal yang tipis menyebabkan perubahan dimensi *alveolar ridge* yang besar, terutama pada daerah estetik dan premolar. Sedangkan pada daerah posterior, resorpsi *alveolar ridge* mengakibatkan penurunan tinggi tulang vertikal, yang memerlukan elevasi dasar sinus di rahang atas dan penggunaan implan gigi. Biasanya resorpsi lebih besar pada bagian kortikal bukal dibandingkan dengan sisi lingual. (Stumbras *et al.*, 2019)

Pencabutan gigi pada pasien dengan biotipe periodontal dan dinding tulang bukal yang tipis tidak hanya menyebabkan perubahan dimensi tulang tetapi juga resesi jaringan lunak. Resorpsi *ridge alveolar* terbesar dapat terjadi pada kasus gigi yang mengalami masalah periodontal atau endodontik, trauma yang menyebabkan kehilangan gigi, atau pencabutan gigi secara agresif yang mengakibatkan patahnya dinding tulang bukal. Dalam keadaan ini dan tanpa adanya pertumbuhan jaringan fibrosa penghalang dinding tulang ke dalam soket pasca ekstraksi, mengganggu regenerasi tulang alveolar dan menyebabkan resorpsi intensif pada *alveolar ridge*. (Stumbras *et al.*, 2019)

1.2.3 Penyembuhan Luka Pasca Pencabutan Gigi



Luka pada soket gigi pasca pencabutan gigi secara fisiologis mengalami penyembuhan yang terdiri atas penyembuhan jaringan lunak dan jaringan keras. Jaringan lunak yang mengalami penyembuhan adalah epitel gingiva, sedangkan jaringan keras yang mengalami penyembuhan adalah jaringan tulang alveolar. (Raditya Ningsih *et al.*, 2019)

Penyembuhan luka secara normal terjadi dengan beberapa proses yang melibatkan sel inflamasi serta faktor pertumbuhan yang saling

mempengaruhi pada setiap fase penyembuhan. Tahapan penyembuhan luka pada daerah bekas pencabutan terdiri atas beberapa fase, yaitu fase koagulasi dan hemostasis, inflamasi, proliferasi, serta proses *remodelling* tulang. (Primadina, Basori and Perdanakusuma, 2019)

Fase Koagulasi dan Hemostasis

Fase hemostasis terjadi di awal tahapan dari proses penyembuhan luka. Setelah pencabutan gigi, pembuluh darah yang terputus akan menyebabkan pendarahan, soket bekas pencabutan mulai terisi dengan darah, kemudian mengaktifkan faktor koagulasi intrinsik dan ekstrinsik, yang mengarah ke agregasi platelet dan pembentukan bekuan darah, yang terdiri dari sel darah merah dan putih dengan trombosit yang semuanya berada dalam jaringan fibrin. Dalam 7 hari pertama, bekuan darah ini digantikan oleh jaringan granulasi yang terutama terdiri dari sejumlah besar pembuluh darah yang tertanam dalam jaringan ikat sel mesenkim dan leukosit. (Primadina, Basori and Perdanakusuma, 2019; Udeabor *et al.*, 2023)

Proses pembentukan bekuan pada soket mengikuti kaskade koagulasi yang telah terbentuk. Pendarahan setelah pencabutan gigi akan menyebabkan interaksi trombosit dengan sel-sel endotel dan matriks ekstraseluler yang terbuka, menyebabkan agregasi trombosit dan selanjutnya pembentukan bekuan fibrin. Selain membantu mencapai hemostasis, bekuan darah awal yang mengisi soket juga menyediakan kerangka atau *scaffold* untuk adhesi sel yang akan memainkan peran penting dalam tahap penyembuhan soket lainnya. Bekuan darah dan trombosit yang teraktivasi, bersama dengan sel endotel dan leukosit, melepaskan berbagai sitokin dan faktor pertumbuhan yang memodulasi tahap inflamasi penyembuhan soket. (Udeabor *et al.*, 2023)

Fase Inflamasi

Fase ini sebenarnya bersamaan dengan hemostasis, dan digambarkan sebagai awal tahap penyembuhan luka. Proses inflamasi dianggap memiliki peran penting dalam proses penyembuhan dan regenerasi tulang dengan cara mengaktifasi respon inflamasi humoral dan seluler. Fase ini dimulai dalam waktu 48 hingga 72 jam setelah ekstraksi, terjadi rekrutmen, migrasi, diferensiasi, dan proliferasi sel inflamasi sebagai respon terhadap pelepasan sitokin dan faktor pertumbuhan. Sejumlah besar sel inflamasi ini bermigrasi ke soket penyembuhan dan membantu membersihkan sisa-sisa, termasuk bekuan darah, untuk mencegah jaringan lain dan membantu untuk membuka jalan bagi jaringan baru. (Peate and Glencross, 2015; Udeabor *et al.*, 2023)



sitokin dan faktor pertumbuhan memainkan peran berbeda dalam penyembuhan. Misalnya, *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF) dan *Transforming Growth Factor- α* menarik neutrofil ke lokasi luka. *Transforming Growth Factor- β* membantu mengubah monosit yang bersirkulasi menjadi

makrofag dan *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) yang dilepaskan trombosit dan *Fibroblast Growth Factor* yang dilepaskan makrofag (FGF) juga membantu pembentukan *Extracellulrr Matrix* (ECM) dan angiogenesis. (Udeabor *et al.*, 2023)

Neutrofil mendominasi pada tahap awal, diikuti oleh makrofag dan kemudian limfosit. Sel-sel ini memfagositosis bekuan darah dan jaringan nekrotik. Makrofag juga melepaskan berbagai faktor pertumbuhan, seperti FGF, TGF- α , TGF- β , dan *Epidermal Growth Factor* (EGF), yang mengaktifkan fibroblas dan osteoblas seiring dengan penyembuhan soket. (Udeabor *et al.*, 2023)

Fase Proliferasi

Fase proliferasi berlangsung mulai hari ke-3 hingga 14 ditandai dengan pergantian matriks provisional yang didominasi oleh platelet dan makrofag secara bertahap digantikan oleh migrasi sel fibroblas dan deposisi sintesis matriks ekstraseluler. (Primadina, Basori and Perdanakusuma, 2019)

Peningkatan jumlah fibroblas pada daerah luka merupakan kombinasi dari proliferasi dan migrasi, yang biasa dikenal dengan istilah fibroplasia. Fibroplasia terjadi dengan melibatkan deposisi cepat *provisional matrix*. Pada tahap ini migrasi dan proliferasi fibroblas yang cepat terjadi, serta peningkatan sintesis kolagen dan protein matriks ekstraseluler lainnya. (Udeabor *et al.*, 2023)

Tahap penyembuhan soket ini sering dilaporkan terjadi dalam dua fase: fibroplasia dan pembentukan *woven bone*. *Provisional matrix* akan secara progresif menggantikan jaringan granulasi dan sisa-sisa ligamen periodontal seiring dengan perkembangan tahap ini. *Provisional matrix* sebagian besar terdiri dari sel-sel mesenkim padat dalam matriks jaringan ikat yang kaya akan kolagen dengan banyak pembuluh darah dan sedikit leukosit mononuklear. (Udeabor *et al.*, 2023)

Kehadiran pembuluh darah yang melimpah di dalam *provisional matrix* dan sel-sel *osteoprogenitor* mengakibatkan terbentuknya *woven bone* terutama di sekitar struktur pembuluh darah dan mengelilingi pembuluh darah. *Woven bone* pada dasarnya adalah jaringan termineralisasi dalam matriks jaringan ikat yang dilapisi oleh osteoblas dan mengandung sejumlah besar osteosit. (Udeabor *et al.*, 2023) Hampir seluruh jaringan granulasi digantikan oleh *woven bone* dalam waktu 6 sampai 8 minggu setelah penyembuhan soket, namun jaringan tersebut teridentifikasi paling cepat 2 minggu pasca ekstraksi. (Udeabor *et al.*, 2023)



