

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pulpa gigi merupakan jaringan yang unik karena berada di dalam jaringan keras untuk memberikan dukungan mekanik yang kuat dan perlindungan dari lingkungan mulut yang kaya akan bakteri. Jaringan ini berfungsi untuk pertahanan terhadap iritasi mekanis, termal, kimia atau bakteri, jika teriritasi dan tidak dirawat dapat memperparah inflamasi dan menyebabkan kematian pulpa (Hayman & May, 2019; Cohen, 2016; Nugroho et al., 2020).

Inflamasi akut adalah respon cepat terhadap perlukaan dan substansi asing lainnya yang berlangsung selama 1-4 hari untuk menghantarkan leukosit dan protein plasma ke daerah perlukaan (Korkmaz et al., 2023; Golberg et al, 2015; Sabir & Sumidarti, 2017). Akumulasi sel ini menyebabkan vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas vaskular dan ditandai dengan infiltrasi sel imun, terutama netrofil, makrofag, sel plasma, limfosit dan produksi sitokin proinflamasi (Preethanath et al., 2019; Tanumihardja et al., 2020).

Pada pulpa terinflamasi, terdapat beberapa mediator yang berkaitan erat dengan reaksi inflamasi, salah satunya adalah sitokin yang berfungsi sebagai sinyal intraseluler untuk mengatur aktivitas respon imun, inflamasi lokal maupun sistemik terhadap rangsangan dari luar. *Nuclear factor kappa β* (NF- κ β) merupakan faktor transkripsi yang dapat menginduksi faktor transkripsi gen dari beberapa sitokin proinflamasi yang berhubungan dengan stimulasi sinyal pada sel yang disebabkan oleh suatu patogen atau cedera. *Nuclear factor kappa beta* juga berperan dalam produksi sitokin proinflamasi seperti Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6) dan *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α), yang memulai proses imunologis dan membantu jaringan pulpa mengatasi inflamasi. Ekspresi NF- κ β akan muncul setelah cedera dan menjalani pemulihan hingga hari ke-3 (Saraswati et al, 2023). Selain itu juga ada *growth factor* yang membantu resolusi dari proses inflamasi, salah satunya adalah *Transforming Growth Factor Beta 1* (TGF β -1) (Pribadi et al., 2020).

Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF β -1) secara garis besar di produksi pada dentin gigi, yang berperan dalam pembentukan dan perbaikan kompleks dentin-pulpa, juga berperan sebagai pengatur aktivasi sel seperti limfosit, makrofag, dan granulosit, untuk resolusi dan resolusi respon inflamasi. *Growth factor* ini berperan dalam siklus sel dan sintesis protein yang mengatur proliferasi sel terdiferensiasi menjadi jaringan baru. *Transforming Growth Factor* meningkat sesaat setelah terjadi trauma, meningkat pada hari ke-3 dan tertinggi diekspresikan pada hari ke-3, dan terus meningkat (Saraswati et al., 2023). Semua faktor ini sangat berperan



dalam perawatan inflamasi pulpa terutama *pulp capping* (Pribadi et al., 2021; Saraswati et al., 2023).

Dalam dunia kedokteran gigi, bahan biokeramik telah banyak dikembangkan dan dimanfaatkan di berbagai bidang, seperti bahan *pulp capping* dan regenerasi tulang serta jaringan. Bahan biokeramik adalah bahan yang stabil secara kimiawi, anorganik dan biokompatibel, memiliki bahan dasar kalsium silikat terutama terdiri dari dikalsium atau trikalsium atau tetrakalsium silikat. Biokeramik sering dijumpai dalam bentuk telah dicampur terdiri dari kalsium silikat, zirkonium oksida, tantalum oksida, kalsium fosfat monobasa dan bahan *filler*. Bahan ini memiliki sifat mekanik dan biologis yang unggul, serta mudah digunakan (Davaie et al., 2021; Motwani et al., 2021).

Akan tetapi, bahan biokeramik tetap memiliki kekurangan dibandingkan bahan *pulp capping* lainnya. Penelitian yang dilakukan Chae tahun 2024 menunjukkan bahwa kemampuan melepaskan ion kalsium dari bahan biokeramik belum semaksimal bahan lainnya. Kemampuan bahan *pulp capping* melepaskan ion kalsium akan mempengaruhi kemampuan osteoblas untuk berdiferensiasi dan menghasilkan lingkungan dengan pH tinggi sehingga dapat menginduksi jaringan keras baru (Chae et al., 2024; Saber et al., 2023).

Berdasarkan kekurangan bahan biokeramik dari penelitian sebelumnya, menjadi pertimbangan penulis untuk menemukan kombinasi bahan yang efektif guna meminimalisir inflamasi pulpa dan berpotensi sebagai bahan remineralisasi. Salah satu bahan alam yang potensial dalam perkembangan pengobatan inflamasi dan bahan remineralisasi jaringan gigi adalah kerang darah (*Anadara granosa*).

