

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Enamel merupakan jaringan mineral keras yang memiliki fungsi utama sebagai pelindung gigi dan komponen struktur yang penting dalam proses mastikasi. Jaringan ini merupakan lapisan paling luar dari mahkota gigi yang secara langsung berkontak dengan lingkungan rongga mulut. Enamel berfungsi untuk melindungi lapisan di bawahnya, yaitu dentin dan pulpa, dari berbagai faktor eksternal seperti tekanan mekanis akibat proses pengunyahan, serta paparan kimiawi dari makanan dan minuman yang bersifat asam. Ketahanan enamel terhadap abrasi dan erosi sangat penting untuk mempertahankan integritas dan kesehatan keseluruhan gigi.

Enamel merupakan pertahanan pertama pada struktur gigi terhadap adanya serangan mekanis dan paparan kimiawi. Komposisi enamel tersusun hampir seluruhnya dari kristal hidroksiapatit (HA), yaitu senyawa kalsium fosfat yang memiliki struktur kristalin yang padat dan terorganisir. Kandungan mineral yang sangat tinggi, sekitar 96% dari total berat enamel, menjadikan jaringan enamel paling keras dalam tubuh manusia. Struktur ini memberikan enamel kekuatan luar biasa serta ketahanan tinggi terhadap beban kunyah yang berulang setiap hari (Free et al., 2020; Welborn, 2020; Reyes-Gasga & Vargas-Becerril, 2020). Selain itu, kekerasan enamel juga berperan penting dalam mencegah penetrasi mikroorganisme ke jaringan gigi yang lebih dalam, serta mengurangi risiko infeksi dan penyakit gigi seperti karies. Dengan demikian, enamel bukan hanya sebagai pelindung pasif, tetapi juga merupakan komponen esensial dalam menjaga fungsi fisiologis dan kesehatan gigi jangka panjang.

Secara mikroskopis, enamel memiliki struktur khas yang disebut struktur prismatic. Struktur ini terdiri atas susunan rapat dari prisma-prisma kristal hidroksiapatit yang tersusun secara sejajar dan terorganisir. Setiap prisma memiliki celah mikroskopis di antara satu dengan lainnya yang berfungsi sebagai jalur distribusi energi ketika terjadi tekanan atau benturan. Celah-celah ini memungkinkan enamel menyerap dan menyebarkan tekanan secara merata, sehingga mengurangi risiko konsentrasi tekanan pada satu titik yang dapat memicu retakan. Dengan mekanisme ini, enamel mampu mencegah terjadinya propagasi retakan lebih dalam ke lapisan dentin maupun pulpa. Mekanisme penyebaran tekanan tersebut sangat penting dalam menjaga integritas struktural gigi, terutama dalam menghadapi beban mastikasi yang terjadi secara berulang sepanjang kehidupan seseorang (Borrero-Lopez et al., 2020).



dungan terhadap tekanan mekanis, enamel juga memiliki fungsi agresif kimiawi. Lapisan ini berperan sebagai penghalang utama film bakteri dan paparan zat kimia berbahaya yang merupakan sumber mikroorganisme di dalam rongga mulut. Salah satu produk metabolisme bakteri adalah asam laktat, yang dapat menurunkan pH dan memicu proses demineralisasi enamel. Dalam kondisi pH rendah, kristal hidroksiapatit pada enamel akan larut secara perlahan,

mengakibatkan terbentuknya lesi awal karies. Untuk memperkuat ketahanan enamel terhadap kondisi tersebut, suplementasi fluoride secara topikal telah terbukti menjadi langkah preventif yang efektif. Fluoride akan berinteraksi dengan ion kalsium dan fosfat pada permukaan enamel, membentuk lapisan kalsium fluorida yang bersifat protektif. Lapisan ini tidak hanya memperlambat laju demineralisasi, tetapi juga mendukung proses remineralisasi dengan meningkatkan penyerapan ion mineral ke dalam jaringan enamel yang melemah. Dengan demikian, enamel menjadi lebih tahan terhadap serangan asam dan kerusakan jangka panjang dapat dicegah secara efektif (Koontongkaew et al., 2024).

Enamel terbentuk selama masa perkembangan gigi oleh sel khusus yang disebut *ameloblast*. Sel-sel ini berperan penting dalam proses amelogenesis, yaitu pembentukan lapisan enamel yang kuat dan tahan lama. Namun, proses ini hanya berlangsung dalam tahap pertumbuhan gigi, dan setelah proses mineralisasi enamel selesai, ameloblast akan mengalami degenerasi dan tidak tersisa pada usia dewasa. Hal ini menyebabkan enamel tidak memiliki kemampuan regeneratif secara alami. Oleh karena itu, setiap kerusakan yang terjadi pada enamel bersifat permanen dan tidak dapat diperbaiki oleh tubuh secara biologis (Javaroni et al., 2024; Alghadeer et al., 2022).

Langkah-langkah preventif yang dapat diterapkan meliputi pemeliharaan kebersihan mulut secara rutin, penggunaan pasta gigi yang mengandung fluoride, serta asupan nutrisi yang mendukung kesehatan gigi dan enamel, seperti kalsium dan vitamin D. Selain itu, pengawasan terhadap kebiasaan makan, seperti mengurangi konsumsi makanan tinggi gula dan minuman asam, juga berperan penting dalam menjaga integritas enamel agar tetap utuh dan fungsional seiring waktu (Galuscan et al., 2024).

Gangguan pada proses pembentukan enamel, seperti hipoplasia, dapat menyebabkan terbentuknya enamel yang tipis, tidak sempurna, dan secara struktural lebih lemah dibandingkan enamel normal. Kondisi ini tidak hanya berdampak pada kekuatan dan ketahanan gigi, tetapi juga menimbulkan gangguan kosmetik yang dapat memengaruhi kepercayaan diri, terutama pada anak-anak. Hipoplasia enamel ditandai dengan permukaan gigi yang kasar, terdapat cekungan atau garis horizontal, dan dalam kasus yang lebih berat dapat disertai perubahan warna. Berdasarkan penelitian, prevalensi hipoplasia enamel mencapai 6,2% pada anak-anak, yang menunjukkan tingginya angka kejadian dan pentingnya perhatian terhadap kesehatan enamel sejak dini (Hussien et al., 2017).

Salah satu faktor penting yang menentukan ketahanan enamel terhadap kerusakan adalah densitas atau kerapatan dari struktur prisma enamel. Enamel dengan densitas tinggi memiliki susunan kristal hidroksiapatit yang lebih rapat dan juga lebih tahan terhadap tekanan mekanis dan serangan asam dari mulut. Densitas enamel yang tinggi terbukti memiliki hubungan penurunan risiko karies gigi. Studi menunjukkan bahwa anak-anak dengan enamel yang lebih tinggi memiliki tingkat kejadian karies yang lebih rendah. Enamel yang padat mampu bertindak sebagai penghalang efektif terhadap bakteri serta erosi yang disebabkan oleh asam dari makanan dan minuman (Kelly et al., 2020).



Terapi remineralisasi merupakan langkah penting dalam upaya menjaga dan memulihkan struktur enamel, terutama pada tahap awal pembentukan enamel atau saat enamel mengalami demineralisasi ringan. Tujuan utama dari terapi ini adalah untuk meningkatkan densitas enamel serta memperkuat struktur kristal hidroksiapatit yang menyusun enamel, sehingga enamel menjadi lebih tahan terhadap tekanan mekanis maupun serangan asam dari aktivitas bakteri mulut.

Penerapan terapi remineralisasi secara dini sangat krusial karena mampu mencegah progresivitas kerusakan enamel yang dapat berkembang menjadi karies. Dengan memperbaiki permukaan gigi yang mulai mengalami pelunakan atau kerusakan mikroskopis, terapi ini membantu mencegah terbentuknya kavitas serta mempertahankan integritas struktural gigi secara keseluruhan. Selain itu, terapi remineralisasi juga berperan dalam mengurangi sensitivitas gigi akibat eksposur dentin yang disebabkan oleh erosi enamel (Javaroni et al., 2024).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Oliinyk et al. (2024), intervensi remineralisasi pada fase awal terbukti efektif dalam meningkatkan densitas enamel, memperbaiki permukaan gigi yang rusak secara mikroskopis, serta memberikan proteksi tambahan terhadap perkembangan karies. Oleh karena itu, strategi remineralisasi tidak hanya bersifat kuratif, tetapi juga preventif dalam menjaga kesehatan gigi jangka panjang. (Oliinyk et al., 2024).

Beberapa penelitian mengenai penggunaan inovasi biomaterial nanokalsium cangkang kerang hijau dan nanokitosan kulit udang dalam peningkatan densitas enamel

Tabel 1 Data Penelitian yang menggunakan Cangkang Kerang dan Kitosan sebagai Sumber Nanokalsium dan Nanokitosan

No	Penulis dan jurnal	Tahun	Judul	Kesimpulan
1.	Zhang et al., (Journal of Dentistry/Q1) https://doi.org/10.1016/j.jdent.2019.03.006	2019	<i>Chitosan-bioglass complexes promote subsurface remineralisation of incipient human carious enamel lesions</i>	Kompleks Chitosan-bioglass menunjukkan efek positif terhadap deposisi mineral pada permukaan gigi dan dapat menjadi alternatif strategi remineralisasi pada lesi karies pada enamel serta menyebabkan efek



				desensitasi pada dentin yang terekspos.
2.	Zhang et al., (Journal of Dentistry/Q1) https://doi.org/10.1016/j.jdent.2018.02.004	2018	<i>Remineralisation of enamel white spot lesions pre-treated with chitosan in the presence of salivary pellicle</i>	Pre-treatment dengan menggunakan kitosan dapat meningkatkan remineralisasi ketika terdapat pelikel saliva.
3.	Sari & Yusuf (International Journal of Nanoelectronics and Materials/Q4) http://dx.doi.org/10.1088/1757-899X/432/1/012046	2018	<i>Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite based on Green Mussel Shells (Perna viridis) with Calcination Temperature Variation Using Precipitation Method</i>	HA didapatkan dari cangkang kerang hijau melalui metode presipitasi dengan level Ca pada suhu kalsinasi 950°C sebesar 49,5757% dengan kalsium oksida memiliki ukuran kristal terbesar
4	Dhanaraj et al., (Journal of Applied Science and Computations/Q4) ISSN NO: 1076-5131	2018	<i>Characterization of Calcium Oxide (CaO) derived from Perna viridis shell waste through solid state reaction</i>	Cangkang kerang hijau menunjukkan fase aragonite dari kalsium karbonat yang dapat diubah menjadi kalsit pada suhu 500°C dan dari hasil FT-IR menunjukkan kalsium oksida dan sedikit kalsium hidroksida
	(Polymers/Q1)	2023	<i>The Preparation and</i>	Chitosan/Calcium Phosphate memiliki



