

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tulang merupakan jaringan dinamis yang senantiasa mengalami proses *remodeling*, yaitu keseimbangan antara resorpsi tulang lama oleh osteoklas dan pembentukan tulang baru oleh osteoblas. Proses ini dipengaruhi oleh berbagai faktor, seperti asupan nutrisi (kalsium dan vitamin D), regulasi hormonal (estrogen dan testosteron), serta stimulasi biomekanik dari aktivitas fungsional sehari-hari. Tekanan mekanik merangsang aktivitas osteoblas dan osteosit selama proses mekanotransduksi untuk mempertahankan struktur serta kekuatan tulang. Defisiensi mineral, gangguan metabolik, atau kondisi inflamasi kronis dapat menghambat biomineralisasi dan menurunkan densitas tulang (Silviana & Aulia, 2022; Van Eijden, 2000).

Penurunan densitas tulang berkaitan erat dengan ketidakseimbangan proses remodeling dan dapat melemahkan struktur tulang, sehingga risiko fraktur ikut meningkat. Upaya meningkatkan bone mineral density (BMD) menjadi perhatian utama dalam kedokteran maupun kedokteran gigi, terutama pada masa pertumbuhan dan tahap penyembuhan jaringan keras.

Perkembangan nanoteknologi telah membuka peluang besar dalam pengembangan biomaterial regeneratif yang mampu mendukung osteogenesis. Material berukuran nano memiliki luas permukaan spesifik tinggi, meningkatkan bioaktivitas, adhesi sel, serta diferensiasi osteoblas. Hidroksiapatit (HA) merupakan salah satu biomaterial yang telah banyak diteliti dan dikenal bersifat osteokonduktif, mampu mendukung proliferasi osteoblas, serta mempercepat pembentukan jaringan tulang baru (Paladini & Pollini, 2022; Saleem et al., 2020; Szwed-Georgiou et al., 2023).

Sumber daya alam dari limbah laut, seperti cangkang kerang hijau (*Perna viridis*) dan kulit udang vannamei (*Litopenaeus vannamei*), memiliki potensi besar sebagai bahan dasar biomaterial alami yang ramah lingkungan. Cangkang kerang hijau kaya akan kalsium karbonat yang dapat diolah menjadi hidroksiapatit (HA), sedangkan kulit udang merupakan sumber kitosan yang bersifat biokompatibel, biodegradabel, dan antibakteri. Hidroksiapatit hasil sintesis dari cangkang kerang hijau terbukti meningkatkan proliferasi osteoblas dan kadar osteokalsin, sedangkan nanokitosan menunjukkan kemampuan meningkatkan densitas tulang pada model hewan (Gani et al., 2022; Wahjuningrum et al., 2022).

Beberapa penelitian masih mengevaluasi hidroksiapatit dan kitosan secara terpisah. Belum banyak kajian yang meneliti interaksi sinergis antara kedua bahan tersebut pada skala nano terhadap peningkatan densitas dan regenerasi tulang. Kombinasi keduanya secara teoritis berpotensi menggabungkan sifat osteokonduktif HA dan sifat osteoinduktif kitosan, sehingga dapat mempercepat proses mineralisasi dan pembentukan tulang (Gani et al., 2024).



Optimized using
trial version
www.balesio.com

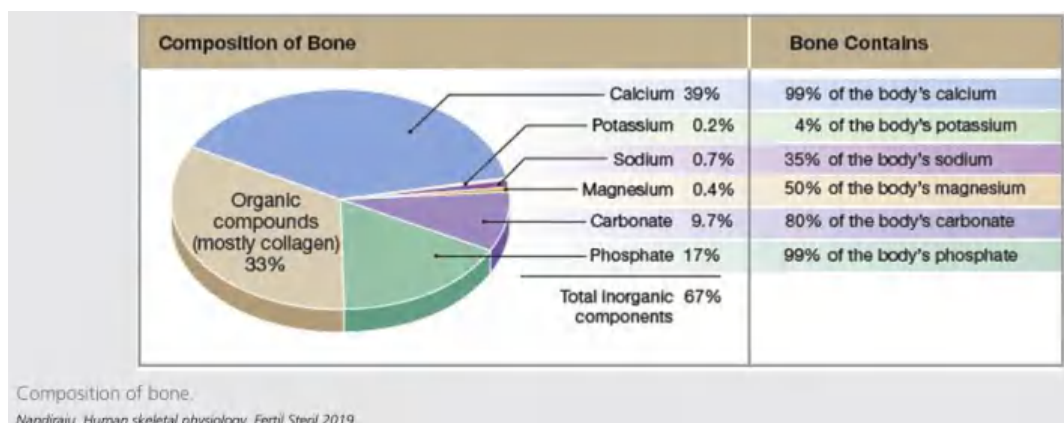
penelitian tersebut menunjukkan perlunya dilakukan kajian uji efektivitas kombinasi nanokalsium dari cangkang kerang hijau dan kulit udang vannamei terhadap peningkatan densitas tulang. Penelitian ini memberikan bukti ilmiah baru mengenai potensi biomaterial alami yang efektif, biokompatibel, dan berkelanjutan untuk mendukung kesehatan dan pengembangan terapi kedokteran gigi modern.

1.2 Landasan Teori

1.2.1 Tulang

Tulang adalah jaringan ikat khusus yang tersusun atas kristal mikroskopik kalsium fosfat, terutama hidroksiapatit, dan matriks kolagen yang memberi kekuatan sekaligus elastisitas. Struktur ini membentuk sebagian besar kerangka tubuh manusia, terdiri atas sel, serat, dan matriks ekstraseluler. Kekuatan serta kesehatan tulang bergantung pada massa dan densitas yang terjaga dalam kondisi optimal (Hall, 2022).

Matriks tulang tersusun atas sekitar 67% komponen anorganik dan 33% komponen organik, terutama kolagen tipe I. Komponen mineral utama meliputi kalsium (39%), fosfat (17%), karbonat (9,7%), natrium (0,7%), magnesium (0,4%), dan kalium (0,2%). Tulang berfungsi sebagai reservoir mineral bagi tubuh, menyimpan sekitar 99% kalsium dan fosfat serta sebagian besar karbonat dan magnesium. Komposisi ini menjadikan tulang struktur yang kuat sekaligus dinamis, serta berperan penting dalam menopang tubuh dan menjaga homeostasis mineral (Kini & Nandeesh, 2012; Nandiraju & Ahmed, 2019).



Gambar 1. Komponen Tulang (Nandiraju & Ahmed, 2019)

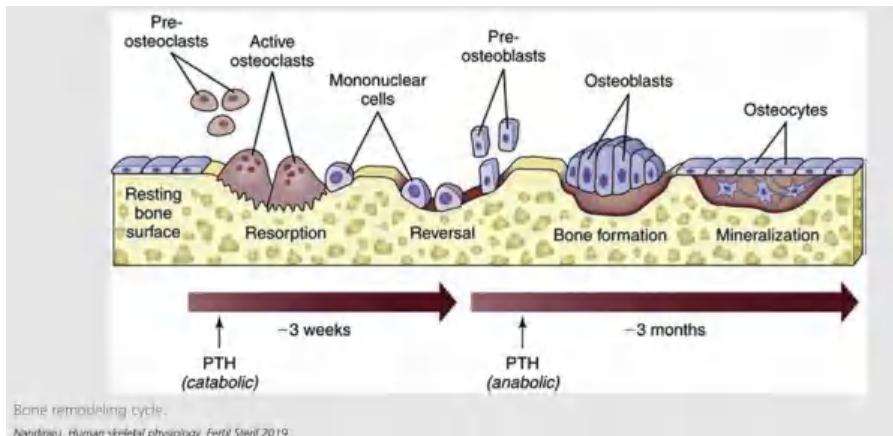
Proses *remodeling* tulang sudah dimulai sejak masa janin dan berlangsung seumur hidup melalui keseimbangan antara pembentukan dan resorpsi tulang. Dua jenis sel utama berperan dalam proses ini: osteoblas, membentuk tulang baru, dan osteoklas, melakukan resorpsi tulang lama (Siddiqui & Partridge, 2016). Osteoblas akan bertransformasi setelah pembentukan tulang selesai menjadi osteosit, yaitu sel tulang matang yang berfungsi sebagai sensor mekanik dan pengatur metabolisme mineral (Schaffler et al., 2014).

