



**PENGARUH PEMBERIAN GELATIN IKAN
PATIN (*Pangasius djambal*) TERHADAP
EKSPRESI RANK (*Receptor Activator of Nuclear
factor Kappa- β*) PADA PENYEMBUHAN
TULANG SOKET GIGI PASCA PENCABUTAN
GIGI TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)**

**SKRIPSI
UNTUK MEMENUHI PERSYARATAN
MEMPEROLEH GELAR SARJANA**

OLEH :

**Ahida Mu'izun
165160100111031**

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

2019





DAFTAR ISI

Halaman

JUDULi

HALAMAN PENGESAHANii

PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSIiii

KATA PENGANTARiv

ABSTRAKvii

ABSTRACTviii

DAFTAR ISIix

DAFTAR GAMBARxiii

DAFTAR TABELxiv

DAFTAR SINGKATANxv

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang1

1.2 Rumusan Masalah5

1.3 Tujuan Penelitian5

1.3.1 Tujuan Umum5

1.3.2 Tujuan Khusus5

1.4 Manfaat Penelitian6

1.4.1 Manfaat Akademik6

1.4.2 Manfaat Praktis6

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Trauma Maksilofasial7



2.2	Penyembuhan Luka Pada Tulang.....	7
2.2.1	Fase Penyembuhan Tulang Primer.....	8
2.2.1.1	Contact Healing.....	8
2.2.1.2	Gap Healing.....	9
2.2.2	Fase Penyembuhan Tulang Sekunder.....	9
2.2.2.1	Fase Inflamasi.....	9
2.2.2.2	Fase Proliferasi.....	10
2.2.2.3	Fase <i>Remodelling</i>	10
2.2.3	Fase Penyembuhan Luka Pasca Pencabutan Gigi.....	11
2.3	RANK (Receptor Activator of Nuclear factor Kappa B)	12
2.4	Pewarnaan Imunohistokimia.....	15
2.4.1	Definisi.....	15
2.4.2	Prinsip Pewarnaan Imunohistokimia.....	16
2.4.3	Metode Pewarnaan Imunohistokimia.....	16
2.5	Gelatin.....	19
2.5.1	Definisi.....	19
2.5.2	Gelatin Ikan.....	19
2.6	Ikan Patin.....	20
2.6.1	Definisi.....	20
2.6.2	Klasifikasi.....	20
2.6.3	Kandungan.....	22
2.7	Tikus Putih.....	23
2.7.1	Taksonomi Tikus Putih.....	23
2.7.2	Anatomi Gigi Tikus.....	24

BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konsep Penelitian.....	25
3.2 Hipotesis Penelitian.....	26

BAB 4. METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian.....	29
4.2 Sampel Penelitian.....	31
4.2.1 Jenis dan Kriteria Sampel.....	31
4.2.2 Jumlah Sampel.....	32
4.3 Variabel Penelitian.....	33
4.3.1 Variabel Bebas.....	33
4.3.2 Variabel Terikat.....	33
4.3.3 Variabel Terkendali.....	34
4.4 Tempat dan Waktu Penelitian.....	34
4.4.1 Tempat.....	34
4.4.2 Waktu.....	35
4.5 Alat dan Bahan Penelitian.....	35
4.5.1 Pembuatan Gelatin Ikan Patin.....	35
4.5.2 Pencabutan Gigi.....	35
4.5.3 Perlakuan Hewan Coba.....	35
4.5.4 Pengambilan Jaringan dan Pembuatan Preparat.....	36
4.5.5 Pewarnaan Imunohistokimia Indirek.....	36
4.6 Definisi Operasional.....	36
4.6.1 Ekstraksi Gigi Tikus.....	36
4.6.2 Soket Gigi.....	37



4.6.3	Gelatin Ikan Patin.....	37
4.2.1	RANK.....	37
4.7	Prosedur Penelitian.....	37
4.7.1	Persiapan dan Perawatan Hewan Coba.....	37
4.7.2	Pembuatan Gelatin Ikan Patin (<i>Pangasius djambal</i>)	38
4.7.3	Pencabutan Gigi Tikus Putih.....	41
4.7.4	Pemberian Obat Analgesik Tikus Putih.....	41
4.7.5	Pemberian Gelatin Ikan Patin (<i>Pangasius djambal</i>).....	41
4.7.6	Perawatan Tikus Putih Pasca Pencabutan.....	41
4.7.7	Pengambil Sampel Jaringan.....	42
4.7.8	Pembuatan Sediaan Histologi.....	43
4.7.9	Pewarnaan Imunohistokimia.....	44
4.7.10	Pengambilan Data.....	46
4.8	Analisa Data.....	47
4.9	Skema Prosedur.....	49

DAFTAR PUSTAKA.....	51
---------------------	----

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 2.1	RANK-RANKL-OPG System.....	13
Gambar 2.2	Osteoklastogenesis.....	15
Gambar 2.3	Gambaran Metode Imunohistokimia	18
Gambar 2.4	Ikan Patin (Pangasius djambal).....	21
Gambar 2.5	Anatomi Gigi Tikus Putih.....	24
Gambar 3.1	Skema Kerangka Konsep.....	25
Gambar 4.1	Rancangan Penelitian.....	29
Gambar 4.2	Tikus Putih (<i>Rattus Novergicus</i>) galur wistar.....	31
Gambar 4.3	Rumus Federar.....	33

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 2.1	Kelebihan dan Kekurangan Metode Imunohistokimia	18
Tabel 2.2	Kandungan Ikan Patin	22
Tabel 2.3	Perbandingan Komposisi Asam Amino (mg/g) pada Gelatin dari Empat Spesies Ikan Air Tawar	22
Tabel 2.4	Taksonomi Tikus Putih	24



DAFTAR SINGKATAN

OPG	Osteoprogenitor
ORIF	Open Reduction Internal Fixation
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
IGFs	Insulinlike Growth Factor
IGF-1	Insulinlike Growth Factor-1
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
IL-11	Interleukin-11
IL-8	Interleukin-8
IFN- γ	Interferon-Gamma
KGF	Keratinocyte Growth Factor
TNF	Tumor Necrosis Factor
IHK/ IHC	Imunohistokimia/ Imunohistochemistry
PE	Poly Ether
PBS	Phospate Buffer Saline
RANKL	Receptor Activator of Nuclear factor Kappa- β
	Ligand
DAB	Diaminobenzinidine
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
PDAM	Perusahaan Daerah Air Minum



ABSTRAK

Muizun, Ahida. 165160100111031. Program Studi Sarjana Kedokteran Gigi. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya Malang. 19 September 2019. **“Pengaruh Pemberian Gelatin Ikan Patin (*Pangasius djambal*) terhadap Ekspresi RANK (*Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-β*) pada Penyembuhan Tulang Soket Gigi Pasca Pencabutan Gigi Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)”**. Pembimbing: drg. Fredy Mardiyantoro, Sp. BM. dan drg. Robinson Pasaribu, Sp. BM.

Salah satu parameter keberhasilan penyembuhan tulang adalah terjadinya remodeling tulang. Gelatin ikan patin mengandung banyak kandungan asam amino salah satunya arginin, glisin dan glutamin yang berperan dalam mempercepat proses penyembuhan tulang. Tujuan penelitian ini mengetahui pengaruh pemberian gelatin patin terhadap penurunan ekspresi RANK pada tulang soket gigi pasca pencabutan gigi Tikus Putih. 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 RANK pada preparat HPA dengan mikroskop cahaya OLYMPUS pada 5 lapang pandang dengan perbesaran 400x. Uji ANOVA menunjukkan terdapat penurunan jumlah ekspresi RANK yang signifikan pada kelompok perlakuan $p < 0.05$, dengan penurunan ekspresi RANK terendah 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 penurunan jumlah ekspresi RANK pada tulang soket gigi pasca pencabutan gigi tikus putih.

Kata Kunci: RANK, Gelatin Ikan Patin, Asam Amino, Pencabutan Gigi.

ABSTRACT

Muizun, Ahida. 165160100111031. Study Program Bachelor of Dentistry . Dentistry Faculty of Brawijaya University, Malang. September 19th 2019. **“The Effect of Patin (*Pangasius djambal*) Gelatine to The Expression of RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa- β) in Tooth Socket Bone After White Rat’s (*Rattus norvegicus*) Tooth Extraction”**, Supervisor: drg.Fredy Mardiyantoro, Sp. BM. and drg. Robinson Pasaribu, Sp. BM.

One of the success parameter of bone healing is *remodelling*. Gelatine of patine fish contains many of amino acids include arginine, glysin and glutamine which can accelerate bone healing process. This study aims to prove that gelatine of *patin fish* can increase expression of RANK in bone 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 RANK expression was calculated in 5 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 decrease 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 decreasing the expression of RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa- β) in bone healing after white rat’s (*Rattus norvegicus*) tooth extraction.

Keywords: RANK, Gelatine of Patin, Arginine, Angiogenesis, Tooth Extraction.

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Trauma mulut dan maksilofasial adalah hal yang kerap terjadi (Booth, 2007). Salah satu jenis trauma mulut dan maksilofasial adalah Fraktur Maksilofasial. Fraktur Maksilofasial adalah suatu ruda paksa yang mengenai wajah dan jaringan sekitarnya yang menyebabkan hilangnya kontinuitas tulang-tulang wajah (Pederson, 2012). Penyebab utama fraktur maksilofasial adalah kecelakaan lalu lintas, perkelahian, jatuh, kecelakaan olah raga, dan kecelakaan kerja (Peterson, 2003). Trauma mulut dan maksilofasial dapat juga disebabkan dari tindakan pencabutan gigi. Pencabutan gigi adalah suatu proses pengeluaran gigi dari alveolus, dimana pada gigi tersebut sudah tidak dapat dilakukan perawatan lagi. Pencabutan gigi juga merupakan tindakan bedah minor pada bidang kedokteran gigi yang melibatkan jaringan keras dan jaringan lunak pada rongga mulut (Gordon, 2013). Proses pencabutan gigi sering menimbulkan luka baik di jaringan lunak maupun jaringan keras (Zahara, 2012).

Proses penyembuhan trauma dapat dibagi menjadi tiga fase pokok, yaitu:

hemostasis dan inflamasi, proliferasi, maturasi dan remodelling. Fase-fase ini terjadi saling tumpang tindih, dan berlangsung sejak terjadinya luka, sampai tercapainya resolusi luka

(Wiksmann dkk, 2007). Penyembuhan luka merupakan suatu hubungan yang kompleks antara aksi seluler dan biokimia yang akan mengawali proses pemulihan integritas struktural dan fungsional dengan menumbuhkan kembali kekuatan pada jaringan yang terluka tersebut meliputi interaksi sel-sel berkelanjutan. Normalnya perkembangan fase-fase penyembuhan luka dapat diprediksi, sesuai dengan waktu yang diharapkan (Thakur dkk, 2011).

Respon inflamasi pasca trauma pada tulang akan mengeluarkan mediator inflamasi, salah satu mediator inflamasi yang dikeluarkan adalah RANK (*Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa- β*) (Kresnadi dkk, 2014). RANK merupakan anggota superfamily TNF yang berfungsi mengatur massa tulang dan metabolisme kalsium dengan cara meresorpsi tulang (Kanazawa dan Kudo, 2005). RANK adalah protein dalam membran sel osteoklas dan sel dendritik, yang berperan penting bagi semua hormon kalsium tropik dan proresorpsi sitokin dalam meningkatkan kalsemia dan multifikasi dari osteoklas dalam tulang. RANK dianggap sebagai reseptor permukaan hematopoietik mengendalikan osteoklastogenesis dalam metabolisme kalsium. RANK, disintesis sebagai tipe I transmembran protein dari 616 asam amino dan merakit dirinya menjadi fungsional. RANK dianggap sebagai reseptor alami RANKL yang terdapat sel line dari monosit atau makrofag termasuk prekursor osteoklas dewasa,

limfosit B dan T, sel dendritik, fibroblas, dan artikular kondrosit (Wenny, 2012).

Penyembuhan luka dapat dibantu dengan pengaplikasian gelatin. Gelatin merupakan substansi protein yang larut dalam air hangat dan secara alami tidak terdapat di alam, tetapi diperoleh dari kolagen melalui proses penghancuran struktur sekunder dengan bermacam tingkatan hidrolisis (Setiowati dan Nugrahaningsih, 2015). Gelatin merupakan suatu jenis protein yang bisa diekstraksi dari jaringan kolagen hewan (Nugrahaningsih, dkk 2012). Pada umumnya sediaan gelatin yang ada hampir 90% berbahan baku dari kulit babi, kulit sapi dan tulang sapi. Penggunaan bahan baku dari kulit babi, tentunya akan menimbulkan masalah bagi masyarakat Indonesia yang mayoritas penduduknya beragama Islam, sedangkan untuk bahan baku dari sapi, menimbulkan masalah bagi masyarakat yang menganut agama Hindu (Agnes, 2013).

Pada tahun-tahun terakhir para peneliti sudah banyak yang meneliti sumber-sumber bahan baku gelatin yang sifatnya halal, higienis dan dapat diterima oleh berbagai penganut agama. Jenis bahan gelatin yang sudah banyak diteliti saat ini yaitu dari tulang ikan dan dari kulit ikan. Tulang ikan dan kulit ikan adalah hasil limbah yang belum dimanfaatkan secara maksimal (Agnes, 2013). Keanekaragaman hewani saat ini mulai menarik perhatian para peneliti untuk memanfaatkannya sebagai salah satu sumber pengobatan luka terutama dari komoditas perairan. Ikan merupakan

salah satu komoditas unggulan hasil perairan Indonesia yang memiliki prospek sangat besar untuk dikembangkan. Berkaitan dengan ikan sebagai sumber bahan baku gelatin, ikan-ikan yang berasal dari perairan tropis memiliki karakteristik yang lebih mirip dengan gelatin yang bersumber dari sapi (*Bovine Gelatin*) dibandingkan dengan ikan-ikan yang berasal dari daerah beriklim dingin (Hekta dkk., 2015).

Ikan Patin (*Pangasius djambal*) adalah ikan yang banyak ditemukan di perairan umum di Indonesia seperti sungai, waduk dan rawa (Martha, 2006). Ikan Patin (*Pangasius djambal*) adalah salah satu ikan air tawar yang paling banyak dibudidayakan, karena merupakan salah satu ikan unggul yang memiliki daging enak, lezat, dan gurih (Minggawati, 2011). Daging Ikan Patin (*Pangasius djambal*) memiliki kandungan protein yang cukup tinggi. Ikan Patin (*Pangasius djambal*) juga memiliki kadar kolesterol yang rendah sehingga aman untuk dikonsumsi. Daging Ikan Patin (*Pangasius djambal*) juga memiliki kandungan lemak tak jenuh (Wiranti, 2015).

Berdasarkan hasil penelitian Ratnasari dkk. (2013), gelatin Ikan Patin (*Pangasius djambal*) terbukti lebih unggul dari gelatin ikan jenis lain, seperti penampakan visual yang lebih berwarna putih, lebih lembab sebesar 2,84%, kandungan protein yang lebih tinggi sebesar 87,1%, kandungan abu yang sangat rendah sebesar 0,5%, dan rendah lemak sebesar 0,002%. Komposisi asam amino dalam gelatin Ikan Patin juga sangat tinggi, terutama

prolin dan glisin, yang merupakan asam amino utama penyusun gelatin. Pengaruh gelatin Ikan Patin terhadap proses *remodeling* tulang ialah kulit Ikan Patin mengandung kolagen yang berperan sebagai agen pembawa protein yang menginduksi tulang. Dengan demikian, gelatin Ikan Patin mempunyai pengaruh terhadap proses penyembuhan luka pasca pencabutan gigi dikarenakan dapat membantu proses kalsifikasi tulang alveolar (Hardyanti, 2014).