			<i>Characterization of Chitosan/Calcium Phosphate Composite Microspheres for Biomedical Applications</i>	ukuran porus and luas permukaan yang tinggi sehingga ideal untuk digunakan sebagai <i>drug carriers</i> .
6	Lazarevic et al., (Biomolecules/Q1) https://doi.org/10.3390/biom13040579	2023	<i>Antimicrobial and Osteogenic Effects of Collagen Membrane Decorated with Chitosan-Nano-Hydroxyapatite</i>	Hasil MTT menunjukkan tidak terdapat sitotoksitas pada membrane kontrol dan yang menggunakan CHI-HApNP. Pemeriksaan qPCR untuk BMP4,ALP,RUNX dan OCN menunjukkan peningkatan aktivitas osteogenik
7	Zhang et al (Dental Materials/Q1) https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.04.010	2018	<i>In-Vitro subsurface remineralization of artificial enamel white spot lesions pre-treated with chitosan</i>	Kitosan meningkatkan remineralisasi dengan menggunakan campuran bioactive glass secara tunggal maupun kompleks asam bioactive glass/polyacrylic.
8	Wahyuninurum et al., (Asia Pacific Journal of Toxicology/Q4) /apjmt.2019.14332	2019	<i>Cytotoxicity of Chitosan Derived from Shrimp for Bone Scaffold on Adipose Tissue-Derived</i>	Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa scaffold kitosan tidak memiliki efek toksik dan dapat



			<i>Mesenchymal Stem Cells</i>	digunakan sebagai bahan biomaterial yang kompatibel untuk rekayasa jaringan tulang
9	El-Naggar et al., (Aquaculture Reports/Q1) https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100628	2021	<i>Efficacy of dietary chitosan and chitosan nanoparticles supplementati on on health status of Nile tilapia, Oreochromis niloticus (L.)</i>	Kitosan dan Nanopartikel Kitosan memiliki kemampuan untuk meningkatkan status nutrisi dari protein berbasis tanaman
10	Soares et al., (Reserch Reports: Biomaterials & Bioengineering/Q4) DOI: 10.1177/00220345211024207	2021	<i>Chitosan-Calcium-Simvastatin Scaffold as an Inductive Cell-Free Platform</i>	Kombinasi bahan Kitosan-Kalsium-Simvastatin memiliki kemampuan sebagai <i>scaffold</i> yang berdiferensiasi menjadi <i>Dental Pulp Cells</i> (DPC) dengan meningkatkan kemampuan lingkungan mikro untuk menarik sel pulpa gigi ke permukaan sehingga meningkatkan efek odontoblastik.



hadap inovasi biomaterial nanokalsium cangkang kerang hijau dan idang ini masih terbatas, sehingga peneliti tertarik untuk melakukan p kombinasi bahan biomaterial ini khususnya dalam model hewan

untuk mengetahui efektivitas bahan tersebut dalam pembentukan densitas enamel gigi.

1.2 Landasan Teori

1.2.1 Pembentukan Enamel pada Anak

Proses pembentukan enamel dimulai sejak masa kehamilan dan berlanjut hingga awal masa kanak-kanak. Fase ini merupakan tahapan yang sangat penting dalam perkembangan gigi, khususnya dalam membentuk jaringan yang paling keras di tubuh manusia, yaitu enamel gigi. Enamel memiliki peran protektif yang vital terhadap struktur dalam gigi, seperti dentin dan pulpa, serta membantu dalam fungsi mastikasi sehari-hari (Wright, 2023)

Pembentukan enamel diawali melalui dua fase utama, yaitu fase inisiasi dan fase sekresi, yang terjadi selama masa perkembangan intrauterin. Pada fase inisiasi, terjadi diferensiasi sel epitel menjadi ameloblast, yaitu sel khusus yang bertanggung jawab dalam proses sekresi matriks protein enamel. Sel ameloblast ini akan menghasilkan protein-protein utama seperti amelogenin, enamelin, dan ameloblastin, yang berperan sebagai kerangka (scaffold) awal untuk proses deposisi mineral selanjutnya (Wright, 2023; Bai et al., 2020).

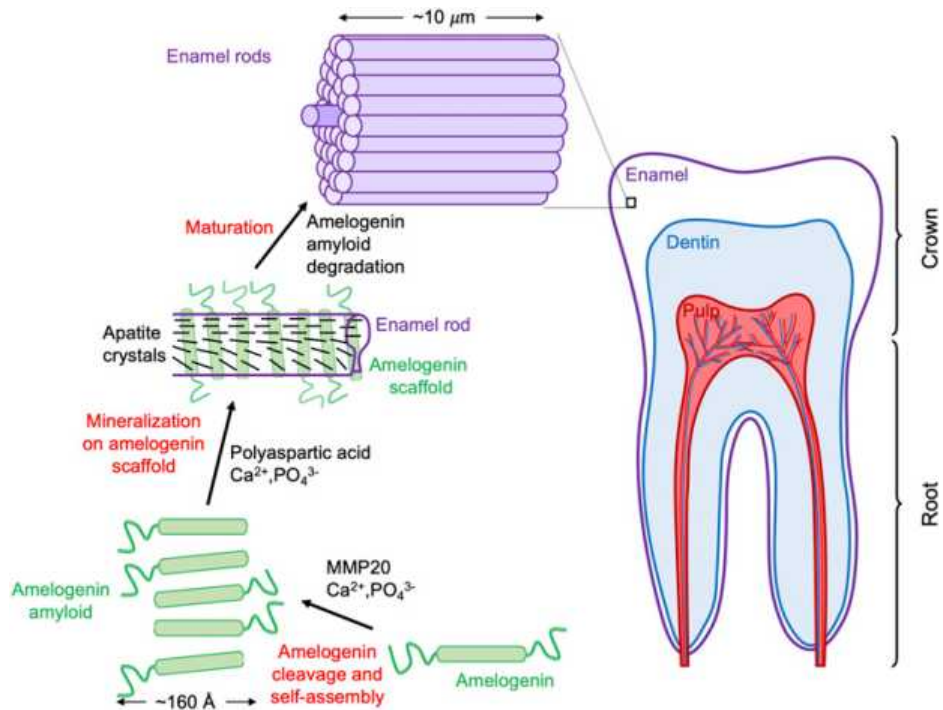
Selama fase sekresi, ameloblast secara aktif mensekresikan matriks protein enamel, khususnya amelogenin, yang kemudian akan mengatur dan mengarahkan pertumbuhan serta orientasi kristal hidroksiapatit. Kristal hidroksiapatit yang terbentuk ini akan mengalami pemanjangan dan penataan secara paralel dalam struktur prismatic enamel yang khas. Proses ini sangat menentukan kekuatan, kekompakan, dan sifat fungsional dari enamel yang terbentuk. Amelogenin berperan penting dalam mengontrol ukuran dan bentuk kristal, sehingga pembentukan enamel yang normal sangat bergantung pada ekspresi dan aktivitas protein ini (Bai et al., 2020; Welborn, 2020). Sekresi matrix protein pada ruang enamel terjadi untuk mencapai mineralisasi yang sempurna pada fase maturasi (Li et al., 2022).

Fase selanjutnya dalam proses pembentukan enamel adalah fase transisi. Pada tahap ini, terjadi perubahan signifikan dalam komposisi matriks enamel yang telah terbentuk sebelumnya. Ameloblast mengalami perubahan morfologi dan fungsi, dari sel yang aktif mensekresikan protein menjadi sel yang berperan dalam pengaturan keseimbangan mineralisasi. Pada fase transisi ini, terjadi penurunan kandungan protein matriks dan peningkatan relatif kandungan mineral, yang menjadi tahap penting dalam mempersiapkan enamel menuju fase pengerasan akhir (Bai et al., 2020).

Proses setelah fase transisi, berlanjut ke fase maturasi. Fase ini ditandai dengan aktivitas ameloblast yang berfokus pada pemindahan air dan penguraian serta komponen organik dari matriks enamel. Pengurangan komponen organik ini membuka ruang bagi ion-ion mineral, seperti kalsium dan fosfat, untuk mengisi rongga-rongga tersebut dan memperbesar serta memperkuat kristal hidroksiapatit yang telah terbentuk pada fase sebelumnya. Peningkatan mineralisasi dan pepadatan struktur kristal selama fase maturasi ini menghasilkan enamel yang sangat keras dan memiliki kemampuan mekanik yang tahan beban kunyah sehari-hari (Karaaslan et al., 2024).



Fase pembentukan enamel juga merupakan periode yang sangat sensitif terhadap gangguan fisiologis, seperti defisiensi nutrisi, infeksi sistemik, atau paparan toksin selama masa pertumbuhan. Gangguan-gangguan tersebut dapat menyebabkan kelainan struktur atau kualitas enamel, seperti hipomineralisasi atau hipoplasia, yang akan berpengaruh jangka panjang terhadap kekuatan dan ketahanan gigi. Kerentanan enamel terhadap kerusakan ini menjadi alasan pentingnya upaya preventif sejak dini, terutama pada anak-anak selama fase pertumbuhan gigi (Welborn, 2020).