Aktivitas ketiga jenis sel ini secara fisiologis membentuk suatu siklus berulang yang dikenal sebagai proses *remodeling* tulang. Proses ini memastikan jaringan tulang senantiasa diperbarui agar tetap kuat dan berfungsi optimal. *Remodeling* berlangsung dalam beberapa tahapan utama: (1) resorpsi oleh osteoklas yang melarutkan jaringan tulang al oleh sel mononuklear yang menyiapkan area pembentukan, (3) s yang mensintesis osteoid baru, dan (4) mineralisasi, di mana m menjadi osteosit untuk menjaga keseimbangan tulang (Nandiraju



ngsung terus-menerus, dengan fase resorpsi sekitar tiga minggu dan neralisasi sekitar tiga bulan. Tulang mampu beradaptasi terhadap mpertahankan kekuatannya melalui tahap ini. Keseimbangan

antara kedua fase tersebut menentukan densitas tulang. Pembentukan yang berlangsung lebih dominan dibandingkan resorpsi akan meningkatkan densitas, sedangkan resorpsi yang terjadi lebih cepat menyebabkan penurunan densitas serta meningkatkan risiko kerapuhan tulang. Faktor seperti asupan kalsium, aktivitas fisik, dan keseimbangan hormonal memegang peranan penting dalam menjaga siklus remodeling yang sehat serta mendukung kepadatan tulang pada kondisi optimal (Nandiraju & Ahmed, 2019).



Gambar 2. Siklus Remodeling Tulang (Nandiraju & Ahmed, 2019)

Model hewan coba seperti tikus Wistar memiliki dinamika remodeling tulang yang berlangsung lebih cepat dibanding manusia. Fase resorpsi–formasi yang pada manusia memerlukan waktu beberapa bulan berlangsung hanya dalam hitungan minggu pada tikus karena laju metabolisme, turnover seluler, serta pertumbuhan jaringan yang lebih tinggi (Taguchi & Lopez, 2020; Wright & DeMoss, 2000). Periode 3–6 minggu merupakan fase ketika perubahan awal osteogenesis, yaitu peningkatan aktivitas osteoblas, deposisi osteoid, mineralisasi primer, dan transformasi osteoblas menjadi osteosit, dapat diamati secara jelas dan terukur (Melhus et al., 2010).

1.2.2 Kepadatan Tulang

Kepadatan tulang adalah ukuran jumlah mineral, terutama kalsium dan fosfat, yang tersimpan dalam matriks tulang. Nilai ini mencerminkan kekuatan serta ketahanan tulang terhadap beban mekanis (Ammann et al., 2005). Kepadatan tulang memiliki peran penting dalam menentukan stabilitas struktur skeletal, termasuk mandibula, yang berfungsi sebagai penopang gigi sekaligus tulang utama dalam sistem pengunyahan (Khaohoen et al., 2023).

Perkembangan kepadatan tulang berlangsung pesat sejak masa kanak-kanak hingga remaja, terutama pada fase pertumbuhan cepat (growth spurt). Pada periode ini, tulang (*ossification*) melebihi resorpsi, sehingga terjadi peningkatan tulang. Setelah puncak pertumbuhan tercapai, keseimbangan antara osteoklas menentukan kestabilan densitas tulang sepanjang hidup.



or memengaruhi kepadatan tulang, di antaranya asupan nutrisi, regulasi hormonal, dan status kesehatan sistemik:

Kalsium dan vitamin D merupakan elemen esensial dalam proses mineralisasi matriks tulang. Defisiensi keduanya dapat menghambat deposisi hidroksiapatit dan menurunkan densitas tulang (Hildebolt et al., 2004; Masztalerz-Kozubek et al., 2021).

b. Faktor biomekanik

Aktivitas mastikasi menghasilkan gaya mekanik yang dideteksi osteosit dan ditransduksi menjadi sinyal untuk pembentukan tulang baru. Stimulasi mekanik yang memadai meningkatkan aktivitas osteoblastik dan mencegah resorpsi tulang alveolar (Hutchinson et al., 2017; Van Ankum et al., 2021).

c. Faktor hormonal

Estrogen dan testosteron memiliki fungsi penting dalam menjaga keseimbangan *remodeling* tulang. Gangguan hormonal, seperti hipogonadisme atau defisiensi estrogen, dapat menurunkan densitas tulang (Armada et al., 2018).

d. Kondisi inflamasi dan sistemik

Penyakit metabolik atau inflamasi kronis, seperti diabetes mellitus dan penyakit radang usus, dapat mempercepat resorpsi tulang melalui peningkatan pelepasan sitokin proinflamasi (Belluci et al., 2019; Suzuki et al., 2021).

1.2.3 Kalsium

Kalsium merupakan mineral utama penyusun tulang dan gigi yang berperan penting dalam menjaga kekuatan, kekakuan, dan kepadatan tulang. Lebih dari 99% kalsium tubuh tersimpan dalam jaringan tulang dalam bentuk kristal hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), sedangkan sisanya beredar dalam darah dan cairan ekstraseluler untuk fungsi fisiologis seperti kontraksi otot serta transmisi saraf (Alpert, 2013).

Proses mineralisasi tulang berlangsung ketika kalsium berikatan dengan fosfat dan membentuk hidroksiapatit yang kemudian mengisi matriks kolagen hasil sintesis osteoblas. Struktur tersebut menjadi kerangka bagi pembentukan tulang baru. Asupan kalsium yang tidak mencukupi menyebabkan deposisi mineral tidak terjadi secara optimal, sehingga tulang cenderung kurang padat dan lebih rapuh. Keseimbangan antara penyerapan kalsium dan pelepasannya dari tulang merupakan faktor penting untuk menjaga homeostasis mineral (Bonjour, 2011).

Interaksi antara kalsium, fosfor, dan vitamin D juga mempunyai peran penting dalam mempertahankan proses mineralisasi yang optimal. Vitamin D meningkatkan penyerapan kalsium di usus, sementara fosfor mendukung stabilitas kristal hidroksiapatit. Defisiensi salah satu di antara ketiga unsur ini dapat menurunkan densitas tulang dan memperlambat pembentukan tulang baru (Reid et al., 2015).

Kebutuhan kalsium meningkat selama masa pertumbuhan anak dan remaja karena



osteoblastik. Berdasarkan Kementerian Kesehatan RI (2019), anak usia an sekitar 1.000 mg kalsium per hari, sedangkan usia 10–18 tahun mg per hari. Kekurangan kalsium kronis pada periode ini dapat uhan linier, menurunkan massa tulang, dan meningkatkan risiko porosis dini (Bueno & Czepielewski, 2008; Kementerian Kesehatan

nya berperan pada fisiologi normal, tetapi juga menjadi komponen erial regeneratif. Kalsium dalam bentuk hidroksiapatit (HA) berfungsi

sebagai bahan osteokonduktif, yang mendukung adhesi, proliferasi, dan diferensiasi osteoblas pada permukaan material. Struktur mikrokristal HA menyerupai mineral tulang alami, memungkinkan integrasi langsung dengan jaringan tulang tanpa menimbulkan reaksi imunologis yang signifikan (Venkatesan & Kim, 2014).