Remodelling

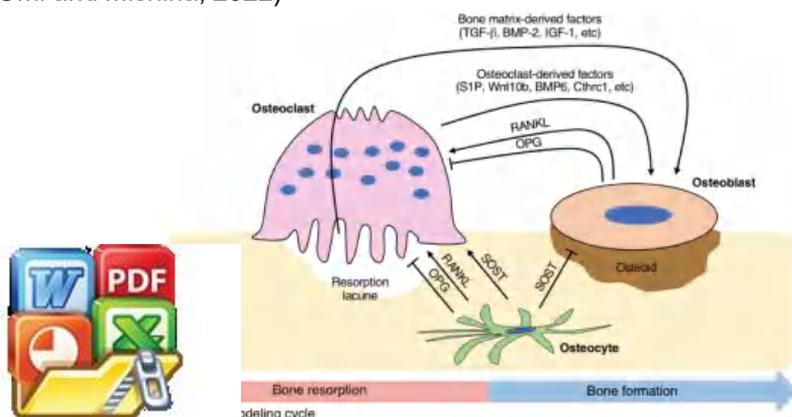
mulai dua hingga tiga minggu setelah timbulnya luka dan dapat selesai dalam waktu satu tahun atau lebih. (Gonzalez *et al.*, 2016) Fase ini merupakan akhir dari penyembuhan luka soket pasca pencabutan gigi yang ditandai dengan pergantian *woven bone* menjadi tulang yang matang. *Modelling* merujuk pada perubahan struktur tulang dengan modifikasi pada

bentuknya sedangkan *remodelling* adalah perubahan pada struktur tulang tanpa modifikasi pada bentuknya. Oleh karena itu, dalam konteks ini, perletakan tulang lamela dan sumsum tulang untuk menggantikan *woven bone* di dalam soket adalah *fase remodelling*, sedangkan perubahan dimensi yang terjadi pada tulang alveolar sebagai akibat resorpsi adalah fase *modelling*. Durasi remodeling tulang bervariasi pada setiap individu dan mungkin memerlukan waktu beberapa bulan atau tahun. (Udeabor *et al.*, 2023)

Sel utama yang berperan penting pada fase ini adalah osteoblas dan osteoklas. Remodeling tulang merupakan proses yang sangat kompleks dimana tulang tua diganti dengan tulang baru, dengan siklus yang terdiri dari tiga fase yaitu inisiasi resorpsi tulang oleh osteoklas, transisi (periode reversal) dari resorpsi ke pembentukan tulang baru, dan pembentukan tulang oleh osteoblas. Proses ini terjadi karena tindakan terkoordinasi dari osteoklas, osteoblas, osteosit, dan sel lapisan tulang yang bersama-sama membentuk struktur anatomi sementara yang disebut *basic multicellular unit* (BMU). Aktivitas osteoblas dan osteoklas bertanggung jawab dalam fase *modelling* dan *remodelling* soket alveolar dan sejumlah faktor pertumbuhan yang penting dalam memodulasi fase ini, seperti *Runt-Related Transcription Factor 2* (RUNX2), osteokalsin (OCN), osteopontin (OPN), osterix (OST), RANK, RANKL, dan OPG. Oleh karena itu, fase *modelling* dan *remodelling* akan menghasilkan perubahan dimensi pada *ridge alveolar edentulous* dengan penurunan tinggi dan volume *ridge* secara keseluruhan. (Udeabor *et al.*, 2023)

1.2.4 Hubungan Ekspresi RANKL dalam Remodelling Tulang

Proses *remodelling* melibatkan sel-sel tulang termasuk osteoklas, osteoblas, dan osteosit. Jumlah tulang yang mengalami resorpsi oleh osteoklas sesuai dengan jumlah tulang yang baru dibentuk oleh osteoblas dan dengan demikian massa tulang tetap terjaga. Sistem ini dikenal sebagai kopling dan osteoklas memainkan peran penting dalam mengendalikan keseimbangan pembentukan dan resorpsi tulang. (Omi and Mishina, 2022)



an interaksi seluler antara osteoklas, osteoblas, dan osteosit

dalam remodeling tulang.

Osteoblas dan osteosit mengekspresikan RANKL dan OPG. Ikatan RANKL dengan reseptor RANK pada osteoklas menyebabkan diferensiasi dan aktivasi osteoklas. OPG bertindak sebagai reseptor umpan untuk RANKL dan dengan demikian menghambat diferensiasi osteoklas. Osteosit menghambat pembentukan tulang dan meningkatkan resorpsi tulang melalui *Sclerostin* (SOST). Osteoklas mengatur migrasi dan aktivitas osteoblas melalui faktor-faktor yang disekresikan dari osteoklas itu sendiri dan rongga resorpsi tulang. Osteoklas adalah sel utama yang bertanggung jawab atas resorpsi tulang yang diposisikan pada permukaan tulang dan berjalan sesuai fungsinya. Osteoklas yang teraktivasi melepaskan enzim proteolitik yang menghancurkan jaringan ikat pada tulang, mereka juga mengeluarkan beberapa asam yang memecahkan bagian mineral tulang. Melalui berbagai tahapan diferensiasi osteoblas, beberapa biomarker yang dikenal sebagai penanda osteogenik, berubah secara signifikan, seperti OCN, Runx2, *alkaline phosphatase*, dan osterix. Di sisi lain, untuk memodulasi diferensiasi monosit ke osteoklas, osteoblas akan melepaskan OPG dan RANKL, serta *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF).

RANK, RANKL, dan osteoprotegerin (OPG) adalah 3 komponen penting yang dimodulasi oleh osteoblas serta mempengaruhi kepadatan massa tulang melalui regulasi fungsi osteoblas dan osteoklas. RANKL dan OPG adalah faktor penting dalam penyembuhan tulang yang memainkan peran penting dalam osteoklastogenesis. RANKL akan berikatan dengan RANK, sehingga menginduksi proses osteoklastogenik. Ikatan RANK-RANKL akan menginisiasi diferensiasi prekursor osteoklas menjadi osteoklas matang, menstimulasi kapasitas resorpsi tulang, dan mengurangi apoptosis osteoklas. Dalam proses ini, OPG bertindak sebagai inhibitor, mencegah RANKL berikatan dengan RANK dengan cara berikatan dengan RANKL. (Tobeiha *et al.*, 2020; Kresnoadi, Laksono and Dahlan, 2023)

Segera setelah resorpsi tulang terjadi, sel induk dari sumsum tulang dan periosteum membentuk osteoblas di permukaan. Osteoblas ini menyimpan osteoid dan mengalami mineralisasi pada waktunya untuk membentuk tulang baru yang *mature*. Sintesis tulang berlangsung selama jangka waktu tertentu dan kemudian dihentikan. Osteoblas kemudian mengubah dirinya menjadi sel-sel berlapis yang menutupi tulang yang baru terbentuk. (Nayak, Uppoor and Abhay, 2021)

1.2.5 Socket Preservation

Pencabutan gigi dapat mengakibatkan hilangnya fungsi pendukung dari menyebabkan volume tulang yang tersisa tidak memadai untuk menahan protesa atau implan gigi dalam posisi yang benar. Oleh karena itu, tahun terakhir disarankan untuk mengisi soket bekas dengan bahan biomaterial. (Pranskunas, Galindo-Moreno and)



Tindakan *socket preservation* memerlukan penambahan bahan *graft* ke dalam soket. Berbagai macam bahan atau teknik yang digunakan untuk memaksimalkan volume tulang dan jaringan lunak setelah pencabutan gigi diharapkan dapat meningkatkan hasil perawatan. Berdasarkan konsep ini, *socket preservation* seringkali dilakukan dengan cara *guided bone regeneration* yaitu menggunakan bahan *bone graft*, membran, atau kombinasi dari bahan-bahan tersebut.(Yankov, 2023)

Bone graft didefinisikan sebagai jaringan hidup yang mampu mempercepat penyembuhan tulang, ditanamkan ke dalam bagian tulang yang rusak, baik secara terpisah atau dikombinasikan dengan bahan lain. Fungsi utama *bone graft* adalah untuk memberikan dukungan mekanis dan menstimulasi osteoregenerasi, dengan tujuan akhir penggantian tulang. Empat sifat biologis mendasar yaitu osseointegrasi, osteogenesis, osteokonduksi, dan osteoinduksi, sangat penting dalam menjalankan peran ini secara efektif. Kemampuan bahan *graft* untuk berikatan secara kimiawi dengan permukaan tulang tanpa adanya lapisan jaringan fibrosa di dalamnya disebut sebagai osseointegrasi. osteokonduksi mengacu pada kemampuan bahan *graft* untuk menghasilkan bioaktif *scaffold* sehingga *host cells* dapat tumbuh. Struktur ini memungkinkan pembuluh darah, osteoblas dan sel-sel progenitor untuk bermigrasi ke dalam osteomatriks yang saling berhubungan. Osteoinduksi adalah proses peningkatan pembentukan tulang dengan pengumpulan *Mesenchymal Stem Cell* (MSC) dari jaringan host dan dapat berdiferensiasi menjadi osteoblas dewasa untuk pembentukan tulang. Osteogenik didefinisikan sebagai bahan yang mengandung sel progenitor dan mampu berdiferensiasi menjadi tulang.(Zhao *et al.*, 2021; Ferraz, 2023)

