

CHAPTER 1

PENDAHULUAN UMUM

1.1 Latar Belakang

Ekstraksi gigi telah menjadi bentuk perawatan yang paling sering diterapkan pada karies gigi, penyakit periodontal, trauma dan keadaan lain yang berpotensi menyebabkan defek tulang alveolar. Kehilangan struktur dan volume tulang alveolar akibat ekstraksi gigi ataupun penyakit periodontal akan mengakibatkan bagian tulang mengalami resorpsi lebih dari 25% dalam 1 tahun pertama dan meningkat 40-60% selama 3 tahun. Studi terbaru juga menunjukkan bahwa pada anak yang mengalami karies gigi, trauma gigi, penyakit periodontal yang parah dan faktor fisiologis merupakan alasan paling penting terjadinya *premature loss* disebabkan karena ekstraksi gigi desidui lebih dini pada anak usia 4-7 tahun yang dapat menyebabkan maloklusi apabila tidak segera ditangani, ekstraksi gigi yang ideal adalah tanpa rasa sakit dengan satu gigi utuh, atau akar gigi. Pencabutan gigi memicu atrofi pada tulang alveolar di sekitar luka bekas pencabutan. Pada 1 tahun paska ekstraksi, rata-rata 50% dari lebar ridge akan berkurang antara 5-7 mm, dan 2/3 dari pengurangan ini terjadi dalam 3 bulan pertama (Supradnyana et.al, 2019; Utami et al, 2021; Kim et al, 2020).

Perubahan yang terjadi pada jaringan keras, seperti tulang alveolar selain paska ekstraksi gigi pada penyakit periodontal juga merupakan hal penting karena kerusakan tulang berpengaruh terhadap keberadaan gigi. Pencegahan kerusakan tulang alveolar yang lebih parah, dapat dilakukan dengan terapi periodontal agar terjadi regenerasi. Regenerasi periodontal meliputi perbaikan tulang, sementum dan serabut-serabut periodontal, setelah terjadi kerusakan akibat proses penyakit periodontal. Berbagai bahan dan teknik digunakan sebagai terapi regeneratif untuk kerusakan tulang seperti *bone graft*, *Guided Tissue Regeneration* (GTR) dan *growth factors* (Bariyah, et. al, 2016).

Kerusakan tulang alveolar akibat penyakit periodontal maupun adanya soket gigi setelah ekstraksi gigi perlu segera ditangani untuk mencegah terjadinya resorpsi pada tulang alveol. Upaya meningkatkan regenerasi tulang pada defek tulang alveolar di sekitar soket gigi dapat menggunakan beberapa tipe bahan *bone graft*. Syarat yang harus dipenuhi oleh *bone graft* yang baik adalah dapat diterima tubuh atau biocompatible, memiliki sifat osteokonduksi, osteoinduksi, dan osteogenesis tulang. Osteokonduktif dan osteoinduktif adalah hal terpenting bagi biomaterial untuk mendorong pembentukan pertumbuhan jaringan tulang (Juodzbalys et al. 2019; Mohammed Al-Namnam et al. 2019).

Inovasi rekayasa jaringan tulang dikembangkan scaffold tiga dimensi seperti polimer yang dapat diserap oleh tubuh, mampu mempercepat penggantian jaringan yang rusak atau berfungsi sebagai matriks ekstraseluler, karena scaffold memungkinkan sel untuk berproliferasi, diferensiasi dan mempertahankan fungsi jaringan. Polimer yang saat ini banyak digunakan salah satunya adalah kitosan. Kitosan merupakan polisakarida alami yang disintesis dari kitin hasil ekstraksi dari cangkang hewan. Karakteristik kitosan yang diperoleh sangat bergantung pada efektivitas tahapan deasetilasi serta sumber kitin yang digunakan. Pada umumnya serangga yang dimanfaatkan sebagai sumber kitin adalah kumbang dan ulat sutra. Lalat *Black Soldier Fly* (BSF) (*Hermetia illucens*) yang juga dikenal sebagai lalat serdadu hitam merupakan lalat yang berasal dari Amerika dan larvanya telah banyak dimanfaatkan sebagai pengolah limbah khususnya limbah organik. Pada fase prepupa hingga menjadi pupa, lalat BSF dapat dimanfaatkan sebagai sumber kitin yang potensial karena eksoskeleton dari lalat BSF tersebut mengandung kitin sebanyak 35% yang terdapat pada shedding dan kepompong. BSF (*Hermetia illucens*) memiliki kandungan protein yang cukup tinggi sekitar 40 – 50 %. Penyembuhan jaringan keras dan lunak dimediasi oleh berbagai peristiwa intraseluler dan ekstraseluler yang diatur oleh sinyal protein (Um et al., 2017; Pudji et al., 2019; Sulistiawaty et al., 2022).

Kitosan merupakan amino polysaccharidae dengan rumus kimia *N-acetyl-D-glucosamine* yang

sama dengan *hyaluronic acid* yaitu golongan glycosaminoglycan (GAGs) yang melekat matriks ekstraseluler yang penting untuk penyembuhan luka. Kitosan bahan alami turunan dari kitin yang terdeasetilasi, memiliki sifat biokompatibel serta an osteointegrasi dan osteokonduktif yang tinggi untuk merangsang pembentukan urunkan aktifitas osteoklas sehingga cocok digunakan sebagai regenerasi tulang (8).



Kemampuan kitosan yang diterapkan dalam berbagai bidang industri modern, misalnya farmasi, biokimia, kosmetika, industri pangan, dan industri tekstil mendorong untuk terus dikembangkan berbagai penelitian yang menggunakan kitosan, termasuk melakukan modifikasi kitosan secara kimia atau fisik. Modifikasi fisik pada kitosan mencakup perubahan ukuran partikel atau butiran kitosan menjadi lebih kecil untuk pemanfaatan yang lebih luas, perkembangan modifikasi fisik dan kimiawi mengarah ke bentuk nanopartikel. Nanopartikel mempunyai keunggulan dibandingkan dengan material sejenis dalam ukuran besar (bulk) karena ukuran nano-partikel memiliki nilai perbandingan antara luas permukaan dan volume yang lebih besar jika dibandingkan dengan bahan sejenis dalam ukuran besar, sehingga nano-partikel bersifat lebih reaktif. Nanokitosan yang merupakan bagian terkecil dari kitosan (Bashir et al. 2022; Sam et al., 2022).

Secara kimiawi kitosan merupakan polisakarida linear yang memiliki rantai berupa β -(1,4)-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose yang strukturnya mirip glukosaminoglikan (GAG). GAG berperan penting dalam penyembuhan luka. GAG terdiri dari rantai polisakarida yang meliputi asam hialuronat, dermatan sulfat, kondroitin sulfat, heparin, heparan sulfat dan keratin sulfat. Asam hialuronat merupakan komponen utama dalam matriks ekstraseluler. Asam hialuronat adalah komponen GAG terbesar yang bertugas dalam menarik air dan jumlahnya meningkat pada jaringan yang rusak. Asam hialuronat menstimulasi produksi sitokin oleh makrofag, meningkatkan reepitelisasi dan angiogenesis. Ketika kitosan bertemu dengan sel radang akan melepaskan *N-acetyl-Dglucosamine* dan berikatan dengan reseptor utama pada makrofag serta memicu migrasi sel-sel radang ke daerah luka dan meningkatkan proliferasi sel-sel radang pada daerah luka tersebut. Semakin meningkat proliferasi dari sel-sel radang menyebabkan semakin banyak pula sitokin dan *growth factor* yang dilepaskan oleh sel-sel radang tersebut. Beberapa sitokin dan *growth factor* yang berperan penting dalam proses epitelisasi luka adalah dari EGF family yaitu EGF (*Epidermal Growth Factor*) dan HB-EGF (*Heparin Binding EGF*); FGF family yaitu KGF (*Keratinocyte Growth Factor*); dan TGF β 1 (*Transforming Growth Factor β 1*). Kitosan akan menurunkan produksi mediator sitokin proinflamasi yaitu IL-1, IL-6 dan TNF- α yang berperan dalam diferensiasi dan aktivasi osteoklas melalui RANKL (*Receptor Activator of Nuclear κ B Ligand*), sehingga dapat menyebabkan pembentukan dan aktivitas osteoklas terganggu menurunkan tingkat resorpsi tulang, jumlah sel osteoklas mengalami penurunan dan pembentukan sel osteoblas meningkat (Zhang et al. 2017; Sam et al, 2022).

Respon inflamasi memuncak pada 24 hingga 48 jam pasca cedera dan dapat berlangsung hingga satu minggu atau 7 hari. Pada fase inflamasi, setelah 48 jam setelah terjadinya luka pencabutan, monosit akan berdeferensiasi menjadi makrofag. Turunan makrofag ditandai dengan heterogenitas dan plastisitas. Makrofag dapat diaktifkan (terpolarisasi) menjadi dua jenis makrofag utama yaitu makrofag tipe 1 proinflamasi (M1) dan makrofag tipe 2 antiinflamasi (M2). Fenotip makrofag dapat berubah tergantung pada tingkat sitokin dan memberikan pengaruh yang berbeda pada proses penyembuhan tulang setelah pemberian biomaterial. M1 dapat diidentifikasi melalui sekresi proinflamasi seperti TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, IL-23. M1 akan mendorong perkembangan limfosit Th1 dan menginduksi peradangan. Pada gilirannya M2 menghasilkan sitokin antiinflamasi Tingkat tinggi seperti IL-10, IL-4, IL-13 dan mengeluarkan factor angiogenik dan *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- β), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) dan *Fibroblast Growth Factor-Beta* (FGF- β). M2 mendorong perbaikan dan penyembuhan jaringan serta mendukung migrasi dan diferensiasi osteogenik sel punca mesenkim (Kazimierczak et al., 2021).

Penelitian Kazimierczak (2021) menyimpulkan pada hari ke 7 pemberian kitosan makrofag dapat melepaskan IL-10. IL-10 adalah sitokin antiinflamasi yang menekan sintesis sitokin proinflamasi seperti TNF- α , IL-1, IL-6. Peningkatan IL-10 dapat menyebabkan peningkatan Osteoprotegerin (OPG) dan peningkatan ekspresi RANKL yang diproduksi oleh sel osteoblas. OPG berfungsi untuk mencegah RANKL berikatan dengan RANK sehingga resorpsi tulang terhambat dan aposisi tulang alveolar (Kazimierczak et al. 2021).

Imad dan Asdar (2021) menyimpulkan gel kitosan yang dikombinasi dengan hambat produksi sitokin proinflamasi dan meningkatkan produksi BMP-2. Penelitian menyimpulkan gel kitosan yang disuntikkan telah ditemukan secara signifikan meningkatkan proliferasi osteoblasik sel-sel prekursor osteoblas tikus. Formulasi gel kitosan dapat meningkatkan aktivitas osteoblasik sel tulang dengan mengukur aktivitas



spesifik *Alkaline Phosphatase* (ALP) sel stroma sumsum tulang preosteoblas tikus. Sel osteoblas yang terbentuk dari osteoprogenitor akan mengekspresikan ALP, memproduksi protein kolagen terutama kolagen tipe I dan protein non-kolagen, seperti, *Osteocalcin* (OCN) dan *Osteopontin* (OPN) (Achmad et al. 2021, Sularsih, 2018).

Osteoblas merupakan sel yang berperan dalam meregulasi proses pembentukan tulang melalui ikatan dengan RANKL dan OPG. Osteoblas ketika berikatan dengan RANKL akan mengaktifasi preosteoklas menjadi osteoklas yang berperan dalam meresorpsi tulang. Osteoblas ketika berikatan dengan OPG akan merangsang maturasi osteoblas pembentukan osteosit yang berperan pada proses pembentukan tulang. Jaringan fibroblast juga akan menstimulir OPG untuk menghambat RANKL dan RANK dan memicu pertumbuhan FGF2. Ketika osteoblas meningkat dan RANKL menurun akan terjadi pembentukan tulang alveol baru (Zhang et al. 2017).

Namun, kitosan memiliki kelemahan seperti kekuatan mekanik yang rendah karena memiliki membran yang kaku dan rapuh serta kurangnya sisi aktif yang dapat meningkatkan fungsi kerja membran, untuk mengatasi kelemahan tersebut perlu dilakukan modifikasi salah satunya dengan bahan alami lainnya seperti *Demineralized Dentin Matrix* (DDM) yang berasal dari gigi manusia. Tulang dan dentin memiliki komposisi yang sama, yaitu 70% hidroksiapatit, 18% kolagen, 10% cairan tubuh, 2% protein non-kolagen. Pada tulang dan dentin, beberapa faktor pertumbuhan yang menyebabkan dentin dapat memicu osteoinduksi, osteokonduksi, dan pembentukan pembuluh darah (Gao et al. 2019; Nuraeni et al. 2021).

