

**EFEKTIVITAS *BONE GRAFT* YANG MENGANDUNG
CANGKANG KERANG MUTIARA (*PINCTADA
MAXIMA*) TERHADAP REGENERASI TULANG
MELALUI ANALISIS EKSPRESI TGF- β**

TESIS



**SITTI RAODA JUANITA RAMADHAN
J035191007**

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

**EFEKTIVITAS *BONE GRAFT* YANG MENGANDUNG
CANGKANG KERANG MUTIARA (PINCTADA
MAXIMA) TERHADAP REGENERASI TULANG
MELALUI ANALISIS EKSPRESI TGF- β**

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk
Memperoleh gelar Profesi Spesialis-1 dalam bidang ilmu Periodonsia
Pada Program Pendidikan Dokter Gigi Spesialis
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hasanuddin



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

2022

**EFEKTIVITAS *BONE GRAFT* YANG MENGANDUNG
CANGKANG KERANG MUTIARA (*PINCTADA MAXIMA*)
TERHADAP REGENERASI TULANG MELALUI ANALISIS
EKSPRESI TGF- β**

OLEH:

SITTI RAODA JUANITA RAMADHAN

J035191007

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

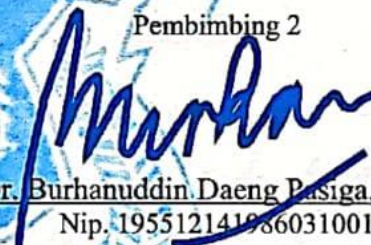
Makassar, 1 Maret 2022

Pembimbing 1



Prof. Dr. Sri Oktawati drg., Sp.Perio (K)
Nip. Nip. 196410031990022001

Pembimbing 2



Prof. Dr. Burhanuddin Daeng Pasiga, drg., M.Kes
Nip. 19551214196031001



Mengetahui

Prof. Dr. Sri Oktawati drg., Sp. Perio (K)
Nip. 196410031990022001

PENGESAHAN UJIAN TESIS

EFEKTIVITAS *BONE GRAFT* YANG MENGANDUNG
CANGKANG KERANG MUTIARA (*PINCTADA MAXIMA*)
TERHADAP REGENERASI TULANG MELALUI ANALISIS
EKSPRESI TGF- β

OLEH:

SITTI RAODA JUANITA RAMADHAN

J035191007

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

Makassar, 1 Maret 2022

Pembimbing 1



Prof. Dr. Sri Oktawati, drg., Sp.Perio (K)
Nip. 196410031990022001

Pembimbing 2



Prof. Dr. Burhanuddin Daeng Pasiga, drg., M.Kes
Nip. 195512141986031001



UNIVERSITAS HASANUDDIN
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI (KPS)
GGS PERIO DAN KG-UNHAS

Prof. Dr. Sri Oktawati, drg., Sp. Perio (K)
Nip. 196410031990022001



UNIVERSITAS HASANUDDIN
DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

Prof. Muhammad Ruslin, drg., M.Kes., Ph.D., Sp.BM(K)
Nip. 197307022001121001

TESIS

EFEKTIVITAS *BONE GRAFT* YANG MENGANDUNG CANGKANG KERANG MUTIARA (*PINCTADA MAXIMA*) TERHADAP REGENERASI TULANG MELALUI ANALISIS EKSPRESI TGF- β

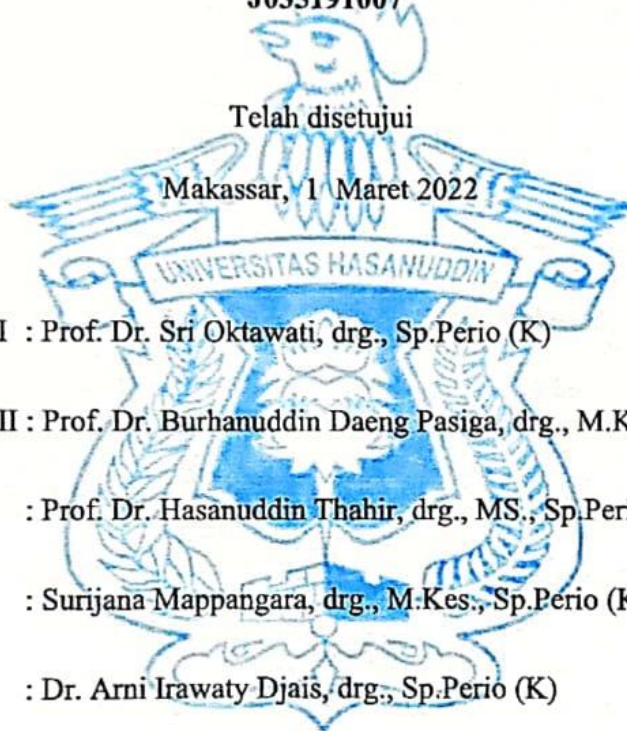
OLEH:

SITTI RAODA JUANITA RAMADHAN

J035191007

Telah disetujui

Makassar, 1 Maret 2022



1. Pembimbing I : Prof. Dr. Sri Oktawati, drg., Sp.Perio (K)
2. Pembimbing II : Prof. Dr. Burhanuddin Daeng Pasiga, drg., M.Kes
3. Penguji I : Prof. Dr. Hasanuddin Thahir, drg., MS., Sp.Perio (K)
4. Penguji II : Surijana Mappangara, drg., M.Kes., Sp.Perio (K)
5. Penguji III : Dr. Arni Irawaty Djais, drg., Sp.Perio (K)

.....
Muscha
Arni Irawaty Djais
.....
.....

Mengetahui
Program Studi (KPS)
Sp.Perio pada FKG-UNHAS



Prof. Dr. Sri Oktawati, drg., Sp. Perio (K)
Nip. 196410031990022001

PERNYATAAN KEASLIAN KARYA TULIS AKHIR

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Sitti Raoda Juanita Ramadhan

Stambuk : J035191007

Program studi : Pendidikan Dokter Gigi Spesialis Periodonsia

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

Makassar, 1 Maret 2022

Yang menyatakan



Sitti Raoda Juanita Ramadhan

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim. Dengan memanjatkan puji dan syukur kehadirat Allah SWT atas segala berkah dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan karya tulis akhir pada waktunya sebagai salah satu persyaratan dalam menyelesaikan pendidikan dokter gigi spesialis periodonsia fakultas kedokteran gigi universitas hasanuddin makassar.

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

1. Ibu Prof. Dr. Dwia Ariestina Pulubuhu, MA selaku Rektor Universitas Hasanuddin
2. Prof. Muhammad Ruslin, drg., M.Kes., Ph.D, Sp. BM(K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hasanuddin
3. Prof. Dr. Sri Oktawati, drg., Sp. Perio (K) sebagai Ketua Program Studi PPDGS Periodonsia dan sebagai pembimbing pertama yang selama ini telah meluangkan waktu untuk membimbing dan mengarahkan hingga selesainya penulisan tesis ini
4. Prof. Dr. Burhanuddin dg. Pasiga, drg., M.Kes sebagai pembimbing kedua tesis yang selama ini sudah meluangkan waktunya untuk membimbing, mengarahkan dan mendorong penulis menyelesaikan tesis ini
5. Prof. Dr. Hasanuddin thahir, drg., MS., Sp. Perio (K), Surijana Mappangara, drg., M.Kes., Sp.Perio (K), Dr. Arni Irawaty Djais, drg., Sp. Perio (K), sebagai tim penguji yang telah banyak memberikan masukan dan koreksi dalam proses perbaikan tesis ini
6. dr. Isra Wahid, Ph.D, selaku kepala lab Animal-Entomologi. Pabbenteng, S.T., M.Ling kepala laboratorium politeknik kimia universitas hasanuddin. Heryanto,S.Si,M.Si selaku analis Besar Laboratorium Kesehatan Makassar dan Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Sains FMIPA UNHAS, yang telah membantu proses penelitian ini.
7. Kepada drh. Andi Fitrah A sebagai tim dokter hewan yang telah membantu selesainya penelitian ini
8. Seluruh staf pengajar pada program pendidikan dokter gigi spesialis yang telah memberikan ilmunya

9. Ibunda tercinta yang dengan penuh kesabaran memberikan dukungan dan motivasi hingga terselesaikannya pendidikan ini
10. Saudara-saudaraku tersayang yang selalu mendukung dan memberikan semangat hingga terselesaikannya masa pendidikan ini.
11. Senior-senior terbaik drg. Heri Siswanto, drg. Ingrid Neormansyah, drg. Fatmawaty Madjid, drg. Rahma medikawati, drg. Patimah, drg. Trisantoso Rezdy Asalui atas semua masukan dan bimbingannya
12. drg. Gustivanny Dwipa A dan drg. Muhammad Yudin, terimakasih atas pengertian dan kesabarannya dalam menemani, mendukung dan memberikan semangat selama proses penelitian berlangsung.
13. Kepada teman-teman seperjuangan TiTU drg. Afdalia Annisa, drg. Sri Wahyu Putri, drg. Dian Eka Satya, drg. Azizah, drg. Sherly Endang, drg. Jennifer Tjokro, drg. Ayu Rahayu Feblina, drg. Nir Etriyani, drg. Nurhadijah Raja atas segala dukungan dan perhatiannya hingga dapat terselesaikannya pendidikan spesialis ini bersama-sama
14. Seluruh staf dan karyawan bagian periodonsia dan RSGM Halimah dg. Sikati yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu atas bantuannya selama menjalani pendidikan

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

Makassar, 1 Maret 2022

Sitti Raoda Juanita Ramadhan

EFEKTIVITAS *BONE GRAFT* YANG MENGANDUNG CANGKANG KERANG MUTIARA (*Pinctada maxima*) TERHADAP REGENERASI TULANG MELALUI ANALISIS EKSPRESI TGF- β

Abstrak

Pendahuluan: Penyakit periodontal yang parah dapat menyebabkan terjadi kehilangan tulang alveolar. Terapi regeneratif berupa pemberian *bone graft* pada defek tulang merupakan salah satu pilihan perawatan yang dapat mempercepat regenerasi tulang. Saat ini penggunaan bahan alam sebagai bahan pengganti tulang merupakan alternatif pilihan karena sedikit menimbulkan reaksi penolakan pada manusia. Cangkang kerang mutiara (*Pinctada maxima*) merupakan salah satu sumber daya laut yang budidayanya sudah mulai berkembang di beberapa kabupaten di Sulawesi Selatan, salah satunya di pulau Bontosua Kabupaten Pangkep. *Pinctada maxima* merupakan salah satu sumber daya laut yang memiliki kandungan kalsium tinggi, bahan utamanya adalah kalsium karbonat. Beberapa penelitian menyebutkan kalsium karbonat mampu mempercepat regenerasi tulang. Pemanfaatan limbah *Pinctada Maxima* hasil budidaya kabupaten pangkep, masih belum ada saat ini. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas *bone graft* yang mengandung cangkang kerang mutiara (*Pinctada maxima*) terhadap regenerasi tulang.

Bahan dan metode: Penelitian ini menggunakan cangkang kerang mutiara (*Pinctada maxima*) yang diproses menjadi bubuk kalsium karbonat. Kandungan dan karakteristik bahan diuji dengan menggunakan *Atomic Absorption Spectroscopy* (AAS), *X-Ray Fluorescence* (XRF), *Fourier Transform Infra-Red* (FTIR), and *X-Ray Diffraction* (XRD) secara berurutan. Pengujian bahan dilakukan pada marmut jantan dengan jumlah sampel 30 ekor yang dikelompokkan menjadi 3 kelompok. Kelompok kontrol negative, tanpa aplikasi *bone graft* (KN), kelompok kontrol positif, *bone graft* hidroksiapatit BATAN (KP), kelompok perlakuan diberikan *bone graft* yang mengandung kalsium karbonat bubuk cangkang kerang Mutiara (PM). Setiap kelompok perlakuan dibagi 2 berdasarkan waktu pengamatan 14 dan 21 hari. Data hasil penelitian kemudian dianalisis dengan bantuan program analisis data IBM SPSS Statistic versi 21 dengan nilai signifikan $p < 0.05$.

Hasil : Hasil Uji AAS diketahui bahwa bubuk cangkang kerang mengandung unsur kalsium sebesar 321389.92 $\mu\text{g/g}$. Hasil uji XRF diketahui kandungan kalsium dari PM sebesar 99.66% dan kalsium oksida sebesar 99.49%. Hasil uji FTIR menunjukkan adanya struktur kalsium karbonat dan kalsium oksida yang terbentuk dari bahan. Hasil Uji XRD menunjukkan derajat kristalisasi yang tinggi yaitu 85.71%. Hasil analisa data menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dengan nilai $p < 0.05$ berdasarkan waktu pengamatan hari ke 14 dan 21 pada kelompok PM. Tidak terdapat perbedaan yang signifikan dengan nilai $p < 0.05$

antara kelompok KN, KP, PM pada hari ke 14. Terdapat perbedaan yang tidak signifikan antara kelompok KN, KP, PM pada hari ke 21.

Kesimpulan: Hasil penelitian menunjukkan *bone graft* yang mengandung cangkang kerang Mutiara (*Pinctada maxima*) tersusun atas unsur kalsium dan kalsium oksida yang sangat tinggi dan struktur kalsium karbonat terbentuk dengan derajat kristalisasi yang cukup tinggi sehingga bahan ini memiliki potensi yang cukup baik sebagai *bone graft*. PM terbukti efektif dalam meningkatkan rerata ekspresi TGF- β 1 berdasarkan waktu pengamatan hari ke 14 dan 21. PM tidak efektif meningkatkan rerata ekspresi TGF- β 1 pada kelompok KN, KP, PM pada pengamatan hari ke 14. PM memiliki efektifitas yang sama dengan KP atau *gold standard* dalam meningkatkan rerata ekspresi TGF- β 1 pada pengamatan hari 21.