Berdasarkan latar belakang di atas maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian gelatin Ikan Patin (*pangasius djambal*) terhadap ekspresi RANK (*Receptor Activator of Nuclear factor Kappa- β*) pada soket pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus Norvegicus*).

1.2 Rumusan Masalah

Apakah pemberian gelatin Ikan Patin (*Pangasius djambal*) berpengaruh terhadap ekspresi RANK pada penyembuhan tulang soket gigi pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*)?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh pemberian gelatin Ikan Patin (*Pangasius djambal*) terhadap ekspresi RANK pada luka pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*).

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini antara lain:

1. Mengetahui jumlah ekspresi RANK di fase inflamasi pada proses penyembuhan luka pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang tidak diberi gelatin Ikan Patin (*Pangasius djambal*).
2. Mengetahui jumlah ekspresi RANK di fase inflamasi pada proses penyembuhan luka pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diberi gelatin Ikan Patin (*Pangasius djambal*).
3. Mengetahui perbedaan jumlah ekspresi RANK yang tidak diberi gelatin Ikan Patin (*Pangasius djambal*) dan diberi gelatin Ikan Patin (*Pangasius djambal*) di fase inflamasi pada proses penyembuhan luka pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*).

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

Meningkatkan pengetahuan mengenai pengaruh pemberian gelatin Ikan Patin (*Pangasius djambal*) terhadap ekspresi RANK pada soket pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*).

1.4.2 Manfaat Praktis

Memberikan informasi ilmiah dan alternatif mengenai pengobatan di bidang kedokteran gigi mengenai penggunaan bahan hemostatik dari gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) dalam mempercepat penyembuhan luka pasca ekstraksi gigi.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Trauma Maksilofasial

Trauma maksilofasial merupakan trauma yang menyebabkan cedera pada jaringan lunak serta jaringan keras pada wajah, mulut, dan dentoalveolar. Cedera dentoalveolar berupa trauma tulang alveolar, trauma pada gigi geligi yang dapat disertai dengan kegoyangan gigi, pergeseran letak gigi dan avulsi. Cedera pada jaringan lunak antara lain: abrasi, kontusio, luka bakar dan laserasi. Cedera pada jaringan keras yaitu berupa fraktur (Adrianti, 2015).

Fraktur maksilofasial dapat terjadi karena kecelakaan lalu lintas, kecelakaan kerja, kecelakaan akibat peperangan dan juga sebagai akibat dari tindakan kekerasan yang memberi gaya tekan besar pada tulang sehingga terjadi cedera yang menyebabkan perdarahan akibat terputusnya pembuluh darah. Trauma pada jaringan keras dapat disebabkan oleh adanya trauma yang timbul secara mendadak yang melebihi batas kekuatan jaringan keras sehingga terjadi kehilangan kontinuitas daripada tulang sehingga fraktur atau karena keadaan patologis (Fonsesca, 2005).

Trauma maksilofasial juga dapat disebabkan dari tindakan pencabutan gigi. Pencabutan gigi merupakan suatu prosedur bedah yang dapat dilakukan dengan tang, elevator, atau pendekatan transalveolar dan bersifat *irreversible* atau tidak dapat dikembalikan ke keadaan semula apabila sudah dilaksanakan (Pedlar dkk., 2007). Pencabutan gigi merupakan tindakan yang sering dilakukan dalam bidang kedokteran gigi. Pencabutan gigi ideal merupakan pencabutan sebuah gigi atau akar gigi yang utuh dan dengan trauma sekecil mungkin sehingga tidak menimbulkan komplikasi (Sitanaya, 2016).

2.2 Penyembuhan Luka pada Tulang

Proses penyembuhan tulang melewati fase yang sama dengan penyembuhan luka pada umumnya (Puspito, dkk., 2014).

Penyembuhan luka merupakan suatu hubungan yang kompleks antara aksi seluler dan biokimia yang akan mengawali proses pemulihan integritas struktural dan fungsional dengan menumbuhkan kembali kekuatan pada jaringan yang terluka tersebut meliputi interaksi sel-sel berkelanjutan. Normalnya perkembangan fase-fase penyembuhan luka dapat diprediksi, sesuai dengan waktu yang diharapkan (Thakur, dkk., 2011).

Proses penyembuhan tulang dapat dibagi menjadi dua cara, yaitu primer (*direct healing*) dan sekunder (*indirect healing*). Perbedaan kedua penyembuhan tersebut adalah dari ada atau tidaknya kalus yang terbentuk. Pada penyembuhan primer tidak terdapat pembentukan kalus. Sedangkan pada penyembuhan sekunder disertai dengan terbentuknya kalus (Mardiyantoro, 2018).

2.2.1 Fase Penyembuhan Tulang Primer

Fase penyembuhan tulang primer Menurut Mardiyantoro (2018):

Penyembuhan primer merupakan tujuan akhir yang selalu diharapkan pada setiap tindakan perawatan fraktur tulang secara terbuka atau lebih dikenal dengan ORIF (*Open Reduction Internal Fixation*). Bila persyaratan ini tercapai, penyembuhan tulang langsung pada tulang *lamellar*, kanal Haversian, dan pembuluh darah.

Penyembuhan primer fraktur dapat terjadi melalui *contact healing* atau *gap healing*. Hasil akhir dari kedua proses tersebut adalah merekonstruksi kembali secara anatomis tulang seperti semula serta membentuk struktur *lamellar* tulang yang adekuat secara biomekanis.

2.2.1.1 Contact Healing

Pada proses *contact healing*, tulang di satu sisi korteks harus bersatu dengan tulang di sisi lain korteks untuk

membangun kembali kontinuitas mekanis. Contact healing dapat terjadi jika jarak antara ujung tulang kurang dari 0,01mm dan tegangan antar fragmen kurang dari 2% (Marsell, 2011 dalam Mardiyantoro, 2018) setelah dilakukan reduksi dengan baik, rongga sempit yang masih terbentuk akan diisi oleh tulang yang diproduksi oleh osteoblas dari kedua sisi fragmen fraktur.

2.2.1.2 Gap Healing

Gap healing berbeda dengan *contact healing* dimana penyatuan tulang dan *remodeling* sistem haversian tidak berlangsung secara simultan. Proses *gap healing* dapat terjadi apabila sudah dilakukan reduksi anatomis dengan baik dan fiksasi fragmen dengan stabil namun masih terdapat celah kecil sekitar 800µm sampai 1mm.

2.2.2 Fase Penyembuhan Tulang Sekunder

Penyembuhan tulang sekunder menurut Mardiyantoro (2018):

Penyembuhan tulang sekunder merupakan proses yang paling sering terjadi. Proses penyembuhan tulang secara spontan tanpa penggunaan fiksasi rigid pada area fraktur akan memunculkan adanya kalus.

2.2.2.1 Fase Inflamasi

Fase ini dimulai dengan terbentuknya hematoma pada daerah fraktur. Hematoma tersebut berasal dari tulang yang fraktur dan pembuluh darah dan pembuluh periosteal yang dibentuk di sekitar kanal medular di bawah periosteum. Proses koagulasi juga terjadi dengan melepaskan mediator potensial vasoaktif dari platelet di daerah fraktur. Mediator inflamasi akan meningkat secara signifikan pada hari pertama setelah terjadi fraktur di antaranya adalah interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-11, IL-8, dan tumor necrosis factor- α (TNF- α). Mediator proinflamasi ini memiliki efek kemotaksis pada sel inflamasi yang lain. Kemudian terjadi agregasi platelet dan angiogenesis. Setelah trauma vaskuler, lokasi fraktur menjadi

hipoksia dan osteosit pada lokasi fraktur menjadi kekurangan nutrisi dan menjadi nekrosis.

Sel endotel dan fibroblast berperan dalam mengisi gap fraktur dengan pembentukan jaringan granulasi. Pada fase inflamasi, kalus primitif berkembang dan mengurangi mobilitas yang tidak terkontrol dari lokasi fraktur. Pada kondisi normal, fase inflamasi ini cepat dan berlangsung hingga 1 minggu setelah fraktur.

2.2.2.2 Fase Proliferasi

Pada 24 jam setelah terjadi fraktur, maka akan terjadi migrasi dan proliferasi fibroblast pada daerah jejas tersebut. Proses ini dinamakan fibroplasia. Pada hari ketiga, fibroblast muda akan berkumpul di daerah fraktur yaitu pada area benang benang fibrin di sepanjang garis fraktur. Saat fase fibroplasia dimulai, osteoklas meresorpsi tulang yang nekrosis, yang diperoleh dari siklus monosit dalam darah dan sel precursor monoblastik dari sumsum tulang lokal.

Bridging atau callus formation stage terjadi hingga 2-3 minggu. Fibroblas di sekitar granulasi hematoma mengendapkan fibrocartilage dan jaringan cartilage dengan cara membentuk jembatan di antara fragmen fraktur.

Durasi pada fase hard callus tergantung pada lokasi fraktur dan bisa berlangsung selama 6-12 minggu. Pada fase ini, jembatan tadi diperluas menjadi kalus keras dengan endapan mineral.

2.2.2.3 Fase Remodelling

Fase ketiga ini melibatkan formasi dan mineralisasi kalus dan membentuk tulang kembali ke bentuk dan ukuran aslinya serta kompetensi biomekanikalnya lewat modelling dan remodelling. Pada fase ini terjadi perubahan dari anyaman tulang ireguler menjadi tulang lamelar. Osteoklas

meresorpsi anyaman tulang yang baru dan osteoblast mengganti matriks ini dengan tulang lamellar. Hasil fungsional yang penting pada fase remodelling adalah perbaikan kekuatan dan stabilitas mekanis tulang. Osteoklas menjadi terpolarisasi dan melekat pada permukaan termineralisasi dan melanjutkan remodeling tulang.

Fase ini dapat berlangsung hingga 5 tahun setelah *injury* terjadi. Adaptasi tulang terjadi sesuai dengan hukum Wolff. Hukum ini menjelaskan bahwa sebagai respon terhadap pemuatan eksternal, tulang akan diperbaiki ke bentuk aslinya, yang melibatkan resorpsi oleh osteoklas dan pembentukan tulang baru oleh osteoblas.

2.2.3 Fase Penyembuhan Luka Pasca Pencabutan Gigi

Menurut Shetty dan N. Charles (2004), tahapan penyembuhan luka pasca ekstraksi gigi, yaitu:

Segera setelah gigi dicabut dari soket, terjadi perdarahan yang memenuhi area pencabutan. Jalur intrinsik dan ekstrinsik pembekuan darah diaktifkan. Dari tahapan ini dihasilkan fibrin dan ukuran luka pencabutan mengecil.

Dalam 24-48 jam pertama, terjadi inflamasi (bengkak) dan dilatasi pembuluh darah di dalam ligamen periodontal. Tahapan ini juga diikuti migrasi leukosit dan pembentukan lapisan fibrin.

Di minggu pertama, terjadi pembentukan bekuan dari *temporary scaffold* dan sel inflamasi hilang. Lapisan epitel mulai terbentuk dan menutupi tepi hingga permukaan luka. Tahapan resorpsi tulang dimulai dengan berkumpulnya sel osteoklas di sekitar tulang alveolar. Pada tahap ini, proses angiogenesis masih terjadi di ligament periodontal.

Di minggu kedua, pembuluh darah baru berpenetrasi ke tengah bekuan darah dan trabekula secara perlahan memanjang masuk ke dalam bekuan melalui tulang alveolar. Lalu, terjadi peningkatan resorpsi osteoklas di margin tulang kortikal dari soket alveolar.

Di minggu ketiga, jaringan granulasi terbentuk dan mengisi soket tempat pencabutan. Proses kalsifikasi tulang perlahan terbentuk. Proses re-epitelisasi yang berlangsung menyebabkan permukaan luka tertutup sempurna dengan minimal/ tanpa jaringan parut.

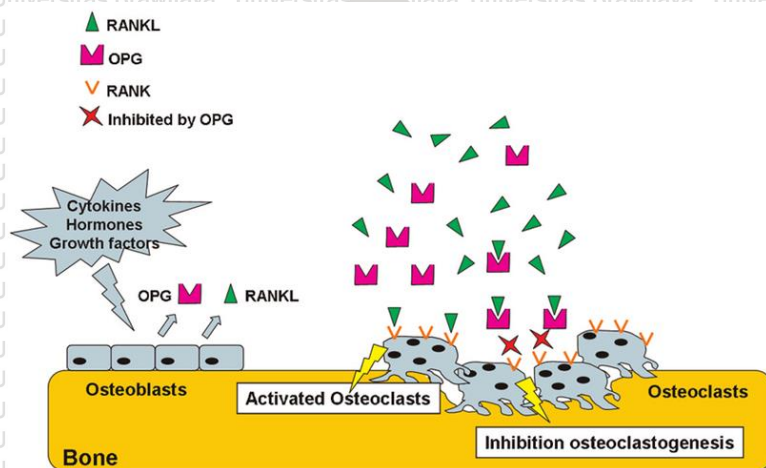
Hingga minggu kedelapan, proses remodeling tulang masih aktif melalui proses deposisi dan resorpsi. Hal ini dibuktikan dengan terbentuknya tulang yang belum sempurna saat foto radiografi. Di bulan keempat-keenam, penyembuhan luka berakhir.

2.3 Receptor Activator of Nuclear Factor κ -B (RANK)

Receptor Activator of Nuclear factor Kappa- β (RANK) merupakan *superfamily* TNF. RANK diekspresikan pada osteoklas yang mengatur massa tulang dan metabolisme kalsium dengan cara meresorpsi tulang. RANK memiliki peran yang penting untuk diferensiasi osteoklas. RANKL, yang merupakan ligan untuk RANK, juga memainkan peran penting dalam diferensiasi osteoklas (Kanazawa dan Kudo, 2005). RANK, protein transmembran tipe I yang terdiri dari 616 asam amino. Ekspresi RANK sebagian besar terbatas pada osteoklas, sel T dan B, sel dendritik, dan fibroblast. RANK merupakan persyaratan penting untuk diferensiasi dan aktivasi osteoklas (Hofbauer dan Heufelder, 2000).

Osteoklas adalah sel yang berperan dalam proses resorpsi tulang. Berasal dari stem sel hematopoietik yang terdapat pada sumsum tulang dan limpa. Osteoklas merupakan sel dengan banyak inti atau multinuklear, berukuran besar sehingga mudah dikenali dan bertanggung jawab dalam proses resorpsi tulang. Sel osteoklas berasal dari progenitor makrofag di sumsum tulang dan pada proses pembentukan sampai perkembangannya memerlukan factor soluble yang didapat dari osteoblast. Siklus terjadinya

resorpsi di tulang dimulai dengan melekatnya osteoklas pada permukaan tulang yang akan diresorpsi, kemudian berpolarisasi membentuk zona sealing yang pada akhirnya terjadi pemisahan komponen yang terdapat dalam tulang hingga proses kematian sel yang terprogram (apoptosis). Diferensiasi dari osteoklas imatur menjadi matur memerlukan adanya molekul RANKL yang berikatan dengan reseptornya, yaitu RANK yang terdapat pada membran sel prekursor osteoklas (Antonio, 2008).