Klasifikasi bahan graft secara umum antara lain:(Zhao *et al.*, 2021)

1. Autogenous/autograft

Autograft biasanya diperoleh dari bagian intraoral dan ekstraoral pada individu yang sama, seperti simfisis mandibula, ramus mandibula, *external oblique ridge*, *iliac crest*, proksimal ulna, atau distal radius, karena dapat dijadikan sumber *graft* yang baik dari tulang kortikal dan tulang cancellous dari individu yang sama. *Bone graft* autogenous dianggap sebagai *gold standard* karena bersifat osteogenesis, osteokonduktif, dan osteoinduktif. *Bone graft* autogenous mengandung dan melepaskan faktor pertumbuhan osteogenik, misalnya *Bone Morphogenetic Proteins* (BMP) yang meningkatkan proliferasi dan differensiasi sel progenitor mesenkimal ke jalur osteogenik (osteoinduksi) dan menyediakan scaffold



< menghasilkan tulang baru (osteoinduksi), autograft juga menyediakan kondisi optimal untuk penetrasi pembuluh darah baru progenitor. Kekurangan dari autograft adalah diperlukannya ta prosedur operasi tambahan, daerah donor terbatas, dan tas pasien.

2. Allograft

Allograft merupakan bahan graft yang dapat diperoleh dari donor hidup yang kompatibel atau dari sumber tulang cadaver. Bahan allograft dapat disiapkan dalam tiga bentuk yaitu tulang segar beku, *Freeze-dried Bone Allograft* (FDBA) dan *Demineralized Freeze-dried Bone Allograft* (DFDBA). Bahan ini memiliki sifat osteoinduktif yang unggul tetapi jarang digunakan saat ini karena risiko yang lebih tinggi dari respons imun host serta adanya peningkatan risiko transmisi penyakit. Salah satu keunggulan allograft dibandingkan graft komersial lainnya adalah adanya potensi osteoinduktif, terutama pada allograft yang telah didemineralisasi. Allograft merupakan bahan ideal untuk penyembuhan soket ekstraksi, prosedur elevasi sinus, *Guided Bone Regeneration* (GBR), dan dalam prosedur implan. Penelitian yang dilakukan oleh Kao et al, menyebutkan bahwa allograft memiliki keberhasilan yang tinggi ketika dikombinasikan dengan xenograft untuk tindakan GBR pada perawatan augmentasi tulang

3. Xenograft

Xenograft merupakan bahan okulasi yang berasal dari spesies genetika yang tidak berhubungan dengan host. Sumber yang paling sering digunakan dari bahan xenograft di bidang kedokteran gigi adalah *Deproteinized Bovine Bone Mineral* (DBBM) yang tersedia secara komersial sebagai Biomaterial dan berasal dari sapi. Keuntungan menggunakan DBBM adalah aman, kandungan mineralnya sebanding dengan tulang manusia, dan tidak mudah diresorpsi. Xenograft dapat mempertahankan volumenya hingga bertahun-tahun, tidak seperti allograft yang rentan mengalami resorpsi dimensional. Meskipun xenograft tidak memiliki potensi osteogenik atau osteoinduktif, sifatnya yang sulit diresorpsi menjadikannya bahan ideal untuk mempertahankan volume tulang

4. Alloplast

Alloplast merupakan bahan graft yang dibuat secara sintesis yang diturunkan dari berbagai kombinasi HA, β -TCP, polimer, dan/atau kaca bioaktif. Meskipun alloplast memiliki permukaan osteokonduktif yang memungkinkan perlekatan dan proliferasi sel serta pertumbuhan tulang, alloplast secara umum menunjukkan kemampuan regenerasi tulang yang lebih rendah dibandingkan bahan graft lainnya. Sejumlah produk alloplast telah dikombinasikan dengan berbagai faktor pertumbuhan rekombinan yang mampu memfasilitasi regenerasi tulang dan periodontal.



tiara (*Pinctada maxima*)

tiara merupakan salah satu sumber daya laut yang memiliki nilai ekonomis baik secara nasional maupun internasional. Tiara ini dapat menghasilkan butiran mutiara yang bernilai jual tinggi. Terdapat beberapa jenis kerang yang dapat menghasilkan butiran mutiara, di antaranya *Pinctada maxima* merupakan salah satu jenis kerang mutiara yang

berukuran besar yang ada di perairan Indonesia. Kerang mutiara jenis *Pinctada maxima* di pasaran dunia dikenal dengan nama Mutiara Laut Selatan (*South Sea Pearl*) dan 41,21 % mutiara yang dihasilkan dari kerang jenis ini yang beredar di pasaran dunia berasal dari Indonesia. Jumlah ini jauh di atas Australia (34,27 %) dan masih terus mengalami peningkatan. Keelokan warna mutiara yang dihasilkan oleh kerang jenis ini menyebabkan permintaan pasar domestik maupun manca negara akan mutiara yang berasal dari *Pinctada maxima* terus mengalami kenaikan. (Hastuti *et al.*, 2019)

Klasifikasi Kerang Mutiara

Menurut Sutaman (1993), secara rinci jenis kerang mutiara dapat diklasifikasikan sebagai berikut : (Southgate and Lucas, 2008)

- Kingdom : Invertebrata
- Phyllum : Mollusca
- Klass : Pellecypoda atau Lamellibranchiata
- Orda : Anysomyaria
- Famili : Pteridae
- Genus : Pinctada
- Spesies : *Pinctada maxima*, *P. margaritifera*, *P. chemnitz*, *P. fucata*
- Genus : Pteria
- Spesies : *Pteria penguin*

Jenis-jenis kerang mutiara yang ada di Indonesia umumnya adalah *Pinctada maxima*, *P. margaritifera*, *P. fucata*, *P. chemnitz* dan *Pteria penguin*. Tetapi penghasil mutiara yang terpenting ada tiga jenis, yaitu *Pteria penguin*, *Pinctada maxima* dan, *P. margaritifera*.

Morfologi dan Anatomi



Anatomi kerang mutiara (*Pinctada Maxima*). 1) Gonad 2) Hati 3) Kaki 4) Inti 5) Mantel 6) Otot adductor 7) Otot retractor 8) Insang. (Southgate and Lucas, 2008)



ra merupakan hewan laut yang bertubuh lunak, tidak bertulang
tulangan yang di ganti oleh dua belah keping cangkang yang tidak simetris, tebal

dan sangat keras. Bentuk luar kerang mutiara tampak seperti batu karang yang tidak ada tanda-tanda kehidupan. Sepasang cangkang pada mutiara memiliki bentuk yang tidak sama dimana cangkang sebelah kanan agak pipih sedangkan cangkang sebelah kiri lebih cembung. Cangkang kerang mutiara memiliki ketebalan berkisar antara 1-5 mm. Pada bagian luar cangkang terdapat garis-garis melingkar yang jumlahnya bervariasi antara 6-8 garis yang berwarna merah tua, coklat kemerahan dan merah kecoklatan. Warna-warna ini terlihat sangat jelas pada kerang muda, sedangkan pada kerang dewasa warna akan memudar. (Southgate and Lucas, 2008)

Menurut Sutaman (1993) cangkang pada kerang mutiara jika dipotong melintang, maka dapat kita lihat cangkang tersebut terdiri dari 3 lapisan yang tampak, yaitu :(Southgate and Lucas, 2008)

- 1) Lapisan *periostrakum*, merupakan lapisan kulit terluar yang kasar yang tersusun dari zat organik yang menyerupai tanduk.
- 2) Lapisan *prismatik*, merupakan lapisan kedua yang tersusun dari Kristal-kristal kecil yang berbentuk prisma dari *hexagonal calcite* dan tersusun padat pada kerangka conchiolin ($C_{32}H_{48}N_2O_{11}$).
- 3) Lapisan mutiara atau *nacre*, ini merupakan lapisan kelut sebelah dalam yang tersusun dari kalsium karbonat ($CaCO_3$), yang dihasilkan oleh sel-sel dari ephitelium luar dalam bentuk kristal *aragonite*.

