



**PENGARUH PEMBERIAN GELATIN IKAN  
PATIN (*PANGASIU DJAMBAL*) TERHADAP  
*ALKALINE PHOSPHATASE (ALP)* PADA  
PENYEMBUHAN LUKA PASCA PENCABUTAN  
GIGI TIKUS PUTIH (*RATTUS NORVEGICUS*)  
STRAIN WISTAR**

**SKRIPSI**

**UNTUK MEMENUHI PERSYARATAN  
MEMPEROLEH GELAR SARJANA**

**OLEH:**

**RIZQI AULIYA LATIFATUL MUBAROKAH**

**NIM : 165160100111020**

**PROGRAM STUDI SARJANA KEDOKTERAN GIGI  
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG**

**2019**



**DAFTAR ISI**

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERSETUJUAN.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
ABSTRAK.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR SINGKATAN DAN ISTILAH.....	xiii
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Trauma Maksilofasial.....	6
2.2 Penyembuhan Luka Jaringan Lunak.....	7
2.2.1 Hemostasis.....	7
2.2.2 Inflamasi.....	8
2.2.3 Proliferasi.....	10
2.2.4 Remodeling.....	11
2.3 Penyembuhan Luka Jaringan Keras Pasca Fraktur.....	11
2.3.1 Penyembuhan Tulang Primer.....	11
2.3.2 Penyembuhan Tulang Sekunder.....	12
2.4 Proses Pembentukan Tulang.....	14
2.4.1 Osifikasi Intramembraneous.....	15
2.4.2 Osifikasi Endokondral.....	15
2.5 Osteoklas.....	15
2.6 Osteoblas.....	17
2.7 Alkaline Phosphatase.....	18
2.8 Kolagen Tipe 1.....	19
2.9 Ikan Patin.....	20
2.10 Gelatin.....	23
2.11 Tikus.....	26
2.12 Pewarnaan Imunohistokimia.....	27

**BAB III. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN**

3.1 Kerangka Konsep Penelitian ..... 30

3.2 Hipotesis Penelitian ..... 32

**BAB IV. METODE PENELITIAN**

4.1 Rancangan Penelitian ..... 33

4.2 Sampel Penelitian ..... 34

4.3 Variabel Penelitian ..... 36

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian ..... 37

4.5 Alat dan Bahan Penelitian ..... 38

4.6 Definisi Operasional ..... 39

4.7 Prosedur Penelitian ..... 40

4.8 Penghitungan Ekspresi ALP ..... 45

4.9 Analisis Data ..... 45

4.10 Skema Prosedur Penelitian ..... 47

**BAB V. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN**

5.1 Hasil Penelitian ..... 48

5.2 Analisis Data ..... 53

5.2.1 Uji Normalitas ..... 53

5.2.2 Uji Homogenitas Ragam ..... 53

5.2.3 Uji *One Way ANOVA* ..... 54

5.2.4 Uji *Post Hoc LSD* ..... 55

5.3 Pembahasan ..... 56

**BAB VI. PENUTUP ..... 59**

**DAFTAR PUSTAKA ..... 61**

**LAMPIRAN ..... 70**

Lampiran 1. Keterangan Kelayakan Etik ..... 70

Lampiran 2. Dokumentasi Penelitian dan Pengamatan ..... 71

Lampiran 3. Hasil Uji Statistika ..... 75



**DAFTAR GAMBAR**

Gambar 2.1 Fase Penyembuhan Luka Jaringan Lunak .....	8
Gambar 2.2 Fase Inflamasi Penyembuhan Luka .....	9
Gambar 2.3 Fase Proliferasi Penyembuhan Luka .....	10
Gambar 2.4 Penyembuhan Jaringan Keras .....	14
Gambar 2.5 Gambar Histologi Sel Osteoklas .....	16
Gambar 2.6 Gambar Histologi Sel Osteoblast .....	17
Gambar 2.7 Hubungan Kolagen dan Hidroksiapatit .....	20
Gambar 2.8 Ikan Patin .....	21
Gambar 2.9 Struktur Kimia Gelatin .....	24
Gambar 2.10 Tikus Putih .....	26
Gambar 2.11 Anatomi Gigi Tikus Putih .....	27
Gambar 2.12 Pewarnaan Imunohistokimia .....	28
Gambar 3.1 Kerangka Penelitian .....	30
Gambar 4.1 Desain Penelitian .....	33
Gambar 4.2 Rumus Federar .....	36
Gambar 4.3 Gambaran Histologi Ekspresi ALP .....	40
Gambar 4.4 Skema Prosedur Penelitian .....	47
Gambar 5.1 Perbandingan Gambaran Histologi pada Hari Ke-3 .....	49
Gambar 5.2 Perbandingan Gambaran Histologi pada Hari Ke-5 .....	50
Gambar 5.3 Perbandingan Gambaran Histologi pada Hari Ke-7 .....	51
Gambar 5.4 Grafik Rata-rata Ekspresi ALP pada Hari yang Sama .....	52



DAFTAR TABEL

Tabel 5.1 Data Rata-Rata dan Standar Deviasi Ekspresi ALP..... 52  
Tabel 5.2 Uji Normalitas *Shapiro-Wilk* ..... 53  
Tabel 5.3 Uji Homogenitas Ragam *Levene* ..... 54  
Tabel 5.4 Uji Anova *One way* ..... 54  
Tabel 5.5 Hasil Uji *Post Hoc LSD* ..... 55



## DAFTAR SINGKATAN

ALP	: <i>Alkaline Phosphatase</i>
BFGF	: <i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
BSE	: <i>Mad Cow Disease</i>
DAB	: <i>Diaminobenzinidine</i>
EDTA	: <i>Ethylenediaminetetraacetid Acid</i>
EGF	: <i>Epidermal Growth Factor</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
FMD	: <i>Foot and Mouth Disease</i>
IGF-1	: <i>Insulin like Growth Factor-1</i>
IHK/IHC	: <i>Imunohistokimia/ Imunohistochemistry</i>
IL-1	: <i>Interleukin-1</i>
IL-6	: <i>Interleukin-6</i>
MSCF	: <i>Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
Mg <sup>2+</sup>	: <i>Magnesium</i>
OC	: <i>Osteocalcin</i>
OPN	: <i>Osteopontin</i>
OPG	: <i>Osteoprogenin</i>
ORIF	: <i>Open Reduction Internal Fixation</i>
PINP	: <i>Procollagen Type-I N-Terminal Propeptide</i>
PICP	: <i>Procollagen Type-I C-Terminal Propeptide</i>
PBS	: <i>Phospate Buffer Saline</i>
PDAM	: <i>Perusahaan Daerah Air Minum</i>

**PDGF** : *Platelet Derived Growth Factor*

**PE** : *Poly Ether*

**PGE2** : *Prostaglandin E2*

**RANK** : *Receptor Activator Of Nuclear Factor-Kb Ligand*

**RANKL** : *Receptor Activator Of Nuclear Factor-Kb*

**RunX-2** : *Run-Related Transcription Factor 2*

**TNAP** : *Tissue Nonspecific Alkaline Phosphatase*

**TGF-β** : *Transforming Growth Factor beta*

**TNF-α** : *Tumor Necrosis Factor Alpha*

**TNF-β** : *Tumor Necrosis Factor Beta*

**TSE** : *Transmissible Spongiform Encephalopathy*

**Zn<sup>2+</sup>** : *Zink*



**ABSTRAK**

Mubarokah, Rizqi Auliya L. 165160100111020. Program Studi Sarjana Kedokteran Gigi. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya Malang. 15 September 2019. **“Pengaruh Pemberian Gelatin Ikan Patin (*Pangasius Djambal*) Terhadap Alkaline Phosphatase (ALP) Pada Penyembuhan Luka Pasca Pencabutan Gigi Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Strain Wistar”**. Pembimbing; drg. Fredy Mardiyantoro, Sp.BM, dan drg. Irwan Baga, Sp.BM.

Fase remodeling adalah salah satu parameter keberhasilan penyembuhan luka. Biochemical marker fase remodeling salah satunya adalah ALP. Gelatin ikan patin mengandung banyak kandungan asam amino salah satunya glisin dan glitamin yang menginduksi ALP pada osteoblastogenesis fase remodeling. Tujuan penelitian ini mengetahui pengaruh pemberian gelatin patin terhadap peningkatan ekspresi ALP pada penyembuhan luka pasca pencabutan gigi tikus putih.strain wistar. Penelitian menggunakan metode eksperimental *Randomized Post Test Only Contol Group Design* dilakukan pada hewan coba tikus putih. Sampel diambil secara *random sampling* kemudian dibagi menjadi 2 kelompok secara acak dengan 3 kontrol hari (hari ke-3, ke-5, dan ke-7). Kelompok kontrol (K) kelompok yang tidak diberi gelatin ikan patin dan kelompok perlakuan (P) kelompok yang diberi gelatin ikan patin. Pewarnaan yang digunakan adalah imunohistokimia. Pengamatan ekspresi ALP pada preparat HPA dengan mikroskop cahaya OLYMPUS pada 5 lapang pandang dengan perbesaran 400x. Uji ANOVA menunjukkan terdapat peningkatan jumlah ekspresi ALP yang signifikan pada kelompok perlakuan  $p < 0.05$ , dengan puncak ekspresi ALP pada hari ke-7. Uji *Post Hoc LSD* membuktikan terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dan perlakuan dengan  $p < 0.05$ . Kesimpulannya adalah gelatin patin terbukti berpengaruh terhadap peningkatan jumlah ekspresi ALP pada penyembuhan luka pasca pencabutan gigi tikus putih strain wistar.

**Kata Kunci:** ALP, Gelatin Ikan Patin, Glutamin, Arginin, Osteoblastogenesis, Pencabutan Gigi.



## ABSTRACT

Mubarokah, Rizqi Auliya L. 165160100111020. Study Program Bachelor of Dentistry . Dentistry Faculty of Brawijaya University, Malang. September 15<sup>th</sup> 2019 “**The Effect of Patin (*Pangasius djambal*) Gelatine to The Expression of Alkaline Phosphatase (ALP) in Wound Healing After White Rat’s (*Rattus norvegicus*) Strain Wistar Tooth Extraction**”. Supervisor: drg. Fredy Mardiyantoro, Sp. BM., drg Irwan Baga, Sp. BM.

Remodeling phase is one of the success parameter of wound healing. One of the biochemical marker of remodeling phase is ALP. Gelatine of patine fish contains many of amino acids, one of them are arginine and glutamin, which can induce osteoblastogenesis process in wound healing. This study aims to prove that gelatine of *patin fish* can increase expression of ALP in wound healing after white rat’s tooth extraction. This study uses Experimental Randomized Post Test Only Control Group Design which is done to white rats. Random sampling methods is used to divided sample into 2 groups randomly with three control days (3rd day, 5th day, and 7th day). The control groups were not given the gelatine meanwhile the treatment group were given the gelatine. The number of ALP expression was calculated in 10 fields of view from HPA preparation with immunohistochemistry staining. Observation was conducted using microscope light OLYMPUS with 400x magnification. Anova test results that treatment group showed the significant increase with  $p < 0.05$ , with the peak day of expressions in 7th day. Post Hoc LSD test results showed there was a significant difference between the control and treatment group with  $p < 0.05$ . The conclusion of this study is gelatine of *patin (Pangasius djambal)* has effect in increasing the expression of *alkaline phosphatase (ALP)* in wound healing after white rat’s (*Rattus norvegicus*) strain wistar tooth extraction.

**Keywords:** ALP, Gelatine of Patin, Glutamin, Arginine, Osteoblastogenesis, Tooth Extraction.



## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Menurut Retnani (dalam Basuki, 2015), luka dapat didefinisikan sebagai rusaknya struktur dan fungsi anatomis normal akibat proses patologis yang berasal dari internal maupun eksternal dan mengenai organ tertentu. Luka dapat terjadi karena jejas dan tindakan medis ataupun dapat diakibatkan oleh adanya trauma, neuropatik, vaskuler, penekanan, atau akibat keganasan.

Luka pada regio maksilofasial atau trauma maksilofasial sering dijumpai dalam praktek kedokteran gigi terutama dibidang bedah mulut, biasanya disebabkan oleh adanya infeksi, kelainan kongenital, neoplasma, trauma karena kecelakaan, pemakaian alat ortodonti, sikat gigi atau pencabutan gigi. Menurut Pedlar dan Frame (dalam Hollins, 2008) mengemukakan bahwa pencabutan gigi merupakan prosedur bedah untuk mengambil gigi dari soketnya menggunakan tang dan elevator. Di Indonesia angka pencabutan gigi masih relatif tinggi, kurang lebih sekitar lima puluh persen (50%) pasien yang datang ke tempat praktik dokter gigi meminta untuk dilakukan pencabutan gigi. Dan berdasarkan data pada Riskesdas 2007 penduduk yang mengalami masalah gigi dan mulut yaitu 87,6% dan perawatan dengan pencabutan gigi 38,5% dan bertambah seiring bertambahnya usia (Departemen Kesehatan RI, 2008).

Luka pasca pencabutan gigi mengenai jaringan keras dan jaringan lunak rongga mulut (Gordon, 2013). Luka tersebut akan menstimulasi tubuh untuk melakukan upaya pengembalian struktur dan fungsional bagian yang terluka melalui penyembuhan luka (*would healing*) atau perbaikan (*repair*) yang melibatkan faktor internal dan eksternal serta tahapan yang saling tumpang tindih dalam proses yang kompleks (Basuki, 2015; Wiksman, 2007). Secara umum penyembuhan luka diawali oleh hemostatis, fase inflamasi, proliferasi dan remodeling.

Proses penyembuhan luka pada jaringan keras ditandai dengan ekspresi marker serologis pembentuk tulang yang berasal dari osteoblast meliputi *bone-specific alkaline phosphatase*

(ALP), *procollagen type-I N-terminal propeptide* (PINP), *procollagen type-I C-terminal propeptide* (PICP), and *osteocalcin* (OC). *Alkaline phosphatase* (ALP) merupakan salah satu bentuk diferensiasi osteoblast yang bersifat nonkolagen. *Alkaline phosphatase* (ALP) berperan dalam meningkatkan konsentrasi *inorganic phosphate* yang berperan dalam proses mineralisasi tulang (Coulibaly, 2011).

Waktu penyembuhan luka tergantung pada tingkat keparahan dari luka tersebut. Penyembuhan luka yang melibatkan jaringan keras cenderung lebih lama dibandingkan dengan luka pada jaringan lunak saja. Tenggangnya fungsi dan integritas jaringan tubuh akibat luka bisa menjadi tempat yang kondusif untuk pertumbuhan mikroba yang dapat memperparah keadaan luka yang awalnya merupakan luka akut dapat berubah menjadi kronik sehingga waktu penyembuhan menjadi lebih lama dan tidak jarang menimbulkan komplikasi seperti infeksi. Luka pasca pencabutan gigi memiliki resiko infeksi lebih besar karena adanya kehilangan sebagian jaringan (Mardiyantoro, 2018). Dan dari sisi psikologis pasien, luka dapat menimbulkan rasa tidak nyaman dan bisa mempengaruhi aktivitas sehari-hari. Oleh karena itu perlu adanya upaya mempercepat penyembuhan luka.

Di alam semesta ada berbagai sumber daya alam yang memiliki khasiat dalam mempercepat penyembuhan salah satunya adalah gelatin (Nurrachmawati, 2015). Beberapa dekade terakhir banyak penelitian yang memanfaatkan bahan alam (Pramono, 2002). Kecenderungan masyarakat akan bahan yang bersifat alami salah satunya dipengaruhi oleh tingginya harga obat dipasaran. Gelatin merupakan hasil hidrolisa parsial jaringan kolagen hewan yang terdapat pada kulit dan tulang hewan seperti sapi, babi dan ikan (Nugrahaningsih, 2012; Sudrajat, 2012). Gelatin dapat diperoleh dari tulang dan kulit hewan yang sering dianggap limbah (Agnes, 2013). Gelatin memiliki karakteristik yang padat, tembus cahaya, tidak berwarna, rapuh (jika kering), dan tidak berasa (Nurrachmawati, 2015).

Ketersediaan Ikan Patin (*Pangasius djambal*) sebagai sumber potensial bahan dasar gelatin perairan di Indonesia dapat dengan mudah dijumpai. Ikan patin tidak hanya memiliki ukuran daging yang putih dan rasa gurih, ikan patin memiliki kandungan gizi yang tinggi dengan kandungan protein 68,69%, lemak 5,8%, abu 3,5% dan air 59,3%, selain itu juga kaya akan omega 3, DHA (*Docosahexaenoic Acid*), vitamin, fosfor dan kandungan kolesterol tak jenuh (Minggawati, 2011; Wiranti, 2015). Ikan patin berasal dari perairan tropis sehingga memiliki karakteristik yang lebih mirip dengan gelatin yang bersumber dari sapi (*Bovine Gelatin*) dibandingkan dengan ikan-ikan yang berasal dari daerah beriklim dingin (Saputra, 2015). Gelatin ikan patin yang mengandung banyak kolagen tipe 1 yang merupakan salah satu bahan pembentuk tulang maupun tulang rawan (Nurrachmawati, 2015). Gelatin ikan patin dapat mempengaruhi proses penyembuhan luka pasca pencabutan gigi karena dapat membantu proses kalsifikasi tulang alveolar (Hardyanti, 2014).

Menurut Regenstein (2003) bahwa masalah budaya dan kepercayaan menjadi pertimbangan utama dalam menggunakan kolagen komersial yang bersumber dari sapi dan babi. Untuk memenuhi kebutuhan gelatin dalam negeri, Indonesia mengimpor gelatin dari negara lain yang hampir 90% berbahan baku dari kulit babi, kulit sapi dan tulang sapi, dan hal ini akan menimbulkan masalah keagamaan terutama pada penganut agama islam dan hindu di Indonesia. Selain itu kolagen yang berasal dari hewan darat memiliki pertimbangan lain seperti kontaminasi biologis yang bisa terjadi pada hewan tersebut seperti BSE (*Mad Cow Disease*), TSE (*Transmissible Spongiform Encephalopathy*), FMD (*Foot and Mouth Disease*) dan sebagainya. Gelatin yang diperoleh dari hewan darat juga berpotensi memiliki kualitas kolagen rendah dikarenakan adanya asam amino yang tinggi dan mempengaruhi proses denaturasi menjadi lebih cepat (Aberoumand, 2012). Oleh karena itu, kolagen yang berasal dari hewan yang hidup di air menjadi solusi alternatif yang menjanjikan.

