



**PENGARUH GELATIN IKAN PATIN (*Pangasius djambal*)
TERHADAP EKSPRESI RANKL PADA LUKA PASCA
PENCABUTAN GIGI TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)**

**SKRIPSI UNTUK MEMENUHI PERSYARATAN
MEMEPEROLEH GELAR SARJANA**

Oleh:

VIRGINIA CORNELIA RORING

155070401111047

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER GIGI

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2019





HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI

PENGARUH GELATIN IKAN PATIN (*Pangasius djambal*) TERHADAP EKSPRESI RANKL PADA LUKA PASCA PENCABUTAN GIGI TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)

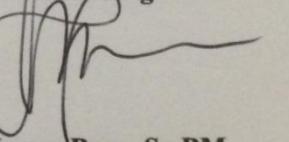
Oleh:

Virginia Cornelia Roring

155070401111047

Telah diujikan di depan Majelis Penguji pada tanggal 14
Februari 2019 dan dinyatakan memenuhi syarat memperoleh
gelar Sarjana dalam bidang Kedokteran Gigi

Menyetujui,
Pembimbing

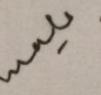


Drg. Irwan Baga, Sp.BM
NIK. 19581213 19701 1 001

Malang, 14 Februari 2019

Mengetahui,

Ketua Program Studi Sarjana Kedokteran Gigi
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya



drg. Yuliana Ratna Kumala, Sp.KG
NIP 198004092008122004



HALAMAN PERSETUJUAN SKRIPSI

**PENGARUH GELATIN IKAN PATIN (*Pangasius djambal*)
TERHADAP EKSPRESI RANKL PADA LUKA PASCA
PENCABUTAN GIGI TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)**

Oleh:

Virginia Cornelia Roring

155070401111047

Menyutujui Untuk Diuji:

Pembimbing

Drg. Irwan Baga, Sp.BM

NIK. 19581213 19701 1 001

PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam naskah skripsi ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu perguruan tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis tuktip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah skripsi ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur plagiasi, saya bersedia skripsi ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh SARJANA dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku (UU No. 20 tahun 2003, Pasal 25 ayat2 dan Pasal 70)

Malang , 29 Januari 2019

Yang menyatakan,

Virginia Cornelia Roring

155070401111047



ABSTRAK

Virginia Cornelia Roring, 155070401111047, Program Studi Sarjana Kedokteran Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Brawijaya, Malang, 28 Januari 2019, "Pengaruh Gelatin Ikan Patin (*Pangasius djambal*) terhadap Ekspresi RANKL pada Luka Pasca Pencabutan Gigi Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)", Tim Pembimbing: drg. Irwan Baga, Sp.BM.

Dalam proses remodeling tulang, RANKL (*Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand*) yang diproduksi oleh osteoblas, merupakan agen yang sangat penting. RANK yang merupakan reseptor dari RANKL diproduksi oleh osteoklas yang pada saat RANKL berikatan dengan reseptornya RANK, maka akan terjadi diferensiasi dan proliferasi osteoklas yang mengakibatkan resorpsi tulang. Gelatin Ikan Patin (*Pangasius djambal*) mengandung banyak asam amino esensial dan yang paling banyak adalah Glisin dan Arginin. Arginin memproduksi *Nitric Oxide* (NO) yang dapat menstimulasi *growth factor*, meningkatkan jumlah ekspresi OPG (*Osteoprotegerin*) dan menurunkan ekspresi RANKL. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) terhadap ekspresi RANKL pada luka pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*). Rancangan yang digunakan pada penelitian ini adalah *Randomized Post Test Only Group Design* di laboratorium secara *in-vivo*. Sampel yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dibagi secara acak menjadi 6 kelompok yaitu kelompok kontrol yang tidak diberi gelatin ikan patin dan kelompok perlakuan yang diberi gelatin ikan patin dan kemudian didekaputasi pada hari ke-3, hari ke-5, dan hari ke-7. Perhitungan ekspresi RANKL menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran kuat (1000x) pada 20 bidang lapang pandang pada perparat histologi dengan perwarnaan immunohistokimia . Jumlah ekspresi RANKL pada kelompok perlakuan mengalami penurunan secara bertahap dan menurun secara signifikan pada hari ke-7. Kesimpulan penelitian ini adalah pemberian gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) berpengaruh terhadap penurunan ekspresi RANKL pada luka pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*).

Kata kunci: RANKL, gelatin ikan patin, arginin, pencabutan gigi

ABSTRACT

Virginia Cornelia Roring, 155070401111047, Dentistry Faculty of Brawijaya University Malang, January 5, 2018, "The Effect of Patin Fish (*Pangasius djambal*) Gelatine to the Expression of RANKL in Wound After White Rat's (*Rattus norvegicus*) Tooth Extraction", Supervisor: drg. Irwan Baga, Sp.BM

RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand) that produced by osteoblasts is a very important agent in bone remodelling process. when RANKL binds to its receptors RANK which made by osteoclasts, osteoclast differentiation and proliferation will occur which induce bone resorption. Patin fish gelatine (*Pangasius djambal*) contains many essential amino acids which contains the most glycine and arginine. Arginine produces Nitric Oxide (NO) which can stimulate growth factors, increase the amount of OPG (Osteoprotegerin) expression and reduce RANKL expression, which will accelerate wound healing. The purpose of this study was to study the effect of patin fish gelatine (*Pangasius djambal*) on RANKL reactions in wounds after tooth extraction of white rats (*Rattus norvegicus*). This study used an experimental laboratory design that used the Random Post Test Only Design Group Design in the laboratory in-vivo. The samples were white mice (*Rattus norvegicus*) which were randomly divided into 6 control groups who were not given patin fish gelatine and the group given patin fish gelatin and then decapitated on 3rd, 5th, and 7th day . The number of RANKL expression on histological preparations with immunohistochemistry (IHC) staining was calculated using a light microscope with strong magnification (1000x) in 20 fields of view. The One Way ANOVA test results in this study indicate the facts shown in the control group and the management group (p value < 0.05).The mean result showed that RANKL expression was gradually decreased in treatment group and significantly decreased at the 7th day treatment group. The conclusion of this study was the patin fish (*Pangasius djambal*) gelatine has effect to decrease the number of RANKL expression in wound after white rat's (*Rattus norvegicus*) tooth extraction.

Key words: RANKL, patin fish gelatin, arginine, tooth extraction

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan atas kehadirat Tuhan yang Maha Esa yang telah memberi petunjuk, rahmat, dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir dengan judul “Pengaruh Gelatin Ikan Patin (*Pangasius djambal*) terhadap Ekspresi RANKL pada Luka Pasca Pencabutan Gigi Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)” dapat diselesaikan tepat pada waktunya. Skripsi ini diajukan untuk memenuhi persyaratan memperoleh gelar sarjana.

Penulis mengucapkan terimakasih yang tak terhingga kepada para pihak yang telah membantu dan membimbing untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis mengucapkan banyak terimakasih kepada :

1. drg. R. Setyohadi, M.S selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya Malang
2. drg. Yuliana Ratna Kumala, Sp.KG selaku Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya
3. drg. Irwan Baga Sp.BM selaku dosen pembimbing utama yang telah meluangkan waktu, tenaga, dengan baik membeberikan arahan, dan masukan serta selalu bisa memotivasi anak didiknya untuk segera menyelesaikan tugas akhir
4. drg. Fredy Mardyantoro, Sp.BM selaku dosen penguji Iyang telah meluangkan waktu, tenaga, dengan baik membeberikan arahan, dan masukan serta kepada penulis sehingga skripsi ini dapat diselesaikan
5. drg. Nenny Prasetyaningrum, M.Ked selaku dosen penguji IIyang telah meluangkan waktu, tenaga, dengan baik membeberikan arahan, dan masukan serta kepada penulis sehingga skripsi ini dapat diselesaikan
6. Segenap anggota Tim Pengelola Tugas Akhir Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya
7. Seluruh dosen dan staff Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya atas segala ilmu dan bantuan yang telah diberikan kepada penulis
8. Mama, Papa, Pingkan, Michelle, Tabita, Oma Tina yang selalu dan tak pernah berhenti mendoakan dan

mengingatkan, memberi semangat, dukungan dan kasih sayang dalam proses penulisan skripsi

9. Rafly Dwi Anggara, yang selalu mendoakan, menghibur, memberi semangat, dukungan dan kasih sayang selama saya kuliah dan selama proses penulisan skripsi
10. Kepada PA Dieng, yang selalu menjadi penghiburan dan selalu memberi doa, semangat dan dukungan dalam penulisan skripsi
11. Teman-teman Bawang (Intan, Adinda, Rima) yang selalu menyemangati dan memberi dukungan dalam penulisan skripsi
12. Grace Leasiwal, selaku sahabat yang selalu menyemangati dan memberi dukungan dalam penulisan skripsi
13. Kak Hanna, yang membimbing, menguatkan dan menyemangati, dalam proses penulisan skripsi
14. Kepada Rini, Felicia, Raras, Sabrina, dan Nieta sebagai teman yang selalu memberi semangat dan dukungan dalam penulisan skripsi
15. Kakak-kakak 2014 seperjuangan Tim Skripsi BM Sukses yang telah membantu kelancaran dalam penulisan skripsi
16. Teman-teman seperjuangan Tim Skripsi BM Sukses (Savira, Dwika, Varellia, Uswa, Abde) yang telah membantu kelancaran dalam penulisan skripsi
17. Seluruh kolega angkatan 2015 (INC15IVE) yang telah memberikan bantuan, doa, dan semangat kepada penulis

Penulis menyadari bahwa penulisan ini masih jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu, penulis dengan senang hati membukadiri untuk kritik yang membangun. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat baik bagi penulis sendiri maupun bagi dunia kedokteran gigi.