DDM adalah suatu bahan organik yang diperoleh dari dentin yang memiliki kemampuan osteogenic. Dentin merupakan bagian dari struktur gigi yang memiliki komposisi yang hampir sama dengan tulang yaitu terdiri dari kolagen (20%), hidroksiapatit (70%) dan cairan tubuh (10%) dalam berat volume. Dentin gigi manusia terdiri dari 70% bahan anorganik, 20% bahan organik dengan 90% dari kandungan organik dentin adalah kolagen tipe I dan *Bone Morphogenetic Protein* (BMP) serta 10% air. Struktur mikro dentin terdiri dari jaringan serat kolagen dan mengandung berbagai *growth factor*, seperti *Insulin Growth Factor-2* (IGF-2), *Bone Morphogenetic Protein* (BMP), *Tumor Growth Factor-β* (TGF-β), *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF) dan *Fibroblast Growth Factor* (FGF). DDM yang ditempatkan dalam soket pencabutan gigi bertujuan untuk mempertahankan kualitas tulang, meningkatkan dimensi vertikal dan horisontal tulang, dan membantu penyembuhan jaringan lunak. Beberapa penelitian lain dipublikasikan tentang penggunaan DDM dalam rekayasa jaringan. DDM merupakan bahan *bone graft* yang terdapat pada dentin gigi manusia. Keuntungan dari penggunaan material ini yaitu memiliki kemampuan osteokonduktif dan osteoinduktif, mengurangi penggunaan anestesi, efisiensi waktu operasi, mengurangi kehilangan lebih banyak darah dan tidak membutuhkan operasi pada bagian tubuh lain dari penderita (Kumala et al. 2021; Gao et al. 2019; Kabir et al. 2015).

Bone graft dapat diklasifikasikan yaitu autograft, allograft, xenograft. Bahan bone graft yang ideal harus memiliki potensi untuk mempertahankan sel tetap hidup, tidak menimbulkan reaksi imunologi, mudah didapat dan memberikan kekuatan pada daerah sekeliling tulang serta tidak menyebarkan penyakit. Autograft telah menjadi gold standard untuk prosedur regeneratif yang sukses karena dapat mendukung sifat osteogenik, osteoinduktif, dan osteokonduktif yang berhubungan dengan sel-sel preosteoblasik dalam graft, namun pengambilan tulang autograft dapat menyebabkan beberapa komplikasi, seperti kehilangan darah, pembentukan haematoma, fraktur, infeksi, mengganggu estetik dan (sakit) kronik pada tempat asal tulang tersebut diambil. Alternatifnya adalah menggunakan allograft. Allograft merupakan graft yang didapat dari individu lain dari spesies yang sama, seperti DDM, yang berasal dari gigi manusia yang diekstraksi. Bahan tooth graft dari gigi yang diekstraksi memiliki kemiripan substansi dengan tulang (Bariyah et al. 2016; Sohn et al. 2019; Gual-Vaqués et al. 2018).

DDM yang berasal dari gigi manusia, adalah bahan scaffold yang sangat baik dengan sifat bioaktif yang menarik untuk meningkatkan keberhasilan rekayasa jaringan tulang dan gigi. DDM telah



dalam penelitian kedokteran gigi karena mudah diperoleh dalam jumlah besar gigi dengan biaya yang murah. Tipe-tipe dari DDM antara lain, autograft, allograft, yang memiliki kemampuan osteokonduktif dan osteoinduktif. Autograft merupakan graft yang diambil dari pasien itu sendiri. Autograft memiliki kekurangan yaitu tulang bagian tubuh lainnya pada pasien yang sama melalui teknik operasi sehingga aplikasi klinis. Xenograft merupakan suatu material bone graft yang disumber dari

hewan akan tetapi memiliki kekurangan yaitu dapat menimbulkan reaksi autoimun serta dapat memungkinkan terjadinya transfer penyakit. Allograft merupakan bahan bone graft yang diambil dari pasien lain. Allograft tipe DDM memiliki kemampuan osteoinduktif dan osteokonduktif. Alloplast merupakan suatu material sintetik yang dapat digunakan untuk bone graft karena komposisinya hampir mirip dengan komposisi tulang. Suatu tingkat keberhasilan bone graft ditandai dengan adanya stimulasi osteoblas (Koga et al. 2016; Sohn et al. 2019).

Identifikasi hubungan langsung maupun tidak langsung setelah ekstraksi gigi yang dapat meningkatkan osteoblas dan menurunkan osteoklas melalui RANKL, OCN oleh OPG dapat dianalisis melalui Analisa jalur (*Path Analysis*). Analisis Jalur (*Path Analysis*) merupakan teknik statistik yang menguji hubungan antar variabel dalam sebuah model untuk mengidentifikasi hubungan sebab-akibat antara dua atau lebih variable, dengan menggunakan teknis statistic Analisa jalur memungkinkan pengukuran pengaruh langsung dan tidak langsung antar variable serta identifikasi hubungan kausal diantara mereka. Metode ini membantu menilai sejauh mana model sesuai dengan data yang diamati, memvalidasi teori-teori yang kompleks dan mengidentifikasi factor-faktor yang signifikan dalam menjelaskan fenomena yang diteliti (Iba, 2024).

Tindakan pencabutan gigi akan meninggalkan luka berupa soket gigi yang terbuka dan menyebabkan keadaan tidak nyaman bagi pasien, terutama pada pasien anak, sehingga perlu dibuat suatu bahan yang dapat mempercepat proses penyembuhan luka dengan memberikan suatu bahan untuk membantu proses penyembuhan melalui pemberian bahan yang berasal dari kombinasi nanokitosan *Black Soldier Fly (Hermetia illucens)* dan *Demineralize Dentin Matrix (DDM)* pada luka pasca ekstraksi gigi belum pernah dilakukan sehingga diharapkan menjadi biomaterial masa depan yang dapat mempercepat proses regenerasi tulang alveolar dengan melihat RANKL sehingga mencegah/menurunkan proses inflamasi dan mencegah resorpsi tulang alveol serta melihat OPG, Osteocalcin yang menstimulasi aktifitas ostoblast pada regenerasi tulang alveolar dan melihat jalur mana yang paling dominan dalam mempercepat regenerasi tulang alveolar melalui OPG yang dapat meningkatkan osteoblas dan menurunkan osteoklas yang merupakan formasi dalam regenerasi tulang alveolar.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah pemberian kombinasi nanokitosan pupa *Black Soldier Fly (Hermetia illucens)* dan *Demineralized Dentin Matrix (DDM)* dapat menurunkan ekspresi RANKL.
2. Apakah pemberian kombinasi nanokitosan pupa *Black Soldier Fly (Hermetia illucens)* dan *Demineralized Dentin Matrix (DDM)* dapat menurunkan jumlah osteoklas.
3. Apakah pemberian kombinasi nanokitosan *Black Soldier Fly (Hermetia illucens)* dan *Demineralized Dentin Matrix (DDM)* dapat meningkatkan ekspresi OPG.
4. Apakah pemberian kombinasi nanokitosan *Black Soldier Fly (Hermetia illucens)* dan *Demineralized Dentin Matrix (DDM)* dapat meningkatkan ekspresi OCN.
5. Apakah pemberian kombinasi nanokitosan *Black Soldier Fly (Hermetia illucens)* dan *Demineralized Dentin Matrix (DDM)* dapat meningkatkan jumlah osteoblas.
6. Apakah pemberian kombinasi nanokitosan *Black Soldier Fly (Hermetia illucens)* dan *Demineralized Dentin Matrix (DDM)* dapat meningkatkan rasio OPG/RANKL sehingga mempercepat proses *bone healing*
7. Bagaimana analisa jalur pemberian kombinasi nanokitosan *Black Soldier Fly (Hermetia illucens)* dan *Demineralized Dentin Matrix (DDM)* melalui OPG dalam menurunkan osteoklas dan meningkatkan osteoblas sehingga mempercepat proses *bone healing*.



ium

ensi pemberian kombinasi nanokitosan pupa *Black Soldier Fly (Hermetia illucens)* dan *Dentin Matrix (DDM)* sebagai bahan alternatif regenerasi tulang alveol.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Menganalisis perbedaan penurunan ekspresi RANKL dan Osteoklas (OK) pada soket pencabutan *Cavia Cobaya* antara kelompok yang diberikan kombinasi nanokitosan pupa *Black Soldier Fly (Hermetia illucens)* dan *Demineralized Dentin Matrix (DDM)*, terhadap kelompok kontrol.
2. Menganalisis perbedaan peningkatan ekspresi OPG, Osteocalcin (OCN) dan Osteoblas (OB) pada soket pencabutan *Cavia Cobaya* antara kelompok yang diberikan kombinasi nanokitosan *Black Soldier Fly (Hermetia illucens)* dan *Demineralized Dentin Matrix (DDM)* terhadap kelompok kontrol.
3. Menganalisis rasio OPG/RANKL pada soket pencabutan *Cavia Cobaya* antara kelompok yang diberikan kombinasi nanokitosan pupa *Black Soldier Fly (Hermetia illucens)* dan *Demineralized Dentin Matrix (DDM)*, terhadap kelompok kontrol.
4. Menganalisis jalur mana yang dominan dalam regenerasi tulang alveol dengan menggunakan kombinasi nanokitosan *Black Soldier Fly (Hermetia illucens)* dan *Demineralized Dentin Matrix (DDM)*.

1.4 Kegunaan Penelitian

1.4.1 Manfaat Pengembangan Ilmu

1. Memberikan kontribusi keilmuan dalam mengatasi defek tulang alveolar pasca pencabutan dan setelah pemberian kombinasi nanokitosan *Black Soldier Fly (Hermetia illucens)* dan *Demineralized Dentin Matrix (DDM)*.
2. Memberikan penjelasan dasar mekanisme kerja kombinasi nanokitosan *Black Soldier Fly (Hermetia illucens)* dan *Demineralized Dentin Matrix (DDM)* dalam menginduksi ekspresi RANKL, OPG dan Osteocalcin (OCN) pada regenerasi tulang alveol.

1.4.2 Manfaat Praktis

Mendapatkan produk biomaterial yang dapat mencegah resorpsi dan biogenic stimulator pertumbuhan tulang alveol baru setelah pencabutan gigi pada anak maupun dewasa dengan pemanfaatan limbah gigi manusia dan pemanfaatan pupa BSF dalam regenerasi tulang alveol pasca pencabutan gigi.

1.5 Ruang Lingkup Penelitian

Penelitian mengenai potensi kombinasi nanokitosan pupa *Black Soldier Fly (Hermetia illucens)* dan *Demineralized Dentin Matrix (DDM)* sebagai bahan alternatif regenerasi tulang alveol melalui ekspresi RANKL, OPG dan OCN yang dilakukan secara *in vivo* menggunakan sampel marmut (*Cavia cobaya*) berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi kemudian diekstraksi gigi insisif mandibula kirinya lalu diberikan bahan gel nanokitosan pupa BSF dan gel kombinasi nanokitosan pupa BSF+DDM dan dilihat ekspresi RANKL, OPG dan OCN di hari ke-7, -14, dan -21.



CHAPTER 2

Hasil Analisis Jalur pada Penanda Tulang yang Mempengaruhi Percepatan Remodeling Tulang

Abstrak

Latar Belakang: Remodeling tulang pasca-pencabutan gigi dapat dipengaruhi oleh osteoblas, Osteoprotegerin (OPG), osteoklas, *Receptor Activator of Nuclear Factor-Kappa B Ligand* (RANKL), dan Osteokalsin (OCN). Nanokitosan, dengan rumus kimia N-asetil-D-glukosamin, yang struktur polimernya mirip dengan gugus glikosaminoglikan (GAG), merupakan makromolekul matriks ekstraseluler yang penting untuk penyembuhan luka. DDM mengandung banyak faktor pertumbuhan tulang. Kami menguji potensi kombinasi nanokitosan pupa *Black Soldier Fly* (BSF) dan *Demineralized Dentin Matrix* (DDM) untuk mempercepat remodeling tulang melalui analisis jalur osteoblas, OPG, OCN, osteoklas, dan RANKL.

Metode: Penelitian laboratorium menggunakan dua puluh tujuh sampel marmut jantan yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Gigi seri kiri bawah diekstraksi, kemudian diambil secara acak dan dibagi menjadi kelompok kontrol (C), yang diberi gel Polietilen glikol (PEG) sebagai plasebo dan dijahit dengan benang non-absorbable, kelompok perlakuan satu (T1) yang diberikan nanokitosan pupa BSF, dan kelompok perlakuan dua (T2) yang diberi kombinasi gel nanokitosan pupa BSF dan DDM, kemudian dijahit dengan benang non-absorbable. Sampel dieutanasia pada hari ke-7, ke-14, dan ke-21 untuk memeriksa osteoblas, OPG, OCN, osteoklas, dan RANKL. Data dianalisis menggunakan oneway ANOVA ($p < 0,05$). Analisis jalur dilakukan menggunakan model *goodness-of-fit* dan ukuran efek, menguji hipotesis bahwa OPG memiliki pengaruh langsung dan dominan terhadap RANKL dan OCN, yang menghasilkan peningkatan osteoblas dan penurunan osteoklas.