Gambar 2.1 RANK-RANKL-OPG System (Valeria, dkk., 2014)

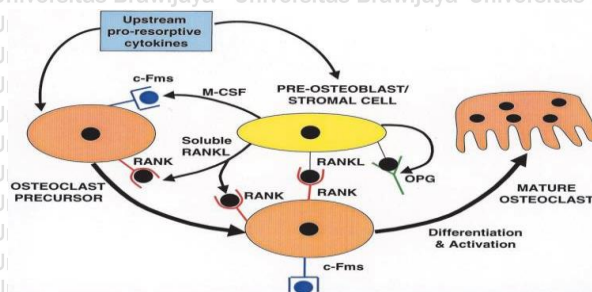
RANK memiliki peran penting dalam dalam metabolisme sel tulang dan osteoklastogenesis yang terlibat regulasi resorpsi tulang. RANK muncul pada hari ke-3 pasca inflamasi yang ditandai dengan adanya aktivitas resorpsi oleh osteoklas. Diferensiasi progenitor hemopoietic tergantung pada RANK yang terletak pada membrane sel osteoklas. RANKL diekspresikan pada permukaan membran sel stroma osteoblastik. Selanjutnya, RANKL akan mengikat RANK pada permukaan sel progenitor osteoklas untuk merangsang diferensiasi sel (Yunaini, dkk., 2018). Proses osteoklastogenesis dihambat oleh molekul OPG yang diekspresikan oleh osteoblas. OPG berikatan dengan RANKL, sehingga RANKL tidak berikatan dengan RANK pada prekursor osteoklas. Akibatnya prekursor osteoklas

gagal berdiferensiasi menjadi osteoklas yang matur dan akan diinduksi untuk mengalami kematian sel yang terprogram (apoptosis) (Wenny, 2012).

Trias sitokin novel yang terdiri dari aktivator reseptor ligan NF- κ B (RANKL), reseptornya (RANK) dan reseptor pemikat endogen osteoprotegerin (OPG) telah diidentifikasi dan dikarakterisasi secara luas untuk perannya dalam remodeling tulang. Telah diketahui bahwa sumbu RANK, RANKL dan OPG mengontrol osteoklastogenesis dan resorpsi tulang. Anggota superfamili ligan TNF RANKL, yang diekspresikan pada permukaan osteoblas, sangat penting untuk pembentukan, fungsi dan kelangsungan hidup osteoklas. RANKL menggunakan fungsinya dengan mengikat dan mengaktifkan reseptor RANK yang diekspresikan pada permukaan prekursor osteoklastik dan osteoklas dewasa. OPG adalah anggota larut dari keluarga super reseptor TNF yang disekresikan oleh osteoblas yang, dengan bersaing dengan RANK untuk mengikat pada RANKL, bertindak sebagai reseptor umpan, sehingga menghambat osteoklastogenesis (Santini, dkk., 2011).

Respon inflamasi pasca pencabutan gigi akan mengeluarkan mediator inflamasi seperti *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa- β* (RANK), *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa- β Ligand* (RANKL), dan osteoprotegerin (OPG) (Kresnadi dkk., 2014). RANK diekspresikan pada progenitors osteoklas sumsum tulang dan diaktivasi pada saat pengikatan dengan RANKL yang diperlukan untuk diferensiasi dari progenitor osteoklas menjadi osteoklas dewasa. OPG dihasilkan oleh osteoblas, merupakan suatu reseptor umpan untuk RANKL yang akan menghambat osteoklastogenesis dengan menghambat interaksi RANK dengan RANKL. RANK, RANKL, OPG adalah pengatur utama resorpsi tulang osteoklast (Hikmah dan Shita, 2013).

Fungsi RANK, RANKL dan OPG dalam penyembuhan luka pada tulang ialah menjaga keseimbangan antara resorpsi dan remodeling tulang, adanya ketidakseimbangan ditandai dengan aktivitas osteoklastik yang berlebihan sehingga menyebabkan resorpsi tulang yang berlebihan (Santini, dkk., 2011).



Gambar 2.2 Proses osteoklastogenesis (Khosla S, 2001).

2.4 Pewarnaan Imunohistokimia

2.4.1 Definisi

Imunohistokimia merupakan proses untuk mendeteksi antigen (protein, karbohidrat, dsb) pada sel dari jaringan dengan prinsip reaksi antibodi yang berikatan terhadap antigen pada jaringan. Nama imunohistokimia diambil dari kata “*immune*” yang menunjukkan bahwa prinsip dasar dalam proses ini ialah penggunaan antibodi dan “*histo*” menunjukkan jaringan secara mikroskopis. Imunohistokimia seringkali digunakan untuk mengukur dan mengidentifikasi proses proliferasi sel dan apoptosis. Imunohistokimia juga sering digunakan untuk penelitian dasar dalam rangka mengetahui distribusi dan lokasi *biomarker* ataupun protein terekspresi pada berbagai macam jaringan pada tubuh, selain itu pewarnaan IHK merupakan teknik uji yang tergolong cepat, aman, sensitif dan spesifik (Ramos dan Vara 2005).

Imunohistokimia merupakan gabungan antara histologi atau sitologi dan imunologi. Imunohistokimia adalah suatu metode perawatan substansi atau bahan aktif di dalam jaringan dengan

menggunakan prinsip-prinsip dasar imunologi yaitu pengikatan bahan aktif (antigen) pada sisi aktif yang spesifik oleh suatu anti bahan aktif (antibodi). 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, bahan-bahan alami lainnya serta bahan-bahan sintetik (Nurhidayat, 2002).

2.4.2 Prinsip Pewarnaan Imunohistokimia

Prinsip dari metode imunohistokimia adalah perpaduan antara reaksi imunologi dan kimiawi, dimana reaksi imunologi ditandai adanya reaksi antara antigen dengan antibodi, dan reaksi kimiawi ditandai adanya reaksi antara enzim dengan substrat. Pemeriksaan imunohistokimia dimaksudkan untuk mengenali bahan spesifik tertentu didalam jaringan dengan menggunakan antibodi dan sistem deteksi yang memungkinkan untuk mengenali bahan spesifik tersebut secara visual (Sudiana, 2005).

Dengan diketahuinya bahan spesifik tersebut maka dokter dapat menentukan dengan lebih tepat histogenesis dari lesi tertentu dan prognostiknya. Antibodi bereaksi terhadap determinan dari antigen yang berada dalam bahan spesifik yang diperiksa. Antibodi-antibodi ini akan berikatan dengan bahan dalam jaringan, dan antibodi-antibodi ini diketahui dengan menggunakan antibodiantibodi lain yang dirancang untuk mengenal immunoglobulin tersebut dari spesies-spesies yang terekspos dengan bahan asli (original) (Sudiana, 2005).

2.4.3 Metode Pewarnaan Imunohistokimia

Berdasarkan *Cancer Chemoprevention Research* Fakultas Farmasi UGM (2010), terdapat dua metode dasar imunohistokimia :

a. Metode langsung (*direct method*)

Metode ini adalah metode pengecatan satu langkah dan hanya melibatkan satu jenis antibodi terlabel. Contoh dari metode ini adalah antiserum terkonjugasi *fluorescein isothiocyanate* (FITC) atau rodhamin.

b. Metode tidak langsung (*indirect method*)

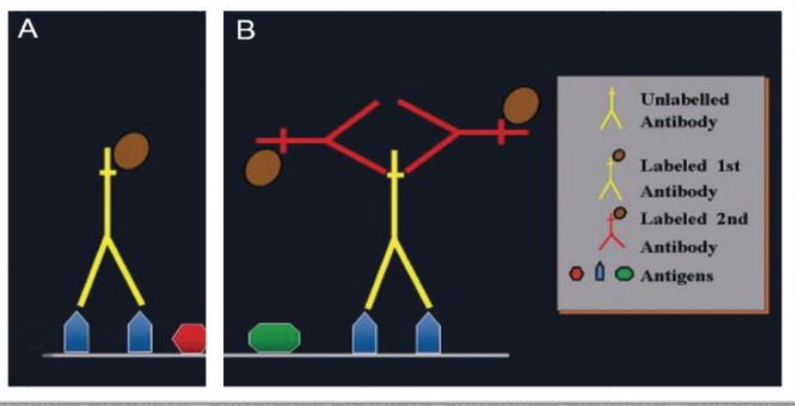
Metode ini menggunakan dua macam antibodi, yaitu antibodi tidak berlabel (primer) dan antibodi berlabel (sekunder). Antibodi primer akan mengenali antigen yang diidentifikasi pada jaringan (*first layer*), sedangkan antibodi sekunder akan berikatan dengan antibodi primer (*second layer*). Antibodi kedua adalah anti-antibodi primer. Antibodi sekunder yang terlabel akan ditambahkan substrat kromogen *diaminobenzidine* (DAB), yaitu suatu gugus fungsi yang akan membentuk senyawa berwarna saat bereaksi dengan senyawa tertentu. Terdiri atas 2 metode, yakni metode *immunofluorescence* (menggunakan kromogen *fluorescent dye* seperti FITC, rodhamin, dan *Texas-red*) serta metode *immunoenzyme* (menggunakan enzim peroksidase, alkali fosfatase, atau glukosa oksidase).

Perbedaan dari kedua metode tersebut berada pada jumlah antibodi yang digunakan, *direct method* hanya menggunakan satu antibodi sedangkan *indirect method* menggunakan dua antibody

Imunohistochemistry	Kelebihan	Kekurangan
<i>Direct Method</i>	Metodologi cepat karena hanya	Imunoreaktivitas dari antibodi primer memiliki

	menggunakan satu antibodi ▪ Ikatan antibodi sekunder yang tidak spesifik dihilangkan	kemungkinan dapat berkurang akibat pelabelan ▪ Amplifikasi sinyal kecil
<i>Indirect Method</i>	Sensitivitas meningkat karena setiap antibodi primer mengandung beberapa epitop yang dapat diikat oleh antibodi sekunder berlabel, dan memungkinkan amplifikasi sinyal	▪ Ikatan non spesifik dapat terjadi dengan antibodi sekunder ▪ Memerlukan langkah-langkah inkubasi dan pencucian yang ekstra

Tabel 2.1 Kelebihan dan Kekurangan Metode Imunohistokimia (Innova Biosciences, 2010).



Gambar 2.3 Gambaran *Direct Method* (A) dan *Indirect Method* (B) (Ramos-Vara, 2005)

2.5 Gelatin

2.5.1 Definisi

Gelatin adalah zat kimia padat, transparan dan tembus cahaya, rapuh saat kering, dan tidak berasa. Gelatin merupakan senyawa turunan dihasilkan oleh serabut kolagen jaringan ikat, kulit, tulang keras, serta tulang rawan yang dihidrolisis dengan asam ataupun basa. Gelatin diperoleh dari hidrolisis parsial kolagen (Nurrachmawati, 2015).

2.5.2 Gelatin Ikan

Gelatin pada umumnya berasal dari kulit dan tulang babi dan sapi. Sebagai sumber alternative berbahan dasar sapi dan babi, maka ditemukan gelatin ikan yang dapat mengatasi kelemahan tersebut. Berkaitan dengan ikan sebagai sumber bahan baku gelatin, ikan-ikan yang berasal dari perairan tropis memiliki karakteristik yang lebih mirip dengan gelatin yang bersumber dari sapi (Bovine gelatin) dibandingkan dengan ikan-ikan yang berasal dari daerah beriklim dingin (Hekta dkk., 2015).

Berdasarkan hasil penelitian Ratnasari dkk. (2013), gelatin Ikan Patin terbukti lebih unggul dari gelatin ikan jenis lain, seperti penampakan visual yang lebih berwarna putih, lebih lembab sebesar 2,84%, kandungan protein yang lebih tinggi sebesar 87,1%, kandungan abu yang sangat rendah sebesar 0,5%, dan rendah lemak sebesar 0,002%. Komposisi asam amino dalam gelatin Ikan Patin juga sangat tinggi, terutama prolin dan glisin, yang merupakan asam amino utama penyusun gelatin. Sifat fisik-kimiawi dan reologis yang unggul dalam gelatin ikan patin, yaitu kekuatan gel lebih kuat, kekentalan yang baik, titik isoelektrik yang baik, pH sebesar 5,8, titik didih 32°C, suhu proses menjadi gel 12°C, titik cair 29°C, dan kelarutan sebesar 99,4%.

Gelatin kulit Ikan Patin mengandung asam amino yang diperoleh dari interaksi asam klorida dengan suhu 45°C, seperti arginin (11,89%), glutamin (10,25%), alanin (9,67%), histidin

(1,45%), *threonine* (3,20%), *serin* (3,55%), *tirosin* (0,83%) dan lainnya (Saputra dkk., 2015). Sedangkan, asam amino yang berpengaruh terhadap proses penyembuhan luka, yaitu arginin dan glutamin. Arginin merupakan jenis asam amino semi esensial yang dibutuhkan dalam proses pertumbuhan, cedera, dan stress. Arginin berperan dalam sistem imun sehingga dapat menurunkan inflamasi, penyembuhan luka, sekresi hormon, vaskularisasi, deposisi kolagen, dan *wound contraction* (Sugiaman, 2011).

Pengaruh gelatin Ikan Patin terhadap proses *remodeling* tulang ialah kulit Ikan Patin mengandung kolagen yang berperan sebagai agen pembawa protein yang menginduksi tulang (Hardyanti, 2014). Dengan demikian gelatin Ikan Patin mempunyai pengaruh terhadap penyembuhan luka pasca pencabutan gigi dikarenakan dapat membantu proses kalsifikasi tulang alveolar.

2.6 Ikan patin

2.6.1 Definisi

Ikan Patin (*Pangasius djambal*) adalah ikan yang banyak ditemukan di perairan umum di Indonesia seperti sungai, waduk dan rawa (Martha, 2006). Ikan Patin (*Pangasius djambal*) adalah salah satu ikan air tawar yang paling banyak dibudidayakan, karena merupakan salah satu ikan unggul yang memiliki daging enak, lezat, dan gurih (Minggawati, 2011). Daging Ikan Patin (*Pangasius djambal*) memiliki kandungan protein yang cukup tinggi. Ikan Patin (*Pangasius djambal*) juga memiliki kadar kolesterol yang rendah sehingga aman untuk dikonsumsi. Daging Ikan Patin (*Pangasius djambal*) juga memiliki kandungan lemak tak jenuh (Wiranti, 2015).

2.6.2 Klasifikasi

Keanekaragaman spesies Ikan Patin tersebar secara tidak merata di setiap sungai utama dengan tingkat keanekaragaman spesies yang besar di Sumatera (*Pangasius djambal*, *Pteropangasius micronemus*, *Pangasius nasutus*, *Pangasius polyuranodon*, *Pangasius kunyit*, *Helicophagus waandersii*, *Helicophagus typus*)

dan beberapa spesies endemik tersebar di sungai besar Kalimantan seperti di Sungai Kapuas di Kalimantan Barat (*Pangasius lithostoma* dan *Pangasius humeralis*), serta Sungai Mahakam (*Pangasius nieuwenhuisii* dan *Pangasius mahakamensis*), Sungai Kayan dan Sungai Berau (*Pangasius rheophilus*) yang terletak di Kalimantan Timur (Gustiano, dkk. 2003).