Berdasarkan latar belakang di atas maka, penulis ingin melakukan penelitian mengenai pengaruh pemberian gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) terhadap ekspresi *Alkaline Phosphatase (ALP)* pada luka pasca pencabutan gigi pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar.

## 1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Apakah pemberian gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) berpengaruh terhadap ekspresi *alkaline phosphatase (ALP)* pada penyembuhan luka pasca pencabutan gigi pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar?

## 1.3 Tujuan Penelitian

### 1.3.1 Tujuan Umum

1.3.1.1 Mengetahui pengaruh pemberian gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) terhadap ekspresi *alkaline phosphatase (ALP)* pada penyembuhan luka pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar

### 1.3.2 Tujuan Khusus

1.3.2.1 Mengetahui jumlah ekspresi *alkaline phosphatase (ALP)* antara tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar yang tidak diberi gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) pada fase remodeling proses penyembuhan luka pasca pencabutan gigi.

1.3.2.2 Mengetahui jumlah *alkaline phosphatase (ALP)* antara tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar yang diberi gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) pada fase remodeling proses penyembuhan luka pasca pencabutan gigi

1.3.2.3 Membandingkan perbedaan jumlah *alkaline phosphatase (ALP)* antara tikus putih (*Rattus*

*norvegicus*) strain wistar yang tidak diberi gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) dan yang diberi gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) pada fase remodeling proses penyembuhan luka pasca pencabutan gigi.

## 1.4 Manfaat Penelitian

### 1.4.1 Manfaat Akademis

1.4.1.1 Menambah pengetahuan mengenai manfaat gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) terhadap terhadap *alkaline phosphatase* (ALP) pada penyembuhan luka pasca pencabutan gigi pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar.

1.4.1.2 Hasil dari penelitian ini memberikan kontribusi ilmiah dan bisa digunakan sebagai dasar penelitian selanjutnya tentang penyembuhan luka pasca pencabutan gigi.

### 1.4.2 Manfaat Praktis

1.4.2.1 Mengetahui adanya kegunaan lain dari ikan patin selain sebagai bahan makanan menjadi pilihan yang memperkaya variasi bahan pengobatan untuk mempercepat penyembuhan luka pasca pencabutan gigi dalam bidang kedokteran gigi.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Trauma Maksilofasial

Trauma merupakan salah penyebab utama morbiditas dan mortalitas dalam kesehatan masyarakat. Menurut *International Association of Trauma Surgery and Intensive Care* (IATSIC) dan *World Health Organization* (WHO), setiap hari sekitar 16.000 orang meninggal karena trauma dan lebih dari 9 orang meninggal setiap menit karena cedera atau kekerasan (Choonthar, 2016; Krishnan, 2013). Trauma juga mengambil 16% dari total kejadian penyakit di dunia dengan hampir 90% kasus terjadi di negara-negara miskin dan berkembang, termasuk Indonesia (Mock, 2016).

Menurut Kementerian Kesehatan RI, salah satu trauma yang sering terjadi adalah trauma maksilofasial dengan angka insidensi trauma maksilofasial sekitar 10,5% dari seluruh trauma. Trauma maksilofasial dapat diartikan sebagai suatu Ruda paksa atau cedera pada jaringan lunak (*soft-tissue*) dan jaringan keras (*hard-tissue*) yang terjadi di area tulang maksilofasial yang meliputi area wajah, mulut dan dentoalveolar. Trauma jaringan keras (*hard-tissue*) biasanya berupa fraktur tulang tergantung lokasinya (Adrianti, 2015). Trauma jaringan lunak (*soft-tissue*) dapat berupa edema, kontusio, abrasi, dan laserasi (Sastrawan, 2017).

Menurut Saleh (2016), Trauma maksilofasial dibagi berdasarkan lokasi terjadinya fraktur yaitu fraktur dentoalveolar, fraktur tulang penyusun wajah, fraktur zigomatikus dan fraktur nasal. Fraktur tulang penyusun wajah meliputi fraktur mandibular, fraktur maksila, fraktur palatine, fraktur nasal, fraktur sinus frontalis, fraktur orbita, dan fraktur zygoma. Dan fraktur dentoalveolar meliputi fraktur yang terjadi pada tulang alveolar dan gigi geligi, biasanya disertai dengan avulsi, kegoyangan gigi dan pergeseran letak gigi.

Angka insidensi trauma maksilofasial semakin meningkat dan biasanya disebabkan oleh kekerasan fisik, kecelakaan lalu lintas, jatuh dari ketinggian, kecelakaan kerja, trauma saat berolahraga, kondisi patologis dan tindakan

pencabutan gigi (Rodrigues, 2014; Malik, 2012; Leles, 2010; Hupp, 2014). Pencabutan gigi merupakan prosedur bedah dibidang kedokteran gigi yang bersifat *irreversible* dan dilakukan dengan menggunakan tang, elevator, atau pendekatan transalveolar (Pedlar, 2007). Untuk meminimalisasi terjadinya komplikasi trauma sekecil mungkin, perlu dilakukan pencabutan gigi ideal dengan kondisi gigi atau akar gigi utuh (Sitanaya, 2016).

## 2.2 Penyembuhan Luka Jaringan Lunak

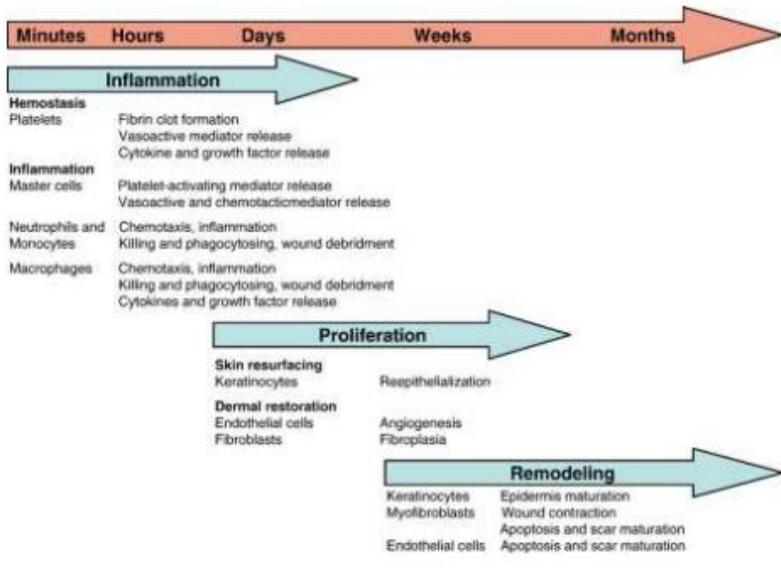
Luka akan memicu ketidakseimbangan fisiologis tubuh selanjutnya direspon oleh tubuh dengan berusaha menyeimbangkan kembali melalui penyembuhan luka. Luka akan menstimulasi datangnya rangsangan eksogen dan endogen dapat menimbulkan kerusakan sel, dilanjutkan reaksi vaskuler kompleks pada jaringan ikat yang ada pembuluh darahnya, melibatkan reaksi seluler, humoral, dan jaringan ikat (Gurtner, 2007).

Proses penyembuhan luka berbeda antara jaringan satu dengan yang lain tergantung dari jenis luka. Pada proses penyembuhan luka elemen yang berbeda secara kontinyu dan bersamaan bekerja secara terintegrasi dan fase yang saling tumpang tindih yakni fase inflamasi, proliferasi dan remodeling dan ditunjukkan oleh gambar 2.1. (Gurtner, 2007).

### a. Hemostatis

Segera setelah terjadi luka terjadi hemostatis berupa vasokonstriksi, agregasi trombosit, dan proses pembekuan darah berkepanjangan. Bekuan darah yang terbentuk dari fase hemostatis berfungsi sebagai pertahanan terhadap kontaminasi bakteri dan mencegah kehilangan cairan. Hemostatis terjadi karena trombosit yang keluar dari pembuluh darah saling melekat bersama jala fibrin. Pembentukan matriks sebagai perekat sel dan jalur masuk sel ke daerah luka (Gurtner, 2007).

Gambar 2.1 Fase Penyembuhan Luka Jaringan Lunak dan Sel yang Mendominasi Pada Masing-Masing Fase



Sumber: Gurtner, 2007.

b. Fase Inflamasi

Terhitung berlangsung sejak terjadinya luka sampai kira-kira hari keempat. Platelet tidak hanya berperan membentuk bekuan darah tetapi juga menghasilkan beberapa *growth factor* seperti *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF), *Insulin-Like Growth Factor-1* (IGF-1), *Epidermal Growth Factor* (EGF), *Fibroblast Growth Factor* (FGF), dan *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β). *Growth factor* tersebut berfungsi untuk merangsang pertumbuhan dan proliferasi dari sel-luka seperti keratinosit dan fibroblas untuk bermigrasi ke bagian luka. Mediator inflamasi seperti *prostaglandin*, *Interleukin-1* (IL-1), *Tumor Necrosis Factor* (TNF), C5a, TGF-β dan produk degradasi bakteri seperti

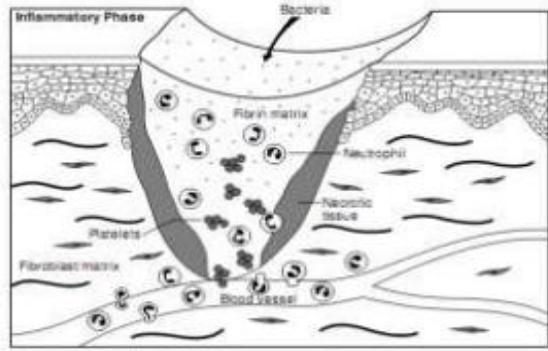


lipopolisakarida (LPS) akan menarik sel neutrofil sehingga menginfiltrasi matriks fibrin dan mengisi kavitas luka (Gurtner, 2007).

Migrasi neutrophil dan makrofag ke area luka menyebabkan terjadi peningkatan permeabilitas kapiler akibat terlepasnya serotonin dan histamin oleh sel mast dan jaringan ikat untuk memfagositosis jaringan mati dan mencegah infeksi. Makrofag juga berperan memproduksi *growth factor* yang dibutuhkan dalam produksi matriks ekstraseluler oleh fibroblas dan pembentukan neovaskularisasi. Keberadaan makrofag sangat penting dalam fase inflamasi (Gurtner, 2007).

Limfosit dan sel mast bermigrasi menuju luka dan dapat ditemukan pada hari kelima sampai ketujuh pasca trauma. Fase lamban terjadi karena reaksi pembentukan kolagen baru sedikit dan luka hanya dipertautkan oleh fibrin yang amat lemah. Pada aktivitas seluler terjadi pergerakan leukosit menembus dinding pembuluh darah menuju area luka karena daya kemotaksis (Gurtner, 2007). Lalu leukosit mengeluarkan enzim hidrolitik yang membantu mencerna bakteri dan debris seperti gambar 2.2

Gambar 2.2 Fase Inflamasi Penyembuhan Luka



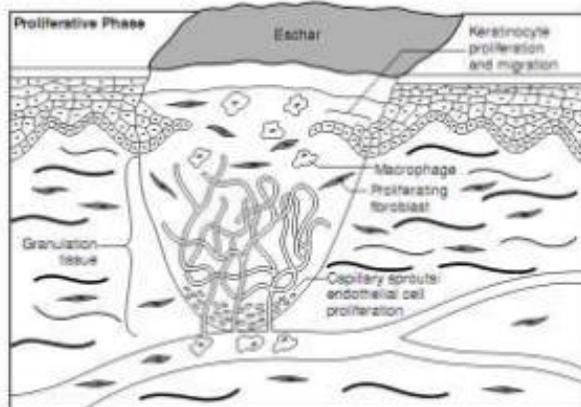
Sumber: Gurtner, 2007



### c. Fase Proliferasi

Fase proliferasi atau fibroplasia berlangsung mulai hari ke-4 hingga hari ke-21 pasca trauma. Keratinosit yang berada pada tepi luka sebenarnya telah mulai bekerja beberapa jam pasca trauma, menginduksi terjadinya reepitelialisasi. Matriks fibrin yang didominasi oleh platelet dan makrofag digantikan oleh jaringan granulasi yang tersusun dari fibroblas, makrofag dan sel endotel yang membentuk matriks ekstraseluler dan neovaskular. Fibroblas berasal dari sel mesenkim yang belum terdiferensiasi, menghasilkan mukopolisakarida, asam amino glisin dan prolin yang merupakan bahan dasar serat kolagen yang akan mempertautkan tepi luka dan membantu penyembuhan dan pembentukan tulang, tulang rawan, dan kulit (Gurtner, 2007). Fase ini berhenti setelah epitel saling menyentuh dan menutup permukaan luka dan mulailah proses pematangan dalam fase penyudahan seperti gambar 2.3.

Gambar 2.3 Fase Proliferasi Penyembuhan luka



Sumber: Gurtner, 2007

#### d. Fase *Remodelling*

Fase *remodelling* atau fase penyudahan dari penyembuhan luka merupakan fase paling lama. Fase ini dimulai segera setelah kavitas luka terisi oleh jaringan granulasi dan reepitelialisasi usai. Tubuh akan berusaha menormalkan kembali semua yang menjadi abnormal karena proses penyembuhan. Penyerapan sel radang dan edema, maturasi sel muda, kapiler baru menutup dan diserap kembali, kolagen yang berlebih diserap, dan sisanya mengerut sesuai dengan regangan yang ada. Peningkatan *tensile strength* luka oleh kolagen membentuk jaringan kembali seperti semula atau jaringan parut dengan 80% kekuatan jaringan semula (Gurtner, 2007).

### 2.3 Penyembuhan Luka Jaringan Keras Pasca Fraktur

Penyembuhan Tulang dibagi menjadi 2, yaitu penyembuhan tulang primer (*direct healing*) dan penyembuhan tulang sekunder (*indirect healing*). Pada penyembuhan sekunder terdapat pembentukan kalus yang tidak terbentuk pada penyembuhan primer (Mardiyantoro, 2018).

#### 2.3.1 Penyembuhan Tulang Primer

Penyembuhan tulang primer terjadi remodeling langsung pada tulang lamellar, kanal haversian dan pembuluh darah. Penyembuhan tulang tanpa pembentukan kalus ini memerlukan tindakan fiksasi untuk menstabilkan pergerakan antar fragmen tulang sehingga didapatkan celah antar fragmen tersebut yang maksimal 1 mm. Penyembuhan primer dipengaruhi oleh *contact healing* dan *gap healing*. Pada proses *contact healing* terjadi koontinuitas mekanis antar korteks tulang dengan celah kurang dari 0.01 mm. Kemudian terjadi pemulihan sistem haversian memungkinkan transport mekanis pro-osteoblast yang mengisi celah fragmen dan membentuk *osteon*

*bridging* dalam tulang lamellar sehingga penyembuhan tulang tidak disertai pembentukan kalus periosteal. Dan *gap healing* terjadi apabila didapatkan celah sekitar 1 mm yang kemudian diisi oleh tulang lamellar secara tegak lurus dengan sumbu panjang untuk rekonstruksi osteonal sekunder (Mardiyantoro, 2018).

### 2.3.2 Penyembuhan Tulang Sekunder

Tahapan penyembuhan fraktur dibagi menjadi 3, yaitu: fase inflamasi, fase perbaikan, dan fase remodeling (Kneale, 2011).

#### a. Fase Inflamasi

Pasca fraktur jaringan periosteum, pembuluh darah dalam korteks, sumbu tulang dan jaringan lunak pembungkus tulang mengalami kerusakan yang mengakibatkan pendarahan dan membentuk hematoma. Ujung fragmen tulang mengalami devitalisasi sekitar 1-2 mm akibat kekurangan suplai oksigen (Asikin, 2016). Jaringan nekrosis akibat matinya sel osteosit dan sel periosteal tersebut akan menstimulasi respon inflamasi yang ditandai vasodilatasi, eksudasi plasma, leukosit dan infiltrasi sel darah putih untuk memfagosit bekuan dan debris serta penyatuan polimorfonukleosit dan histiosit (Asikin, 2016; Noor, 2016; Kneale, 2011). Pelepasan *growth factor* akan menstimulasi proses diferensiasi *mesenkimal stem cel* menjadi angioblas, kondroblas, fibroblas dan osteoblast yang membentuk jaringan granulasi (Mardiyantoro, 2018).

#### b. Fase Perbaikan

Sel osteoblast pada periosteum dan sumbu tulang akan membentuk jaringan spongiosa yang menutupi bagian luka pada tulang sebagai jembatan antar ujung tulang (Noor, 2016; Kneale, 2011). Awal mulanya terbentuk *soft callus (fibrocartilage callus)* yang terbentuk tebal dan akan diresorpsi menjadi

tulang kartilago. Pembentukan jembatan antar fragmen fraktur dari jaringan cartilage menghasilkan *hard callus* yang akan dimeneralisasi oleh proses penulangan endrokondral dalam 2-3 minggu (Noor, 2016; Mardiyantoro, 2018).