Sumber alami kalsium banyak dikembangkan untuk menggantikan bahan sintetis, salah satunya cangkang kerang hijau (*Perna viridis*), yang kaya akan kalsium karbonat dan dapat disintesis menjadi hidroksiapatit berukuran nano. Proses nanoisasi meningkatkan luas permukaan dan bioaktivitas, sehingga ion kalsium lebih mudah dilepaskan dan dimanfaatkan dalam proses osteogenesis (Tjandra, et al., 2023). Hidroksiapatit dari kerang hijau terbukti meningkatkan proliferasi osteoblas, kadar osteokalsin, dan deposisi mineral tulang baru, menjadikannya kandidat biomaterial alami yang potensial untuk aplikasi regeneratif pada tulang mandibula (Muntean et al., 2024; Tjandra et al., 2024).

Kalsium, khususnya dalam bentuk nanohidroksiapatit yang diperoleh dari cangkang kerang hijau, tidak hanya berfungsi sebagai mineral struktural tetapi juga sebagai agen bioaktif yang menstimulasi pembentukan tulang baru. Pemanfaatan sumber laut ini selaras dengan prinsip biokompatibilitas, keberlanjutan, dan ekonomi sirkular, sehingga mendukung pengembangan biomaterial ramah lingkungan untuk kedokteran gigi anak.

1.2.4 Inovasi Nanomaterial dalam Regenerasi Tulang

Perkembangan ilmu material dalam kedokteran gigi modern mendorong pemanfaatan biomaterial inovatif untuk memperbaiki dan meregenerasi jaringan keras seperti tulang dan gigi. Biomaterial ideal harus bersifat biokompatibel, bioaktif, osteokonduktif, osteoinduktif, serta dapat terdegradasi secara fisiologis tanpa menimbulkan reaksi imunologis, sehingga dalam konteks regenerasi tulang, bahan berbasis kalsium fosfat seperti hidroksiapatit dan polimer alami seperti kitosan telah banyak digunakan karena mampu mendukung pembentukan tulang baru dengan risiko efek samping minimal (Alamgir & Haider, 2023).

Nanoteknologi memungkinkan modifikasi material pada skala nanometer (1–100 nm), pada tingkat di mana terjadi perubahan sifat fisik, kimia, dan biologis yang signifikan dibandingkan material dalam ukuran makro. Pada skala ini, luas permukaan lebih besar dan reaktivitas yang tinggi meningkatkan kemampuan material untuk berinteraksi dengan protein matriks ekstraseluler serta sel osteoblas. Perubahan tersebut menghasilkan bioaktivitas lebih tinggi dan dapat menstimulasi osteogenesis serta mempercepat penyembuhan tulang (Roco, 2011).

Bidang rekayasa jaringan tulang (bone tissue engineering) memanfaatkan nanohidroksiapatit (nHA) sebagai bahan osteokonduktif yang mampu mendukung adhesi, proliferasi, dan diferensiasi osteoblas pada permukaannya. Struktur kristalnya menyerupai mineral alami tulang, sehingga memungkinkan integrasi langsung dengan jaringan keras tubuh tanpa memicu respons imun (Venkatesan, et al., 2017). Nanokitosan berperan



f yang osteoinduktif sekaligus antibakteri, menciptakan lingkungan bersih dan kondusif untuk regenerasi jaringan (Kazimierczak & Im et al., 2024)

dua bahan ini menghasilkan efek sinergis, karena nanokitosan si dan stabilitas mekanik hidroksiapatit, sementara nHA memperkuat deposit deposisi mineral. Sinergi tersebut menjadikan nanokomposit sebagai bahan unggulan regeneratif tulang dengan kemampuan

osteokonduktif dan osteoinduktif yang seimbang (Deng et al., 2024).

Penerapan nanomaterial dalam bidang kedokteran gigi anak berperan penting dalam regenerasi tulang mandibula yang mengalami kerusakan akibat trauma, infeksi, atau kelainan perkembangan. Nanokomposit berbasis hidroksiapatit dan kitosan dapat digunakan sebagai rangka (*scaffold*), bahan tambal tulang, atau lapisan bioaktif implan gigi. Sifat biodegradabelnya memungkinkan material terurai secara alami seiring pembentukan jaringan baru tanpa meninggalkan residu berbahaya (Souto-Lopes et al., 2024).

Sumber bahan alami seperti cangkang kerang hijau (*Perna viridis*) dan kulit udang (*Litopenaeus vannamei*) menawarkan keunggulan biokompatibilitas serta keberlanjutan lingkungan. Pemanfaatan limbah laut sebagai sumber nanokalsium dan nanokitosan tidak hanya mendukung inovasi medis tetapi juga mencerminkan prinsip ekonomi sirkular dan *green dentistry*. Penerapan nanoteknologi dalam biomaterial regeneratif memberikan peluang besar untuk meningkatkan densitas tulang mandibula secara aman, efektif, dan berkelanjutan, sekaligus memperkuat dasar ilmiah pengembangan kombinasi nanokalsium dan kitosan dalam penelitian ini.

a. Nanokalsium dari Cangkang Kerang Hijau

Kerang hijau (*Perna viridis*), juga dikenal sebagai *green mussel*, merupakan moluska laut bercangkang hijau yang termasuk dalam kelas *Bivalvia* atau *Pelecypoda*. Organisme ini memiliki dua cangkang simetris dan termasuk dalam famili *Mytilidae*. Kerang hijau memiliki insang berlapis (*Lamellibranchia*), kaki berbentuk kapak (*Pelecypoda*), serta benang *byssus* yang membantunya menempel dan berpindah tempat. Kerang hijau (*Perna viridis*) merupakan biota laut bernilai ekonomis tinggi yang tersebar luas di perairan Indonesia, terutama wilayah pesisir, daerah mangrove, dan muara sungai (Cappenberg, 2008).



Gambar 3. Kerang hijau (*Perna viridis*)



Optimized using
trial version
www.balesio.com

Klasifikasi dari kerang hijau (*Perna viridis*) adalah sebagai berikut:

le

a

nalua

a

a *viridis*

ang hijau (*Perna viridis*) merupakan sumber kalsium karbonat alami

yang dapat disintesis menjadi hidroksiapatit berukuran nano (nanokalsium) melalui proses kalsinasi dan presipitasi pada suhu rendah. Proses tersebut menghasilkan partikel berukuran sekitar 16–20 nm dengan luas permukaan yang tinggi dan struktur kristal menyerupai mineral tulang alami (Prihanto et al., 2023; Venkatesan & Kim, 2014).

Hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) merupakan komponen utama mineral tulang dan gigi yang memiliki sifat osteokonduktif, yaitu mendukung adhesi dan proliferasi osteoblas serta pembentukan tulang baru. Hidroksiapatit yang disintesis dari cangkang kerang hijau telah terbukti meningkatkan proliferasi osteoblas, ekspresi osteokalsin, serta deposisi kalsium, dan mampu mempercepat pembentukan trabekula baru dibandingkan hidroksiapatit sintetis (Putra et al., 2023; K. Tjandra, et al., 2023).

Keunggulan nanokalsium dibanding bentuk mikro terletak pada bioaktivitas dan kemampuan pelepasan ion Ca^{2+} yang lebih efisien, yang berperan penting dalam proses mineralisasi tulang dan regulasi aktivitas osteoblastik. Porositas alami dari hidroksiapatit hasil sintesis cangkang kerang hijau memungkinkan difusi nutrisi dan vaskularisasi yang optimal dalam jaringan regeneratif. Berdasarkan karakteristik tersebut, nanokalsium dari cangkang kerang hijau berpotensi menjadi biomaterial biokompatibel, osteokonduktif, dan berkelanjutan untuk regenerasi tulang mandibula (Muntean et al., 2024).

b. Nanokitosan dari Kulit Udang

Udang merupakan salah satu komoditas perikanan utama Indonesia dengan potensi ekspor yang tinggi. Indonesia termasuk dalam lima negara penghasil udang terbesar di dunia. Sulawesi Selatan menempati peringkat ketujuh sebagai daerah penghasil udang terbanyak di Indonesia. Berdasarkan data dari Dinas Kelautan dan Perikanan Provinsi Sulawesi Selatan pada tahun 2021-2022, udang vannamei menjadi komoditas unggulan utama di wilayah tersebut (Dinas Kelautan Perikanan (DKP), 2022).