Nacre dan Tulang

Nacre adalah lapisan dalam dari cangkang mutiara, terdiri dari kalsium karbonat aseluler yang diproduksi oleh bivalvia, gastropoda, dan cephalopoda. *Nacre* terdiri dari tablet kristal *aragonite* yang dilapisi dengan matriks organik. *Aragonite* dan kalsit adalah dua polimorf kalsium karbonat yang merupakan penyusun cangkang moluska dan memberikan kekuatan dan ketahanan terhadap keseluruhan arsitektur cangkang. Sebagian besar cangkang invertebrata kecil terdiri dari matriks organik yang bertanggung jawab untuk proses nukleasi, pertumbuhan, dan penghambatan kalsium karbonat.(Oktawati *et al.*, 2021)

Pinctada maxima yang sering disebut "*Mother of Pearl*" telah menunjukkan hasil yang menjanjikan sebagai alternatif bahan *graft* biomimetik yang dapat diserap. *Nacre* sering menunjukkan pergantian osteokonduktif alami dengan efek kuat pada osteoprogenitor, osteoblas, dan osteoklas selama pembentukan jaringan tulang dan morfogenesis. Selain itu, nacre juga menunjukkan sifat biokompatibel dan biodegradable pada jaringan tulang.(Chandha *et al.*, 2022)



nia cangkang *Pinctada maxima* adalah 97% anorganik dan 3% dari protein, peptida, glukoprotein, kitin, lipid, dan pigmen. *maxima* adalah Ca, Mg, Na, P, Fe, Cu, Ni, B, Zn, dan Si. *acre* ini adalah kalsium karbonat ($CaCO_3$). Kalsium karbonat osteokonduktifitas bila dibandingkan bahan sintesis pengganti *nano-β-tricalcium phosphate* dan *nano-hydroxyapatite*, dan

dapat mempercepat ekspresi marker osteogenik spesifik. Selain itu, di dalam matriks organik cangkang kerang mutiara ditemukan molekul biologis yang mampu mengaktifkan sinyal kimiawi osteoblas. (Li *et al.*, 2018; Oktawati *et al.*, 2021)

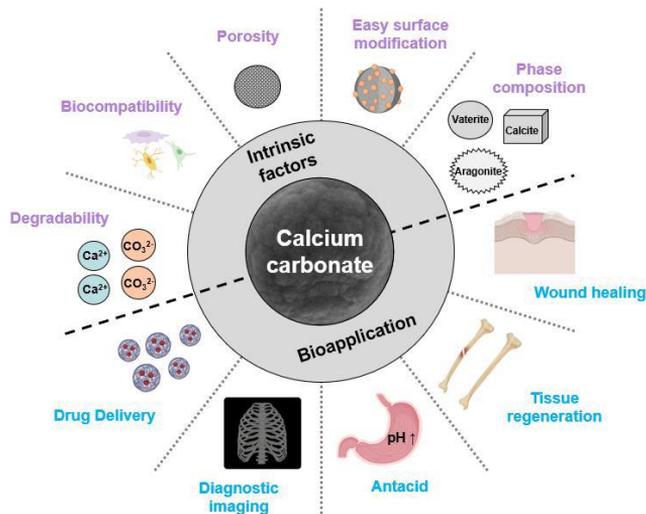
***Pinctada maxima* Budidaya dan Non-Budidaya**

Pada Kerang Mutiara (*Pinctada maxima*), baik yang dibudidayakan maupun non-budidaya, terdapat perbedaan dalam ketebalan *nacre* dan komponen utama dari mutiara. Faktor genetika dari budidaya yang memiliki kecenderungan untuk mengalami kekurangan materi genetika sehingga tidak menghasilkan jumlah kristal aragonite yang ideal. Konsiderasi lain adalah pada deposisi *Nacre*. Deposisi *Nacre* yang dilakukan secara cepat (komersil) cenderung lebih tipis dan menghasilkan kualitas kristal yang lebih rendah, hal ini karena deposisi terjadi secara cepat dan dalam kurun waktu yang lebih singkat, sedangkan pada non-budidaya proses ini cenderung terjadi secara lebih alami, sehingga terjadi deposisi dalam waktu yang lebih lama, sehingga menghasilkan kualitas *aragonite* yang lebih baik. (Lind *et al.*, 2009; Blay *et al.*, 2014; Homkrajae *et al.*, 2021)

1.2.7 Kalsium Karbonat

Senyawa kalsium memainkan peran penting dalam rekayasa jaringan dan regenerasi tulang. Kalsium karbonat merupakan mineral yang paling penting dalam pembentukan elemen rangka pada berbagai kelompok invertebrata, termasuk echinodermata, moluska, dan artropoda. Kalsium karbonat (CaCO_3) meningkatkan biokompatibilitas dengan meningkatkan interaksi dengan osteoblas, sehingga mendorong pembentukan tulang. Kalsium karbonat telah menarik perhatian signifikan dari para peneliti ilmiah dan praktisi industri, karena fungsinya serta pilihan desain, berbagai macam pengaplikasian, dan biokompatibilitasnya. Kalsium karbonat telah digunakan sebagai *scaffold* untuk pertumbuhan tulang karena memiliki sifat osteokonduktif dan biokompatibilitas. (Biomimetic *et al.*, 2024; Biomineral-Based *et al.*, 2024)





Gambar 4. Sifat kalsium karbonat dan kegunaannya dalam dunia medis.

(Biomimetic *et al.*, 2024)

Kalsium karbonat (CaCO_3) terdapat dalam berbagai bentuk, dengan kalsit, aragonit, dan vaterit sebagai tiga polimorf utama yang ditemukan dalam elemen rangka organisme. Kalsit, bentuk yang paling stabil, memiliki struktur rhombohedral dan kekuatan mekanik yang tinggi, sehingga cocok sebagai *scaffold*, meskipun kelarutannya yang rendah dapat mempengaruhi integrasi dan resorpsi dari waktu ke waktu. Aragonit, dengan struktur ortorombik kurang stabil dibandingkan kalsit tetapi lebih mudah larut, yang dapat memfasilitasi integrasi dengan tulang di sekitarnya dan mendorong pembentukan tulang baru, karena memiliki daya serap yang lebih besar. Vaterit, bentuk yang paling tidak stabil dan paling mudah larut, memiliki struktur heksagonal dan biasanya digunakan dalam pengaturan eksperimental; mudah terurai dalam kondisi fisiologis yang memungkinkan resorpsi cepat dan potensi regenerasi tulang lebih cepat, tetapi ketidakstabilannya dapat membatasi dukungan struktural jangka panjang. (Biomimetic *et al.*, 2024)

Kalsium karbonat juga digunakan dalam *wound dressing*, membantu hemostasis. Fungsi ini penting dalam mengobati perdarahan yang perforasi dan tidak teratur, yang memungkinkan pembekuan darah di lokasi perdarahan. Berbagai penelitian saat ini bertujuan untuk meningkatkan bahan hemostatik, menyediakan solusi untuk luka yang perforasi atau tidak teratur dengan menutup atau menyumbat permukaan kulit untuk mencegah perdarahan. Hemostatik tradisional telah atasan dalam hemostasis luka, karena tantangan dalam luka yang tidak teratur atau perforasi. Namun, material komposit menghadirkan alternatif. Partikel Janus dalam hemostatik indung CaCO_3 yang mampu menghasilkan gelembung mikro s tempat pendarahan dalam pada luka yang tidak teratur dan

(-Based *et al.*, 2024)