Ikan Patin dapat diklasifikasikan sebagai berikut (Dewi, 2011):

Filum : Chordata

Sub Filum : Vertebrata

Kelas : Pisces

Sub Kelas : Teleostei

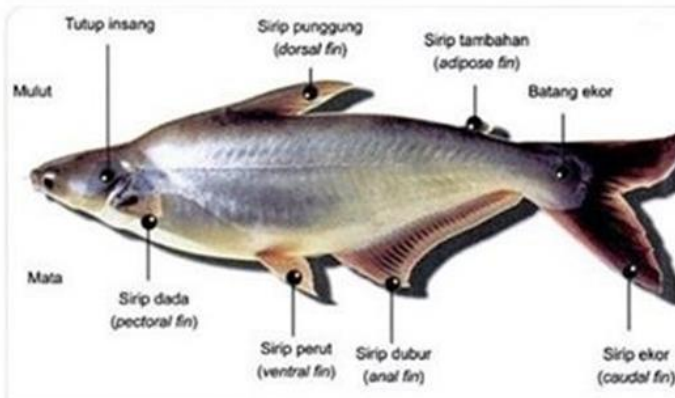
Ordo : Ostriophysi

SubOrdo : Siluroidea

Family : Pangasidae

Genus : *Pangasius*

Spesies : *Pangasius djambal*



Gambar 2.4 Ikan Patin (*Pangasius djambal*)

(Mahyuddin K, 2010)

2.6.3 Kandungan

Daging Ikan Patin memiliki kandungan protein yang cukup tinggi. Ikan patin juga memiliki kadar kolesterol yang rendah sehingga aman untuk dikonsumsi. Daging Ikan Patin juga memiliki kandungan lemak tak jenuh (Wiranti, 2015). Menurut Mahyuddin (2010), kandungan gizi Ikan Patin sebagai berikut; Kandungan Gizi Ikan Patin (Mahyuddin, 2010).

Komposisi	Konsentrasi
Protein	68,6%
Lemak	5,8%
Abu	3,5%
Air	59,3%

Tabel 2.2 Kandungan Ikan Patin (Mahyuddin, 2010).

Amino Acid (mg/g gelatin)	Pangas catfish	Asian redtail catfish	Nile tilapia	Striped snakehead	Commercial Gelatin
Asparagine	40.77	40.46	39.47	40.82	40.18
Threonine	9.46	8.90	8.42	11.09	9.67
Serine	30.85	32.78	28.12	33.93	35.49
Glutamic	83.81	77.66	79.03	77.66	70.51
Proline	117.39	99.8	98.06	110.38	123.28
Glycine	167.31	151.41	154.80	150.76	147.75
Alanine	68.57	67.52	64.70	80.51	69.54
Valine	16.64	15.40	13.44	14.53	13.77
Methionine	9.04	6.44	8.52	7.144	5.64
Isoleucine	8.64	5.76	7.53	6.61	5.15
Leucine	26.52	24.32	21.17	29.15	23.43
Tyrosine	4.83	4.00	3.58	4.24	3.88
Phenylalanine	18.24	18.08	15.72	19.61	16.85
Histidine	8.98	9.42	7.42	13.05	8.98
Lysine	35.23	22.47	28.06	29.12	24.04
Arginine	70.19	48.37	39.49	67.26	65.13
Tryptophan	38.00	38.31	37.92	39.08	36.57
Total	754.47	671.1	655.45	734.94	699.86

Tabel 2.3 Perbandingan Komposisi Asam Amino (mg/g) pada Gelatin dari Empat Spesies Ikan Air Tawar (Ratnasari, 2013).



2.7 Tikus Putih

Tikus putih dan mencit merupakan hewan laboratorium yang sering digunakan karena kemampuan reproduksi tinggi (sekitar 10-12 anak/kelahiran), harga dan biaya pemeliharaan relatif murah, serta efisien dalam waktu karena sifat genetik dapat dibuat seragam dalam waktu yang lebih singkat dibandingkan dengan ternak besar (Kartika, 2013).

Menurut Schuler (2006), genome mencit, sapi, babi dan manusia sangat mirip, sehingga mencit dapat digunakan sebagai hewan model untuk mempelajari pengetahuan dasar genetika kualitatif dan kuantitatif maupun metode pemuliaan. *R. norvegicus* tergolong dalam kumpulan mamalia kecil karena berat badannya kurang dari 5 kg. Mamalia ini mempunyai kadar metabolisme yang tinggi, aktif, serta pergerakan yang tinggi. (Nizam F, 2018) *R. norvegicus* memiliki berat 140500 g, rata-rata 400 g. Pejantan biasanya lebih besar dari betina. (Armitage dan Myers, 2009)

2.7.1 Taksonomi Tikus Putih

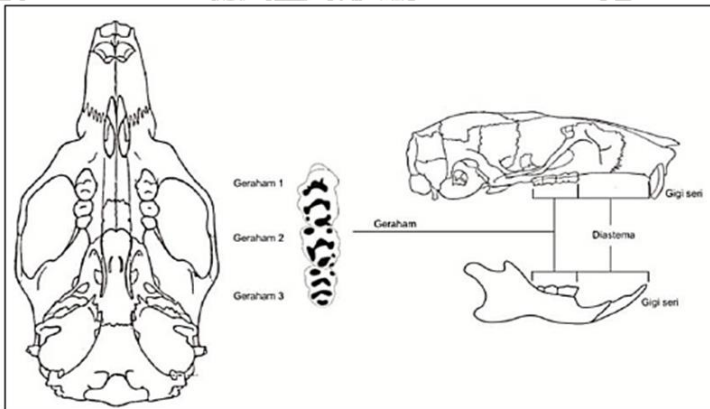
Berdasarkan taksonominya tikus putih termasuk dalam genus *Rattus* dan spesies *R. norvegicus* Tikus putih berasal dari Asia Tengah sedangkan mencit di Indonesia merupakan hasil divergen dari mencit di Asia Barat Daya (Suzuki dkk., 2013).

Taksonomi	Tikus
Kingdom	Animal
Filum	Chordata
Kelas	Mamalia
Ordo	Rodentia
Famili	Muridae
Genus	Rattus
Spesies	Rattus Norvegicus

Tabel 2. 4 Taksonomi Tikus Putih (Kartika, 2013).

2.7.2 Anatomi Gigi Tikus

Tikus memiliki diastema di antara gigi insisivus dan gigi geraham. Susunan gigi geligi tikus terdiri dari 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, dkk., 2016).

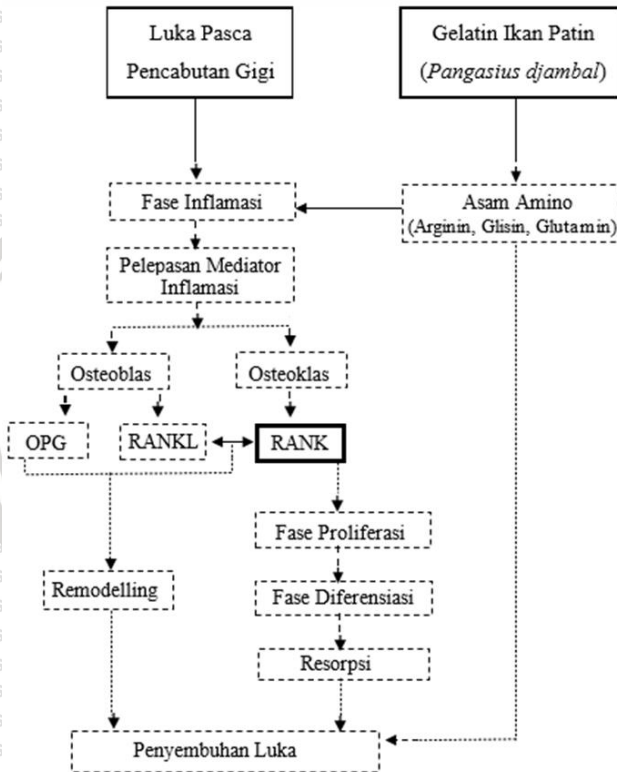


Gambar 2.5 Anatomi Gigi Tikus (Yuliadi, dkk.,2016).



BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Keterangan :



= Proses yang diteliti



= Proses yang tidak diteliti



= Mempercepat



= Tahapan proses

Gambar 3.1 Skema Kerangka Konsep

Pencabutan gigi merupakan suatu proses pengeluaran gigi dari alveolus, dimana pada gigi tersebut sudah tidak dapat dilakukan perawatan lagi (Fenanlampir, Mariati, Hutagalung, 2014). Luka pasca pencabutan gigi akan mengalami beberapa fase penyembuhan yang berlangsung secara tumpang-tindih, di antaranya adalah fase inflamasi, fase proliferasi dan diferensiasi dan fase remodelling (Sugiaman, 2011).

Fase inflamasi berlangsung sejak terjadinya luka sampai sekitar hari ke lima (Sugiaman, 2011). Dalam fase ini akan terjadi pengeluaran mediator inflamasi. RANK, RANKL dan OPG merupakan mediator inflamasi yang berfungsi dalam menjaga keseimbangan antara resorpsi dan remodeling tulang, adanya ketidakseimbangan RANK, RANKL, OPG ditandai dengan aktivitas osteoklastik yang berlebihan menyebabkan resorpsi tulang yang berlebihan (Santini, dkk., 2011). Pemberian Gelatin Ikan Patin pada pencabutan gigi diharapkan dapat mempercepat penyelesaian fase inflamasi dan meningkatkan OPG sehingga proses penyembuhan fase inflamasi hingga remodelling tulang dapat berjalan dengan lebih cepat dan lebih baik.

Gelatin Ikan Patin mengandung zat yang dapat membantu proses penyembuhan luka. Asam amino yang berpengaruh dalam penyembuhan luka adalah arginin, glutamin dan glisin. Arginin adalah asam amino non-essensial yang berperan dalam mengatur jalur untuk pertumbuhan sel jaringan, replikasi dan perbaikan.

Arginin merupakan protein yang baik untuk fungsi imun karena meningkatkan fungsi dari limfosit-T. Sedangkan glutamin adalah asam amino nonessensial yang digunakan sel inflamasi dalam luka untuk proliferasi sel dan dapat menstimulasi kolagen. (Amstrong dkk., 2014). Glisin dalam protein memiliki peran sebagai bahan pembentuk kolagen dan mempercepat pembentukan pembuluh darah baru (Wang dkk., 2013).

Pengaruh gelatin ikan patin terhadap proses remodeling tulang ialah kulit ikan patin mengandung kolagen yang berperan sebagai agen pembawa protein yang menginduksi tulang (Hardyanti, 2014). Dengan demikian, gelatin ikan patin mempunyai pengaruh terhadap proses penyembuhan luka pasca pencabutan gigi dikarenakan dapat membantu proses kalsifikasi tulang alveolar.

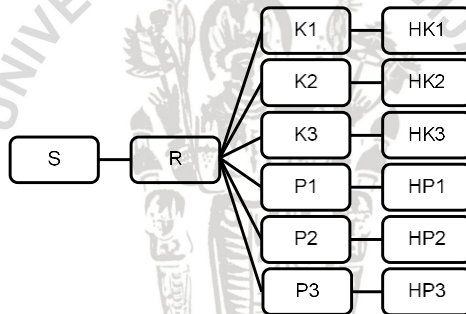
3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis dari penelitian ini adalah pemberian gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) berpengaruh terhadap ekspresi *Receptor Activator of Nuclear factor Kappa- β (RANK)* pada penyembuhan tulang soket gigi pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*).

BAB IV METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Pendekatan yang digunakan untuk tujuan penelitian ini adalah dengan rancangan eksperimental laboratoris. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *Randomized Post Test Only Group Design* dilaboratorium untuk mengetahui pengaruh pemberian gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) terhadap ekspresi *RANK* 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.

30

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*) pasca pencabutan dengan konsentrasi 100% selama 3 hari perawatan.

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

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

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

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

4.2 Sampel Penelitian

4.2.1 Jenis dan Kriteria Sampel

Sampel penelitian ini adalah hewan percobaan berupa tikus putih jantan dengan galur wistar (*Rattus norvegicus*) yang dipelihara di Laboratorium Farmakologi Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Tikus putih galur Wistar dipilih sebagai populasi karena merupakan hewan yang jinak, jarang berkelahi, mudah diperoleh dalam jumlah banyak, mempunyai respon yang lebih cepat, mudah perawatannya, dan fungsi metabolismenya mirip dengan manusia.

Gambar tikus putih (*Rattus norvegicus*) tampak pada gambar



Gambar 4.2 Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) galur wistar

Tikus putih dipilih sebagai sampel dalam penelitian ini karena memiliki beberapa kriteria sebagai berikut:

1. Kriteria inklusi

- a. Berumur 2-3 bulan
- b. Mempunyai berat badan 200-250 gram
- c. Sehat ditandai dengan bola mata jernih dan tidak kemerahan
- d. Tikus putih galur Wistar berkelamin jantan

2. Kriteria eksklusi

- a. Adanya luka pada tubuh tikus
- b. Gigi patah saat proses pencabutan
- c. Konsistensi feses cair akibat diare
- d. 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
- e. 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). Perhitungan jumlah sampel yang diperlukan dapat menggunakan rumus Federer sebagai berikut.

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

Ket:

t = jumlah kelompok

n = jumlah pengulangan penelitian

Gambar 4.3 Rumus Federar

Pada penelitian ini nilai t = 6 sehingga jumlah pengulangan penelitian sebagai berikut.

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

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

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Maka jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah minimal 4 ekor tikus putih untuk tiap kelompok. Pada penelitian ini terdiri atas 6 kelompok penelitian sehingga dibutuhkan 24 ekor tikus putih. Untuk mencegah kehilangan sampel akibat tikus yang mati, maka jumlah sampel ditambah menjadi 30 ekor tikus putih.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

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

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat penelitian ini adalah jumlah ekspresi *Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-β (RANK)*

4.3.4 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol penelitian ini adalah:

1. Jenis kelamin hewan coba
2. Umur hewan coba
3. Berat badan hewan coba
4. Makanan dan minuman yang dikonsumsi hewan coba
5. Perlakuan kandang hewan coba
6. Jumlah dan aplikasi gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) yang dimasukkan kedalam soket gigi tikus hewan coba
7. Teknik pencabutan gigi hewan coba
8. Pengambilan preparat jaringan

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

4.4.1 Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di beberapa tempat berikut :

1. Laboratorium Biokimia Pangan Fakultas Teknologi Hasil Pangan Universitas Brawijaya untuk pembuatan gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*)
2. Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk pemeliharaan dan pemberian perlakuan pada hewan coba
3. Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk pengambilan jaringan luka dan pembuatan preparat

4. Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran

Universitas Brawijaya untuk pengecatan imunohistokimia, serta pengambilan dan analisa data dengan menghitung jumlah ekspresi RANK

4.4.2 Waktu

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Agustus - September 2019.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat dan Bahan 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 (HCl) 1%, kertas lakmus, baskom, wadah tertutup, masker, sarung tangan, kantong plastik jenis PE (poly ether), dan aquadest.

4.5.2 Alat dan Bahan Pencabutan Gigi

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur wistar umur 2-3 bulan dengan berat badan 200-250 gram, pisau lecron modifikasi, anastesi ketamine 1000 mg/10 ml, kain kasa, masker, sarung tangan, dan needle holder modifikasi.