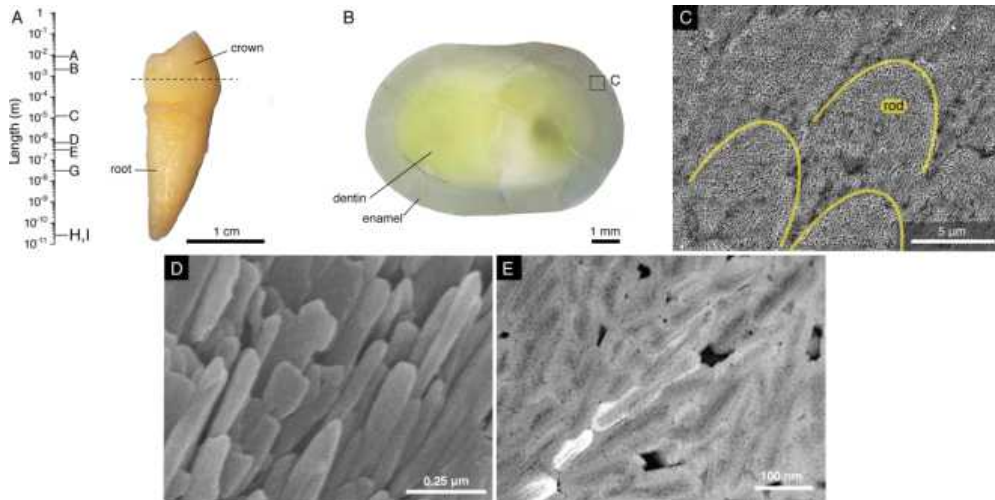


Gambar 1 Ilustrasi Pembentukan Enamel

Sumber : Welborn, (2020) "Enamel synthesis explained" Available at: <http://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.2014394117>

Pembentukan enamel tersebut dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor dalam pembentukannya seperti genetik dan lingkungan. Faktor genetik dapat mempengaruhi proses amelogenesis yang dapat mempengaruhi ketebalan enamel dan mineralisasi, seperti kondisi *amelogenesis imperfecta* (Wright, 2023 ; Desoutter, 2023). Faktor lingkungan seperti defisiensi nutrisi, penyakit pada masa kanak-kanak, serta obat-obatan tertentu yang dikonsumsi pada ibu di masa tersebut dapat menyebabkan perubahan permanen pada struktur enamel (Javaroni et al., 2024).

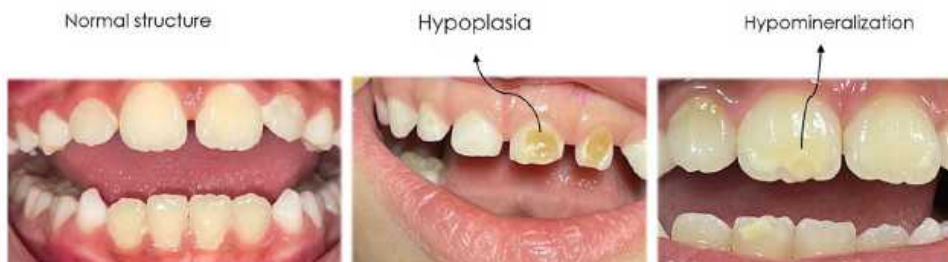




Gambar 2 Mikrostruktur Enamel Manusia (A) Premolar Manusia, (B) Potongan Paralel, (C) Enamel Rods, (D) Gambaran SEM, (E) Potongan Lintang dari kristal enamel

Sumber : Free, R. et al. (2020) "Mapping Crystallographic (Dis)Order and Crystal Properties in Human Enamel," in *Microscopy and Microanalysis*. Cambridge University Press. Available at: <https://doi.org/10.1017/S1431927620014932>

Kerusakan pada enamel gigi umumnya disebabkan oleh paparan asam, baik yang berasal dari konsumsi makanan dan minuman bersifat asam, kebersihan rongga mulut yang buruk, maupun produk sampingan (byproduct) dari aktivitas bakteri. Aktivitas bakteri dalam rongga mulut, terutama dari spesies seperti *Streptococcus mutans*, akan memfermentasi sisa makanan dan menghasilkan asam laktat, yang menurunkan pH lingkungan mulut. Kondisi ini menyebabkan proses demineralisasi, yakni pelarutan mineral hidroksiapatit (HA) pada permukaan enamel, yang mengakibatkan melemahnya struktur enamel dan peningkatan risiko terjadinya karies (Fan et al., 2023).



Gambar 3 Gangguan pada Enamel



, J.B. et al. (2024) "teeth can tell a story about childhood! young viewers: caroline," *Frontiers for Young Minds*, 12.

ventif demineralisasi dapat dilakukan dengan menggunakan bahan telah terbukti efektif. Fluorida yang diaplikasikan secara topikal nish atau gel akan berinteraksi dengan kristal hidroksiapatit pada

enamel, membentuk fluoroapatit (FA). Fluoroapatit memiliki sifat yang jauh lebih resisten terhadap serangan asam dibandingkan hidroksiapatit biasa, sehingga mampu meningkatkan ketahanan enamel terhadap kondisi lingkungan asam dan memperkuat struktur mineral gigi (Fan et al., 2023; Abdulhussain & Haidar, 2023).

Selain penggunaan fluorida, kebiasaan menjaga kebersihan gigi dan mulut secara rutin melalui menyikat gigi dua kali sehari, penggunaan benang gigi, dan pembatasan konsumsi makanan manis atau asam berperan penting sebagai tindakan preventif. Perilaku ini membantu menjaga kestabilan pH dalam rongga mulut agar tetap netral, sehingga proses demineralisasi dapat ditekan dan enamel tetap terjaga kekuatannya dalam jangka panjang (Galuscan et al., 2024).

Modalitas perawatan yang bersifat reparatif pada enamel saat ini semakin berkembang dengan pendekatan yang meniru proses biomineralisasi alami, salah satunya adalah melalui teknik mineralisasi biomimetik. Teknik ini melibatkan penggunaan peptida *self-assembling* serta protein dengan kompleksitas rendah yang berfungsi untuk menstimulasi pertumbuhan kristal hidroksiapatit (HA) pada permukaan enamel. Komponen-komponen tersebut bekerja dengan membentuk scaffold atau matriks awal yang menyerupai struktur alami tempat terbentuknya kristal enamel pada tahap perkembangan gigi. Proses ini tidak hanya membantu memperbaiki struktur mikro dari enamel yang telah mengalami demineralisasi, tetapi juga memperkuat permukaan gigi sehingga lebih tahan terhadap paparan asam dan tekanan mekanis. Selain itu, permukaan enamel hasil biomineralisasi biomimetik juga menunjukkan peningkatan resistensi terhadap adesi bakteri, yang berkontribusi dalam mencegah pembentukan biofilm dan perkembangan karies di masa mendatang (Chang et al., 2022).

1.2.1.1 Suplemen Enamel terhadap Densitas Enamel

Suplementasi enamel pada anak-anak memiliki tujuan utama untuk meningkatkan proses remineralisasi enamel dan mencegah terjadinya karies gigi sejak dini. Pendekatan ini dapat dilakukan dengan pemberian bahan-bahan seperti peptida bioaktif, fluorida, kalsium fosfat, serta vitamin D yang mendukung pembentukan dan pemeliharaan struktur enamel yang sehat.

Salah satu peptida yang menjanjikan dalam hal ini adalah *amelogenin-inspired peptide* yang mampu menstimulasi remineralisasi dengan cara meniru proses alami pembentukan enamel. Ketika dikombinasikan dengan larutan kalsium fosfat, peptida ini mendorong nukleasi dan pertumbuhan kristal hidroksiapatit pada area enamel yang mengalami demineralisasi. Kombinasi tersebut menjadi lebih efektif ketika ditambahkan fluoride, membentuk kompleks kalsium fosfat fluoride yang terbukti meningkatkan sifat mekanis enamel seperti kekerasan mikro (*microhardness*) dan modulus elastisitas bahkan dalam kondisi pH yang bervariasi (Sakr et al., 2024).



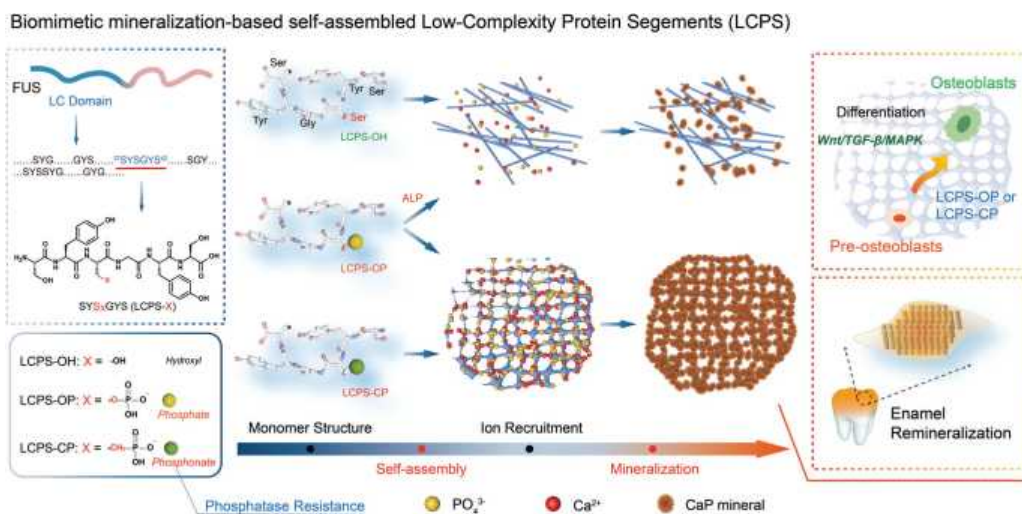
Salah satu bahan remineralisasi yang telah banyak diteliti dan digunakan adalah *peptide-Amorphous Calcium Phosphate* (CPP-ACP), yang memiliki kemampuan dalam mencegah demineralisasi serta memperkuat enamel dan mencegah terbentuknya karies, terutama pada gigi sulung anak-anak (Liu et al., 2020). Meski demikian, fluorida tetap menjadi pilihan paling umum saat ini, terutama dalam bentuk pasta gigi anak, karena

ketersediaannya yang luas dan efektivitasnya dalam meningkatkan resistensi enamel terhadap asam (Chibinski et al., 2023).