Malang, 29 Januari 2019

Penulis

DAFTAR ISI	
Halaman	
Halaman Judul	i
Halaman Pengesahan Skripsi	ii
Pernyataan Orisinalitas Skripsi	iii
Halaman Persetujuan	iv
Abstrak	v
Abstract	vi
Kata Pengantar	vii
Daftar Isi	ix
Daftar Tabel	xii
Daftar Gambar	xiii
Daftar Singkatan	xiv

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.3.1 Tujuan Umum	3
1.3.2 Tujuan Khusus	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.4.1 Manfaat Akademik	4
1.4.2 Manfaat Praktis	4

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pencabutan Gigi	5
2.2 Luka	6
2.2.2 Fase Penyembuhan Luka	6
2.2.3 Fase Inflamasi	7
2.2.4 Fase Proliferasi	7
2.2.5 Fase Remodeling Jaringan	7
2.2.6 Proses Penyembuhan Luka Pasca Pencabutan Gigi	8
2.2 Osteoblas	10
2.3 Ekspresi RANKL	11
2.4 Gelatin	12
2.4.2 Fungsi Gelatin	13
2.4.3 Gelatin Ikan	13

2.5 IkanPatin	13
2.5.3 Kandungan GiziIkan Patin	14
2.6 TikusPutih	15
BAB3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1 Kerangka Konsep	19
3.3 Hipotesis	20
BAB 4. METODE PENELITIAN	
4.1 RancanganPenelitian	21
4.2 SampelPenelitian	22
4.2.1 KriteriaSampel	22
4.2.2 Jumlah Sampel Penelitian	23
4.3 VariabelPenelitian	23
4.4 Tempat danWaktu Penelitian	24
4.5 Alat dan BahanPenelitian	24
4.6 DefinisiOperasional	25
4.7 ProsedurPenelitian	26
4.7.1 Persiapan dan PerawatanHewan Coba	26
4.7.2 Pembuatan GelatinIkan Patin	27
4.7.3 PencabutanGigiTikus	27
4.7.4 Pemberian GelatinIkanPatin	28
4.7.5 Perawatan Tikus PascaPencabutanGigi	28
4.7.6 PengambilanSampelJaringan	29
4.7.7 Teknik Pemrosesan Preparat Jaringan	29
4.7.8 PewarnaanImunohistokimia	29
4.8 Perhitungan Ekspresi RANKL	30
4.9 Analisis Data	31
4.10 SkemaProsedurPenelitian	33
BAB 5. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	
5.1 Hasil	35
5.1.1 Hasil Penelitian	35
5.1.2 Analisa Data	40
5.1.2.1 Uji Normalitas	40
5.1.2.2 Uji Homogenitas Data	41
5.1.2.3 Uji One Way ANOVA	41
5.1.2.4 Uji Post Hoc LSD	42

5.2 Pembahasan	42
BAB 6. PENUTUP	
6.1 Kesimpulan	47
6.2 Saran.....	47
DAFTARPUSTAKA	49
LAMPIRAN	59





DAFTAR TABEL

Halama

Tabel 5.1 Hasil Perhitungan Rata-rata dan Standar Deviasi.....39

Tabel 5.2 Hasil Uji Post Hoc LSD

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 2.1 Peran RANKL & OPG dalam aktivasi osteoklas.....	10
Gambar 2.2 Ekspresi RANKL-positif pada permukaan stroma tulang normal	12
Gambar 2.3 Morfologi Ikan Patin.....	13
Gambar 2.4 Tabel Analisis Hasil Asam Amino dari Berbagai Jenis Ikan Patin.....	14
Gambar 2.5 Tabel Data dan Fisiologis Tikus Putih.....	17
Gambar 3.1 Skema Kerangka Konsep.....	18
Gambar 4.1 Desain Rancangan Penelitian Eksperimen	20
Gambar 4.2 Rumus Federer.....	22
Gambar 4.3 Ekspresi RANKL pada pewarnaan Imunohistokimia	30
Gambar 5.1 Gambaran Histologi Ekspresi RANKL pada Kelompok K1 pada Hari Ke-3	36
Gambar 5.2 Gambaran Histologi Ekspresi RANKL pada Kelompok P1 pada Hari ke-3	36
Gambar 5.3 Gambaran Histologi Ekspresi RANKL pada Kelompok K2 pada hari ke-5	37
Gambar 5.4 Gambaran Histologi Ekspresi RANKL pada Kelompok P2 pada hari ke-5.....	37
Gambar 5.5 Gambaran Histologi Ekspresi RANKL pada Kelompok K3 pada hari ke-7	38
Gambar 5.6 Gambaran Histologi Ekspresi RANKL pada Kelompok P3 pada hari ke-7.....	38
Gambar 5.7 Grafik Rata-rata Jumlah Ekspresi RANKL	39

DAFTAR SINGKATAN

OPG	<i>Osteoprotegerin</i>
RANKL	<i>Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand</i>
BMPs	<i>Bone Morphogenetic Proteins</i>
TGFβ	<i>Transforming Growth Factor-Beta</i>
FGFs	<i>Fibroblast Growth Factors</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
M-CSF	<i>Macrophag Colony-Ctimulating Factors</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
DAB	<i>Diaminobenzidine</i>
PTH	<i>Parathyroid Hormone</i>
RME	<i>Rapid Maxillary Expansion</i>
NO	<i>Nitric Oxide</i>
PRMTs	<i>Posttranslational Modification Mediated by Protein Arginine Methyltransferase</i>
IGF-1	<i>Insulin-like Growth Factor 1s</i>
IL-8	<i>Interleukin 8</i>



ABSTRAK

Virginia Cornelia Roring, 155070401111047, Program Studi Sarjana Kedokteran Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Brawijaya, Malang, 28 Januari 2019, "Pengaruh Gelatin Ikan Patin (*Pangasius djambal*) terhadap Ekspresi RANKL pada Luka Pasca Pencabutan Gigi Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)", Tim Pembimbing: drg. Irwan Baga, Sp.BM.

Dalam proses remodeling tulang, RANKL (*Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand*) yang diproduksi oleh osteoblas, merupakan agen yang sangat penting. RANK yang merupakan reseptor dari RANKL diproduksi oleh osteoklas yang pada saat RANKL berikatan dengan reseptornya RANK, maka akan terjadi diferensiasi dan proliferasi osteoklas yang mengakibatkan resorpsi tulang. Gelatin Ikan Patin (*Pangasius djambal*) mengandung banyak asam amino esensial dan yang paling banyak adalah Glisin dan Arginin. Arginin memproduksi *Nitric Oxide* (NO) yang dapat menstimulasi *growth factor*, meningkatkan jumlah ekspresi OPG (*Osteoprotegerin*) dan menurunkan ekspresi RANKL. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) terhadap ekspresi RANKL pada luka pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*). Rancangan yang digunakan pada penelitian ini adalah *Randomized Post Test Only Group Design* di laboratorium secara *in-vivo*. Sampel yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dibagi secara acak menjadi 6 kelompok yaitu kelompok kontrol yang tidak diberi gelatin ikan patin dan kelompok perlakuan yang diberi gelatin ikan patin dan kemudian didekaputasi pada hari ke-3, hari ke-5, dan hari ke-7. Perhitungan ekspresi RANKL menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran kuat (1000x) pada 20 bidang lapang pandang pada perparat histologi dengan perwarnaan immunohistokimia. Jumlah ekspresi RANKL pada kelompok perlakuan mengalami penurunan secara bertahap dan menurun secara signifikan pada hari ke-7. Kesimpulan penelitian ini adalah pemberian gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) berpengaruh terhadap penurunan ekspresi RANKL pada luka pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*).

Kata kunci: RANKL, gelatin ikan patin, arginin, pencabutan gigi

ABSTRACT

Virginia Cornelia Roring, 155070401111047, Dentistry Faculty of Brawijaya University Malang, January 5, 2018, "The Effect of Patin Fish (*Pangasius djambal*) Gelatine to the Expression of RANKL in Wound After White Rat's (*Rattus norvegicus*) Tooth Extraction", Supervisor: drg. Irwan Baga, Sp.BM

RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand) that produced by osteoblasts is a very important agent in bone remodelling process. when RANKL binds to its receptors RANK which made by osteoclasts, osteoclast differentiation and proliferation will occur which induce bone resorption. Patin fish gelatine (*Pangasius djambal*) contains many essential amino acids which contains the most glycine and arginine. Arginine produces Nitric Oxide (NO) which can stimulate growth factors, increase the amount of OPG (Osteoprotegerin) expression and reduce RANKL expression, which will accelerate wound healing. The purpose of this study was to study the effect of patin fish gelatine (*Pangasius djambal*) on RANKL reactions in wounds after tooth extraction of white rats (*Rattus norvegicus*). This study used an experimental laboratory design that used the Random Post Test Only Design Group Design in the laboratory in-vivo. The samples were white mice (*Rattus norvegicus*) which were randomly divided into 6 control groups who were not given patin fish gelatine and the group given patin fish gelatin and then decapitated on 3rd, 5th, and 7th day. The number of RANKL expression on histological preparations with immunohistochemistry (IHC) staining was calculated using a light microscope with strong magnification (1000x) in 20 fields of view. The One Way ANOVA test results in this study indicate the facts shown in the control group and the management group (*p* value < 0.05).The mean result showed that RANKL expression was gradually decreased in treatment group and significantly decreased at the 7th day treatment group. The conclusion of this study was the patin fish (*Pangasius djambal*) gelatine has effect to decrease the number of RANKL expression in wound after white rat's (*Rattus norvegicus*) tooth extraction.