Kata Kunci: Bone graft, cangkang kerang mutiara, defek periodontal, *Pinctada maxima*, TGF- β

EFFECTIVENESS OF BONE GRAFT CONTAINING PEARL SHELLS (PINCTADA MAXIMA) ON BONE REGENERATION THROUGH TGF- β EXPRESSION ANALYSIS

Abstract

Introduction

Severe periodontal disease can lead to alveolar bone loss. One of regenerative therapy to treat bone defect is bone graft that can accelerate bone regeneration. Currently, the use of natural materials as bone substitutes is an alternative choice because it causes a slight rejection reaction in humans. Pearl oyster shell (*Pinctada maxima*) is one of the marine resources whose cultivation has begun to develop in several districts in South Sulawesi, one of which is on Bontosua Island, Pangkep Regency. *Pinctada maxima* is one of the marine resources that has a high calcium content, the main ingredient is calcium carbonate. Some studies say calcium carbonate can accelerate bone regeneration. Utilization of *Pinctada Maxima* waste from Pangkep Regency cultivation as a bone graft is still not available at this time. This study aims to determine the effectiveness of bone graft containing pearl oyster shell (*Pinctada maxima*) on bone regeneration.

Materials and methods: This study used pearl oyster shells (*Pinctada maxima*) which were processed into calcium carbonate powder. The content and characteristics of the ingredients were tested using Atomic Absorption Spectroscopy (AAS), X-Ray Fluorescence (XRF), Fourier Transform Infra-Red (FTIR), and X-Ray Diffraction (XRD) respectively. Material testing was carried out on 30 male guinea pigs which were divided into 3 groups. The negative control group without bone graft application (KN), the positive control group, bone graft hydroxyapatite (KP), the treatment group was given bone graft containing calcium carbonate powdered pearl shells (PM). Each treatment group was divided into 2 observation time of 14 and 21 days. The research data were then analyzed with the IBM SPSS Statistics version 21 data analysis program with a significant value of $p < 0.05$

Results: The results of the AAS showed that the pearl oyster shell powder contained a calcium element of 321389.92 $\mu\text{g/g}$. The results of the XRF showed that the calcium content of PM was 99.66% and calcium oxide was 99.49%. The results of the FTIR showed the presence of a structure of calcium carbonate and calcium oxide formed from the material. XRD results showed a high degree of crystallization, namely 85.71%. The results of data analysis showed that there was a significant difference with a p value of < 0.05 based on the observation time of day 14 and 21 in the PM group. There was significant difference with $p < 0.05$ between the KN, KP, PM groups on day 14. There was no significant difference between the KN, KP, PM groups on day 21

Conclusion: The results showed that the bone graft containing Pearl oyster shell (*Pinctada maxima*) was composed of very high elements of calcium and calcium oxide and the calcium carbonate structure was formed with a high degree of crystallization so that this material has good potential as a bone graft. PM was proven to be effective in increasing the mean expression of TGF- β 1 based on the observation time of day 14 and 21. PM was not effective in increasing the mean expression of TGF- β 1 in the KN, KP, PM groups on the observation day 14. PM had the same effectiveness as KP or gold standard in increasing the mean expression of TGF- β 1 on observation day 21.

Keywords: Bone graft, pearl oyster shell, periodontal defect, *pinctada maxima*, TGF- β

DAFTAR ISI

| | |
|--|-------|
| HALAMAN JUDUL | i |
| LEMBAR PENGESAHAN | ii |
| PERNYATAAN KEASLIAN KARYA TULIS AKHIR | vi |
| KATA PENGANTAR | vii |
| ABSTRAK | ix |
| ABSTRACT | xi |
| DAFTAR ISI | xiii |
| DAFTAR GAMBAR | xvi |
| DAFTAR TABEL | xvii |
| DAFTAR LAMPIRAN | xviii |
| DAFTAR SINGKATAN | xix |
| BAB I PENDAHULUAN | |
| 1.1 Latar Belakang | 1 |
| 1.2 Rumusan masalah..... | 6 |
| 1.3 Tujuan Penelitian | 7 |
| 1.3.1 Tujuan Umum..... | 7 |
| 1.3.2 Tujuan Khusus | 7 |
| 1.4 Manfaat Penelitian | 8 |
| 1.4.1 Manfaat Pengembangan Ilmu | 8 |
| 1.4.2 Manfaat Praktis..... | 8 |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA | |
| 2.1 Defek tulang periodontal..... | 9 |
| 2.2 Struktur dan komponen penyusun tulang..... | 10 |
| 2.2.1 Matriks tulang | 11 |
| 2.2.2 Sel-sel tulang..... | 15 |
| 2.3 Penyembuhan jaringan periodontal..... | 18 |

| | |
|---|----|
| 2.3.1 Penyembuhan jaringan lunak | 19 |
| 2.3.2 Penyembuhan jaringan keras..... | 20 |
| 2.3.3 Remodeling tulang | 21 |
| 2.4 TGF- β | 23 |
| 2.4.1 Sejarah TGF- β | 23 |
| 2.4.2 TGF- β 1 | 27 |
| 2.4.3 TGF- β 1 dan tulang | 27 |
| 2.4.4 TGF- β 1 dan osteoimmunitas..... | 28 |
| 2.4.5 TGF- β 1 dan osteoblas | 29 |
| 2.3.6 TGF- β 1 dan osteoklas | 30 |
| 2.5 Perawatan defek periodontal | 31 |
| 2.5.1 Bone graft..... | 32 |
| 2.5.2 Klasifikasi bone graft | 34 |
| 2.6 Cangkang kerang Mutiara (<i>Pinctada maxima</i>)..... | 36 |
| 2.6.1 Komposisi cangkang kerang | 39 |
| 2.7 Bone graft hidroksiapatit..... | 41 |
| BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS | |
| 3.1 Kerangka Teori..... | 43 |
| 3.2 Kerangka Konsep | 44 |
| 3.3 Hipotesis..... | 45 |
| 3.4 Keterbatasan penelitian | 45 |
| BAB IV METODE PENELITIAN | |
| 4.1 Rancangan Penelitian | 46 |
| 4.2 Waktu dan lokasi Penelitian..... | 46 |
| 4.3 Populasi dan Teknik sampel..... | 47 |
| 4.4 Identifikasi variable penelitian dan definisi operasional | 48 |
| 4.5 Persiapan dan tahap penelitian | 49 |
| 4.6 Analisis data | 46 |

| | |
|--|-----------|
| 4.7 Izin Etik..... | 46 |
| 4.8 Alur Penelitian | 47 |
| BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN | |
| 5.1 Persiapan penelitian | 61 |
| 5.2 Hasil penelitian..... | 63 |
| 5.3 Pembahasan..... | 68 |
| BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN | |
| 6.1 Kesimpulan | 74 |
| 6.2 Saran..... | 74 |
| DAFTAR PUSTAKA | 76 |
| LAMPIRAN GAMBAR PENELITIAN | 86 |

DAFTAR GAMBAR

| | |
|---|----|
| Gambar 1. Skema presentasi fase deposisi mineral tulang..... | 15 |
| Gambar 2. Fase remodelling tulang..... | 23 |
| Gambar 3. Lima peran TGF- β 1 dalam osteoimunitas..... | 29 |
| Gambar 4. Klasifikasi bahan <i>bone graft</i> | 34 |
| Gambar 5. Mikrostruktur cangkang Pinctada..... | 38 |
| Gambar 6. Fourier Transform Infra-Red (FTIR) kalsium karbonat cangkang kerang mutiara..... | 62 |
| Gambar 7. Derajat kristalisasi X-Ray Diffraction kalsium karbonat cangkang kerang mutiara..... | 63 |
| Gambar 8. Grafik rata-rata ekspresi TGF- β 1..... | 65 |
| Gambar 9. Ekspresi TGF- β 1 pada hari ke 14..... | 65 |
| Gambar 10.. Ekspresi TGF- β 1 pada hari ke 21..... | 66 |

DAFTAR TABEL

| | |
|---|----|
| Tabel 1. Hasil Uji X-Ray Fluoresence (XRF)..... | 61 |
| Tabel 2. Perbandingan Rerata dan simpang baku ekspresi TGF- β 1 masing-masing kelompok penelitian..... | 66 |
| Tabel 3. Perbandingan rerata dan simpang baku ekspresi TGF- β 1 antar kelompok penelitian pada hari 14 dan 21 | 67 |
| Tabel 4. Uji Beda Lanjut LSD rerata ekspresi TGF- β 1 antar kelompok penelitian | 68 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | |
|--|----|
| 1. Lembar etik penelitian | 86 |
| 2. Persiapan Bubuk bonegraft yang mengandung cangkang kerang mutiara Pinctada maxima..... | 87 |
| 3. Pembuatan Bone graft di Lab politeknik unhas dan entomologi FK Unhas..... | 87 |
| 4. Hasil Analisa Kandungan kalsium bahan sebelum diolah dengan Analisa AAS..... | 88 |
| 5. Hasil Analisa Kandungan senyawa bahan setelah diolah dengan Analisa XRF..... | 89 |
| 6. Hasil Analisa Kandungan senyawa bahan setelah diolah dengan Analisa FTIR..... | 91 |
| 7. Hasil Analisa Kandungan senyawa bahan setelah diolah dengan Analisa XRD..... | 92 |
| 8. Adaptasi Hewan..... | 95 |
| 9. Perlakuan pada hewan coba..... | 95 |
| 10. Pengambilan jaringan tulang..... | 96 |
| 11. Pembuatan Slide..... | 97 |
| 12. Pemeriksaan Immunohistokimia..... | 98 |
| 13. Hasil Analisa data IBM SPSS Statistic versi 21..... | 99 |

DAFTAR SINGKATAN

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

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

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit periodontal yang terjadi akibat infeksi bakteri dapat menyebabkan peradangan, kerusakan jaringan ikat, dan destruksi tulang alveolar.¹ Berdasarkan data RISKESDAS (2018), prevalensi penyakit periodontal di Indonesia mencapai angka 74,1%.² Infeksi pada jaringan periodontal dapat menyebabkan terjadinya defek pada tulang, sehingga terbentuk kerusakan tulang yang tidak merata dan kompleks.³

Defek tulang alveolar didefinisikan sebagai perubahan pada morfologi tulang alveolar yang dapat berkembang dari penyakit periodontal, kehilangan gigi, trauma, dan infeksi.⁴ Saat resorpsi melampaui formasi maka baik tinggi tulang maupun kepadatan tulang berkurang.^{5,6} Pada penelitian prevalensi dan distribusi defek tulang yang dihubungkan dengan *moderate periodontitis* dan *severe periodontitis*, besar prevalensi defek tulang alveolar pada pasien dengan *moderate/severe* periodontitis sebesar 94%.⁷ De Toledo dkk, prevalensi terjadinya defek vertikal pada pasien pria lebih tinggi (14.95%) dibandingkan pada pasien wanita (8.2%).⁸ Baljon dkk, defek vertikal lebih sering terjadi pada gigi posterior,⁹ Vrotsos dkk; Kasaj dkk, prevalensi tertinggi pada gigi posterior mandibula.^{10,11}

Terapi regeneratif diberikan untuk mempercepat penyembuhan dan pembentukan tulang baru.^{5,6} Terdapat beberapa terapi rekayasa jaringan periodontal, diantaranya penggunaan *guided tissue regeneration*, *bone graft*,

dan beberapa bahan biologik lainnya. *Bone graft* digunakan untuk merekonstruksi defek *intraosseous* yang terbentuk akibat adanya penyakit periodontal. Secara garis besar *bone graft* dapat diklasifikasikan kedalam empat bagian yaitu *autograft*, *allograft*, *xenograft* dan material sintesis *alloplastic*. *Autograft* masih menjadi pilihan utama dalam merestorasi defek tulang namun masih sangat terbatas sehingga dibutuhkan bahan *bone graft* pengganti yang dapat membantu regenerasi tulang.^{12,13,14}

Penggunaan *bone graft* untuk peningkatan penyembuhan tulang dan pembentukan tulang baru, perlu memperhatikan tiga prinsip dasar yaitu osteoinduksi, osteokonduksi dan osteogenesis. Osteoinduksi adalah pembentukan tulang baru dari sel-sel prekursor osteogenik yang berdiferensiasi menjadi osteoblas, biasanya diinduksi oleh *Bone Morfogenetik Protein* (BMP) yang dihasilkan oleh *graft*, osteokonduksi merupakan peningkatan pembentukan tulang karena struktur yang menguntungkan di sekitar tulang baru, dan efek osteogenesis diperoleh melalui modulasi proses biokimia alami yang memulai dan mempertahankan pembentukan tulang selama proses penyembuhan, osteoblast dari *graft* mampu merangsang pembentukan tulang baru.¹⁵

Osteoinduksi dapat diperoleh melalui dua pendekatan yaitu 1) mediasi sel: sel-sel prekursor tulang dapat diambil dari sumsum tulang dan ditempatkan di daerah defek, selain itu dapat pula di kultur dari stem sel tulang. 2) Mediasi *growth factor*: melalui beberapa *growth factor* yang berperan dalam regulasi fisiologis pembentukan tulang, yaitu *insuline-like growth factor* (IGFs),

transforming growth factor (TGF- β), *fibroblast growth factor* (FGFs), *epidermal growth factor* (EGF), *wingless and Int-1* (WNTs) dan BMPs.¹⁶