4.5.3 Alat dan Bahan Perlakuan Hewan Coba

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur wistar umur 2-3 bulan dengan berat badan 200-250 gram, gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) konsentrasi 100%, pipet, 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 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%, masker, dan sarung tangan.

4.5.5 Alat dan Bahan Pewarnaan Imunohistokimia Indirek

Blok parafin, *xylene*, etanol, *peroxidase blocking solution*, *prediluted blocking serum*, antibodi monoklonal (anti RANK), *Phosphate Buffer Saline* (PBS), antibodisekunder (*conjugated to horse radish peroxidase*), peroksidase, kromogen DAB (*Diaminobenzinidine*), *Hematoxylin*, air, *mounting media*, coverslip, mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x dan 5 lapang pandang.

4.6 Definisi Operasional

4.6.1 Ekstraksi Gigi Tikus

Pencabutan atau ekstraksi gigi adalah suatu tindakan pengeluaran gigi dari alveolus. Gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dicabut dalam penelitian ini adalah gigi insisivus satu kiri rahang bawah (RB) menggunakan lecron dan *needle holder*.

4.6.2 Soket Gigi

Soket adalah kavitas dalam tulang alveolar rahang bawah tempat melekatnya akar gigi insisivus satu rahang bawah (RB) tikus

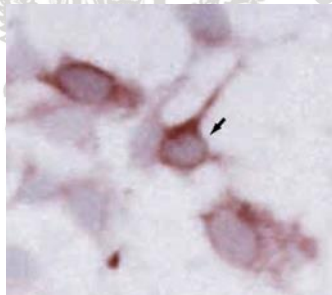
putih (*Rattus norvegicus*) yang dipotong di bagian median secara vertikal yang diambil untuk dijadikan preparat histologi penelitian.

4.6.3 Gelatin Ikan Patin

Pada penelitian ini gelatin ikan patin didapatkan dari kulit ikan patin (*Pangasius djambal*) yang dibuat tanpa proses pengeringan. Penelitian ini membuat gelatin dengan konsentrasi gelatin patin (*Pangasius djambal*) sebesar 100%.

4.6.4 RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa- β)

Eksprei RANK dapat diamati dengan pewarnaan imunohistokimia dengan perbesaran 400X. RANK tampak berwarna kecoklatan gelap pada sel osteoklas dengan bentuk mononuklear.



Gambar 4.4 Gambaran Histologis RANK (Roux, 2002).

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan dan Perawatan Hewan Coba

Persiapan dan perawatan hewan coba (Juknis Rodensia, 2017), adalah:

1. Hewan coba diseleksi berdasarkan kriteria sampel. Kemudian dikelompokkan menjadi 8 kelompok yang masing-masing terdiri dari 4 ekor tikus putih.
2. Tikus putih putih dipelihara dalam kandang berupa

box plastic berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm yang beratapkan kawat berjaring.

3. Lakukan aklimatisasi hewan coba tikus putih putih untuk membuat tikus putih putih beradaptasi pada tempat pemeliharaan (Laboratorium Farmakologi FK UB) selama 7 hari pada suhu ruangan (20-26°C) dengan kelembaban udara berkisar 40-70%.

4. Lakukan desinfeksi menggunakan larutan *lysol* 3-5% untuk menjaga kebersihan kandang.

5. Beri makan tikus putih putih dengan pelet komersial yang disediakan di tempat pakan dan ditaburkan (*bedding*) di lantai kandang untuk menambah nafsu makan. Selain itu, tikus putih putih juga harus diberi minum seperti air segar PDAM.

4.7.2 Pembuatan Gelatin Ikan Patin (*Pangasius djambal*)

Prosedur pembuatan gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*), (Ratnasari dkk, 2013) adalah :

1. Kulit ikan patin (*Pangasius djambal*) diambil dan dipisahkan dari daging dan lemak (*degreasing*) yang menempel pada kulit.
2. Kemudian, kulit ikan patin disimpan dalam suhu -20°C.
3. Kulit ikan patin yang telah disimpan dicairkan dalam suhu ruangan dan dipotong dengan ukuran sekitar 1 cm².
4. Selanjutnya, kulit ikan patin dibilas dengan air lemon untuk menghilangkan material selain kulit ikan.

5. Lalu, sampel ikan patin 100 gram dibilas dan direndam dalam larutan asam sitrat (HCl) selama 12 jam untuk mencairkan serabut kolagen menjadi serat-serat/ fibril sehingga mudah diekstraksi
6. Sampel dinetralkan dengan cara pencucian beberapa kali hingga air cucian berada pada pH netral (6-7)
7. Kulit patin diekstraksi menggunakan *shaker water bath* dengan air suling air suling dalam suhu 60°C selama 6 jam
8. Larutan gelatin dipisahkan dari kulit sisa dengan menggunakan kain saring *Wathman* no.1
9. Larutan gelatin didinginkan pada suhu ruang hingga terbentuk gel gelatin.

4.7.3 Pencabutan Gigi Tikus Putih

Prosedur pencabutan gigi tikus putih (Widyastomo dkk, 2013) :

1. Tikus yang digunakan sebagai hewan coba akan diadaptasikan terlebih dahulu kurang lebih selama 7 hari
2. Sebelum dilakukan ekstraksi, tikus diberikan injeksi anestesi secara intra peritoneal menggunakan ketamine 1000 mg/10 ml sebanyak 0,18-0,2 ml (mengikuti berat badan tikus)
3. Ulesi alkohol 70% terlebih dahulu pada bagian tikus yang akan dilakukan anestesi
4. Lakukan injeksi dengan cara intra peritoneal dilakukan dengan cara menyuntikan 2/3 posterior dari bagian perut atau paha
5. Setelah bagian jarum dimasukkan lalu lakukan aspirasi

6. Jika jarum sudah ditempatkan dengan benar maka obat anastesi dapat diinjeksikan
7. *Onset of action* dari ketamine adalah ± 3 menit setelah injeksi dan mempunyai *duration of action* ± 60 menit
8. Setelah tikus tertidur, lakukan pemisahan akar gigi dari ginggiva dengan menggunakan alat lecron yang telah dimodifikasi
9. Lakukan ekstraksi pada insisivus rahang bawah dengan needle holder yang telah dimodifikasi. Pencabutan gigi dilakukan secara hati-hati searah dengan soket gigi. Kekuatan pencabutan harus sama untuk meminimalisir patahnya gigi
10. Irigasi soket dengan menggunakan aquades steril untuk membersihkan sisa-sisa fragmen gigi
11. Kontrol perdarahan dengan menggunakan kasa steril

4.7.4 Pemberian Obat Analgesik Tikus putih

Untuk meredakan komplikasi rasa nyeri pasca pencabutan, tikus diberikan obat analgesic. Prosedur pemberian analgesik pada tikus adalah Metamizole Sodium 500mg/ml diberikan sebanyak 1 kali sehari dengan dosis 0,3 ml secara intra peritoneal (Widyastomo dkk, 2013).

4.7.5 Pemberian Gelatin Ikan Patin (*Pangasius djambal*)

Prosedur pemberian gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*), (Syafriadi, 2007) adalah:

1. Gel gelatin dimasukkan pada soket gigi setelah prosedur pencabutan gigi dilakukan, pemberian gelatin dilakukan sebanyak satu kali, tanpa dilakukan penjahitan soket setelahnya
2. Pemberian gelatin ikan patin dengan menggunakan *cotton bud* pada soket gigi tikus yang telah dicabut sebanyak 0,1 ml (jumlah maksimal yang dapat diberikan pada soket gigi Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*))
3. Untuk kelompok kontrol tidak diberi perlakuan.

4.7.6 Perawatan Tikus Putih Pasca Pencabutan Gigi

Perawatan pada tikus putih pasca pencabutan dilakukan dengan :

1. Pemberian makan tikus pasca pencabutan gigi dilakukan dengan mengencerkan makanan (pelet komersial),
2. Memberikan makan tikus dengan melakukan sondasi menggunakan sonde gastrik agar langsung menuju lambung tanpa melawati mulut untuk mencegah gangguan penyembuhan pada soket gigi.
3. Pemberian makanan dilakukan 2 kali sehari setiap pagi dan sore agar asupan makanan bagi tikus terpenuhi, asupan cairan bagi tikus tetap diberikan air PDAM secukupnya (Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan, 2016)

4.7.7 Pengambil Sampel Jaringan

Sebelum pengambilan sampel jaringan dilakukan beberapa tahapan berikut :

1. Dilakukan pada hari ke-3, ke-5 dan ke-7 pada masing-masing kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, ekspresi RANK tampak berwarna kecoklatan dengan bentuk mononuklear pada sel osteoklas di jaringan soket gigi hewan coba.
2. Anestesi dengan menggunakan injeksi *ketamine* dosis lethal dengan tiga kali injeksi sebanyak 0,9 ml.
3. Melakukan konfirmasi kematian tikus dengan cara melihat aspirasi, detak jantung, dan kedipan mata. Apabila sudah tidak terlihat maka dapat dilakukan dekapitulasi rahang.
4. Dekaputasi dan diambil rahang bawah (mandibula), menggunakan scalpel no.11 dimana terdapat soket bekas pencabutan gigi.
5. Rahang bawah kemudian dimasukkan ke dalam tabung berisi formalin 10% untuk fiksasi jaringan selama 18-24 jam jaringan dan diberi label sebagai penanda.
6. Tikus dikuburkan dalam tanah secara layak dengan bantuan tenaga ahli dari laboratorium.

4.7.8 Pembuatan Sediaan Histologi

Setelah dilakukan dekaputasi rahang bawah (mandibula) dan fiksasi jaringan telah selesai, langkah selanjutnya adalah pembuatan sediaan histologi berupa preparat :

1. Sampel jaringan tikus yang telah difiksasi menggunakan formalin 10% selama 18-24 jam, dicuci menggunakan air mengalir selama 15 menit

2. Lakukan dekalsifikasi rahang bawah (mandibula) menggunakan EDTA 14% selama 3-4 minggu
3. Dicuci dengan air mengalir selama 15 menit dan melakukan pemotongan jaringan dengan ukuran 2 cm x 1 cm x 3 mm. Kemudian dicuci dengan air selama 15 menit dan dilakukan dehidrasi dengan menggunakan *acetone* sebanyak 1 jam x 4.
4. Melakukan *clearing* dengan menggunakan *xylo*l sebanyak 30 menit x 4.
5. Dilakukan impregnasi dengan menggunakan paraffin cair dengan suhu 55°C selama 1 jam x 4.
6. Dilakukan penanaman jaringan kedalam blok paraffin (*embedding*) lalu dilakukan pendinginan selama 24 jam.
7. Sediaan disayat dengan menggunakan *mikrotom rotary* dengan ketebalan berkisar 3-5 mikron lalu dilakukan pelekatan sayatan pada *water bath* dengan suhu 30°C.
8. Mengambil sayatan dan meletakkan pada *object glass*, didiamkan selama 24 jam.
9. Dilakukan pewarnaan dengan teknik imunohistokimia

4.7.9 Pewarnaan Imunohistokimia

Metode pewarnaan imunohistokimia yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu metode *indirect* (tidak langsung). Metode ini merupakan pewarnaan imunohistokimia yang menggunakan antibodi primer (tidak berlabel) dan antibodi sekunder (berlabel). Antibodi primer berfungsi untuk mengenali antigen yang mengidentifikasi

jaringan. Antibodi sekunder berfungsi untuk berikatan dengan antibodi primer dan memberikan warna coklat untuk ekspresi RANK karena berikatan dengan senyawa pemberi warna (kromogen).

Prosedur pewarnaan imunohistokimia indirek menurut Protap Pengecatan Imunohistokimia Fakultas Farmasi UGM dengan modifikasi sebagai berikut :

1. Melakukan deparafinasi preparat (blok parafin) dengan *xylene* sebanyak 3 kali masing-masing selama 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. Merendam dalam *peroxidase blocking solution* (PBS) pada suhu kamar selama 10 menit
4. Menginkubasi preparat dalam *prediluted blocking serum* 25°C selama 10 menit
5. Merendam preparat di dalam antibodi monoklonal anti-RANK selama 10 menit
6. Mencuci preparat dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) selama 5 menit
7. Menginkubasi preparat dengan antibodi sekunder (*peroxidase*) selama 10 menit
8. Mencuci preparat dengan PBS selama 5 menit
9. Menginkubasi preparat dengan *peroksidase* selama 10 menit
10. Mencuci preparat dengan PBS selama 5 menit

11. Menginkubasi preparat dengan kromogen DAB (*Diaminobenzinidine*) selama 10 menit
12. Menginkubasi preparat dengan *hematoxylin* selama 3 menit
13. Mencuci preparat dengan air mengalir
14. Membersihkan preparat dan tetesi dengan *mounting media*
15. Menutup preparat dengan *coverslip*
16. Mengamati ekspresi RANK (warna coklat gelap) pada sel osteoklas menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x
17. Mendokumentasikan hasil setiap pengamatan
18. Melakukan perhitungan jumlah sel osteoklas yang mengekspresikan RANK. Perhitungan dilakukan secara manual dengan mengamati ekspresi RANK yang tampak bewarna kecoklatan dengan bentuk mononuclear pada sel osteoklas di jaringan soket gigi hewan coba.

4.7.8 Pengambilan Data

Preparat jaringan luka pasca pencabutan gigi yang telah dilakukan pengecatan imunohistokimia akan diamati dan dilakukan penghitungan sel yang mengekspresikan RANK menggunakan mikroskop cahaya *Olympus CX-21* dengan perbesaran 400x pada 5 bidang lapang pandang yang berbeda di sepanjang luka pasca pencabutan gigi. Kemudian, sel dihitung secara manual untuk memperoleh data yang akurat. Indikator ekspresi RANK dalam

pewarnaan imunohistokimia dengan menggunakan kromogen diaminobenzidine (DAB) akan terlihat berwarna coklat gelap pada sel osteoklas.