Key words: RANKL, patin fish gelatin, arginine, tooth extraction

1.1 Latar Belakang

BAB I

PENDAHULUAN

Pencabutan gigi merupakan salah satu tindakan dalam perawatan gigi, yang dapat dilakukan dengan tang (*forceps*), elevator atau pendekatan transalveolar (Pedlar, 2017), yaitu dengan mengambil gigi yang berada dalam soket atau dental alveolus yang berada di dalam tulang alveolar. Pencabutan gigi paling banyak dilakukan karena karies, selain itu oleh karena penyakit periodontal, gigi impaksi dan gigi yang sudah tidak dapat lagi dilakukan perawatan endodontik. Tindakan pencabutan gigi juga dilakukan pada gigi sehat untuk tujuan memperbaiki maloklusi, untuk alasan estetik, dan juga kepentingan perawatan ortodontik atau prostodontik (Ngangi dkk., 2012).

Setelah prosedur pencabutan gigi dilakukan, maka akan terjadi luka dan pada jaringan lunak dan jaringan keras. Luka yang terjadi karena tindakan pencabutan gigi dan atau pembedahan akan mengalami proses penyembuhan secara alami dengan melewati tahap-tahap proses penyembuhan luka. Proses penyembuhan luka terdiri dari beberapa fase yaitu fase hemostatis, fase inflamasi, fase proliferasi dan fase remodeling (Syam dkk, 2015). Proses penyembuhan luka pada tulang alveolar pasca pencabutan gigi mengikuti fase penyembuhan luka pada umumnya tetapi yang membedakan adalah adanya keterlibatan osteoblas dan osteoklas (Hupp, 2013).

Tulang adalah jaringan ikat yang mengandung mineral yang menunjukkan empat jenis sel yaitu: osteoblas, osteoklas, osteosit dan *bone lining cells*. Remodeling tulang merupakan proses yang mengandalkan keseimbangan antara resorpsi tulang oleh osteoklas dan deposisi tulang oleh osteoblas. Osteoblas adalah sel-sel yang memiliki fungsi osteogenik atau jaringan yang berkaitan dengan pembentukan tulang. Osteoklas adalah sel yang berperan untuk menghancurkan matriks tulang, sedangkan osteosit berperan sebagai mekanosensor dan mengawali dari proses remodeling tulang. Sedangkan *bone lining cells* merupakan osteoblas yang berbentuk datar yang melapisi permukaan tulang, fungsi bone lining cells masih belum diketahui secara jelas, tetapi telah dibuktikan bahwa sel-sel ini mencegah terjadinya interaksi langsung antara osteoklas dan matriks

2

tulang bila resorpsi tulang tidak seharusnya terjadi, dan juga berpartisipasi dalam diferensiasi osteoklas, memproduksi osteoprotegerin (OPG) dan *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand* (RANKL) (Andersen, 2009).

RANKL adalah protein yang di produksi oleh sel osteoblas, sel stroma tulang dan oleh sel limfosit T yang teraktivasi dan dapat meningkatkan osteoresorpsi dengan menginduksi ekspresi gen cathepsin K. Osteoprotegerin (OPG) diproduksi oleh sel osteoblas dan sel stroma dan akan mengikat RANKL dan menghambat diferensiasi sel progenitor menjadi osteoblas, serta menunjukkan efek hipokalemik dan antiresoptif (Wang & Zhong, 2013).

Pada proses remodeling tulang, RANKL akan berinteraksi dengan reseptornya yaitu RANK (*Receptor Activator of Nuclear Kappa-B*) yang akan memicu terdiferensiasinya osteoklas. Lalu faktor-faktor yang tersimpan dalam matriks tulang seperti BMPs, TGF β , FGFs yang merekrut osteoblas pada daerah yang direasorbsi akan lepas karena osteoklas meresorpsi tulang. Setelah itu matriks tulang baru akan diproduksi oleh osteoblas dan osteoblas juga akan mendorong mineralisasi dan menyelesaikan proses remodeling tulang.

Dewasa ini, aplikasi gelatin sering digunakan untuk mempercepat proses penyembuhan luka. Gelatin merupakan bahan yang saat ini sering digunakan baik di industri pangan, non pangan maupun farmasi atau medis. Gelatin merupakan protein yang diperoleh dari hidrolisis kolagen kulit dan tulang hewan. Kolagen mempunyai kemampuan antara lain homeostasis, interaksi dengan trombosit, interaksi dengan fibronektin, meningkatkan eksudasi cairan, meningkatkan komponen seluler, meningkatkan faktor pertumbuhan dan mendorong proses fibroplasia dan terkadang pada proliferasi epidermis (Triyono, 2005). Manfaat kolagen pada bidang medis adalah mempercepat pertumbuhan jaringan baru.

Umumnya gelatin diperoleh dari kulit atau tulang dari hewan mamalia, contohnya seperti sapi dan babi. Bahan yang berasal dari babi dapat menimbulkan masalah di negara yang mayoritas penduduknya muslim (Rachmania dkk, 2013). Hal ini yang menjadikan gelatin dari kulit ikan sebagai bahan alternatif untuk mendapatkan gelatin yang halal.

Salah satu jenis ikan yang dapat digunakan adalah ikan patin (*Pangasius djambal*). Ikan patin (*Pangasius djambal*) merupakan ikan yang mengandung protein yang tinggi. Gomez-Guillen et al. (2002) menyebutkan bahwa kekuatan gel yang dihasilkan dari gelatin kulit ikan patin dapat mencapai 200 bloom; oleh karena potensi tersebut maka kulit ikan patin dapat dijadikan sumber alternatif bahan baku pembuatan gelatin.

Berdasarkan uraian di atas, maka peneliti ingin mengetahui pengaruh gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) terhadap ekspresi RANKL pada luka pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang masalah, maka rumusan masalah penelitian adalah sebagai berikut:

- a. Apakah pemberian gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) berpengaruh terhadap ekspresi RANKL pada luka 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 RANKL pada luka pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*).

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini antara lain:

- a. Menghitung ekspresi RANKL pada proses penyembuhan luka pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang tidak diberi gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) pada hari ke-3, ke-5, dan ke-7
- b. Menghitung ekspresi RANKL pada proses penyembuhan luka pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diberi gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) pada hari ke-3, ke-5, dan ke-7
- c. Membandingkan ekspresi RANKL yang tidak diberi gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) dan diberi gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) pada hari ke-3, ke-5, dan ke-7 dalam

proses penyembuhan luka pasca pencabutan 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 RANKL pada luka pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*).

1.4.2 Manfaat Praktis

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



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pencabutan Gigi

2.2 2.1.1 Definisi

Pencabutan gigi atau ekstraksi gigi adalah suatu tindakan pengambilan gigi dari dalam soket tulang alveolar (Howe, 1999). Pencabutan gigi yang ideal adalah pencabutan tanpa rasa sakit satu gigi utuh, atau akar gigi, dengan trauma minimal terhadap jaringan pendukung gigi, sehingga bekas pencabutan gigi dapat sembuh dengan sempurna dan tidak terdapat masalah prsotetik pascaoperasi di masa mendatang (Howe, 1999).

Tindakan pencabutan gigi membutuhkan anamnesa dan pemeriksaan klinis sebelum dilakukan, pencabutan gigi akan meninggalkan kerusakan jaringan, baik jaringan keras maupun lunak. Selain itu juga akan muncul beberapa komplikasi pasca pencabutan gigi, seperti pendarahan, rasa sakit, dan edema (Pedersen, 1996).

2.1.2 Indikasi Pencabutan Gigi

Menurut Rini Sitanaya (2016), indikasi dari pencabutan gigi agar dapat dilakukan, diantaranya adalah gigi dengan karies besar sehingga tidak dapat ditambal atau perawatan lagi, gigi yang sangat goyah karena resorbsi tulang misalnya patologis atau trauma, gigi impaksi, kepentingan ortodontik, gigi yang merupakan fokus infeksi, gigi yang menyebabkan trauma pada jaringan sekitarnya, penderita yang mendapat radiasi pada regio kepala dan leher, dapat menyebabkan kerapuhan gigi, karies pada gigi, dan pada gigi yang sebelumnya sudah rusak bila terkena radiasi dapat menjadi lebih parah, gigi *supernumerary*, gigi dengan fraktur pada akar, gigi dengan sisa akar, gigi dengan frakturpatah pada bagian tulang alveolar, gigi yang terletak pada garis fraktur yang mengganggu reposisi dan keinginan pasien.

2.1.3 Kontraindikasi Pencabutan Gigi

Rini Sinataya (2016) membagi kontraindikasi pencabutan gigi dalam 2 kelompok besar, yaitu kontraindikasi lokal dan sistemik. Kontraindikasi lokal yaitu gigi yang mengalami infeksi gingiva aku, *pericoronitis*, kelainan periapikal seperti abses periapikal, sinusitis maksilaris dan gigi yang berada dalam jaringan tumor. Sedangkan kontraindikasi sistemik adalah Pasien yang membutuhkan pertimbangan khusus untuk dilakukan pencabutan

gigi. Bukan merupakan kontraindikasi mutlak dari pencabutan gigi. Faktor-faktor ini meliputi pasien yang memiliki riwayat penyakit khusus, diantaranya diabetes melitus, kehamilan, penyakit kardiovaskuler, dan kelainan darah.