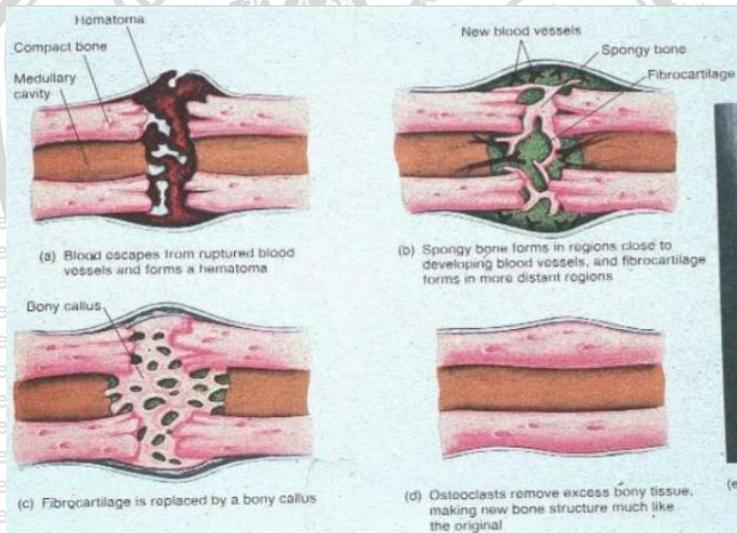
#### c. Fase Remodeling

Tahapan terakhir perbaikan tulang meliputi pengambilan jaringan mati dan penyusunan kembali struktur tulang seperti sebelumnya sehingga terjadi revitalisasi korteks (Noor, 2016). Fase remodeling terjadi sebagai hasil proses antara resorpsi dan deposisi osteoblastik tulang secara bersamaan (Lukman, 2013). Fase ini didominasi aktifitas osteoblast dan osteoklas. Osteoklas akan meresorpsi anyaman tulang dan akan digantikan oleh tulang lamellar oleh osteoblast. Resorpsi diinisiasi oleh hormone, sitokin, dan molekul yang mengaktifasi reseptor osteoblast sehingga terjadi degradasi matrik ekstraseluler nonmineral serta mensistesis M-CSF dan RANKL sebagai awal diferensiasi osteoklas (Noor, 2014). Selanjutnya osteoklas akan menempel pada permukaan tulang termineralisasi ketika osteoblast ditarik dari lokasi yang harus diresorpsi. Osteoklas akan melepaskan asam laktat dan asam sitrat untuk mengikis lapisan tulang, serta enzim proteolitik untuk mendigesti kolagen dan matrik organic (Kneale, 2011).

Kelenjar paratiroid mengsekresikan parathormon yang akan mengaktifkan osteoklas dan menghambat osteoblast sehingga konsentrasi kalsium dan fosfor dalam darah akan meningkat. Selanjutnya kelenjar tiroid mensekresikan kalsitonin untuk inaktifasi osteoklast dan mempercepat penulangan. Prosektor osteoblast akan masuk dan mengalami aktifasi menjadi osteoblast aktif oleh IGF-1 (*Insulin Growth Factor-1*) dan TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor-B*) (Akbar, 2012).

Selain menghasilkan *bone matrix* yang membentuk garam hidroksiapatit, osteoblast juga mengatur deposisi hidroksiapatit pada kolagen dengan mensekresikan alkaline phosphatase (Noor, 2014). Matriks tulang yang terbentuk mengalami pengerasan yang tertimbun dalam serabut kolagen dalam lingkungan elektronegatif (Asikin, 2016). Serabut kolagen dalam tulang berfungsi untuk memberikan kekuatan tulang terhadap gaya tarikan dan fungsi kalsium dalam tulang berfungsi untuk menahan gaya tekan (Asikin, 2016). Proses penyembuhan luka jaringan keras diatas digambarkan pada gambar 2.4.

Gambar 2.4. Preses Penyembuhan Luka Jaringan



Sumber: Borle, 2014

## 2.4 Proses Pembentukan Tulang

Pembentukan tulang disebut osifikasi atau osteogenesis, dimulai dari masa embrio manusia. Menurut Sefrina (2015), Osifikasi diklasifikasikan menjadi 2, yaitu:

a. Osifikasi Intramembraneous

Osifikasi terbentuk dari sel induk osteoprogenitor yang berkoloni dengan jaringan ikat membentuk dan mengawali proses angiogenesis pada jaringan yang akan menjadi tulang (Kneale, 2011). Selanjutnya, sel progenitor masuk kedalam jaringan tersebut dan membentuk osteoblast. Osteoblast berfungsi membentuk osteosid yang terdiri dari kolagen dan matrik nonkolagen. Sebagian osteoblast akan berubah menjadi osteosit yang masuk kedalam lacuna matrik tulang dan sebagian menetap pada periosteum. Mayoritas tulang tengkorak dan klavikula terbentuk dari osifikasi ini (Sefrina, 2015).

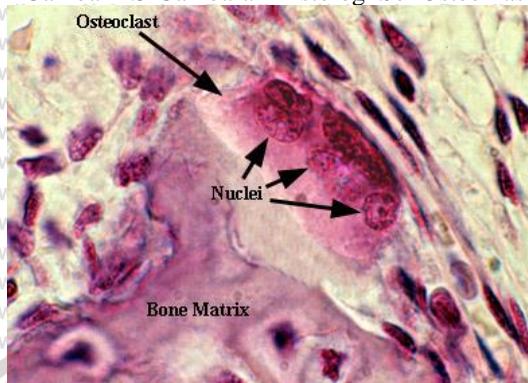
b. Osifikasi Endokhondral

Pembentukan tulang ini berasal dari prototipe kartilago dan hialin. Kartilago diselubungi membrane perikondrium yang diinvasi kapiler darah dan merangsang sel osteoprogenitor membentuk osteoblast (Kneale, 2011). Osifikasi endokhondral dibagi menjadi 2, yaitu osifikasi endokhondral primer yang terjadi dibagian tengah tulang (diafisis) dan osifikasi endokhondral sekunder yang terjadi dibagian luar tulang (epifisis) (Sefrina, 2015).

## 2.5 Osteoklas

Sel osteoklas merupakan sel berinti banyak yang berfungsi penting dalam proses resorpsi mineral dan matrik tulang (Noor, 2016). Osteoklas merupakan turunan golongan monosit atau makrofage yang dibentuk oleh fusi selular prekursor *mononuclear haemopoetic stem cell* yang berasal dari sumsum tulang belakang (Minashima, 2002; Sefrina; 2015). Osteoklas mampu mengikis tulang dengan menghasilkan enzim proteolitik yang mendigesti kolagen serta asam laktat dan asam sistrat yang memecah matrik dan melarutkan mineral tulang sehingga kalsium dan fosfat terlepas dalam darah (Noor, 2016; Kneale, 2011). Gambaran histologi sel osteoklas digambarkan pada gambar 2.5.

Gambar 2.5 Gambaran Histologi Sel Osteoklas



Sumber: Dragos, 2012

Diferensiasi osteoklas dipengaruhi oleh adanya RANKL (*Receptor Activator of Nuclear Factor-KB Ligand*) dan M-CSF (*Macrophage Colony-Stimulating Factor*) yang diekpresikan oleh osteoblast (Saltel *et al.*, 2006; dalam Akbar, 2012). Sekresi M-CSF (*Macrophage-Colony Stimulating Factor*) oleh sel stroma. M-CSF akan berikatan dengan c-Fms pada prekursor sel osteoklas sehingga terbentuk pre-osteoklas. Kemudian sel pre-osteoklas tersebut akan mempengaruhi pengekspresiaian RANK (*Receptor Activator of Nuklear  $\beta$* ) yang berada di membran sel pre-osteoklas prekursor osteoklas, dan terjadi hubungan interaksi dan ikatan dengan RANKL yang akan mempengaruhi proses resorpsi tulang (Heineman dkk, 2010). Hubungan Interaksi antara RANKL dan RANK berperan penting dalam pembentukan dan aktivasi sel osteoklas. RANKL (*Receptor Activator of Nuklear  $\beta$  Ligand*) berperan sebagai jembatan untuk PGE<sub>2</sub>, IL-1, IL-6, dan TNF- $\alpha$  bisa menstimulasi pembentukan sel osteoklas langsung. Peningkatan osteoklastogenesis dapat mengakibatkan peningkatan resorpsi tulang (Takayanagi, 2007).

## 2.6 Osteoblas

Berbeda halnya dengan sel osteoklas, sel steoblast berperan penting dalam pembentukan tulang. Sel osteoblast

merupakan sel mononukleus yang tergambar pada gambar 2.6. Sel osteoblast berasal dari diferensiasi multipoten *mesenkimal stem cel* (MSC) sebagai *osteoprogenitor* yang terdapat pada bagian dalam periosteum dan sumsum tulang yang berperan dalam mensintesis, mentransfer, dan mengatur komponen matrik tulang (Orwoll, 2003; Sefrina, 2015). Osteoblas membentuk tulang dengan mensekresikan osteoisid atau proteoglikan yang sebagian besar terdiri dari kolagen (Noor, 2016). Sel osteoblast yang masuk kedalam matrik tulang dan berfungsi membentuk tulang baru disebut osteosit yang berfungsi memperluas sitoplastik kavitas lacuna melalui *network* insetselular kanalikuli (Sefrina, 2015). Osteosit mengatur komunikasi antar sel dan penempatan matrik mineralisasi pada remodeling sesuai kebutuhan fungsional.

Gambar 2.6 Gambaran Histologi Sel Osteoblast



Sumber: Khumar, 2014

Saat resorpsi tulang oleh osteoklas ada beberapa matrix ekstraseluler yang dilepaskan seperti; IGF-1 (*Insulin Growth Factor 1*) dan TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor  $\beta$* ) yang berfungsi mengontrol diferensiasi dan aktifitas osteoblast pasca pelepasan (Harada dan Rodan, 2003; Lamberts, 2007). Proses resorpsi yang terjadi mengakibatkan komunikasi intraseluler osteoblast yang menjadi aktif. Sel osteoblast bersama IGF-1 menjalankan fungsinya mensintesis

pembentukan kolagen dan matriks tulang sehingga mampu mempertahankan masa tulang (Sudoyo, 2015).

Diferensiasi tersebut dikontrol oleh 2 transkrip factor yaitu Runx2 dan osterix. Diferensiasi osteoblast dibagi menjadi 3 fase yaitu: Poliferasi sel, Maturasi matrix, dan Mineralisasi matrix. Pada stase poliferasi sel dan ditandai adanya OPN, Pro-collagen 1, TGF- $\beta$ , dan *fibronectin*. Pada fase maturasi matrik ditandai oleh *alkaline phosphatase* (ALP) dan kolagen. Fase mineralisasi matrik ditandai oleh *osteocalcin* (OC), dan *osteopontin* (OPN). Sintesis kolagen pada diferensiasi osteoblast merupakan kolagen tipe 1 yang berfungsi essential pada mineralisasi *hydroxyapatite* dan membentuk osteoids. Osteoblast akan merangsang pengendapan garam kalsium dan fosfor yang kemudian akan membentuk berikatan dengan osteoid untuk mineralisasi jaringan tulang (Bosworth, 2011). Endapan kalsium fosfor  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  akan membentuk *hydroxyapatite* (Sherwood, 2011).

## 2.7 Alkaline Phosphatase (ALP)

*Alkaline Phosphatase* (ALP) merupakan enzim hidrolise dengan kofaktor Magnesium ( $\text{Mg}^{2+}$ ) dan Zink ( $\text{Zn}^{2+}$ ) yang terdapat pada lapisan eksternal membrane sel yang ditemukan disebagian besar organ tubuh dengan 80% terdapat pada hati dan tulang serta sisanya pada organ lain seperti plasenta, ginjal, testis, timus, paru-paru dan tumor. Enzim ini bekerja secara optimum pada keadaan basa (pH 8-10,5). Enzim ALP berperan penting dalam tumbuh kembang manusia terutama dalam mineralisasi tulang oleh karenanya pada kondisi normal ALP lebih banyak ditemukan pada bayi, anak-anak dan remaja dibandingkan dengan pada orang dewasa (Whyte, 2016). Menurut penelitian pada bayi yang mengalami *Hypophosphatasia* dengan defisiensi ALP berhubungan dengan *severe osteogenesis imperfect* tipe II dan mendeaktifasikan RunX2 (CBFA1) dari fungsi osteoblast yang mengganggu pertumbuhan tulang dan gigi serta distribusi osteosit yang tidak merata pada permukaan

trabekular yang menyebabkan tulang lebih mudah fraktur (Whyte, 2016, Akbar, 2012).

Ada 4 bentuk (isoenzim) *alkaline phosphatase*, yaitu *plasenta*, *germ cell ALP*, *intestinal ALP* dan *tissue nonspecific ALP*. TNAP (*Tissue Nonspecific Alkaline Phosphatase*) melekat pada permukaan dan matrix vesicle hipertropik membrane sel kondrosite, osteoblast dan odontoblast. Alkaline phosphatase dihasilkan saat osteoblast sedang aktif menghasilkan jaringan bone matrix dengan sekresi optimum pada fase maturasi matrix. Alkaline phosphatase (ALP) dapat digunakan sebagai biochemical marker aktifitas osteogenik pada bone formation stase proliferasi awal (Noor, 2016).

Secara fisiologis enzim ini banyak di temukan pada masa pertumbuhan tulang kehamilan. Dan secara patologis peningkatan sementara enzim ini berhubungan dengan penyakit hepatoliliar dan keadaan tulang yang disebabkan oleh adanya peningkatan aktivitas osteoblastik seperti faktor, metastasis tulang, hiperparatiroidisme, penyakit tulang, dan keganasan. Konsentrasi ALP yang meningkat mempengaruhi transformasi fibroblast ke *osteogenic tissue* (Kaplan, 2009).

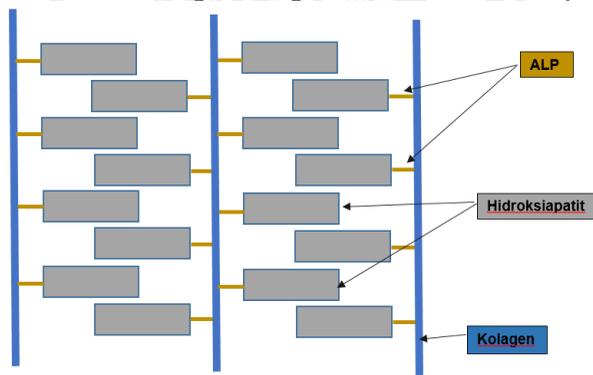
Fungsi alkaline phosphatase (ALP) dalam penyembuhan luka dikenal dalam teori "Hipotesis Booster" yang menyatakan bahwa ALP berfungsi meningkatkan *local inorganic phosphate* dengan menghidrolisis fosfat organik dalam darah. Peningkatan calcium fosfat mempengaruhi deposisi hidksiapatit. Enzim ALP mentransport ion calcium dan fosfat yang membentuk hidksiapatit kedalam kerangka kolagen sebelum yang selanjutnya mengalami deposisi dalam matrik tulang (Caulibaly, 2011).

## 2.8 Kolagen tipe 1

Kolagen tipe I secara spesifik berperan dalam mineralisasi tulang. Kolagen yang terdapat pada tulang dan jaringan lain memiliki komposisi dasar yang sama, akan tetapi pada kolagen tulang memiliki *pyridinoline cross link* yang menjadi ciri khas pada kolagen tulang (Akbar, 2012). Kolagen merupakan salah satu faktor utama pembentuk matrik dan

mampu berikatan dengan fibrin sehingga meningkatkan kekakuan dan ketegangan tulang terhadap gaya tarikan (Mardiyantoro, 2018; Asikin, 2016). Sintesis kolagen dimulai pada awal diferensiasi osteoblast dengan membentuk prekolagen yang selanjutnya mengalami maturasi menjadi kolagen tipe 1. Kolagen berfungsi essential pada mineralisasi *hydroxyapatite* dan pembentukan osteoids. Kolagen tipe 1 mampu meningkatkan osteogenesis dengan mendeposisi kalsium, mensekresikan OPN dan OC, serta meningkatkan rasio mineral terhadap matrix. Serta sintesis kolagen juga berperan penting dalam imobilisasi ALP (Akbar, 2012). Kolagen memiliki fungsi penting dalam deposisi garam hidroksiapatit yang difasilitasi oleh *alkaline phosphatase* (ALP). Peran penting kolagen dalam pembentukan tulang digambarkan dalam gambar 2.7.

Gambar 2.7 Hubungan Kolagen dan Garam Hidroksiapatit



## 2.9 Ikan Patin

Ikan patin (*Pangasius djambal*) masuk dalam family *Pangasidae* merupakan kelompok ikan lele-lelean (*cat fish*) ikan air tawar asli Indonesia yang tersebar sebagian besar tersebar di wilayah Kalimantan, Sumatra, Papua dan Jawa. Ikan patin hidup dan berkembang di sungai dan kawasan sepanjang daerah aliran sungai Musi, Mahakam, Barito, Kapuas, dan lain-lain. Pada mulanya ikan patin hidup di

sungai-sungai besar yang bermuara ke laut. Dengan seiring perkembangan zaman, ikan ini mulai populer saat berhasil pemijahan didalam kolam berhasil dilakukan (Utomo, 2018)

Berdasarkan klasifikasinya taksonomi ikan patin di jabarkan sebagai berikut:

Phylum : Chordata  
Klas : Pisces  
Sub Klas : Teleostei  
Ordo : Ostariophsi  
Sub ordo : Siluroidea  
Famili : Pangasidae  
Genus : Pangasius  
Spesies : *Pangasius djambal*

Gambar 2.8. Ikan patin



Sumber: Priyanto, 2013

Terdapat beberapa kekerabatan ikan patin local seperti; *Pangasius-Pangasius (Pangasius djambal)*, *Pangasius macronema*, *Pangasius micronema*, *Pangasius nasutus*, *Pangasius nienhuisii*, *Pangasius polyuranodon*, *Pangasius humeralis*, dan *Pangasius litostoma*. Dan yang paling berpeluang menjadi komoditas adalah *Pangasius djambal* karena memiliki daging yang putih. Dan ikan ini termasuk ikan yang besar karena pada umur 6 bulan ikan patin bisa mencapai ukuran 35-40 cm (Mahyuddin, 2010).