Gambar 4. Udang Vannamei (*Litopenaeus vannamei*)

Klasifikasi dari udang vannamei (*Litopenaeus vannamei*) adalah sebagai berikut:

Kerajaan : *Animalia*



oda

cea

da

idae

naeus

enaeus vannamei (Galil et al., 2011)

itopenaeus vannamei) merupakan sumber alami kitin, yang dapat

diubah menjadi kitosan melalui proses deasetilasi dengan menggunakan larutan basa. Kitosan adalah polimer alami yang bersifat biokompatibel, biodegradabel, dan antibakteri, sehingga aman untuk aplikasi biomedis. Melalui proses nanoisasi, kitosan menghasilkan partikel berukuran <100 nm yang memiliki luas permukaan dan bioaktivitas lebih tinggi dibanding bentuk konvensional (Kravanja et al., 2019).

Nanokitosan berperan penting dalam menstimulasi osteogenesis, yakni meningkatkan proliferasi osteoblas, produksi kolagen tipe I, dan pembentukan matriks mineral tulang. Partikel ini juga neovaskularisasi, yaitu pembentukan pembuluh darah baru yang penting untuk suplai oksigen dan nutrisi selama proses penyembuhan jaringan (Deng et al., 2024).

Kombinasi nanokitosan dengan hidroksiapatit memperkuat bioadhesi, stabilitas mekanik, dan biokompatibilitas biomaterial. Kitosan berperan sebagai matriks polimerik yang meningkatkan integrasi jaringan dan mengatur pelepasan ion kalsium secara bertahap, sedangkan hidroksiapatit menyediakan kekuatan struktural serta sifat osteokonduktif. Kombinasi kedua bahan tersebut terbukti efektif dalam meningkatkan densitas tulang, ekspresi penanda osteogenik seperti Runx2, ALP, dan osteokalsin, serta kualitas jaringan tulang baru yang terbentuk (Deng et al., 2024; Souto-Lopes et al., 2024).

Sifat biologis dan mekanis tersebut menjadikan nanokitosan dari kulit udang berperan penting sebagai komponen sinergis dalam biomaterial kombinasi untuk meningkatkan densitas tulang, sekaligus mendukung konsep bioteknologi ramah lingkungan dan ekonomi sirkular melalui pemanfaatan limbah laut sebagai sumber biomaterial alami.

1.2.5 Kombinasi nanomaterial untuk Densitas Tulang Mandibula

Penggunaan kombinasi nanokalsium dan nanokitosan dalam regenerasi tulang didasarkan pada sinergi antara sifat osteokonduktif dan osteoinduktif dari kedua bahan tersebut. Nanokalsium berperan sebagai sumber mineral esensial bagi proses pembentukan tulang, sedangkan nanokitosan memiliki sifat antibakteri, biokompatibel, dan biodegradabel yang mendukung lingkungan penyembuhan yang optimal (Boda et al., 2023; Dasgupta et al., 2019).

Nanokalsium yang diekstrak dari cangkang kerang hijau (*Perna viridis*) mengandung hidroksiapatit yang menyerupai mineral alami tulang manusia. Nanokitosan yang berasal dari kulit udang vannamei (*Litopenaeus vannamei*) memiliki kemampuan mempercepat regenerasi jaringan serta meningkatkan adhesi dan proliferasi sel osteoblas. Kombinasi kedua bahan ini menghasilkan biomaterial yang efektif dalam meningkatkan densitas tulang mandibula (Hatami Kaleshtari et al., 2025; UI-Islam et al., 2024).

Interaksi antara nanokitosan (nCS) dan nanokalsium (nCa) berlangsung melalui ikatan ionik, ikatan hidrogen, dan *chelating bond* (ikatan koordinasi semi-kovalen). Gugus



amf ($-\text{NH}_3^+$) pada kitosan berikatan dengan ion Ca^{2+} dan gugus PO_4^{3-} membentuk gaya elektrostatik yang meningkatkan stabilitas struktur. Gugus $-\text{OH}$ dan $-\text{NH}_2$ pada kitosan dengan gugus hidroksil pada kuat jaringan polimer-ionik dan mempertahankan porositas ideal ta pertumbuhan osteoblas. Gugus amina pada kitosan juga dapat koordinasi dengan Ca^{2+} yang memungkinkan pelepasan ion kalsium erangsang diferensiasi osteoblas dan mineralisasi matriks tulang

(Mathews et al., 2011; Paladini & Pollini, 2022; Sathiyavimal et al., 2024).

Kombinasi gaya elektrostatik, ikatan hidrogen, dan *chelating* pada skala nano menghasilkan struktur self-assembled interpenetrating network, di mana nanopartikel kitosan melapisi permukaan nanokalsium membentuk sistem *core-shell*. Struktur hibrida ini meningkatkan bioaktivitas, mempercepat nukleasi hidroksiapatit, dan menstimulasi osteoconduction serta osteoinduction secara sinergis (Szwed-Georgiou et al., 2023; Gani et al., 2022).

Bionanomaterial berbasis sumber daya laut ini memiliki potensi aplikasi klinis pada perawatan kehilangan tulang akibat trauma, infeksi, atau kelainan kraniofasial pada anak. Pemanfaatannya mencakup penggunaan sebagai rangka (*scaffold*) untuk regenerasi tulang, bahan tambal gigi, dan pelapis implan yang berfungsi mempercepat penyembuhan serta meningkatkan keberhasilan terapi.

Kombinasi nanokalsium dari cangkang kerang hijau dan nanokitosan dari kulit udang diyakini memiliki potensi besar sebagai biomaterial alami berbasis nanoteknologi untuk meningkatkan densitas tulang mandibula sekaligus mendukung pertumbuhan orofasial yang optimal pada anak. Berdasarkan landasan ilmiah tersebut, penelitian ini dilakukan untuk menguji efektivitas kombinasi biomaterial tersebut secara eksperimental pada model hewan.

1.3 Rumusan Masalah

1. Apakah pemberian kombinasi nanokalsium dari cangkang kerang hijau (*Perna viridis*) dan nanokitosan dari kulit udang (*Litopenaeus vannamei*) berpotensi meningkatkan kepadatan tulang mandibula tikus Wistar jantan (*Rattus norvegicus*)?
2. Apakah kombinasi kedua biomaterial tersebut lebih efektif dibandingkan kelompok kontrol lainnya dalam meningkatkan densitas tulang mandibula?

1.4 Tujuan Penelitian

1.4.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui efektivitas kombinasi biomaterial alami berbasis nanokalsium dari cangkang kerang hijau dan nanokitosan dari kulit udang dalam meningkatkan densitas tulang mandibula pada tikus Wistar.

1.4.2 Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui pengaruh pemberian kombinasi nanokalsium cangkang kerang hijau dan nanokitosan kulit udang terhadap kepadatan tulang dengan menilai *optical density* pada tulang mandibula tikus Wistar.
2. Untuk mengetahui pengaruh pemberian kombinasi nanokalsium cangkang kerang hijau dan nanokitosan kulit udang terhadap kepadatan tulang dengan menilai jumlah osteosit pada tulang mandibula tikus Wistar.