Kerang darah (*Anadara granosa*) merupakan sumber daya yang bernilai ekonomis dan mudah ditemukan di Indonesia. Sekitar 98.7% mineral yang terkandung dalam kerang darah adalah kalsium karbonat (CaCO_3), 0.05% Magnesium (Mg), 0.9% Natrium (Na), 0.02% Fosfat (P) dan 0.2% lainnya (Omari et al., 2016).

Kalsium karbonat merupakan salah satu mineral yang terkandung dalam gigi dan tulang, serta banyak digunakan dalam berbagai bidang di dunia kedokteran gigi seperti bahan pasta gigi, bahan *bone graft* dan semen. Kandungan kalsium dari kalsium karbonat melepaskan ion Ca^{2+} sehingga aliran ion Ca^{2+} intraseluler meningkat. Peningkatan kalsium merupakan hal penting karena merupakan pembawa pesan ke-2 yang memediasi respon terhadap berbagai rangsangan dalam mediasi proses inflamasi, diferensiasi sel, pergerakan, sekresi, dan transmisi saraf. Unsur ini penting untuk kelangsungan hidup sel melalui regulasi ekspresi gen dan proses fisiologis dan patofisiologis sel dan jaringan. Kandungan kalsium berperan dalam regenerasi jaringan dengan meningkatkan konsentrasi kalsium melalui saluran kalsium potasium sehingga akan membantu



dalam resolusi inflamasi dan dapat mempercepat penyembuhan jaringan (Praja et al., 2022 ; Naringrekar et al., 2021).

Kandungan kalsium karbonat (CaCO_3) yang tinggi pada cangkang kerang darah merupakan sumber kalsium dan memiliki biokompatibilitas yang baik dikarenakan pH nya 8-9 sehingga tidak menyebabkan kerusakan pada jaringan sekitarnya (Praja et al., 2022). Penelitian yang dilakukan Hikmah, et al (2019) menunjukkan terjadi peningkatan kadar ion kalsium setelah aplikasi pasta cangkang kerang darah pada permukaan email gigi paska *in office bleaching*. Hal ini membuktikan bahwa cangkang kerang darah berpotensi sebagai sumber kalsium alami yang dapat dikombinasikan dengan bahan biokeramik pada penelitian ini (Hikmah et al., 2019).

Berdasarkan uraian diatas, menarik minat penulis untuk meneliti efektivitas kombinasi sintesis kalsium karbonat cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) dan bahan biokeramik terhadap ekspresi NF- κ B dan TGF β -1 pada pulpa gigi tikus galur wistar yang terinflamasi.

1.2 Rumusan masalah

Bagaimana efektivitas kombinasi sintesis kalsium karbonat cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) dan bahan biokeramik terhadap ekspresi NF- κ B dan TGF β -1 pada pulpa gigi tikus galur wistar yang terinflamasi?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengevaluasi efektivitas aplikasi kombinasi sintesis kalsium karbonat cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) dan bahan biokeramik terhadap perbaikan inflamasi pulpa gigi tikus galur wistar yang terinflamasi.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Menganalisis efektivitas aplikasi kombinasi sintesis kalsium karbonat cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) dan bahan biokeramik konsentrasi 25%, 50% dan 75% terhadap ekspresi NF- κ B pada pulpa gigi tikus galur wistar yang terinflamasi berdasarkan waktu pengamatan hari ke-1, ke-3, ke-7 dan ke-14.
2. Menganalisis efektivitas aplikasi kombinasi sintesis kalsium karbonat erang darah (*Anadara granosa*) dan bahan biokeramik pada 25%, 50% dan 75% terhadap ekspresi TGF β -1 pada pulpa alur wistar yang terinflamasi berdasarkan waktu pengamatan 3-3, ke-7 dan ke-14.



1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Iptek

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi pengetahuan mengenai ekspresi NF- κ B dan TGF β -1 setelah aplikasi kombinasi sintesis kalsium karbonat cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) dan bahan biokeramik pada pulpa gigi tikus galur wistar yang terinflamasi.

1.4.2 Manfaat Klinis

1. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi pengetahuan bagi dokter gigi dan khususnya dokter gigi spesialis konservasi gigi mengenai efektivitas aplikasi kombinasi sintesis kalsium karbonat cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) dan bahan biokeramik terhadap ekspresi NF- κ B dan TGF β -1 pada pulpa gigi tikus galur wistar yang terinflamasi.
2. Sebagai penelitian lanjutan tentang pemanfaatan kombinasi sintesis kalsium karbonat cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) dan bahan biokeramik dalam bidang kedokteran gigi secara umum dan secara khusus dalam bidang konservasi gigi.

1.5 Tinjauan Teori

1.5.1 Pulpa Gigi

Pulpa gigi merupakan jaringan ikat yang unik dengan elemen vaskular, limfatik dan saraf yang berasal dari sel neural. Jaringan ini berada di dalam rongga tengah gigi yang dilindungi oleh dinding yang kaku yaitu email dan dentin (Torabinejad, 2021; Goldberg & Hirata, 2017). Pulpa gigi terdiri atas beberapa jenis sel antara lain sel odontoblas, sel fibroblas dan sel mesenkimial yang tidak berdiferensiasi, kolagen tipe 1 dan 2, proteoglikan, glikoprotein, dan air. Komponen lain yang terdapat pada pulpa gigi adalah pembuluh darah, pembuluh saraf, substansi dasar serta jaringan limfatik (Galler et al., 2021; Mount and Hume, 2016).