Langkah preventif juga dapat dimulai sejak masa kehamilan. Suplementasi vitamin D pada ibu hamil terbukti dapat menurunkan risiko terjadinya defek enamel dan kelainan bentuk gigi pada anak. Vitamin D berperan penting dalam proses mineralisasi jaringan keras dan regulasi metabolisme kalsium yang esensial bagi perkembangan struktur gigi janin (Tester & Capaldi, 2020).

Fungsi lain dari suplementasi enamel adalah untuk mencapai densitas enamel yang ideal, sehingga meningkatkan ketahanan terhadap kerusakan akibat faktor mekanis maupun kimiawi. Densitas enamel yang optimal sangat penting karena berperan langsung dalam kemampuan gigi untuk bertahan dari tekanan kunyah serta mencegah terjadinya demineralisasi dan penetrasi bakteri yang dapat menyebabkan karies. Salah satu bahan dasar yang sangat ideal untuk mendukung fungsi ini adalah bahan berbasis hidroksiapatit (HA).

Hidroksiapatit memiliki struktur kristal yang menyerupai komposisi mineral alami enamel, sehingga sangat efektif dalam memicu proses remineralisasi serta memperkuat struktur kristal HA yang telah ada pada jaringan gigi. Suplementasi dengan HA memungkinkan terjadinya integrasi mineral secara biomimetik ke dalam permukaan enamel, sehingga membantu memperbaiki kerusakan mikro dan meningkatkan kekuatan enamel secara keseluruhan (Bai et al., 2020; Batubara & Sitompul, 2024; Essa et al., 2023).



Gambar 4 Ilustrasi perbaikan enamel



Optimized using
trial version
www.balesio.com

et al. (2022) "Phosphorylated and Phosphonated Low-Complexity Segments for Biomimetic Mineralization and Repair of Tooth Enamel," *Science*, 9(6). Available at: <https://doi.org/10.1002/advs.202103829>.

HA juga telah terbukti mampu memperbaiki struktur enamel yang memberikan perlindungan terhadap pengaruh asam dari konsumsi aktivitas mikroba dalam rongga mulut. Oleh karena itu, formulasi semakin banyak digunakan dalam produk perawatan gigi seperti pasta

gigi, gel, maupun larutan remineralisasi, untuk memberikan perlindungan tambahan sekaligus perbaikan struktur enamel yang optimal.

1.2.2 Nanokalsium dan Nanokitosan dalam Densitas Enamel

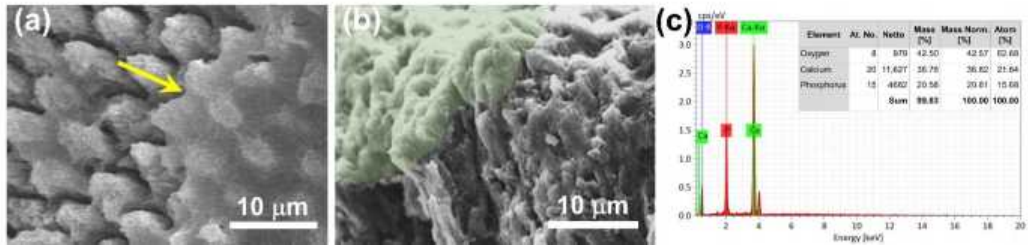
Nanokalsium merupakan bentuk nanopartikel dari kalsium yang telah dikembangkan untuk berbagai aplikasi medis dan biologis karena ukuran partikelnya yang sangat kecil serta sifatnya yang aktif secara biologis. Salah satu manfaat utama dari nanokalsium adalah kemampuannya untuk meregulasi homeostasis kalsium dalam tubuh. Ini penting dalam menjaga keseimbangan kalsium yang dibutuhkan untuk fungsi fisiologis seperti pembentukan tulang, kontraksi otot, serta fungsi enzim dan neurotransmitter (Bai et al., 2022).

Selain itu, nanokalsium juga menunjukkan potensi besar sebagai carrier atau penghantar obat karena luas permukaan spesifiknya yang tinggi, yang memungkinkan ikatan yang efisien dengan berbagai molekul terapeutik. Nanopartikel ini dapat dimodifikasi secara kimia untuk mengontrol pelepasan obat secara bertahap di dalam tubuh, sehingga meningkatkan efektivitas terapi dan mengurangi efek samping. Di bidang rekayasa jaringan, nanokalsium digunakan sebagai bahan substitusi tulang karena sifatnya yang menyerupai mineral tulang alami dan biokompatibilitasnya yang tinggi, memungkinkan integrasi yang baik dengan jaringan tubuh tanpa menimbulkan reaksi imun yang merugikan (Sokolova & Epple, 2021).

Bahan nanokalsium telah digunakan secara luas dalam bidang kedokteran gigi preventif dan restoratif untuk meningkatkan densitas serta memperbaiki kerusakan pada enamel. Salah satu bentuk aplikatif dari bahan ini adalah *Amorphous Nanocalcium Phosphate* (NACP), yang menunjukkan efikasi tinggi dalam mendukung remineralisasi. NACP memiliki kemampuan untuk menembus serat kolagen dan kemudian bertransformasi menjadi kristal hidroksiapatit (HA), yang merupakan komponen utama dari enamel dan dentin. Transformasi ini tidak hanya memicu proses perbaikan dentin yang mengalami demineralisasi, tetapi juga secara signifikan meningkatkan kekerasan mikro dari enamel yang tererosi. Selain itu, NACP juga berperan sebagai *reservoir* kalsium aktif yang dapat dilepaskan ke area yang membutuhkan perbaikan, sehingga memperkuat struktur mineral gigi secara berkelanjutan (Gao et al., 2022).

Selain NACP, bahan lain yang juga berbasis nanokalsium dan menunjukkan potensi tinggi adalah *Calcium Phosphate Nanoclusters* (CaP NCs). Bahan ini disintesis secara khusus untuk menangani kondisi erosi enamel akibat paparan asam berlebih. Uji kekerasan mikro menunjukkan bahwa enamel yang dirawat dengan CaP NCs mengalami perbaikan struktural yang hampir menyerupai enamel alami. Hal ini menunjukkan kemampuan bahan tersebut dalam meningkatkan densitas, kekuatan mekanik, serta integritas struktural enamel yang rusak. Dengan sifat biokompatibel CaP NCs menjadi pilihan menjanjikan dalam strategi remineralisasi perawatan gigi yang lebih konservatif dan berkelanjutan (Wang et





Gambar 5 Efek Mikroskopis aplikasi CaP NCs (A) Enamel Rod yang dilapisi CAP, (B) Potongan Lintang SEM Enamel setelah perbaikan dengan CaP NCs, (C) Analisis EDX Enamel setelah aplikasi CaP NCs

Sumber : Wang, C.H. *et al.* (2022) "Calcium Phosphate Nanoclusters for the Repair of Tooth Enamel Erosion," *Nanomaterials*, 12(12). Available at: <https://doi.org/10.3390/nano12121997>.

Nanokitosan merupakan bentuk nanopartikel dari kitosan, yaitu biopolimer alami yang diperoleh melalui proses deasetilasi kitin dengan komponen utama dari eksoskeleton hewan laut seperti udang dan kepiting. Dalam bentuk nano, kitosan menunjukkan peningkatan signifikan dalam sifat fisiokimiawinya, terutama karena skala distribusi *surface-to-volume ratio* yang sangat tinggi. Hal ini memungkinkan peningkatan kelarutan, stabilitas, dan kemampuan adhesi terhadap permukaan biologis, menjadikannya lebih efektif dibandingkan bentuk bulk-nya (Jha & Mayanovic, 2023).

Secara medis, nanokitosan banyak digunakan sebagai sistem penghantar obat (*drug delivery system*). Kemampuan nanokitosan untuk mengenkapsulasi berbagai molekul terapeutik, baik yang bersifat hidrofobik maupun hidrofilik, menjadikannya pilihan ideal untuk perawatan berbasis pelepasan obat yang terkontrol. Selain itu, sifat biokompatibel dan biodegradabel dari nanokitosan membuatnya aman digunakan dalam tubuh manusia, tanpa memicu reaksi toksik atau inflamasi yang merugikan (Karayianni et al., 2023).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa aplikasi kitosan mampu meningkatkan densitas enamel melalui mekanisme remineralisasi yang efektif. Kitosan, yang memiliki muatan positif, dapat berikatan dengan permukaan enamel yang terdegradasi akibat demineralisasi dan menarik ion kalsium serta fosfat ke area tersebut. Hal ini memfasilitasi pembentukan kembali kristal hidroksiapatit, yang merupakan komponen utama dalam struktur enamel. Ketika digunakan bersama bahan bioaktif seperti bioactive glass dan polyacrylic acid (PAA), terbentuk kristal hidroksiapatit tipe B dengan peningkatan kekerasan permukaan enamel serta struktur morfologis yang lebih padat dan terorganisir (Zhang et al., 2018).



ingkatkan kekerasan dan kepadatan mineral enamel, kitosan juga mampu dalam menutup area lesi awal berupa white spot. Partikel nanokitosan menembus ke dalam struktur enamel mikro dan membawa ion kalsium dan fosfat, sehingga remineralisasi berlangsung tidak hanya di permukaan enamel (Zhang et al., 2019).