4.8 Analisa Data

Untuk memperoleh data perhitungan jumlah ekspresi RANK, maka dilakukan 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% ($\alpha=0,05$) dengan langkah analisis statistik sebagai berikut :

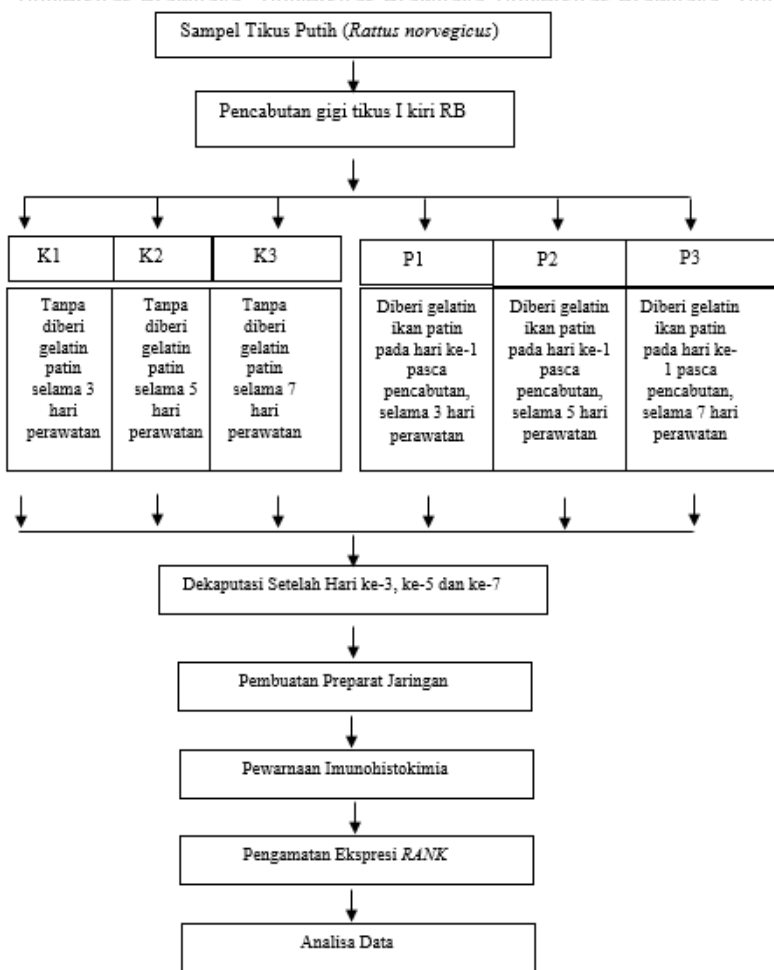
1. Pertama yaitu melakukan uji normalitas dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk* karena besar sampel ≤ 50 dan bertujuan untuk menilai sebaran data tersebut berdistribusi normal atau tidak normal.
2. Kedua yaitu melakukan uji homogenitas ragam untuk mengetahui sebaran data masing-masing kelompok tersebut homogen atau tidak dengan menggunakan *Levene's test*
3. Ketiga, bila data berdistribusi normal ($p>0,05$) dan data bersifat homogen ($p>0,05$), dilakukan *one way ANOVA* yang bertujuan untuk mengetahui perbedaan jumlah ekspresi RANK pada kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan pada proses penyembuhan luka pasca ekstraksi gigi tikus putih galur wistar (*Rattus norvegicus*).



4. Keempat yaitu melakukan *Post Hoc Turkey* menggunakan *Least Significance Differences* (LSD) untuk mengetahui perbandingan rata-rata antar kelompok.
5. Kelima, bila data tidak berdistribusi normal dan tidak homogen, dilakukan uji non parametrik menggunakan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui perbedaan peningkatan jumlah ekspresi RANK antar kelompok.



Skema Prosedur Penelitian



BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil

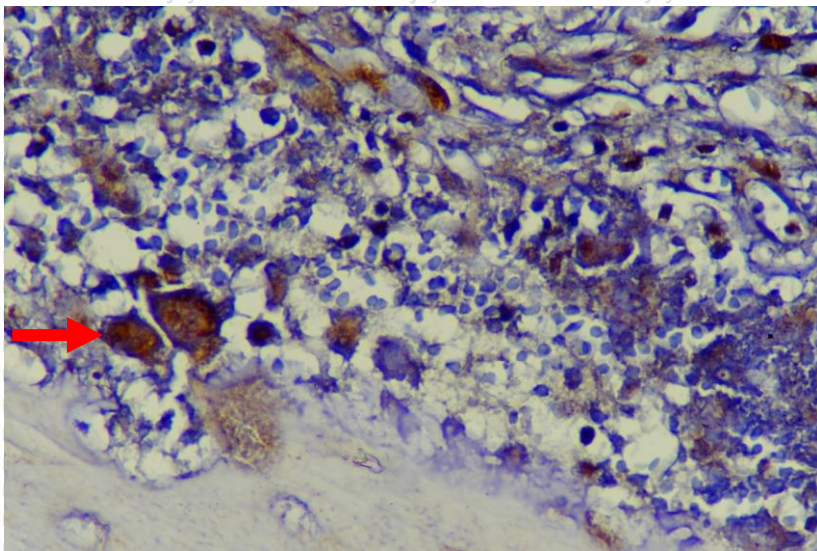
5.1.1 Hasil Penelitian

Pada penelitian ini hewan coba (*Rattus norvegicus*) dibagi menjadi 2 kelompok besar, yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Kelompok kontrol terdiri atas kelompok kontrol 1 (hewan coba tanpa diberi perlakuan pasca pencabutan, selama 3 hari perawatan), kelompok kontrol 2 (hewan coba tanpa diberi perlakuan pasca pencabutan, selama 5 hari perawatan) dan kelompok kontrol 3 (hewan coba tanpa diberi perlakuan pasca pencabutan, selama 7 hari perawatan). Sedangkan kelompok perlakuan diberikan gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) pada soket gigi tikus pasca pencabutan dengan konsentrasi 100%, terdiri dari kelompok perlakuan 1 (hewan coba diberi gelatin ikan patin pada hari ke-1 pasca pencabutan, selama 3 hari perawatan), kelompok perlakuan 2 (hewan coba diberi gelatin ikan patin pada hari ke-1 pasca pencabutan, selama 5 hari perawatan), kelompok perlakuan 3 (hewan coba diberi gelatin ikan patin pada hari ke-1 pasca pencabutan, selama 7 hari perawatan).

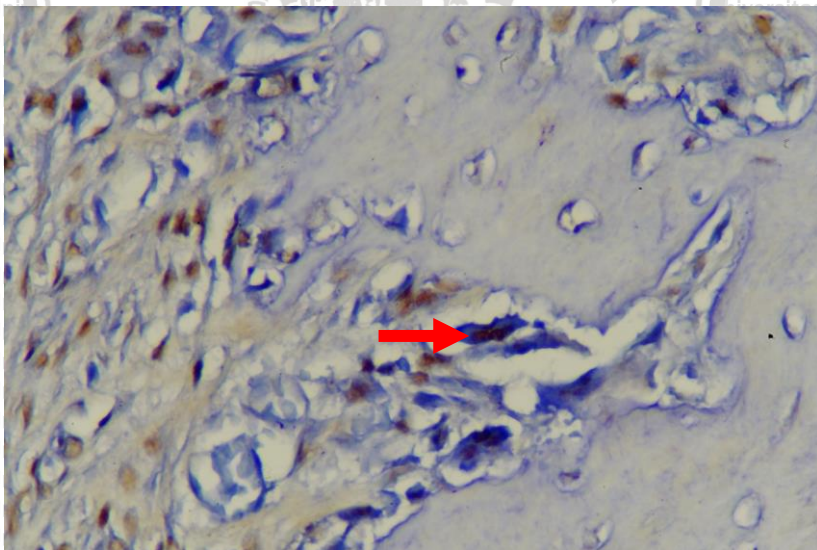
Pada penelitian ini, sampel preparat jaringan tulang soket gigi pasca pencabutan gigi yang telah dilakukan pengecatan imunohistokimia dilakukan pengamatan dan

perhitungan sel untuk mengetahui jumlah ekspresi RANK menggunakan mikroskop cahaya *Olympus CX-21* dengan perbesaran 400x pada 5 bidang lapang pandang yang berbeda.

Pada kelompok kontrol 1 (K1) tanpa diberi gelatin ikan patin pasca pencabutan, selama 3 hari perawatan memiliki rerata ekspresi RANK berjumlah 12,80 dan pada kelompok perlakuan (P1) yang diberi gelatin ikan patin pada soket gigi Insisivus 1 RB di hari ke-1 pasca pencabutan, selama 3 hari kemudian didekaputasi pada hari ke-3 memiliki rata-rata jumlah ekspresi RANK berjumlah 9,20. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah ekspresi RANK pada kelompok K1 memiliki jumlah yang lebih tinggi dibandingkan kelompok P1. Ekspresi RANK berwarna kecoklatan dengan bentuk mononuklear pada sel yang ditunjuk dengan panah merah pada **gambar 5.1** dan **gambar 5.2**

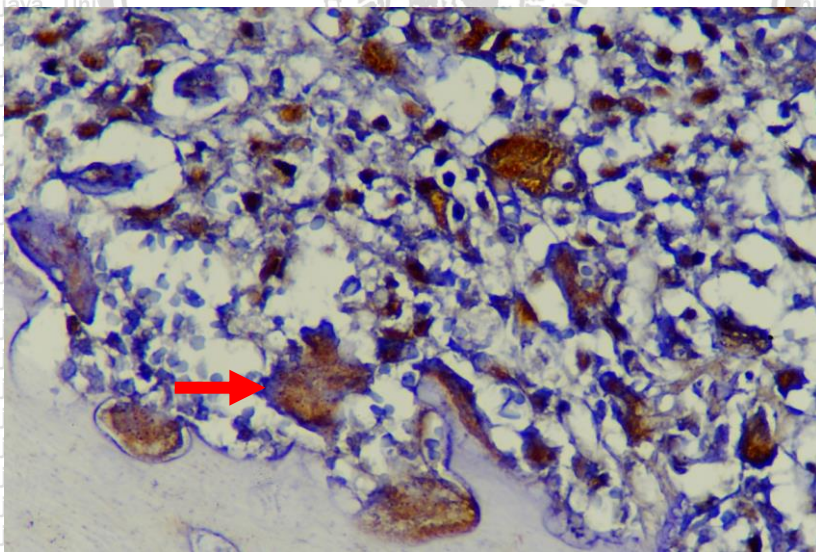


Gambar 5.1. Gambaran Histologi Ekspresi RANK pada Kelompok K1 dengan Pewarnaan Immunohistokimia (Perbesaran 400x).

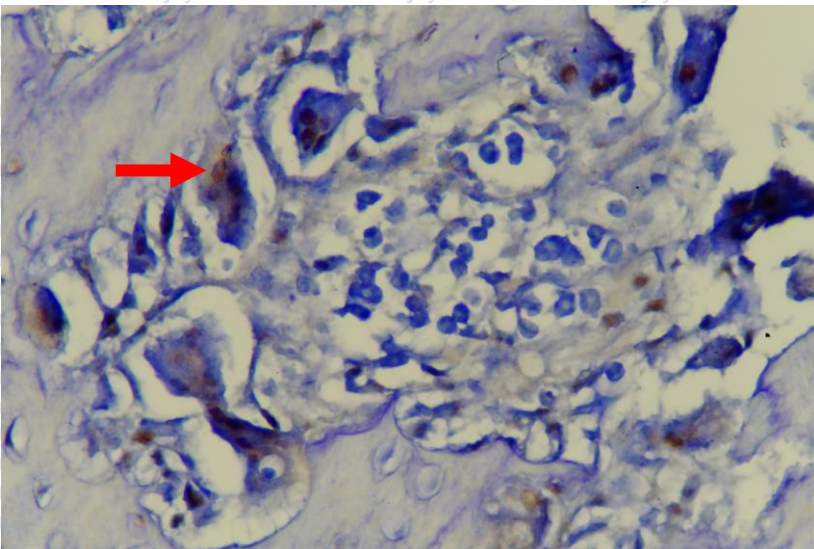


Gambar 5.2. Gambaran Histologi Ekspresi RANK pada Kelompok P1 dengan Pewarnaan Immunohistokimia (Perbesaran 400x).

Pada kelompok kontrol 2 (K2), yaitu kelompok hewan coba yang tanpa diberi gelatin ikan patin pasca pencabutan, selama 5 hari perawatan memiliki rerata ekspresi RANK berjumlah 14,80 dan pada kelompok perlakuan 2 (P2) yang diberi gelatin ikan patin pada soket gigi Insisivus 1 RB di hari ke-1 pasca pencabutan, selama 5 hari perawatan kemudian didekaputasi pada hari ke-5 memiliki rata-rata jumlah ekspresi RANK 7,60. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah ekspresi RANK pada kelompok K2 memiliki jumlah yang lebih tinggi dibandingkan kelompok P2. Ekspresi RANK bewarna kecoklatan dengan bentuk mononuklear pada sel yang ditunjuk dengan panah hitam pada **gambar 5.3** dan **gambar 5.4**.



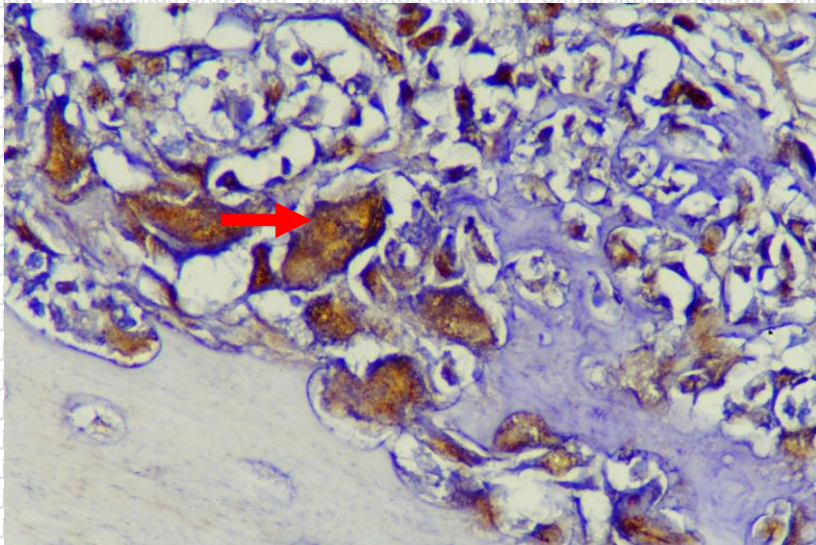
Gambar 5.3. Gambaran Histologi Ekspresi RANK pada Kelompok K2 dengan Pewarnaan Immunohistokimia (Perbesaran 400x).



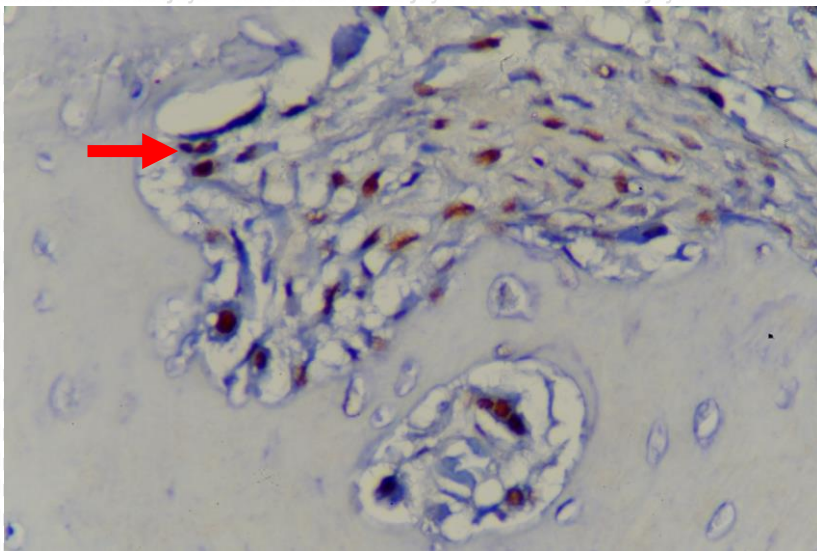
Gambar 5.4. Gambaran Histologi Ekspresi RANK pada Kelompok P2 dengan Pewarnaan Immunohistokimia (Perbesaran 400x).