Struktur histologis pulpa ini penting untuk pembentukan dentin dan pertahanan terhadap serangan patogen. Odontoblas membentuk suatu lapisan pada bagian perifer pulpa dan mempunyai prosesus yang meluas sampai ke dentin, dan terlibat dalam produksi dentin yang termineralisasi.



Odontoblas merupakan sel yang berasal dari mesenkim dan berperan pada odontogenesis. Selain itu, odontoblas juga memainkan peranan pertahanan karena dapat mengekspresikan *Toll-like receptor* defensin, dan mediator imunologi lainnya (Torabinejad, 2021; Hirata, 2017; Garg & Garg, 2019).

1.5.2 Pulp Capping

Cedera pada pulpa bisa menimbulkan ketidaknyamanan dan penyakit, sehingga kesehatan pulpa merupakan hal yang paling penting bagi keberhasilan prosedur restorasi. Salah satu perawatan pada karies yang dalam adalah *pulp capping*. *Pulp capping* merupakan prosedur untuk mencegah terbukanya pulpa selama pembuangan dentin karies (Torabinejad, 2021).

Pulp capping bertujuan untuk memelihara vitalitas pulpa. Ada 2 jenis, *pulp capping* yaitu *pulp capping* direk dan *pulp capping* indirek. *Pulp capping* direk adalah perawatan untuk gigi dengan keadaan pulpa terbuka karena faktor iatrogenik, atau trauma terhadap material tertentu, sedangkan *pulp capping* indirek merupakan perawatan yang bertujuan untuk mencegah terbukanya pulpa. *Pulp capping* indirek dapat dilakukan untuk lesi karies yang dalam tetapi belum mengenai pulpa. *Pulp capping* indirek dipertimbangkan jika tidak ada riwayat inflamasi pada pulpa atau pulpitis *irreversible* (Torabinejad, 2021).

Keberhasilan perawatan *pulp capping* indirek secara klinis didapat dari hasil pemeriksaan subjektif dan objektif baik ekstra oral maupun intra oral. Kriteria klinis yang digunakan untuk menentukan keberhasilan perawatan *pulp capping* indirek adalah tidak adanya nyeri spontan dan atau sensitivitas pada gigi, tidak ada fistula, edema dan atau pergerakan gigi yang abnormal (Gurcan & Seymen, 2019).

Perawatan terbaik untuk pulpitis reversibel adalah pencegahan (*conservative pulp therapy*). Tujuan terapi ini untuk menciptakan lingkungan yang kondusif bagi kesehatan pulpa. Kondisi ini melibatkan pengangkatan jaringan yang terinfeksi dan menutup tepi *cavosurface* dari kavitas untuk memungkinkan regenerasi atau perbaikan kompleks dentin-pulpa. Setelah iritasi jaringan dihilangkan, bahan ditempatkan di atas dentin, atau kontak langsung dengan pulpa untuk merangsang pembentukan *dentinal bridge* termineralisasi oleh odontoblas atau *odontoblast like cell* (Yong & Cathro, 2021).

1.5.3 Bahan Biokeramik

Pada awal tahun 1990-an, biokeramik diperkenalkan di bidang endodontik sebagai kelompok material gigi yang baru. Biokeramik adalah bahan keramik biokompatibel atau oksida logam termasuk alumina, zirkonia, kaca bioaktif,



hidroksiapatit, kalsium silikat, dan kalsium fosfat yang terserap mik dapat diklasifikasikan sebagai bahan *bioinert*, *bioactive*, *dable* berdasarkan reaktivitasnya dengan jaringan di keramik yang digunakan dalam endodontik umumnya bersifat ranya yang paling umum digunakan adalah semen berbasis (CSC). Selain memiliki sifat fisik dan kimia yang sangat baik,

CSC memainkan peran penting dalam terapi endodontik karena biokompatibilitas dan bioaktivitasnya (Dong & Xu, 2023).

Beberapa literatur menyebut bahan biokeramik dengan istilah *premixed bioceramic* karena bahan ini sudah tercampur dengan konsistensi yang homogen sehingga menghindari kesalahan operator dalam pencampurannya. *Premixed bioceramic* juga dapat lebih mudah dalam pengantaran ke daerah kerja yang sulit diakses sehingga lebih mudah dalam kondensasi dan pengaplikasiannya, selain itu juga dapat menghindari kontaminasi silang. Keuntungan lain dari bahan ini setelah *setting timenya* tercapai, bahan ini mengeras dan sedikit mengembang sehingga membentuk penutupan jangka panjang yang unggul (Dong & Xu, 2023; Motwani et al., 2021; Saudi et al., 2024). Karena keunggulan ini, *premixed bioceramic* direkomendasikan untuk prosedur seperti *pulp capping*, pulpotomi, perbaikan perforasi, pengisian ujung akar dan obturasi (Motwani et al., 2021).