Peran TGF- β dalam regenerasi tulang yaitu mengatur secara ketat diferensiasi dan aktivasi dua sel osteoblas oleh stem sel mesenkim dan osteoklas oleh stem sel hematopoietik. TGF- β 1 mengontrol osteoblas dan diferensiasi osteoklas, sehingga terjadi keseimbangan pembentukan dan resorpsi tulang. TGF- β memiliki dua efek pada osteoblas yaitu menstimulasi ekspresi differensiasi osteoblas awal dan matriks protein oleh osteoblas, serta menahan diferensiasi akhir.¹⁶

Terdapat tiga isoform TGF- β 1 mamalia yang ditemukan pada tulang (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3), namun jumlah TGF- β 1 yang paling banyak ditemukan pada tulang. TGF- β merupakan regulator multifungsi dengan berbagai aktivitas biologis, diantaranya regulasi pertumbuhan, diferensiasi berbagai jenis sel, efek stimulus pada sel mesenkim dan efek penghambat pada sel ektodermal. Tulang dan trombosit mengandung TGF- β yang jumlahnya 100 kali lebih banyak daripada jaringan lain dan osteoblast mengandung reseptor TGF- β terbanyak. Hal ini menunjukkan pentingnya TGF- β dalam proses metabolisme tulang.¹⁶

Osteokonduksi, pembentukan tulang normal dibantu oleh tersedianya struktur lingkungan yang menguntungkan dimana bahan konduktif tulang berfungsi sebagai perancah untuk pembentukan tulang baru. Cangkang kerang mutiara (*Pinctada maxima*) telah menjadi bahan pengganti tulang yang cukup menjanjikan.¹⁷ Cangkang kerang mampu memfasilitasi proliferasi osteoblas,

mempercepat produksi matriks ekstraseluler, dan mineralisasi. Selain itu, cangkang kerang juga mengandung bahan inorganik dan organik yang memiliki struktur dasar mirip tulang.⁵

Kerang mutiara (*Pinctada maxima*) merupakan salah satu sumber daya laut yang mampu menghasilkan mutiara dengan nilai ekonomi tinggi dan mengandung protein yang tinggi sehingga cukup baik bila dikonsumsi. Budidaya kerang mutiara telah banyak dilakukan salah satunya di Kepulauan Pangkep Sulawesi Selatan.¹⁸ Cangkang kerang memiliki 2 sisi, sisi bagian luar dan sisi bagian dalam. Sisi bagian dalam (*nacre*) dapat membentuk lapisan mutiara dengan penampilan mengkilap. *Nacre* biasa disebut “mother of pearl” merupakan bagian dari cangkang kerang mutiara (*Pinctada maxima*) yang memiliki kandungan utama kalsium karbonat dalam bentuk kristal *aragonite*.⁵ Kadar kalsium yang tinggi yang terkandung dalam cangkang kerang mendorong pemanfaatannya sebagai sumber kalsium alami. Kalsium merupakan mineral terbanyak dalam tubuh, sekitar 99% total kalsium ditemukan pada tulang dan gigi.¹⁹

Kalsium karbonat merupakan senyawa kimia dengan formula CaCO_3 . Tingginya kadar kalsium karbonat dalam cangkang kerang bisa dilihat pada tingkat kekerasannya. Semakin keras cangkang, makin tinggi kadar kalsium karbonatnya. Kalsium karbonat telah lama digunakan dalam dunia medis, sebagai suplemen kalsium dalam merawat penyakit yang berhubungan dengan defisiensi kalsium.²⁰ Rahayu dkk. Sumber kalsium yang berasal dari cangkang kerang dapat mengubah ion logam beracun dan menyerap unsur

kimia organik dalam tubuh.²¹ Kalsium karbonat juga memberikan harapan yang baik dalam perbaikan tulang pada defek periodontal dengan mempercepat stimulasi pembentukan tulang baru.²² Kalsium karbonat dipertimbangkan karena efisiensi tinggi, harga lebih murah dan pembuatannya yang sederhana. Kalsium karbonat dapat mempengaruhi aktivasi mineral tulang, sehingga berpotensi untuk mempercepat proses penyembuhan tulang.

Penemuan implan gigi pada tulang tengkorak suku mayan menjadi awal dilakukannya sejumlah penelitian terhadap cangkang kerang mutiara.³ Lamghari dkk melakukan penelitian *in vivo* yang menunjukkan aktivitas osteogenik dari cangkang kerang mutiara (*Pinctada maxima*) dengan terbentuknya tulang baru pada defek tulang belakang kelinci dan domba.^{3,23} Almeida MJ, dkk. menemukan asam amino yang terdiri dari *glisin* dan *alanin* dari *water soluble matrix (WSM)* yang diekstrak dari cangkang kerang mutiara (*Pinctada maxima*).²⁴ Asvanund, dkk. melakukan penelitian *in vivo* dengan menggunakan cangkang kerang mutiara (*Pinctada maxima*) dan membandingkan efek osteogenik cangkang kerang dan *β-tricalcium phosphate* (β -TCP) pada sel tulang babi dan menemukan terbentuknya sel tulang baru yang dilihat dari meningkatnya ekspresi *alkaline phosphatase (ALP)*, *bone sialoprotein (BSP)*, dan *osteocalcin (OC)* tanpa adanya jaringan fibrous.²⁵ Penelitian *in vitro* yang dilakukan oleh Green dengan melakukan observasi pada *chip nacre* cangkang kerang mutiara (*Pinctada maxima*) yang di kultur pada sel sumsum tulang manusia, diperoleh peningkatan ekspresi ALP yang

menunjukkan *nacre* mempengaruhi tahap awal differensiasi sel tulang manusia.¹⁷

Penelitian-penelitian sebelumnya yang dilakukan pada cangkang kerang mutiara (*Pinctada maxima*) menunjukkan biokompatibilitas, biodegradabilitas, dan osteogenik dari cangkang kerang sebagai alternatif bahan pengganti tulang yang cukup potensial. Namun, pemanfaatan limbah hasil budidaya cangkang kerang mutiara (*Pinctada maxima*) dari kepulauan Pangkep sebagai bahan *bone graft* masih belum diteliti. Perbedaan perairan dapat mempengaruhi kandungan mineral cangkang kerang. Kalesaran, dkk. perbedaan kandungan mineral cangkang kerang dapat dipengaruhi oleh kesuburan perairan sehingga penyerapan makanan oleh organisme berbeda. Selain itu, sifat fisika, kimia, dan organisme pendukung lainnya sangat mempengaruhi perbedaan produktivitas perairan daerah satu dengan lainnya.²⁶

Berdasarkan uraian di atas maka penulis tertarik untuk mengetahui efektifitas *bone graft* yang mengandung cangkang kerang mutiara (*Pinctada maxima*) terhadap regenerasi tulang.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah apakah *bone graft* yang mengandung cangkang kerang mutiara (*Pinctada maxima*) dapat mempengaruhi regenerasi tulang yang ditandai dengan terbentuknya ekspresi TGF- β 1?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui efektivitas *bone graft* yang mengandung cangkang kerang mutiara (*Pinctada maxima*) terhadap regenerasi tulang.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui kandungan dan karakteristik bahan *bone graft* yang mengandung cangkang kerang (*Pinctada maxima*)
2. Untuk mengetahui perbandingan ekspresi TGF β -1 setelah aplikasi *bone graft* yang mengandung cangkang kerang mutiara (*Pinctada maxima*), *bone graft* hidroksiapatit (BATAN), dan tanpa aplikasi *bone graft* terhadap regenerasi tulang berdasarkan waktu pengamatan hari ke 14 dan 21.
3. Untuk mengetahui perbandingan ekspresi TGF β -1 setelah aplikasi *bone graft* yang mengandung cangkang kerang mutiara *Pinctada maxima*), *bone graft* hidroksiapatit (BATAN), dan tanpa aplikasi *bone graft* terhadap regenerasi tulang pada hari ke 14.
4. Untuk mengetahui perbandingan ekspresi TGF β -1 setelah aplikasi *bone graft* yang mengandung cangkang kerang mutiara (*Pinctada maxima*), *bone graft* hidroksiapatit (BATAN), dan tanpa aplikasi *bone graft* terhadap regenerasi tulang pada hari ke 21.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat pengembangan ilmu

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

1.4.2 Manfaat penelitian

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

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

Tulang alveolar, ligamen periodontal, sementum dan gingiva merupakan struktur unik komponen penyusun jaringan periodontal yang mendukung dan menutrisi gigi.²⁷ Tulang alveolar berasal dari kondensasi awal ekto-mesenkim sekitar benih gigi, pertama kali terbentuk saat erupsi gigi untuk memfasilitasi perlekatan tulang dan ligamen periodontal serta akan resorpsi saat gigi hilang³

Etiologi utama penyebab infeksi pada jaringan periodontal adalah adanya akumulasi bakteri plak.²⁸⁻²⁹ Perkembangan infeksi ini dapat ditandai dengan terjadinya resorpsi tulang alveolar. Resorpsi tulang akibat penyakit periodontal dapat terjadi pada satu sisi atau dalam kombinasi bentuk berbeda. Kehilangan dukungan tulang alveolar merupakan pertanda anatomis terjadi perkembangan penyakit periodontal. Kerusakan tulang alveolar yang tidak merata dan kompleks, apabila tidak dirawat dapat mengakibatkan kehilangan gigi.^{3,30,31,32}

2.1 Defek Tulang Periodontal

Defek tulang didefinisikan sebagai perubahan pada morfologi tulang alveolar, yang dapat terjadi secara normal akibat variasi anatomis maupun akibat perkembangan penyakit. Defek ini berperan penting pada awal dan perkembangan penyakit.²⁸ Dalam kedokteran gigi kerusakan alveolar dapat terjadi akibat faktor bawaan atau akibat faktor lain. Kerusakan alveolar akibat faktor lain diklasifikasikan menjadi kerusakan vertikal dan horisontal, kerusakan ini dapat disebabkan oleh proses pencabutan, penyakit periodontal, gigi avulsi akibat trauma, atau resesi.³³ Proses inflamasi yang terjadi akibat

luka dapat meluas ke jaringan periodontal, sehingga jaringan melepaskan mediator inflamasi. Apabila inflamasi awal ini tidak dapat dihambat, maka respon inflamasi akan meluas hingga ke tulang alveolar.³⁴

Secara radiografis, jarak 2 mm dari *Cemento Enamel Junction* (CEJ) ke *Alveolar Crest* (AC) menggambarkan keadaan periodontium normal. Jarak lebih dari 2mm, menunjukkan telah terjadi kehilangan tulang alveolar.³⁵ Ada berbagai klasifikasi defek tulang, Klasifikasi yang didasarkan pada kriteria morfologis tertentu dibedakan menjadi defek *suprabony*, defek *infrabony*, dan defek *interradicular* atau furkasi. Defek suprabony merupakan defek dimana dasar poket berada lebih ke koronal dari *crest* alveolar, defek infrabony merupakan defek dimana dasar poket letaknya lebih ke apical dari *crest* alveolar, defek *interradicular* merupakan defek yang terjadi pada daerah sekitar bifurkasi.^{28,36}

2.2 Struktur dan Komponen Penyusun Tulang

Tulang dibentuk melalui dua fase berbeda: 1) osifikasi endokondral, di mana model dibentuk oleh tulang rawan dan 2) osifikasi intramembran, di mana tulang dibentuk langsung dari kerapatan sel mesenkim tanpa perantara tulang rawan. Tulang merupakan jaringan dinamis yang selalu diperbaharui selama hidup masing-masing individu melalui proses remodeling tulang dan ketidakseimbangan dalam proses ini menyebabkan terjadinya penyakit pada tulang^{37,38}

Tulang memiliki beberapa fungsi yaitu sebagai struktur pendukung tubuh, tempat melekatnya otot, ligamen dan tendon, pendukung mekanis, pelindung

organ-organ vital serta tempaan penyimpanan kalsium dan faktor pertumbuhan. Tulang tidak padat secara homogen, tetapi tersusun dari sel-sel tulang yang diatur dalam media biomineral. Tulang itu sendiri mengandung serat kolagen dan mineral tulang anorganik berupa kristal kecil.³⁹ Berdasarkan struktur makroskopisnya tulang terbagi menjadi dua bagian yaitu *cancellous* (tulang trabekular atau *spongy*) dan kortikal (tulang kompak). Tulang kortikal menyusun 80% dari total tulang sedangkan tulang trabekular menyusun 20 % dari total massa tulang.⁴⁰

2.2.1 Matriks tulang

Tulang tersusun atas matriks tulang dan sel yang membantu menyusun matriks tulang. Media biomineral tulang mengandung sekitar 30% organik dan 70% inorganik.⁴¹ Organik matriks organik atau material osteoid yang menyusun sepertiga massa tulang adalah protein yang 90% dari kandungannya adalah kolagen. kolagen tipe I (> 95%) dan tipe V (<5%) dan sejumlah kecil kolagen tipe III, serat Sharpey, dan kolagen tipe XII.^{42,43}

Kandungan lain dari matriks organik adalah non-kolagen protein, yang terdiri dari *proteoglican*, *proteins with γ -carboxyglutamic acid*, *Glycoproteins*, *Proteins originating from plasma*, *growth factors*. *Proteoglican* merupakan molekul besar yang membentuk 10% protein non-kolagen. Dalam matriks osteoid terdapat empat jenis proteoglikan yaitu *hyaluronan* dan *kondroitin-sulfat*, *biglycan* dan *decorin*.^{42,43}