Hasil: Terdapat penurunan jumlah osteoklas, ekspresi RANKL, dan peningkatan jumlah osteoblas, OPG, dan ekspresi OCN antara kelompok C, T1 dan T2. Analisis oneway ANOVA menunjukkan perbedaan yang signifikan (0,000) ($p < 0,05$). Analisis jalur yang berkontribusi paling signifikan dalam mengurangi osteoklas dan meningkatkan osteoblas, sehingga mempercepat remodeling tulang, adalah OPG yang memengaruhi OCN (0,952), bukan OPG yang memengaruhi jalur RANKL (-0,001).

Kesimpulan: Kombinasi nanokitosan pupa BSF dan DDM memberikan dampak yang maksimal terhadap remodeling tulang, sehingga dapat digunakan sebagai bahan cangkok tulang alternatif untuk perawatan penyembuhan soket dan mempercepat regenerasi tulang alveolar.

Kata Kunci: *Black Soldier Fly* (BSF) (*Hermetia illucens*), Bone regeneration, *Demineralized Dentin Matrix* (DDM), Nanochitosan, *Path analysis*.

6.1 Pendahuluan

Pencabutan gigi merupakan perawatan yang paling umum dilakukan untuk karies gigi, penyakit periodontal, trauma, dan kondisi lain yang berpotensi menyebabkan defek tulang alveolar. Penyembuhan luka pasca-pencabutan melibatkan pemulihan jaringan keras pada tulang alveolar dan jaringan lunak, terutama epitel gingiva dan jaringan ikat (Ozer, 2024). Proses biokimia penyembuhan luka berkembang dalam beberapa fase (respons inflamasi, proliferasi sel, sintesis komponen matriks ekstraseluler, dan remodeling) yang dapat tumpang tindih seiring waktu. Secara klinis, kehilangan tulang pasca-pencabutan dapat berkisar antara 5 hingga 7 mm, dengan sekitar dua pertiga tulang hilang dalam tiga bulan pertama. Kehilangan tulang yang berlebihan dapat mengganggu kapasitas perbaikan diri tulang, sehingga membutuhkan bahan pendukung, seperti *bone graft*, untuk membantu



cegah infeksi, dan meningkatkan pertumbuhan tulang. Cangkok tulang yang baik beberapa kriteria: harus biokompatibel (ditoleransi dengan baik oleh tubuh) dan osteoinduktif, osteoinduktif, dan osteogenik. *Bone graft* dapat distimulasi oleh mengandung komponen osteoinduktif dan osteoinduktif. Selama penyembuhan cangkok tulang seperti allograf, xenograf, dan aloplas dapat memberikan dukungan cegah defek tulang, sehingga mempercepat proses remodeling tulang (Bono, 2019;

Compton, 2014). Dengan berbagai pilihan material *bone graft*, penelitian ini mengusulkan formulasi gel yang menggabungkan nanokitosan pupa *Black Soldier Fly* (BSF) dan *Demineralized Dentin Matrix* (DDM) sebagai alternatif *bone graft* yang menjanjikan untuk mendorong regenerasi tulang alveolar dan penyembuhan soket dengan mengurangi osteoklas dan RANKL sekaligus meningkatkan osteoblas, OPG, dan OCN, dengan OCN berperan sebagai faktor regulator utama (Juodzbalys, 2019; Gonzalez, 2016).

Salah satu metode untuk mempertahankan dimensi tulang adalah preservasi soket, yang dapat dicapai dengan menggunakan material *bone graft* (Bashir, 2022). Inovasi dalam rekayasa jaringan tulang telah menghasilkan pengembangan *scaffold* tiga dimensi, seperti polimer biodegradabel, yang dapat mempercepat penggantian jaringan yang rusak atau berfungsi sebagai matriks ekstraseluler. Kitosan merupakan salah satu polimer yang paling banyak digunakan. Kitosan merupakan polisakarida alami yang disintesis dari kitin yang diekstrak dari cangkang hewan. Aplikasi kitosan yang luas di berbagai bidang telah mendorong pengembangan berbagai penelitian yang memanfaatkan kitosan, termasuk modifikasi fisik yang melibatkan pengurangan ukurannya menjadi nanopartikel. Nanopartikel menawarkan keunggulan dibandingkan material serupa karena reaktivitasnya yang lebih tinggi (Sam, 2022; Loo, 2022). Namun, kitosan memiliki beberapa keterbatasan, termasuk kekuatan mekanik yang rendah, membran yang kaku dan rapuh, serta kurangnya situs aktif yang meningkatkan fungsionalitas membran. Untuk mengatasi keterbatasan ini, kitosan dapat dimodifikasi dengan menggabungkannya dengan material alami lainnya, seperti *Demineralized Dentin Matrix* (DDM), yang berasal dari gigi manusia. Tulang dan dentin memiliki komposisi yang sama, yaitu 70% hidroksiapatit, 18% kolagen, 10% cairan tubuh, dan 2% protein non-kolagen. Tulang dan dentin mengandung beberapa *growth factor* yang memungkinkan dentin menstimulasi osteoinduksi, osteokonduksi, dan pembentukan pembuluh darah. DDM telah banyak digunakan dalam penelitian kedokteran gigi karena tersedia dalam jumlah besar, berkualitas tinggi dan mudah didapat (Loo, 2022; Gao, 2019).

Eksoskeleton *Black Soldier Fly* (BSF) (*Hermetia illucens*) terdiri dari sekitar 35% kitin, yang terlihat selama tahap pupa. Dengan demikian, kitin merupakan sumber kitin dan dapat diubah menjadi kitosan yang menjanjikan. Baik fase perkembangan prapupa maupun pupa cocok untuk ekstraksi kitin karena adanya eksuvia yang terlepas dan selubung pupa yang kaya akan polisakarida. Selain itu, prapupa BSF menunjukkan konsentrasi tinggi asam amino esensial, termasuk lisin, leusin, dan valin, yang meningkatkan nilai gizi dan industrinya. Asam amino fungsional memainkan peran penting dalam mengatur remodeling tulang, karena asam amino memengaruhi jalur metabolisme utama yang penting untuk menjaga homeostasis tulang. Kitosan menunjukkan kapasitas pengikatan yang tinggi, membuatnya cocok untuk digunakan sebagai media penyerap dan penghantar obat, dan terdiri dari gugus amino-NH₂ dan gugus hidroksil(-OH). Kitosan adalah polisakarida kationik yang terdiri dari unit D-glukosamin dan N-asetil-D-glukosamin yang berulang. Sifat strukturalnya menyerupai asam hialuronat, suatu glikosaminoglikan (GAG) yang terdapat dalam matriks ekstraseluler. HA merupakan makromolekul kunci dalam perbaikan jaringan (Siddiqui, 2024; Zhang, 2017; Wang, 2024; Takeuchi, 2024).

Inovasi utama dari penelitian ini adalah pemanfaatan material NBSF dan DDM untuk meningkatkan proses remodeling tulang. Penelitian sebelumnya telah mengeksplorasi penggunaan kitosan dan nanokitosan; namun, aplikasinya dalam kombinasi dengan DDM belum diteliti. Sebagaimana dilaporkan oleh Zhang (2017), aplikasi kitosan memodulasi remodeling tulang dengan meningkatkan ekspresi OPG dan menurunkan kadar RANKL. Penelitian Gao (2019) menyimpulkan bahwa aplikasi DDM dapat mempercepat regenerasi tulang, karena dentin mengandung beberapa faktor pertumbuhan yang dapat merangsang osteoinduksi, osteokonduksi, dan pembentukan pembuluh darah (Gao, 2019; Zhang, 2017).



nya adalah beberapa penelitian sebelumnya telah menggunakan parameter : mengukur peningkatan osteoblas dan penurunan osteoklas, serta remodeling beberapa biomarker lain dalam remodeling tulang salah satunya adalah osteokalsin ini menggunakan pendekatan metodologis yang lebih komprehensif dengan sis jalur untuk mengevaluasi secara statistik efek langsung dan tidak langsung antara untuk menetapkan hubungan kausal. Kami menguji apakah OPG dapat

mengurangi RANKL dan meningkatkan OCN, sehingga meningkatkan aktivitas osteoblas dan mengurangi aktivitas osteoklas. Pendekatan ini membantu menentukan komponen-komponen yang relevan secara statistik yang mendasari peristiwa yang diteliti, memvalidasi kerangka teoritis yang kompleks, dan menilai tingkat pengaruh model yang diamati (Iba, 2024; Rajinikanth, 2024).

Penelitian ini bertujuan untuk menyelidiki efek gabungan nanochitosan pupa BSF dan DDM pada pelestarian soket setelah pencabutan gigi dengan menganalisis jalur biomolekuler yang melibatkan osteoblas, osteoklas, OPG, RANKL, dan OCN. Pertanyaan penelitian yang harus dijawab dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: (1) Apakah aplikasi kombinasi pupa nanochitosan Black Soldier Fly (BSF) dan Demineralized Dentin Matrix (DDM) meningkatkan jumlah osteoblas, OPG, dan osteokalsin sementara secara bersamaan mengurangi jumlah osteoklas dan ekspresi RANKL selama remodeling tulang pasca-ekstraksi? (2). Apa hubungan kausal antara OPG, RANKL, dan OCN dalam modulasi keseimbangan aktivitas osteoblas dan osteoklas selama proses remodeling? Penelitian ini memberikan alternatif baru dan inovatif untuk bahan *bone graft* dan menawarkan pemahaman terintegrasi tentang mekanisme biomolekuler dari regenerasi tulang yang dipercepat. Temuan ini diharapkan dapat berkontribusi pada pengembangan perancah rekayasa jaringan berbasis biomaterial alami, yang lebih efektif dan mudah diakses untuk aplikasi klinis dalam kedokteran gigi, khususnya dalam upaya pelestarian soket, dan untuk mempercepat penyembuhan tulang alveolar.

6.2 Metode Penelitian

6.2.1 Persetujuan etik dan persetujuan untuk berpartisipasi

Seluruh prosedur penelitian yang menggunakan sampel marmut telah disetujui oleh Komite Etik Bersama Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hasanuddin dan Rumah Sakit Gigi dan Mulut Universitas Hasanuddin, Makassar, Indonesia (Nomor Persetujuan 0108/PL.09/KEPK FKG-RSGM UNHAS/2023). Seluruh metode penelitian dilakukan sesuai dengan pedoman dan peraturan yang berlaku.

6.2.2 Desain Studi

Penelitian ini menggunakan *post-test-only control group design* dengan sampel delapan belas marmut jantan (*Cavia cobaya*). Pencabutan gigi seri mandibula kiri dilakukan, dan subjek dibagi menjadi dua kelompok: kelompok kontrol (C), yang diaplikasikan gel polietilen glikol (PEG) sebagai plasebo dan dijahit dengan *non-absorbable sutures*; dan kelompok perlakuan (T) diaplikasikan gel kombinasi nanokitosan pupa BSF dan DDM kemudian dijahit dengan *non-absorbable sutures*. Spesimen dieutanasia pada hari ke-7, ke-14, dan ke-21 untuk analisis histologis osteoblas, osteoklas, dan pemeriksaan imunohistokimia (IHC) tingkat ekspresi OPG, OCN, dan RANKL. Data dianalisis menggunakan oneway ANOVA ($p < 0,05$). Selain itu, analisis jalur dilakukan menggunakan model kesesuaian untuk menilai efek langsung dan dominan, khususnya menganalisis bagaimana OPG memengaruhi kadar RANKL dan OCN. Hasil ini bertujuan untuk menentukan apakah aktivitas osteoblas meningkat dan aktivitas osteoklas menurun setelah perawatan, sehingga memberikan wawasan tentang proses regenerasi tulang di lokasi pasca-ekstraksi.

6.2.3 Ukuran sampel

Penelitian ini melibatkan marmut jantan (*Cavia cobaya*) yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Jumlah sampel yang akan diteliti dihitung dengan menggunakan rumus analisis komparatif isangan lebih dari satu kali pengukuran, sebagai berikut:



$$n = 2 \frac{(Z\alpha + Z\beta)^2 s^2}{((x_1 - x_2)^2)}$$

$$n = 2 \frac{(2,92)^2 (1,52)^2}{(6,77 - 2,33)^2}$$

$$n = 1,99$$

$$n = 2$$

Keterangan:

- n : Besar sampel
 Z_{α} : Deviat baku alfa (kesalahan tipe I)
 Z_{β} : Deviat baku beta (kesalahan tipe II)
 S : Simpang baku dari selisih antar kelompok
 $X_1 - X_2$: Selisih minimal rerata yang dianggap bermakna

Perhitungan Besar Sampel:

- Kesalahan tipe I ditetapkan sebesar 5%, hipotesis dua arah, sehingga Z_{α} : 1,96.
- Kesalahan tipe II ditetapkan sebesar 5%, sehingga Z_{β} : 1,64
- Selisih rerata minimal yang dianggap bermakna ($X_1 - X_2$) = 4,44
- Simpang baku (S): 1,52 (Dahlan, 2010)

Jumlah hewan coba masing-masing kelompok perlakuan adalah sebesar 2 ekor, untuk setiap kelompok perlakuan dengan perhitungan sebagai berikut: kemungkinan hewan coba mati (f) $\pm$ 10% sehingga dikalikan dengan $1/1-f$

$$n' = \frac{n}{1-f}$$

$$n' = \frac{2}{1-10\%}$$

$$n = 2,2 \approx 3$$

Keterangan:

- n = jumlah replikasi sesudah koreksi
 r = replikasi
 f = angka kemungkinan hewan coba mati (10%)

Hasil perhitungan rumus diatas maka didapatkan jumlah replikasi minimal tiap kelompok adalah 3 ekor marmut. Penelitian ini menggunakan 3 ekor marmut pada 9 kelompok sehingga secara keseluruhan menjadi 27 ekor marmut. Sampel dibagi secara acak menjadi dua kelompok: kelompok kontrol (C) (n = 9) dan kelompok perlakuan satu (T1) dan kelompok perlakuan dua (T2) (n = 9).