Saat bahan biokeramik berkontak dengan kelembapan alami di dalam tubulus dentin, kalsium silikat bereaksi dengan H_2O menghasilkan hidrogel kalsium silikat dan kalsium hidroksida; kalsium hidroksida bereaksi dengan kalsium fosfat untuk melepaskan ion Ca^{2+} dan OH^- yang akan bercampur dengan fosfat dalam cairan di sekitarnya, menyebabkan pengendapan lapisan permukaan kalsium fosfat yang mampu mengisi celah yang terbuka. Hal ini akan menginduksi pembentukan kristal apatit, yang dapat meningkatkan penutupan (*sealing*) ketika terjadi kontak material dengan dentin (Liu et al., 2015; Davaie et al., 2021; Saudi et al., 2024).

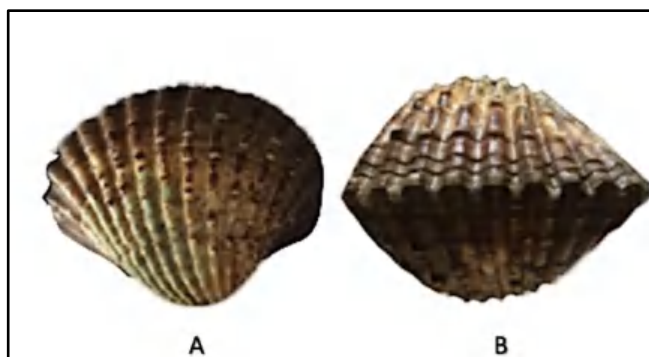
Pelepasan ion Ca^{2+} yang berkelanjutan oleh bahan biokeramik dapat terjadi hingga 28 hari telah terbukti menjadi elemen penting dalam mendorong regenerasi jaringan, yang akan meningkatkan bioaktivitas dan biokompatibilitas bahan (Saudi et al., 2024).

1.5.4 Kerang Darah

Kerang darah (*Anadara granosa*) merupakan salah satu jenis *mollusca* yang hidup di air yang umum dikonsumsi negara-negara di Asia Tenggara. Kerang darah (*Anadara granosa*) memiliki potensi digunakan sebagai bahan regenerasi jaringan keras tubuh seperti tulang dan gigi (Saryati et al., 2014).

Cangkang kerang darah merupakan bagian kerang yang lebih banyak dibuang sehingga menjadi limbah bagi lingkungan. Secara umum, ng darah merupakan komposit mineral dan biopolimer terdiri % kalsium karbonat ($CaCO_3$) 0.05% Magnesium (Mg), 0.9% 02% Fosfat (P) dan 0.2% lainnya (Omari et al., 2016).





Gambar 1.1. Ilustrasi cangkang kerang darah (*Anadara granosa*)
Sumber: Rozirwan et al., 2023).

Taxonomi kerang darah (*Anadara granosa*) menurut Devi et al., 2019:

Kerajaan: *Animalia*

Filum: *Mollusca*

Kelas: *Pelecypoda*

Sub Kelas: *Lamellibranchia*

Ordo: *Taxodonta*

Famili: *Taxodonta*

Genus: *Anadara*

Spesies: *Anadara granosa*

Ciri-ciri kerang darah (*Anadara granosa*), mempunyai dua keping cangkang yang tebal, elips dan kedua sisi sama, cangkang berwarna putih ditutupi periostrakum yang berwarna kuning kecoklatan hingga coklat kehitaman dan lapisan dalam berwarna putih, ukuran panjang 50-60 mm dan lebar 40-50 mm (Bharatham et al., 2014).

Kandungan kalsium karbonat (CaCO_3) yang tinggi pada cangkang kerang darah diharapkan dapat menjadi sumber kalsium yang baik dan biokompatibel digunakan sebagai bahan perbaikan tulang. Oleh karena itu, cangkang kerang darah diharapkan dapat menjadi bahan alternatif pelindung pulpa untuk menginisiasi deposisi jaringan dentin baru sehingga proses penyembuhan dapat terjadi melalui pembentukan dentin reaksioner. Cangkang kerang darah juga dikenal memiliki sifat antiinflamasi yang baik (Praja et al., 2022).



Factor Kappa Beta (NF- κ B)

Kappa Beta (NF- κ B) adalah faktor transkripsi yang mengatur aksi sitokin proinflamasi dan *growth factor*. Reaksi inflamasi ini oleh *reactive oxygen species* (ROS) yang diproduksi oleh makrofag. *Reactive oxygen species* memimpin aktivasi faktor

transkripsi inflamasi dengan memisahkan ikatan NF- κ B dan *inhibitor Kappa Beta* ($\text{I}\kappa\text{B}$), untuk memulai proses inflamasi. Ekspresi NF- κ B dan adanya sitokin proinflamasi digunakan sebagai penanda inflamasi pulpa dan dapat meningkatkan diferensiasi odontoblas dan pembentukan matriks kolagen (Saraswati et al., 2023).

Nuklear Factor Kappa Beta memainkan peran penting dalam proses inflamasi, dan mempengaruhi sel untuk mengekspresikan TNF- α dan IL-1 β . Proses ini juga terdapat pada dentin. Dengan adanya sekresi dentin, aktivitas metabolisme odontoblas dapat dikontrol sebagai respon terhadap kerusakan (Saraswati et al., 2023).