Protein dengan asam γ -karboksiglutamat meliputi osteokalsin (OC) dan protein matriks dengan asam γ -karboksiglutamat yang merupakan asam

amino yang mengikat kalsium dan membutuhkan vitamin K untuk sintesisnya. Osteokalsin adalah protein matriks kecil yang disintesis oleh osteoblas dan trombosit. kadar plasmatiknya telah dianggap sebagai salah satu penanda biokimiawi osteogenesis, yang terkait dengan jumlah dan aktivitas osteoblas.^{42,43}

Glikoprotein meliputi osteonektin, alkali fosfatase, dan protein dengan tripeptida RGD (*Arg-Gly-Asp*). Osteonektin adalah glikoprotein dengan afinitas yang kuat untuk kolagen tipe I, kalsium dan hidroksiapatit yang berperan dalam regulasi adhesi seluler antara matriks dan sel. Alkali fosfatase adalah enzim yang membebaskan fosfat anorganik dari ester fosfat, dan diperlukan untuk mineralisasi. Lima protein dengan tripeptida RGD yaitu osteopontin, sialoprotein tulang, fibronektin, trombospondin dan vitronektin. Glikoprotein ini fundamental bagi proses regenerasi dan remodeling tulang.^{42,43}

Protein yang berasal dari plasma meliputi albumin dan *a2-SH-glikoprotein*, yang terkait dengan pengendapan kalsium dalam matriks osteoid. Growth faktor meliputi polipeptida seperti IGF-I, II, TGF- β , *Platelet-derived growth factor* (PDGF), disintesis di dalam tulang itu sendiri atau berasal dari lokasi lain (hati, trombosit, dll.) yang berperan dalam diferensiasi, pertumbuhan, dan proliferasi sel autokrin atau parakrin.^{43,44}

Inorganik tulang disusun oleh mineral tulang berupa hidroksiapatit, yang tersusun atas kristal kalsium fosfat dan karbonat. Kandungan lainnya adalah magnesium, natrium, kalium, mangan, fluorida dan karbonat.

Kehadiran berbagai ion selain kalsium, fosfat, dan hidroksil, menyebabkan mineral pembentuk tulang tidak bisa dikatakan secara stokiometri dengan hidroksiapatit dengan formula kimia $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Hidroksiapatit mempunyai sifat biokompatibel, bioaktif, dan osteokonduktif. Secara termodinamik pH, temperatur dan komposisi fisiologi fluida pada hidroksiapatit sangat stabil. Hidroksiapatit bersifat osteokonduksi, yaitu mampu menginduksi dan menstimulasi sel-sel punca dan osteoblas untuk berproliferasi dan diferensiasi dalam pembentukan tulang baru atau proses regenerasi tulang.⁴⁵⁻⁴⁷

Karbonat merupakan salah satu mineral yang terdapat di tulang dalam jumlah sedikit, sekitar 4% ditemukan pada ikan, 8% ditemukan pada mamalia, dan 13 persen ditemukan pada kura-kura. Karbonat dalam tubuh juga berperan dalam menjaga keseimbangan asam basah. Analisis kimia menunjukkan bentuk biomineral terbanyak dari apatit mengandung karbonat, yang merupakan bagian penting mencapai 2-8% berat, tergantung pada sumbernya (tulang, gigi, kalsifikasi patologis), spesies, dan usia. Karbonat dapat disubstitusikan menjadi dua ion pada struktur hidroksiapatit: yaitu pada PO_4^{3-} (membentuk karbonat apatit tipe B, B-Cap) dan pada OH^- yang berada sepanjang jalur *crystallographic C-axis* (membentuk karbonat apatit tipe A, A-Cap).⁴⁸

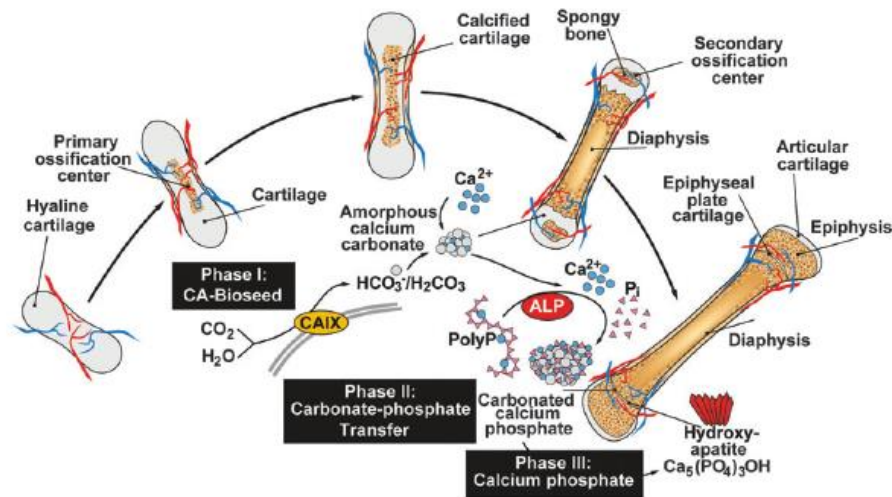
Beberapa kelebihan sifat karbonat apatit dibandingkan dengan hidroksiapatit bila dalam kaitannya dengan proses remodeling tulang yaitu karbonat apatit merupakan komposisi yang lebih menyerupai tulang manusia

sedangkan hidroksiapatit bukan merupakan komposisi tulang manusia, karbonat apatit dapat diresopsi dengan baik oleh osteoklas sedangkan hidroksiapatit tidak dapat diresopsi, karbonat apatit memiliki kemampuan kelarutan yang baik pada kondisi asam lemah yaitu ketika osteoklas bekerja meresorpsi tulang dengan mengeluarkan ion H^+ , karbonat apatit dapat memacu pertumbuhan tulang secara cepat dan sempurna sedangkan hidroksiapatit memacu pertumbuhan secara lambat.^{49,50}

Kalsium karbonat dengan fitur skala nano telah mendapat perhatian dalam regenerasi tulang karena fleksibilitasnya dalam preparasi, biodegradasi dan osteokonduktivitas.⁵¹ Sebuah penelitian mengkonfirmasi bahwa keramik nano kalsium karbonat memiliki tingkat degradasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan keramik substitusi tulang sintetis lainnya, termasuk nano- β -tri kalsium fosfat dan nano-hidroksiapatit, dan dapat meningkatkan ekspresi gen pada penanda osteogenik tertentu.⁵² Yu dkk. membuktikan bahwa perancah kalsium karbonat dengan nano struktur dapat mempercepat adsorpsi protein dan mempercepat degradasi, sehingga memberikan lebih banyak kalsium mempercepat pertumbuhan tulang.⁵³

Kalsium karbonat, merupakan reservoir karbon geokemikal terbesar, yang terdapat dalam tiga polimorf kristalin yaitu kalsit, aragonite, dan vaterite. Deposisi mineral kalsium karbonat pada tahap pertumbuhan tulang dapat dibagi kedalam tiga fase. Fase 1: benih *amorphous calcium carbonate* (AAC) terbentuk, proses ini dimediasi oleh membrane-associated CA-IX. Fase II: polyp dilepaskan dari platelet ALP-mediated hidrolisis dibawah

pembentukan ortho-phosphate yang bereaksi sebagai donor phosphate untuk reaksi transfer carbonate-phosphate. Fase III: phosphate digunakan untuk pembentukan (carbonated) *calcium phosphate*.⁵⁴



Gambar 1. Skema presentasi fase deposisi mineral tulang⁵⁴

2.2.2 Sel-sel tulang

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 dan osteoklas). Sel-sel yang membantu menyusun matriks tulang dan berperan dalam regenerasi tulang adalah osteoblas, osteosit, *bone lining cel*, dan osteoklas.⁵⁴

A. Osteoblas

Osteoblas merupakan sel kuboid yang berada sepanjang permukaan tulang, berukuran (20-30 μm) sekitar 4-6 % dari seluruh sel tulang. Osteoblas berasal dari sel osteoprogenitor *mesenchymal stem cells* (MSC)

dan jaringan ikat lainnya, yang berdiferensiasi dan berkembang biak menjadi osteoblas sebelum membentuk tulang. Beberapa fungsi dari osteoblas adalah mensintesis kolagen dan non-kolagen dari matriks tulang organik, mengarahkan susunan fibril matriks ekstraseluler, mineralisasi osteoid, melalui alkalik fosfat yang memediasi resopsi osteoblas dengan mensintesis sitokin spesifik, dan mensintesis *growth factors*, serta diferensiasi sel yang dimediasi oleh sejumlah besar *bone morphogenic proteins* (BMPs), *growth factors* dan sitokin. Osteoblas bertahan selama 1-10 minggu, memiliki tiga perjalanan perkembangan: osteoblas inaktif menjadi *bone-lining cells*, matriks termineralisasi yang dihasilkan akan mengelilingi osteoblas dan menjadi osteosit, menghilang dari tempat pembentukan tulang sebagai hasil dari apoptosis.^{44,55}

B. Osteosit

Osteosit merupakan sel yang jumlahnya 90-95 % dari total sel tulang dan berumur panjang hingga 25 tahun. Osteosit terletak di dalam lakuna yang dikelilingi oleh matriks tulang termineralisasi. Jumlah osteosit berbeda tergantung pada jenis tulangnya. Osteosit berasal dari *mesenchymal stem cells* (MSC) melalui diferensiasi osteoblas. Dalam proses ini terdapat 4 tahap osteosit yaitu: Osteoid-osteosit, preosteosit, *young-osteosit*, *mature-osteosit*. Setelah matriks termineralisasi, beberapa osteoblas tetap terperangkap di dalamnya dan berubah menjadi osteosit. Osteoblas, osteoklas, dan *bone lining cells* berada di permukaan tulang sedangkan osteosit berada di bagian dalam tulang. Osteosit berbentuk

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

44,45

Osteosit juga berpartisipasi dalam sintesis dan mineralisasi matriks osteoid, mengontrol remodeling tulang, mendeteksi variasi beban mekanis, berkontribusi terhadap regulasi hemostatis kalsium dan fosfat.^{44,45} Osteosit merupakan tahap akhir dari osteoblas yang tidak mampu memperbarui diri. Kerusakan pertumbuhan osteosit mengarah pada kerapuhan tulang atau osteoporosis.⁵⁶

C. *Bone-lining cells*

Sel pipih osteoblas yang menutup permukaan tulang, merupakan osteoblas tidak aktif dan terdapat pada permukaan tulang. *Bone-lining cells* berperan dalam resorpsi tulang hingga *remodeling* tulang, hemostasis kalsium, dan diferensiasi osteoklastik. Sel ini akan diaktivasi menjadi osteoblas pada saat pembentukan sel tulang baru. Fungsi *bone-lining cells* adalah mencegah interaksi langsung antara osteoklas dan matriks tulang, ketika resorpsi tulang seharusnya tidak terjadi, berpartisipasi dalam diferensiasi osteoklas, memproduksi *osteoprotegerin* (OPG) dan *receptor activator of nuclear factor ligand* (RANKL)^{44,55}

D. Osteoklas

Osteoklas merupakan sel besar berinti banyak yang berasal dari makrofag hematopoietik dan *monocyte stem-cell line*. Bila distimulasi sel ini berproliferasi dan bergabung membentuk *large multinucleated osteoclas*, biasanya memiliki 3–20 nukleus dan sejumlah besar mitokondria, lisosom, dan memproduksi asam fosfatase yang berfungsi untuk melarutkan mineral dalam tulang. Faktor-faktor yang mempengaruhi differensiasi sel osteoklas diantaranya *macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)* yang disekresikan oleh osteoprogenitor mesenchymal cells dan osteoblast, *receptor activator of nuclear factor (RANK)* ligand yang disekresikan oleh osteoblast, osteosit dan sel stroma. Kedua faktor ini mengaktifasi faktor transkripsi dan ekspresi gen osteoklas. Pembentukan osteoklas terjadi saat RANKL berikatan dengan RANK, dimana proses ini disebut osteoklastogenesis. Di sisi lain osteoprotegerin yang disekresikan oleh osteoblast, sel stroma, gingiva, dan fibroblast periodontal berikatan dengan RANKL, mencegah interaksi RANK/RANKL sehingga menghambat osteoklastogenesis. Sistem RANKL / RANK / OPG adalah mediator kunci dari osteoklastogenesis. ^{44,55}

2.3 Penyembuhan jaringan periodontal

Jaringan periodontal disusun oleh jaringan lunak (gingiva, mukosa dan ligamen periodontal) dan jaringan keras (sementum dan tulang alveolar). Proses penyembuhan jaringan periodontal melalui empat fase

yang saling berhubungan, yaitu: hematoma dan koagulasi, inflamasi, sel proliferasi, dan remodelling dan maturase lokal.⁵⁷