6.2.4 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Sampel marmut diperoleh dari Rumah Sakit Hewan Pendidikan Universitas Airlangga. Hewan-hewan tersebut diikutsertakan dalam penelitian jika dinyatakan sehat oleh dokter hewan. Hewan-hewan yang diikutsertakan dalam penelitian: marmut jantan pada saat percobaan berusia 2,5 hingga 3 bulan, dengan berat 200-300 gram, dan digunakan. Hewan-hewan diikutsertakan jika ada marmut yang mati selama periode aklimatisasi 7 hari sebelum percobaan.

Marmut berfungsi sebagai model hewan percobaan yang sesuai karena kemiripan fisiologis dan reproduksinya dengan mamalia, serta respons imunologis dan patologisnya yang sebanding dengan manusia. Gigi seri mandibula dipilih untuk diekstraksi karena lebih panjang dan lebih besar daripada gigi rahang atas, sehingga memudahkan untuk dilakukan pencabutan. Marmut tidak memiliki molar, sehingga terdapat diastema antara gigi anterior dan posterior. Diastema anterior dan posterior serta tulang rahang yang lebih padat memudahkan akses ke gigi 4).



6.2.5 Persiapan Gel Nanokitosan dan DDM

Pupa BSF diperoleh dari peternakan BSF CV maggo banua di Kalimantan Selatan, Indonesia, dan kemudian diolah menjadi kitosan. Kitosan pupa BSF diproduksi melalui tahapan demineralisasi, deproteinisasi, dan depigmentasi untuk menghasilkan kitin, diikuti dengan proses deasetilasi yang mengubah kitin menjadi kitosan. Kitosan yang dihasilkan mencapai tingkat deasetilasi 80%, yang menegaskan kemurniannya yang tinggi. Kitosan dikonversi menjadi nanokitosan menggunakan pengaduk magnetik untuk menghasilkan partikel bulat berukuran 204,9 nm. DDM dibuat dari akar gigi manusia yang sudah dilakukan pencabutan dari soket alveolar dipisahkan dari pulpa dan saluran akar serta sementum kemudian di haluskan dengan *Planetary Ball Mill* (Tencan, Jepang) untuk mendapatkan partikel halus, kemudian dilakukan proses demineralisasi dan pengeringan beku (KFD-P F Series, Pilot Freeze Dryers, Korea) dalam kondisi vakum <20 Pa dan suhu (-80°C) hingga beku, kemudian dikeringkan selama 18-24 jam hingga kadar air tersisa 5% dan disterilkan menggunakan sinar gamma. Preparat gel diaplikasikan pada soket setelah ekstraksi gigi dengan mencampurkan serbuk nanokitosan pupa BSF dan DDM (rasio 50:50) dengan polietilen glikol (PEG) 400 dan PEG 4000 hingga homogen.

Pencampuran kombinasi PEG 400 dan PEG 4000 dibuat dengan perbandingan 80%:20%. Total kombinasi PEG yang dibutuhkan adalah 25 gram, maka dibutuhkan 20gram PEG 400 dan 5gram PEG 4000. PEG 4000 (berbentuk padat) dilelehkan dalam mortal porcelen diatas waterbath dengan suhu sekitar 80°C kemudian tambahkan PEG 400 (berbentuk cairan). Kedua bahan tersebut diaduk hingga rata atau homogen. Kemudian mortal diturunkan dari waterbath dan diaduk sampai mengental atau terbentuk cairan pasta. Campurkan nanokitosan pupa BSF dan DDM yang telah ditimbang sedikit demi sedikit aduk hingga homogen, lalu pindahkan bahan untuk dimasukkan kedalam pot palstik steril dan diberi label masing-masing (Nareswari, 2017; Dewi et.al. 2024).

6.2.6 Prosedur Eksperimen

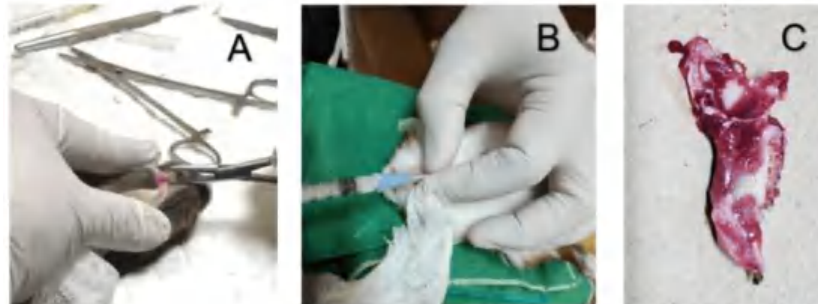
Marmut yang digunakan dalam penelitian ini akan diaklimatisasi terlebih dahulu di lingkungan laboratorium dengan menjaga suhu kandang ideal untuk marmut, yaitu 20-26°C. Selama penelitian, marmut akan diberi pakan standar berupa sayuran yang disuplemen dengan vitamin C dan vitamin lainnya, serta 20-35gram serat kasar per hari. Duapuluh tujuh marmut jantan disuntik secara intramuskular dengan ketamin (Bernofarm, Indonesia) (50 mg/kg berat badan) dan xylazine (CXBT & ShowVet, Henan, Tiongkok) (5 mg/kg berat badan), diikuti dengan pencabutan gigi seri mandibula kiri. Pada kelompok C, soket diaplikasikan dengan gel PEG menggunakan spuit plastik dan kemudian dijahit menggunakan benang non absorbable silk. Pada kelompok T1 soket pencabutan diaplikasikan dengan nanokitosan pupa BSF dan kemudian dijahit menggunakan benang non absorbable silk. Pada kelompok T2 soket pencabutan diaplikasikan kombinasi nanokitosan pupa BSF dan DDM menggunakan spuit plastik hingga luka terisi, diikuti dijahit dengan benang non absorbable silk. Setiap kelompok dieutanasia pada hari ke-7, ke-14, dan ke-21 setelah penelitian. Proses eutanasia dimulai dengan suntikan ketamin intraperitoneal pada dosis letal (4 kali dosis anestesi atau 0,4 mL/400gram berat badan), diberikan di daerah perut bawah sampai marmut mati. Setelah eutanasia, sampel jaringan dikumpulkan dengan memotong mandibula di daerah soket ekstraksi, secara vertikal sepanjang sisi mesial dan distal (Yuza, 2014). Tulang alveolar diambil dari daerah soket setelah pencabutan gigi untuk menyiapkan blok parafin dan spesimen slide, yang kemudian digunakan untuk menilai proses regenerasi tulang (Gambar 6.1). Setelah eutanasia, marmut dikubur. Tubuh hewan terlebih dahulu dibersihkan secara menyeluruh sebelum dikubur pada kedalaman 25 hingga 75 cm (Yuza, 2014).



logis

berikut dinilai: jumlah osteoblas dan osteoklas, ekspresi RANKL, OPG, dan OCN. Patologis dilakukan menggunakan pewarnaan Hematoksilin dan Eosin (HE) untuk menilai keadaan osteoblas dan osteoklas serta mengkuantifikasi jumlahnya. Hal ini diikuti dengan imunohistokimia (IHC) untuk menilai jumlah osteoblas yang mengekspresikan

RANKL, OPG, dan OCN. Pewarnaan IHC dilakukan pada potongan jaringan tulang menggunakan antibodi monoklonal terhadap RANKL, OPG, dan OCN. Kuantifikasi osteoblas, osteoklas, dan tingkat ekspresi RANKL, OPG, dan OCN dilakukan menggunakan mikroskop cahaya (Olympus, Jepang) dengan perbesaran 400x di sepertiga apikal rongga gigi, dengan penghitungan yang diambil dari lima bidang pandang oleh peneliti, analis, dan spesialis patologi klinis.



Gambar 6.1. Prosedur marmut (A). Pencabutan gigi dengan needle holder (B). Pemasangan material menggunakan spuit plastik (C). Diseksi rahang bawah.

6.2.8 Analisis Statistik dan Analisis Jalur

Semua pengukuran osteoblas, osteoklas, OPG, RANKL, dan OCN ditabulasi dan dianalisis menggunakan oneway ANOVA dengan tingkat signifikansi ditetapkan pada $p < 0,05$. Selain itu, kesesuaian model, ukuran efek, dan pengujian hipotesis dilakukan untuk mengevaluasi efek langsung dan jalur dominan, khususnya memeriksa bagaimana OPG memengaruhi RANKL dan OCN melalui analisis jalur. Pendekatan ini bertujuan untuk menentukan efek peningkatan aktivitas osteoblas dan penurunan aktivitas osteoklas. Analisis jalur memungkinkan penilaian efek langsung dan tidak langsung antar variabel dan membantu mengidentifikasi hubungan sebab-akibat di antara variabel-variabel tersebut.

6.3 Hasil Penelitian

6.3.1 Perbandingan antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol

Dalam penelitian ini, data dikumpulkan dengan memeriksa jumlah osteoblas dan osteoklas serta tingkat ekspresi OPG, OCN, dan RANKL pada hari ke-7, ke-14, dan ke-21. Nilai rerata dan standar deviasi osteoblas, OPG, dan OCN lebih tinggi pada kelompok T dibandingkan kelompok C, sedangkan nilai RANKL dan osteoklas lebih rendah pada kelompok T dibandingkan kelompok C.

Penurunan jumlah osteoklas pada kelompok T2 pada hari ke-21 ($1,000 \pm 0,0000$) merupakan yang terendah di antara semua kelompok, sedangkan peningkatan jumlah osteoblas pada kelompok T2 pada hari ke-21 ($13,000 \pm 2,0000$) merupakan yang tertinggi dibandingkan kelompok C ($7,000 \pm 1,0000$) (Tabel 6.1). Berdasarkan oneway ANOVA, jumlah osteoblas, tingkat ekspresi OPG dan OCN, jumlah osteoklas, dan ekspresi RANKL pada hari ke-7, 14, dan 21 berbeda secara signifikan ($p < 0,05$), dengan nilai p sebesar 0,000 di semua kelompok.