1.5.6 Transforming Growth Factor-Beta 1 (TGF- β 1)

Transforming Growth Factor-Beta 1 merupakan *growth factor* dengan berbagai aktivitas biologis seperti memodulasi pertumbuhan sel, diferensiasi, kemotaksis dan apoptosis yang dapat mempengaruhi berbagai jenis sel seperti monosit, epitel, mesenkim dan sel saraf (Saraswati et al., 2023). *TGF- β 1* ini sangat kuat dan memiliki berbagai kemampuan pensinyalan sel, yang memungkinkan bekerja pada dosis sangat rendah. Setelah dilepaskan, *growth factor* ini melintasi tubulus ke pulpa dan menginduksi berbagai respons seluler, termasuk aktivasi odontoblas yang berperan pada proses dentinogenesis (Saraswati et al., 2023).

1.6 Hipotesis Penelitian

H0 : Aplikasi kombinasi sintesis kalsium karbonat cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) dan bahan biokeramik pada pulpa gigi tikus galur wistar yang terinflamasi tidak menurunkan ekspresi NF- κ B dan tidak meningkatkan ekspresi TGF β -1.

H1 : Aplikasi kombinasi sintesis kalsium karbonat cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) dan bahan biokeramik pada pulpa gigi tikus galur wistar yang terinflamasi efektif menurunkan ekspresi NF- κ B dan meningkatkan ekspresi TGF β -1. Aplikasi kombinasi sintesis kalsium karbonat cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) dan bahan biokeramik pada pulpa gigi tikus galur wistar yang terinflamasi efektif menurunkan ekspresi NF- κ B dan meningkatkan ekspresi TGF β -1.



BAB II

METODELOGI PENELITIAN

2.1 Rancangan Penelitian

2.1.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan desain penelitian *post-test control group design*.

2.1.2 Desain Penelitian

Desain penelitian *post-test with control group design*.

2.2 Waktu dan Tempat Penelitian

2.2.1 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada Februari - Mei 2025

2.2.2. Lokasi Penelitian

1. Pembuatan bubuk sintesis kalsium karbonat cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) dilakukan di Laboratorium Politeknik Kimia Politeknik Negeri Ujung Pandang.
2. Pemeliharaan hewan dan dekapitasi hewan coba tikus wistar dilakukan di Klinik Hewan RS Pendidikan Universitas Hasanuddin.
3. Preparasi dan aplikasi ke hewan coba dilakukan di Klinik Hewan RS Pendidikan Universitas Hasanuddin.
4. Pembuatan slide preparat dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin.
5. Pengamatan histologi dilakukan di Laboratorium Biokimia Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

2.3 Populasi dan Sampel Penelitian

2.3.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian adalah hewan coba tikus galur wistar (*Rattus norvegicus*) dewasa yang sehat dan beraktivitas normal. Seluruh hewan coba dipelihara dan diberi pakan yang sama. Hewan coba diadaptasikan dengan lingkungan penelitian selama 1 minggu sebelum penelitian.

2.3.2 Sampel Penelitian



Penelitian adalah tikus galur wistar (*Rattus norvegicus*) yang teraklimatisasi dan menerima tindakan preparasi atap pulpa pada gigi bawah.

Taxonomi tikus galur wistar (*Rattus norvegicus*) menurut Islam et al., 2021:

Kerajaan: *Animalia*

Filum: *Chordata*

Kelas: *Mammalia*

Ordo: *Rodentia*

Famili: *Muridae*

Genus: *Rattus*

Spesies: *Rattus norvegicus*

Adapun kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

Kriteria inklusi:

1. Tikus wistar dalam keadaan sehat, aktivitas dan tingkah laku normal
2. Berat badan 250-300 gram
3. Umur tikus antara 3-4 bulan
4. Jenis kelamin jantan
5. Gigi seri rahang bawah tidak mengalami karies
6. Jaringan periodontal di sekitar gigi sehat

Kriteria eksklusi:

1. Tikus tidak sehat ditandai dengan bulu kusam, rontok dan gerakan tidak aktif serta malas makan.
2. Tikus wistar yang mati dalam periode penelitian
3. Gigi karies, goyang atau patah.

2.3.3 Perhitungan Besar Sampel

Perhitungan besar sampel dalam penelitian ini menggunakan rumus Federer:

Keterangan :

n = jumlah sampel

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

t = jumlah kelompok penelitian

Cara perhitungan besar sampel:

t = 4 kelompok penelitian

$$(n-1) \times (4-1) \geq 15$$

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

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 15+3$$

$$n \geq 6$$

Selanjutnya dilakukan validasi jumlah besar sampel minimum dengan SPSS (versi 3.1.9.7 untuk Windows). Besar sampel untuk setiap perlakuan adalah 6 (enam) tikus wistar. Dalam penelitian ini kelompok perlakuan, sehingga total keseluruhan 32 sampel tikus (*Rattus norvegicus*). Jumlah besar sampel penelitian hewan ini didasarkan pada prinsip 3R (*Replacement, Reduction, Refinement*).