Ikan patin memiliki karakter seperti memiliki lubang mulut kecil, berpinggiran rongga mata yang bebas, sirip punggung tambahan sangat kecil, memiliki sungut atau kumis

dibagian hidung, dan bentuk badan memanjang agak pipih. Ikan patin memiliki tubuh yang licin seperti lele karena ikan ini tidak memiliki sisik, warna tubuhnya putih seperti perak dan punggung berwarna hitam kebiru-biruan. Ciri khas dari cat fish adalah memiliki ukuran kepala ikan patin relatif kecil dengan mulut terletak di ujung kepala dan pada sudut mulutnya terdapat dua pasang kumis pendek yang berfungsi sebagai indera peraba saat benerang ataupun mencari makanan. (Mahyuddin, 2010)

Habitat ikan patin berada di perairan air tawar berupa waduk, sungai-sungai besar dan muara-muara sungai hampir diseluruh wilayah Indonesia. Ikan omnivora ini lebih suka menetap di dasar perairan daripada di permukaan, oleh karena itu termasuk *bottom feeder fish* dan aktif pada malam hari (nokturnal). Persebaran ikan ini cukup luas yaitu meliputi perairan Thailand, Vietnam, Cina, Kamboja, Myanmar, Laos Burma, India, Taiwan, Malaysia dan Semenanjung Indo-Cina. Ikan ini juga masuk dalam peringkat no 1 ikan dengan permintaan tertinggi di Asia Tenggara (Mahyuddin, 2010).

Komposisi tubuh ikan patin didominasi oleh 49% daging dan yang lain, yaitu kulit, tulang, kepala, jeroan, dan gelembung renang. Secara umum komposisi daging ikan terdiri dari 15 - 24% protein, 0,1 - 22% lemak, 1 - 3% karbohidrat, 0,8 - 2% substansi anorganik, dan 66-84% air (Suzuki 1981). Asam lemak jenuh tinggi pada ikan patin sekitar 50,28 - 64,42% dari total asam lemak, asam lemak tak jenuh sekitar 27,79-43,49% dan asam lemak tidak jenuh ganda rendah sekitar 6,93-13,07 dari total asam lemak. Omega 3 pada ikan patin sekitar 2,58 - 6,69% sedangkan omega 6 sekitar 5,00 - 12,50% (Suryaningrum, 2010).

Ikan patin memiliki kandungan seperti vitamin B, seng (Zn), besi (Fe), mangan (Mn), kobalt (Co), fosfor (P), yodium (I) 2220594/100 g, magnesium (Mg) 11,9-12,3 mg/100g dan kalsium (Ca) 5,50-10,10 mg/100g, dan kalium (Ka) 30-340 mg/100g (Sobri, 2008; Orban dkk, 2008).

Ikan patin juga merupakan sumber kolagen perairan. Kandungan lemak dalam daging ikan bervariasi tergantung pada spesies, umur, kondisi sebelum atau setelah perkembangbiakan (bertelur), dan kondisi pakan, semakin tinggi kandungan lemaknya, maka semakin rendah kandungan air daging ikan. Lemak pada produk perikanan umumnya sangat mudah untuk dicerna langsung oleh tubuh karena sebagian besar adalah asam lemak tak jenuh yang dibutuhkan oleh pertumbuhan, dan kandungan kadar kolesterol yang rendah (Adawyah, 2007).

Ikan patin jambal memiliki kandungan protein yang cukup tinggi. Protein tersusun oleh rangkaian dari asam gugus amino. Asam amino ada 2 jenis, yaitu asam amino esensial dan non esensial (Suryaningrum dkk, 2010). Protein berperan sebagai *body building*, salah satunya dalam proses penyembuhan luka. Ikan patin jambal mengandung asam amino yang tinggi seperti glisin, alanin, valin, lisin, asam glutamat dan lain sebagainya. Menurut jurnal International Ratnasari dkk, (2013), gelatin ikan patin memiliki kandungan asam amino yang berperan penting dalam penyembuhan luka. Menurut studi (Suryaningrum,2010) Ikan patin (*Pangasius djambal*) memiliki kandungan asam amino glisin(24,7%), Alanin(3,3%), Valin (2,2%), Leusin (2,7%), Isoleusin(2,4%), Asam aspartate (6,5%), Asam glutamate (9,9%), Lisin(10,3%), Arginin(16,3%), Histadin(1%), Serin(2,5%), Treonin(2,8%), Fenilalanin(4%), Tirosin(1,6%), Metionin(3,7%), dan Prolin(2,3%)

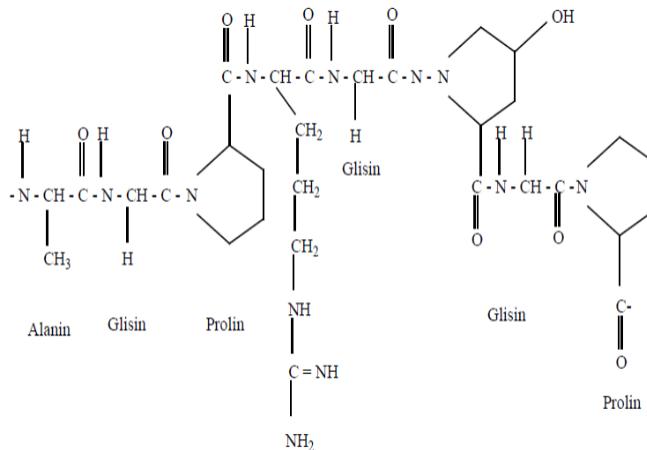
## 2.5 Gelatin

Gelatin dengan nama ilmiah *Hydrolised Collagen* ( $C_{76}H_{124}O_{29}N_{24}$ ) merupakan senyawa turunan yang memiliki ikatan polipeptida yang dihasilkan dari serabut kolagen jaringan penghubung, kulit, tulang dan tulang rawan yang dihidrolisis dengan asam atau basa atau bisa di peroleh dengan denaturarasi panas. Gelatin memiliki berat molekul sekitar 75

kDa Sifat senyawa ini padat, tembus cahaya, tidak berwarna, rapuh jika kering dan tak berasa (Nurrachmawati, 2015).

Gelatin digunakan secara luas di berbagai bidang dalam kehidupan sehari-hari seperti bidang makanan sebagai penstabil (*stabilizer*), pembentuk gel (*gelling agent*), pengikat (*binder*), pengental (*thickner*), pengemulsi (*emulsifier*), perekat (*adhesive*) dan sebagai *surface active agent* atau penurun tegangan antar permukaan, oleh karena itu gelatin disebut sebagai *miracle agent*. Pada industri farmasi gelatin dimanfaatkan sebagai bahan pembuat kapsul. Lalu industry lain yang memanfaatkan gelatin adalah pada fotografi dan industri kosmetik. Secara umumnya pemanfaatan diberbagai bidang adalah sebagai berikut: 60% total produksi gelatin digunakan pada industri pangan, sekitar 20% pada industri fotografi dan 10% pada industri farmasi dan kosmetik (Peranginangin, 2006).

Gambar 2.9. Struktire Kimia Gelatin



Sumber: Chaplin, 2006

Peran gelatin dalam kehidupan sehari-hari mengakibatkan permintaan gelatin terus meningkat seiring perkembangan trend dan pola komsumsi masyarakat. Dalam pemenuhan gelatin dalam negeri, Indonesia masih harus

bergantung pada import dari negara lain seperti India, China, Thailand, Australia, Brazil, Bangladesh, dan New Zealand (Peranginangin, 2006).

Komposisi utama gelatin terdiri dari 2/3 bagian kandungan asam amino glicyne dan 1/3 bagian kandungan asam amino prolin dan hidroksprolin. Kandungan sepertiga (2/3) asam amino dalam bentuk bubuk adalah *glicyne* yang memiliki efek sebagai anti inflamasi dan membantu proses penyembuhan luka. Gelatin dapat mempengaruhi proses hemostatis, berinteraksi dengan trombosit, berinteraksi dengan fibronectin, meningkatkan eksudat cairan, meningkatkan komponen seluler, meningkatkan *growth factor*, meningkatkan proses fibriplasia, dan mempengaruhi proliferasi epidermis. Gelatin yang mengandung kolagen yang merupakan salah satu bahan pembentuk tulang maupun tulang rawan (Nurrachmawati, 2015). Gelatin dapat bekerja sebagai micropartikel mengontrol sintesis bFGF (*basic fibroblast growth factor*) dalam tubuh (Elisseeff dkk, 2014). Kandungan protein gelatin kurang lebih sekitar 85-92% dan sisanya berupa garam mineral dan air (Nurrachmawati, 2015).

Kolegen yang menjadi sumber utama gelatin biasanya diperoleh dari tulang, tulang rawan, kulit dan jaringan ikat hewan. Menurut Regenstein (2014), bahwa masalah budaya dan kepercayaan menjadi pertimbangan utama dalam menggunakan kolagen komersial yang bersumber dari sapi dan babi. Kolagen yang berasal dari hewan darat memiliki pertimbangan lain seperti kontaminasi biologis yang bisa terjadi pada hewan tersebut seperti BSE (*Mad Cow Disease*), TSE (*Transmissible Spongiform Encephalopathy*), FMD (*Foot and Mouth Disease*) dan sebagainya. Gelatin yang diperoleh dari hewan darat juga berpotensi memiliki kualitas kolagen rendah dikarenakan adanya asam amino yang tinggi dan mempengaruhi proses denaturasi menjadi lebih cepat (Aberoumand, 2012).

Sebagai protein biodegradable, gelatin dapat di denaturasi melalui proses asam basa dari kolagen dan menghasilkan titik isoelektrik yang berbeda. Gelatin mampu

menyerap air (*bioabsorptivitas*) 5-10 kali dari bobot asal kemudian mengembang. Gelatin memiliki sifat yang lentur dan biocompatible (Aberoumand, 2012).

## 2.10 Tikus Putih

Tikus putih merupakan hewan yang umum dipakai dalam pengujian atau penelitian, hampir 90% penelitian dan pengujian yang menggunakan hewan coba mamalia menggunakan tikus putih (Moore, 2000).

Klasifikasikan tikus putih sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Sub ordo	: Myorporpha
Famili	: Muridae
Genus	: Mus
Spesies	: Mus musculus

Tikus putih atau mencit dianggap cukup efisien untuk dijadikan hewan coba karena selain mudah dipelihara tikus putih juga memiliki sifat menyerupai mamalia besar. Masa hidup dari tikus putih dapat mencapai usia 3 sampai 4 tahun (Bintari, 2016). Berikut ini adalah gambar tikus putih ditunjukkan pada gambar 2.10.

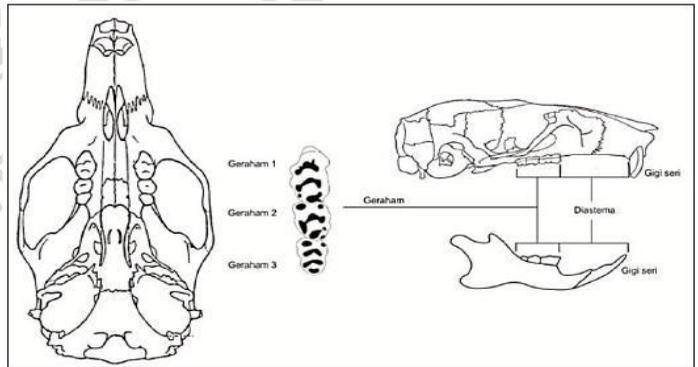
Gambar 2.10 Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Galur Wistar



Sumber: Robirukmana, 2012

Pada anatomi gigi tikus terdapat 2 gigi insisivus rahang atas dan 2 gigi insisivus rahang bawah, tidak memiliki gigi caninus dan premolar tetapi memiliki 6 gigi molar rahang atas dan 4-6 gigi molar rahang bawah sehingga total gigi tikus berjumlah 16 (Yuliadi *et al*, 2016). Serta diastema antara gigi insisivus dan gigi molar seperti yang tampak pada gambar 2.11.

Gambar 2.11 Anatomi Gigi Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Galur Wistar



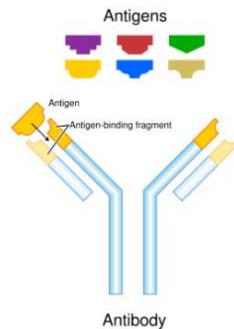
Sumber: Yuliadi *et al*, 2016

## 2.11 Pewarnaan Immunohistokimia

Nama Imuno histokimia berasal dari kata “*Immune*” yang menunjukkan prinsip dasar dari proses pewarnaan adalah antibodi dan kata “*Histo*” yang menunjukan adanya hubungan jaringan secara mikroskopis. Pewarnaan imunohistokimia sering digunakan sebagai penelitian dasar untuk mengetahui distribusi dan lokasi biomarker atau protein terekspresi pada berbagai macam jaringan pada tubuh serta dapat mengidentifikasi dan mengukur proses proliferasi dan apoptosis sel (Ramos dan Vara, 2005). Pemeriksaan imunohistokimia mampu mendeteksi adanya antigen, hal ini disebabkan adanya ikatan spesifik antara antigen dan antibodi. Interaksi antara antigen dengan antibodi dapat dilihat pada Gambar 2.12

Metode pewarnaan substansi atau bahan aktif di dalam jaringan dengan menggunakan prinsip dasar imunologi yaitu pengikatan bahan aktif (antigen) pada sisi aktif yang spesifik oleh suatu anti bahan aktif (antibodi). Pewarnaan imunohistokimia menggunakan prinsip histologi atau sitologi dan imunologi (Ramos dan Vara, 2005). Hasil reaksi antigen dan antibodi ini dapat diidentifikasi pada spesimen bila antibodi dapat diikat oleh suatu penanda marker berupa fluoresin enzim, bahan partikel atau isotop yang dapat divisualisasikan sehingga dapat menandai keberadaan bahan aktif tersebut dalam jaringan. Bahan aktif tersebut dapat berupa protein, karbohidrat, asam nukleat, lemak, dan bahan alami atau bahan sintetik lainnya (Nurhidayat, 2002). Pemeriksaan imunohistokimia untuk mengenali bahan spesifik tertentu pada jaringan dengan menggunakan antibodi dan sistem deteksi sehingga memungkinkan untuk mengenali bahan spesifik tersebut secara visual (Sudiana, 2005).

Gambar 2.12 Interaksi antara Antigen dengan Antibodi

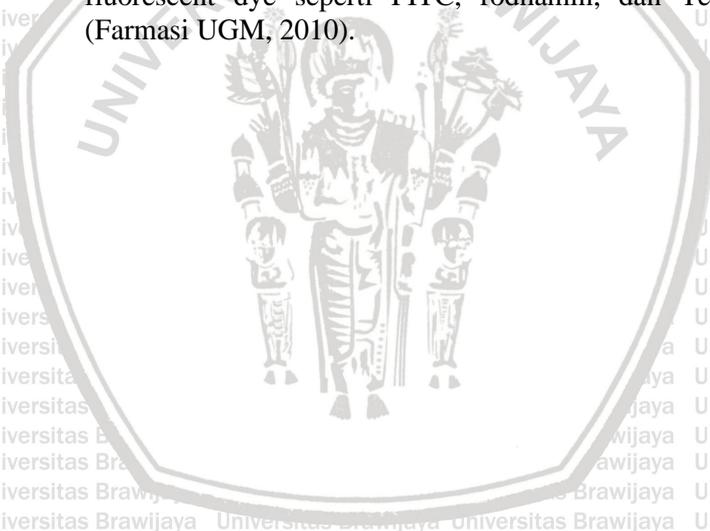


Sumber: Roitt et al, 1989

Metode Pewarnaan Imunohistokimia Berdasarkan Cancer Chemoprevention Research Fakultas Farmasi UGM (2010), terdapat dua metode dasar imunohistokimia: metode langsung (*direct*) dan metode tidak langsung (*indirect*).

Metode langsung (*direct method*) adalah metode pengecatan satu langkah dan hanya melibatkan satu jenis

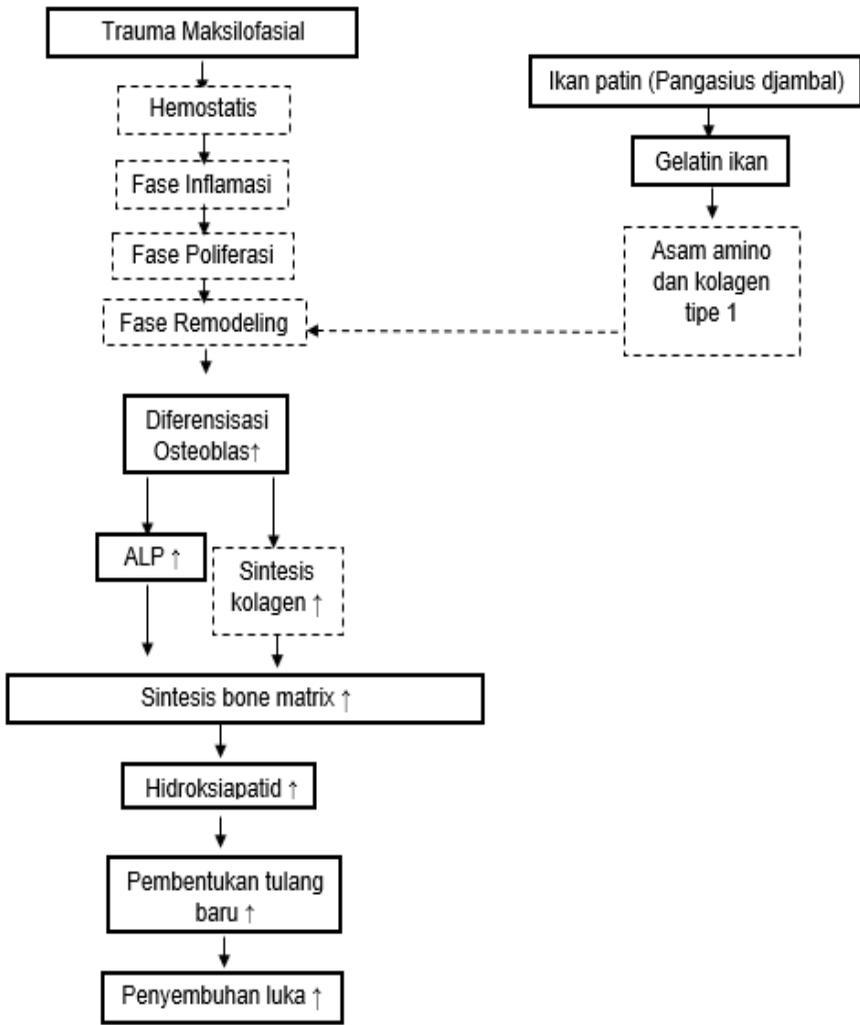
antibodi terlabel. Contoh dari metode ini adalah antiserum terkonjugasi *fluorescein isothiocyanate* (FITC) atau rodhamin. Metode tidak langsung (*indirect method*) menggunakan dua macam antibodi, yaitu antibodi tidak berlabel (primer) dan antibodi berlabel (sekunder). Antibodi primer akan mengenali antigen yang diidentifikasi pada jaringan (first layer), sedangkan antibodi sekunder akan berikatan dengan antibodi primer (second layer). Antibodi kedua adalah anti-antibodi primer. Antibodi sekunder yang terlabel akan ditambahkan substrat kromogen, yaitu suatu gugus fungsi yang akan membentuk senyawa berwarna saat bereaksi dengan senyawa tertentu. Terdiri atas metode, yakni metode *immunofluorescence* (menggunakan kromogen fluorescent dye seperti FITC, rodhamin, dan Texas-red) (Farmasi UGM, 2010).



BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS SEMENTARA

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan:



= Proses yang diteliti



= Proses yang tidak di teliti



= Tahapan proses



= Stimulan

Gambar 3.1 Kerangka Konsep

### 3.2 Deskripsi Kerangka Konsep Penelitian

Trauma maksilofasial sering terjadi dalam kedokteran gigi salah satunya disebabkan trauma pasca pencabutan gigi. Luka tersebut menstimulasi tubuh melakukan proses penyembuhan luka (*wound healing*) atau perbaikan (*repair*) untuk mengembalikan arsitektur dan fungsi suatu jaringan setelah cedera atau luka.

Tahan penyembuhan luka antara lain: hemostatis, inflamasi, proliferasi dan remodeling. Pada fase hemostatis pada 24 jam pertama untuk menghentikan pendarahan dan mengembalikan aliran darah pada daerah yang luka. Selanjutnya pada fase inflamasi didominasi oleh kostriksi vaskuler, agregasi platelet, degranulasi dan pembentukan fibrin (trombin). Selanjutnya pada fase proliferasi terjadinya perpindahan sel mesenkimal dan *growth factors* meregulasi sel osteoklas dan osteoblas. Terakhir, fase remodeling yang didominasi aktifitas osteoblast dan osteoklas dalam menstimulasi proses resorpsi dan pembentukan tulang baru.

Sel osteoblas mengekspresikan RANKL dan M-CSF untuk berikatan dengan RANK dan c-Fms pada osteoklas untuk meresorpsi tulang dan meningkatkan konsentrasi kalsium dan fosfor dalam darah. Sel osteoblast berfungsi sintesiskan matrix tulang yang terdiri dari kolagen tipe1 dan matrix nonkolagen salah satunya ALP (*Alkaline Phosphatase*) tulang atau TNAP (*Tissue Nonspecific Alkaline Phosphatase*).

Matrik ekstraseluler yang diekspresikan osteoblast berikatan dengan konsentrasi kalsium dan fosfor dalam darah membentuk garam kalsiumfosfat. ALP berfungsi mentransport garam kalsium fosfat untuk pembentukan hidroksiapatite yang selanjutnya berikatan dengan kolagen dan terdeposisi pada matrik tulang termineral sehingga terjadi proses remodeling.

Kandungan asam amino yang tinggi pada ikan patin akan mempercepat tahapan penyembuhan. Asam amino tersebut akan dibuat sediaan gelatin yang digunakan untuk perawatan luka. Perawatan luka menggunakan gelatin dilakukan pada fase hemostatis. Pemberiangelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) akan mempercepat proses penyembuhan luka. Percepatan tersebut ditunjukkan dengan meningkatnya biochemical marker penyembuhan luka salah satunya ALP (*Alkaline Phosphatase*). Jumlah ekspresi *Alkaline Phosphatase* (ALP) akan menandakan seberapa cepat proses mineralisasi penyembuhan luka yang sedang terjadi.

### 3.3 Hipotesis Penelitian

Pemberian gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) dapat meningkatkan ekspresi ALP (*Alkaline Phosphatase*) pada penyembuhan luka pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar.

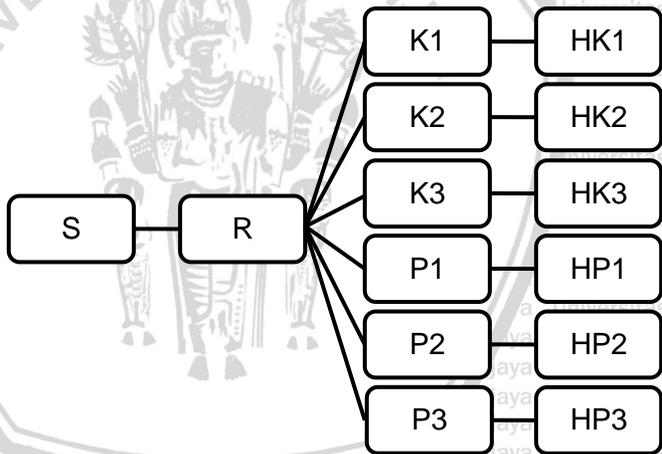
**BAB IV**

**METODE PENELITIAN**

**4.1 Rancangan Penelitian**

Pendekatan yang digunakan untuk tujuan penelitian ini adalah dengan rancangan eksperimental laboratorium. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *Randomized Post Test Only Group Design* dilaboratorium untuk mengetahui pengaruh pemberian gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) terhadap ekspresi *extracellular matrix protein ALP* pada penyembuhan luka pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar.

Gambar 4.1 Desain Penelitian *Randomized Post Test Only Control Group Design*



Keterangan :

S: Sampel

R: Sampel dipilih secara acak (random)

K1: Kelompok kontrol 1 tanpa diberi gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) selama 3 hari pasca pencabutan gigi.



K2: Kelompok kontrol 2 tanpa diberi gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) selama 5 hari pasca pencabutan gigi.

K3: Kelompok kontrol 3 tanpa diberi gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) selama 7 hari pasca pencabutan gigi.

P1: Kelompok perlakuan 1 diberi gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) dengan konsentrasi 100% selama 3 hari perawatan.

P2: Kelompok perlakuan 2 diberi gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) dengan konsentrasi 100% selama 5 hari perawatan.

P3: Kelompok perlakuan 3 diberi gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) dengan konsentrasi 100% selama 7 hari perawatan.

HK1: Hasil pengamatan kelompok kontrol 1 tanpa diberi gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) selama 3 hari pasca pencabutan gigi.

HK2: Hasil pengamatan kelompok kontrol 2 tanpa diberi gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) selama 5 hari pasca pencabutan gigi.

HK3: Hasil pengamatan kelompok kontrol 3 tanpa diberi gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) selama 7 hari pasca pencabutan gigi.

HP1: Hasil pengamatan kelompok perlakuan 1 diberi gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) dengan konsentrasi 100% selama 3 hari perawatan.

HP2: Hasil pengamatan kelompok perlakuan 2 diberi gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) dengan konsentrasi 100% selama 5 hari perawatan.

HP3: Hasil pengamatan kelompok perlakuan 3 diberi gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) dengan konsentrasi 100% selama 7 hari perawatan.

#### 4.2 Sampel Penelitian

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar jantan yang

dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pemeliharaan dilakukan dalam kandang yang bersih. Pemilihan tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar jantan sebagai populasi dalam penelitian ini karena hewan mamalia tersebut hewan yang jinak, tidak agresif atau jarang berkelahi, relative murah, mudah beradaptasi, dapat dengan mudah diperoleh dalam jumlah banyak, memiliki respon yang cepat terhadap rangsangan, interval kelahiran pendek, struktur tubuh dan karakteristik tikus yang mudah dan fungsi metabolisme mirip manusia dipahami.

#### 4.2.1 Kriteria Sampel

Menurut Oroh, *et al* (2015), sampel penelitian yang dipilih berdasarkan ketentuan:

Kriteria Inklusi:

- a. Jenis kelamin jantan.
- b. Usia 2-3 bulan.
- c. Berat badan 250-300 gram.
- d. Sehat, ditandai dengan gerakan yang aktif, mata yang jernih tidak merah dan bulu tebal berwarna putih mengkilap

Kriteria Eksklusif:

- a. Adanya luka pada tubuh tikus
- b. Gigi patah saat proses pencabutan
- c. Tikus dalam kondisi yang tidak sehat ditandai dengan aktivitas gerak tikus yang berkurang, bola mata kemerahan, hidung dan mulut berlendir, air liur terus menerus keluar, feses cair karena diare.
- d. Tikus mati selama proses penelitian berlangsung

#### 4.2.2 Jumlah Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan teknik randomisasi untuk pengelompokan perlakuan menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan pertimbangan hewan coba, bahan pakan, dan bahan penelitian lainnya adalah homogen.

Pada penelitian ini, hewan coba dikelompokkan menjadi 6 kelompok yaitu 3 kelompok kontrol negatif (K1, K2, K3) dan 3 kelompok eksperimen (P1, P2, P3). Rumus Federer digunakan dalam menghitung jumlah sampel yang diperlukan sebagai berikut.

Gambar 4.2 Rumus Federar

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

Keterangan:

t = Jumlah kelompok

n = Jumlah pengulangan penelitian

Pada penelitian ini  $t=6$  sehingga jumlah pengulangan penelitian adalah sebagai berikut:

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

$$(n-1)(6-1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan dengan menggunakan rumus Federar diatas dapat disimpulkan bahwa jumlah sampel yang digunakan dalam pada penelitian ini minimal 4 ekor tikus putih untuk tiap kelompok. Pada penelitian ini dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan, sehingga dibutuhkan 24 ekor tikus putih. Untuk mengurangi *lost of sample* akibat adanya tikus yang mati, maka jumlah sampel ditambah menjadi 30 ekor tikus putih.

### 4.3 Variabel Penelitian

#### 4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pemberian gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*).

#### 4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah ekspresi *Alkaline Phosphatase (ALP)*

### 4.3.3 Variabel Kendali

Variabel kendali pada penelitian ini adalah usia, jenis kelamin, berat badan, makanan dan minuman yang dikonsumsi hewan coba, perlakuan kandang hewan coba kesehatan hewan coba, teknik luka pada tubuh hewan coba, aplikasi gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) pada hewan coba dan pengambilan preparat jaringan.

## 4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

### 4.4.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama  $\pm 2$  bulan dengan rincian sebagai berikut:

1. Pembuatan gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Teknologi Hasil Pangan Universitas Brawijaya.
2. Pemeliharaan dan perlakuan pada hewan coba dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
3. Pembuatan preparat penelitian histologi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
4. Pengamatan imunohistokimia *Alkaline Phosphatase* (ALP) dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
5. Pengamatan sediaan dan analisis data dengan menghitung ekspresi *Alkaline Phosphatase* (ALP) dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

### 4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Agustus-September 2019.

## 4.5 Alat dan Bahan Penelitian

### 4.5.1 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Gelatin Ikan Patin

Kulit ikan patin (*Pangasius djambal*) konsentrasi 100%, timbangan analitik (neraca *Ohaus*), *glass beaker*, *glass erlenmeyer*, gelas ukur, talenan, loyang, pisau/gunting, termometer, *shaker water bath*, air suling, kain saring *whatman* no. 1, kulkas, air lemon, larutan asam sitrat 1%, kertas lakmus, baskom, wadah tertutup, masker, sarung tangan, kantong plastik jenis PE (*poly ether*), dan *aquadest*.

### 4.5.2 Alat dan Bahan untuk Pencabutan Gigi Tikus Putih

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *wistar* berumur 2-3 bulan dengan berat badan 250-300 gram, pisau *lecron* modifikasi, anastesi *ketamine* 1000 mg/10 mL, masker, sarung tangan, dan *needle holder* modifikasi.

### 4.5.3 Alat dan Bahan untuk Perlakuan

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *wistar* berumur 2-3 bulan dengan berat 250-300 gram, gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) konsentrasi 100%, pinset bedah, sonde gastrik, *cotton bud*, *scalpel* no. 11, toples kaca yang sudah diberi label untuk fiksasi, jarum jahit, benang jahit, gunting bedah, masker, dan sarung tangan.

### 4.5.4 Alat dan Bahan untuk Pengambilan Jaringan dan Pembuatan Preparat

Eter, *scalpel*, *microtom*, kaca obyek dan penutup, blok parafin, *water bath*, tempat pewarnaan dan cucian, kertas saring, *timer*, formalin 10%, *acetone*, *xylol*, kuas kecil, gelatin, alkohol 96%, *reagen kit* pewarnaan imunohistokimia, masker, dan sarung tangan.

### 4.5.5 Alat dan Bahan untuk Pewarnaan Imunohistokimia Indirek

Blok parafin yang sudah tersedia di Laboratorium Biokimia FKUB, *xylene*, etanol, *peroxidase blocking solution*, *prediluted blocking serum*, antibodi monoklonal (anti rat-ALP), *phosphate buffer saline*, antibodi sekunder

(conjugated to horse radish peroxidase), peroksidase, kromogen DAB (*Diaminobenzinidine*), *hematoxylin eosin*, air, *mounting media*, *coverslip*, *mikroskop cahaya* dengan perbesaran 400x dan 20 lapang pandang.

## 4.6 Definisi Operasional

### 4.6.1 Gelatin Ikan Patin

Gelatin diperoleh dari kulit ikan patin (*Pangasius djambal*) yang dibuat menggunakan teknik pembuatan komersial modifikasi tanpa proses pengeringan (Ratnasari dkk, 2013). Didapatkan hasil berupa gel yang mengandung konsentrasi gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) yang akan di buat pada penelitian ini sebesar 100%.

### 4.6.2 Pencabutan Gigi Tikus

Pencabutan gigi merupakan prosedur bedah yang bersifat irreversible dan dapat dilakukan dengan tang, elevator, atau pendekatan transveolar (Pedlar, 2007). Pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*) akan dilakukan pada gigi insisivus satu kiri rahang bawah.

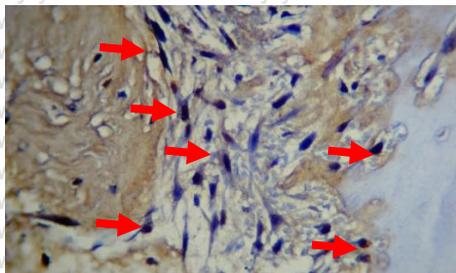
### 4.6.3 Soket Gigi

Pada penelitian ini, yang di maksud soket gigi adalah kavitas pada tulang alveolar rahang bawah tempat melekatnya gigi insisivus satu rahang bawah pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dipotong pada bagian mesial secara vertikal untuk dijadikan preparat histologi penelitian (Widyastomo dkk, 2013).

### 4.6.4 Ekpresi Alkaline Phosphatase (ALP)

*Alkaline Phosphatase (ALP)* yang dihitung adalah yang diekspresikan oleh osteoblas dengan pewarnaan imunohistokimia. ALP akan tampak berwarna coklat sedikit gelap pada permukaan sel osteoblast.

Gambar 4.3. Gambaran Imunohistokimia ALP



## 4.7 Prosedur Penelitian

### 4.7.1 Persiapan dan Perawatan Hewan Coba

Persiapan dan perawatan hewan coba (Rodensia, 2017) sebagai berikut:

1. Pemilihan hewan coba berdasarkan kriteria sampel. Kemudian hewan coba yang telah dipilih dikelompokkan menjadi 6 kelompok, setiap kelompok terdiri dari 4 ekor tikus putih.
2. Kemudian, tikus dipelihara dalam kandang berupa kotak plastik dengan penutup berupa kawat berjaring dengan ukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm dan dalam satu kandang berisi 2 ekor tikus putih.
3. Setelah itu, lakukan aklimatisasi hewan coba tikus putih agar tikus putih dapat beradaptasi selama 1 minggu dalam Laboratorium Farmakologi FKUB pada suhu ruangan 20-26°C dengan kelembapan udara antara 40-70%.
4. Untuk menjaga kebersihan kandang perlu dilakukan desinfeksi menggunakan *lysol* 3-5%.
5. Hewan coba diberi makan berupa pelet komersial yang diletakkan pada tempat makan dan diberi air minum segar (air PDAM) yang diletakkan pada tempat air minum.

### 4.7.2 Pembuatan Gelatin Ikan Patin

Kulit ikan patin dipisahkan dari daging dan lemak yang masih menempel pada kulit ikan patin, kemudian kulit

ikan patin disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ . Selanjutnya, kulit ikan patin dicairkan dalam suhu ruangan dan dipotong dengan ukuran sekitar  $1\text{ cm}^2$ . Kulit ikan patin dibilas menggunakan air lemon untuk menghilangkan material selain kulit ikan. Kemudian, 100 gram sampel ikan patin dibilas dan direndam dalam larutan asam klorida 1% selama 2 jam untuk mencairkan serabut kolagen menjadi serat-serat/ fibril sehingga mudah diekstraksi. Setelah di rendam, sampel dilakukan pencucian beberapa kali hingga mencapai pH netral (6-7). Kulit patin diekstraksi menggunakan *shaker water bath* dengan air suling pada suhu  $45^{\circ}\text{C}$  selama 12 jam. Selanjutnya, menggunakan kain saring *Wathman no.1* untuk memisahkan larutan gelatin dengan sisa kulit ikan patin. Kemudian larutan gelatin didinginkan pada suhu ruang hingga terbentuk gel gelatin ikan patin (Ratnasari *et al*, 2013; Reza *et al*, 2015).

#### 4.7.3 Pencabutan Gigi Tikus

Sebelum dilakukan pencabutan gigi hewan coba diadaptasikan terlebih dahulu sekitar 7 hari. Prosedur yang dilakukan pertama kali sebelum melakukan pencabutan gigi adalah mengulasi daerah yang akan di anastesi menggunakan antiseptik yaitu larutan *povidone iodine* 10% atau alkohol 70% pada bagian labial dan palatal dari gingiva gigi yang akan di cabut. Kemudian melakukan anastesi untuk menghilangkan rasa sakit pada saat pencabutan gigi pada tikus putih menggunakan larutan anastesi ketamin 1000 mg/10 ml sebanyak 0,18-0,2 ml (mengikuti berat hewan coba) dengan cara injeksi intra peritoneal 2/3 dari perut atau paha. Pastikan lakukan aspirasi setelah jarum masuk. Jika hasil aspirasi negative dan letak insersi sudah benar maka bisa dilakkan injeksi. Larutan anastesi ketamin memiliki *onset of action*  $\pm 3$  menit sedangkan *duration of action*  $\pm 60$  menit. Setelah tikus tertidur maka dapat dilakukan tindakan pemisahan akar gigi dari gingiva dengan menggunakan lecron yang telah dimodifikasi. Lakukan pencabutan searah soket gigi dengan hati-hati dengan

tekanan seminimal mungkin untuk meminimalisir patahnya gigi dan Pengambil gigi insisivus satu kiri rahang bawah menggunakan needle holder. Kemudian, melakukan irigasi pada soket menggunakan aquades yang steril bersihkan dari sisa-sisa fagmen gigi dan yang terakhir adalah kontrol pendarahan menggunakan tampon atau kasa steril (Widyastomo *et al.*, 2013).