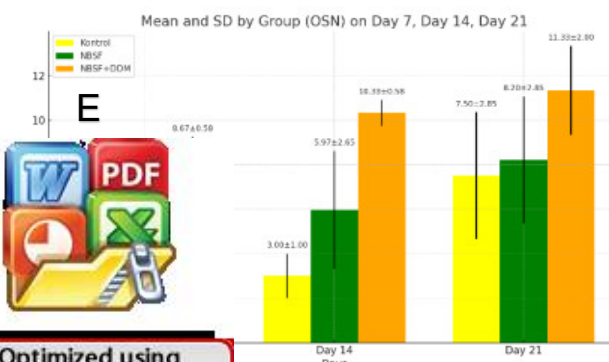
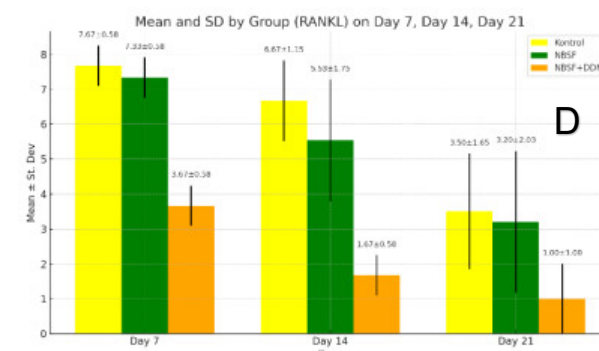
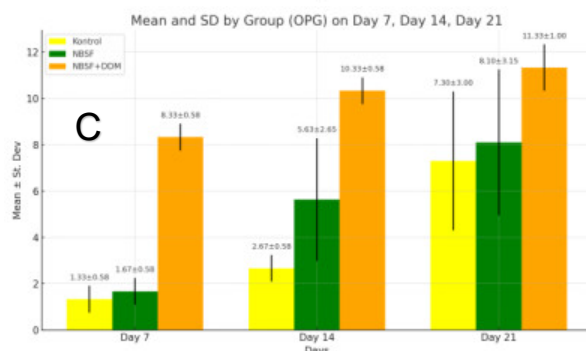
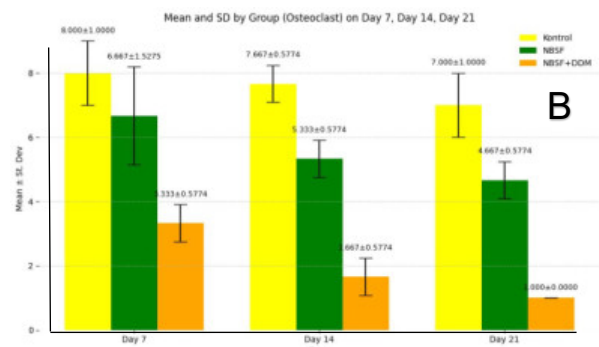
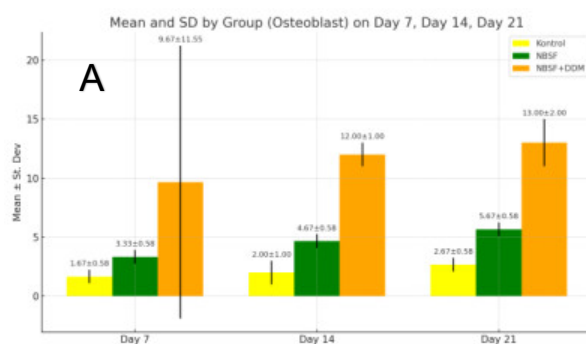
Berdasarkan hasil uji normalitas menggunakan uji Shapiro-Wilk dengan tingkat signifikansi $\alpha = 0,05$, semua variabel pada setiap hari pengukuran memiliki nilai signifikansi lebih besar dari 0,05, yang menunjukkan distribusi normal. Uji homogenitas menggunakan uji Levene juga menunjukkan nilai- p yang signifikan ($p < 0,05$), yang menunjukkan bahwa data memiliki varians heterogen di semua pengukuran. Oleh karena itu, data dianggap terdistribusi normal, dan analisis statistik selanjutnya akan menggunakan uji ANOVA Satu Arah parametrik. Hasil ANOVA Satu Arah menunjukkan signifikan secara statistik ($p < 0,05$) dalam jumlah osteoblas, ekspresi OPG dan OCN, dan ekspresi RANKL pada hari ke-7, ke-14, dan ke-21 di semua kelompok, dengan



Tabel 6.1. Mean $\pm$ Standard deviasi dan signifikansi *Osteoblast*, *Osteoclast*, *OPG*, *RANKL*, dan *OCN*

	Group	Hari 7	Hari 14	Hari 21	P-value
Osteoblast	C	1.667 $\pm$ 0.5774	2.000 $\pm$ 1.0000	2.667 $\pm$ 0.5774	0.000*
	T1	3.333 $\pm$ 0.5774	4.667 $\pm$ 0.5774	5.667 $\pm$ 0.5774	
	T2	9.667 $\pm$ 11.547	12.000 $\pm$ 1.0000	13.000 $\pm$ 2.0000	
Osteoclast	C	8.000 $\pm$ 1.0000	7.667 $\pm$ 0.5774	7.000 $\pm$ 1.0000	0.000*
	T1	6.667 $\pm$ 1.5275	5.333 $\pm$ 0.5774	4.667 $\pm$ 0.5774	
	T2	3.333 $\pm$ 0.5774	1.667 $\pm$ 0.5774	1.000 $\pm$ 0.0000	
OPG	C	1.333 $\pm$ 0.5774	2.667 $\pm$ 0.5774	7.300 $\pm$ 3.0000	0.000*
	T1	1.667 $\pm$ 0.5774	5.633 $\pm$ 2.6502	8.100 $\pm$ 3.1512	
	T2	8.333 $\pm$ 0.5774	10.333 $\pm$ 0.5774	11.333 $\pm$ 1.000	
RANKL	C	7.667 $\pm$ 0.5774	6.667 $\pm$ 1.1547	3.500 $\pm$ 1.6523	0.000*
	T1	7.333 $\pm$ 0.5774	5.533 $\pm$ 1.7474	3.200 $\pm$ 2.0298	
	T2	3.667 $\pm$ 0.5774	1.667 $\pm$ 0.5774	1.000 $\pm$ 1.0000	
OCN	C	1.667 $\pm$ 0.5774	3.000 $\pm$ 1.0000	7.500 $\pm$ 2.8513	0.000*
	T1	2.333 $\pm$ 0.5774	5.967 $\pm$ 2.6502	8.200 $\pm$ 2.8513	
	T2	8.667 $\pm$ 0.5774	10.333 $\pm$ 0.5774	11.333 $\pm$ 2.0000	

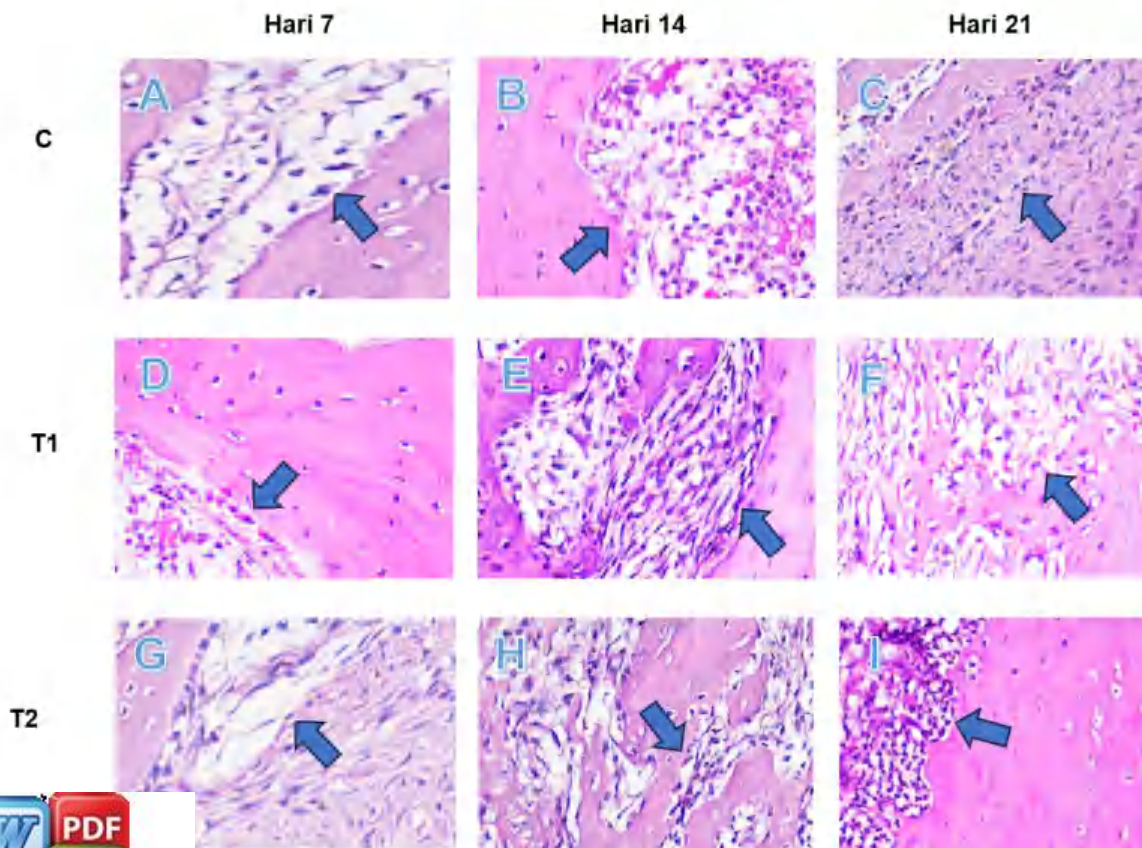
*significant = alpha = 5%



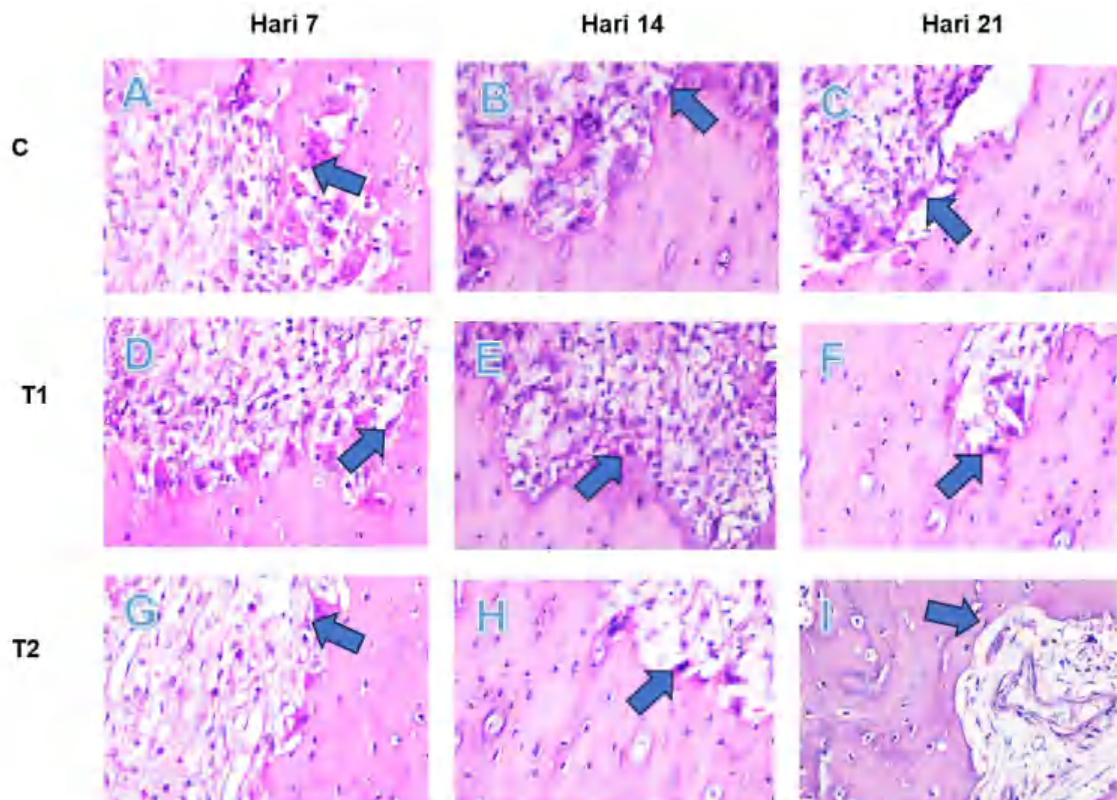
Gambar 6.2. Grafik hasil pengukuran: (A) jumlah sel osteoblast; (B) ekspresi OPG; (C) ekspresi OCN; (D) jumlah osteoklas; (E) ekspresi RANKL pada hari ke-7, 14 dan 21.