2.1.3 Luka

2.1.4 Definisi

Menurut Perry & Potter (2006) luka merupakan rusaknya struktur dan fungsi anatomis akibat proses patologis yang berasal dari internal maupun eksternal dan mengenai organ tertentu.

2.1.1 Penyembuhan Luka

Penyembuhan luka adalah proses yang mengembalikan struktur jaringan yang terluka atau terkena penyakit. Proses penyembuhan luka mencakup beberapa aspek yaitu, pembekuan darah, perbaikan jaringan, jaringan parut dan penyembuhan tulang (Fairchild, 1993). Proses penyembuhan luka dibagi dalam 3 fase utama yaitu inflamasi, proliferatif dan remodeling.

2.1.2 Fase Inflamasi

Pada fase inflamasi ini setelah timbulnya luka maka terjadilah vasokonstriksi lokal, pada saat vasokonstriksi lokal ini pendarahan yang ada di dalam luka membeku. Setelah itu vasodilatasi lokal timbul setelah 5-10 menit dan plasma merembes ke jaringan sekitarnya melalui venula kecil. Pada fase ini leukosit polimorfonuklear dan monosit melekat pada endotelium kapiler karena strukturnya semakin kental. Pembersihan sel rusak dan pembekuan darah melalui fagositosis dimulai segera setelah sel berpindah dari kapiler. Karena adanya penyumbatan fibrin pada pembuluh limfe, reaksi inflamasi mula-mula lokal. Dalam waktu 2 hari, perlekatan fibroblas, fibrin dan kolagen muncul karena fibronektin (suatu glikoprotein) yang bertumpuk sehingga dapat menimbulkan reaksi lokalitas permanen (Middleton, 2011).

Enzim intrasel keluar ke ruang ekstrasel oleh sel yang rusak. Vasodilatasi awal dan permeabilitas terjadi sekunder terhadap histamin dari sel mast lalu berakhir sekitar 30 menit. Prostaglandin E₁ dan E₂ menyebabkan respon vaskular yang terlalu lama (sehingga

dihalangi oleh asam asetilsalisilat dan indometasin) (Middleton, 2011)

7

2.1.3 Fase Proliferasi

Fase proliferasi terjadi pada hari ketiga dan berlangsung selama satu minggu setelahnya. Migrasi fibroblast terjadi dan pengendapan matriks ekstraseluler yang baru disintesis akan berperan sebagai pengganti jaringan sementara yang terdiri dari fibrin dan fibronektin akan terjadi pada fase ini. Pembentukan jaringan granulasi sangat berlimpah pada fase proliferasi (Middleton, 2011). Setelah luka terjadi, pada 3 hari pertama fibroblas dan myofibroblas dirangsang di jaringan sekitarnya untuk berproliferasi. Kemudian fibroblas dan myofibroblas bermigrasi ke luka karena adanya faktor-faktor seperti TGF- β dan PDGF yang dilepaskan oleh sel-sel inflamasi dan trombosit. Setelah itu fibroblas berkembang dan menghasilkan protein matriks hyaluronan, fibronektin dan proteoglikan dan prokolagen tipe 1 dan tipe 3. Pada akhir minggu pertama akumulasi matriks ekstraseluler akan mendukung migrasi sel. Setelah itu kolagen disintesis oleh fibroblast yang memegang peran penting dalam pembentukan matriks intraseluler dalam luka. IL-8, IGF-1, dan GM-CFS juga merupakan beberapa dari growth factors yang mengambil peran dalam fase ini. (Werner & Grose, 2002)

2.14 Fase Remodelling

Pada fase remodeling terjadi pengembangan epitel baru dan pembentukan jaringan parut. Sintesis matriks ekstraseluler dalam fase proliferasi dan remodeling dimulai secara bersamaan dengan perkembangan jaringan granulasi. Seiring dengan pematangan matriks intraseluler, ikatan kolagen meningkatkan diameter dan asam hialuronat dan fibronektin terdegradasi (Hunt, 1988) (Baum & Arpey, 2005). Sintesis dan pemecahan kolagen serta remodeling matriks ekstraseluler berlangsung terus menerus dan keduanya cenderung menyeimbangkan ke keadaan stabil sekitar 3 minggu setelah terjadinya luka (Mulder, 2002).

Neutrofil, makrofag dan fibroblas dalam luka memproduksi enzim matriks metaloproteinase, yang berperan untuk degradasi kolagen. Aktivitas neutrofil, makrofag dan fibroblas diatur oleh

faktor-faktor penghambat. Aktivitas inhibitor jaringan metaloproteinase meningkat, memuncak dalam penurunan aktivitas enzim metaloproteinase secara bertahap, sehingga meningkatkan akumulasi matriks baru (Toy, 2005).

Pada tahap akhir fase remodeling, terjadi interaksi fibroblast dengan matriks ekstraseluler yang menyebabkan ukuran jaringan ikat mengecil dan menyusut kemudian tepi luka menyatu atau luka mulai menutup. PDGF, TGF- β dan FGF memegang peran penting dalam proses ini (Clark, 1993) (Pierce, 1991). Ketika luka sembuh, kepadatan fibroblas dan makrofag akan berkurang dengan apoptosis. Kemudian pertumbuhan kapiler berhenti, aliran darah akan menurun dan aktivitas metabolismik pada luka berkurang (Baum, 2005) (Clark, 1993) (Falanga, 1998).

2.14.1 Penyembuhan Luka Pasca Pencabutan Gigi

Penyembuhan luka akibat pencabutan gigi prinsipnya tidak berbeda dengan penyembuhan luka di bagian tubuh lainnya. Menurut Ibsen dan Phelan proses penyembuhan luka pasca pencabutan gigi memiliki 5 tahapan, yaitu:

1. Pembentukan gumpalan darah segera setelah pencabutan gigi
2. Pembentukan jaringan granulasi yang menggantikan gumpalan darah
3. Pembentukan jaringan granulasi oleh jaringan ikat
4. Pembentukan *woven bone*
5. Penggantian *woven bone* oleh trabekula tulang dan remodeling oleh tulang alveoli

Pada saat segera setelah pencabutan, terjadi pendarahan yang pada soket, hal ini akan membantu membersihkan debri keluar dari soket. Kemudian terbentuk bekuan darah yang terdiri dari fibrin, sel darah merah dan platelet beberapa saat setelah pembuluh darah yang rusak mengkerut. Platelet berperan dalam pembekuan darah (Olga dkk., 2009).

Sehari setelah pencabutan, timbul reaksi inflamasi akut yang disebabkan oleh kerusakan jaringan yang terjadi. Kemudian neutrofil berpindah dari mikrosirkulasi ke dalam jaringan yang terluka dan melakukan fagositosis terhadap benda asing dan jaringan nekrotik. Dua hari setelah pencabutan, dalam bentuk makrofag monosit berpindah dari mikrosirkulasi ke daerah luka kemudian melanjutkan

proses fagositosis. Jumlah fibroblas pada jaringan ikat yang terluka meningkat, kemudian akan terjadi pembentukan jaringan kolagen baru dengan menggunakan jala-jala fibrin. Tiga hari setelah pencabutan gigi, di dalam permukaan bekuan darah epitel mulai berproliferasi. Fibroblas juga akan mulai berproliferasi dan masuk ke dalam bekuan darah. Lima hari setelah pencabutan, kedua tepi luka mulai dihubungkan oleh serat kolagen yang tumbuh secara berlebihan. Tujuh hari setelah pencabutan, enzim jaringan akan menghancurkan fibrin. Proliferasi epitel terjadi terus-menerus pada tepi luka dan mulai terlihat adanya pembentukan jaringan tulang pada dasar soket (Olga dkk., 2009).

Setelah dua minggu pencabutan, jaringan menjadi kuat karena jaringan granulasi dan serabutnya telah diremodeling, jaringan baru tampak lebih pucat atau putih pada permukaan luka karena peningkatan jumlah serabut kolagen dan penurunan vaskularisasi, jaringan ini disebut jaringan parut. Proses penyembuhan mencapai tahap akhir setelah satu bulan pencabutan gigi. Proses deposisi dan resorbsi tulang akan terus dilanjutkan sehingga terjadi *remodelling* tulang yang mengisi soket (Anthony dkk., 2013).

2.1.5 Osteoklas

Osteoklas adalah sel multinuklear yang terdiferensiasi, yang berasal dari sel mononuklear dari garis sel induk hematopoietik yang dipengaruhi oleh beberapa faktor. Faktor yang mempengaruhinya adalah *Macrophag colony-stimulating factors* (M-CSF), yang dihasilkan oleh sel mesenkim osteoprogenitor dan osteoblas, dan RANKL yang dihasilkan oleh osteoblas, dan termasuk osteosit dan sel-sel stromal lainnya (Florencio-Silva, dkk., 2015).

M-CSF berikatan dengan reseptornya (cFMS) sebagai prekursor osteoklas, yang merangsang proliferasi dan menghambat apoptosis. RANKL adalah faktor penting dalam osteoklastogenesis dan diekspresikan oleh osteoblas, osteosit, dan sel-sel stromal. RANKL sudah muncul bahkan sebelum ada jejas dan kemudian akan meningkat satu minggu setelah pencabutan gigi (Jung dkk., 2015). Ketika RANKL berikatan dengan reseptornya dalam prekursor osteoklas, terjadilah pembentukan osteoklas. Kemudian ada faktor lain yang disebut osteoprotegerin (OPG), yang diproduksi oleh berbagai sel termasuk osteoblas, sel stroma, dan sel fibroblas.



dari gingiva dan jaringan periodontal, OPG akan berikan dengan RANKL, mencegah interaksi RANK / RANKL yang akan menghambat osteoklastogenesis (Florencio-Silva, dkk., 2015).