Pembuatan gelembung makro melalui hemostat memungkinkan penetrasi yang lebih dalam pada luka yang berdarah, sehingga secara efektif mengurangi perdarahan. Oleh karena itu, hemostat yang menggunakan mekanisme ini terbukti lebih baik daripada alternatif konvensional. Penelitian lebih lanjut mendemonstrasikan hidrogel antimikroba dalam bentuk injeksi kalsium karbonat yang terdiri dari kitosan dan menunjukkan daya rekat jaringan yang sangat baik, efek hemostatik, kinerja gelasi yang cepat, dan efek antibakteri, dan bersifat bioadhesif, dengan aktivitas koagulasi dan gelasi yang cepat. (Biomaterial-Based *et al.*, 2024)

1.2.8 Sintesa Penelitian

Tabel 1. Sintesa Penelitian

No.	Penulis	Tahun	Judul	Kesimpulan
1.	Chandha MH, et al (Chandha <i>et al.</i> , 2022)	2022	Kerang Mutiara (<i>Pinctada Maxima</i>) sebagai <i>bone graft material</i> dalam Kedokteran Gigi	Serbuk yang didapatkan dari <i>Pinctada Maxima</i> potensi sebagai bahan bone grafting karena memiliki kondisi mineral yang mirip dengan tulang.
2.	Patty DJ, et al (Patty <i>et al.</i> , 2022)	2022	Karakteristik Mekanik dan Bioaktivitas <i>Nanocomposite Hydroxyapatite/ Collagen Coated Titanium</i> untuk Rekayasa Jaringan Tulang	Cangkang kerang mutiara <i>Pinctada maxima</i> mengandung <i>carbonate hydroxyapatite</i> serta kalsium yang secara signifikan meningkatkan ukuran pori, porositas, biokompatibilitas tulang, dan sifat antibakteri yang kuat pada penyakit periodontitis.
3.	Gani A, et al (Gani <i>et al.</i> , 2022)	2022	Efektivitas Kombinasi Gel Kitosan dan Hidroksiapatit dari Limbah Cangkang Kepiting (<i>Portunus pelagicus</i>) Sebagai Bone Graft pada Regenerasi	Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat peningkatan ekspresi BMP-2 dan IL-1 yang signifikan pada defek tulang dengan pemberian kombinasi gel kitosan



			Jaringan Periodontal melalui Analisis IL-1 dan BMP-2	dan hidroksiapatit dari limbah cangkang kepiting (<i>Portunus pelagicus</i>). Hasil penelitian ini menunjukkan adanya penghambatan produksi sitokin proinflamasi IL-1 dan peningkatan BMP-2 yang merupakan penanda bonegraft sebagai regenerasi jaringan periodontal.
4.	Djais Al, et al(Djais <i>et al.</i> , 2020)	2020	Pengaruh Kombinasi <i>Demineralization Freeze Dried Dentin Matrix (DFDDM)</i> dan <i>Moringa oleifera Lam</i> terhadap Osteoprotegerin (OPG) dan <i>Receptor Activator of Nuclear Factor Kapa B Ligand (RANKL)</i> sebagai Marker dalam <i>Remodelling Tulang</i>	Kombinasi <i>Moringa oleifera Lam</i> dan DFDDM secara efektif dapat menghasilkan ekspresi OPG dan RANKL selama tindakan <i>socket preservation</i> pasca pencabutan gigi
5.	Oktawati S, et al(Oktawati <i>et al.</i> , 2021)	2021	Efektivitas Cangkang Kerang Mutiara (<i>Pinctada Maxima</i>) sebagai <i>Bone Graft</i> dalam <i>Periodontal Bone Remodelling</i>	Kerang mutiara Nacre adalah bahan yang memiliki beberapa kesamaan dengan tulang. Cangkang mutiara nacre berpotensi untuk digunakan sebagai bahan substitusi tulang pada remodelling tulang periodontal.



6.	Yonatasya, FD et al(Yonatasya, Prananingrum and Ashrin, 2019)	2019	Pengaruh Bone Graft Senyawa Kalsium Hasil Sintesis Cangkang Kerang Darah (<i>Anadara granosa</i>) dengan Variasi Waktu Sintering terhadap Proliferasi Sel Fibroblas pada Proses Socket Healing	Pemberian Bone Graft dari senyawa kalsium hasil sintesis cangkang kerang darah (<i>Anadara granosa</i>) dengan variasi waktu sintering 6 dan 12 jam memiliki pengaruh terhadap proliferasi sel fibroblast pada proses <i>socket healing</i> pasca pencabutan gigi pada hari ke-7 dan 14.
7.	Hariyati, et al(Shofiyani and Agus Wibowo, 2019)	2019	Ekstraksi Kalsium Karbonat (CaCO_3) dari Bahan Dasar Cangkang Kerang <i>Ale-Ale</i> (<i>Meretrix meretrix</i>) pada temperatur Kalsinasi 500°C	Cangkang Kerang <i>Ale-Ale</i> (<i>Meretrix meretrix</i>) mengandung Kalsium Oksida (CaO) sebesar 87% berpotensi digunakan sebagai bahan dasar ekstraksi kalsium karbonat (CaCO_3). Berdasarkan hasil XRD pada Kalsinasi dengan temperatur 500°C menunjukkan terbentuknya CaCO_3 murni.
8.	Brundavanam et al(Brundavanam, Fawcett and Poinern, 2017)	2017	Sintesis Material Komposit Tulang dari Limbah Cangkang Kerang Mutiara sebagai Bioteknologi Jaringan Tulang	<i>Nacre Pinctada Maxima</i> akan menghasilkan bahan yang lebih baik dan dapat digunakan dalam rekayasa jaringan tulan. Dari hasil penelitian diperoleh bahwa kandungan cangkang kerang mutiara mampu memfasilitasi proliferasi osteoblas,



				mempercepat produksi matriks ekstraseluler, dan mineralisasi.
--	--	--	--	---

1.3 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah apakah pemberian kalsium karbonat dari cangkang kerang mutiara (*Pinctada maxima*) non-budidaya sebagai *bone graft* pada tindakan *socket preservation* mampu menurunkan ekspresi RANKL dalam regenerasi tulang?

1.4 Hipotesa

Pemberian Kalsium Karbonat dari Cangkang Kerang Mutiara (*Pinctada maxima*) non-budidaya sebagai *bone graft* pada tindakan *socket preservation* dapat menurunkan ekspresi RANKL dalam regenerasi tulang.

1.5 Tujuan Penulisan

1.5.1 Tujuan Umum

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah Kalsium Karbonat dari Cangkang Kerang Mutiara (*Pinctada Maxima*) sebagai bahan Bone Graft dapat menurunkan ekspresi RANKL pada proses regenerasi tulang.

1.5.2 Tujuan Khusus

1. Mempelajari proses pengolahan Cangkang Kerang Mutiara dalam menghasilkan bahan baku berupa kalsium karbonat dalam bentuk bubuk
2. Menilai pengaruh Kalsium Karbonat dari Cangkang Kerang Mutiara sebagai *bone graft* terhadap regenerasi tulang pada hewan coba
3. Menilai regenerasi tulang melalui indikator ekspresi *Receptor Activator of Nuclear Factor-Kappa β Ligand* (RANKL)

1.6 Manfaat Penelitian

1.6.1 Manfaat Pengembangan Ilmu

1. Memberikan kontribusi ilmiah terkait penggunaan Cangkang Kerang Mutiara Non-Budidaya dan potensinya sebagai bahan dasar pembuatan Bone Graft pengetahuan ilmiah terkait kadar RANKL dalam proses lang dengan bahan bone grafting baru informasi tentang penggunaan bahan bone grafting alami yang kan dalam tindakan regenerasi tulang periodontal