#### 4.7.4 Pemberian Analgesik

Pemberian analgesik pasca pencabutan pada tikus putih untuk meredakan rasa nyeri pasca pencabutan gigi insisivus satu kiri rahang bawah. Prosedur pemberian analgetik yaitu diberikan Novalgin 500mg/ml dengan dosis 0,3 ml secara intra peritoneal sebanyak 1 kali sehari (Widyastomo *et al.*, 2013).

#### 4.7.5 Pemberian Gelatin Ikan Patin (*Pangasius djambal*)

1. Soket diberi gelatin ikan patin dengan menggunakan spuit yang dimasukkan ke dalam soket sebanyak 1cc.
2. Gelatin ikan patin juga diulaskan pelan-pelan menggunakan *cotton bud* pada soket secara merata
3. Pemberian gelatin ikan patin dilakukan setelah pencabutan gigi hingga hari ketujuh pasca pencabutan gigi. Sedangkan pada kelompok kontrol tidak diberi gelatin ikan patin.
4. Untuk kelompok control tidak dilakukan perlakuan.

#### 4.7.6 Perawatan Hewan Coba Pasca Pencabutan Gigi

Asupan gizi pada tikus putih pasca pencabutan harus diperhatikan dan tercukupi dengan memberikan makanan yang lunak yaitu mengencerkan makanan tikus putih (pelet komersial). Pemberian makan pada tikus dilakukan dengan teknik sondasi menggunakan sonde gastrik sehingga makanan langsung masuk ke lambung dandidakmelewati mulut agar tidak mengganggu proses penyembuhan soket gigi. Pemberian makanan dilakukan 2 kali sehari yaitu pagi dan sore hari serta diberi minum air PDAM secukupnya (Pusat Penelitian dan Perkembangan Peternakan, 2016).

#### 4.7.7 Pengambilan Sampel Jaringan

Untuk melihat peningkatan ketebalan epitel pada jaringan di soket gigi, tikus pada hari ke-3, ke-5, dan ke-7 dimatikan terlebih dahulu (euthanasia secara kimiawi). Sebelum dilakukan pengambilan sampel jaringan dengan cara menginjeksikan anastesi *ketamine* dengan dosis letal (tiga kali dosis anastesi pada umumnya) sebanyak 0,9 ml atau anastesi inhalasi menggunakan eter. Setelah melakukan injeksi, dapat dilakukan pengecekan dan memastikan bahwa tikus telah mati dengan cara melihat aspirasi, detak jantung, dan kedipan mata tikus putih. Kemudian, melakukan dekaputasi rahang mandibular dengan menggunakan *scalpel* nomor 11 dimana terdapat gigi yang sudah dilakukan pencabutan. Rahang tikus putih kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang berisi larutan formalin 10% selama 18-24 jam untuk fiksasi jaringan dan diberi label penanda. Kemudian, jasad tikus dikuburkan dengan layak dan dibantu dengan tenaga ahli dari laboratorium. (Widyastomo *et al*, 2013).

#### 4.7.8 Teknik Pemrosesan Preparat Jaringan

Sampel jaringan yang telah dilakukan kemudian dilakukan pencucian pada air mengalir selama 15 menit. Selanjutnya, melakukan dekalsifikasi dengan menggunakan EDTA 14% selama 3-4 minggu kemudian dilakukan pencucian kembali menggunakan air mengalir selama 15 menit. Kemudian, dilakukan dehidrasi menggunakan *acetone* sebanyak 4 kali dalam 1 jam. Selanjutnya, dilakukan *clearing* dengan menggunakan *xylol* sebanyak 4 kali dalam 30 menit dan setelah itu dilakukan impregnasi menggunakan parafin cair pada suhu 55°C-80°C sebanyak 4 kali dalam 1 jam. Selanjutnya, penanaman jaringan ke dalam blok parafin (*embedding*) dan didinginkan selama 24 jam. Kemudian, sediaan dilakukan penyayatan dengan menggunakan *mircrotom rotary* dengan ketebalan antara 3-5 mikron lalu sayatan diletakkan pada *water bath* pada suhu 30°C. Setelah itu, sayatan diletakkan pada gelas objek dan didiamkan

selama 24 jam kemudian dilakukan pewarnaan menggunakan teknik imunohistokimia indirek.

#### 4.7.9 Teknik Indirek Pewarnaan Imunohistokimia

Metode pewarnaan pada penelitian ini menggunakan metode Imunohistokimia *indirect* (tidak langsung) yang menggunakan antibodi primer untuk mengenali antigen yang mengidentifikasi jaringan sedangkan antibodi sekunder (berlabel) digunakan agar berikatan dengan antibodi primer dan menghasilkan warna coklat untuk ekspresi EGF karena berikatan dengan senyawa pemberi warna (kromogen).

Menurut Protap Pengecatan Imunohistokimia Fakultas Farmasi UGM, prosedur pewarnaan Imunohistokimia dapat dimodifikasi sebagai berikut:

1. Melakukan deparafinasi preparat (blok parafin) yang sudah tersedia di Laboratorium Biokimia FKUB dengan menggunakan *xylene* sebanyak 3 kali masing-masing 3 menit.
2. Rehidrasi masing-masing preparat dengan menggunakan etanol 100% selama 2 menit, etanol 95% selama 2 menit, etanol 70% selama 1 menit dan air selama 1 menit.
3. Melakukan perendaman dalam *peroxidase blocking solution* pada suhu kamar selama 10 menit.
4. Inkubasi preparat dalam *prediluted blocking serum* 25°C selama 10 menit.
5. Merendam preparat dalam antibodi monoklonal anti-ALP selama 10 menit.
6. Mencuci preparat dengan menggunakan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) selama 5 menit.
7. Inkubasi preparat dengan antibodi sekunder (*peroxidase*) selama 10 menit.
8. Pencucian preparat dengan PBS selama 5 menit.
9. Inkubasi preparat dengan peroksidase lagi selama 10 menit.
10. Mencuci preparat dengan PBS selama 5 menit.

11. Inkubasi preparat dengan kromogen DAB (*Diaminobenzimidine*) selama 10 menit.
12. Inkubasi preparasi dengan *Hematoxylin* selama 3 menit.
13. Mencuci preparat dengan menggunakan air mengalir.
14. Preparat dibersihkan dan ditetesi *mounting media*.
15. Preparat ditutup dengan *coverslip*.
16. Mengamati ekspresi ALP (bagian berwarna coklat pada permukaan sel osteoblast) menggunakan mikroskop cahaya Olympus CX-21 dengan pembesaran 400x.
17. Dokumentasi hasil pengamatan
18. Perhitungan jumlah ALP

#### 4.8 Penghitungan Ekspresi *Alkaline Phosphatase* (ALP)

Perhitungan ekspresi ALP dapat dilakukan setelah preparat jaringan dilakukan pengecatan dengan teknik imunohistokimia menggunakan antibodi anti-ALP. Perhitungan ekspresi ALP menggunakan mikroskop cahaya Olympus CX-21 dengan pembesaran kuat (400x) pada 5 bidang lapang pandang berbeda disepanjang luka pasca pencabutan gigi. Selanjutnya, dilakukan perhitungan secara manual untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat. Indikator ekspresi ALP menggunakan kromogen DAB (*diaminobenzidine*) akan terlihat berwarna coklat disekitar sel osteoblast (Nonaka *et al*, 2011).

#### 4.9 Analisis Data

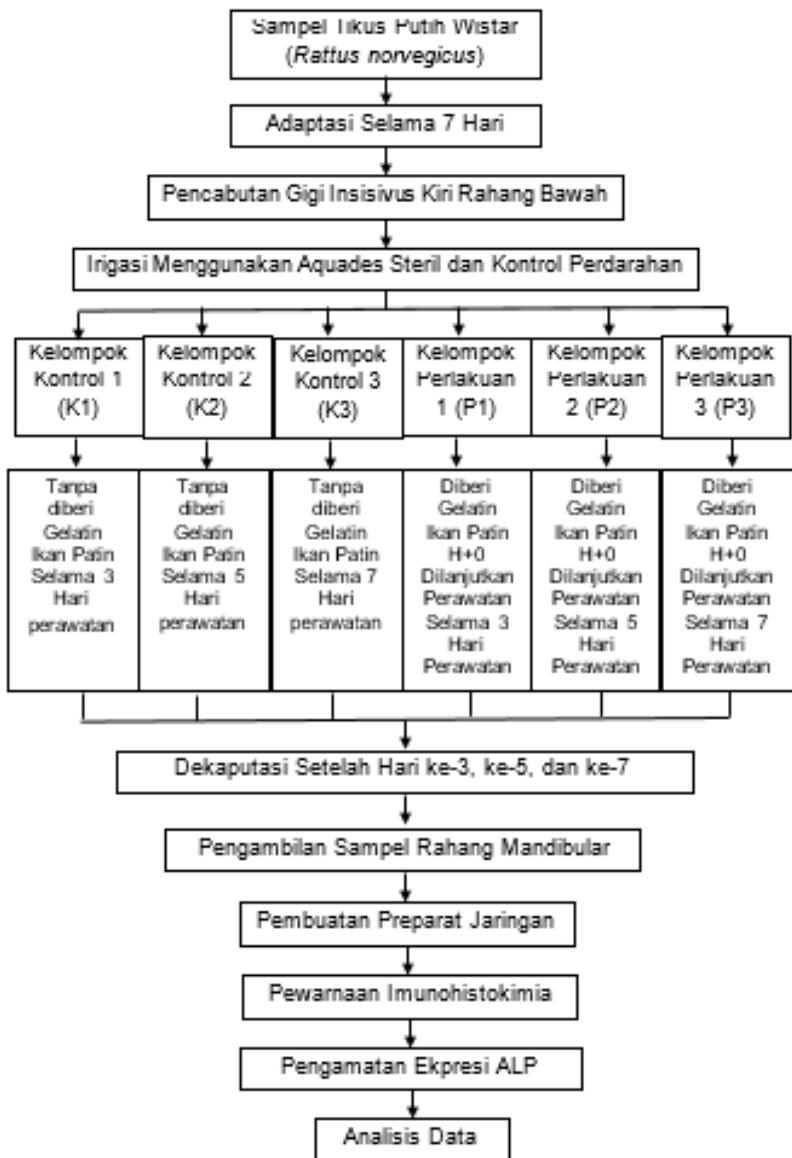
Untuk mendapatkan data perhitungan jumlah ekspresi ALP (*Alkaline Phosphatase*) diperoleh dari analisis statistika menggunakan program *Statistical Product of Service Solution* (SPSS) 16.0 untuk *Windows* dengan tingkat signifikansi 0,05 ( $p=0,05$ ) dan tingkat kepercayaan 95% ( $\alpha=0,05$ ). Langkah analisis statistika sebagai berikut:

1. Langkah pertama pada analisis statistik yaitu uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* karena sampel besar  $\geq 50$  dengan tujuan menilai sebaran data berdistribusi normal atau tidak normal.

2. Langkah kedua adalah melakukan uji homogenitas ragam dengan tujuan untuk mengetahui sebaran data masing-masing kelompok homogen atau tidak homogen dengan menggunakan *Levene's test*.
3. Langkah ketiga, jika terdapat data berdistribusi normal ( $\alpha > 0,05$ ) dan data bersifat homogen ( $p > 0,05$ ) dapat dilakukan uji t atau one way ANOVA tidak berpasangan dengan tujuan untuk mengetahui perbedaan jumlah ekspresi ALP antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok perlakuan pada saat proses penyembuhan luka setelah pencabutan gigi tikus putih galur wistar (*Rattus norvegicus*).
4. Langkah keempat yaitu melakukan *Post Hoc Turkey* dengan menggunakan *Least Significance Differences* (LSD) untuk mengetahui perbandingan rata-rata antar kelompok.
5. Langkah kelima yaitu apabila data tidak berdistribusi normal dan tidak homogen maka dapat dilakukan uji non parametrik dengan menggunakan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui perbedaan peningkatan jumlah ekspresi ALP antar kelompok.



#### 4.10 Skema Prosedur Penelitian



**BAB V****HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN****5.1 Hasil Penelitian**

Penelitian ini terdapat 6 kelompok penelitian yang terbagi 3 kelompok kontrol yaitu K1, K2, K3 dan 3 kelompok perlakuan yaitu P1, P2, P3. Pada kelompok kontrol 1 (K1) tidak diberikan gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) pada soket gigi Insisivus 1 RB, kemudian didekaputasi pada hari ke-3, hasil pengamatan dan perhitungan rata-rata ekspresi ALP 5 lapang pandang berkisar 10,8. Pada kelompok perlakuan 1 (P1) yang diberikan gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) pada soket gigi Insisivus 1 RB kemudian didekaputasi pada hari ke-3 memiliki rata-rata jumlah ekspresi ALP 12,2. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah rata-rata ekspresi ALP pada kelompok P1 memiliki jumlah lebih tinggi dibandingkan pada kelompok K1. Hasil foto preparat histologi menggunakan pewarnaan IHK dengan perbesaran 400x pada kelompok K1 dan P1 tampak pada Gambar 5.1

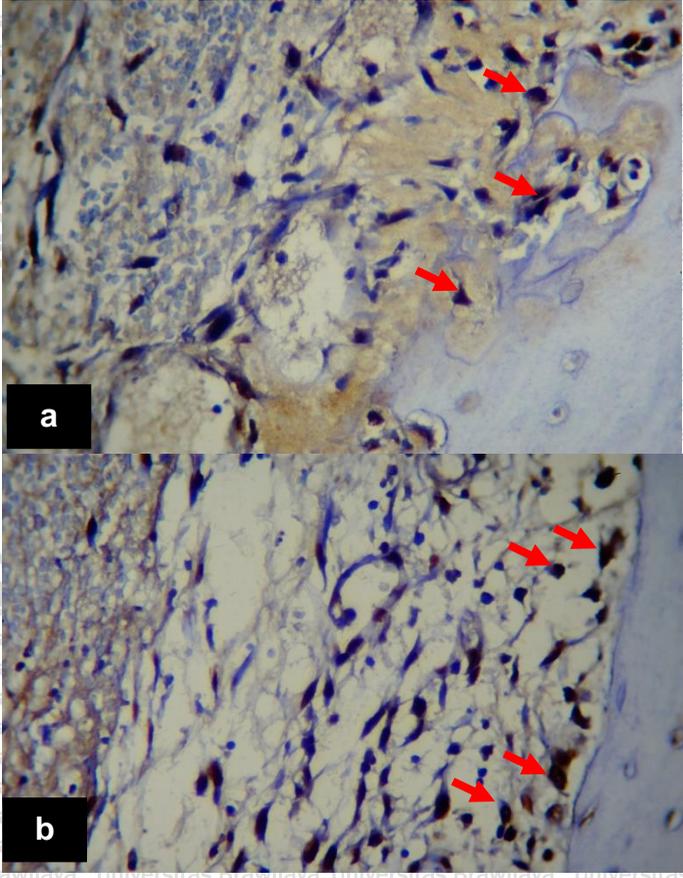
Pada kelompok kontrol 2 (K2) yang tidak diberikan gelatin patin (*Pangasius djambal*) pada soket gigi Insisivus 1 RB kemudian didekaputasi pada hari ke-5, hasil pengamatan dan perhitungan rata-rata ekspresi ALP setiap lapang pandang berjumlah 11,8. Pada kelompok perlakuan 2 (P2) yang diberikan gelatin patin (*Pangasius djambal*) pada soket gigi Insisivus 1 RB kemudian didekaputasi pada hari ke-5 memiliki rata-rata jumlah ekspresi 13,6. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah rata-rata ekspresi ALP pada kelompok P2 memiliki jumlah yang lebih tinggi dibandingkan pada kelompok K2. Hasil foto preparat histologi menggunakan pewarnaan IHK dengan perbesaran 400x pada kelompok K2 dan P2 tampak pada Gambar 5.2.

Kemudian, pada kelompok kontrol 3 (K3) yang tidak diberikan gelatin patin (*Pangasius djambal*) pada soket gigi Insisivus 1 RB kemudian didekaputasi pada hari ke-7, hasil pengamatan dan perhitungan rata-rata ekspresi ALP setiap lapang pandang berjumlah 12,85. Pada kelompok perlakuan 3 (P3) yang diberikan gelatin patin (*Pangasius djambal*) pada soket gigi Insisivus 1 RB kemudian didekaputasi pada hari ke-7 memiliki

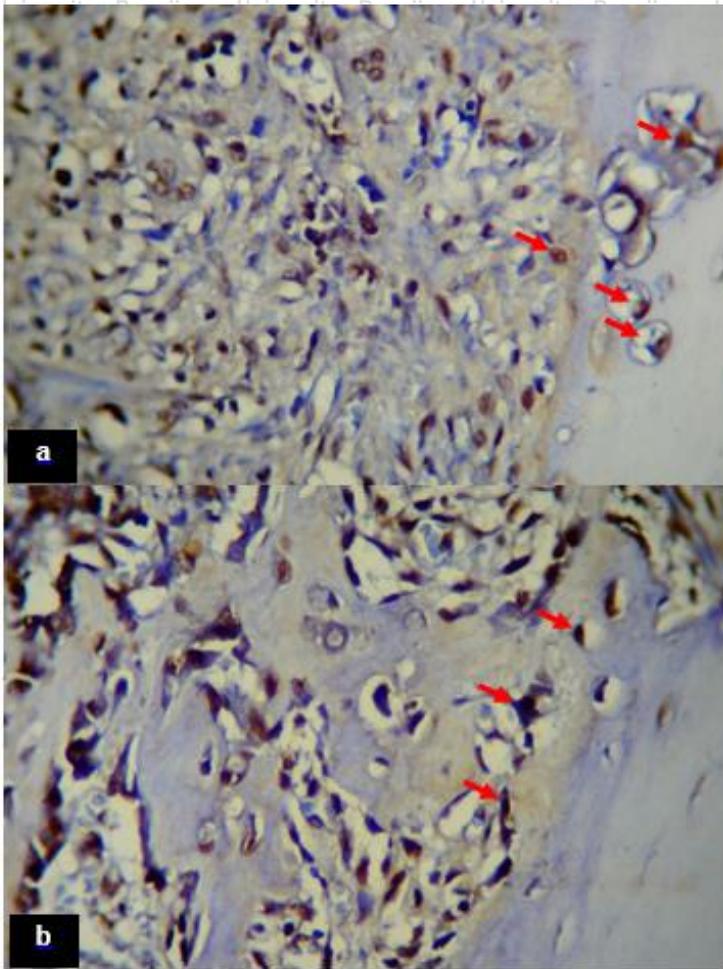


rata-rata jumlah ekspresi ALP berjumlah 17,85. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah rata-rata ekspresi ALP pada kelompok P3 memiliki jumlah yang lebih tinggi dibandingkan pada kelompok K3. Hasil foto preparat histologi menggunakan pewarnaan IHK dengan perbesaran 400x pada kelompok K3 dan P3 tampak pada Gambar 5.3.