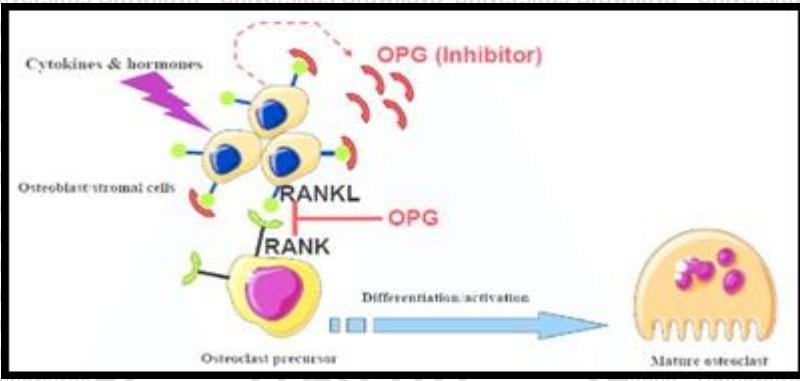
2.2 Osteoblas

Osteoblas adalah sel kuboid yang berada di sekitar permukaan tulang yang diketahui sangat memiliki peran penting dalam pembentukan tulang. Sebagai sel yang terpolarisasi, osteoblas menghasilkan osteoid terhadap matriks tulang (Florencio-Silva, dkk., 2015). Osteoblas memiliki sel yang berbentuk tipis dan datar yang melapisi permukaan tulang yang disebut dengan *bone lining cells*.

Aktivitas sekresi bone lining cell tergantung pada keadaan fisiologis tulang, fungsi sel-sel ini mencegah interaksi langsung antara osteoklas dan matriks tulang agar tidak terjadinya resorpsi tulang. Bone lining cell juga berperan dalam diferensiasi osteoklas, menghasilkan osteoprotegerin (OPG) dan aktivator reseptor faktor nuklir kappa-B ligan (RANKL) (Florencio-Silva, dkk., 2015).

Pada proses resorpsi osteoklastik terjadi dalam tulang matriks tulang melepaskan TGF- β dan IGF-1 yang berperan dalam aktivitas osteoblas seperti ekspresi RANKL dan migrasi sel (Tang, dkk., 2009) (Xian, dkk., 2012).

Gambar 2.1 Peran RANKL & OPG dalam aktivasi osteoklas



(Bilal, dkk., 2015)

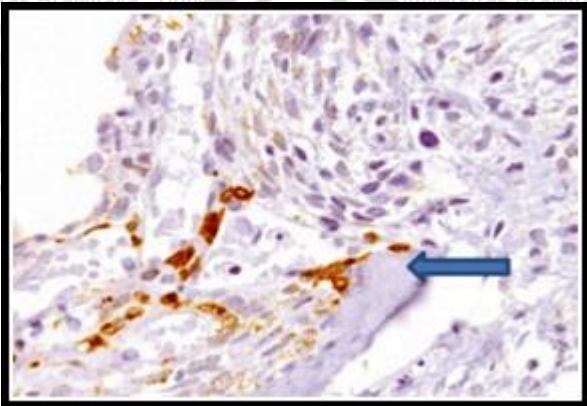
2.3 Ekspresi RANKL

RANKL adalah protein transmembran homotrimerik tipe II yang diekspresikan sebagai protein yang terikat dengan membran dan juga sebagai hasil dari sekresi protein, yang berasal dari membran yang menjadi hasil pembelahan proteolitik. Ekspresi RANKL dirangsang dalam sel osteoblas/stroma oleh sebagian besar faktor yang diketahui untuk merangsang pembentukan dan aktivitas osteoklas. RANKL, seperti *Tumor Necrosis Factor* (TNF), menstimulasi pengeluaran progenitor immatur menuju sistem sirkulasi. Selanjutnya, RANKL menginduksi aktivasi osteoklas serta meregulasi rekrutmen progenitor sebagai bagian dari proses homeostasis dan pertahanan host, serta menghubungkan proses remodeling tulang dengan regulasi hematopoiesis (Boyce BF, dkk., 2007).

Resorpsi tulang alveolar diperankan oleh sel osteoklas. Differensiasi dan aktivasi osteoklas salah satunya di perankan oleh RANKL yang merupakan TNF. RANKL sudah muncul bahkan sebelum ada jejas dan kemudian akan meningkat satu minggu setelah pencabutan gigi (Jung dkk., 2015). RANKL akan berikan dengan *Receptor Activator of Nuclear Factor κ B* (RANK) untuk menstimulasi differensiasi dan aktivasi osteoklas. RANK merupakan reseptor dari RANKL yang diekspresikan oleh sel progenitor osteoklas (Boyle, dkk., 2003). RANKL dan reseptor RANK berperan pada pembentukan dan fungsi dari osteoklas

(Matsuo K dan Irie N., 2008). RANKL di produksi oleh sel-sel stromal sumsum tulang serta membran yang mengelilingi osteoblas. Osteoprotegerin (OPG) merupakan membran yang mengelilingi dan mensekresi protein yang melekat pada RANKL untuk menghambat perannya terhadap reseptor RANK (Cohen MM., 2006).

Gambar 2.2 Ekspresi RANKL-positif pada permukaan stroma tulang normal



(Daniel, dkk., 2015)

Pada pewarnaan immunohistokimia RANKL dapat dilihat dengan sitoplasma yang berwarna coklat.

2.4 Gelatin

2.4.1 Definisi

Gelatin adalah senyawa turunan kolagen yang terdapat pada kulit, tulang dan jaringan ikat hewan yang dihidrolisis dengan asam atau basa (Tazwir dkk., 2009). Penggunaan gelatin sangat luas dalam bidang industri pangan, non pangan dan farmasi. Umumnya gelatin diperoleh dari tulang atau kulit hewan mamalia, seperti sapi dan babi (Rachmania dkk., 2013). Gelatin memiliki sifat yang khas, yaitu berubah secara reversibel dari bentuk sol (koloid) ke bentuk gel, mengembang dalam air dingin, dapat membentuk film serta mempengaruhi viskositas suatu bahan (Parker, 1982).



Kolagen memegang peranan yang sangat penting pada setiap tahap proses penyembuhan luka. Kolagen mempunyai kemampuan antara lain homeostasis, interaksi dengan trombosit, interaksi dengan fibronektin, meningkatkan eksudasi cairan, meningkatkan komponen seluler, meningkatkan faktor pertumbuhan dan mendorong proses fibroplasia dan terkadang pada proliferasi epidermis (Triyono, 2005). Menurut Junianto, 2006 gelatin dihasilkan dari kolagen yang terdapat dalam tulang dan kulit yang kalau diperlakukan asam atau alkali dengan metode ekstraksi dapat menyebabkan kolagen tersebut dapat dikonversikan menjadi gelatin. Gelatin mengandung protein yang sangat tinggi dan kaya akan asam amino yang dapat mempercepat proses penyembuhan luka.

2.4.2 Fungsi

Kolagen sangat berperan penting dalam penyembuhan luka karena adanya molekul bioaktif yang dilepas oleh kolagen. Ikatan molekul pada kolagen cepat dalam mengirimkan molekul terapeutik pada luka sehingga mempercepat penyembuhan luka dan regenerasi jaringan (Sayani dkk., 2014). Protein dari kolagen merupakan komponen serat utama dalam kulit, tulang, tendon, tulang rawan dan gigi. Reseptor pada protein kolagen dipicu oleh molekul kecil spesifik seperti asetilkolin yang berperan dalam transmisi impuls saraf pada sinap yang menghubungkan sel-sel saraf dan pengaturan pertumbuhan dan diferensiasi (Katili, 2009).

2.4.3 Gelatin ikan

Gelatin ikan adalah hasil hidrolisa protein yang terdapat pada tulang dan kulit ikan, mudah dicerna oleh tubuh manusia. Mempunyai sifat yang rendah kalori, protein tinggi, serta bebas kandungan gula. Gelatin dapat diaplikasikan dengan mudah untuk keperluan industri pangan, farmasi dan fotografi (Agustin, 2013).

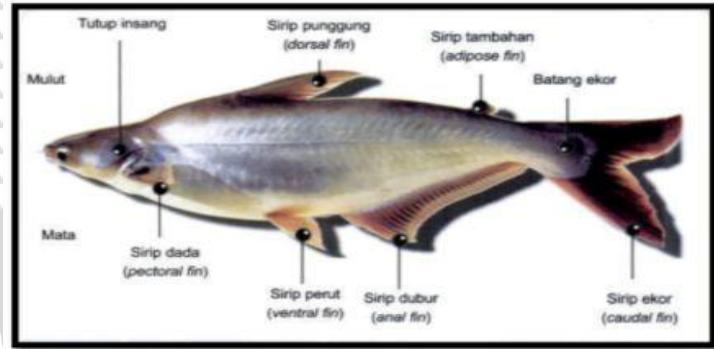
2.5 Ikan Patin

2.5.1 Definisi

Ikan Patin (*Pangasius djambal*) merupakan jenis patin lokal yang banyak terdapat pada beberapa sungai besar di Sumatera dan Kalimantan. Keunggulan patin jambal terletak pada ukuran tubuhnya yang besar dan warna dagingnya putih, sehingga disukai oleh pasar

ekspor (Khairuman dkk., 2008). Patin merupakan jenis kelompok ikan lele (*catfish*) yang menjadi salah satu komoditas ikan air tawar yang mudah dibudidayakan dan memiliki sifat ekonomis yang tinggi. Budidaya ikan patin 14elative mudah, dapat hidup dan tumbuh pada kolam yang airnya tergenang atau tidak mengalir serta rendah oksigen (Mahyudin Kholis, 2010).