2.3.1 Penyembuhan jaringan lunak

Secara umum, saat pertama kali terjadi cedera atau luka, maka akan terjadi perdarahan pada daerah jejas. Pada keadaan normal, molekul yang bertanggung jawab pada proses pembekuan akan terbentuk, melindungi daerah luka dan menyediakan matriks untuk migrasi ke daerah luka, proses ini berlangsung 24 jam pertama. Setelah bekuan darah terbentuk, akan berlanjut ke fase inflamasi dimana sel-sel inflamasi seperti *polimorfonuclear neutrophil* dan monosit teraktivasi, dan membersihkan jaringan nekrotik sekitar jejas, proses ini berlangsung selama 0-5 hari. Setelah inflamasi, terbentuk jaringan granulasi, yang diawali dengan akumulasi kolagen, lalu makrofag memberi sinyal kepada sitokin dan *growth factor* agar terjadi migrasi fibroblast dan sel endotel ke daerah jejas. Sel yang kaya jaringan granulasi ini mengaktivasi fase pembentukan matriks dan maturase. Fibroblas digantikan dengan ekstraselular matriks (ECM) dengan memproduksi matriks kaya kolagen sehingga endothelial dapat masuk dan meningkatkan vaskularisasi, fase ini disebut angiogenesis, seluruh proses proliferasi ini terjadi sekitar 5-15 hari. Jaringan granulasi yang telah dewasa menyebabkan terjadinya regenerasi jaringan atau perbaikan jaringan, proses ini berlangsung selama 20 hari.⁵⁷

2.3.2 Penyembuhan jaringan keras

Ketika terjadi jejas pada tulang, proses penyembuhan tulang terbagi menjadi 4 tahap yaitu: pembentukan hematoma, pembentukan *callus Fibrocartilaginous*, pembentukan *callus* tulang, dan remodeling tulang.^{58,59}

1. Pembentukan hematoma (1-5 hari).

Segera setelah terjadi jejas, pembuluh darah dan periosteum rusak, menyebabkan terjadinya hematoma pada daerah sekitar jejas. Bekuan darah membentuk frame sementara untuk penyembuhan tulang. Jejas ini menyebabkan sekresi sitokin proinflamasi seperti TNF α , BMPs, dan Interleukin (IL-1, IL-6, IL-11, IL-23). Sitokin ini menstimulasi sel-sel daerah jejas seperti makrofag, monosit, dan limfosit. Sel ini bekerjasama mengeluarkan *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) dalam menstimulasi penyembuhan

2. Pembentukan *Callus Fibrocartilaginous* (5-11 hari)

Pelepasan VEGF menyebabkan terjadinya angiogenesis pada daerah jejas, dan dalam hematoma jaringan granulasi yang kaya akan fibrin mulai berkembang. Selanjutnya mesenkimal stem sel ditarik ke daerah jejas dan proses differensiasi dimulai (oleh BMP) menjadi fibroblas, chondroblas dan osteoblas. Pada saat ini lapisan periosteal yang berdekatan, lapisan tulang muda (*woven bone*) dibentuk oleh sel osteoprogenitor

3. Pembentukan Callus Tulang (11-28 hari)

Terbentuknya *callus cartilage* merupakan tahap awal ossifikasi tulang. RANK-L diekspresikan, menstimulasi differensiasi lebih lanjut dari conroblas, condroclas, osteoblast, osteoklas. Sebagai hasilnya *callus cartilage* diresorpsi dan dimulai tahap kalsifikasi. Woven bone tetap berlanjut untuk terbentuk. Pembuluh darah yang baru terbentuk berlanjut ke tahap proliferasi, menyebabkan migrasi stem sel mesenkim. Di akhir fase ini, terbentuk tulang keras, yang merupakan kalsifikasi *callus tulang immature*

4. Remodeling tulang (18hari-bulan hingga tahun)

Dalam kelanjutan migrasi osteoblast dan osteoklas, *hard callus*, mengulang proses remodeling yang disebut “couple remodeling”. *Couple remodelling* merupakan tahap keseimbangan antara resorpsi oleh osteoklas dan formasi oleh osteoblas. Pusat *callus* diganti dengan tulang kompak, sementara *callus* luar diganti dengan tulang *lamellar*. Proses ini membutuhkan waktu berbulan-bulan hingga struktur normal tulang terbentuk sempurna.

2.3.3 Remodeling Tulang

Remodeling tulang merupakan proses yang mempertahankan kekuatan tulang dan hemostasis mineral dengan menjaga keseimbangan antara resorpsi tulang oleh osteoklas dan deposisi tulang oleh osteoblas. Siklus remodeling tulang terdiri dari beberapa tahapan yaitu^{39,56,59}

1. Tahap aktivasi (*activation phase*)

Pada tahap ini terdapat stimulus hormonal atau fisik yang menarik pre-osteoklas mononuclear dari sirkulasi ke daerah remodeling tulang yang diikuti dengan perlekatan pada permukaan tulang dan sel menyatu dengan osteoklas multinukleat.

2. Tahap resorpsi (*resorption phase*)

Pada tahap ini osteoklas mensekresi ion hydrogen dan enzim lisosom terutama cathepsin K kemudian mengawali resorpsi komponen organik dan mineral tulang. Proses ini memakan waktu sekitar 2-4 minggu. Setelah terjadi resorpsi maka osteoklas akan membentuk lekukan atau cekungan tidak teratur yang biasa disebut lakuna howship pada tulang trabekular dan saluran haversian pada tulang kortikal. Pada tahap ini, kalsium di lepaskan kedalam darah dan digunakan untuk berbagai fungsi tubuh. Setelah kavitas terbentuk, osteoklas mengalami apoptosis yang menandakan akhir dari resorpsi tulang.

3. Tahap reversal (*reversal phase*)

Pada akhir proses resorpsi tulang, pada rongga hasil resorpsi akan dipenuhi oleh sel mononuklear makrofag dan dipersiapkan untuk deposisi matriks. Mesenkimal

4. Tahap formasi (*formation phase*),

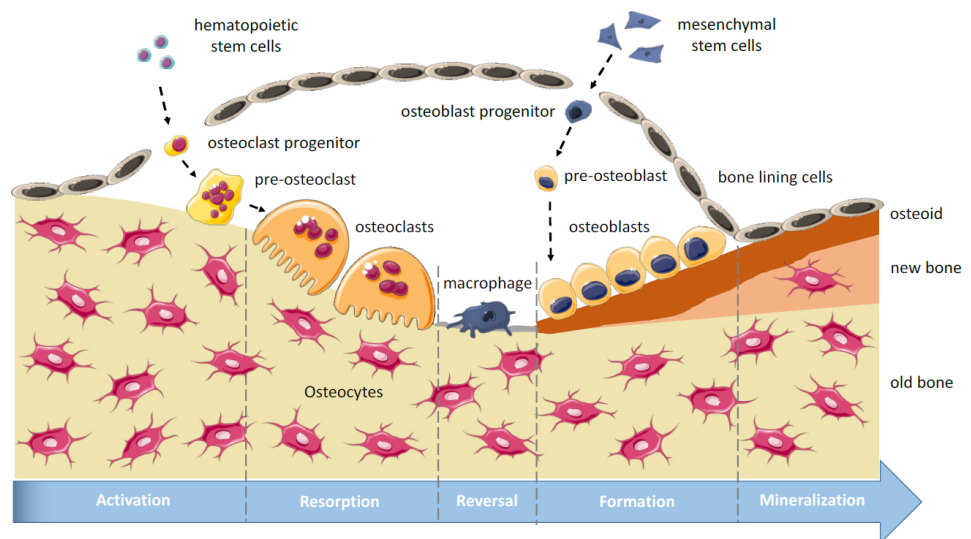
Resorpsi matriks tulang menyebabkan lepasnya beberapa faktor pertumbuhan, meliputi *bone morphogenetic proteins* (BMPs), *fibroblast growth factors* (FGFs) and *transforming growth factor β* (TGF- β), yang

berperan dalam menarik osteoblas ke daerah tereasorbsi. Tahap awal, osteoblas menghasilkan matriks tulang baru yang tidak terkalsifikasi (osteoid) dan kemudian merangsang mineralisasi. Tahap formasi akan berakhir ketika defek (cekungan) yang dibentuk oleh osteoklas telah diisi.

5. Tahap mineralisasi

Proses mineralisasi dimulai 30 hari setelah pengendapan osteoid, berakhir 90 hari pada tulang trabekular dan pada 130 hari pada tulang kortikal.

Ketidakeimbangan fase resorpsi dan formasi menyebabkan gangguan proses remodeling, yang mempengaruhi massa tulang dan dapat menyebabkan terjadinya kondisi patologis.^{39,56,59}



Gambar 2. Fase Remodeling tulang⁵⁶

2.4 TGF- β

2.4.1 Sejarah TGF- β

George Todaro dan Robert Huebner (1970-1972) mempelajari aktivitas transformasi RNA virus tumor tipe C, dan merupakan awal

diusulkannya hipotesis *oncogene* virus. “Onco-gen” merupakan komponen penting dari virogen RNA virus tumor, yang ekspresinya berkurang pada sel normal dan teraktivasi pada terapi sel dengan karsinogen, mutagen, atau radiasi. Michael Bishop dan Harold Varmus, meneliti effects RNA virus pada keganasan tumor, mendapatkan Nobel melalui terobosan perubahas sel neoplastik yg dimediasi oleh virus tunggal (*src/gen onco*). Stehelin dkk (1976), Levinson dkk. (1978) Produk gen *src* sebagian besar dikenal sebagai mediator sinyal sel dari reseptor *tirosin kinase*, merupakan analog yg sedikit dimodifikasi dari sel normal. Beberapa tahun kemudian, Swanstrom dkk. (1983) menunjukkan bahwa onkogen retroviral yang berubah (*v-src*) muncul melalui transduksi gen *c-src* seluler.⁶¹

Pemenang Nobel, Robert Holley (1972), mengusulkan bahwa salah satu mekanisme akuisisi keganasan melibatkan peningkatan hormon tertentu (*transforming factor*) pada reseptor hormon tertentu. Holley (1975) Perubahan bentuk sel ganas dari pertumbuhan normal membutuhkan lebih sedikit hormon atau *transforming factor*.⁶¹

De Larco dan Todaro (1978) perubahan *transforming Growth Faktor* (TGFs) dengan gen *v-src* dapat menyebabkan fibroblas normal terbentuk secara progresif. Todaro dkk. (1979). Properti yang terkait erat dengan fenotipe berubah secara *in vivo*. Berbeda dengan *v-src* dan onkogen lainnya, perubahan tidak dihasilkan dari perubahan sel intrinsik tetapi dari faktor-faktor yang disekresikan yang tidak mempengaruhi genotip. Istilah TGF dipilih karena aktivitas induksi transformasi fenotip dalam kultur

monolayer pada cawan agar lunak. Asumsi sel-sel yang tidak mengalami perubahan terbukti salah, karena pada kenyataannya induksi terjadi hanya pada sel-sel kanker.⁶¹

Penemuan awal TGF- β dimulai oleh De Larco dan Todaro (1978) menggambarkan pemurnian parsial pertumbuhan polipeptida. TGF β merupakan bagian dari prototipe *super family, growth factor dimeric* dan *sitokin* yang dikodekan dalam 33 gen manusia dan tikus. Proteins TGF- β *family* diketahui berperan pada perkembangan embrionik, diferensiasi sel dan hemostaatis jaringan. Saat ini terdapat hampir 7000 publikasi yang membahas tentang TGF- β .⁶¹

TGF- β berbeda dengan TGF- α karena tidak berikatan dengan reseptor *Epidermal Growth Factor* (EGF) yang sama dengan TGF- α , sehingga aktivitas melalui reseptor permukaan sel dan mediator sinyal juga berbeda. TGF- β tidak berikatan dengan EGF reseptor, namun dibutuhkan dalam menginduksi fenotip transformasi yang dikombinasikan dengan EGF. Istilah α dan β , didasarkan pada Todaro, yang mengungkapkan bahwa TGF- α merupakan ekspresi unik yang menunjukkan aktivitas dominan dari sel tumor dan TGF- β merupakan ekspresi pada jaringan normal yang terjadi untuk memodulasi proses.⁶¹

Chiefetz (1987) mengidentifikasi TGF- β 1, dan TGF- β 2, yang kemudian Derynck (1988), Ten Dijke dkk (1988) menemukan TGF- β 3. Pfeilschiffer dan Maundy (1987) pertama kali menemukan TGF β pada proses remodelling tulang. (Preffo 1989) osteoklas memiliki kemampuan

mengaktifasi TGF- β . TGF- β terdeposit pada matriks tulang oleh osteoblas, disimpulkan bahwa TGF- β memiliki peran penting pada pembentukan dan resopsi tulang⁶¹

Pembentukan tulang baru membutuhkan regenerasi dari osteoblas, resopsi osteoklas bukan hanya menjadi bagian aktivitas dari osteoblast tapi juga merupakan diferensiasi dari sel osteoprogenitor. Salah satu faktor yang memodulasi differensiasi osteoblas dan proliferasi sel osteoprogenitor yaitu *transforming growth factor* (TGF- β). Dallas (1994), Centrella (1994) mengatakan bahwa osteoblas dan osteoklas mensekresikan TGF- β dan semua isoform TGF- β (TGF- β 1, - β 2, and - β 3) yang hadir pada matriks tulang.⁶¹

Remodeling tulang bergantung pada diferensiasi dan aktivasi dua sel yaitu osteoblas oleh stem sel mesenkim dan osteoklas oleh stem sel hematopoietik. Tulang dalam tingkat molekular, proses diferensiasi dan aktivasi kedua sel ini diatur secara ketat oleh berbagai macam sitokin dan *growth factors*, termasuk TGF- β .⁴¹ TGF- β merupakan prototipe TGF- β *superfamily* yang dapat berasal dari sitokin terkait struktur pada mamalia dan invertebrata. TGF- β *superfamily* meliputi TGF- β s, *Bone Morphogenetic Protein* (BMPs), faktor pertumbuhan dan differensiasi, *activin*, *inhibin*, dan hormone *anti-mullerian*, yang semuanya memainkan peran penting dalam regenerasi proliferasi dan diferensiasi sel.⁶²

Terdapat setidaknya 30 anggota TGF- β family pada manusia dengan tiga *isoform* mamalia (TGF- β 1, - β 2, dan - β 3) ditemukan di tulang.