Optimized using
trial version
www.balesio.com

ian

itis:

literatur ilmiah tentang pengembangan dan pemanfaatan al berbasis sumber alam sebagai alternatif biomaterial yang ramah okompatibel, dan efektif untuk regenerasi tulang.

asar teoritis mengenai mekanisme kerja sinergis nanokalsium dan

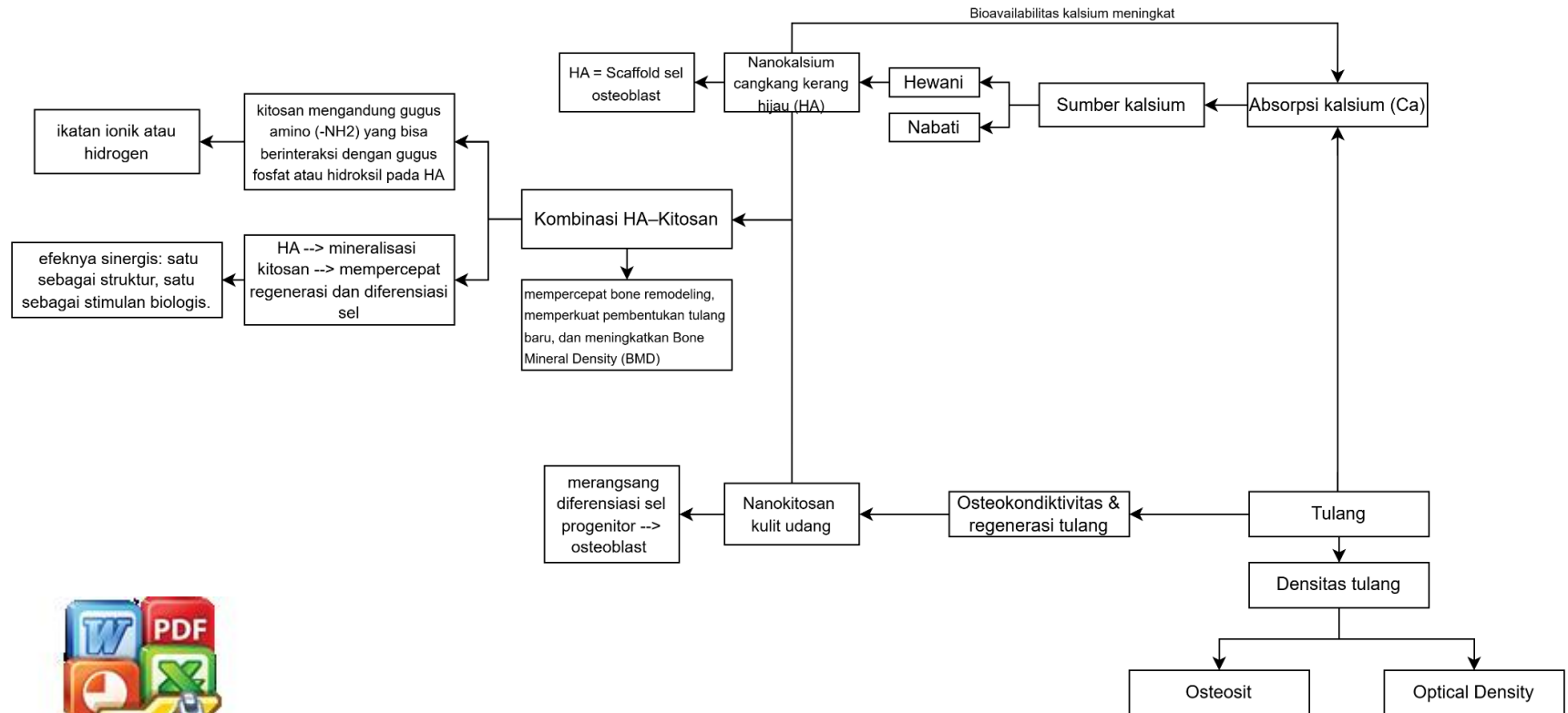
nanokitosan dalam merangsang osteogenesis serta mengurangi resorpsi tulang selama fase pertumbuhan mandibula.

1.5.2 Manfaat Praktis:

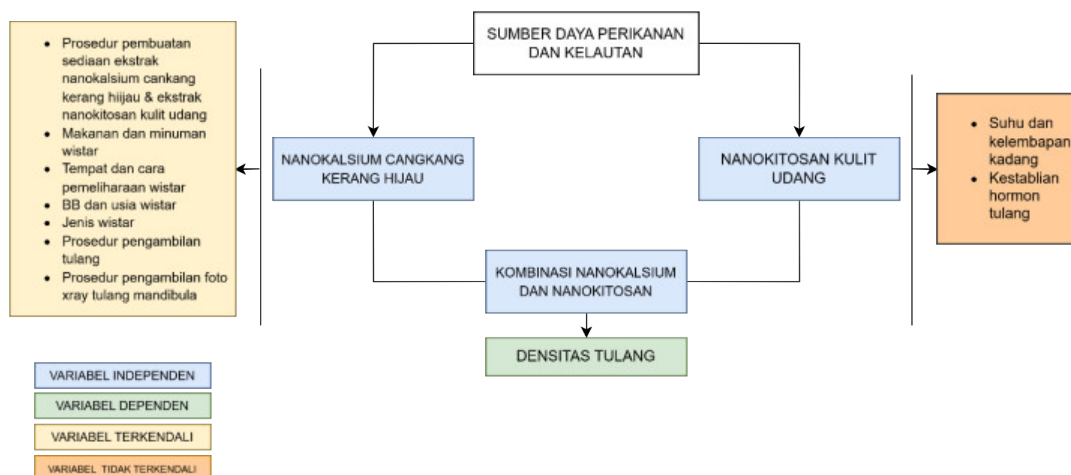
1. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan pemahaman bagi dokter gigi, khususnya dokter gigi anak, mengenai potensi kombinasi nanokalsium dari cangkang kerang hijau (*Perna viridis*) dan nanokitosan dari kulit udang (*Litopenaeus vannamei*) dalam mendukung proses regenerasi tulang pada masa pertumbuhan anak.
2. Hasil penelitian ini dapat menjadi dasar untuk mengembangkan pemanfaatan limbah maritim, seperti cangkang kerang dan kulit udang, sebagai bahan biomaterial berkelanjutan yang berpotensi meningkatkan pertumbuhan tulang.



1.6 Kerangka Teori



1.7 Kerangka Konsep



1.8 Hipotesis

Kombinasi nanokalsium dari cangkang kerang hijau dan nanokitosan dari kulit udang berpotensi meningkatkan kepadatan tulang mandibula tikus Wistar jantan.



BAB 2 METODE PENELITIAN

2.1 Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris dengan desain penelitian post-test only control group design dengan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Menggunakan subjek penelitian tikus Wistar jantan yang akan dibagi menjadi beberapa kelompok berbeda untuk membandingkan efek bionanomaterial terhadap densitas tulang mandibula (Notoatmodjo, 2010).

2.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

2.2.1 Lokasi Penelitian

1. Pembuatan dan pengukuran nanokalsium cangkang kerang hijau dan nanokitosan kulit udang di Laboratorium Pengujian Kimia, Politeknik Pertanian Negeri Pangkep, Jurusan Teknologi Pertanian.
2. Pemeliharaan, perlakuan hewan coba, pengambilan foto xray sampel tulang mandibula, pembuatan dan pewarnaan slide prepare, perhitungan jumlah osteosit di Laboratorium Terpadu Prodi Kedokteran Hewan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin.

2.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Mei – September 2025

2.3 Populasi dan Sampel Penelitian

2.3.1 Populasi Penelitian

Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) jantan yang sehat, berusia 8–10 minggu, dengan berat 150–200 gram. Semua hewan coba dipelihara dalam kondisi seragam dan menjalani adaptasi lingkungan selama 7 hari sebelum perlakuan.