Gambar 2.3Morfologi Ikan Patin



Gambar 1. Morfologi ikan patin. (Mahyuddin, 2010)

(Mahyuddin, 2010)

2.5.2 Klasifikasi

Berdasarkan klasifikasinya taksonomi ikan patin dijabarkan sebagai berikut (Mahyuddin Kholis, 2010):

Filum : Chordata

Kelas : Pisces

Sub kelas : Teleostei

Ordo : Ostariophysi

Subordo : Siluroidea

Famili : Pangasidae

Genus : Pangasius

2.5.3 Kandungan

Menurut Khairuman dan Sudenda 2002, kandungan gizi dari ikan patin adalah 68,6% protein, 5,8% lemak, 3,5% abu dan 51,3% air. Dagingnya pun rendah sodium sehingga sangat cocok bagi orang



yang diet garam, mudah dicerna oleh usus serta mengandung kalsium, zat besi dan mineral yang sangat baik untuk kesehatan (Hernowo, 2001). Ikan patin mengandung protein yang sangat tinggi. Kualitas suatu protein dapat dinilai dari perbandingan asam-amino yang menyusun protein tersebut.

Gambar 2.4 Tabel hasil analisis asam amino dari berbagai jenis ikan patin.

Asam Amino/Amino Acid	Siam (%)	Jambal (%)	Pasupati (%)	Nasutus (%)	H. Nasutus (%)
Glisin/Glycine	25.12	24.70	21.00	24.30	21.30
Alanin/Alanine	3.80	3.30	2.80	3.10	3.10
Valin/Valine	3.20	2.20	3.30	2.30	3.30
Leusin/Leusine	5.40	2.70	2.90	2.30	3.00
Isoleusin/Isoleusine	3.40	2.40	2.90	2.40	2.50
Asam Aspartik/Aspartic Acid	0.30	6.50	6.50	6.80	7.30
Asam Glamat/Glutamic Acid	5.10	9.90	10.00	10.60	10.90
Lisin/Lysine	10.70	10.30	10.20	10.30	10.30
Arginin/Arginine	15.00	16.30	15.60	15.90	15.50
Histidina/Histidine	2.62	1.00	0.60	1.10	0.90
Serini/Serine	4.40	2.50	2.40	2.60	2.50
Treonini/Threonine	7.20	2.80	2.90	3.30	3.20
Penilalanin/Phenylalanine	2.60	4.00	4.20	4.30	4.50
Tirozin/Tyrosine	2.30	1.65	2.00	2.20	1.90
Sistin/Cystein	-	-	-	-	-
Metionin/Methionine	2.00	3.70	3.90	4.10	4.10
Prolin/Proline	3.30	2.30	2.20	2.80	2.10
Asam Amino Esensial/Essencial Amino Acid	52.13	45.44	46.80	45.97	47.26
Asam Amino non Esensial/Non Essencial Amino Acid	43.32	50.85	44.70	52.40	49.10

(Suryaningrum, dkk., 2010)

Ikan patin mengandung kadar protein yang cukup tinggi dan mengandung semua asam amino esensial serta mengandung lisin dan arginin yang lebih tinggi dibandingkan dengan protein susu dan daging (Suryaningrum, dkk., 2010). Arginin menghasilkan *Nitric Oxide* atau (NO) atau nitrogen monoksida. Pada beberapa penelitian yang dilakukan didapati bahwa arginin menstimulasi pelepasan *growth factor*, seperti IGF-1, yang dapat mempercepat penyembuhan luka (Alexander, 2014).

2.6 Tikus Putih

2.6.1 Definisi

Tikus putih merupakan tikus yang sering digunakan untuk penelitian di laboratorium dan memiliki namailmiah *Rattus norvegicus*. Hewan ini termasuk hewan nokturnal dan sosial. Temperatur 19° C hingga 23°C dengan kelembaban 40-70% merupakan temperatur yang cocok untuk habitat tikus (Wolfenshon dan Lloyd, 2013).

2.6.2 Klasifikasi

Klasifikasi tikus putih (*Rattus norvegicus*) menurut Myres dan Armitage 2004:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Sub Ordo	: Sciurognathi
Famili	: Muridae
Subfamili	: Murinae
Genus	: Rattus
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>
Galur/strain	: Sprague/Dawley

2.6.3 Ciri Tikus Putih

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) atau yang dikenal dengan nama lainnya yaitu tikus norwegia adalah hewan penggerat yang cukup besar, kuat, memiliki bulu yang kasar yang berwarna keabuan atau kecoklatan. Memiliki ekor panjang yang berambut kasar. Bagian bawah dan kaki tikus putih atau tikus norwegia ini berwarna abu-abu hingga keputihan. Spesies ini sering digunakan dalam penelitian di laboratorium dalam berbagai bidang penelitian seperti biologi dan medis, termasuk genetika, fisiologi, imunologi, epidemiologi, dan patologi (Linsey & Brecht, 2006). Berikut adalah data fisiologi tikus putih menurut Wolfenshon dan Lloyd (2013):

Nilai Fisiologis**Kadar**

Berat tikus dewasa	Jantan 450 - 520g Betina 250 - 300 g
Kebutuhan makan	5 - 10g/100g berat badan
Kebutuhan minum	10 ml/100 g berat badan
Jangka hidup	3 - 4 tahun
Temperatur rektal	36°C - 40°C
Detak Jantung	250 - 450 kali / menit
Tekanan Darah	
Sistol	84 - 134 mmHg
Diastol	60 mmHg
Laju pernafasan	70 - 115 kali / menit
Serum protein (g/dl)	5.6 - 7.6
Albumin (g/dl)	3.8 - 4.8
Globulin (g/dl)	1.8 - 3
Glukosa (mg/dl)	50 - 135
Nitrogen urea darah (mg/dl)	15 - 21
Kreatinin (mg/dl)	0.2 - 0.8
Total bilirubin (mg/dl)	0.2 - 0.55
Kolesterol (mg/dl)	40 - 130

(Wolfenshon & Lloyd, 2013)

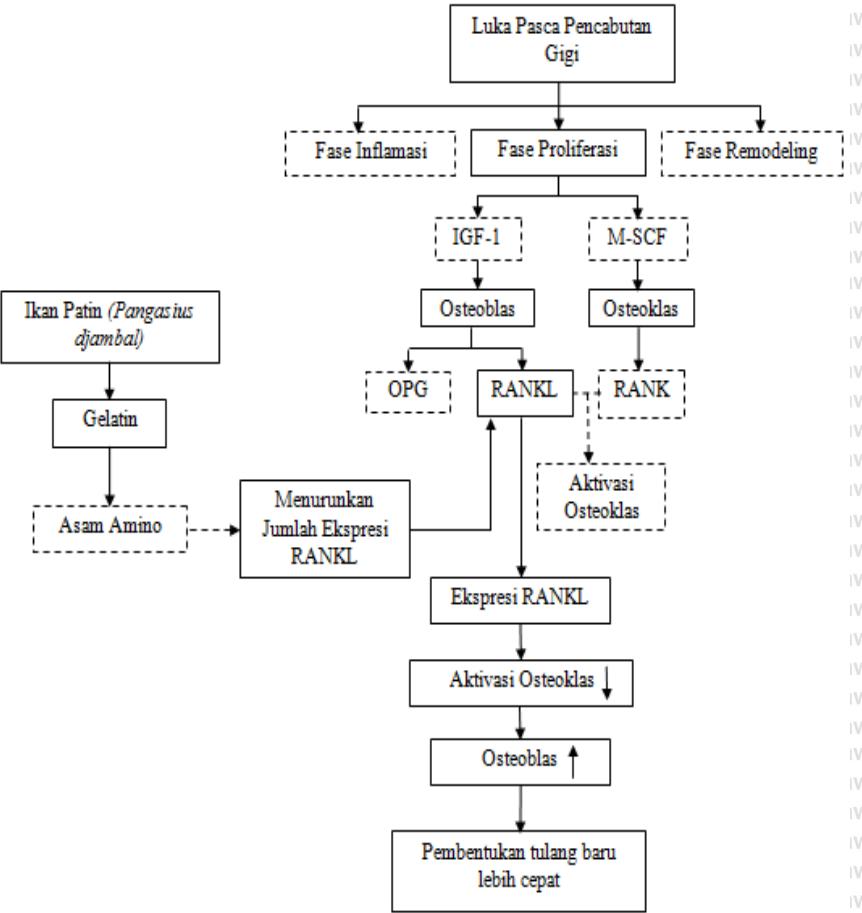




KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS SEMENTARA

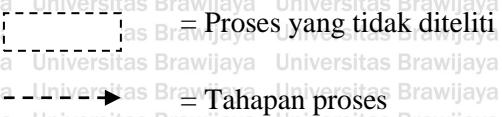
3.1 Kerangka Konsep

Gambar 3.1 Skema Kerangka Konsep



Keterangan:

= Proses yang diteliti



3.2 Deskripsi Kerangka Konsep Penelitian

Pada luka pasca pencabutan gigi akan terjadi tiga fase penyembuhan utama yaitu fase inflamasi, fase proliferasi dan fase remodeling. Pada fase inflamasi terjadi saat setelah timbulnya luka. Kemudian pada hari ketiga terjadilah fase proliferasi. Pada fase proliferasi ini IGF-1 dan M-SCF yang merupakan growth factors akan meregulasi aktivasi dari osteoblas dan osteoklas.