Keunggulan kitosan sebagai bahan remineralisasi juga terletak pada sifatnya yang biokompatibel, tidak toksik, dan mampu berikatan dengan jaringan keras gigi tanpa menyebabkan iritasi. Dibandingkan dengan agen remineralisasi konvensional seperti fluorida, kitosan tidak menimbulkan risiko toksisitas sistemik, menjadikannya pilihan yang aman untuk aplikasi jangka panjang dalam perawatan gigi. Kitosan juga mampu merangsang regenerasi kolagen dan meningkatkan pembentukan hidroksiapatit, baik pada enamel maupun dentin, yang memperkuat struktur jaringan keras gigi secara keseluruhan (Nimbeni et al., 2021). Dengan demikian, kitosan berpotensi besar sebagai agen aktif dalam strategi minimal invasif untuk memperbaiki dan mempertahankan struktur enamel yang sehat.

1.2.3 Cangkang Kerang Hijau (*Perna viridis*) dan Kulit Udang (*Litopenaeus vannamei*) sebagai sumber Nanokalsium dan Nanokitosan

1.2.3.1 Cangkang Kerang Hijau sebagai Sumber Nanokalsium

Kalsium merupakan mineral esensial yang berperan penting dalam proses mineralisasi enamel, dan salah satu sumber alaminya yang potensial adalah cangkang kerang hijau (*Perna viridis*). Cangkang ini mengandung kalsium karbonat (CaCO_3) dalam jumlah tinggi yang dapat diproses menjadi hidroksiapatit (HA), yaitu komponen utama dari jaringan keras seperti tulang dan gigi. Hidroksiapatit yang dihasilkan dari *Perna viridis* memiliki rasio kalsium terhadap fosfor (Ca/P) yang mendekati rasio alami yang ditemukan pada tulang dan enamel gigi, sehingga menunjukkan kesesuaian dan biokompatibilitas yang tinggi untuk aplikasi biomedis, termasuk dalam bidang kedokteran gigi sebagai bahan remineralisasi atau pelapis gigi (Irfa'i et al., 2022; Edahwati et al., 2023).



Gambar 6 Kerang Hijau (*Perna viridis*)

Sumber : Dos Santos, H.S., Bertollo, J.C. and Creed, J.C. (2023) "Range extension of the mussel *Perna viridis* (Linnaeus, 1758) into a Marine Extractive Brazil," *BioInvasions Records*, 12(1), pp. 208–222. Available at: <https://doi.org/10.3391/bir.2023.12.1.17>.



Optimized using
trial version
www.balesio.com

manfaat biomedisnya, urgensi pemanfaatan cangkang kerang hijau terkait dengan isu lingkungan. Limbah cangkang dari industri pengolahan berpotensi menjadi sumber polusi jika tidak dikelola dengan baik. Oleh

karena itu, pemanfaatan limbah cangkang ini sebagai bahan dasar pembentukan HA tidak hanya menawarkan solusi efektif dan efisien secara medis, tetapi juga mendukung upaya pengelolaan limbah yang ramah lingkungan. Pendekatan ini juga memberikan nilai tambah dari segi ekonomi dengan mendaur ulang limbah menjadi produk bernilai tinggi yang dapat digunakan dalam industri kesehatan dan kedokteran gigi (Ismail et al., 2022; Prihanto et al., 2022).

Cangkang Kerang Hijau (*Perna viridis*) merupakan limbah industri perikanan yang berpotensi menjadi sumber polusi lingkungan jika tidak dikelola dengan baik. Namun, limbah ini memiliki potensi besar sebagai bahan baku biomaterial karena kandungan kalsiumnya yang tinggi. Karakterisasi menggunakan *Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)*, *X-ray Diffraction (XRD)*, dan *Thermogravimetric-Differential Thermal Analysis (TG-DTA)* mengungkapkan bahwa cangkang ini mengandung *calcium oxide (CaO)*, yang dapat digunakan sebagai prekursor untuk sintesis *hydroxyapatite (HA)*. Hidroksiapatit adalah komponen mineral utama tulang yang banyak digunakan dalam rekayasa jaringan dan suplementasi osteogenik karena sifatnya yang biokompatibel dan osteokonduktif (Dhanaraj et al., 2018; Sari & Yusuf, 2018).

Proses ekstraksi kalsium dari cangkang *Perna viridis* melibatkan kalsinasi dan deproteinasi untuk mengubah kalsium karbonat (CaCO_3) menjadi kalsium oksida (CaO). Proses kalsinasi dilakukan pada suhu tinggi untuk menghilangkan bahan organik dan mengonversi mineral kalsium menjadi bentuk aktif yang siap digunakan sebagai bahan dasar formulasi hidroksiapatit (Usman et al., 2020).

Kandungan cangkang kerang hijau memiliki kandungan kalsium karbonat dengan kandungan kalsium 95,7%-98,2%. Sehingga merupakan salah satu sumber kalsium alami yang tinggi (Irfai'l et al., 2022). Kandungan kalsium dari cangkang *perna viridis* berada dalam bentuk aragonite dan kalsit yang merupakan polimorf dari kalsium karbonat, sehingga dapat digunakan sebagai suplemen makanan dan kompatibel dengan fisiologi manusia (Liao et al., 2019).

1.2.3.2 Kulit Udang sebagai Sumber Nanokitosan

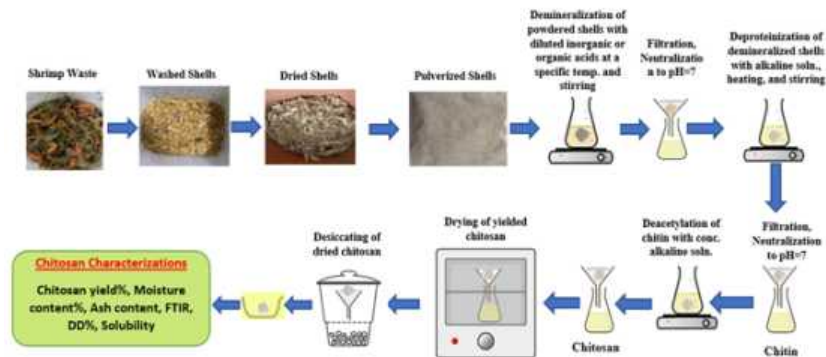
Kulit udang merupakan salah satu sumber alami utama kitin yang dapat dimanfaatkan secara optimal untuk menghasilkan kitosan. Proses konversi kitin menjadi kitosan dilakukan melalui tahap deasetilisasi, yang diawali dengan proses demineralisasi dan deproteinasi menggunakan larutan sodium hidroksida (NaOH). Tahap ini bertujuan untuk menghilangkan kandungan mineral serta protein yang menempel pada struktur kitin, sehingga menghasilkan kitosan yang lebih murni, larut dalam larutan asam ringan, dan memiliki aktivitas biologis yang lebih tinggi (Boonmahitthisud et al., 2023).



Ekstraksi kitosan dari kulit udang dilakukan secara kimiawi dengan NaOH, yaitu demineralisasi untuk menghilangkan kandungan kalsium, deproteinasi untuk menghilangkan protein, dan deasetilisasi untuk mengubah struktur kitosan yang aktif secara biologis (Hosney et al., 2022). Kulit udang memiliki potensi besar sebagai bahan baku karena mampu menghasilkan kitosan yang signifikan, yaitu mencapai 33,53% dari total limbah padat industri perikanan udang (Liyana et al., 2022). Namun, kualitas akhir kitosan

sangat dipengaruhi oleh kelembapan bahan baku serta derajat deasetilisasi yang dicapai dalam proses tersebut, yang menentukan tingkat kemurnian dan bioaktivitas kitosan (Hosney et al., 2022 ; Chik et al., 2022).

Keunggulan utama dari kitosan sebagai biomaterial adalah sifat biokompatibel dan biodegradabelnya yang tinggi. Kedua sifat ini menjadikan kitosan sangat ideal untuk berbagai aplikasi medis dan farmasi, termasuk sebagai bahan pembawa obat, pembalut luka, serta bahan dalam rekayasa jaringan (Junianto et al., 2021).



Gambar 7 Proses mendapatkan Kitosan dari Kulit Udang

Sumber : Hosney, A., Ullah, S. and Barčauskaitė, K. (2022) “A Review of the Chemical Extraction of Chitosan from Shrimp Wastes and Prediction of Factors Affecting Chitosan Yield by Using an Artificial Neural Network,” *Marine Drugs*. MDPI. Available at: <https://doi.org/10.3390/md20110675>

Setelah sintesis, nanopowder kitosan dapat dikarakterisasi menggunakan *X-ray diffraction* (XRD) untuk mengidentifikasi struktur kristal dan *scanning electron microscopy* (SEM) untuk mengamati morfologi serta dimensi partikel (Paul et al., 2022). Karakterisasi ini penting untuk memastikan kualitas dan konsistensi nanokitosan yang dihasilkan, terutama dalam aplikasi biomedis dan regeneratif.

Dibandingkan dengan kitosan dalam bentuk bulk, nanokitosan memiliki luas permukaan yang lebih besar dan reaktivitas yang lebih tinggi. Hal ini meningkatkan sifat mekanis dan bioaktivitasnya, menjadikannya ideal sebagai bahan *scaffold* untuk rekayasa jaringan. Partikel berukuran nano memungkinkan interaksi yang lebih baik dengan sel, meningkatkan adhesi seluler, proliferasi, dan diferensiasi osteogenik, sehingga mempercepat proses penyembuhan dan regenerasi jaringan keras maupun lunak (Paul et al., 2022).



nerupakan jaringan keras yang paling banyak mengandung mineral dan berperan penting dalam melindungi gigi dari pengaruh mekanis. Enamel tidak memiliki kemampuan regeneratif sehingga terjadi bersifat permanen. Salah satu strategi preventif dan restoratif

yang sedang berkembang adalah penggunaan bahan alami berbasis nanoteknologi yang mampu meningkatkan remineralisasi dan densitas enamel.

Nanokalsium dari cangkang kerang hijau (*Perna viridis*) merupakan sumber kalsium karbonat alami yang dapat diolah menjadi bentuk nano untuk meningkatkan bioavailabilitasnya. Sementara itu, nanokitosan dari kulit udang memiliki sifat antimikroba, biokompatibel, dan mampu mengikat ion kalsium serta fosfat, menjadikannya kandidat ideal dalam proses pembentukan kembali struktur enamel. Penggunaan kedua bahan ini dalam bentuk suplementasi berpotensi memberikan efek sinergis dalam meningkatkan densitas enamel.