Kesamaan ketiga isoform pada domain C-terminal (64 - 82%), dengan sembilan residu sistein yang dilestarikan membentuk empat *intrachain* dan satu ikatan pada *interchain disulfida*.⁶²

2.4.2 TGF- β 1

TGF- β 1 merupakan *isoform* terbanyak yang diekspresikan oleh perikondrium, periosteum, dan lempeng pertumbuhan epifisis.⁶⁰ TGF- β 1 adalah sitokin immunoregulator yang mengatur proliferasi sel kekebalan tubuh, diferensiasi, migrasi sel, dan produksi matriks ekstraseluler (ECM).⁶²

Respons seluler, memediasi efek TGF- β 1 pada respons kekebalan tubuh, angiogenesis, penyembuhan luka, pengembangan, dan pembentukan tulang. Pembentukan tulang oleh TGF- β 1 dipromosikan melalui kemotaksis osteoblas, peningkatan proliferasi osteoblas dan tahap awal diferensiasi dengan produksi protein ECM, stimulation ekspresi kolagen tipe II dan sintesis *proteoglycan* oleh prekursor sel *chondrocyte* dan penekanan proliferasi sel prekursor hematopoetik. TGF- β 1 sangat penting baik selama embriogenesis dan dalam mempertahankan homeostasis jaringan selama hidup.^{62,63}

2.4.3 TGF- β 1 dan tulang

Tulang merupakan organ kaku yang tersusun atas berbagai macam mineral yang memberikan dukungan mekanis pada sendi, tendon, dan ligamen, melindungi jaringan lunak atau organ dari stress mekanis atau trauma, menyimpan mineral, menghasilkan sel hematopoetik,

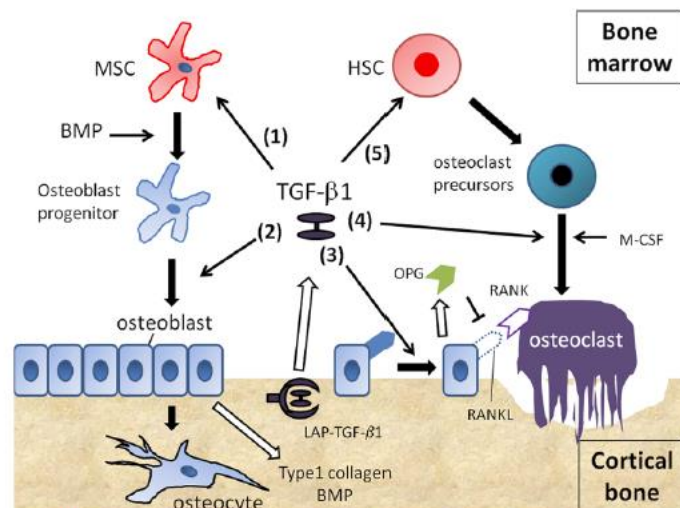
hormon, dan mengatur kadar kalsium dalam darah. Berbagai fungsi tulang ini diatur oleh berbagai faktor, salah satunya adalah TGF- β 1. TGF- β 1 memiliki peran penting dalam pembentukan tulang, penyimpanan mineral, generasi sel hematopoetik, dan osteoimunitas. Peran penting TGF- β 1 pada proses regenerasi tulang terbukti melalui proses resorpsi tulang dan remodeling tulang. TGF- β 1 disekresikan oleh sel-sel tulang dan di simpan dalam ECM. Saat osteoklas aktif dan meresorpsi tulang, terjadi aktivasi TGF- β 1 yang menstimulasi proliferasi dan diferensiasi osteoblast. Efek kerja TGF- β 1 pada proses pembentukan osteoklas dan osteoblas sangat bergantung pada proses diferensiasi sel, kepadatan sel, konsentrasi TGF- β 1, adanya serum dan kondisi lainnya.⁶³

2.4.4 TGF- β 1 dan osteoimmunitas

Fase hemostasis tulang diperoleh melalui mekanisme regulasi selama fase *reversal*. Selama resorpsi tulang yang dimediasi oleh osteoklas, beberapa faktor dilepaskan dari matriks tulang dan/atau disekresikan secara lokal, menciptakan lingkungan osteogenik yang memproduksi perolehan MSCs dan diferensiasi osteoblas menjadi pembentukan tulang baru. TGF- β 1 dilepas dan diaktivasi oleh osteoklas untuk menginduksi migrasi MSCs ke daerah resorpsi tulang.¹⁶

TGF- β 1 mengontrol baik osteoblas maupun diferensiasi osteoklas, sehingga terjadi keseimbangan pembentukan dan resorpsi tulang.⁶⁴ TGF- β memiliki dua efek pada osteoblas. TGF- β menstimulasi ekspresi diferensiasi osteoblas awal dan matriks protein oleh osteoblas. Namun,

TGF- β menahan diferensiasi akhir osteoblas. Lima peran utama TGF- β 1 dalam osteoimunitas adalah menstimulasi proliferasi mesenkimal stem sel dan mendorong diferensiasi menjadi osteoblas, mendorong diferensiasi osteoklas prekursor menjadi osteoklas, mempercepat proliferasi osteoblas dan menekan ekspresi RANKL dengan modulasi RANKL dan OPG oleh osteoblas pada konsentrasi tinggi, mendorong maturase osteoklas pada konsentrasi rendah, dan menjaga stem sel hematopoetik tetap pada keadaan hibernasi.^{63,64}



Gambar 3. Lima peran TGF- β 1 dalam osteoimunitas¹⁶

2.4.5 TGF- β 1 dan osteoblas

Osteoblas adalah sel mononukleat yang berperan pada pembentukan tulang. Muncul dari prekursor osteoblastik yang terletak di lapisan periosteum dan sumsum tulang yang lebih dalam, dan menghasilkan matriks osteoid, yang terutama terdiri dari kolagen tipe I. TGF- β 1 memiliki berbagai peran dalam pembentukan tulang, yaitu TGF- β 1 meningkatkan proliferasi osteoblas, menahan apoptosis

osteoblas, dan juga merekrut prekursor osteoblastik atau osteoblas yang memproduksi matriks ke situs melalui daya tarik kemotaktik. Selain itu, TGF- β 1 meningkatkan produksi protein matriks tulang ekstrasellur oleh osteoblas pada tahap awal diferensiasi osteoblas.^{60,61,65}

2.4.6 TGF- β 1 dan osteoklas

Peran TGF- β 1 dalam osteoklastogenesis dan resorpsi tulang sangat kompleks dan kontroversial. Jelas bahwa TGF- β 1 memediasi fungsi osteoklas, seperti pematangan osteoklas, apoptosis, dan rekrutan prekursor osteoklas dari limpa atau tulang rawan. Beberapa laporan menunjukkan bahwa TGF- β 1 memiliki efek *biphasic* pada pematangan osteoklas. TGF- β 1 menginduksi osteoklastogenesis prekursor hematopoetik dan prekursor osteoklastik lainnya ketika ditambahkan ke dalam kultur dengan RANKL dan faktor koloni makrofag stimulasi faktor (M-CSF). TGF- β 1 memicu ekspresi *Nuclear Factor Kappa B* (NF- κ B) dan RANK pada prekursor osteoklas, dan interaksi RANKL-RANK, dan diferensiasi yang menyebabkan prekursor osteoklas menjadi osteoklas. Di sisi lain, ketika prekursor osteoklas dikultur dengan osteoblas, tampaknya aktivasi osteoklas tertahan terutama ketika dirangsang dengan konsentrasi tinggi TGF- β 1 (1-10 ng / ml), sementara konsentrasi rendah TGF- β 1 (1-10 pg / ml) menginduksi pematangan osteoklas. Konsentrasi tinggi TGF- β 1 mengatur ekspresi dan sekresi osteoproteogelin (OPG) yang menjadi reseptor umpan untuk RANKL,

dan menghambat interaksi RANKL-RANK dengan mengikat RANKL pada osteoblas. Akibatnya, prekursor osteoklas menjadi osteoklas matang yang dimediasi oleh RANKL-RANK dihambat oleh OPG yang dilepaskan dari osteoblas.^{60,61,65}

RANKL-RANK-OPG merupakan sistem pensinyalan yang berfungsi baik dalam pembentukan tulang dan kekebalan tubuh. RANKL oleh sel T mampu menginduksi osteoklas. RANK oleh sel dendrit, berikatan dengan RANKL mengaktifkan sel dendrit, yang menandakan apoptosis terhambat oleh sel dendrit, terjadi proliferasi sel T yang menyebabkan terjadi leukosit campuran. OPG dihasilkan oleh monosit, sel T, dan sel B. Sitokin merangsang osteoklastogenesis seperti IL-1 β , IL-6, IL-17, dan TNF- α meningkatkan ekspresi RANKL dan penurunan ekspresi OPG pada osteoblast. Temuan ini menunjukkan peran lain RANKL-RANK-OPG dalam sistem pertahanan tubuh.^{60,61,65}

2.5 Perawatan defek periodontal

Penyakit periodontal yang tidak dirawat dapat menyebabkan terbentuknya defek pada tulang alveolar.^{27,29} Ketika resorpsi melampaui formasi maka baik tinggi tulang ataupun kepadatan tulang berkurang. Regenerasi spontan tidak selalu terjadi, sehingga dibutuhkannya terapi regeneratif yang dapat mempercepat penyembuhan dan pembentukan tulang baru.⁶⁶ Rekayasa jaringan merupakan teknologi biomedis yang dikembangkan untuk membantu regenerasi anggota tubuh yang tidak dapat diperbaiki sendiri oleh jaringan.¹⁵

Penyembuhan kerusakan tulang dengan transplantasi tulang merupakan alternatif dari perawatan konvensional. Sel-sel akan berkembang biak, bermigrasi dan berdiferensiasi menjadi jaringan khusus dan dengan bantuan faktor pertumbuhan sel akan menghasilkan komponen matriks ekstraseluler yang diperlukan untuk pembentukan jaringan. Prinsip dasar rekayasa jaringan tulang bertujuan untuk mengatasi keterbatasan pengobatan konvensional didasarkan pada transplantasi organ dan implantasi biomaterial. Rekayasa jaringan dapat menjadi solusi dari kerusakan organ atau jaringan tanpa perlu terapi tambahan, sehingga biaya pengobatan menjadi lebih efektif. Terdapat beberapa terapi rekayasa jaringan, diantaranya penggunaan *guided tissue regeneration, bone graft*, dan beberapa bahan biologik lainnya.⁶⁷

2.5.1 Bone graft

Bone graft atau cangkok tulang disebut sebagai *gold standart* terapi tulang. *Bone graft* digunakan untuk memberikan dukungan, mengisi celah kosong antara tulang dan implan, serta dapat mempercepat penyembuhan pada kelainan skeletal. Pengganti tulang ini berfungsi pasif membimbing atau mengantar sel bermigrasi melalui matriks, sehingga terjadi perbaikan.⁶⁷

Material *bone graft* dari berbagai sumber dan komposisi memiliki potensi regenerasi tulang yang berbeda terkait dengan sifat-sifat berikut:⁶⁷

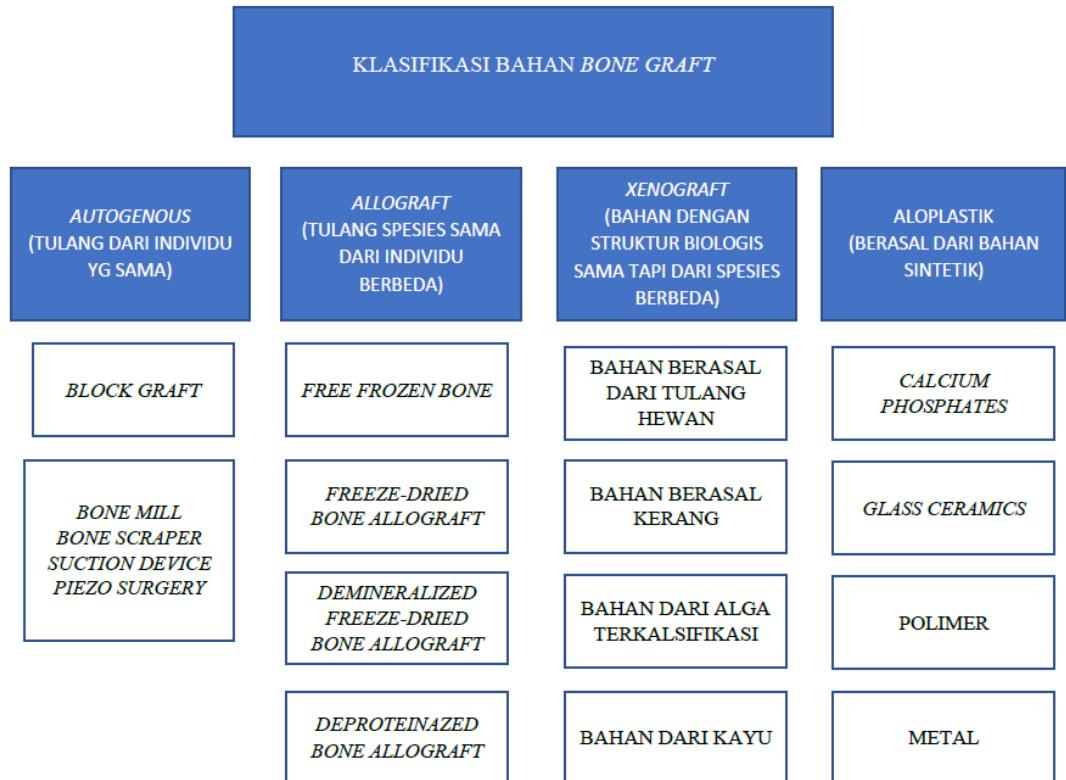
1. Osteogenesis: osteoblas hidup yang berasal dari *graft* berkontribusi pada produksi tulang baru;

2. Osteoinduksi: stimulasi sel-sel osteoprogenitor yang berdiferensiasi menjadi osteoblas, biasanya dipengaruhi oleh *Bone Morphogenic Protein* (BMP) yang dilepaskan dari *graft*;
3. Osteokonduksi: cangkok memberikan 'kerangka' membantu kapiler dan sel-sel prekursor untuk berkembang, sehingga menciptakan perancah tulang yang dapat dibuat di dalam dan sekitarnya.