Osteoblast kemudian memproduksi RANKL dan OPG sebagai komponen penting dalam penyembuhan jaringan keras. RANKL nantinya akan berikatan dengan reseptornya yaitu RANK yang didiferensiasi oleh osteoklas, kemudian terjadi lah aktivasi yang akan menjalankan fungsinya dalam meresorpsi tulang yang rusak atau jaringan nekrotik. Sementara OPG akan mengikat RANKL agar tidak berikatan atau mencegah RANKL berikatan dengan reseptornya yaitu RANK.

Gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) merupakan hasil hidrolisa protein yang didapat dari kulit ikan patin (*Pangasius djambal*). Gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) memiliki kandungan asam amino yang sangat tinggi.

Asam amino yang ada dalam kandungan gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) akan menurunkan jumlah RANKL. Jumlah RANKL yang menurun akan menurunkan jumlah osteoklas yang teraktivasi jika aktivasi osteoklas menurun maka jumlah osteoblas meningkat atau semakin banyak. Saat jumlah osteoblas semakin banyak, pembentukan tulang yang baru jadi lebih cepat.

3.3 Hipotesis Penelitian

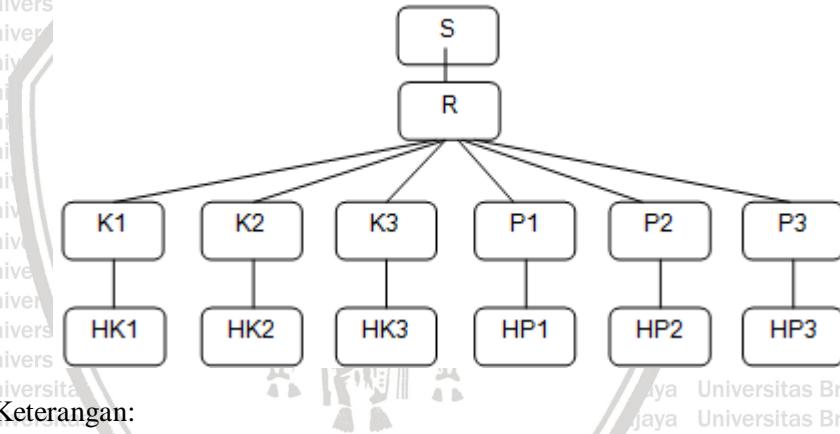
Hipotesis dari penelitian ini adalah gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) dapat menurunkan ekspresi *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand*(RANKL) pada luka pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*).



4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan pada penelitian ini adalah rancangan eksperimental laboratoris. Untuk mengetahui pengaruh gelatin ikan patin terhadap ekspresi *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand* (RANKL) pada luka pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*) maka digunakan rancangan penelitian *Randomized Post Test Only Group Design* di laboratorium secara *in vivo*.

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



Keterangan:

S: Sampel

R: Sampel yang dipilih secara acak (*random*)

K1: Kelompok kontrol 1 tanpa diberi gelatin ikan patin setelah 3 hari pasca pencabutan gigi

K2: Kelompok kontrol 2 tanpa diberi gelatin ikan patin setelah 5 hari pasca pencabutan gigi

K3: Kelompok kontrol 3 tanpa diberi gelatin ikan patin setelah 7 hari pasca pencabutan gigi

P1: Kelompok perlakuan 1 diberi gelatin ikan patin dengan konsentrasi 100% setelah 3 hari pasca pencabutan gigi

P2: Kelompok perlakuan 2 diberi gelatin ikan patin dengan konsentrasi 100% setelah 5 hari pasca pencabutan gigi

P3: Kelompok perlakuan 3 diberi gelatin ikan patin dengan konsentrasi 100% setelah 7 hari pasca pencabutan gigi

HK1: Hasil pengamatan kelompok kontrol 1 tanpa diberi gelatin ikan patin setelah 3 hari pasca pencabutan gigi

HK2: Hasil pengamatan kelompok kontrol 2 tanpa diberi gelatin ikan patin setelah 5 hari pasca pencabutan gigi

HK3: Hasil pengamatan kelompok kontrol 3 tanpa diberi gelatin ikan patin setelah 7 hari pasca pencabutan gigi

HP1: Hasil pengamatan kelompok perlakuan 1 diberi gelatin ikan patin dengan konsentrasi 100% selama 3 hari pasca pencabutan gigi

HP2: Hasil pengamatan kelompok perlakuan 2 diberi gelatin ikan patin dengan konsentrasi 100% setelah 5 hari pasca pencabutan gigi

HP3: Hasil pengamatan kelompok perlakuan 3 diberi gelatin ikan patin dengan konsentrasi 100% setelah 7 hari pasca pencabutan gigi

4.2 Sampel Penelitian

Hewan coba yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih strain wistar yang dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Keunggulan tikus putih dibandingkan tikus liar antara lain lebih cepat dewasa, tidak memperlihatkan perkawinan musiman, dan umumnya lebih cepat berkembang biak. Kelebihan lainnya sebagai hewan laboratorium adalah sangat mudah ditangani, dapat ditinggal sendirian dalam kandang asal dapat mendengar suara tikus lain dan berukuran cukup besar sehingga memudahkan pengamatan (Smith & Mangkoewidjojo, 1988).

4.2.1 Kriteria sampel

Sampel yang dipilih berdasarkan ketentuan (Oroh, et al, 2015):

Kriteria Inklusi:

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

Kriteria Ekslusi:

- a. Tikus yang mengalami sepsis selama penelitian berlangsung

- b. Tikus yang mengalami penurunan berat badan secara drastis jika dibandingkan dari awal penelitian hingga saat akan didekaputasi (<250-300 gram)
- c. Tikus yang mati selama penelitian berlangsung
- d. Tikus yang mengalami pencabutan gigi yang tidak sempurna

4.2.2 Jumlah Sampel Penelitian

Hewan coba dikelompokkan menjadi 6 kelompok, yaitu 3 kelompok kontrol negatif (K1, K2, K3) dan 3 kelompok eksperimen (P1, P2, P3). Dalam menghitung jumlah sampel digunakan Rumus Federer, sebagai berikut yang terlihat pada **gambar 4.2.**

Gambar 4.2 Rumus Federer

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

Keterangan:

t = Jumlah kelompok

n = Jumlah pengulangan penelitian

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

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

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

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Penelitian ini menggunakan minimal 4 ekor tikus putih untuk tiap kelompok. Pada penelitian ini dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan, sehingga dibutuhkan 24 ekor tikus putih. Jumlah sampel ditambah menjadi 30 ekor tikus putih untuk mengurangi *lost of sample* akibat adanya tikus yang mati.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pemberian gelatin ikan patin

4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah ekspresi *Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand* (RANKL).





4.3.3 Variabel Kendali

Variabel kendali pada penelitian ini adalah usia, jenis kelamin, berat badan, kesehatan hewan coba, teknik luka pada tubuh hewan coba, serta aplikasi gelatin ikan patin pada hewan coba.

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

4.4.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan ± 3 bulan dengan rincian sebagai berikut:

- a. Pembuatan gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) dilakukan di Laboratorium Fakultas Teknologi Hasil Pangan Universitas Brawijaya.
- b. Pemeliharaan dan perlakuan pada hewan coba dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
- c. Pembuatan preparat penelitian histologi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
- d. Pengecatan imunohistokimia *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand* (RANKL) di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- e. Pengamatan sediaan dan analisis data dengan menghitung ekspresi *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand* (RANKL) dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

4.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan selama ± 3 bulan.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Gelatin Ikan Patin

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



4.5.2 Alat dan Bahan untuk Pencabutan Gigi Tikus Putih

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

4.5.3 Alat dan Bahan untuk Perlakuan

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

4.5.4 Alat dan Bahan untuk Pengambilan Jaringan dan Pembuatan Preparat

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

4.5.5 Alat dan Bahan untuk Pewarnaan Imunohistokimia Indirek

Blok parafin yang sudah tersedia di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, *xylene*, etanol, *peroxidase blocking solution*, *prediluted blocking serum*, antibodi monoklonal (anti rat- RANKL), *phosphate buffer saline*, antibodi sekunder (*conjugated to horse radish peroxidase*), peroksidase, keomogen DAB (*Diaminobenzidine*), *hematoxylin eosin*, air, *mounting media*, *coverslip*.

4.6 Definisi Operasional

4.6.1 Gelatin Ikan Patin

Gelatin ikan patin adalah hasil hidrolisa protein yang terdapat pada tulang dan kulit ikan patin, mudah dicerna oleh tubuh manusia. Teknik yang digunakan dalam pembuatan gelatin ikan patin adalah teknik komersial tanpa proses pengeringan. Konsentrasi gelatin ikan yang akan dibuat pada penelitian ini sebesar 100%

4.6.2 Pencabutan Gigi

Pencabutan gigi merupakan suatu prosedur bedah yang dapat dilakukan dengan tang (*forceps*), elevators atau pendekatan transalveolar (Pedlar, 2017). Pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*) akan dilakukan pada gigi insisivus satu kiri rahang bawah.