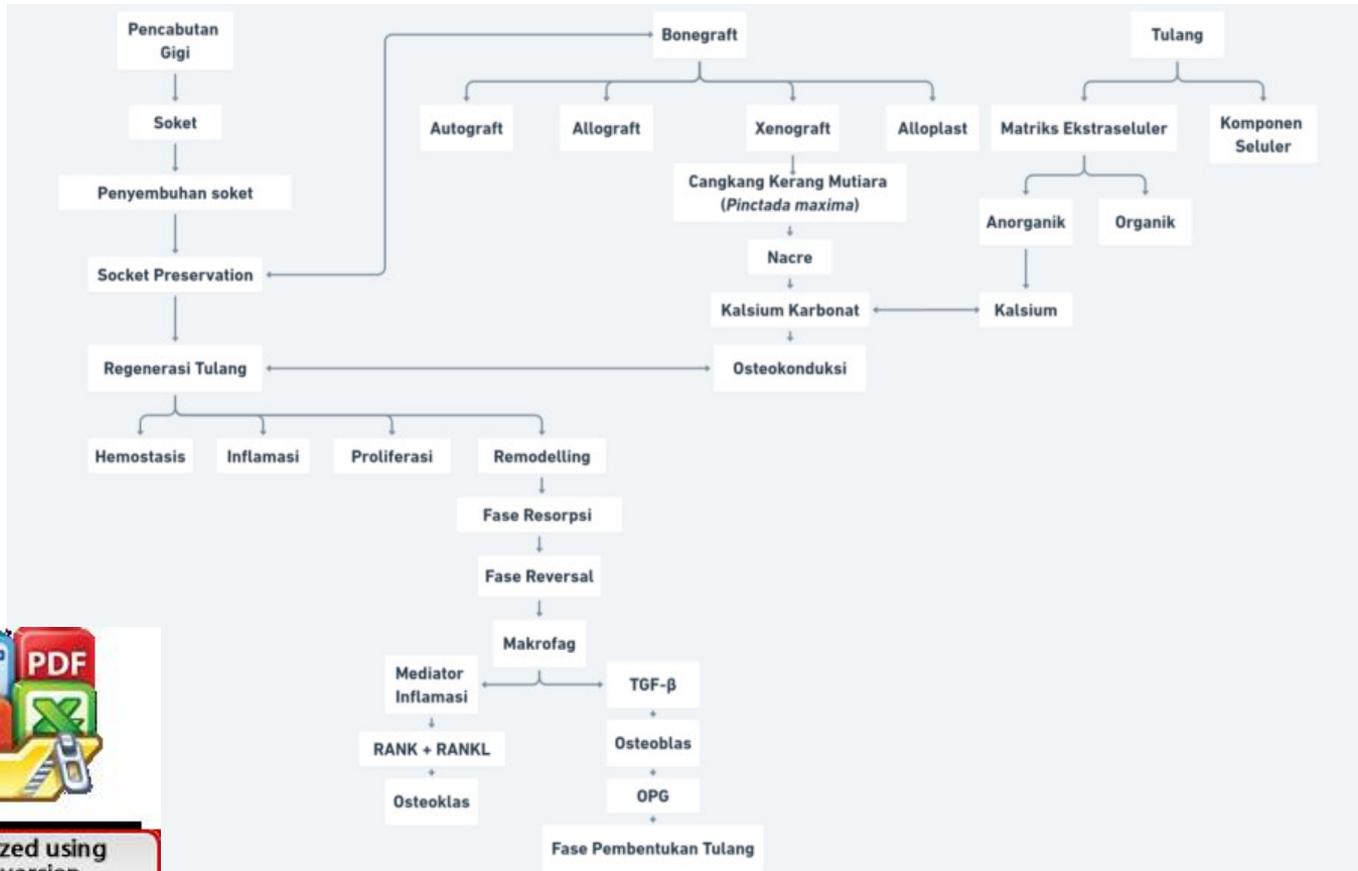
1.6.2 Manfaat Praktis

Penelitian ini diharapkan memberi kontribusi terkait bahan alami yang berasal dari Cangkang Kerang Mutiara (*Pinctada Maxima*) Non-Budidaya (Kalsium Karbonat) dan diharapkan bahwa bahan ini dapat digunakan secara klinis pada pasien di Bidang Kedokteran Gigi, khususnya pada tindakan pembedahan Periodontal Regeneratif.

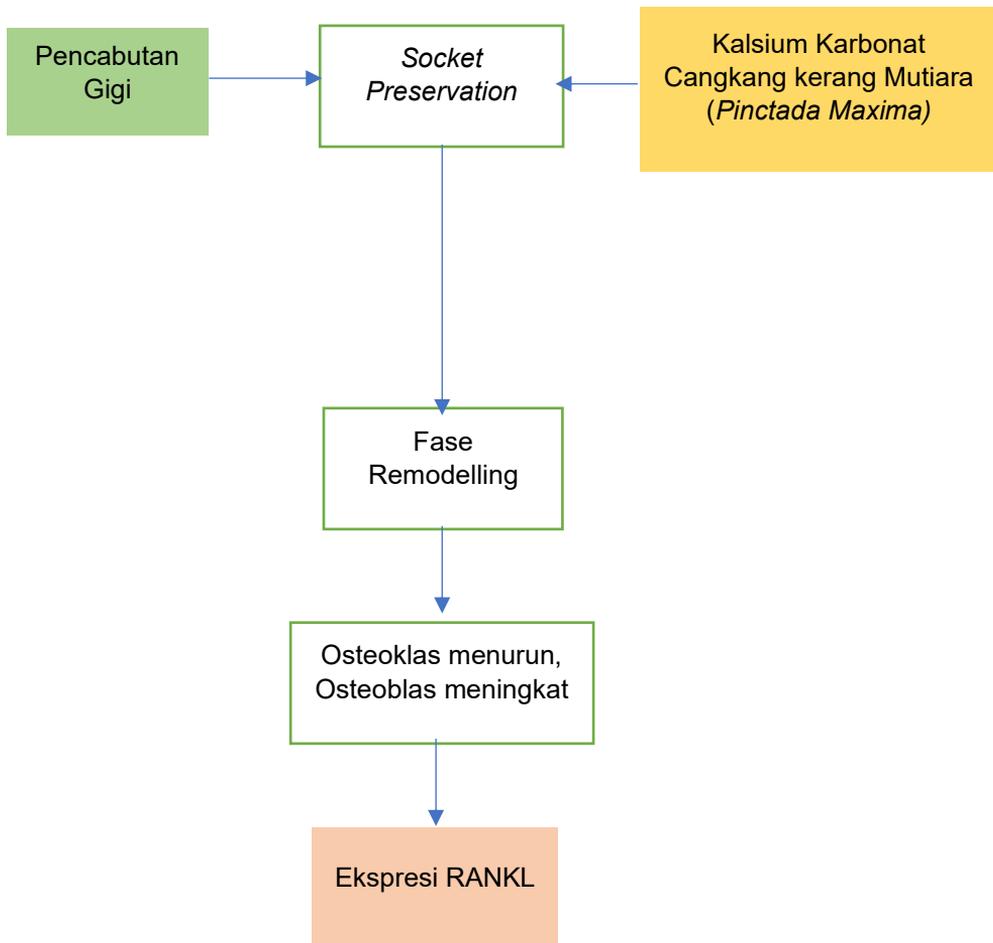


1.7 Teori Konseptual

1.7.1 Kerangka Teori



1.7.2 Kerangka Konsep



 : Variabel Kendali

 : Variabel Bebas

 : Variabel Terikat



1.7.3 Deskripsi Teori Konseptual

Penelitian ini didasarkan pada hipotesa yaitu penurunan level *RANKL* pada kelompok pemberian kalsium karbonat dari Cangkang Kerang Mutiara (*Pinctada Maxima*) dan pada kelompok pemberian *bone graft* BATAN terhadap tindakan *socket preservation* dibandingkan kelompok kontrol negatif.

Tulang alveolar terdiri dari dua komponen dasar, yaitu matriks ekstraseluler dan komponen seluler. Komponen ekstraseluler dari tulang memiliki komponen anorganik yaitu kalsium. Biota laut yang banyak digunakan untuk pembuatan bone graft salah satunya adalah cangkang kerang. Cangkang kerang memiliki kandungan kalsium yang tinggi. Cangkang kerang mempunyai beberapa spesies salah satunya cangkang kerang mutiara (*Pinctada Maxima*) yang mengandung kalsium karbonat (CaCO_3). Kalsium karbonat mampu meningkatkan osteokonduktifitas, selain itu kalsium di dalam matriks organik cangkang kerang mutiara merupakan molekul biologis yang mampu mengaktifkan sinyal kimiawi osteoblas. Dengan demikian, cangkang kerang mutiara berpotensi untuk dijadikan sebagai bahan bone graft yang dapat mempercepat proses regenerasi tulang.

Tindakan *socket preservation* setelah pencabutan gigi bertujuan untuk menjaga volume tulang akar tidak mengalami resorpsi. Dalam Dalam prosedur ini, penggunaan bahan bone graft sangatlah penting. Cangkang kerang mutiara, dengan sifat osteokonduktif, osteoinduktif, dan osteogenesisnya, dapat mempercepat proses regenerasi tulang.