Bahan yang ideal untuk rehabilitasi tulang harus memiliki karakteristik berikut:⁶⁷

1. Sifat osteogenik, osteoinduktif dan osteokonduktif;
2. Stimulasi neo-angiogenesis;
3. Kurangnya reaksi antigenik, teratogenik atau karsinogenik;
4. Suplai dalam jumlah yang cukup;
5. Dukungan dan stabilitas yang memuaskan;
6. Minimum hingga nol morbiditas - komplikasi;
7. Sifat hidrofilik;
8. Penanganan yang mudah;
9. Biaya rendah

2.5.2 Klasifikasi *Bone graft*



Gambar 4. Klasifikasi bahan *bone graft*⁶⁷

A. *Autograft*

Merupakan bahan cangkok tulang yang berasal dari bagian tubuh individu yang sama yang dipindahkan ke tempat lain sehingga masalah biokompatibilitas dan penularan penyakit dapat dieliminasi. Bahan cangkok autogenous adalah bahan cangkok yang paling ideal karena memiliki efek osteokonduktif, osteoinduktif dan mengandung sel osteoprogenitor sehingga menjadi *gold standar* untuk pencangkokan tulang. Namun terdapat beberapa kekurangan, seperti dua kali pembedahan di daerah donor sehingga menimbulkan ketidaknyamanan

pasien, jumlah yang terbatas dan proses pengambilannya membutuhkan waktu tambahan untuk pembedahan hingga resiko morbiditas pada daerah donor.^{68,69,70}

B. Allograft

Merupakan bahan cangkok tulang yang ditransplantasikan kepada orang lain yang secara genetik berbeda dari spesies yang sama, dipilih, diproses dan disimpan dalam bank tulang di mana penyaringan donor yang luas, termasuk sejarah sosial dan medis yang rinci serta pemeriksaan serologis. Mereka berasal dari donor yang masih hidup (biasanya kepala femoralis pengganti) atau bahan tulang kadaver, diproses lebih lanjut untuk menetralkan respons imun dan penularan penyakit menular. Bahan ini tersedia sebagai cangkok kortikal, kanselus atau kortiko-kanselus, dalam berbagai bentuk dan ukuran.^{69,70,71}

Jenis utama bahan ini terdiri dari: *Fresh frozen bone* (FFB): dibekukan pada suhu -800 C untuk menghindari degradasi enzim, tanpa proses iradiasi, liofilisasi, atau demineralisasi lebih lanjut. Tidak digunakan lagi karena penularan penyakit dan respon imun yang tinggi, *Freeze Dried Bone Allograft* (FDBA): mengalami dehidrasi dan pembekuan tanpa demineralisasi, yang mengarah ke penurunan antigenisitas. Ia hanya memiliki potensi osteokonduktif. *Demineralized freeze-dried bone allograft* (DFDBA). DFDBA selain bersifat osteokonduktif juga osteoinduktif dan terbukti mengekspos *bone morphogenetic protein* (BMP) dalam matriks tulang. BMP akan

menginduksi diferensiasi sel dan menginduksi sel induk pluripotential untuk berdiferensiasi menjadi osteoblast.⁷⁰

C. Xenograft

Merupakan bahan cangkok tulang yang diambil dari spesies yang berbeda, misalnya tulang sapi dan kerang alami. Salah satu *xenograft* yang sering digunakan adalah *deproteinized bovine bone mineral* (DBBM) yang berasal dari sapi. Keuntungan menggunakan DBBM adalah aman, kandungan mineralnya menyerupai struktur tulang manusia, dan tidak mudah diresorpsi. *Xenograft* dapat mempertahankan volumenya hingga bertahun-tahun, tidak seperti allograft yang rentan mengalami resorpsi dimensional.^{67,71,72}

D. Aloplastik

Merupakan bahan cangkok tulang sintetik, inorganik, biokompatibel dan mempunyai bahan bioaktif yang digunakan sebagai pengganti cangkok tulang sehingga dapat merangsang pembentukan tulang baru.⁷¹

2.6. Cangkang Kerang Mutiara (*Pinctada maxima*)

Kerang Mutiara (*Pinctada maxima*) merupakan organisme laut dengan bentukan luar tiram tampak seperti batu karang. Cangkang dari kerang Mutiara berfungsi sebagai pelindung diri. Cangkang kerang memiliki tekstur dan bentukan yang sangat keras dan tidak simetris. Kerang ini memiliki kemampuan untuk membentuk butiran Mutiara apabila suatu benda asing masuk baik sengaja atau tidak sengaja.⁷³

Klasifikasi kerang mutiara (*Pinctada maxima*) adalah sebagai

berikut:^{73,74}

Kingdom : Animalia

Sub kindom: Invertebrata

Filum : Moluska

Kelas : Bivalvia

Sub Kelas : Lamellibranchiata

Ordo : Anysomyaria

Sub Ordo : Pteriomorpha

Famili : Pteridae

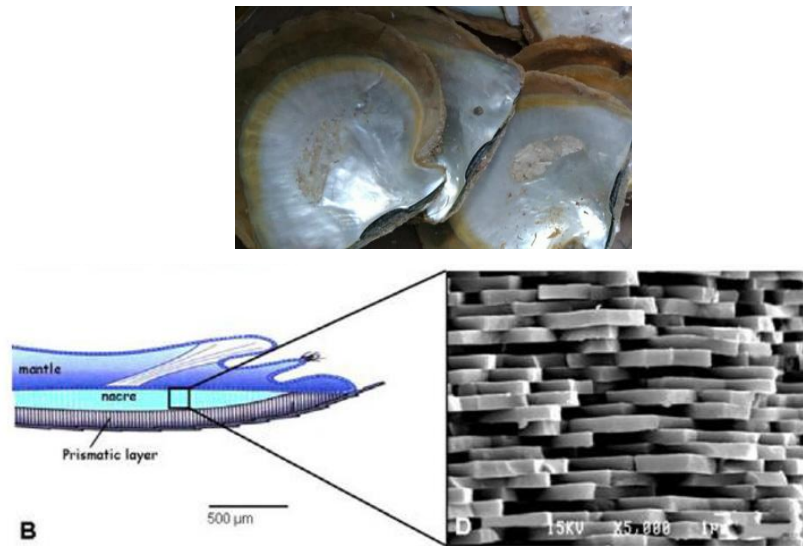
Sub Famili : Pteriacea

Genus : Pinctada

Spesies : Pinctada maxima

Cangkang kerang Mutiara terdiri dari 3 lapisan yaitu lapisan *periostracum*, lapisan *prismatic*, dan lapisan *nacre*. Lapisan *periostracum* merupakan lapisan kulit terluar yang tersusun dari zat organik yang menyerupai tanduk. Lapisan prismatic merupakan lapisan kedua yang tersusun dari kristal-kristal kecil yang berbentuk prisma heksagonal kalsit dan tersusun padat pada kerangka *conchiolin*. Lapisan *nacre* merupakan lapisan dalam yang tersusun atas kalsium karbonat (CaCO_3) aselular yang banyak diproduksi oleh *bivalves*, *gastropods*, dan *cephalopods*. *Nacre* terdiri dari tablet kristal *aragonite* yang dilapisi matriks *organik*. *Aragonit* dan kalsit adalah dua kalsium karbonat *polimorf* yang merupakan penyusun cangkang moluska dan memberi kekuatan dan ketahanan terhadap keseluruhan

arsitektur cangkang. Sebagian kecil cangkang *invertebrata* terdiri dari matriks organik yang bertanggung jawab terhadap proses nukleasi, pertumbuhan dan inhibisi kalsium karbonat.^{75,76,77}



Gambar 5. Mikrostruktur cangkang pinctada⁶⁸

Struktur khusus dari cangkang kerang mutiara tersusun dari dinding berbentuk seperti bata yang mengandung tablet *aragonite pseudo-hexagonal* dengan ketebalan sekitar 0,5 mm dan diameter 5-15 mm. Tablet tersebut diatur dalam lamina paralel dan dipisahkan oleh lembaran *interlamellar* matriks organik. *Pinctada maxima* merupakan spesies cangkang kerang dengan ukuran maksimal dapat mencapai 20-25 cm. Partikel mikro dan komponen berlapis pada cangkang kerang dapat memberikan tegangan tekanan yang sangat baik dan lebih baik dari tulang.^{75,76}

Cangkang kerang merupakan bahan yang memiliki beberapa kelebihan yaitu murah, desain modern, struktur dan arsitektur hirerarki, fungsi biologis intrinsik, imogenitas rendah, toksisitas rendah, penyimpanan aman dan mudah. Cangkang

kerang dan tulang memiliki beberapa kesamaan, struktur aselular cangkang kerang dibentuk oleh skeleton luar moluska, sedangkan struktur aselular dari tulang dibentuk oleh skeleton internal invertebrate. Kedua struktur ini berbagi matriks organik yang terdeposit oleh sel khusus (sel tulang pada vertebrata dan sel *matle epithelial* pada moluska), bentuk organiknya membentuk *scaffold* untuk kristalisasi dan mineralisasi langsung.^{78,79}

2.7.1 Komposisi Cangkang Kerang Mutiara *Pinctada Maxima*

Komposisi kimia cangkang kerang *Pinctada maxima* 97% inorganik dan 3 % organik, yang terdiri dari protein, peptide, glukoprotein, kitin, lipid, dan pigmen. Komposisi *Pinctada maxima* Ca, Mg, Na, P, Fe, Cu, Ni, B, Zn, dan Si. Kandungan utama dari *nacre* ini adalah kalsium karbonat (CaCO₃). Struktur ini mirip dengan tulang manusia, struktur anorganik memiliki kekuatan yang luar biasa, sedangkan matriks organik mampu meningkatkan osteokonduktivitas bila dibandingkan bahan sintesis lain. Di dalam matriks organik cangkang kerang ditemukan molekul biologis yang identik dengan yang ditemukan pada manusia. BMPs (*bone morphogenetic protein*) dan molekul lain mampu mengaktifkan osteoblas melalui sinyal kimiawi osteoblas.^{76,77}

Cangkang kerang merupakan protein matriks organik yang bersifat osteoinduktif. Lamghari dkk menyatakan bahwa peptida matriks cangkang kerang menstimulasi respon seluler *Bone Morphogenic Protein (BMP)* dan *Transforming Growth Factor-beta (TGF-β)*.¹⁷ Ekstrak cangkang kerang,

Water soluble matrix (WSM) mempengaruhi sinyal molekul dan aktivitas regulasi ekspresi gen osteoblast dan osteoklas, dimana osteoblast meningkat dan osteoklas berkurang. Zang dkk., membuat bubuk *nacre* dan mencampurkannya dengan darah, yang kemudian dimasukkan ke dalam defek tulang.⁶⁸ Setelah enam bulan, tulang baru terbentuk, menyatu rapat dengan *nacre* tanpa adanya intervensi jaringan fibrous. Zang dkk, *Water Soluble Matrix (WSM)* dari ekstrak cangkang kerang dapat meningkatkan aktivitas *alkalin phosphate*, pada sel pre-osteoblas tikus *the murine calvarial pre-osteoblasts cell line (MC3T3-E1)*.^{67,68} Wang mengatakan bahwa terjadi peningkatan ekspresi kolagen 1, osteocalcin, runx2, osteopontin pada sel sumsum tulang kelinci.⁶⁴

Kalsium karbonat alami (CaCO_3) telah terbukti menjadi bahan pengganti tulang yang biokompatibel dan bioaktif selama lebih dari 15 tahun. Mengingat bahwa rasio resorpsi bahan pengganti tulang, berhubungan dengan derajat kelarutannya, kalsium karbonat yang menunjukkan derajat kelarutan lebih tinggi dari kalsium fosfat dan biodegradasi yang lebih tinggi dari semen fosfat.²²

Beberapa keunggulan dari kalsium karbonat yaitu materialnya tidak menyebabkan reaksi penolakan dari sistem kekebalan tubuh.⁷⁰ Bentuk alami kalsium karbonat memberikan keuntungan biologis karena fase karbonat dibutuhkan pada awal pembentukan tulang. Bahan *bone graft allogenic* dan *alloplastic* membutuhkan transformasi permukaan dari hidroksiapatit

menjadi karbonat. Kalsium karbonat mengeliminasi tahap ini sehingga pembentukan tulang baru pada daerah defek lebih cepat terjadi.⁸⁰