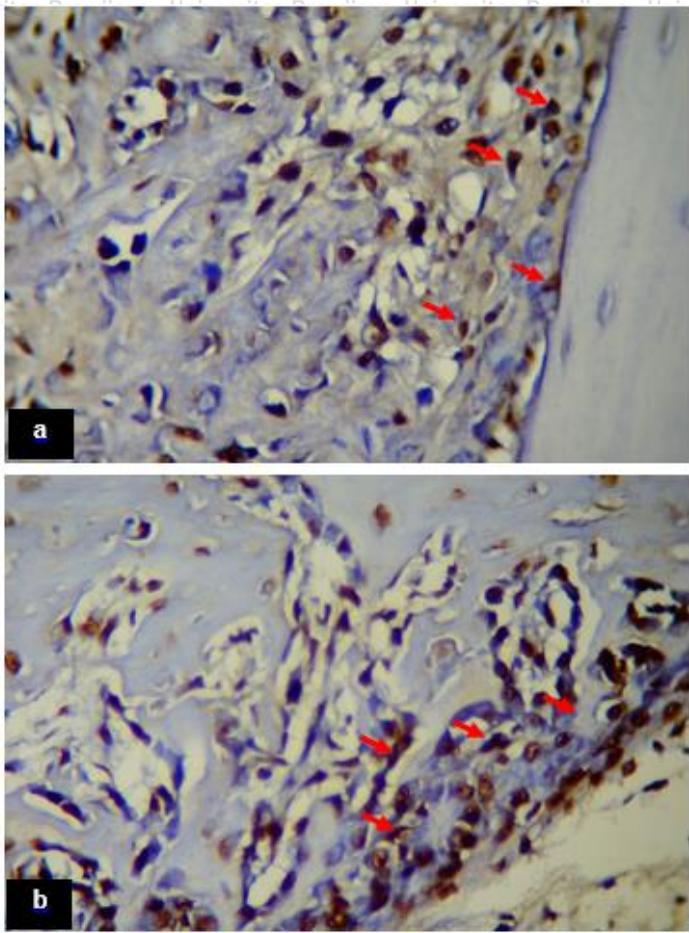
Gambar 5.1 Perbandingan Gambaran Histologi pada Hari Ke-3  
 Pewarnaan IHK, perbesaran 400x, panah hitam menunjukkan ekspresi ALP, (a) Kelompok K1, (b) Kelompok P1



Gambar 5.2 Perbandingan Gambaran Histologi pada Hari Ke-5 Pewarnaan IHK, perbesaran 400x, panah hitam menunjukkan ekspresi ALP, (a) Kelompok K2, (b) Kelompok P2



Gambar 5.3 Perbandingan Gambaran Histologi pada Hari Ke-7  
 Pewarnaan IHK, perbesaran 400x, panah hitam menunjukkan ekspresi ALP,  
 (a) Kelompok K3, (b) Kelompok P3



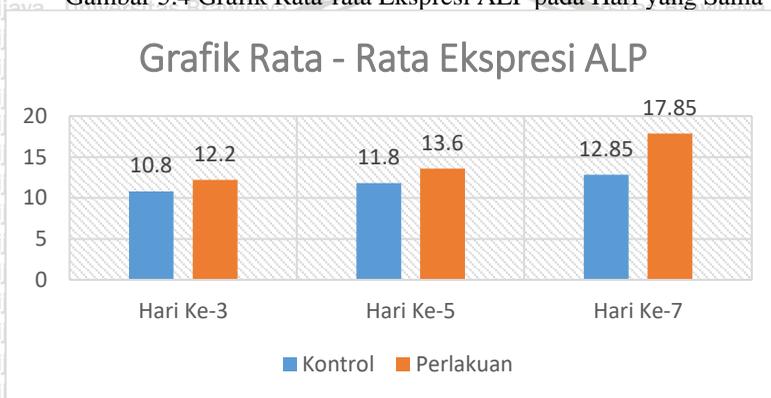
Perhitungan rata-rata jumlah ekspresi ALP dan standar deviasi setiap kelompok disajikan dalam tabel 5.1. Dan data perhitungan rata-rata jumlah ekspresi ALP pada hari yang sama disajikan dalam grafik gambar 5.4



Tabel 5.1 Data Rata-Rata dan Standar Deviasi Ekspresi ALP

Kelompok	Mean	Standar Deviasi
K1	10,8	1,82
P1	12,2	1,32
K2	11,8	1,74
P2	13,6	1,42
K3	12,85	1,15
P3	17,85	2,69

Gambar 5.4 Grafik Rata-rata Ekspresi ALP pada Hari yang Sama



Ekspresi rata - rata ALP terendah pada kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan pada hari ke-3. Pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan hari ke-5 mengalami peningkatan jumlah ekspresi rata-rata ALP dibanding pada hari ke-3. Sedangkan, kelompok kontrol dan kelompok perlakuan hari ke-7 terjadi peningkatan jumlah ekspresi rata-rata ALP yang signifikan. Hasil pengamatan ini sesuai dengan penelitian Nakagawa (2006) yang menyatakan bahwa ALP akan meningkat setelah fraktur dan peningkatan tersebut terdeteksi pada uji imunohistokimia di hari ke-1 dan terus meningkat hingga minggu ke-3 sebelum akhirnya terjadi penurunan hingga keadaan kadar normal pada minggu ke-4. Oleh karena itu, pemberian gelatin patin (*Pangasius djambal*) yang diberikan pada soket pasca pencabutan gigi tikus putih menunjukkan



peningkatan jumlah ekspresi rata-rata ALP pada kelompok perlakuan sehingga dapat mempercepat penyembuhan luka.

## 5.2 Analisis Data

### 5.2.1 Uji Normalitas

Uji normalitas dilakukan menggunakan uji *Shapiro-Wilk* yang berguna untuk mengetahui data penelitian berdistribusi normal atau tidak. Data pada uji *Shapiro-Wilk* adalah <50 dengan nilai signifikansi ( $p$ ) > 0.05 agar uji normalitas terpenuhi.

Tabel 5.2 Uji Normalitas *Shapiro-Wilk*

Kelompok		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
ALP	K3	.250	4	.	.963	4	.797
	P3	.228	4	.	.923	4	.552
	K5	.204	4	.	.987	4	.939
	P5	.300	4	.	.838	4	.189
	K7	.305	4	.	.898	4	.422
	P7	.214	4	.	.933	4	.613

a. Lilliefors Significance Correction

Berdasarkan uji *Shapiro-Wilk* ini didapatkan nilai signifikansi pengujian normalitas seperti pada tabel. Jika nilai signifikansi dibandingkan dengan  $p=0,05$  maka dapat disimpulkan bahwa nilai signifikansi lebih besar daripada 0,05. Sehingga, dari pengujian ini dapat diketahui bahwa uji normalitas terpenuhi dan data berdistribusi normal.

### 5.2.2 Uji Homogenitas Ragam

Uji homogenitas ragam dilakukan menggunakan uji *Levene* yang berguna untuk mengelompokkan data menjadi data parametrik atau non parametrik. Data penelitian dikatakan homogen apabila nilai signifikansi hasil perhitungan ( $p$ ) > 0.05.



Tabel 5.3 Uji Homogenitas Ragam *Levene*

Test of Homogeneity of Variances			
ALP			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
133	5	18	.983

Berdasarkan uji *Levene* ini didapatkan nilai signifikansi pengujian homogenitas data sebesar 0.983 sehingga kesimpulan yang didapat adalah data homogen dan parametrik.

Setelah data penelitian berdistribusi normal, homogen, dan data parametrik, langkah selanjutnya baru dapat dilakukan uji *one way ANOVA*.

### 5.2.3 Uji *One Way ANOVA*

Uji *one way ANOVA* bertujuan untuk mengetahui perbedaan nilai jumlah ekspresi ALP antar kelompok penelitian secara keseluruhan. Uji *one way ANOVA* terpenuhi apabila nilai signifikansi ( $p$ ) < 0.05 atau  $H_0$  ditolak.

Tabel 5.4 Uji Anova *One way*

ANOVA					
ALP					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	122.493	5	24.499	10.045	.000
Within Groups	43.900	18	2.439		
Total	166.393	23			

Perhitungan menggunakan uji *one way ANOVA* antara kelompok kontrol (K1, K2, dan K3) serta kelompok perlakuan (P1, P2, dan P3) memiliki nilai signifikansi ( $p$ ) sebesar 0.000 atau ( $p$ ) < 0.05 atau  $H_0$  ditolak dan  $H_1$  diterima sehingga kesimpulan yang didapat adalah terdapat perbedaan jumlah ekspresi ALP yang tidak diberi gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) dan diberi gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) pada proses penyembuhan jaringan keras pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*).



### 5.2.4 Uji *Post Hoc* LSD

Uji *post hoc* dilakukan untuk mengetahui perbedaan bermakna antar kelompok penelitian (K1, K2, K3, P1, P2, P3). Pada uji *post hoc* LSD data penelitian dikatan berbeda secara bermakna apabila nilai signifikansi ( $p < 0.05$ ) pada interval nilai kepercayaan 95% ( $\alpha = 0.05$ ).

Tabel 5.5 Hasil Uji *Post Hoc* LSD

Kelompok	Kelompok Pemanding	P
P1	K1	0.798
	K2	0.999
	K3	0.991
P2	K1	0.165
	K2	0.591
	K3	0.982
P3	K1	0.000*
	K2	0.000*
	K3	0.003*

Keterangan : \* = signifikan

Hasil uji *post hoc* LSD secara keseluruhan didapatkan perbedaan rata-rata jumlah ekspresi ALP yang signifikan dan tidak signifikan antar kelompok kontrol yang dibandingkan dengan kelompok perlakuan pada hari yang sama yaitu pada hari ke 7. Didapatkan hasil uji *post hoc* LSD sebagai berikut.

- a. Kelompok hari ke-3  
Kelompok perlakuan dan kontrol hari ke-3 (P1 dan K1) terdapat perbedaan rata-rata jumlah ekspresi ALP yang tidak bermakna karena nilai signifikansi ( $p = 0.798 > 0.05$ )
- b. Kelompok hari ke-5  
Kelompok perlakuan dan kontrol hari ke-5 (P2 dan K2) terdapat perbedaan rata-rata jumlah ekspresi ALP yang



tidak bermakna karena nilai signifikansi ( $p$ ) = 0.591 > 0.05

c. Kelompok hari ke-7

Kelompok perlakuan dan kontrol hari ke-7 (P3 dan K3) terdapat perbedaan rata-rata jumlah ekspresi ALP yang bermakna karena nilai signifikansi ( $p$ ) = 0.003 < 0.05

### 5.3 Pembahasan

Penelitian ini bertujuan untuk mengamati jumlah ekspresi *Alkaline Phosphatase* (ALP) pada soket pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar setelah pemberian gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*). Rata-rata jumlah ekspresi ALP terendah pada kelompok kontrol hari ke-3 (K1) yaitu 10,8, sedangkan untuk rata-rata jumlah ekspresi ALP tertinggi pada kelompok perlakuan hari ke-7 (P3) yaitu 17,85. Penjelasan perbandingan rata-rata ekspresi ALP antar kelompok hari sebagai berikut.

Kelompok P1 (hari ke-3) memiliki rata-rata ekspresi ALP lebih tinggi yakni 12,2 dibandingkan dengan kelompok K1 (hari ke-3) yaitu 10,8. Selanjutnya kelompok P2 (hari ke-5) memiliki rata-rata ekspresi ALP lebih tinggi yakni 13,6 dibandingkan dengan kelompok K2 (hari ke-5) yaitu 11,8. Dan kelompok perlakuan P3 (hari ke-7) rata-rata ekspresi ALP yaitu 12,85 secara signifikan meningkat dibandingkan kelompok Kontrol K3 (hari ke-7) yaitu 17,85. Pada penelitian Nakagawa (2006) yang menyatakan bahwa ALP umumnya akan mulai meningkat pada 24 jam pertama setelah trauma dan peningkatan secara signifikan pada minggu ke-2, hasil penelitian tersebut dapat dijadikan acuan bahwa pemberian gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) pada luka pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*) dalam penelitian ini mampu mempercepat ekspresi ALP secara signifikan pada kelompok perlakuan P3(hari ke-7). Penyembuhan luka pada hari ke-3 dan ke -5 masih terfokus pada penyembuhan jaringan lunak sehingga jumlah ALP pada hari ke-3 dan ke-5 masih relatif kecil dan tidak signifikan. Pada kelompok penelitian hari ke-3 dan ke-5 terjadi proses resorpsi tulang yang akan meningkatkan kadar ion kalsium dan fosfat dalam darah. Dan

pada kelompok penelitian hari ke-7, ion kalsium dalam darah sudah cukup tinggi dan mampu mengaktifkan hormone tiroid untuk menstimulasi produksi ALP. Hormone tiroid tersebut akan menstimulasi sintesis ALP melalui induksi *nuclear osteoblast reseptor mediated process* (Sarac, 2014)

*Alkaline phosphatase* merupakan isoenzim pada *matrik vesicle* yang menyelimuti permukaan osteoblast, sehingga ekspresi dari ALP bergantung pada proses osteoblastogenesis yang terjadi dalam osteoblast. Proses osteoblastogenesis bergantung pada osteoklastogenesis yang meningkatkan ion kalsium dalam darah dan selanjutnya akan mengaktifasi hormone tiroid. Oleh karena itu ekspresi ALP dalam penelitian ini mulai memberikan hasil yang signifikan pada kelompok perlakuan P3 (hari ke-7).

Peningkatan jumlah ekspresi ALP pada soket pasca luka dapat mempengaruhi penyembuhan pada jaringan keras tulang. Proses penyembuhan luka jaringan keras berbeda dengan luka jaringan lunak. Penyembuhan luka jaringan keras lebih lambat dibandingkan penyembuhan luka jaringan lunak. Stase penyembuhan luka jaringan keras salah satunya dipengaruhi oleh fase remodeling yang diperankan oleh osteoblast dan osteoklas. ALP merupakan regulator penting yang diekspresikan oleh osteoblast dan berperan aktif dalam pembentukan dan deposisi hidroksiapatit dalam pembentukan tulang. Dalam penelitian Nakagawa (2006) dilakukan pada tikus putih tanpa diberi perlakuan menunjukkan bahwa ekspresi ALP muncul segera setelah terjadinya trauma sekitar 30 menit dan akan terus meningkat sampai akhir minggu ke-2 dan terjadi penurunan hingga konsentrasi normal pada minggu ke 4. Konsentrasi ALP akan mendekati normal apabila proses penyembuhan tulang mendekati sempurna dan telah melewati calcifikasi callus.

Beberapa matrix extracellular yang dilepaskan saat osteoklastogenesis yaitu TGF- $\beta$  dan IGF-1 terlibat dalam aktifasi dan regulasi diferensiasi osteoblast pasca pelepasan (Harada Rodan, 2003; Lamberts, 2007). Osteoklastogenesis menyebabkan terjadinya komunikasi intraseluler osteoblast yang menjadi aktif. Osteoblast yang aktif bersama dengan IGF-1 memsistesis pembentukan dan mempertahankan masa tulang (Sudoyo, 2015).

ALP yang merupakan hasil diferensiasi osteoblast akan mengendapkan ion kalsium dan fosfor dalam plasma yang selanjutnya merubah ion tersebut menjadi hidroksiapatit untuk memineralisasi jaringan tulang pada fase remodeling (Bosworth, 2011).

Kandungan gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) mengandung banyak asam amino glisin, gutanin dan arginine. Menurut Syam (2015), asam amino berperan dalam membentuk sel-sel baru, antibody dan regenerasi jaringan. Kandungan omega 3 dan kolagen yang cukup tinggi pada ikan patin berkhasiat untuk penyembuhan luka (Suryaningrum, 2010). Glisin memiliki struktur mirip kolagen yang merupakan bahan utama gelatin berperan dalam pembentukan sel darah dan kolagen (Reksoprojo, 2010 dalam Pujud, 2016). Kolagen merupakan matrik alami yang berfungsi dalam migrasi osteoblast yang bermanfaat dalam rekonstruksi jaringan keras dan jaringan lunak pada penyembuhan luka (Cho, 2015). Oleh karena itu, asam amino yang terdapat dalam gelatin ikan patin seperti arginine, glutamin, dan glisin akan mengakomodasi proses osteoblastogenesis sehingga pemberian gelatin ikan patin mampu meningkatkan ekspresi ALP secara signifikan pada hari ke 7 yang biasanya ekspresi ALP tanpa perlakuan baru bisa memberikan hasil yang signifikan pada minggu ke 2.

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa hipotesis penelitian dapat diterima karena pemberian gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) terbukti berpengaruh terhadap peningkatan jumlah ekspresi ALP pada luka pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar.