Rata-rata jumlah ekspresi RANK pada kelompok control 3 (K3), yaitu kelompok hewan coba yang tanpa diberi gelatin ikan patin pasca pencabutan, selama 7 hari perawatan, berjumlah 15,60 dan pada kelompok perlakuan 3 (P3) yang diberi gelatin ikan patin pada soket gigi Insisivus 1 RB di hari ke-1 pasca pencabutan, selama 7 hari perawatan kemudian didekaputasi pada hari ke-7 memiliki rata-rata jumlah ekspresi RANK berjumlah 5,80. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah ekspresi RANK pada kelompok K3 memiliki jumlah yang lebih tinggi dibandingkan kelompok P3. Ekspresi RANK

bewarna kecoklatan dengan bentuk mononuklear pada sel yang ditunjuk dengan panah hitam pada **gambar 5.5** dan **gambar 5.6**.



Gambar 5.5. Gambaran Histologi Ekspresi RANK pada Kelompok K3 dengan Pewarnaan Immunohistokimia (Perbesaran 400x).



Gambar 5.6. Gambaran Histologi Ekspresi RANK pada Kelompok P3 dengan Pewarnaan Immunohistokimia (Perbesaran 400x).

Dari hasil perhitungan ekspresi RANK, didapatkan rata-rata dan standar deviasi untuk setiap kelompok yang tertera dalam tabel 5.1.

Kelompok	Mean	Standar Deviasi
K1 (Kelompok kontrol hari ke-3)	12.80	2.775
P1 (Kelompok perlakuan hari ke-3)	9.20	.447
K2 (Kelompok kontrol hari ke-5)	14.80	2.864
P2 (Kelompok perlakuan hari ke-5)	7.60	1.517
K3 (Kelompok kontrol hari ke-7)	15.60	2.302
P3 (Kelompok perlakuan hari ke-7)	5.80	837

Tabel 5.1 Hasil Perhitungan Rata-rata Jumlah Ekspresi RANK.

Berdasarkan data pada tabel di atas, dapat disimpulkan bahwa jumlah rata-rata ekspresi RANK terendah yaitu pada kelompok P3, sedangkan jumlah rata-rata ekspresi RANK tertinggi yaitu pada kelompok K3. Dalam perbandingan jumlah ekspresi RANK pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, didapatkan jumlah ekspresi RANK mengalami peningkatan pada kelompok kontrol, berbanding terbalik dengan kelompok perlakuan yang mengalami penurunan, seperti pada **gambar 5.7**.

Grafik Rata-rata Ekspresi RANK



Gambar 5.7 Rata-rata Ekspresi RANK pada setiap kelompok

Grafik tersebut menunjukkan bahwa terjadi kenaikan pada kelompok kontrol pada hari ke-3 menuju hari ke-5 sampai hari ke-7, sedangkan pada kelompok perlakuan terjadi penurunan pada hari ke-3 menuju hari ke-5 sampai hari ke-7.

5.1.2 Analisis Data

Data hasil penelitian yang ini berupa perhitungan jumlah ekspresi RANK yang dianalisa secara statistik menggunakan program *Statistical Product of Service Solution* (SPSS) dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha > 0.05$). Langkah analisis statistik yang pertama, yaitu uji normalitas dengan menggunakan uji Shapiro-Wilk karena besar sampel ≤ 50 dan bertujuan untuk menilai sebaran data tersebut berdistribusi normal atau tidak normal. Kedua, dilakukan uji homogenitas ragam untuk mengetahui sebaran data masing-masing kelompok tersebut homogen atau tidak menggunakan *Levene's Test*. Ketiga, bila data berdistribusi normal ($p > 0.05$) dan data bersifat homogen ($p > 0.05$), maka dilakukan uji One Way ANOVA yang bertujuan untuk mengetahui perbedaan ekspresi RANK pada kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Hasil menunjukkan terdapat perbedaan bila nilai signifikansi hasil uji $p < 0.05$ sehingga H_0 ditolak.

Hipotesa penelitian ditentukan sesuai dengan rumusan masalah penelitian, yaitu H_0 diterima apabila nilai signifikansi

(p) > 0.05. H_0 dari penelitian ini adalah pemberian gelatin patin (*Pangasius djambal*) tidak berpengaruh terhadap jumlah ekspresi RANK pada luka pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*), sedangkan H_1 dari penelitian ini adalah pemberian gelatin patin (*Pangasius djambal*) berpengaruh terhadap jumlah ekspresi RANK pada luka pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*). Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan yang bermakna antar kelompok penelitian dilakukan uji *Post Hoc LSD*.

5.1.2.1 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. Berdasarkan uji *Shapiro-Wilk* ini didapatkan nilai signifikansi pengujian normalitas data sebesar 0.089 dan 0.062 yang berarti signifikansi >0.05 sehingga kesimpulan yang didapat adalah data berdistribusi normal.

5.1.2.2 Uji Homogenitas Data

Uji homogenitas data dilakukan menggunakan uji *Levene* yang berguna untuk mengelompokkan data menjadi data parametrik atau non parametrik. Data penelitian dikatakan

homogen apabila nilai signifikansi hasil perhitungan $(p) > 0.05$.

Berdasarkan uji *Levene* ini didapatkan nilai signifikansi pengujian homogenitas data sebesar 0,780 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

5.1.2.3 Uji *One Way ANOVA*

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

Perhitungan menggunakan uji *one way ANOVA* antara kelompok kontrol (K1, K2, dan K3) serta kelompok perlakuan (P1, P2, dan P3) memiliki nilai signifikansi $(p) < 0.05$ yang berarti H_0 ditolak dan H_1 diterima, sehingga kesimpulan yang didapat adalah terdapat perbedaan jumlah ekspresi RANK pada soket yang tidak diberi gelatin Ikan Patin (*Pangasius djambal*) dan yang diberi gelatin Ikan Patin (*Pangasius djambal*) pada proses penyembuhan luka (fase inflamasi, fase awal proliferasi, dan fase puncak proliferasi) pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*).

5.1.2.4 Uji *Post Hoc* LSD

Setelah uji *one way* ANOVA terpenuhi, harus dilakukan uji *Post Hoc* LSD untuk mengetahui perbedaan bermakna antar kelompok penelitian (K1, K2, K3, P1, P2, P3).

Pada uji *post hoc* LSD data penelitian dikatakan berbeda secara bermakna apabila nilai signifikansi (p) < 0.05 pada interval nilai kepercayaan 95% ($\alpha = 0.05$).

Kelompok	Kelompok Pembanding	P
P1	K1	0.088
	K2	0.002*
	K3	0.001*
P2	K1	0.001*
	K2	0.000*
	K3	0.000*
P3	K1	0.000*
	K2	0.000*
	K3	0.000*

Keterangan : * = signifikan

Tabel 5.2 Hasil Uji *Post Hoc* LSD

Hasil uji *Post Hoc* LSD secara keseluruhan terdapat perbedaan rata-rata jumlah ekspresi RANK yang bermakna antar kelompok control yang dibandingkan dengan kelompok

perlakuan pada hari yang sama. Didapatkan hasil uji *Post Hoc* LSD sebagai berikut:

a) Kelompok hari ke-3

Kelompok perlakuan (P1) dan control (K1) hari ke-3 terdapat perbedaan rata-rata jumlah ekspresi RANK yang tidak bermakna dikarenakan nilai signifikansi ($p = 0.088 > 0.05$)

b) Kelompok hari ke-5

Kelompok perlakuan (P2) dan control (K2) hari ke-5 terdapat perbedaan rata-rata jumlah ekspresi RANK yang bermakna dikarenakan nilai signifikansi ($p = 0.000 < 0.05$)

c) Kelompok hari ke-7

Kelompok perlakuan (P3) dan control (K3) hari ke-7 terdapat perbedaan rata-rata jumlah ekspresi RANK yang bermakna dikarenakan nilai signifikansi ($p = 0.000 < 0.05$)

5.2 Pembahasan

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan mengetahui pengaruh pemberian gelatin Ikan Patin (*Pangasius djambal*) terhadap ekspresi RANK pada penyembuhan tulang soket gigi pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*). Pada penelitian ini sampel dibagi menjadi dua kelompok besar yaitu kelompok kontrol (K) yang merupakan kelompok yang tidak ada perlakuan pemberian gelatin ikan patin dan kelompok perlakuan (P) yaitu kelompok dengan perlakuan pemberian gelatin ikan patin pada soket gigi insisivus 1 rahang bawah

tikus putih (*Rattus norvegicus*) sebanyak 0,1ml atau hingga soket gigi tersebut terisi penuh dengan konsentrasi 100%. Pengamatan dalam penelitian ini dibagi menjadi 3 waktu setelah dilakukan dekaputasi, yaitu pada hari ke-3 (K1, P1), hari ke-5 (K2, P2), dan hari ke-7 (K3,P3).

Hasil dari analisis data pada penelitian ini berdasarkan uji One Way Anova terhadap kelompok Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) menunjukkan bahwa ada perbedaan hasil ekspresi RANK pada kelompok perlakuan yang diberi gelatin Ikan Patin (*Pangasius djambal*) dengan kelompok kontrol yang tidak diberi perlakuan pemberian gelatin Ikan Patin (*Pangasius djambal*). Jumlah ekspresi RANK meningkat pada kelompok kontrol (K) dari hari ke-3 menuju hari ke-5 hingga hari ke-7, berbanding terbalik dengan jumlah ekspresi RANK pada kelompok perlakuan yang mengalami penurunan pada hari ke-3 menuju hari ke-5 hingga hari ke-7, hal ini menandakan bahwa terdapat pengaruh dalam pemberian gelatin Ikan Patin (*Pangasius djambal*) terhadap ekspresi RANK dalam penyembuhan tulang soket pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*).

Pada pengamatan yang dilakukan oleh peneliti didapatkan bahwa kelompok kontrol (K) yang tidak diberikan gelatin ikan Patin (*Pangasius djambal*) pasca pencabutan gigi tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) memiliki perbedaan hasil

ekspresi RANK dalam kelompok kontrol ini. Kelompok kontrol 1 (K1) yang telah didekaputasi pada hari ke-3 dan diamati, memiliki rata-rata hasil ekspresi RANK sebesar 12,80, lalu pada kelompok kontrol 2 (K2) yang telah didekaputasi pada hari ke-5 dan diamati, memiliki rata-rata hasil ekspresi RANK sebesar 14,80, dan pada kelompok kontrol 2 (K3) yang telah didekaputasi pada hari ke-7 dan diamati, memiliki rata-rata hasil ekspresi RANK sebesar 15,60. Terdapat peningkatan ekspresi RANK yang signifikan pada K2 dan K3, yang berarti mulai hari ke-3 terdapat aktivitas osteoklas dalam proses resorpsi tulang yang meningkat pada hari ke-5 hingga hari ke-7 pada tulang soket tersebut. Hal ini sesuai dengan pendapat Kyung dkk. (2008) bahwa osteoklas adalah sel yang bertanggung jawab pada proses resorpsi tulang, yang terbentuk dari *haemopoetic stemcell*.

Hasil pengamatan penelitian terdapat perbedaan hasil ekspresi RANK pada kelompok perlakuan (P) yang diberikan gelatin Ikan Patin (*Pangasius djambal*) pasca pencabutan gigi Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) memiliki perbedaan hasil ekspresi RANK. Kelompok kontrol 1 (P1) memiliki rata-rata hasil ekspresi RANK sebesar 9,20, lalu pada kelompok kontrol 2 (P2) memiliki rata-rata hasil ekspresi RANK sebesar 7,60, dan pada kelompok kontrol 2 (P3) memiliki rata-rata hasil ekspresi RANK sebesar 5,80.

Terdapat penurunan ekspresi RANK yang signifikan pada P2 dan P3, yang berarti mulai hari ke-3 terdapat aktivitas osteoklas dalam proses resorpsi tulang dan menurun pada hari ke-5 hingga hari ke-7 pada tulang soket tersebut, menandakan bahwa jumlah RANK yang ada pada soket tersebut semakin berkurang. Hal ini berhubungan dengan proses resorpsi yang segera berakhir dan dimulainya proses remodelling dalam mempercepat penyembuhan tulang soket pasca pencabutan gigi tikus Putih (*Rattus norvegicus*) sehingga dapat mempercepat proses penyembuhan. Hasil penelitian ini selaras dengan teori-teori yang sudah ada sebelumnya, menurut Sugiaman (2011) Kandungan asam amino (arginin, glisin, glutamin) dalam Ikan Patin dapat mempercepat penyembuhan luka. Arginin berperan dalam sistem imun sehingga dapat menurunkan inflamasi, penyembuhan luka, vaskularisasi, dan deposisi kolagen. Glisin dalam protein memiliki peran sebagai bahan pembentuk kolagen dan mempercepat pembentukan pembuluh darah baru (Wang dkk., 2013). Glutamin berfungsi dalam proliferasi sel dan dapat menstimulasi kolagen (Amstrong dkk., 2014). Pengaruh gelatin Ikan Patin terhadap proses remodeling tulang ialah kulit Ikan Patin mengandung kolagen yang berperan sebagai agen pembawa protein yang menginduksi tulang (Hardyanti, 2014).

Terdapat perbedaan hasil pengamatan dari kelompok control (K1, K2, K3) dan kelompok perlakuan (P1, P2, P3). Kelompok K1 menunjukkan adanya perbedaan jumlah ekspresi RANK yang tidak signifikan terhadap kelompok P1 dikarenakan memiliki nilai signifikansi $>0,05$ yaitu 0,088, pada kelompok K2 terdapat perbedaan jumlah ekspresi RANK yang signifikan terhadap kelompok P2 dengan nilai signifikansi $<0,05$ yaitu 0,000 dan juga pada kelompok K3 terdapat perbedaan jumlah ekspresi RANK yang signifikan terhadap kelompok P3 dengan nilai signifikansi $<0,05$ yaitu 0,000.

Secara umum terdapat perbedaan yang berbanding terbalik antara kelompok control dan kelompok perlakuan. Jumlah ekspresi RANK pada kelompok control semakin meningkat pada hari ke-3, hari ke-5, hingga hari ke-7 sedangkan jumlah ekspresi RANK pada kelompok perlakuan semakin menurun pada hari ke-3, hari ke-5, hingga hari ke-7. OPG yang diekspresikan sel osteoblas akan menghambat ikatan RANKL dengan RANK, sehingga tidak terjadi pembentukan sel osteoklas (Heineman, 2010). Berdasarkan penelitian Sandana (2017) pemberian *Stichopus hermanii* yang memiliki kandungan asam amino dapat meningkatkan level OPG dan mengaktivasi aposisi tulang.

Terdapat ekspresi RANK yang signifikan pada hari ke-5 dan hari ke-7. Hal ini selaras dengan penelitian Divilia,

Parwati dan Budi (2016) kombinasi pasta cangkang kerang darah (*Anandara Granosa*) minyak ikan lemuru (*Sardinella Longiceps*) paling efektif terhadap penurunan jumlah osteoklas pada proses *bone repair* pada hari ke-7. Sedangkan dalam penelitian lain yang dilakukan Sularsih dan Soeprijanto (2012), perlakuan pemberian kitosan gel pasca pencabutan gigi tikus putih terbukti dapat menstimulasi pembentukan sel osteoblas pada proses penyembuhan luka pencabutan gigi pada pengamatan hari ke-7 dan ke-14.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan serta didukung dengan teori yang ada, maka dapat dibuktikan bahwa rata-rata ekspresi RANK pada kelompok perlakuan dengan pemberian gelatin Ikan Patin memiliki perbedaan yang signifikan dibandingkan pada kelompok control yang tanpa pemberian gelatin Ikan Patin pada soket pasca pencabutan gigi Tikus Putih. Pada hari yang sama kelompok perlakuan dapat menunjukkan jumlah ekspresi RANK yang semakin menurun sedangkan dengan kelompok control semakin meningkat.