2.3.2 Sampel Penelitian

Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang memenuhi kriteria inklusi. Adapun kriteria inklusi dan eksklusi adalah sebagai berikut:

Kriteria Inklusi:

1. Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) jantan usia 8–10 minggu
2. Berat badan rata-rata 150–200 gram
3. Tikus Wistar diperiksa oleh dokter hewan dan dinyatakan sehat (bulu tidak kusam, tidak rontok, tidak botak, gerakan aktif, konsumsi pakan lancar).



aptasi selama 7 hari sebelum perlakuan.

menunjukkan tanda-tanda sakit, seperti bulu kusam, rontok, gerakan n konsumsi pakan tidak lancar.

enurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi di

3. Tikus Wistar mati selama penelitian.

2.3.3 Besar Sampel

Perhitungan besar sampel dalam penelitian ini menggunakan rumus Frederer:

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

t= jumlah kelompok perlakuan

n= replikasi (besar sampel per kelompok)

Cara perhitungan besar sampel:

t= 5 kelompok perlakuan

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

$$(5 - 1)(n - 1) \geq 15$$

$$(4n - 4) \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,7 \sim 5$$

Berdasarkan hasil perhitungan, jumlah sampel dalam 1 kelompok perlakuan sebanyak 4 ekor tikus, total jumlah sampel sebanyak 25 ekor tikus, yang terdiri dari 5 kelompok perlakuan:

1. Kelompok kontrol negatif: diberi pakan standar 2 kali sehari dan minum aquades.
2. Kelompok kontrol positif: diberi pakan standar ditambah susu 2 kali sehari dan susu.
3. Kelompok perlakuan 1: diberi pakan standar ditambah sediaan nanokalsium cangkang kerang hijau 2 kali sehari dan minum aquades.
4. Kelompok perlakuan 2: diberi pakan standar ditambah sediaan nanokitosan kulit udang 2 kali sehari dan minum aquades.
5. Kelompok perlakuan 3: diberi pakan standar ditambah sediaan nanokalsium cangkang kerang hijau dan nanokitosan kulit udang 2 kali sehari dan minum aquades.

2.4 Alat dan Bahan Penelitian

2.4.1 Pembuatan nanokalsium cangkang kerang hijau dan nanokitosan kulit udang

Alat:

1. Blender / Penggiling (Grinder Mill) – Untuk menghancurkan cangkang kerang hijau dan kulit udang menjadi serbuk halus.
2. Oven (Drying Oven) – Untuk mengeringkan bahan sebelum proses ekstraksi.
3. Mesh Sieve, ukuran $\leq 200 \mu\text{m}$ – Untuk menyaring serbuk yang telah saringan mendapatkan ukuran partikel yang seragam.
4. Magnetic Stirrer – Untuk membantu proses ekstraksi dengan pemanasan dan pengadukan.
5. pH Meter – Untuk mengukur pH larutan selama proses ekstraksi dan analisis nanokitosan.
6. Centrifuge – Untuk memisahkan cairan dan padatan selama pemurnian.



ekstrak.

7. Rotary Evaporator – Untuk menghilangkan pelarut dalam ekstrak dengan metode evaporasi vakum.
8. Spektrofotometer UV-Vis – Untuk analisis kandungan kalsium dan karakterisasi nanokitosan.

Bahan:

1. Cangkang Kerang Hijau (*Perna viridis*) – Sebagai sumber kalsium karbonat (CaCO_3) yang akan diekstraksi.
2. Kulit Udang – Sebagai sumber kitosan yang akan diolah menjadi nanokitosan.
3. Asam Klorida (HCl) 1-2M – Untuk demineralisasi cangkang kerang hijau dan kulit udang.
4. Natrium Hidroksida (NaOH) 40-50% – Untuk deasetilasi kitin menjadi kitosan.
5. Asam Asetat (CH_3COOH) 1-2% – Untuk melarutkan kitosan dalam proses pembuatan nanokitosan.
6. Ethanol 96% – Untuk pemurnian bahan.
7. Akuades (Aquabidest) – Sebagai pelarut.

2.4.2 Persiapan perlakuan hewan uji

Alat:

1. Kandang Hewan – Untuk menampung tikus dalam kondisi terkendali.
2. Timbangan Digital – Untuk mengukur berat badan tikus sebelum dan selama penelitian.
3. Alat Anestesi (Ketamin dan Xylazine) – Untuk pembiusan tikus saat dilakukan tindakan pembedahan.
4. Alat Bedah (Scalpel, Gunting Bedah, Pinset, Retraktor, Needle Holder, Benang Jahit, Sterilizer) – Untuk prosedur pembedahan implantasi bahan.
5. Lampu Bedah – Untuk pencahayaan saat prosedur operasi.
6. Alat Sterilisasi (Autoclave / UV Sterilizer) – Untuk mensterilkan peralatan bedah.
7. Sonde lambung – Untuk aplikasi bahan perlakuan.

Bahan:

1. Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) – Hewan coba dalam penelitian.
2. Pakan Tikus (Standard Lab Diet) – Untuk nutrisi hewan uji.
3. Euthanasia Agent (Ketamin/Xylazine Overdose atau CO_2 Chamber) – Untuk prosedur pengorbanan tikus setelah masa penelitian.
4. Alkohol 70% – Untuk sterilisasi sebelum pembedahan.
5. Lidokain Gel / Povidone-Iodine – Untuk antisepsis lokal sebelum insisi.



Optimized using
trial version
www.balesio.com

Preparat Histologi Jaringan Tulang

Rotom – Untuk memotong irisan jaringan tulang yang telah

Rotary / Sliding – Untuk pemotongan irisan tipis (5–10 μm).

Heat (suhu ± 45 – 50°C) – Untuk membantu perlekatan irisan jaringan pada objek.

4. Hot Plate atau Inkubator Slide Warmer – Untuk menempelkan jaringan ke kaca objek secara sempurna.
5. Penjepit / Pinset anatomi – Untuk memindahkan irisan jaringan ke slide.
6. Mikroskop Cahaya atau Digital – Untuk pemeriksaan hasil pewarnaan.
7. Oven Infiltrasi Parafin – Untuk proses dehidrasi dan impregnasi jaringan.
8. Tissue Cassette dan Embedding Mold – Untuk meletakkan jaringan saat proses embedding.

Bahan:

1. Formalin 10% Netral Buffer – Sebagai fiksatif jaringan.
2. Larutan Dekalsifikasi (contoh: EDTA atau asam formiat 10%) – Untuk melunakkan tulang sebelum pemotongan.
3. Alkohol bertingkat (70%, 80%, 90%, 96%, absolut) – Untuk dehidrasi jaringan.
4. Xylol / Xylene – Untuk clearing jaringan sebelum dan sesudah parafinisasi.
5. Parafin Cair (Embedding Medium) – Untuk membentuk blok jaringan.
6. Kaca Objek dan Kaca Penutup (cover glass) – Untuk mounting jaringan.
7. Pewarnaan HE (Hematoxylin-Eosin) – Untuk pengecatan dasar jaringan.
8. Medium Mounting (Entellan atau Canada balsam) – Untuk fiksasi preparat ke slide permanen.

2.4.4 Pengukuran Jumlah Osteosit dan Optical Density (OD)

1. Pengukuran Jumlah Osteosit (Histologi)

Alat:

- a. Mikrotom – Untuk memotong sampel jaringan tulang dalam irisan tipis (5-10 μm).
- b. Mikroskop Cahaya / Mikroskop Digital – Untuk observasi dan analisis histologi osteosit.
- c. Kamera Mikroskop – Untuk dokumentasi gambar histologi.
- d. Water Bath – Untuk membantu perlekatan irisan jaringan pada kaca objek.
- e. Perangkat Lunak Analisis Citra *ImageJ* – Untuk menghitung jumlah osteosit.

Bahan:

- a. Kaca Objek dan Kaca Penutup – Untuk preparat histologi.
- b. Parafin Cair – Untuk embedding jaringan sebelum pemotongan.
- c. Hematoxylin-Eosin (HE Staining) – Untuk pewarnaan jaringan.
- d. Toluidine Blue atau Masson's Trichrome – Untuk pewarnaan spesifik osteosit.
- e. Xylol, Etanol, dan Aquadest – Untuk fiksasi dan dehidrasi jaringan.