Pada fase remodelling tulang, transisi dari pembentukan matriks kolagen akan memicu meningkatnya sel osteoklas. Resorpsi tulang alveolar terjadi melalui aktivasi RANK oleh sel osteoklas. Kemudian osteoklas menstimulasi makrofag untuk mengeluarkan mediator inflamasi dan menginduksi pembentukan RANKL untuk berikatan dengan RANK, yang menyebabkan peningkatan diferensiasi preosteoklas menjadi osteoklas, kemudian mempercepat proses resorpsi tulang. Selain mengeluarkan faktor inflamasi, makrofag juga mengeluarkan TGF- β yang menstimulasi osteoblast untuk menginduksi pembentukan OPG. OPG yang diproduksi oleh osteoblas menghambat perkembangan osteoklas dan mempromosikan diferensiasi sel fibroblas menjadi osteoblas hingga pembentukan tulang baru.



BAB II METODOLOGI PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu Penelitian

2.1.1 Tempat Penelitian

- Pulau Bontosua, Kecamatan Liukang Tupabbiring, Kabupaten Pangkajene dan Kepulauan, Sulawesi Selatan, Indonesia sebagai tempat pengambilan cangkang kerang mutiara (*Pinctada maxima*) non-budidaya
- Laboratorium Terpadu Teknik Kimia PNUP sebagai tempat pembuatan bubuk kalsium karbonat dari cangkang kerang mutiara (*Pinctada Maxima*) serta pengujian bahan cangkang kerang (Uji FTIR dan Porositas)
- Laboratorium Mikrostruktur Fakultas Teknik Universitas Muslim Indonesia sebagai tempat untuk pengujian SEM
- Klinik Hewan Docpet Makassar tempat pemeliharaan dan perlakuan pada hewan coba penelitian
- Laboratorium Patologi Anatomi RS UNHAS tempat pembuatan preparat jaringan hewan coba penelitian
- Laboratorium Biokimia Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya tempat pembacaan preparat jaringan hewan coba penelitian

2.1.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada Februari – September 2024

2.2 Bahan dan Alat Penelitian

2.2.1 Alat dan Bahan Pembuatan Bubuk Kalsium Karbonat

- a. Ember besi
- b. Sikat
- c. Mesin pemotong cangkang kerang
- d. Mesin Furnace



bsorption Spectrophotometer (AAS)
ngan konsentrasi 2M/L
pekat

<

- l. Gelas labu
- m. Batang pengaduk
- n. Microwave
- o. Cawan Porcelain 50 ml
- p. Kertas saring
- q. Kertas pH
- r. Timbangan digital
- s. Ayakan ukuran -60+120 mesh.
- t. Air Destilasi
- u. Botol steril
- v. Mesin uji *Fourier Transform Infra Red (FTIR)*
- w. Mesin uji *Scanning Electron Microscop (SEM)*

2.2.2 Alat dan Bahan Pemeliharaan Hewan Coba

1. Spoit 1 cc
2. Spoit 3 cc
3. Blade 11 dan 15
4. Kasa dan kapas steril
5. Kandang hewan
6. Handscoen
7. Masker
8. Nierbeken
9. Pinset anatomis
10. Pinset jaringan
11. Probe periodontal
12. Kuret Gracey
13. Gunting
14. Tabung kaca penyimpanan specimen
15. Bahan anestesi ketamin 20 mg/kg BB tikus wistar
16. Gel metronidazole
17. Formalin 10% buffer
18. Eter
19. Larutan NaCl
20. Betadine
21. Alkohol 70%

2.2.3 Alat dan Bahan Perlakuan Hewan Coba

1. Alat & Bahan anestesi ketamin 20 mg/kg



anestesi
 irigasi
 in & metronidazole infus 500 mg)

- h. Hand piece Low speed
- i. Alat kondensor Bone graft
- j. Blade 15
- k. Suture absorbable 5-0
- l. Kapas dan kasa
- m. Alcohol 70%
- n. *povidone iodine* 10%
- o. sarung tangan
- p. masker
- q. periostel alevator
- r. gunting
- r. Needle holder
- s. Eter
- t. Botol steril
- u. Betadin solution
- v. Alat sentrifugasi
- w. Tabung eppendorf

2.3 Metode Penelitian

2.3.1 Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris dengan rancangan eksperimental murni didasarkan pada *post test only control* grup design yang menggunakan marmut (*Cavia cobaya*) sebagai subjek penelitian

2.3.2 Penentuan Sumber Data (Penentuan Besar Sampel)

Rumus Federer digunakan untuk menentukan jumlah pengulangan agar diperoleh data yang valid. Jumlah pengulangan ini bisa diartikan dengan jumlah sampel/hewan uji dalam tiap kelompok.

Penentuan jumlah sampel menurut Federer :

$$(t - 1) \times (n - 1) \geq 15$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok perlakuan / intervensi

n = jumlah replikasi/ sampel

$$(n-1) \times (3-1) \geq 15$$

$$(n-1) \geq 7.5$$



rhitungan diatas jumlah sampel minimum sebanyak 9 sampel k. Karena ada 3 kelompok perlakuan maka total sampel yang ekor marmut. Masing-masing kelompok diaplikasikan bahan ti pada hari ke 7 sebanyak 3 ekor, hari ke 14 sebanyak 3 ekor yak 3 ekor.

Kriteria Sampel

Sampel yang digunakan untuk penelitian ini adalah *Cavia Cobaya* dengan persyaratan sebagai berikut:

Kriteria Inklusi

1. Marmut Jantan usia 8-10 minggu
2. Berat badan rata-rata 300-500 gram
3. Sehat (rambut tidak kusam, rontok, botak, gerak aktif, konsumsi pakan lancar)

Kriteria Eksklusi

1. Marmut Nampak sakit (gerak tidak aktif)
2. Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi
3. Marmut mati selama penelitian

2.3.3 Definisi Operasional

A. Kalsium Karbonat Cangkang Kerang Mutiara adalah cangkang kerang mutiara non-budidaya yang telah melalui proses kalsinasi sehingga didapatkan kalsium karbonat dari cangkang kerang mutiara non-budidaya dan diperoleh bentuk sediaan bubuk lalu dimasukkan kedalam socket bekas pencabutan gigi

B. Ekspresi RANKL adalah kadar *RANKL* yang dinilai pada hasil pengamatan slide imunohistokimia

C. *Socket Preservation* adalah tindakan pemberian bubuk kalsium karbonat cangkang kerang mutiara ke dalam socket bekas pencabutan gigi

2.4 Pelaksanaan Penelitian

2.4.1 Persiapan Penelitian

Pembuatan bubuk kalsium karbonat

Pembuatan bubuk cangkang kerang mutiara (*Pinctada Maxima*) melalui metode presipitasi. Pertama dilakukan dengan membersihkan cangkang di bawah air mengalir. Cangkang disikat hingga bersih, kemudian dikeringkan dengan memanfaatkan panas matahari selama 2 jam. Kemudian disimpan selama 1x24 jam pada suhu ruang. Cangkang kemudian dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 110°C hingga kering. Cangkang kerang dipisahkan dengan Nacre kemudian ditimbang kembali. Cangkang dipecah menjadi ukuran lebih kecil dan di-furnance I sampel kemudian disaring dengan ukuran -60+120 mesh serbuk cangkang kerang mutiara. Serbuk diuji menggunakan spectrophotometry (AAS) untuk mengetahui kandungan kalsium. furnace 900°C dan dikalsinasi untuk memperoleh kandungan s dikarakterisasi menggunakan *Fourier Transform Infra Red* kandungan dan karakterisasi senyawa yang terbentuk dan



terkandung dalam *bone graft*. Kemudian dilakukan uji Porositas dan *Scanning Electron Microscop* (SEM). (Anggraini and Yusuf, 2019)

Pemeliharaan hewan coba

Sebelum perlakuan, semua marmut diadaptasikan dan dipelihara secara berkelompok (2-3 marmut per kandang). Adaptasi hewan dilakukan selama 7 hari sebelum perlakuan untuk mengkondisikan hewan dalam keadaan sehat. Makanan berupa pellet yang setiap hari dikombinasikan. Temperatur dan kelembapan ruangan dibiarkan berada pada kisaran alamiah.