Berdasarkan penjabaran dan latar belakang tersebut dirumuskan masalah penelitian :

1. Apakah kombinasi biomaterial nanokalsium cangkang kerang hijau dan nanokitosan kulit udang dapat meningkatkan densitas enamel gigi pada tikus Wistar jantan (*Rattus norvegicus*)?
2. Apakah kombinasi biomaterial nanokalsium cangkang kerang hijau dan nanokitosan kulit udang lebih efektif dalam meningkatkan densitas enamel dibandingkan dengan bahan tunggal dari masing masing biomaterial yaitu nanokalsium cangkang kerang hijau atau nanokitosan kulit udang?

1.4 Tujuan dan Manfaat Penelitian

1.4.1 Tujuan Penelitian

1. Menjelaskan efektivitas kombinasi suplemen biomaterial nanokalsium cangkang kerang hijau dan nanokitosan kulit udang (*Litopenaeus vannamei*) dalam peningkatan densitas enamel pada Tikus Wistar Jantan (*Rattus norvegicus*).
2. Menjelaskan potensi masing masing bahan tunggal Nanokalsium dari Cangkang Kerang Hijau dan potensi Nanokitosan dari Kulit Udang (*Litopenaeus vannamei*) dalam peningkatan densitas enamel pada Tikus Wistar Jantan (*Rattus norvegicus*).

1.4.2 Manfaat Penelitian

1.4.2.1 Manfaat Teoritis

1. Penelitian ini memberikan kontribusi keilmuan terhadap potensi sumber alami nanokalsium dari Cangkang Kerang Hijau (*Perna viridis*) sebagai bahan untuk densitas enamel dari Tikus Wistar Jantan (*Rattus norvegicus*).
2. Penelitian ini memberikan kontribusi keilmuan terhadap potensi sumber alami nanokitosan dari Kulit Udang (*Litopenaeus vannamei*) sebagai bahan untuk meningkatkan densitas enamel dari Tikus Wistar Jantan (*Rattus norvegicus*).
3. Penelitian ini memberikan kontribusi keilmuan terhadap potensi sumber bahan kombinasi nanokalsium cangkang kerang hijau dan nanokitosan dari Kulit Udang (*Litopenaeus vannamei*) sebagai bahan untuk meningkatkan densitas enamel dari Tikus Wistar Jantan (*Rattus norvegicus*) sebagai referensi bagi peneliti lain untuk mengembangkan penelitian dengan tema yang sama



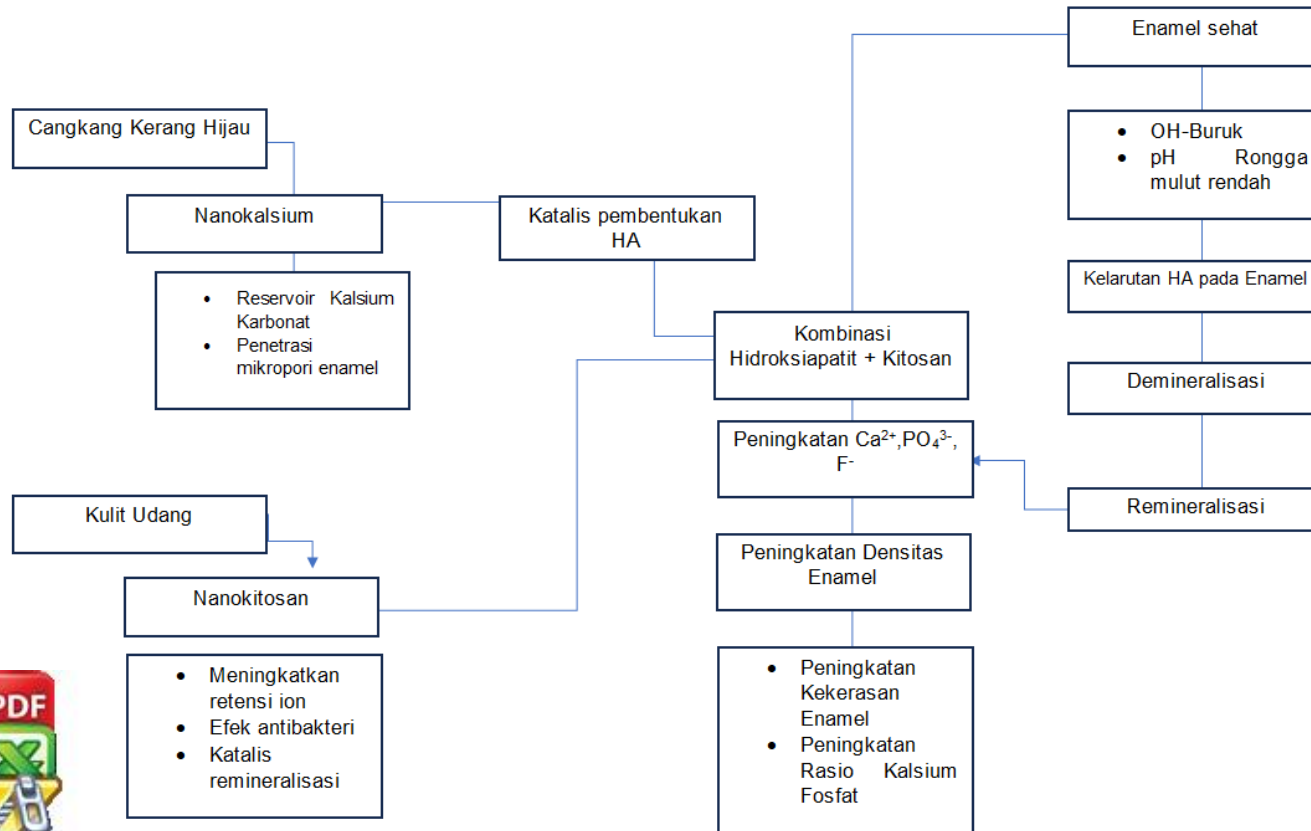
1.4.2.2 Manfaat Praktis

1. Penelitian ini diharapkan berkontribusi dalam peningkatan kesehatan gigi khususnya pada anak dengan memanfaatkan potensi penggunaan bahan limbah industri perikanan sebagai bahan suplementasi untuk meningkatkan densitas enamel pada gigi.

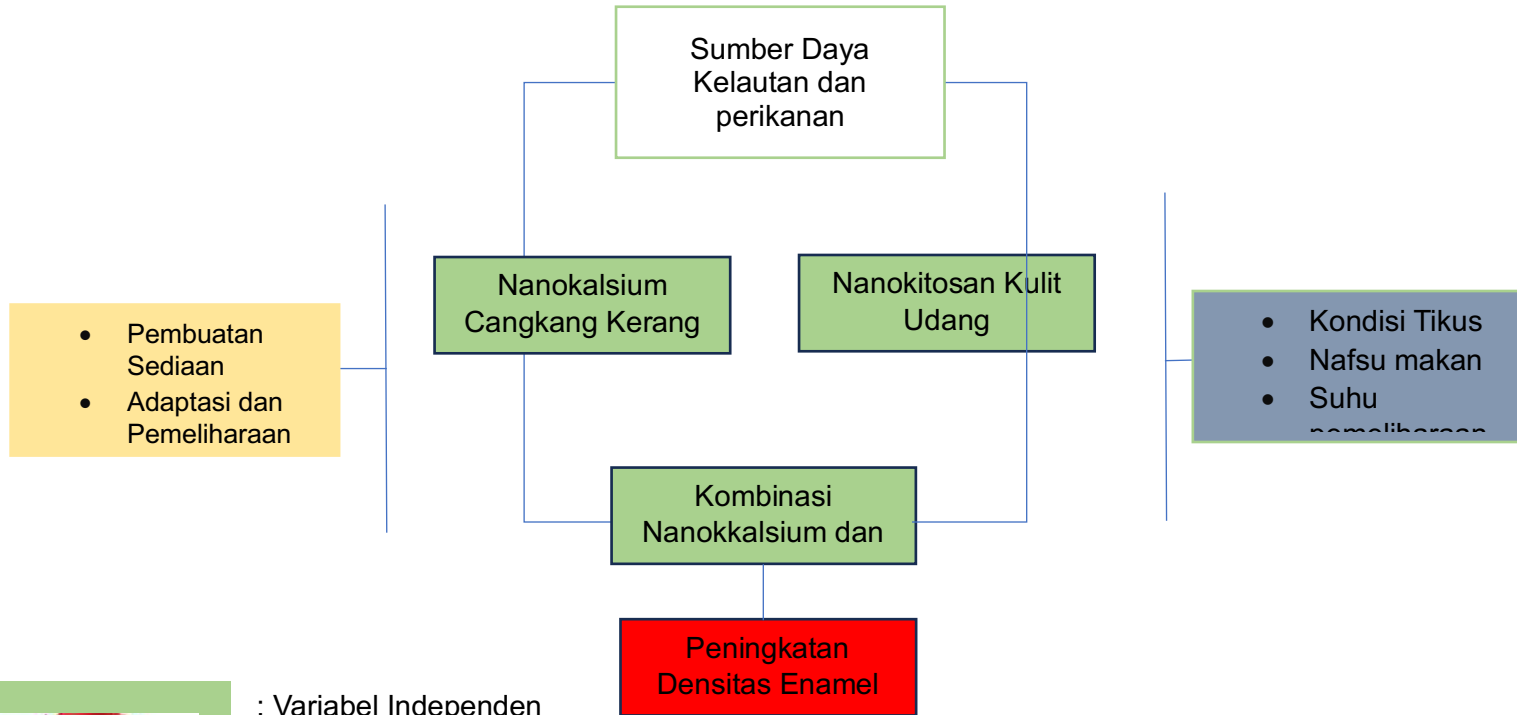






1.5 Teori Konseptual

1.5.1 Kerangka Teori



1.5.2 Kerangka Konsep



-  : Variabel Independen
-  : Variabel Dependen
-  : Variabel Terkendali
-  : Variabel Tidak terkendali

1.6 Hipotesis

- Kombinasi nanokalsium yang diekstraksi dari cangkang kerang hijau (*Perna viridis*) dan nanokitosan yang berasal dari kulit udang (*Litopenaeus vannamei*) terbukti dapat meningkatkan densitas enamel pada gigi Tikus Wistar jantan (*Rattus norvegicus*).
- Potensi masing masing bahan tunggal Nanokalsium dari Cangkang Kerang Hijau dan Nanokitosan dari Kulit Udang (*Litopenaeus vannamei*) juga dapat meningkatkan densitas enamel pada Tikus Wistar Jantan (*Rattus norvegicus*).



BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini adalah Eksperimental Laboratoris in vivo dengan design *Post-Test Only Control Group Design* dengan kelompok perlakuan dan kontrol positif serta negatif. Penelitian ini menggunakan tikus wistar jantan sebagai hewan uji untuk membandingkan efektivitas dari nanomaterial yang digunakan terhadap densitas enamel (Kusumawati et al., 2022).

2.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

2.2.1 Lokasi Penelitian

1. Pembuatan nanokalsium cangkang kerang hijau dan nanokitosan kulit udang di lakukan di Laboratorium Pengujian Kimia, Politeknik Pertanian Negeri Pangkep, Jurusan Teknologi Pertanian.
2. Pemeliharaan Hewan uji dan pemberian perlakuan serta pengambilan sampel gigi dilakukan di Laboratorium Terpadu Prodi Kedokteran Hewan Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Hasanuddin.
3. Pengukuran densitas mineral gigi tikus wistar Jantan dilakukan dengan metode SEM (Scanning Electron Microscope) dan XRD (X-Ray Diffraction) Laboratorium Terpadu Prodi Kedokteran Hewan Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Hasanuddin.

2.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Mei sampai Agustus tahun 2025

2.3 Populasi dan Sampel Penelitian

2.3.1 Populasi Penelitian

2.3.2 Sampel Penelitian

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

Kriteria Inklusi:

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



an adaptasi selama 7 hari sebelum perlakuan.

klusi:

/istar menunjukkan tanda-tanda sakit, seperti bulu kusam, rontok, n tidak aktif, dan konsumsi pakan tidak lancar.

2. Mengalami penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi di laboratorium.
3. Tikus Wistar mati selama penelitian.

2.3.3 Besar Sampel

Perhitungan besar sampel dalam penelitian ini menggunakan rumus Federer:

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

t= jumlah kelompok perlakuan
n= besar sampel per kelompok

Cara perhitungan besar sampel:
t= 6 kelompok perlakuan

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

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

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

$$4n \geq 19$$

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

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

1. Kelompok kontrol negatif: diberi pakan standar 2 kali sehari dan aquades selama 30 hari
2. Kelompok kontrol positif: diberi pakan standar ditambah susu 2 kali sehari dan aquades selama 30 hari
3. Kelompok perlakuan 1: diberi pakan standar ditambah sediaan nanokalsium cangkang kerang hijau 2 kali sehari dan aquades selama 30 hari
4. Kelompok perlakuan 2: diberi pakan standar ditambah sediaan nanokitosan kulit udang 2 kali sehari dan aquades selama 30 hari
5. Kelompok perlakuan 3: diberi pakan standar ditambah sediaan nanokalsium cangkang kerang hijau dan nanokitosan kulit udang 2 kali sehari dan aquades selama 30 hari.



nelitian

elitian

it untuk membuat nanokalsium cangkang kerang hijau dan osan kulit udang

- a) Alat penghancur: Blender atau alat penghancur bahan
 - b) Alat penggiling: Ball mill atau alat penggilingan nano
 - c) Penyaring: Saringan dan kertas saring
 - d) Pengukur kadar air: Moisture balance (Citizen)
 - e) Pemisahan partikel: Centrifuge
 - f) Pemanas: Hot plate atau pemanas
 - g) Wadah reaksi: Beaker
 - h) Pengaduk magnetik: Magnetic stirrer
 - i) Alat ukur volume: Pipet
 - j) Pengukur pH: pH meter
 - k) Peralatan laboratorium umum: Glassware set
 - l) Pemeriksaan morfologi: Kaca pembesar/mikroskop cahaya
 - m) Pengukur massa: Timbangan digital
 - n) Pengeringan sampel: Oven (Memmert)
2. Alat untuk perlakuan hewan uji
- a) Kandang: Kandang plastik
 - b) Penghalang atau pembatas: Kawat
 - c) Peralatan makan dan minum: Tempat makan dan minum tikus
 - d) Alat pengukur dosis: Timbangan untuk menghitung dosis nanokalsium cangkang kerang hijau dan nanokitosan kulit udang
 - e) Alat pemberian bahan: Sonde lambung
 - f) Alat ukur volume: Gelas ukur
3. Alat untuk dekaputasi
- a) Overdose anestesi
 - b) Alat pemotong: Gunting bedah, scalpel
 - c) Alat penjepit: Pinset bedah, forceps
 - d) Retraktor
 - e) Alat pemotong tulang: Gergaji bedah atau bone cutter
 - f) Wadah: Petri dish
 - g) Bahan pembersih: Gauze dan cotton swabs
 - h) Bahan pengawet: Formalin
 - i) Peralatan penyimpanan: Alat penyimpanan
 - j) Penanda: Marker dan label
 - k) Peralatan pendingin: Cooler box
 - l) Perlengkapan steril: Sarung tangan bedah steril



tuk uji densitas
1 metode SEM dan XRD

enelitian

Cangkang kerang hijau
Kulit udang

3. Pakan tikus
4. NaCl
5. Asam klorida (HCl)
6. Natrium hidroksida (NaOH)
7. Air distilasi atau deionisasi
8. Asam asetat (CH_3COOH)
9. Sodium tripolifosfat (STPP)
10. Ethyl alkohol
11. Buffer larutan
12. Formalin
13. Sekam padi

2.5 Variable Penelitian

Variabel independen:

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

Variabel dependen:

1. Densitas Enamel

Variabel Terkendali:

1. Usia dan jenis kelamin
2. Berat badan tikus
3. Makanan dan minuman tikus
4. Kondisi lingkungan
5. Waktu pengambilan sampel
6. Prosedur pembuatan nanokalsium cangkang kerang hijau dan nanokitosan kulit udang.
7. Prosedur pengambilan sacrifice Tikus Wistar Jantan (*Rattus Norvegicus*)
8. Prosedur ekstraksi gigi Tikus Wistar Jantan (*Rattus Norvegicus*)

Variabel Tak Tekendali:

1. Suhu dan Kelembapan kandang
2. Kestabilan hormonal sampel



ial

m cangkang kerang hijau: Nanokalsium dari cangkang kerang *a viridis*) diperoleh melalui sintesis presipitasi dan digunakan mber kalsium hidroksiapatit (HA) untuk mineralisasi enamel gigi, akterisasi ukuran partikel dan kandungan mineral.

2. Nanokitosan kulit udang: Nanokitosan dari kulit udang dihasilkan melalui Proses konversi kitin menjadi kitosan dilakukan melalui tahap deasetilisasi, yang diawali dengan proses demineralisasi dan deproteinasi menggunakan larutan sodium hidroksida (NaOH). Tahap ini bertujuan untuk menghilangkan kandungan mineral serta protein yang menempel pada struktur kitin, sehingga menghasilkan kitosan yang lebih murni dan dievaluasi berdasarkan ukuran partikel dan efektivitasnya dalam meningkatkan densitas mineral enamel gigi
3. Densitas enamel: Densitas enamel adalah jumlah mineral dalam volume tertentu, mencerminkan mineralisasi dan kekuatan enamel. Pengukuran dilakukan SEM dan XRD gigi Tikus Wistar Jantan (*Rattus Norvegicus*).
4. Uji SEM (*Scanning Electron Microscope*) adalah teknik mikroskopi yang digunakan untuk mengamati permukaan bahan biologis dan non-biologis dalam skala mikro hingga nano dan juga mengamati struktur permukaan dan juga menganalisis morfologi sampel (enamel)
5. Uji XRD (*X-Ray Diffraction*) atau difraksi sinar-X adalah metode analisis material yang digunakan untuk mengidentifikasi struktur kristal suatu bahan, termasuk jenis, ukuran, dan tingkat keteraturannya. Uji ini sangat penting dalam ilmu material, termasuk untuk mempelajari struktur enamel gigi karena enamel tersusun dari kristal hidroksiapatit.

2.7 Prosedur Penelitian

2.7.1 Pembuatan Bionanomaterial

Pembuatan Nanokalsium dari Cangkang Kerang Hijau (*Perna viridis*)

Nanokalsium diperoleh melalui Metode Ekstraksi Hidrotermal Modifikasi dengan Ball Milling, dengan langkah-langkah berikut:

1. Cangkang kerang hijau dibersihkan dari kotoran dan jaringan lunak, kemudian dicuci hingga bersih dan dikeringkan.
2. Cangkang dipotong menjadi serpihan kasar yang sesuai untuk proses ekstraksi.
3. Serpihan direndam dalam larutan NaOH 1,5N dengan rasio 1:3 (berat/volume).
4. Campuran dipanaskan pada 22–100°C selama 1–3 jam, dengan pergantian larutan NaOH setiap jam.



h ekstraksi, serpihan dicuci hingga pH netral (± 7) dan dikeringkan 10°C selama 12 jam.

an kering diproses dengan ball mill hingga menjadi serbuk alsium berukuran 200 nm.