B. Pengukuran Optical Density (Radiografi)



Optimized using
trial version
www.balesio.com

radiografi Digital Xray– Untuk analisis kepadatan mineral tulang secara kuantitatif.

Optical Density Meter – Untuk mengukur densitas optik pada citra radiografi.

Photometer UV-Vis – Untuk mengukur OD pada larutan yang telah dioksidasi dengan pewarnaan khusus.

Perangkat Lunak Analisis Citra *ImageJ* – Untuk mengukur OD dari gambar radiografi.

Bahan:

- a. Film Radiografi atau Sensor Digital – Untuk pencitraan tulang.
- b. Fiksatif (Formalin 10%) – Untuk mempertahankan struktur jaringan sebelum analisis.
- c. Larutan Kontras (Van Kossa atau Alizarin Red S Staining) – Untuk meningkatkan kontras mineralisasi tulang.

2.5 Variabel Penelitian

Variabel independen:

1. Nanokalsium dari cangkang kerang hijau
2. Nanokitosan dari kulit udang
3. Kombinasi nanokalsium dan nanokitosan

Variabel dependen:

1. Densitas tulang

Variabel Terkendali:

1. Usia dan jenis kelamin
2. Berat badan tikus
3. Makanan dan minuman tikus
4. Kondisi lingkungan
5. Waktu pengambilan sampel
6. Prosedur pembuatan nanokalsium cangkang kerang hijau dan nanokitosan kulit udang.
7. Prosedur pengambilan tulang mandibula
8. Prosedur pengambilan foto xray tulang mandibula
9. Prosedur pembuatan preparat jaringan

Variabel Tak Tekendali:

1. Suhu dan Kelembapan kandang
2. Kestabilan hormon tulang

2.6 Definisi Operasional

1. Nanokalsium cangkang kerang hijau: Nanokalsium yang diperoleh dari cangkang kerang hijau (*Perna viridis*) merupakan partikel kalsium berukuran nanometer yang dihasilkan melalui proses sintesis presipitasi. Nanokalsium cangkang kerang hijau dalam penelitian ini digunakan sebagai sumber kalsium hidroksiapatit (HA) untuk



Optimized using
trial version
www.balesio.com

mineralisasi dan regenerasi tulang mandibula, dengan karakteristik

serta kandungan mineralnya.
kulit udang: Nanokitosan kulit udang adalah hasil olahan kitosan dari
ang vannamei (*Litopenaeus vannamei*) yang telah mengalami proses
hingga memiliki ukuran partikel <100 nm. Nanokitosan dalam
digunakan sebagai biomaterial alami yang bersifat biodegradabel,
an osteoinduktif, serta berfungsi untuk merangsang diferensiasi

osteoblas dan mendukung regenerasi serta mineralisasi tulang mandibula.

3. Densitas tulang: Densitas tulang dalam penelitian ini didefinisikan sebagai jumlah mineral tulang dalam volume tertentu, yang mencerminkan tingkat mineralisasi dan kekuatan tulang. Pengukurannya dilakukan dengan metode radiografi menggunakan *optical density* (OD) pada X-ray serta analisis histologi berdasarkan jumlah osteosit dalam jaringan tulang mandibula tikus Wistar.
4. Osteosit: Osteosit merupakan sel tulang dewasa yang tertanam dalam matriks tulang, berperan dalam mengatur homeostasis mineral dan proses *remodeling* tulang. Dalam penelitian ini, osteosit dianalisis melalui pewarnaan histologi Hematoxylin-Eosin (HE) dan dihitung jumlahnya dalam area jaringan tulang tertentu untuk menilai aktivitas seluler dalam proses regenerasi tulang mandibula.
5. *Optical density* (OD): *Optical density* adalah ukuran densitas mineral tulang yang diperoleh dari analisis pencitraan radiografi, menggunakan X-ray mandibula dan diolah melalui software *ImageJ*. Nilai OD diukur berdasarkan grayscale intensity, di mana semakin tinggi nilai OD, semakin tinggi densitas mineral tulang yang menandakan keberhasilan proses regenerasi dan mineralisasi tulang mandibula.

2.7 Prosedur Penelitian

2.7.1 Pembuatan Bionanomaterial:

Nanokalsium dihasilkan dari cangkang kerang hijau (*Perna viridis*) menggunakan Metode Ekstraksi Hidrotermal Modifikasi dengan *Ball Milling*. Langkah-langkah pembuatannya adalah sebagai berikut:

1. Bersihkan cangkang kerang hijau dari sisa-sisa kotoran dan jaringan lunak.
2. Cuci cangkang dengan air mengalir hingga bersih.
3. Keringkan cangkang hingga tidak ada sisa air.
4. Potong cangkang kerang hijau menjadi serpihan kasar menggunakan alat pemotong.
5. Pastikan ukuran serpihan sesuai untuk proses ekstraksi.
6. Siapkan larutan NaOH 1,5N dengan perbandingan antara serpihan cangkang kerang hijau dan larutan adalah 1:3 (berat/volume).
7. Panaskan campuran pada suhu 22–100°C dengan variasi lama ekstraksi: 1 jam, 2 jam, dan 3 jam. Ganti larutan NaOH setiap 1 jam untuk menjaga konsistensi proses.
8. Setelah selesai, dinginkan campuran hingga mencapai suhu ruang.
9. Cuci serpihan cangkang kerang hijau dengan air mengalir hingga mencapai pH netral ($\text{pH} \pm 7$).
10. Pastikan larutan NaOH telah hilang sepenuhnya dari serpihan cangkang.
11. Keringkan serpihan cangkang dengan menggunakan oven pada suhu 50°C selama 12 jam.
12. Pastikan kadar air (KA) serpihan di bawah 8% sebelum melanjutkan proses



an cangkang kering ke dalam alat ball mill.

hingga menjadi serbuk nanokalsium dengan ukuran partikel nano (sesuai dengan target ukuran partikel yang diinginkan).

an ukuran partikel untuk memastikan hasil sesuai dengan spesifikasi

anokalsium dalam wadah kedap udara untuk mencegah kontaminasi silikat.

Nanokitosan dibuat dari kulit udang vannamei (*Litopenaeus vannamei*) melalui proses deasetilasi dan ultrasonikasi. Langkah-langkah pembuatannya adalah sebagai berikut:

1. Timbang 100 gram kulit udang segar atau yang sudah dikeringkan, kemudian cuci hingga bersih.
2. Masukkan kulit udang ke dalam oven pada suhu 50°C hingga kadar airnya hilang.
3. Lakukan demineralisasi dengan merendam kulit udang dalam larutan asam klorida 1–2% selama beberapa jam untuk menghilangkan mineral, terutama kalsium karbonat. Setelah itu, cuci dengan air untuk menghilangkan sisa asam.
4. Lakukan deproteinisasi dengan merendam kulit udang dalam larutan natrium klorida 1–5% pada suhu tinggi untuk menghilangkan protein, lalu cuci dengan air untuk menghilangkan sisa basa.
5. Lakukan deasetilasi kitin dengan merendamnya dalam larutan natrium hidroksida 40–50% pada suhu tinggi, kemudian cuci dengan air untuk menghilangkan sisa basa dan keringkan.
6. Konversi kitosan menjadi nanokitosan dengan pembuatan larutan kitosan. Kitosan yang telah diekstraksi dilarutkan dalam asam asetat 1–2% untuk membuat larutan kitosan. Larutan ini kemudian diubah menjadi nanopartikel menggunakan metode seperti gelasi ionik, sonikasi, atau penguapan pelarut (dengan larutan sodium tripolifosfat) melalui proses pengadukan cepat untuk membentuk nanopartikel.
7. Simpan nanokitosan dalam wadah kedap udara untuk mencegah kontaminasi dan penyerapan kelembaban.