Kalsium karbonat dengan skala nano telah menarik perhatian dalam regenerasi tulang karena fleksibilitasnya dalam preparasi, biodegradasi, dan osteokonduksi. Sebuah penelitian menyebutkan bahwa nano-kalsium karbonat keramik memiliki rasio degradasi yang tinggi bila dibandingkan dengan bahan sintesis pengganti tulang lainnya, meliputi *nano-β-tricalcium phosphate* dan *nano-hydroxyapatite*, dan dapat mempercepat ekspresi marker osteogenik spesifik.⁸⁰

2.8. Bone graft Hidroksiapatit (BATAN)

Bone graft (BATAN) tersedia secara komersial dalam berbagai produk diantaranya *Bone Ocular Spherical Implant Radiasi* (BOSIR), *Freeze-Dried Bone Xenograft* steril radiasi (FDBX), *Demineralized Freeze-Dried Bone Allograft* (DFDBA), *Freeze-Dried Bone Allograft Steril Radiasi* (FDBX-chip), *Amnion Liofilisasi steril Radiasi* (ALS-Steril), *Membran selulosa microbial biodegradable steril radiasi*. Diantara berbagai produk tersebut jenis yang sering digunakan pada bidang periodontal adalah FDBX dan DFDBA.⁸⁶

FDBX merupakan salah satu jenis *xenograft* produksi batan yang terbuat dari tulang kanelus sapi Bali (*Bos Sondaicus*). Tulang sapi yang digunakan berasal dari sapi muda di bawah umur 2 tahun, bebas dari berbagai penyakit seperti antrax dan sapi gila. Tulang sapi ini telah diproses secara kimia menggunakan asam klorida encer untuk menghilangkan protein

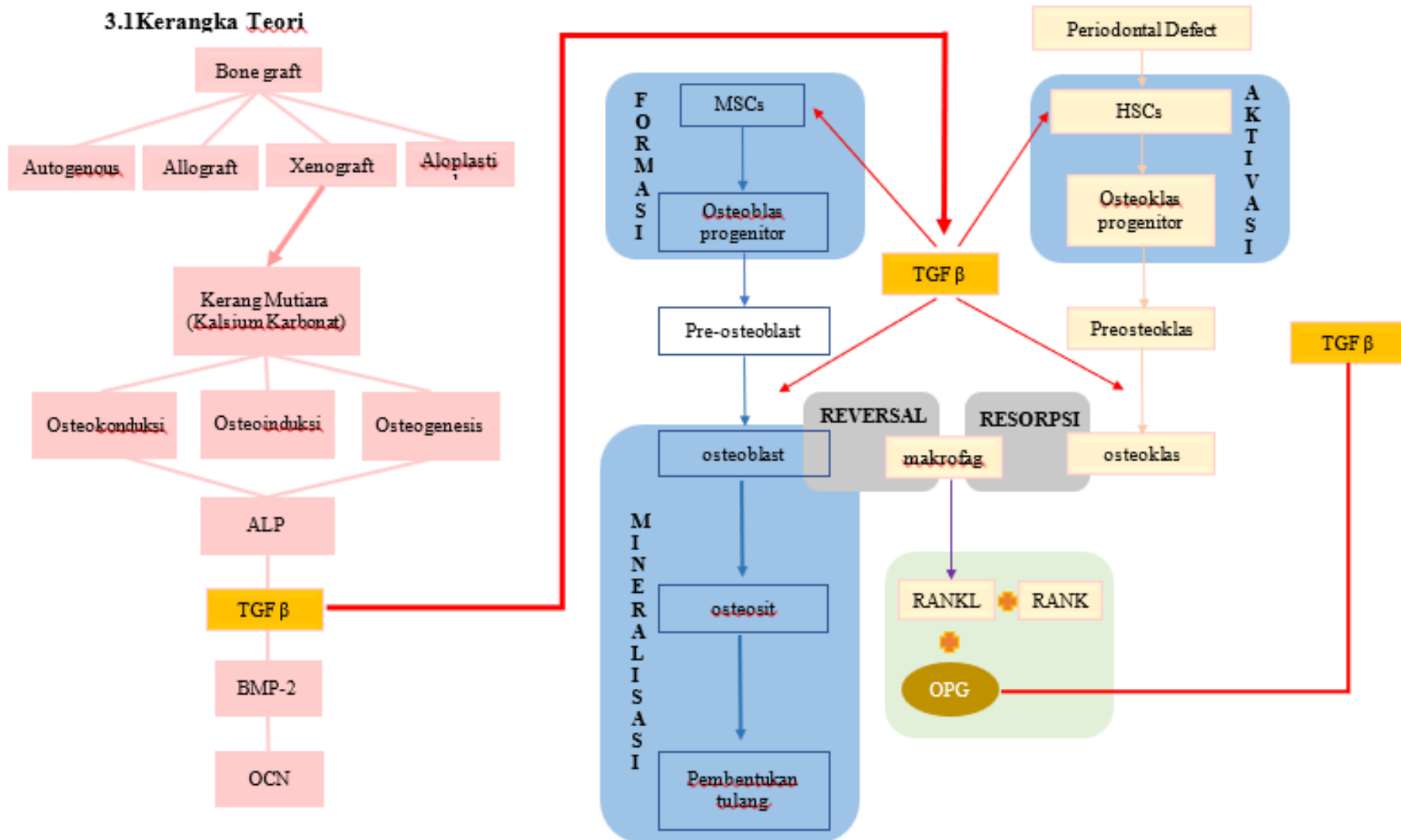
kolagen maupun non kolagen dan *growth factor*, kemudian FDBX dikeringkan secara liofilisasi dan disterilkan dengan radiasi sinar gamma. Bahan ini biasa digunakan pada defek tulang dibidang periodontal dan bedah tulang lainnya yang tidak memerlukan support struktur. Produk ini tersedia dalam bentuk granul dengan ukuran 20-60 mesh. Dari pemakaian klinisnya telah menunjukkan hasil yang memuaskan tanpa adanya efek penolakan.⁸¹

Freeze-dried bone xenograft terdiri dari mineral hidroksiapatit dan protein yang terperangkap di dalamnya, dan memiliki sifat biologis osteokonduktif. Pada proses ini , mineral tulang dihilangkan sehingga protein tulang menjadi terekspos. Protein tulang sapi yang terekspos terbukti memiliki sifat osteoinduktif sehingga dapat merekrut sel punca resipien untuk berdiferensiasi menjadi osteoblast dan merangsang osteoblast resipien memproduksi tulang baru, disamping itu reaksi penolakan yang terjadi dapat diabaikan karena sangat minimal. Disamping itu, tulang sapi juga dapat diproses dengan pembakaran pada suhu 1000°C (furnacing). Pada suhu ini, semua komponen organik tulang akan menguap meninggalkan mineral hidroksiapatit dengan pori-pori yang besar yang merupakan ruang yang ditempati komponen organik tulang yang telah menguap.⁸²

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

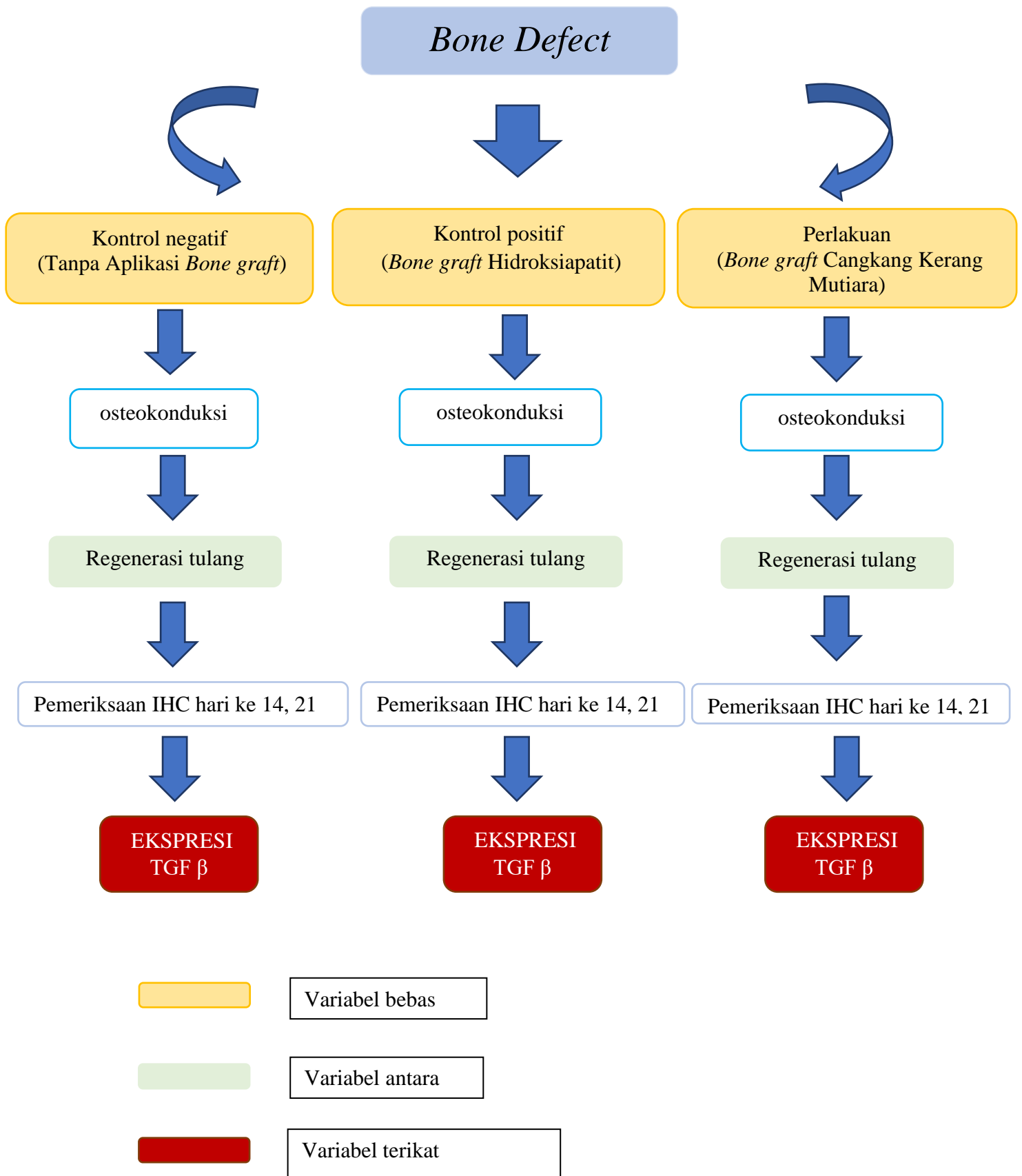
3.1 Kerangka Teori



Deskripsi Kerangka Teori

Bone Graft dapat diklasifikasikan kedalam 4 kelompok yaitu *autograft*, *allograft*, *xenograft*, dan *alloplast*. Cangkang kerang mutiara merupakan *bone graft* yang termasuk dalam kelompok *xenograft* karena merupakan bahan *bone graft* yang terbuat dari bahan alam (cangkang kerang) tanpa campuran bahan kimia lainnya. *Bone graft* yang baik memiliki sifat osteokonduksi, osteoinduksi, dan osteogenesis. Sifat osteokonduksi dapat dilihat dari kemampuan bahan dalam menciptakan Scaffold yang akan diisi oleh sel tulang baru. Sifat osteoinduksi dapat dilihat dari kemampuan mineral bahan dalam mengaktifasi ALP untuk menginduksi TGF- β sehingga menstimulasi mesenkimal stem sel membentuk osteoblas progenitor melalui induksi BMP-2. Sifat osteogenesis dapat dilihat dari kemampuan bahan dalam menghasilkan osteoblas. TGF- β memiliki 5 peran yang sangat berhubungan dengan imunitas pembentukan tulang, yaitu 1) Menstimulasi proliferasi mesenkimal stem sel untuk memproduksi osteoblas progenitor melalui pembentukan BMP-2, 2) mendorong differensiasi osteoblast progenitor menjadi osteoblast, 3) menstimulasi hematopoetik stem sel untuk memproduksi osteoklas prekursor, 4) Pada konsentrasi rendah, mendorong maturasi osteoklas, 5) pada konsentrasi tinggi akan menstimulasi pembentukan osteoblas melalui ikatan RANKL dan OPG.

3.2 Kerangka Konsep



3.3 Hipotesis

1. *Bone graft* yang mengandung cangkang kerang (*Pinctada maxima*) memiliki kandungan dan karakteristik kalsium karbonat
2. Ada perbedaan ekspresi TGF- β pada penggunaan *bahan bone graft* yang mengandung cangkang kerang mutiara (*Pinctada maxima*) terhadap regenerasi tulang berdasarkan waktu pengamatan hari ke 14 dan 21
3. Ada perbedaan ekspresi TGF- β pada penggunaan *bahan bone graft* yang mengandung cangkang kerang mutiara (*Pinctada maxima*) terhadap regenerasi tulang pada hari ke 14
4. Ada perbedaan ekspresi TGF- β pada penggunaan *bahan bone graft* yang mengandung cangkang kerang mutiara (*Pinctada maxima*) terhadap regenerasi tulang pada hari ke 21`

3.4 Keterbatasan Penelitian

1. Pada penelitian ini kami tidak melihat *baseline*, kontrol negatif merupakan defek artifisial yang dibuat pada hewan coba.
2. Kontrol positif pada penelitian ini menggunakan bahan hidroksiapatit karena *bone graft* berbahan dasar kalsium karbonat tidak tersedia di pasaran Indonesia.