2.4.2 Jalannya Penelitian

Perlakuan Hewan Coba

- a. Alat dan bahan yang akan digunakan;
- b. Marmut ditimbang sebelum perlakuan;
- c. Marmut dianestesi menggunakan obat ketamin (50mg/kg) dan Xylazine (5 mg/kg)
- d. Gigi insisivus kanan rahang bawah diekstraksi tanpa rotasi menggunakan needle holder;
- e. Kelompok kontrol negatif: soket bekas pencabutan tidak diberi bone graft, kemudian dijahit menggunakan Vicryl 5.0.
- f. Kelompok uji: bahan serbuk kalsium karbonat cangkang kerang mutiara non-budidaya dimasukkan ke dalam soket gigi selanjutnya dijahit dengan Vicryl 5.0.
- g. Kelompok kontrol positif : bahan hidroksiapatit (BATAN) dimasukkan ke dalam soket gigi kemudian dijahit dengan Vicryl 5.0;
- h. Penjahitan pada daerah soket gigi;
- i. Pemberian warna pada Marmut untuk membedakan antara 3 kelompok perlakuan dan diberikan antibiotik suspensi doksisisiklin via oral 1-5 hari setelah ekstraksi gigi
- j. Sebanyak 3 ekor Marmut *disacrificed* pada masing-masing kelompok perlakuan pada hari ke-7, 14 dan 21 untuk pengambilan jaringan soket pencabutan dan pengamatan preparat untuk pemeriksaan histologi.
- k. Marmut dilakukan euthanasia menggunakan eter.
- l. Pengambilan spesimen rahang mandibula Marmut diambil dengan cara dipotong, lalu disimpan dalam larutan formalin buffer 10 %.



an Preparat

ang rahang dibawa ke Laboratorium PA Fakultas Kedokteran untuk pembuatan preparat imunohistokimia. Spesimen akan diolah dengan asam etilendiamintetraasetat 10%. Alkohol yang diencerkan akan digunakan untuk mendehidrasi subjek sebelum dihilangkan dengan

xylol dan ditanamkan dalam parafin, yang kemudian diaplikasikan pada objek kaca setelah dipotong dengan ketebalan 4 μm .

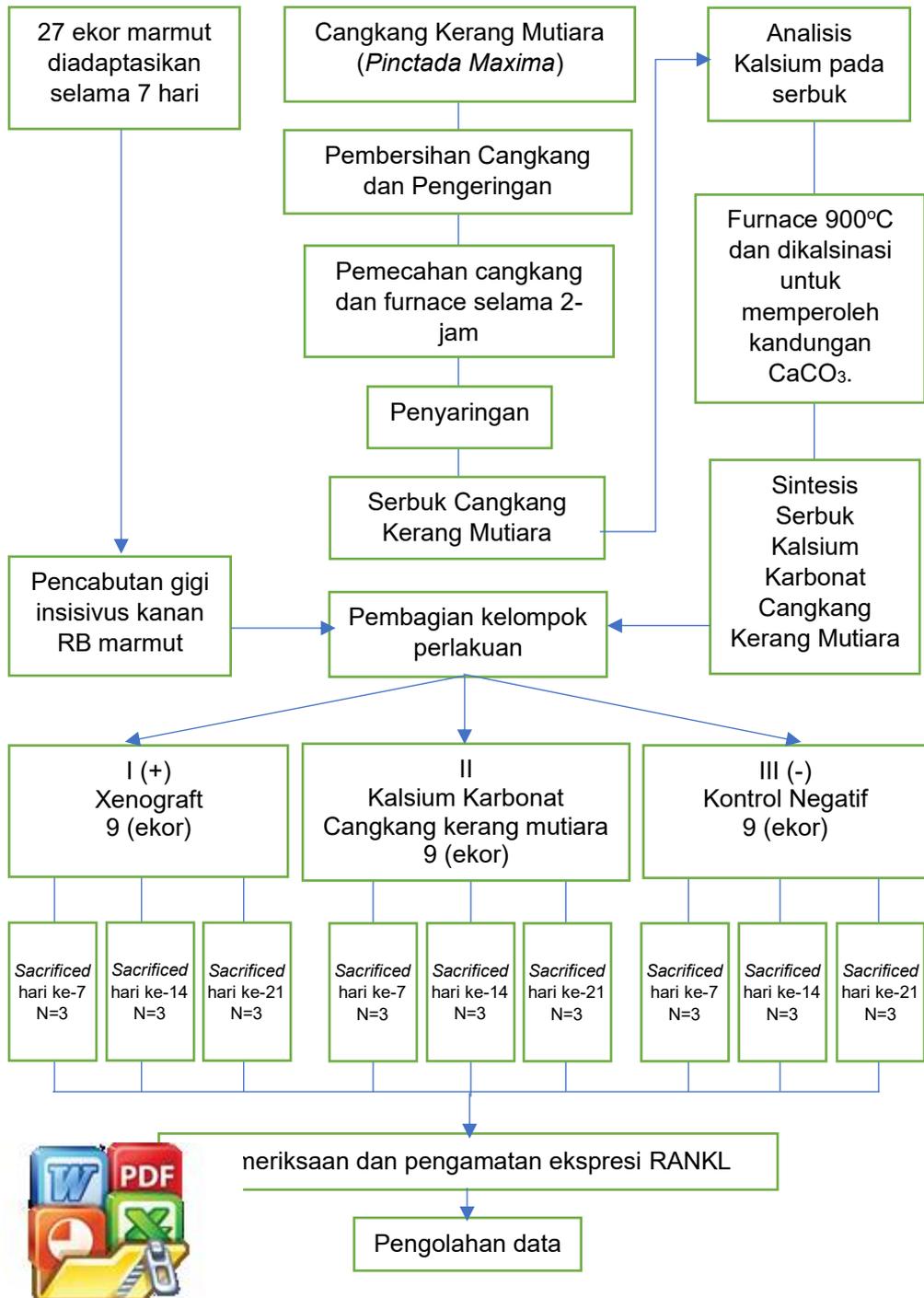
Tahapan pemeriksaan Imunohistokimia

Alkohol dan xylol diaplikasikan untuk mendeparafinisasi sediaan. Untuk mengamati protein RANKL, antibodi monoklonal RANKL diberikan pada sediaan. Substrat kromogen 3,3'-Diaminobenzidine juga ditambahkan. (Kresnadi, Laksono and Dahlan, 2023)

Analisis IHC tripel sekuensial dilakukan dengan pengamatan menggunakan mikroskop spektral (Panjang gelombang; 420 hingga 720 nm, interval; 20 nm) dimana gambar multi spektral diambil dari area yang dipilih, menggunakan kamera Cri Nuance (Nuance, Thermo Fisher Scientific), dipasang ke mikroskop Brightfield (Leica CTR5500, Leica).



2.4.3 Alur Penelitian



2.4.4 Etik Penelitian

Penelitian ini telah mendapatkan izin dari Komite Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hasanuddin dengan Nomor: 0194/PL.09/KEPK FKG-RSGM UNHAS/2024.

2.5 Parameter Pengamatan

2.5.1 Analisis Data

Dalam penelitian ini, data diuji menggunakan uji ANOVA atau Kruskal Wallis. Kedua uji statistik ini menggunakan data dengan skala ratio atau interval. Sebelum menentukan uji statistik yang akan digunakan, data diuji normalitasnya menggunakan uji Shapiro-Wilk karena jumlah subjek penelitian kurang dari 50 subjek. Jika hasil uji normalitas $>0,05$, maka data berdistribusi normal, begitu pula sebaliknya.

Data yang berdistribusi normal selanjutnya akan diuji menggunakan ANOVA, sedangkan data yang tidak berdistribusi normal akan diuji menggunakan Kruskal-Wallis. Jika pada uji ANOVA didapatkan nilai $p < 0,05$, data kemudian akan diuji variansnya menggunakan uji Levene. Jika varians sama, dilakukan uji posthoc Tukey. Jika varians beda, dilanjutkan dengan uji Tamhane's. Jenis data yang digunakan adalah data primer, pengolahan data menggunakan IBM SPSS Statistics V.21. Penyajian data dalam bentuk tabel dan grafik.