2.7.2 Penentuan Dosis dan Perlakuan Pemberian Nanomaterial

Berdasarkan tinjauan literatur sebelumnya mengenai penggunaan ekstrak nanokalsium dan nanokitosan, dosis yang aman dan efektif yang telah diuji sebelumnya untuk nanokalsium menunjukkan efek positif pada kepadatan tulang dengan dosis 1300 mg/hari, sedangkan untuk nanokitosan dosis 1500 mg/hari menunjukkan efek positif pada hal yang sama (Salekhah, 2021). Berdasarkan tabel konversi dosis hewan dengan manusia, dosis manusia dengan berat badan 70 kg dapat dikonversi untuk tikus dengan bobot 200 gr menggunakan faktor konversi 0,018.

Perhitungan dosis untuk tikus Wistar jantan dengan berat 150–220 gr, berdasarkan dosis harian untuk manusia dengan rentang usia 10–14 tahun, adalah sebagai berikut:

1. Nanokalsium: $1300 \times 0,018 = 23,4$ mg untuk 200 gr tikus (dibulatkan menjadi 20 mg/200 gr tikus)
2. Nanokitosan: $1500 \times 0,018 = 27$ mg untuk 200 gr tikus (dibulatkan menjadi 30 mg/200 gr tikus)

Sehingga untuk menentukan dosis kombinasi sebagai dosis permulaan sebaiknya dimulai dari menggunakan dosis yang lebih rendah dari rentang yang telah diuji :
10 mg
20 mg



Angka kecukupan kalsium manusia $\times 0,018 = 0,65 \text{ gr} \times 0,018 = 0,0117 \text{ gr} / 200 \text{ gr BB/hari}$
 Angka kecukupan kalsium pada tikus = 11,7 mg/hari

Dosis susu yang diberikan adalah :

$\frac{\text{Angka kecukupan kalsium (manusia)}}{\text{Dosis harian susu (manusia)}}$	$\frac{\text{Angka kecukupan kalsium (tikus)}}{\text{Dosis harian susu (tikus)}}$
---	---

Dosis susu pada tikus:

$$\frac{35\text{gr} \times 11.7\text{mg}}{35\% \times 650\text{mg}} = 1.8\text{mg/hari}$$

2.7.3 Persiapan Hewan Coba

1. Penyediaan hewan coba: 25 tikus putih galur Wistar jantan.
2. Pengukuran BB awal : 150-200 gr.
3. Menyiapkan kandang, menempatkan 3-4 tikus dalam 1 kandang
4. Mengadaptasikan tikus dalam kandang selama 7 hari.

2.7.4 Perlakuan Hewan Coba

1. Kelompok kontrol negatif: diberi pakan standar 2 kali sehari dan minum aquades.
2. Kelompok kontrol positif: diberi pakan biasa ditambah susu 2 kali sehari dan minum aquades.
3. Kelompok perlakuan 1: diberi pakan biasa ditambah sediaan nanokalsium cangkang kerang hijau 2 kali sehari dan minum aquades.
4. Kelompok perlakuan 2: diberi pakan biasa ditambah sediaan nanokitosan kulit udang 2 kali sehari dan minum aquades.
5. Kelompok perlakuan 3: diberi pakan biasa ditambah sediaan nanokalsium cangkang kerang hijau dan nanokitosan kulit udang 2 kali sehari dan minum aquades.

2.7.5 Koleksi Sampel

Setelah 30 hari perlakuan, dilakukan pembedahan tikus, sebagai berikut :

1. Persiapkan tikus yang akan diambil mandibulanya.
2. Dilakukan dislokasi pada leher tikus dengan menekan bagian leher dan ekor tikus ditarik
3. sampai terasa tulang leher dislokasi
4. Diambil kepala tikus dengan memotongnya melalui leher.
5. Leher yang telah dipotong diikuti dari bagian leher hingga ke mulut sampai yang tertinggal hanya tengkorak kepala.
6. Dibuka mulut tikus kemudian dibersihkan seluruh otot yang ada di bagian mulut.



pengambilan mandibula dengan perlahan, dibersihkan dengan air
mandibula kemudian difiksasi dalam larutan buffer formalin 10% selama 24

Prosedur Xray Os Mandibula

pengambilan tulang mandibula dilakukan di Laboratorium Terpadu Prodi
 Kesehatan Kedokteran Universitas Hasanuddin. Menurut Thrall (dalam

Sabri, 2011), kepadatan tulang dapat dilihat melalui radiografi tulang, di mana area yang tampak radiopaque menunjukkan massa tulang yang lebih padat, sementara yang tampak radiolucent menunjukkan massa tulang yang kurang padat. Foto rontgen digunakan untuk memotret semua sampel tulang secara bersamaan dalam satu film, sehingga mengurangi kemungkinan bias. Tulang mandibula ditempatkan secara berjejer pada imaging plate, kemudian difoto. Pengolahan hasil foto dilakukan secara digital menggunakan metode *Computed Radiography*, di mana hasil foto tulang mandibula pada imaging plate diubah menjadi sinyal digital, yang kemudian ditampilkan di monitor komputer.

2.7.7 Pengamatan dan Pengukuran Densitas Tulang Mandibula

Hasil foto rontgen tulang mandibula diambil dan disimpan dalam format soft file. Analisis densitas tulang mandibula secara radiografik dapat dilakukan menggunakan perangkat lunak *ImageJ*, yang terbukti valid dan akurat dalam mendeteksi perubahan mineralisasi tulang (Bueno et al., 2021; Lakhtin et al., 2021). Setelah gambar diperoleh, dilakukan kalibrasi skala untuk mengonversi nilai piksel menjadi satuan densitas yang lebih bermakna. Selanjutnya, *area of interest* (ROI) pada tulang mandibula diidentifikasi secara manual atau dengan bantuan segmentasi otomatis. Setelah ROI ditentukan, analisis dilakukan dengan menggunakan fitur *Mean Gray Value* di *ImageJ*, yang merepresentasikan tingkat keabuan dalam area tersebut di mana nilai yang lebih tinggi menunjukkan kepadatan mineral yang lebih besar. Teknik thresholding dapat digunakan untuk membedakan jaringan tulang dari jaringan lunak, sementara analisis histogram membantu mengevaluasi distribusi densitas mineral dalam ROI. *Fiture profile plot* dapat digunakan untuk melihat variasi densitas di sepanjang area tertentu pada mandibula.

2.7.8 Tahapan Prosesing Jaringan Tulang Mandibula Wistar

1. Dehidrasi: Tulang didehidrasi melalui rangkaian larutan alkohol bertingkat (70%, 80%, 90%, 95%, dan 100%).
2. Penyematan: Tulang kemudian disematkan dalam parafin atau resin untuk memungkinkan pemotongan bagian tipis.
3. Pemotongan: Gunakan mikrotom untuk memotong irisan tipis (5-10 μm) dari tulang yang disematkan.
4. Pewarnaan: Irisan tulang diwarnai dengan pewarna histologi seperti Hematoxylin dan Eosin (H&E) untuk menilai struktur tulang dan sel-sel terkait.
5. Hasil Pewarnaan kemudian dikeringkan dalam inkubator lalu difoto menggunakan kamera optilab yang hasilnya kemudian dianalisis menggunakan aplikasi *ImageJ* sehingga menghasilkan data dalam bentuk sebaran nilai



2.8 Analisis Data

Jenis Data	: Data Primer
Pengolahan data	: SPSS 23.0 untuk Windows
Analisis Data	: Uji normalitas (<i>Shapiro–Wilk</i>) untuk menentukan distribusi data; uji statistik, jika data normal <i>Anova one way</i> dengan uji <i>post-hoc LSD</i> .
Penyajian data	: Dalam bentuk tabel dan grafik



2.9 Alur Penelitian