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa hipotesis penelitian dapat diterima karena pemberian gelatin Ikan Patin (*Pangasius djambal*) terbukti berpengaruh terhadap penurunan ekspresi RANK pada tulang soket gigi pasca pencabutan gigi Tikus Putih (*Rattus norvegicus*).

BAB VI PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan mengenai pengaruh pemberian gelatin Ikan Patin (*Pangasius djambal*) terhadap ekspresi RANK pada penyembuhan tulang soket gigi pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*), maka dapat ditarik kesimpulan bahwa:

1. Jumlah ekspresi RANK pada proses penyembuhan tulang soket gigi pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*) tidak diberi gelatin Ikan Patin (*Pangasius djambal*) yang tertinggi berada pada hari ke-7 pada kelompok kontrol (K3), yaitu sebesar 15,60 dan untuk yang terendah berada pada hari ke-3 pada kelompok kontrol (K1), yaitu sebesar 12,80
2. Jumlah ekspresi RANK pada proses penyembuhan tulang soket gigi pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*) diberi gelatin Ikan Patin (*Pangasius djambal*) yang tertinggi berada pada hari ke-3 pada kelompok perlakuan (P1), yaitu sebesar 9,20 dan untuk yang terendah berada pada hari ke-7 pada kelompok perlakuan (P3), yaitu sebesar 5,80
3. Terdapat perbedaan yang bermakna antara ekspresi RANK pada tulang soket gigi pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang tidak diberi gelatin Ikan Patin (*Pangasius djambal*) dan yang diberi gelatin Ikan Patin (*Pangasius djambal*)



dibuktikan dengan adanya peningkatan ekspresi RANK pada kelompok kontrol sedangkan pada kelompok perlakuan terjadi penurunan ekspresi RANK

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 RANK terlebih lagi mengenai *bone reparation* agar dapat dilakukan pengamatan menyeluruh agar dapat dilakukan pengamatan menyeluruh mengenai ekspresi RANK pada penyembuhan luka pada tulang.
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

Ade, R. Y., Suardita, K., dan Agustin, D. W. 2012. Peningkatan Jumlah Osteoklas pada Keradangan Periapikal Akibat Induksi Lipopolisakarida *Porphyromonas* Gingivalis. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga. Surabaya.

Adrianti Ni Komang Tri. 2015. Angka Kejadian Diplopia Pada Pasien Fraktur Maksilofasial di Bangsal Bedah RSUD Arifin Achmad Propinsi Riau Periode Januari 2011-2013.

Agnes Triasih Agustin. 2013. Gelatin Ikan: Sumber, Komposisi Kimia dan Potensi Pemanfaatannya. Manado: Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi.

Amstrong D.G., Hanft J.r., Driver V.R., Smith A.P., Lazaro-Martinez J.L., Reyzelman A.M. 2014. *Research: Treatment Effect of Oral Nutritional Supplement on Wound Healing in Diabetic Food Ulcers: a Prospective Randomized Controlled Trial*. NCBI.

Antonio Nanci. 2008. *Oral Histology*. St. Louis. The CV Mosby Co.

Armitage D, Myers P. 2009. *Rattus norvegicus/ Brown Rat (Also :Norway Rat)*.

Bharti, C. A., Takada, Y., Shishodia, S., dan Aggarwal, B., B. 2003. *Ligand Can*

Suppress Cell Proliferation and Induce Apoptosis Through Activation of a NF- B- Independent and TRAF6- Depent Mechanism. Cytokine Research Section, Departement of Biomunotherapy, The University of Texas.

Booth PW. 2007. *Maxillofacial surgery*. 2nd ed. China: Churchill Livingstone Elsevier

Boyce BF dan Xing L. 2007. *Biology of RANK, RANKL, and Osteoprotegerin. Arthritis Research & Therapy*.

Dewi S. 2011. *Jurus Tepat Budidaya Ikan Patin*. Yogyakarta: Pustaka Baru Press.

Divilia D, Parwati R dan Budi P. 2016. Efektivitas Kombinasi Grafting Cangkang Kerang Darah (*Anadara granosa*) dan Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella Longiceps*) terhadap Penurunan Jumlah Osteoklas pada Proses Bone Repair. Fakultas Kedokteran Gigi. Universitas Hang Tuah. Surabaya.

Fakultas Farmasi UGM. 2010. *Cancer Chemoprevention Research*.

Gustiano. 2003. *Petunjuk Teknis Pembenihan Ikan Patin Indonesia, Pangasius djambal* Penyusun: Jacques Slembrouck, Oman Komarudin, Maskurdan Marc Legendre, ISBN.

Gordon PW. 2013. *Buku Ajar Praktis Bedah Mulut (4th ed)*. Jakarta: EGC

Hardyanti Khadijah. 2014. *Isolasi Kolagen dari Kulit Ikan Patin (Pangasius sp.)*.

Skripsi. Bogor: Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.

Heineman C, Bernhardt A, Lode A, Worch H, Hanke T. 2010. In Vitro Osteoclastogenesis on Textile Chitosan Scaffolds. *Europ Cells Mater Journal*. Europ

Hekta, Widiastuti, Supriadi. 2015. Karakteristik Fisik dan Kimia Gelatin Kulit Ikan Patin (*PangasiusPangasius*) dengan Kombinasi Berbagai Asam dan Suhu. Palembang: Fakultas Pertanian, Universitas Sriwijaya.

Hikmah, N., dan Shita, A., D., P. 2013. Peran RANKL pada Proses Resorpsi Tulang Alveolar Kondisi Diabetes. Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember.

Hofbauer, C., L. and Heufelder E. A. 2000. *The Role of Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand and Osteoprotegerin in The Pathogenesis and Treatment of Metabolic Bone Diseases*. Division of Gastroenterology and Endocrinology, Philipps University. Marburg, Germany.

Ikeda T, Kasai M, Utsuyama M, Hirokawa K. 2001 *Determination of Three Isoforms of The Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand and their Differential Expression in Bone and Thymus*. *Endocrinology*.

Inka J. Fenanlampir, Ni Wayan Mariati, dan Bernat Hutagalung. 2014. Gambaran Indikasi Pencabutan Gigi Bercampur pada Siswa SMP Negeri 1 Lawongan. Program Studi Pendidikan Dokter Gigi. Fakultas Kedokteran. Universitas Sam Ratulangi. Manado.

Innova Biosciences, 2010. *Antibody Labeling*. Biomol. Hamburg. Jerman

Kanazawa Kiyoshi. dan Kudo Akira. 2005. *Self-Assembled RANK Induces Osteoclastogenesis Ligand-Independently*. *Journal of*



Bone and Mineral Research. American Society for Bone and Mineral Research.

Kartika, A.A., Siregar, H.C.H., dan Fuah, A.M. 2013. Strategi Pengembangan Usaha Ternak Tikus (*Rattus norvegicus*) dan Mencit (*Mus musculus*) di Fakultas Peternakan IPB. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

Kresnoadi Utari, Rahayu Retno Pudji, dan Djulaeha Eha. 2014. Aktivitas Expressi Kolagen II dan Osteocalcin Tulang Alveol Akibat Preservasi Soket Pencabutan Gigi Dengan Campuran Aloevera dan Graft 0,5%. Departement Prostodonti. Fakultas Kedokteran Gigi. Universitas Airlangga. Surabaya.

Khosla S. 2001. Minireview : *The OPG/RANKL/RANK system*. Endocrinology.

Kyung TW, Lee JE, Shin HH, Choi HS. 2008. Rutin Inhibits Osteoclast Formation by Decreasing Reactive Oxygen Species and TNF α by Inhibiting Activation of NF κ B, J. Experiment and Molecular medicine.

Mahyuddin Kholish. 2010. *Panduan Lengkap Agribisnis Patin*. Depok: Penebar Swadaya, anggota Ikapi.

Mardiyanoro, Fredy. 2018. *Penyembuhan Luka Rongga Mulut*. Malang. UB Press.

Martha, R. 2006. Analisa Kelayakan Industri Fillet Ikan Patin Beku (*Pangasius hypophthalmus*). Food Science and Technology. Bogor.

Minggawati, I. 2011. Analisa Usaha Pembesaran Ikan Patin Djambal (*Pangasius djambal*). dalam Kolam di Desa Sidomulyo



Kabupaten Kuala Kapuas. Fakultas Perikanan Universitas Kristen Palangka Raya. Palangkaraya. Jurnal khtiologi Indonesia.

Murdoch Marshall. 2016. *E-book Wound Healing*. Wits Donald Gardon Medical Centre.

Nagy, V. & Penninger, J. M. 2015. *The RANKL-RANK Story*. Gerontology.

Nizam F. 2008. Kajian Umur, Pembiakan, Pertumbuhan, dan Saiz Kawasan Rayau Tikus Mondok (*Rattus norvegicus*) di Sekitar Pulau Pinang: Universiti Sains Malaysia.

Nugrahaningsih., Lukiati, B., Sholikah, S., I. dan 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.

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.

Nurrachmawati, F. 2015. Mengenal Gelatin, Kegunaan, dan Pembuatannya. Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan- Kementerian Pertanian Indonesia. Jakarta.

Rahmawati N. 2013. Kandungan protein terlarut daging ikan patin (*PangasiusDjambal*) akibat variasi pakan tambahan. Jember:



Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember.

Ramos-Vara, J.A. 2005. Technical Aspects of Immunohistochemistry. Vet. Pathobiology.

Ratnasari, Yuwono, Nusyarni, dan Widjanarko. 2013. Extraction and Characterization of Gelatin from Different Fresh Water Fishes as Alternative Sources of Gelatin. *International Food Research Journal*.

Raux, S., Amazit, L., Meduri, G., Guiochon, A., Milgrom, E., and Marriette, X. 2002. *RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa- β) and RANK Ligand Are Expressed in Giant Cell Tumors of Bone*. Am J Clin Pathol, American Society for Clinical Pathology.

Santini Daniele, Schiavon Gaia, Vincenzi Bruno, Gaeta Laura, Pantano Francesco. 2011. *Receptor Activator of NF-Kb (RANK) Expression in Primary Tumors Associates with Bone Metastasis Occurrence in Breast Cancer Patients*. Department of Medical Oncology, University Campus Bio-Medico of Rome. Rome, Italy.

Saleh Suparyono, Prahasto Iwan, Mudjosemedi Munakhrir, Ana Ika. 2014. Pengaruh Risedronate Bisphosphonate terhadap Enzim Trap (Eksresi Osteoklas) Di Sekitar Substruktur Implan Gigi Endosseous. *Dentika Dental Journal*. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.

Sandana Ika, Velisia Jessica, Yuniar Alexander, Brahmanta Arya, Prameswari Noengki. 2017. Potensi *Stichopus hermannii* dan *Hyperbaric Oxygen Therapy* untuk Mempercepat Perawatan

Ortodonti. Fakultas kedokteran Gigi. Universitas Hang Tuah. Surabaya

Saputra R. H., Widiastuti Indah, dan Supriadi Agus. 2015. Karakteristik Fisik dan Kimia Gelatin Kulit Ikan Patin (*Pangasius pangasius*) dengan Kombinasi Berbagai Asam dan Suhu. *FishtechH-Jurnal Teknologi Hasil Perikanan*.

Shetty Viviek dan Charles N. B. 2004. Wound Healing dalam *Peterson's Principles of Oral and Maxillofacial Surgery 2nd Edition*. London: BC. Breker Inc.

Setiowati, Kunti Frida dan Nugrahaningsih. 2015. Uji Aktivitas Anti Bakteri Sediaan Salep Kombinasi Gelatin dari Kulit Kaki Ayam dan Ekstrak Daun Binahong Terhadap *Staphylococcus Aureus*. *Jurnal Informasi Kesehatan Indonesia*. Universitas Negeri Malang.

Schuler L. 2006. *Model animals and quantitative genetics*. Makalah Kuliah Umum. Bogor (ID): Fakultas Peternakan IPB.

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

Sugiaman, Vinna K. 2011. Peningkatan Penyembuhan Luka di Mukosa Oral Melalui Pemberian Aloe Vera (Linn). Bandung: Universitas Kristen Maranatha.

Sularsih dan Soeprijanto. 2012. Perbandingan jumlah sel osteoblas pada penyembuhan luka antara penggunaan kitosan gel 1% dan 2% Fakultas Kedokteran Gigi. Universitas Hang Tuah. Surabaya.

- Sitanaya, Rini Irmayanti. 2016. Exodontia (Dasar-Dasar Ilmu Pencabutan Gigi) Ed. 1. Yogyakarta: Deepuplish.
- Pederson GW. 2012. Buku Ajar Praktis Bedah Mulut (Oral Surgery). Jakarta: EGC.
- Pedlar J, John WF. 2007. *Oral and maxillafacial surgery* 2nd edition. China: Churchill Living Stone. Elsevier.
- Peterson L.j., 2003. Contemporary Oral and Maxillofacial Surgery.
- Puspito Ratih Hardhani, dkk. 2014. Pengaruh Penambahan Platelet Rich Plasma pada Bovine Porous Bone Mineral Terhadap Penyembuhan Jaringan Periodontal pada Terapi Poket Infraboni. Fakultas Kedokteran Gigi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Teitelbaum SL. 2007. *Osteoclasts: what do they do and how do they do it?*. Am J. Patho.
- Thakur R, Jain N, Pathak R, and Sandhu SS. (2011). *Practice in Wound Healing Studies of Plants*. Hindawi Publishing Corporation, India.
- Valeria Nardone, Federica D'Asta, Maria Luisa Brandil. 2014. *Pharmacological management of osteogenesis*. University of Florence. Italy.
- Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. 2006. *RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease*. Trends Mol Med.



Wang W., Wu Z., Dai Z., Yang Y., Wang j., Wu G. 2013. *Glycine Metabolism In Animals and Humans: Implications for Nutrition and Health*. NCBI.

Wiksmen LB, Solomonik I, Spira R, Tennenbaum T. 2007. Novel insights into wound healing Sequence of events. *Toxicologic Pathol.*

Wenny Yulvie. 2012. Evaluasi Ekspresi RANKL dan OPG pada Ameloblastoma Tipe Folikular, Tipe Pleksiform dan Tipe Campuran. Fakultas Kedokteran Gigi. Universitas Indonesia. Jakarta.

Wiranti Tika dan Indrawati Veni. 2015. Pengaruh Proporsi Tapioka, Tepung Garut, dan Daging Ikan Patin Terhadap Sifat Organoleptik Kerupuk. *E-journal Boga*.

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. *Jurnal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya*, Malang.

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

Yunaini, L., Suryandari, A. D., Kusdhany, L., Kurniati, M., Reihannisa, I., dan Auerkari, I. E. 2018. *The Role of Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa- β (RANK) and Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa- β Ligand (RANKL) in*

Osteoporosis Risk: Gene Polymorphism and Soluble RANKL Level in Indonesia Post-Menopausal Women. Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, Indonesia University. Jakarta 10430, Indonesia.

Zahara Meilawaty. 2012. Pemberian Ekstrak Metanolik Getah Biduri (*Calotropis gigantea*) Terhadap Ketebalan Epitel Gingiva Tikus Wistar. Departemen Biomedik, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.