6.3.2 Histologi dan imunohistokimia

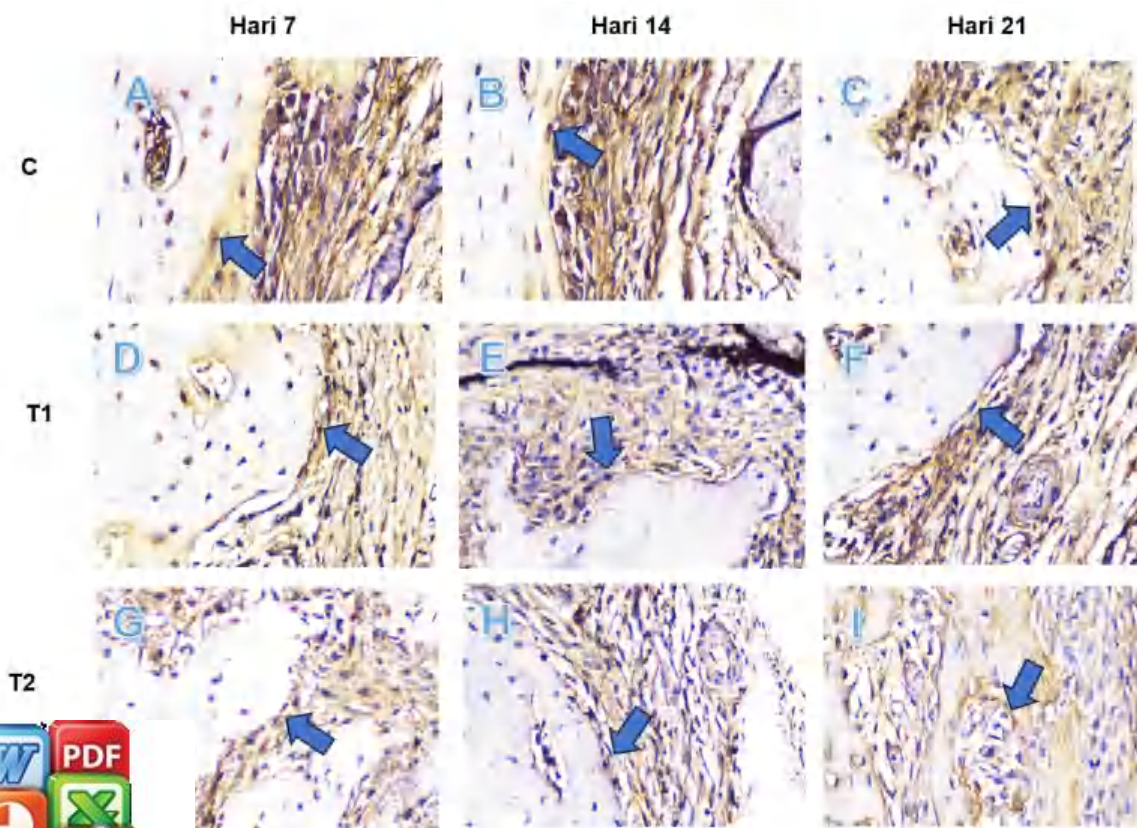
Berdasarkan pemeriksaan histologis menggunakan pewarnaan HE, yang diamati secara berurutan dari kiri ke kanan dalam pola zig-zag dimulai dari bawah ke atas, Gambar 6.3 menunjukkan bahwa jumlah osteoblas lebih tinggi pada kelompok T2 dibandingkan kelompok C dan kelompok T1. Setelah pencabutan gigi, osteoblas tampak sebagai sel kuboid dengan inti tunggal berwarna ungu yang terletak di permukaan matriks tulang di sekitar soket. Pewarnaan HE menunjukkan jumlah osteoklas yang lebih banyak pada kelompok C dibandingkan kelompok T1 dan kelompok T2 (Gambar 6.4). Setelah pencabutan gigi, osteoklas tampak sebagai sel besar dan motil dengan beberapa inti berwarna ungu kemerahan yang terletak di sekitar soket. Gambar 6.5 menunjukkan ekspresi RANKL pada osteoblas, sebagaimana terungkap melalui pewarnaan IHC menggunakan antibodi anti-RANKL monoklonal. Sel berwarna cokelat lebih banyak terdapat di sekitar soket pasca-pencabutan pada kelompok C dibandingkan kelompok T1 dan kelompok T2. Seperti ditunjukkan pada Gambar 6.6, ekspresi OPG oleh osteoblas, yang dideteksi melalui pewarnaan IHC dengan antibodi anti-OPG monoklonal, menunjukkan jumlah sel berwarna cokelat yang lebih banyak pada kelompok T2 dibandingkan kelompok T1 dan kelompok C di sekitar soket. Seperti ditunjukkan pada Gambar 6.7, ekspresi OCN oleh osteoblas, yang diperiksa melalui pewarnaan IHC dengan antibody monoklonal anti-OCN, menunjukkan jumlah sel berwarna cokelat yang lebih banyak pada kelompok T2 dibandingkan kelompok T1 dan kelompok C di sekitar soket pasca-ekstraksi.



ogis sel osteoblast pada kelompok C, Kelompok T1 dan kelompok T2 hari ke-7, -14 an tulang alveolar pada daerah socket pasca pencabutan gigi dengan pembesaran

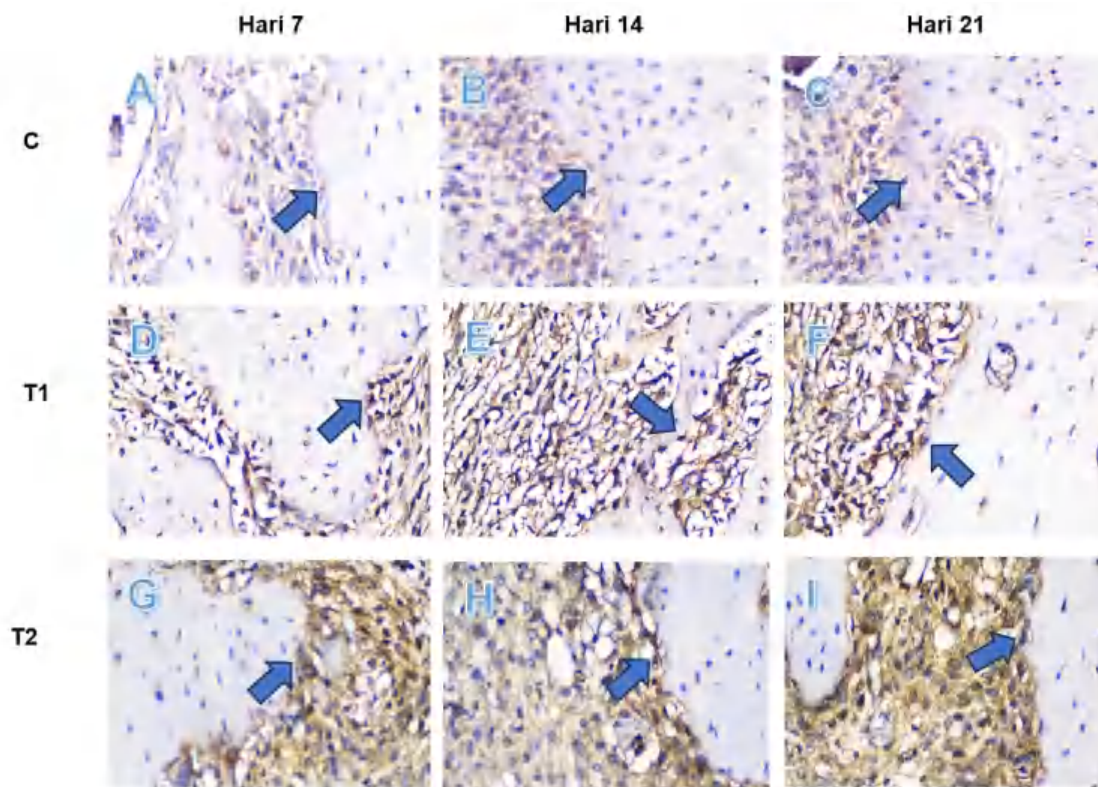


Gambar 6.4. Histologis sel osteoklast pada kelompok C, kelompok T1, dan kelompok T2 hari ke-7, -14 dan -21 pada sediaan tulang alveolar pada daerah socket pasca pencabutan gigi dengan pembesaran 400x

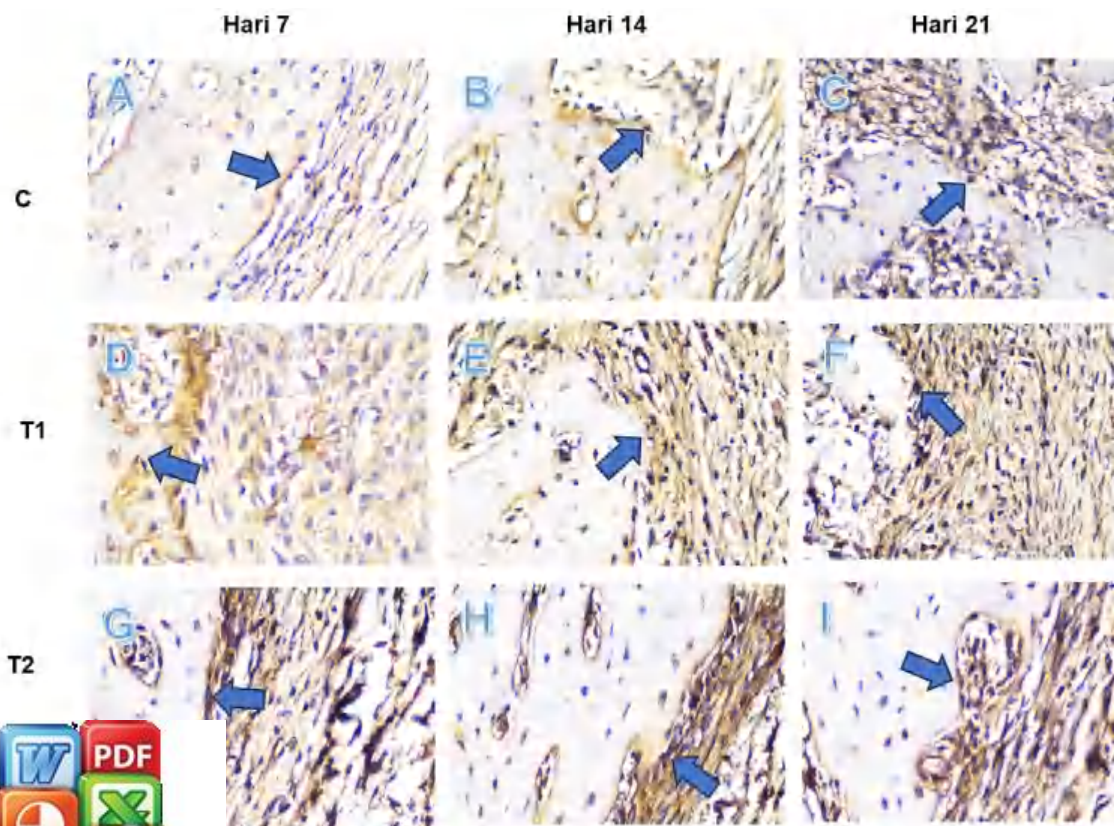


ogis ekspresi RANKL pada kelompok C, kelompok T1, dan kelompok T2 hari ke-7, sediaan tulang alveolar pada daerah socket pasca pencabutan gigi dengan





Gambar 6.6. Histologis ekspresi OPG pada kelompok C, kelompok T1, dan kelompok T2 hari ke-7, -14 dan -21 pada sediaan tulang alveolar pada daerah socket pasca pencabutan gigi dengan pembesaran 400x.



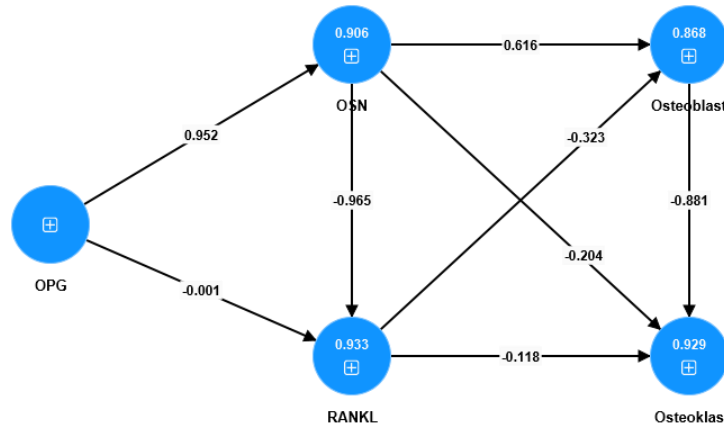
ogis ekspresi OCN pada kelompok C, kelompok T1, dan kelompok T2 hari ke-7, -sediaan tulang alveolar pada daerah socket pasca pencabutan gigi dengan



6.3.3 Analisis Jalur Mediator dalam Remodeling Tulang

Analisis jalur digunakan untuk menganalisis efek langsung dan tidak langsung dari peningkatan jumlah osteoblas. Analisis jalur dilakukan menggunakan AMOS 24. Model yang dikembangkan harus memenuhi kriteria kesesuaian, yang dicapai dengan memasukkan model dan data yang digunakan dalam AMOS (Gambar 6.8).

Model analisis jalur yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:



Gambar 6.8. Struktur model analisa jalur

Goodness of fit Model digunakan untuk mengetahui besarnya kemampuan variabel dependent (OPG, Osteoblas, osteoklas) menjelaskan keragaman variabel independent (OCN, RANKL), atau dengan kata lain untuk mengetahui besarnya kontribusi variabel dependen terhadap variabel independen. *Goodness of fit Model* dalam analisis PLS dilakukan dengan menggunakan koefisien determinasi (R-Square) dan Q-Square predictive relevance (Q^2).

Tabel 6.2. Hasil *Goodness of Fit Model*

<i>Goodness of fit model</i>	R-Square
OCN	0.906
RANKL	0.933
Osteoblast	0.868
Osteoklas	0.929
Q^2 Osteoklas	0.999

Berdasarkan table 6.2 menunjukkan kontribusi OPG terhadap OCN sebesar (0.906) 90.6%, sedangkan sisanya sebesar 9.4% merupakan kontribusi variabel lain yang tidak dibahas dalam penelitian ini. kontribusi OPG dan OCN terhadap RANKL sebesar (0.933) 93.3%, sedangkan sisanya sebesar 6.7% merupakan kontribusi variabel lain yang tidak dibahas dalam penelitian ini. Kontribusi OCN, RANKL, dan osteoblast terhadap osteoklas sebesar (0.929) 92.9%, sedangkan sisanya sebesar 7.1% merupakan kontribusi variabel lain yang tidak dibahas dalam penelitian ini. Kontribusi OPG, OCN, RANKL, dan osteoblast terhadap osteoklas secara keseluruhan sebesar (0.999) 99.99%, sedangkan sisanya sebesar 0.01% merupakan kontribusi variabel lain yang tidak dibahas dalam penelitian ini.