## BAB VI PENUTUP

### 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan mengenai pengaruh pemberian gelatin patin (*Pangasius djambal*) terhadap ekspresi ALP pada luka pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar maka dapat ditarik kesimpulan bahwa:

- 1) Terdapat pengaruh pemberian gelatin patin (*Pangasius djambal*) terhadap peningkatan ekspresi ALP pada luka pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*) Strain Wistar.
- 2) Ekspresi ALP tertinggi terlihat pada hari ke-7 pada kelompok perlakuan/ P3 yaitu sebesar 17,85.
- 3) Ekspresi ALP terendah terlihat pada hari ke-3 pada kelompok kontrol/ K1 yaitu sebesar 10,8.
- 4) Terdapat peningkatan yang signifikan pada kelompok perlakuan yang diberi gelatin patin terhadap ekspresi ALP pada ke-7.
- 5) Terdapat perbedaan jumlah ekspresi ALP antara tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar yang tidak diberi gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) dan yang diberi gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) pada fase remodeling proses penyembuhan luka pasca pencabutan gigi.

### 6.2 Saran

Sebagai saran dari penelitian yang sudah dilakukan ini agar dapat lebih dikembangkan lagi penelitian ini secara lebih menyeluruh di masa yang akan datang maka dapat diajukan beberapa saran sebagai berikut;

- 1) Perlu dilakukan penelitian lanjutan pada minggu ke-2 dan minggu ke-3 untuk mengetahui lanjutan ekspresi ALP terlebih lagi mengenai ekspresi ALP pada *bone reparation* agar dapat dilakukan pengamatan menyeluruh mengenai



ekspresi ALP pada penyembuhan luka (*wound healing*) secara keseluruhan.

- 2) Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek toksik dan dosis maksimum serta minimum yang lebih jelas dalam pemberian gelatin patin (*Pangasius djambal*) sebagai bahan visioner untuk penyembuhan luka pasca pencabutan gigi.



## DAFTAR PUSTAKA

- Adawyah, R. 2009. *Pengolahan dan Pengawetan Ikan*. Jakarta: Bumi Aksara
- Adrianti, N. K. T., Pungkas, K. A., Azrin, M. 2015. Angka Kejadian Diplopia Pada Pasien Fraktur Maksilofasial di Bangsal Bedah RSUD Arifin Achmad Propinsi Riau Periode Januari 2011-2013. *Journal Online Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Riau*. Vol.1, No.2.
- Agustin, A. T. 2013. Gelatin Ikan: Sumber, Komposisi Kimia dan Potensi Pemanfaatannya. *Jurnal Media Teknologi Hasil Perikanan*. Vol.1, No.2:44-46.
- Agnes, T. A. 2013. *Gelatin Ikan: Sumber, Komposisi Kimia dan Potensi Pemanfaatannya*. Manado. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi.
- Akbar, I. Z., Hidayat, M., Soeatmadji, D. W., Kalim, H. 2012. *Osteoporosis: Toksisitas Methylglyoxal Terhadap Sel PreOsteoblas*. Malang: Universitas Brawijaya Press.
- Andersson, L., Kahnberg, K. E., Pogrel M. A. 2010. *Oral and Maxillofacial Surgery*. Edisi Pertama. USA: Wiley-Blacwell.
- Asikin, M., et al. 2016. *Keperawatan Medikal Bedah Sistem Muskuloskeletal*. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Basuki, S., et al. 2015. *Dasar-Dasar Patologi Umum dan Pemeriksaan Patologi*. Malang; Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- Cho, H. N., et al. 2015. Characterization of Off-odor Compounds of Collagen Peptides From Tilapia Scale Using GC-MS-Olfactometry. *Food Science and Biotechnology*. Vol. 24, No.2:403-410.
- Choonthar, M. M., Raghathanan, A., Prasad, R., Pradeep, S., Pandya, K. 2016. Head Injury a Maxillofacial Surgeon's Perspective. *Journal Clinical and Diagnostic Research*. Vol.10, No.1:1-3.



Coulibaly, M. O., *et al.* 2011. Recent Advances in the Use of Serological Bone Formation Markers to Monitor Callus Development and Fracture Healing. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* National Institute of Public Health USA. Vol.20, No.2: 105–127.

Direktorat Jendral Bina Upaya Kesehatan. 2013. *Pelayanan Kedokteran Penanganan Trauma.* Jakarta: Kementrian Kesehatan Republik Indonesia.

Dragos, C. L. 2019. *Bone Marrow – Nonneoplastic Normal Osteoclasts.* Weill Cornell Pathology and Laboratory Medicine. (Online) <http://www.pathologyoutlines.com/topic/bonemarrowosteoclasts.html> diakses pada 1 Oktober 2019

Elisseeff, J., Wu, I. 2014. Biomaterials and Tissue Engineering for soft Tissue Reconstruction. *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*, Elsevier Inc., Vol.14:235-241.

Fakultas Farmasi Universitas Gajahmada. 20110. *Cancer Chemoprevention Research.*

Ginaldi, L., Benedetto M., Martinis M. 2005. Osteoporosis, Inflammation and Ageing. *Immunity and Ageing.* Vol. 2:14.

Gordon, P. W. 2013. *Buku Ajar Praktis Bedah Mulut.* Edisi Keempat. Jakarta: EGC

Gudmundsson, M. 2002. Geological Properties of Fish Gelatin. *Journal of Food Science.* Vol.67:2172-2176.

Gurtner, G. C., *et al.* 2007. *Grabb and Smith's Plastic Surgery 7 Edition.* USA; Lippincott willians and Wilkins.

Hardyanti, K. S.T. 2014. *Isolasi Kolagen dari Kulit Ikan Patin (Pangasius sp).* Skripsi. Bogor: Fakultas Kedokteran Hewan Institute Pertanian Bogor

Heineman, C., *et al.* 2010. In Vitro Osteoclastogenesis on Textile Chitosan Scaffolds. *Euroe Cell and Material Journal*. Vol.19:96-106.

Hollins, C. 2008. *Levisons's Textbook for Dental Nurses*. Edisi kesepuluh: Hongkong, Graphicraft Limited.

Hupp, J. R., Ellis, E., Tucker, M. R. 2014. *Contemporary Oral and Maxillofacial Surgery*, Edisi 6. Missouri: Mosby Elsevier.

Kaplan, L. A., Pesce, A. J. 2009. *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Colellation*. Edisi Kelima. Newyork; Elsevier Health Sciences.

Khairuman, Amri, K. 2010. *Petunjuk Praktis Budi Daya Patin di Kolam Terpal*. Jakarta: Agro Media Pustaka.

Krishnan, D. G. 2013. Systematic assessment of the patient with facial trauma. *Oral Maxillofacial Surgery Clinics of North America*. Vol.25; No.4:537.

Kneale, J., Davis, P. 2011. *Keperawatan Ortopedik dan Trauma*. Jakarta; EGC.

Kumar, Navneet. 2014. Bone Histological Features Types of Bone. (Online) <http://www.kinggeorgemedicaluniversity.org/>

Lamberts. 2007. *Human Osteoblast Differentiationand Bone Formation: Growth Factors, Hormones and Regulatory Networks*. Haveka BV. Rotterdam, Netherlands.

Larasati. 2010. *Prosedur Tetap Pencegatan Imunohistokimia p53. Cancer Chemoprevention Research Center*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi UGM.

Leles, J. L. R., Santos, E. J. D., Jorge, F. D., Silva, E. T., Leles, C. R. 2010. Risk Factors for Maxillofacial Injuries in a Brazillian Emergency Hospital Sample. *Journal Applied Oral Science*. Vol.18, No.1:23-24.

Liu, Baoyan, *et al.* 2019. A Protocol of Isolation and Identification and Comparative Characterization of Primary Osteoblast from Mouse and Rat Calvaria. *Cell Tissue Bank*. Vol.20: 173-182.

Lukman, Ningsih, N. 2013. *Asuhan Keperawatan pada Klien dengan Gangguan Sistem Muskuloskeletal*. Jakarta; Salemba Medika

Mahyuddin, K. 2010. *Panduan Lengkap Agrobisnis Patin*. Jakarta; Penebar Swadaya.

Malik, N. A. 2012. *Textbook of Oral and Maxillofacial Surgery*. Edisi Ketiga. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd.

Mardiyantoro, F., Munika, K., Sutanti, V., Cahyati, M., Pratiwi, A. R. 2018. *Penyembuhan Luka Rongga Mulut*. Malang: Universitas Brawijaya Press.

Minashima, T., *et al.* 2010. Progresive Ankylosis Protein (ANK) in Osteoblast and Osteoclast Control Bone Formation and Bone Remodeling. *Journal of Bone and Mineral Research*. Vol. 25, No.8:1771-1783.

Minggawati, I. 2011. Analisa Usaha Pembesaran Ikan Patin Djambal (*Pangasius djambal*) dalam Kolam di Desa Sidomulyo Kabupaten Kuala Kapuas. *Jurnal khtologi Indonesia*. Vol.3, No.1.

Mock, Charles. 2016. International Association for Trauma Surgery and Intensive Care (IATSIC) Presidential Address: Improving Trauma Care Globally: How is IATSIC Doing?. *World Journal of Surgery*. Vol.40, No.12:2833-2839.

Nakagawa, H., *et al.* 2006. Changes in Total Alkaline Phosphatase Level After Hip Fracture: Comparison between Femoral Neck and Trochanter Fracture. *Journal of Orthopaedic Science*. Vol 11:135-139

Nonaka, C. F., *et al.* 2011. Immunohistochemical Analysis of Bone Resorption Regulators (RANKL and OPG), Angiogenic

Index, and Myofibroblasts in Syndrome and Non-Syndrome Odontogenic Keratocysts. *Archives of Oral Biology*. Vol.57:230-237.

Noor, Zairin. 2014. *Buku Ajar Osteoporosis Patofisiologi dan Peran Atom Mineral Dalam Menejemen Terapi*. Jakarta: Salemba Medika.

Noor, Zairin. 2016. *Buku Ajar Gangguan Muskuloskeletal Edisi Kedua*. Jakarta: Salemba Medika.

Ningsih, J. R. 2018. *Ilmu Dasar Kedokteran Gigi*. Surakarta; Muhammadiyah University Pres.

Nilsson, Bo E., Westlin, Nils E. 2009. The Plasma Concentration of Alkaline Phosphatase, Phosphorus and Calcium following Femoral Neck Fracture. *Acta Orthopaedica Scandinavica*. Vol.43. NO.6: 504-510

Nugrahaningsih. L. B., Sholikah, S. I., Setiawati, F. K. 2012. *Profil Kekuatan Tarik Gelatin Dari Kaki Ayam dan Kecepatan Penutupan Luka pada Mus Musculus Pasca Pemberian Gelatin*. Artikel Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Negeri Malang.

Nurhidayat. 2002. *Deteksi Bahan Aktif dengan Metode Immunohistokimia*. Surabaya; Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.

Nurilmala, M. 2004. *Kajian Potensi Limbah Tulang Ikan Keras (Teleosteri) sebagai Sumber Gelatin dan Analisa Karakteristiknya*. Thesis. Bogor: Sekolah Pancasarjana, Institut Pertanian Bogor.

Nurrachmawati, F. 2015. *Mengenal Gelatin, Kegunaan, dan Pembuatannya*. (Online)

(<http://kesmavet.ditjenpkh.pertanian.go.id/index.php/berita/tulisan-ilmiah-populer/139-mengenal-gelatin-kegunaan-dan-pembuatannya/>, diakses 20 maret 2019).

Oroh, C. G., Damajanty H. C. P., Christy N. M. 2015. Efektivitas Lendir Bekicot (*Achatina fulica*) terhadap Jumlah Sel Fibroblas pada Luka Pasca Pencabutan Gigi Tikus Wistar. *Jurnal e-GiGi (eG)*. Vol 3, No. 2,

Orwoll, E. S. 2003. Toward an Expanded Understanding of the Role of the Periosteum in Skeletal Health. *J Bone Miner.* Vol.18:949-954.

Pedlar J, John W. F. *Oral and Maxillofacial Surgery 2<sup>nd</sup> Edition*. China: Churchill Living Stone. Elsevier.

Pujud, Widodo. 2016. Hubungan antara Pengetahuan Tentang Gizi, Asupan Lemak dan Protein dengan Proses Penyembuhan Luka Pada Pasien Post Caesarean Section di Instalasi Rawat Jalan Rumah Sakit PKU Muhammadiyah Surakarta. Skripsi. Universitas Muhammadiyah Surakarta.

Pramono, S. 2002. Kontribusi bahan obat alam dalam mengatasi krisis bahan obat di Indonesia, *Jurnal Bahan Alam Indonesia*. Vol.1, No.1:18-20.

Ramos, Vara, J. A. 2005 Technical Aspect of *Imunohistochemistry*. *Vet. Pathology*.

Ratnasari, I., et al. 2013. Extraction and Characterization of Gelatin from Different Fresh Water Fishes as Alternative Sources of Gelatin. *Serdang: International Food Research Journal*. Vol.20, No.6:3085-3091.

Reza, H. S., et al. 2015. Karakteristik Fisik dan Kimia Gelatin Kulit Ikan Patin (*Pangasius Pangasius*) dengan Kombinasi Berbagai Asam dan Suhu. *Jurnal Teknologi Hasil Perikanan*. Vol.4:29-36.

Rodrigues, L.J.L., et al. 2010. *Risk Factors for Maxillofacial Injuries in Brazilian Emergency Hospital Sample*. *Journal of Applied Oral Science*, Vol.18, No.1:23-29.

Rodrigues, A. D., *et al.* 2014. Vascular Trauma in the Amazon Region: A Two Years Cases Review from a Single Institutio. *Health Journal in Scientific Research*. Vol.6:517-530.

Saleh, Edwyn. 2016. *Fraktur Maksila dan Tulang Wajah sebagai Akibat Trauma Kepala*. Seminar Handayani Dentistry PDGI cabang Gunung Kidul RSGM Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

Sarac, F., Saygili, F. 2014. Causes of High Bone Alkaline Phosphatase. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. Vol. 21, No. 2:194-197.

Saputra, R. H., Widiastuti, I., Supriadi, A. 2015. Karakteristik Fisik dan Kimia Gelatin Kulit Ikan Patin (*Pangasius Pangasius*) dengan Kombinasi Berbagai Asam dan Suhu. *Jurnal Teknologi Perikanan*. Vol.4, No.1:29-36.

Sastrawan, A. D., Sjamsudin, E., Faried, A. 2017. Studi Kasus Penataksanaan Emergensi pada Trauma Oromaksilofasial Disertai Fraktur Basis Kranii Anterior. *Majalah Kedokteran Gigi Indonesia*. Vol.3, No.2.

Sefrina, A. 2016. *Osteoporosis the Silent Disease*. Yogyakarta: Rapha Publishing.

Setyowati, H., Setyani, W. 2015. Potensi Nanokolagen Limbah Sisik Ikan sebagai Cosmeceutical. *Jurnal Farmasi dan Komunitas*. Vol.12, No.1:30-40.

Sitanaya, R. I. 2016. *Exodontia (Dasar-Dasar Ilmu Pencabutan Gigi)*. Edisi.Pertama. Yogyakarta: Deepublish.

Sudiana, K. I. 2005. *Konsep Dasar Imunologi*. Surabaya; Fakultas Kedokteran. Universitas Airlangga.

Sudrajat, S. E., 2012. *Fosforilasi Gelatin dan Citosan sebagai Eksiipien Pembuatan Serat Nano Asiatikosida*. Tesis. FMIPA Universitas Indonesia Depok.

Sudoyo, A. W., *et al.* 2015. *Ilmu Penyakit Dalam*. Edisi 5. Jakarta: Interna Publish.

Suryaningrum, T. D., Muljanah, I., Tahapari, E. 2010. Profil Sensori dan Nilai Gizi Beberapa Jenis Ikan Patin dan Hibrid Nasutus. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. Vol.5, No.2.

Syam, I.A., Hatta, R. dan Ruslin, M. 2015. Potensi dari Ceker Ayam Kampung (*Gallus domesticus*) untuk Mempercepat Penyembuhan Soket Pasca Ekstraksi Gigi. *Makassar: Dent J.* Vol.4, No.2: 50-55.

Takayanagi, H. 2007. Osteoimmunology: Shared Mechanism and Crosstalk Between The Immune and Bone Systems. *Tokyo: Nature Publishing Group*. Vol.7:292–302.

Thomas, S. D. C. 2012. Bone Turnover Markers. *Aust Prescr.* Vol.35, No.5:156-158

Topazian, R. G., Goldberg, M. H., Hupp, J. R. 2002. *Oral and Maxillofacial Infection*. Edisi 4. USA: Elsevier Saunders.

Utomo, A. J., Aida, S. N. 2017. Strategi Pengelolaan Ikan Patin (*Pangasianodon Hypophthalmus*) di Waduk Gajah Mungkur Jawa Tengah. *Jurnal Kebijakan Perikanan Indonesia*. Vol. 9, No.2.

Whyte, M. P. 2016. *Hypophosphatasia: An Overview for Physicians and Medical Professionals*. St. Louis: Soft Bones Inc. The U.S. Hypophosphatasia Foundation.

Widyastomo, Kartika, A. W., Indah, P. 2013. Pengaruh Jus Buah Belimbing Manis (*Averrhoa carambola* Linn.) terhadap Peningkatan Jumlah Fibroblas pada Soket Tikus Strain Wistar Pasca Ekstraksi Gigi. Malang: Universitas Brawijaya Pess.



Wiksman, L. B., Solomonik, I., Spira R., Tennenbaum, T. 2007. *Novel Insights into Wound Healing Sequence of Events*. Toxicologic Pathol.

Wiranti, T., Indrawati, V. 2015. Pengaruh Proporsi Tapioka, Tepung Garut, dan Daging Ikan Patin Terhadap Sifat Organoleptik Kerupuk. *E-Journal Boga*. Vol. 4, No.1.

Yuliadi, B., Muhidin, Indriyani, S. 2016. *Tikus Jawa Teknik Survei di Bidang Kesehatan*. Jakarta: Lembaga Penerbit Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI.