Teknik pengambilan sampel pada tiap kelompok perlakuan adalah simple random sampling. Simple random sampling merupakan teknik sampling yang dipilih secara acak.

Hewan coba dibagi menjadi 4 kelompok secara random yang terdiri masing-masing 8 ekor tikus per kelompok yang akan di dekapitasi 2 tikus per hari pengamatan (Hari 1, 3, 7, dan 14) di tiap kelompok.

Kelompok penelitian dibagi berdasarkan kombinasi bahan coba ke hewan coba :

- Kelompok Kontrol (+) : (Bahan Biokeramik 100%)
- Kelompok 1 : (Kalsium karbonat sintesis cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) 75% dan bahan biokeramik 25%)
- Kelompok 2 : (Kalsium karbonat sintesis cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) 50% dan bahan biokeramik 50%)
- Kelompok 3 : (Kalsium karbonat sintesis cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) 25% dan bahan biokeramik 75%)

2.4 Identifikasi dan Definisi Operasional Variabel

2.4.1 Variabel Penelitian

Variabel bebas (*independent*): kombinasi sintesis kalsium karbonat cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) dan bahan biokeramik

Variabel terikat (*dependent*): ekspresi NF- κ B dan TGF β -1

Variabel kendali: diameter preparasi dan kedalaman kavitas, jenis kelamin, umur, berat badan, cara pemeliharaan, kondisi kesehatan dan jenis makanan, serta gigi tikus galur wistar (*Rattus norvegicus*) yang digunakan.

2.4.2 Definisi Operasional Variabel

1. Sintesis kalsium karbonat cangkang kerang darah merupakan sediaan dalam bentuk bubuk yang dibuat dari cangkang kerang darah konsentrasi 100% dengan metode kalsinasi.
2. Bahan biokeramik adalah sediaan komersial pasta dengan kandungan trikalsium silikat. Bahan Biokeramik yang digunakan dalam penelitian ini adalah *NeoPutty* (*Avalon Biomed, Houston, USA*)
3. Kombinasi sintesis kalsium karbonat cangkang kerang darah dan bahan biokeramik adalah sediaan pasta yang diperoleh dari hasil pencampuran sintesis cangkang kerang darah dan bahan biokeramik berdasarkan an berat (mg/mg). Kombinasi perlakuan 1 sebesar 75% cangkang kerang darah 0.4 gr + bahan biokeramik 0.1 gr), perlakuan 2 sebesar 50% (sintesis cangkang kerang darah 0.2 + biokeramik 0.2 gr), kombinasi perlakuan 3 sebesar 25% cangkang kerang darah 0.1 gr + bahan biokeramik 0.4 gr) yang n 1x sebanyak 0.5mg pada pulpa gigi tikus galur wistar yang



terbuka.

4. Pulpa terinflamasi adalah kondisi pulpa gigi tikus galur wistar yang mengalami inflamasi akibat dibuat iritan mekanik kavitas klas 1 menggunakan *handpiece* dengan *round diamond bur* ukuran $\frac{1}{4}$ (Mani Inc., Japan) dengan kedalam 0.5 mm hingga menembus atap pulpa dan terlihat titik perdarahan berwarna merah.
5. Ekspresi NF- κ B adalah hasil perhitungan jumlah ekspresi yang dilakukan dengan metode *stain* IHK dan diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x yang diberi pewarnaan *Haematoxylin* 560, dihitung berdasarkan jumlah molekul yang terekspresi pada setiap sampel preparat.
6. Ekspresi TGF β -1 adalah hasil perhitungan jumlah ekspresi yang dilakukan dengan metode *stain* IHK dan diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x yang diberi pewarnaan *Haematoxylin* 560, dihitung berdasarkan jumlah molekul yang terekspresi pada setiap sampel preparat.

Penilaian hasil pemeriksaan imunohistokimia untuk ekspresi NF- κ B dan TGF β -1 dinilai dengan metode positive cell count, yaitu menilai jumlah molekul NF- κ B dan TGF β -1 yang positif terwarnai stain IHK dan diamati dengan mikroskop cahaya, kemudian dihitung jumlah molekulnya (Fedchenko & Reifenrath, 2014).

2.5 Prosedur Penelitian

2.5.1 Pembuatan Sintesis Kalsium Karbonat Cangkang Kerang Darah (*Anadara granosa*)

- Cangkang kerang darah dicuci dengan air hingga bersih.
- Dikeringkan dibawah sinar matahari selama 6 jam dan pengeringan oven pada suhu 110°C selama 2 jam.
- Cangkang dihancurkan menggunakan palu hingga menjadi serpihan kecil, di blender hingga membentuk serbuk halus.
- Serbuk cangkang kerang darah diayak menggunakan ayakan 150 mesh dan hasil ayakan dikalsinasi pada suhu 900°C selama 5 jam, menghasilkan bubuk CaO
- Bubuk CaO dicampurkan dengan 2M HNO₃ (asam nitrat), kemudian dicampur dengan stirrer magnetik pada suhu 60°C selama 30 menit
- Setelah selesai putaran 30 rpm. kemudian ditambahkan larutan NH₄OH (amonium hidroksida) capai pH 12 kemudian di filtrasi dengan *Whatman Filter paper*
- Setelah selesai filtrasi kemudian dipresipitasi dengan dialirkan gas CO₂ (Karbon Dioksida), kemudian susu putih dicuci dan difilter dengan air suling hingga pH 7 dan kemudian dikalsinasi pada suhu 110°C selama 2 jam.