Pengaruh OPG, osteoklas, osteoblas terhadap RANKL dan OCN dapat diketahui melalui effect size, dimana rerata effect size dengan nilai 0.02-0.15 memiliki pengaruh yang kecil, nilai 0.15-0.35 memiliki pengaruh yang cukup besar, nilai >0.35 memiliki pengaruh yang besar, sedangkan pengujian hipotesis pengaruh langsung digunakan untuk menguji ada tidaknya pengaruh secara langsung OPG, terhadap RANKL dan OCN. Kriteria pengujian menyatakan bahwa apabila p-value $\leq$ 0.05 (alpha = 5%) maka dinyatakan adanya pengaruh yang signifikan. Hasil uji hipotesis terdapat pada tabel 6.3.



Tabel 6.3. Hasil tingkat pengaruh OPG, *osteoblast*, osteoklas dan RANKL, OCN

Pengaruh antar variabel	Effect size	Path Coefficient	P Values
OPG OCN	9.612	0.952	0.000*
OPG RANKL	5.446	-0.001	0.997
OCN RANKL	1.304	-0.965	0.000*
OCN Osteoblas	6.216	0.616	0.018*
OCN Osteoklas	0.033	-0.204	-0.456*
RANKL Osteoblast	0.053	-0.323	0.210
RANKL Osteoklas	3.741	-0.118	0.631
Osteoblast Osteoklas	1.431	-0.888	0.000*

Keterangan:

*signifikan = $\alpha = 5\%$

Berdasarkan table 6.3 pada nilai *effect size* pengaruh OPG terhadap OCN sebesar 9.612, hal ini berarti OPG memiliki pengaruh yang besar terhadap OCN. Pengaruh OPG terhadap RANKL sebesar 5.446, hal ini berarti OPG memiliki pengaruh yang besar terhadap RANKL. Pengaruh OCN terhadap RANKL sebesar 1.304, hal ini berarti OCN memiliki pengaruh yang besar terhadap RANKL. Pengaruh OCN terhadap osteoklas 0.033, hal ini berarti OCN memiliki pengaruh yang kecil terhadap osteoklas. Pengaruh OCN terhadap osteoblas sebesar 6.216, hal ini berarti OCN memiliki pengaruh yang besar terhadap osteoblast. Pengaruh RANKL terhadap osteoblast sebesar 0.053, hal ini berarti RANKL memiliki pengaruh yang kecil terhadap osteoblast. Pengaruh RANKL terhadap osteoklas sebesar 3.741, hal ini berarti RANKL memiliki pengaruh yang besar terhadap osteoklas. Pengaruh osteoblast terhadap osteoklas sebesar 1.431, hal ini berarti osteoblast memiliki pengaruh yang besar terhadap osteoklas.

Pada pengujian hipotesa pengaruh langsung pada table 6.3 menunjukkan pengaruh OPG terhadap OCN sebesar 0.952 yang menunjukkan OPG memiliki pengaruh yang searah (positif) terhadap OCN. Dengan demikian, OPG yang semakin tinggi akan meningkatkan OCN, sebaliknya OPG yang semakin rendah akan menurunkan OCN. Pengaruh OPG terhadap OCN menghasilkan p-value sebesar 0.000 ($p < 0.05$) Hal ini berarti terdapat pengaruh yang signifikan OPG terhadap OCN.

Pengaruh OPG terhadap RANKL sebesar -0.0001 yang menunjukkan OPG memiliki pengaruh yang berlawanan (negatif) terhadap RANKL. Dengan demikian, OPG yang semakin tinggi akan menurunkan RANKL, sebaliknya OPG yang semakin rendah akan meningkatkan RANKL. Persamaan pada table 2 menginformasikan bahwa pengaruh OPG terhadap RANKL menghasilkan p-value sebesar 0.997. Hal ini berarti terdapat pengaruh yang tidak signifikan OPG terhadap RANKL.

Pengaruh OCN terhadap RANKL sebesar -0.965 yang menunjukkan OCN memiliki pengaruh yang berlawanan (negatif) terhadap RANKL. Dengan demikian, OCN yang semakin tinggi akan menurunkan RANKL, sebaliknya OCN yang semakin rendah akan meningkatkan RANKL. Pengaruh OCN terhadap RANKL menghasilkan p-value sebesar 0.000. Hal ini berarti terdapat pengaruh yang signifikan OCN terhadap RANKL.

Pengaruh OCN terhadap osteoblast sebesar 0.616 yang menunjukkan OCN memiliki pengaruh yang searah (positif) terhadap osteoblast. Dengan demikian, OCN yang semakin tinggi akan meningkatkan osteoblast, sebaliknya OCN yang semakin rendah akan menurunkan osteoblast. Persamaan di atas menginformasikan bahwa pengaruh OCN terhadap osteoblast menghasilkan p-value sebesar 0.018. Hal ini berarti terdapat pengaruh yang signifikan OCN terhadap osteoblast.

Pengaruh RANKL terhadap osteoblast sebesar -0.323 yang menunjukkan RANKL memiliki pengaruh yang berlawanan (negatif) terhadap osteoblast. Dengan demikian, RANKL yang semakin tinggi akan menurunkan osteoblast, sebaliknya RANKL yang semakin rendah akan meningkatkan osteoblast. Pengaruh RANKL terhadap osteoblast menghasilkan p-value sebesar 0.210. Hal ini berarti terdapat pengaruh yang tidak signifikan RANKL terhadap osteoblast.

Pengaruh OCN terhadap Osteoklas sebesar -0.204 yang menunjukkan OCN memiliki pengaruh yang berlawanan (negatif) terhadap osteoklas. Dengan demikian, OCN yang semakin tinggi akan menurunkan osteoklas, sebaliknya OCN yang semakin rendah akan meningkatkan osteoklas.

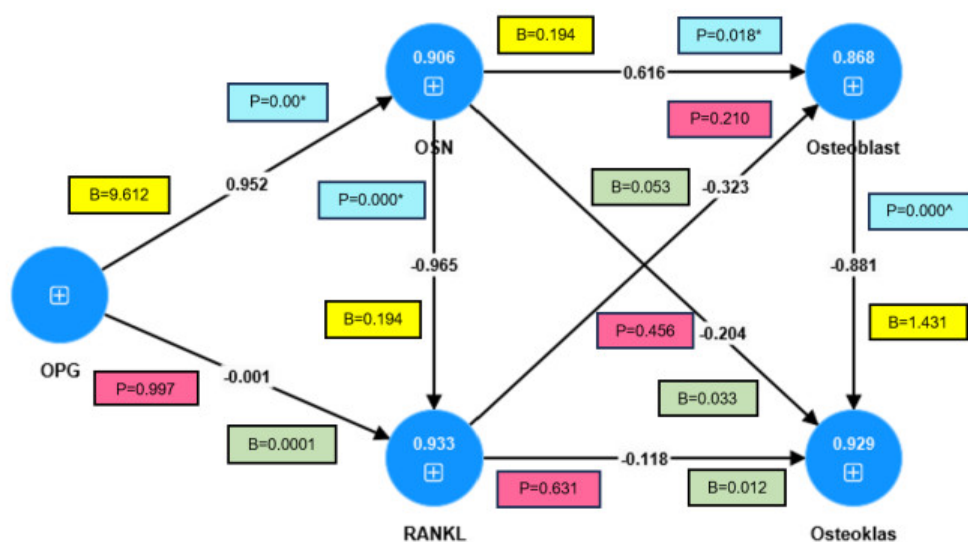


Persamaan di atas menginformasikan bahwa pengaruh OCN terhadap osteoklas menghasilkan p-value sebesar -0.456. Hal ini berarti terdapat pengaruh yang signifikan OCN terhadap osteoklas.

Pengaruh RANKL terhadap Osteoklas sebesar -0.118 yang menunjukkan RANKL memiliki pengaruh yang berlawanan (negatif) terhadap osteoklas. Dengan demikian, RANKL yang semakin tinggi akan menurunkan osteoklas, sebaliknya RANKL yang semakin rendah akan meningkatkan osteoklas. Pengaruh RANKL terhadap osteoklas menghasilkan p-value sebesar 0.631. Hal ini berarti terdapat pengaruh yang tidak signifikan RANKL terhadap osteoklas.

Pengaruh osteoblast terhadap osteoklas sebesar -0.888 yang menunjukkan osteoblast memiliki pengaruh yang berlawanan (negatif) terhadap osteoklas. Dengan demikian, osteoblast yang semakin tinggi akan menurunkan osteoklas, sebaliknya osteoblast yang semakin rendah akan meningkatkan osteoklas. Pengaruh osteoblast terhadap osteoklas menghasilkan p-value sebesar 0.000. Hal ini berarti terdapat pengaruh yang signifikan osteoblast terhadap osteoklas.

Berdasarkan hasil koefisien jalur pada table 1 dan 2 maka dapat digambarkan secara keseluruhan pengaruh kausal antara variable dalam bentuk diagram jalur. Jalur yang dibentuk akan memperlihatkan nilai dari masing-masing variabel. Mekanisme jalur antar variabel dapat dilihat pada gambar 6.9.



Gambar 6.9. Hasil Analisis Jalur Dengan Nilai Koefisien Jalur

Osteoblast, OPG dan osteoklas memiliki pengaruh dominan terhadap RANKL dan OCN dapat diketahui melalui total coefficient yang paling besar tanpa memperhatikan tanda koefisien positif atau negatif yang digambarkan pada table 6.4.

Tabel 6.4. Pengaruh dominan *Osteoblast*, *OPG* dan *osteoklas* terhadap *RANKL*, *OCN*

Pengaruh antar variabel		Effect size
OPG	OCN	0.952
OPG	RANKL	-0.919
OPG	Osteoblast	0.883
OPG	Osteoklas	-0.864
OCN	RANKL	-0.965
last	Osteoblast	0.928
	Osteoklas	-0.908
	Osteoblast	-0.323
	Osteoklas	0.167
	Osteoklas	-0.881



Hasil analisis menginformasikan total coefficient terbesar terhadap RANKL adalah OCN dengan total coefficient sebesar -0.965. Dengan demikian OCN memiliki pengaruh paling dominan terhadap RANKL, sedangkan total coefficient terbesar terhadap osteoblast adalah OCN dengan total coefficient sebesar 0.928. Dengan demikian OCN memiliki pengaruh paling dominan terhadap osteoblast dan total coefficient terbesar terhadap osteoklast adalah OCN dengan total coefficient sebesar -0.908. Dengan demikian OCN memiliki pengaruh paling dominan terhadap osteoklast.

6.4 Diskusi

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kelompok T1 dan kelompok T2 memiliki nilai rata-rata tertinggi untuk jumlah osteoblas, ekspresi OPG, dan kadar OCN, sementara menunjukkan nilai rata-rata terendah untuk jumlah osteoklas dan ekspresi RANKL dibandingkan dengan kelompok C pada hari ke-7, 14, dan 21. Temuan ini mendukung hipotesis bahwa proliferasi osteoblas, ekspresi OPG, dan kadar OCN meningkat. Sebaliknya, jumlah osteoklas dan ekspresi RANKL menurun selama proses pembentukan tulang pada fase remodeling. Lebih lanjut, penelitian ini mengungkapkan hubungan yang signifikan antara osteoblas, osteoklas, RANKL, OPG, dan OCN setelah pencabutan gigi setelah pemberian pengobatan gabungan nanochitosan Lalat Tentara Hitam (*Hermetia illucens*) dan Matriks Dentin yang Didemineralisasi (DDM) pada hari ke-7, 14, dan 21. Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa kitosan menunjukkan aktivitas hemostatik, antibakteri, dan antiinflamasi (Awad, 2022).

Secara kimia, kitosan adalah polisakarida linier yang terdiri dari rantai β -(1,4)-2-amino-2-deoksi-D-glukopiranos, dengan struktur yang mirip dengan glikosaminoglikan (GAG), yang berperan penting dalam penyembuhan luka. Ketika diaplikasikan pada lokasi luka, sifat kationik kitosan berinteraksi dengan karakteristik anionik permukaan sel, menciptakan adhesi elektrostatis. Interaksi ini memfasilitasi pengikatan sel darah merah dan trombosit bermuatan negatif ke molekul kitosan bermuatan positif di permukaan luka. Interaksi ini mempercepat proses hemostatik dan memulai fase inflamasi, yang berlangsung hingga sekitar hari ke-7. Selama fase ini, kitosan memberikan efek antibakteri, yang menyebabkan kematian sel bakteri (Wang, 2023; Takeuchi, 2024). Kitosan pupa BSF yang digunakan dalam penelitian ini menunjukkan tingkat deasetilasi yang tinggi (80%). Sesuai dengan temuan Hakim (2022), kitosan dengan tingkat deasetilasi yang lebih tinggi menunjukkan efikasi antibakteri yang lebih unggul dibandingkan kitosan dengan tingkat deasetilasi yang lebih rendah. Tingkat deasetilasi yang lebih tinggi berkorelasi dengan peningkatan ketersediaan molekul kitosan aktif yang menghambat pertumbuhan bakteri (Wang, 2023; Takeuchi, 2024; Hakim, 2022).