7. Partikel diuji untuk memastikan sesuai spesifikasi, lalu disimpan dalam wadah kedap udara untuk menjaga kualitas.

Nanokitosan diperoleh melalui proses deasetilasi dan ultrasonikasi, dengan langkah-langkah sebagai berikut:

1. Kulit udang segar (100 gram) dicuci bersih dan dikeringkan pada suhu 50°C.
2. Demineralisasi: Kulit udang direndam dalam asam klorida (HCl) 1–2% untuk menghilangkan kalsium karbonat, lalu dicuci hingga bersih.
3. Deproteinisasi: Direndam dalam natrium klorida (NaCl) 1–5% pada suhu tinggi untuk menghilangkan protein, lalu dicuci kembali.
4. Deasetilasi: Kitin direndam dalam natrium hidroksida (NaOH) 40–50% pada suhu tinggi untuk menghasilkan kitosan.
5. Konversi menjadi nanokitosan: Kitosan dilarutkan dalam asam asetat 1–2%, lalu dibuat nanopartikel menggunakan metode gelasi ionik, sonikasi, atau penguapan pelarut dengan larutan sodium tripolifosfat.
6. Nanokitosan disimpan dalam wadah kedap udara untuk mencegah kontaminasi dan penyerapan kelembaban.

2.7.2. Penentuan Dosis dan Perlakuan Pemberian Nanomaterial

Berdasarkan literatur, dosis nanokalsium yang efektif dalam meningkatkan kepadatan enamel pada manusia adalah 1300 mg/hari, sedangkan nanokitosan menunjukkan efek serupa pada dosis 1500 mg/hari (Salekhah, 2021). Untuk penelitian pada tikus dengan bobot 200 gram, diperlukan konversi dosis menggunakan faktor konversi hewan-ke-manusia sesuai tabel standar, yaitu 0,018 untuk manusia dengan berat 70 kg.

Perhitungan Konversi Dosis:

1. Nanokalsium: $1300 \text{ mg} \times 0,018 = 23,4 \text{ mg/hari}$ 1300 untuk tikus 200 g
2. Nanokitosan: $1500 \text{ mg} \times 0,018 = 27 \text{ mg/hari}$ 1500 untuk tikus 200 g

Dengan demikian, dosis yang digunakan dalam penelitian pada tikus adalah 23,4 mg/hari untuk nanokalsium dan 27 mg/hari untuk nanokitosan, yang disesuaikan dengan berat tubuh hewan uji.



Perhitungan dosis untuk tikus wistar jantan dengan berat 150–220 gr, varian untuk manusia dengan rentang usia 10–14 tahun, adalah

m: $1300 \times 0,018 = 23,4 \text{ mg}$ untuk 200 gr tikus (dibulatkan mg/200 gr tikus)

n: $1500 \times 0,018 = 27 \text{ mg}$ untuk 200 gr tikus (dibulatkan menjadi

30 mg/200 gr tikus)

Saat menentukan dosis kombinasi sebagai dosis permulaan sebaiknya dimulai dari dosis konservatif menggunakan dosis yang lebih rendah dari rentang yang telah diuji :

1. Nanokalsium : 10 mg
2. Nanikotosan : 20 mg

Dosis Susu

Berdasarkan konversi perhitungan dosis Laurence and Bacharach, 1964, dosis konversi pada tikus

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

Dosis susu yang diberikan adalah :

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

Dosis susu pada tikus:

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

2.7.3 Persiapan Hewan Coba

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

2.7.4 Perlakuan Hewan Coba

1. Kelompok kontrol negatif: diberi pakan standar 2 kali sehari dan minum air.
2. Kelompok kontrol positif: diberi pakan biasa ditambah susu 2 kali sehari dan minum air.
3. Kelompok perlakuan 1: diberi pakan biasa ditambah sediaan nanokalsium cangkang kerang hijau 2 kali sehari dan minum air.



perlakuan 2: diberi pakan biasa ditambah sediaan nanokitosan 2 kali sehari dan minum air.

perlakuan 3: diberi pakan biasa ditambah sediaan nanokalsium erang hijau dan nanokitosan kulit udang 2 kali sehari dan minum

2.7.5 Koleksi Sampel

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

1. Persiapan *sacrifice* Tikus Wistar Jantan (*Rattus Norvegicus*)
2. *Sacrifice* dilakukan
3. Ekstraksi gigi
4. Gigi kemudian difiksasi dalam larutan buffer formalin 10% selama 24 jam.

2.7.6 Uji XRD

Preparasi Sampel

1. Gigi dibersihkan dari sisa jaringan lunak menggunakan larutan saline atau H_2O_2 .
2. Gigi dikeringkan pada suhu ruang hingga benar-benar kering.

Penempatan pada Sample Holder

1. Gigi diletakkan dengan posisi permukaan email menghadap atas (fokus sinar X mengarah langsung ke permukaan enamel).
2. Pastikan posisi stabil dan tidak bergeser saat pemindaian.

Pengukuran XRD

1. Scan dilakukan pada rentang sudut 2θ : 10° – 70° .
2. Parameter difraksi disesuaikan untuk analisis permukaan enamel.

Analisis Data

1. Identifikasi puncak khas HA: biasanya muncul di sekitar 25.9° , 31.8° , dan 32.9° .
2. Evaluasi intensitas dan lebar puncak sebagai indikator kristalinitas.

2.7.7 Observasi dengan menggunakan SEM

Preparasi Sampel

1. Gigi utuh dibersihkan dan dikeringkan.
2. Dilapisi logam konduktif tipis (emas/emas-palladium) menggunakan sputter coater untuk meningkatkan konduktivitas.

Pengamatan SEM

1. Gigi diposisikan dengan permukaan enamel menghadap detektor.
2. Observasi dilakukan dengan perbesaran bertahap (misal: 500x, 1000x,



pengamatan pada permukaan oklusal atau bukal enamel.

untuk memeriksa keberadaan struktur kristal baru, kekompakan permukaan, dan mikroskopik.

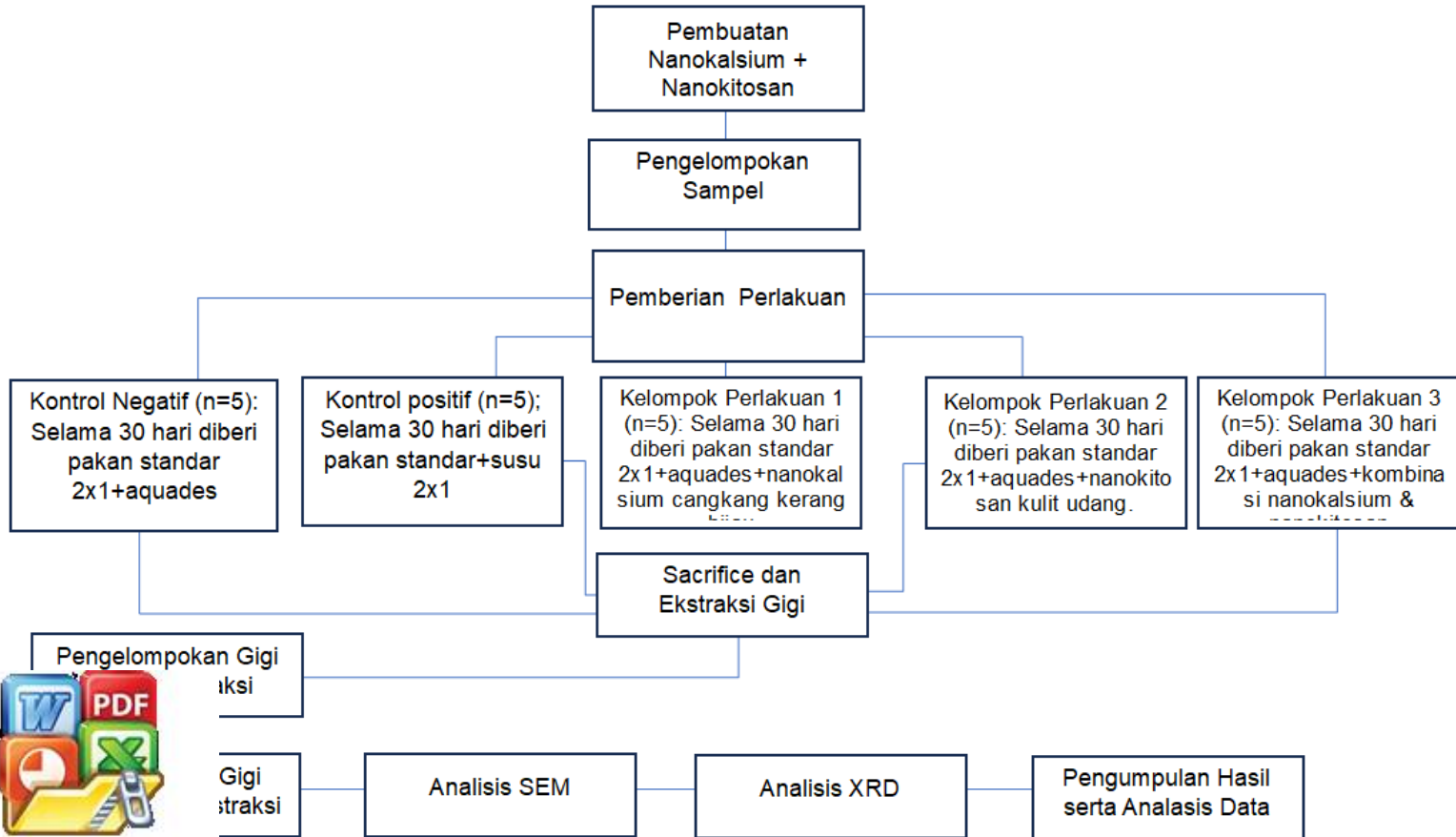
Perbandingan dengan kelompok kontrol untuk melihat efek suplementasi.

2.8 Analisis Data

1. Jenis Data : Data Primer
2. Pengolahan data : SPSS 23.0 untuk Windows
3. Analisis Data : Uji normalitas (shapiro-wilk) untuk menentukan distribusi data; uji statistik, jika data normal: Anova one way dengan uji post-hoc Tukey, jika data tidak normal: Uji Kruskal-Wallis.
4. Penyajian data : Dalam bentuk tabel dan grafik



2.9 Alur Penelitian





Optimized using
trial version
www.balesio.com