- Serbuk cangkang kerang darah ditambahkan dengan propilen glikol kemudian dicampurkan untuk membentuk pasta yang homogen.

2.5.2 Prosedur Hewan Coba dan Aplikasi Bahan Uji pada Pulpa Gigi Tikus

Tikus wistar yang digunakan dalam penelitian ini, berjenis kelamin jantan, umur 12-16 minggu dengan berat badan 250-300gr. Tikus wistar diadaptasikan dalam kandang selama 1 minggu dan dilakukan pemberian pakan dan pembersihan kandang secara terjadwal.

- Anestesi tikus wistar secara intramuskular dengan Ketamine HCl 10%. Dosis yang digunakan adalah 15mg/kgBB dan dapat diulang dengan penambahan dari 1/3 atau 1/2 dosis awal yang diinjeksikan.
- Permukaan gigi yang akan di bur di disinfeksi menggunakan *cotton pellet* yang telah diberi alkohol 70%.
- Induksi injuri pulpa: preparasi gigi seri rahang bawah dibuat kavitas klas 1 menggunakan *handpiece* dengan *round diamond bur* (ukuran 1/4) (Mani Inc., Japan) dengan kedalam 0.5 mm hingga menembus atap pulpa dan terlihat suatu titik perdarahan berwarna merah. Kontrol perdarahan dengan menekan menggunakan kapas steril dan akuades hingga tercapai homeostatis.
- Pengaplikasian bahan coba
- Tikus wistar dibagi secara random menjadi 4 kelompok yang masing-masing terdiri dari 8 ekor, yaitu :
 - Kelompok 1: merupakan kelompok kontrol positif (bahan biokeramik 100%), dilakukan tindakan penembusan atap pulpa gigi seri rahang bawah, kemudian diaplikasikan bahan biokeramik menggunakan *ball applicator* dengan takaran 0.5 mg kemudian semua gigi ditumpat menggunakan bahan *Resin Modified-Glass Ionomer Cement* (GC, Jepang) dicampur sesuai petunjuk pabrik dan diletakkan diatas bahan uji yang telah diaplikasikan dalam kavitas sampai seluruh kavitas terisi. Dilakukan *light curing* selama 40 detik.
 - Kelompok 2: merupakan kelompok perlakuan 1 (aplikasi sintesis kalsium karbonat cangkang kerang darah 75%, bahan biokeramik 25%), dilakukan tindakan penembusan atap pulpa gigi seri rahang bawah, kemudian diaplikasikan sintesis kalsium karbonat cangkang kerang darah dan bahan biokeramik menggunakan *ball applicator* dengan takaran 0.5 an semua gigi ditumpat menggunakan bahan *Resin Modified-mer Cement* (GC, Jepang) dicampur sesuai petunjuk pabrik kan diatas bahan uji yang telah diaplikasikan dalam kavitas iruh kavitas terisi. Dilakukan *light curing* selama 40 detik.
 - Kelompok 3: merupakan kelompok perlakuan 2 (aplikasi sintesis kalsium angkang kerang darah 50%, bahan biokeramik 50%), ndakan penembusan pada atap pulpa gigi seri rahang bawah,



kemudian diaplikasikan sintesis kalsium karbonat cangkang kerang darah dan bahan biokeramik menggunakan *ball applicator* dengan takaran 0.5 mg kemudian semua gigi ditumpat menggunakan bahan *Resin Modified-Glass Ionomer Cement* (GC, Jepang) dicampur sesuai petunjuk pabrik dan diletakkan diatas bahan uji yang telah diaplikasikan dalam kavitas sampai seluruh kavitas terisi. Dilakukan *light curing* selama 40 detik.

- Kelompok 4: merupakan kelompok perlakuan 3 (aplikasi sintesis kalsium karbonat cangkang kerang darah 25%, bahan biokeramik 75%), dilakukan tindakan penembusan pada atap pulpa gigi seri rahang bawah, diaplikasikan sintesis kalsium karbonat cangkang kerang darah dan bahan biokeramik menggunakan *ball applicator* dengan takaran 0.5 mg kemudian semua gigi ditumpat menggunakan bahan *Resin Modified-Glass Ionomer Cement* (GC, Jepang) dicampur sesuai petunjuk pabrik dan diletakkan diatas bahan uji yang telah diaplikasikan dalam kavitas sampai seluruh kavitas terisi. Dilakukan *light curing* selama 40 detik.
- Dekapitasi hewan coba
- Pada hari ke-1, 3, 7 dan 14 setelah perlakuan, hewan coba didekapitasi untuk memisahkan kepala dengan badannya. Hewan coba dikorbankan setelah 1 hari, 3 hari, 7 hari dan 14 hari dengan melakukan sedasi ethanol over konsentrasi, Eutha 4ml/ 10 lb (0,1 ml/ 1 gram) dilanjutkan dengan dekapitasi untuk mengambil mandibula menggunakan *scalpel* dan gunting bedah.