Proses deasetilasi kitosan menyebabkan NAG membentuk D-glukosamin, menghasilkan struktur molekuler yang mengandung gugus amino bebas. Kitosan berukuran nano dapat berfungsi sebagai pembawa obat yang menargetkan jaringan tumor dan memiliki banyak aplikasi biomedis lainnya. Semakin kecil partikel berukuran nano, semakin besar luas permukaannya, sehingga meningkatkan kapasitas kitosan. Karena ukurannya yang kecil, nanopartikel dapat menembus area yang mungkin tidak dapat diakses oleh sistem penghantaran lain seperti luka bekas retraksi soket yang dalam. Sistem ini mengurangi frekuensi pemberian dosis dan selanjutnya memberikan distribusi zat aktif yang seragam dalam jangka waktu yang lama. Sifat kationik kitosan menginduksi hemostasis karena adanya gugus fosfatidiletanolamin, fosfatidilkolin, dan asam sialat. Agregasi eritrosit difasilitasi oleh gugus amino yang terkandung dalam kitosan (poli-N-asetil glukosamin), yang mengubah muatan permukaannya melalui interaksi elektrostatis, sehingga menginduksi hemostasis setelah aktivasi trombosit terjadi. Sifat hemostatik kitosan sangat dipengaruhi oleh berat molekulnya dan derajat deasetilasi yang dicapai selama proses pemurnian kitosan. Hemostasis mulai terjadi karena derajat deasetilasi (DD) kitosan yang lebih tinggi, sehingga meningkatkan agregasi eritrosit dan trombosit, yang meningkatkan hemostasis (Koga, 2016; Bahtiar, 2023).

Kitosan dengan nilai DD yang lebih tinggi memiliki kualitas yang lebih baik. Kualitas kitosan ditentukan oleh adanya gugus asetil. Semakin tinggi kualitas kitosan, semakin tinggi kandungan abu dan air yang rendah dapat menentukan kemurnian kitosan. Dengan tingkat deasetilasi yang tinggi, kitosan akan menjadi lebih reaktif karena semakin tinggi deasetilasi, semakin



banyak gugus amino yang ada dalam rantai molekul kitosan. Asam amino memainkan peran penting dalam mengatur remodeling tulang, karena asam amino memengaruhi jalur metabolisme utama yang penting untuk menjaga homeostasis tulang. Jumlah DD kitosan yang lebih tinggi juga dapat meningkatkan muatan positif, sehingga meningkatkan interaksi antara kitosan dan sel serta meningkatkan biokompatibilitas. Biokompatibilitas mengacu pada sistem metabolisme yang tidak beracun karena kemampuannya untuk berinteraksi dengan sel/jaringan hidup. Deasetilasi dipengaruhi oleh waktu dan suhu selama proses deasetilasi. Pergerakan antar molekul meningkat seiring waktu. Peningkatan suhu mempercepat laju reaksi yang memecah gugus asetil (Koga, 2016; Bahtiar, 2023).

Makrofag muncul 24 jam setelah aktivitas proinflamasi dengan polaritas fenotipe M1 (CD86+) yang melepaskan sitokin antiinflamasi seperti IL-1 β , IL-6, dan TNF α , yang diinduksi oleh *nitric oxide synthase* (iNOS), dan terlibat dalam eliminasi patogen, pelepasan sitokin inflamasi, dan pelepasan reaksi tipe Th1. Fase inflamasi dimulai dalam 0–7 hari setelah cedera, di mana sel inflamasi akut dan neutrofil mengeliminasi debris dan bakteri melalui proses yang dikenal sebagai fagositosis. Selanjutnya, neutrofil menjalani fagositosis oleh makrofag. Selama fase ini, makrofag melepaskan sitokin dan faktor pertumbuhan, karena mereka mengambil peran dominan sel polimorfonuklear dalam memfagositosis debris dan jaringan nekrotik. Ini termasuk *Transforming Growth Factor-Beta* (TGF- β) yang memulai fase proliferasi, *Transforming Growth Factor-Alpha* (TGF- α), *Fibroblast Growth Factor* (FGF), dan *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) (Gambar 6.10) (Hakim, 2022; Gomes, 2019; Umar, 2020). Sitokin dalam fase ini dikategorikan sebagai sitokin antiinflamasi (M2), seperti IL-4, IL-10, dan IL-13, dan sitokin proinflamasi (M1), termasuk TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, dan IL- γ . Menurut Gani (2022), aplikasi kitosan pada hari ke-7, 14, dan 21 secara drastis menurunkan produksi sitokin proinflamasi IL-1, membatasi peradangan berlebih sekaligus meningkatkan BMP-2 untuk mendorong osteogenesis dan osteoinduksi. Penting untuk dicatat bahwa sitokin pro-inflamasi yang diproduksi selama fase inflamasi dapat menginduksi osteoblas untuk meningkatkan produksi RANKL, sekaligus menekan ekspresi OPG. Osteoblas melepaskan OPG, yang menghambat pengikatan RANKL ke RANK, sehingga meningkatkan aktivitas osteoblas dan menurunkan aktivitas osteoklas. Proses remodeling tulang dipicu oleh perubahan keseimbangan seluler yang ditandai dengan peningkatan jumlah osteoblas dan penurunan diferensiasi osteoklas (Hakim, 2022; Umar, 2020; Gani, 2022).

Dalam studi ini, peningkatan progresif harian jumlah osteoblas dan ekspresi OPG menyebabkan penurunan jumlah osteoklas dan ekspresi RANKL yang teramati. Hasil koefisien jalur menguatkan pernyataan ini, karena menunjukkan bahwa OPG berkorelasi negatif dengan RANKL. Lebih spesifik lagi, peningkatan kadar OPG mengakibatkan penurunan ekspresi RANKL. Selain itu, koefisien jalur untuk efek RANKL pada osteoblas juga menunjukkan hubungan negatif, yang menunjukkan bahwa proliferasi osteoblas difasilitasi oleh penurunan level RANKL (Tabel 6.3).

Penurunan ekspresi RANKL yang diamati pada kelompok perlakuan pada hari ke-7, 14, dan 21 (Tabel 6.1) menunjukkan bahwa kombinasi nanochitosan pupa BSF dan DDM menghambat pembentukan dan aktivasi osteoklas. RANKL memainkan peran kunci dalam diferensiasi dan aktivasi osteoklas. Kitosan yang diaplikasikan pada soket pasca-ekstraksi dapat merangsang peningkatan ekspresi mRNA TGF- β 1, PDGF, FGF2, dan BMP. Growth factor ini merangsang proliferasi fibroblas. Peningkatan TGF- β 1 berkontribusi pada peningkatan stimulasi aktivitas osteoblas. Fase inflamasi lanjut ditandai dengan pelepasan faktor pertumbuhan, termasuk TGF- β , TGF- α , FGF, dan VEGF. Selain fungsi pupa BSF nanochitosan selama fase inflamasi, DDM berkontribusi pada pelepasan faktor pertumbuhan osteoinduktif yang menginduksi pembentukan tulang. Matriks organik DDM terdiri dari berbagai faktor pertumbuhan, termasuk IGF, FGF, TGF- β 1, VEGF, dan BMP. Fase proliferasi dimulai dan dipercepat oleh sekresi *growth factor* tersebut (Gambar 6.10) (Pudji, 2019; Wang, 2023).

Studi ini konsisten dengan studi *in vitro* yang dilakukan oleh Kazimierczak (2021), yang setelah 7 hari, makrofag yang dikultur pada permukaan kitosan melepaskan kadar yang jauh lebih tinggi daripada makrofag M0, M1, dan M2. IL-4 adalah faktor yang memainkan peran penting dalam metabolisme tulang. Selain itu, IL-4 mengurangi osteoklas. Selanjutnya, peningkatan kadar TGF- β 1 meningkatkan ekspresi dan sekresi untuk RANKL, sehingga menekan osteoklastogenesis yang dimediasi RANKL– (Kazimierczak, 2021).



Studi ini konsisten dengan penelitian Ding (2020), yang melaporkan bahwa aplikasi DDM dapat meningkatkan rasio tinggi tulang alveolar dan mendorong pembentukan tulang baru di lokasi tempat implan gigi dimasukkan pada minggu keempat. Tulang dan dentin adalah jaringan mineralisasi dengan komposisi kimia yang hampir identic, terdiri dari sekitar 18% kolagen, 2% protein non-kolagen (NCP), 70% hidroksiapatit (HA), dan 10% cairan tubuh. Matriks berfungsi sebagai reservoir untuk faktor pertumbuhan termasuk *Bone Morphogenetic Protein* (BMP), *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β), *Insulin-Like Growth Factor* (IGF), dan *Basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF). Beberapa protein non-kolagen (NCP), seperti OCN dan osteopontin (OPN), umumnya ditemukan di tulang dan dentin. BMP, FGF, kolagen tipe I, dan kolagen tipe III adalah komponen matriks ekstraseluler yang diklasifikasikan sebagai protein non-kolagen dalam matriks tulang dan dentin. Dentin dapat secara aktif mendorong proses osteoinduksi, osteokonduksi, dan vaskularisasi karena adanya faktor pertumbuhan spesifik (Both, 2025; Ding, 2020; Koga, 2016).

Hasil analisis jalur menunjukkan bahwa jalur OPG memiliki pengaruh paling signifikan terhadap OCN. Koefisien jalur menunjukkan hubungan positif (langsung) antara OPG dan OCN, yang menunjukkan bahwa peningkatan OPG dikaitkan dengan peningkatan OCN yang sesuai. Osteokalsin, protein non-kolagen dalam matriks tulang, merupakan indikator penting pembentukan tulang. OCN juga disebut sebagai protein GLA (asam gamma-karboksilglutamat) atau bone GLA protein (BGP). Osteoblas mensintesis kolagen dan disekresikan ke dalam cairan interstisial jaringan tulang pendukung utama. OCN adalah protein yang diproduksi oleh osteoblas yang bergantung pada vitamin K dan D. Ini adalah salah satu dari tiga protein yang disintesis oleh osteoblas yang berikatan dengan hidroksiapatit dalam matriks tulang. RANK diekspresikan dalam sel progenitor osteoklas hematopoietik. OPG dan RANK adalah reseptor yang menunjukkan afinitas serupa terhadap RANKL. OPG yang diproduksi oleh osteoblas berfungsi sebagai reseptor umpan untuk RANKL, mencegahnya mengikat dan mengaktifkan RANK. Temuan ini konsisten dengan hasil penelitian ini, yang mengungkapkan bahwa analisis jalur mengidentifikasi OCN sebagai variabel dengan koefisien total tertinggi yang memengaruhi RANKL. Oleh karena itu, OCN adalah variabel dominan yang memengaruhi ekspresi RANKL. Demikian pula, OCN bertanggung jawab atas koefisien total tertinggi yang memengaruhi osteoblas. Oleh karena itu, OCN memiliki pengaruh paling besar pada osteoblas, dan koefisien total tertinggi untuk variabel osteoklas dikaitkan dengan OCN, menunjukkan bahwa OCN memiliki pengaruh paling besar pada osteoklas. Kelompok perlakuan yang menerima kombinasi Nanochitosan pupa BSF dan DDM menunjukkan penurunan jumlah osteoklas dan ekspresi RANKL, serta peningkatan jumlah osteoblas dan ekspresi OPG dan OCN, seperti yang ditunjukkan oleh hasil dan pembahasan di atas (Tabel 6.1) (Um, 2017; Nagy, 2015; Prahasanti, 2019; Dewi, 2025).

OCN dikenal sebagai protein asam gamma-karboksilglutamat (GLA), yang merupakan protein non-kolagen paling melimpah di jaringan tulang dan disintesis oleh osteoblas selama pembentukan tulang. OCN adalah faktor kunci dalam endokrinologi tulang. Osteoblas memiliki reseptor insulin fungsional, dan pengobatan insulin telah terbukti merangsang proliferasi dan diferensiasi osteoblas. Dalam jalur pensinyalan alternatif, pankreas mensekresikan insulin, yang mendorong ekspresi OCN dan diferensiasi osteoblas dengan menghambat Runx2, sehingga terjadi akumulasi OCN terkarboksilasi dalam matriks tulang. Insulin mengaktifkan osteoklas dan mempercepat pergantian tulang dengan meningkatkan rasio OPG/RANKL. OCN juga memiliki fungsi endokrin, mengatur homeostasis glukosa sistemik, dan memainkan peran penting dalam interaksi antara tulang, pankreas, dan jaringan adiposa. Meskipun beberapa studi klinis telah menunjukkan bahwa OCN mungkin terlibat dalam homeostasis glukosa sistemik, saat ini belum ada bukti langsung bahwa OCN mengatur metabolisme glukosa pada manusia (Kanazawa, 2015; Oktawati, 2018; Ghuchani, 2024).