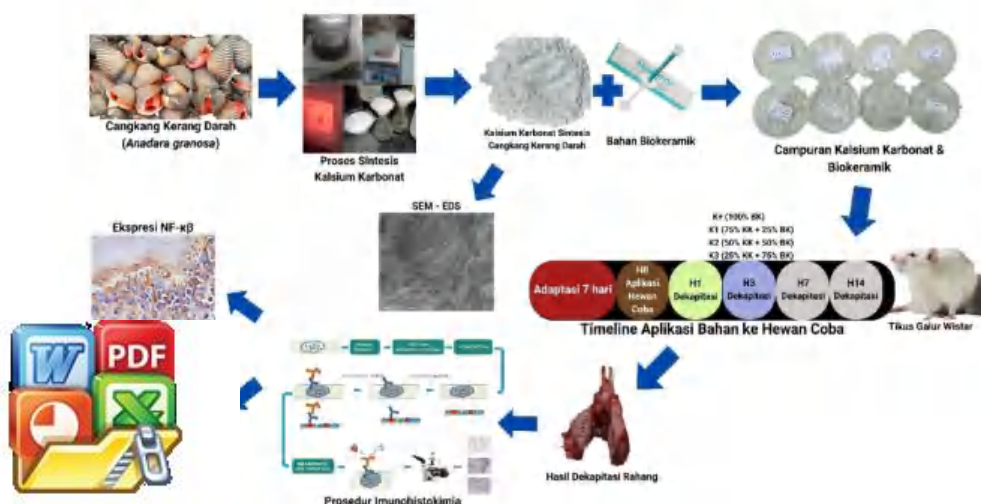
2.5.3 Pemeriksaan Imunohistokimia Jumlah Ekspresi NF- κ B dan TGF β 1

- Persiapan preparat berupa potongan tipis jaringan 4 μ m yang sudah ditempelkan pada kaca objek silanized
- Deparafinisasi dengan mencelupkan preparat ke dalam cairan xylol sebanyak 3 kali, masing-masing 5 menit
- Rehidrasi dengan cara mencelupkan secara berurutan dalam etanol absolut lalu alkohol 95% dan alkohol 70%, masing-masing 5 menit
- Dibilas dengan air mengalir selama 5 menit
- Dimasukkan preparat ke dalam *buffer sitrat* dan dipanaskan ke dalam *microwave*:
 - Cook I: power level 8 selama 5 menit (sampai titik didih pertama)
 - Cook II: power level 1 selama 5 menit
 - Didinginkan $\pm$ 30 menit dalam suhu ruang
- Dicuci dengan *wash buffer* (PBS) 3x2 menit, keringkan air di sekitar jaringan
- Berkeliling jaringan yang ingin dipulas dengan *Pap pen*
- Preparat dengan mencelupkan ke dalam Endogen Peroksidase (*peroxidase* primer) selama 5 menit
- Dicuci dengan *wash buffer* (PBS) 3x2 menit



- *Blocking* preparat dengan meneteskan *background blocker* selama 5 menit
- Dibuang cairan *blocking* tanpa dibilas
- Diteteskan preparat dengan antibodi primer NF- κ B dan TGF β -1 biarkan selama 60 menit dalam rak inkubasi
- Dibilas dengan *wash buffer* (PBS) 3x2 menit
- Diteteskan preparat dengan *PolyVue Plus Enhancer* secukupnya dan biarkan selama 10 menit dalam rak inkubasi
- Diteteskan preparat dengan DAB + substrat dan biarkan selama 2-5 menit
- Dibilas dengan *wash buffer* (PBS) 3x2 menit
- *Counterstain* preparat dengan pewarnaan *Hematoxylin 560* selama 1-2menit
- Dibilas dengan *wash buffer* (PBS) 3x2 menit
- Dibilas dengan air mengalir selama 5 menit
- Dehidrasi dengan cara mencelupkan preparat secara berurutan dalam alkohol 70%, alkohol 96% dan etanol absolut masing-masing selama 5 menit
- Dilakukan *mounting* dan tutup dengan kaca penutup
- Slide imonohistokimia dinilai positif bila pada inti (bercak biru atau bintik biru, difus/granular) untuk satu lapangan pandang dengan pembesaran 1000x. Penghitungan ekspresi *slide* imunohistokimia jumlah ekspresi NF- κ B dan TGF β -1 dilakukan secara semikuantitatif pada daerah odontoblas.
- Penilaian hasil pemeriksaan imunohistokimia untuk ekspresi NF- κ B dan TGF β -1 dinilai dengan *positive cell count*.

2.6 Alur Penelitian



2.7 Analisis Statistik

Jenis data: data primer

Pengolahan data: SPSS versi 26.0 untuk Windows 10.

Analisis data: uji Anova dan *Post Hoc LSD (Least Significance Difference)*



Optimized using
trial version
www.balesio.com