4.6.3 Soket

Soket pada penelitian ini adalah kavitas tulang alvolar rahang bawah tempat melekatnya gigi insisivus satu rahang bawah pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dipotong pada bagian mesial secara vertikal untuk dijadikan preparat histologi penelitian.

4.6.4 Ekspresi Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand (RANKL)

Ekspresi RANKL diamati dengan pewarnaan imunohistokimia dan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x pada 20 bidang lapang pandang menggunakan Olympus CX-21 dengan program optilab. Identifikasi ekspresi RANKL dapat dilihat dan ditentukan dari nukleus atau inti sel dan sitoplasma RANKL yang berwarna coklat (Barreiros, 2018).

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan dan Perawatan Hewan Coba

- a. Pemeliharaan hewan coba berdasarkan kriteria sampel. Kemudian hewan coba yang telah dipilih dikelompokkan menjadi 6 kelompok, setiap kelompok terdiri dari 4 ekor tikus putih.
- b. Kemudian, tikus dipelihara dalam kandang berupa kotak plastik dengan penutup berupa kawat berjaring, dalam satu kandang berisi 2 ekor tikus putih.
- c. Setelah itu, tikus diadaptasikan selama 1 minggu dalam Laboratorium Farmakologi FKUB pada suhu ruangan 20-26°C dengan kelembaban udara antara 40-70%, hewan coba diberi makan berupa pelet komersial yang diletakkan pada tempat makan dan diberi minum (PDAM) yang diletakkan pada tempat air minum





4.7.2 Pembuatan Gelatin Ikan Patin

Kulit ikan patin dipisahkan dari daging dan lemak yang masih menempel pada kulit ikan patin, kemudian kulit ikan patin disimpan pada suhu -200°C. Selanjutnya, kulit ikan patin dicairkan dalam suhu ruangan dan dipotong dengan ukuran sekitar 1 cm². Kulitikan patin dibilas menggunakan air lemon untuk menghilangkan material selain kulit ikan. Kemudian 100 gram sampel ikan patin dibilas dan direndam dalam larutan asam klorida 1% selama 2 jam untuk mencairkan serabut kolagen menjadi serat-serat/fibril sehingga mudah diekstraksi. Setelah direndam, sampel dilakukan pencucian beberapa kali hingga mencapai pH netral (6-7). Kulit patin diekstraksi menggunakan *shaker water bath* dengan air suling pada suhu 45°C selama 12 jam. Selanjutnya, menggunakan kain saring *Wathman* no.1 untuk memisahkan larutan gelatin dengan sisa kulit ikan patin. Kemudian larutan gelatin didinginkan pada suhu ruangan hingga terbentuk gel gelatin ikan patin (Ratnasari dkk, 2013; Reza dkk, 2015). Proses pembuatan gelatin ikan patin ini sudah dilakukan oleh mahasiswa kelompok penelitian departemen Bedah Mulut angkatan 2014.

4.7.3 Pencabutan Gigi Tikus

Prosedur yang dilakukan pertama kali sebelum melakukan pencabutan gigi adalah mengulasi daerah yang akan dianestesi menggunakan antiseptik yaitu *povidone iodine* 10% atau alkohol 70% pada bagian labial dan palatal dari gingiva gigi yang akan dicabut. Kemudian melakukan anestesi untuk menghilangkan rasa sakit pada saat pencabutan gigi pada tikus putih menggunakan larutan anestesi ketamin 1000 mg/10 ml sebanyak 0,2 ml dengan cara *intra peritoneal*. Larutan anestesi ketamin memiliki *onset of action* ±3 menit sedangkan *duration of action* ±60 menit. Selanjutnya melakukan pemisahan akar gigi dari gingiva dengan menggunakan lecron dan mengambil gigi insisisivus satu kiri rahang bawah menggunakan *needle holder*. Pada pencabutan gigi insisisivus satu kiri rahang bawah harus dilakukan secara hati-hati dan dengan kekuatan yang sama agar tidak terjadi fraktur. Kemudian, melakukan irrigasi pada soket menggunakan aquades yang steril dan yang terakhir adalah kontrol pendarahan menggunakan tampon atau kasa steril (Widyastomo dkk, 2013). Proses pembuatan pencabutan gigi

tikus ini sudah dilakukan oleh mahasiswa kelompok penelitian departemen Bedah Mulut angkatan 2014.

4.7.4 Pemberian Gelatin Ikan Patin (*Pangasius djambal*)

- a. Soket diberi gelatin ikan patin dengan menggunakan spuit yang dimasukkan ke dalam soket sebanyak 1cc.
- b. Gelatin ikan patin juga diulaskan pelan-pelan menggunakan *cotton bud* pada soket secara merata
- c. Pemberian gelatin ikan patin dilakukan setelah pencabutan gigi.. Sedangkan pada kelompok kontrol tidak diberi gelatin ikan patin.

Proses pemberian gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) ini sudah dilakukan oleh mahasiswa kelompok penelitian departemen Bedah Mulut angkatan 2014.

4.7.5 Perawatan Hewan Coba Pasca Pencabutan Gigi

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

4.7.6 Pengambilan Sampel Jaringan

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

jasad tikus dikuburkan dengan layak (Widyastomo dkk, 2013).Proses pengambilan sampel jaringan ini sudah dilakukan oleh mahasiswa kelompok penelitian departemen Bedah Mulut angkatan 2014.

4.7.7 Teknik Pemrosesan Preparat Jaringan

Sampel jaringan yang telah dilakukan kemudian dilakukan pencucian pada air mengalir selama 15 menit.Selanjutnya, melakukan dekalsifikasi dengan menggunakan EDTA 14% selama 3-4 minggu kemudian dilakukan pencucian kembali menggunakan air mengalir selama 15 menit.Kemudian, dilakukan dehidrasi menggunakan *acetone* sebanyak 4 kali dalam 1 jam.Selanjutnya, dilakukan *clearing* dengan menggunakan *xylol* sebanyak 4 kali dalam 30 menit dan setelah itu dilakukan impregnasi menggunakan parafin cair pada suhu 55°C-80°C sebanyak 4 kali dalam 1 jam. Selanjutnya, pemanaman jaringan ke dalam blok parafin (*embedding*) dan didinginkan selama 24 jam. Kemudian, sediaan dilakukan penyayatan dengan menggunakan *mircrotom rotary* dengan ketebalan antara 3-5 mikron lalu sayatan diletakkan pada *water bath* pada suhu 30°C. Setelah itu, sayatan diletakkan pada gelas objek dan didiamkan selama 24 jam kemudian dilakukan pewarnaan menggunakan teknik imunohistokimia indirek.Teknik pemrosesan preparat jaringan ini sudah dilakukan oleh mahasiswa kelompok penelitian departemen Bedah Mulut angkatan 2014.

4.7.8 Teknik Indirek Pewarnaan Imunohistokimia

Metode pewarnaan pada penelitian ini menggunakan metode Imunohitokimia *indirect* yang menggunakan antibodi primer untuk mengenali antigen yang mengidentifikasi jaringan sedangkan antibodi sekunder digunakan agar berikatan dengan antibodi primer dan menghasilkan warna coklat.

Prosedur pewarnaan Imunohistokimia dapat dimodifikasi sebagai berikut:

- a. Melakukan deparafinasi preparat (blok parafin) yang sudah tersedia di Laboratorium Biokimia FKUB dengan menggunakan *xylene* sebanyak 3 kali masing-masing 3 menit.
- b. Rehidrasi masing-masing preparat dengan menggunakan etanol 100% selama 2 menit, etanol 95%



30

- selama 2 menit, etanol 70% selama 1 menit dan air selama 1 menit.
- c. Melakukan perendaman dalam *peroxidase blocking solution* pada suhu kamar selama 10 menit.
- d. Inkubasi preparat dalam *prediluted blocking serum* 25°C selama 10 menit.
- e. Merendam preparat dalam antibodi monoklonal anti-RANKL selama 10 menit.
- f. Mencuci preparat dengan menggunakan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) selama 5 menit.
- g. Inkubasi preparat dengan antibodi sekunder (*peroxidase*) selama 10 menit.
- h. Pencucian preparat dengan PBS selama 5 menit.
- i. Inkubasi preparat dengan peroksidase lagi selama 10 menit.
- j. Mencuci preparat dengan PBS selama 5 menit.
- k. Inkubasi preparat dengan kromogen DAB (*Diaminobenzimidine*) selama 10 menit.
- l. Inkubasi preparasi dengan *Hematoxylin Eosin* selama 3 menit.
- m. Mencuci preparat dengan menggunakan air mengalir.
- n. Preparat dibersihkan dan ditetesi *mounting media*.
- o. Preparat ditutup dengan *coverslip*.

Mengamati ekspresi RANKL pada sel menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x **gambar**

4.3

- q. Dokumentasi hasil pengamatan
- r. Perhitungan jumlah sel

4.8 Perhitungan Ekspresi Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand (RANKL)

Perhitungan ekspresi RANKL dapat dilakukan setelah preparat jaringan dilakukan pengecatan dengan teknik imunohistokimia menggunakan antibodi anti-RANKL. Perhitungan ekspresi RANKL menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran kuat (1000x) pada 20 bidang lapang pandang. Selanjutnya, dilakukan perhitungan secara manual untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat. Identifikasi ekspresi RANKL dapat dilihat dan ditentukan

dari nukleus atau inti sel dan sitoplasma RANKL yang berwarna coklat (Barreiros, 2018).

Gambar 4.3 Ekspresi RANKL pada pewarnaan Immunohistokimia



(Moraes, dkk., 2011)

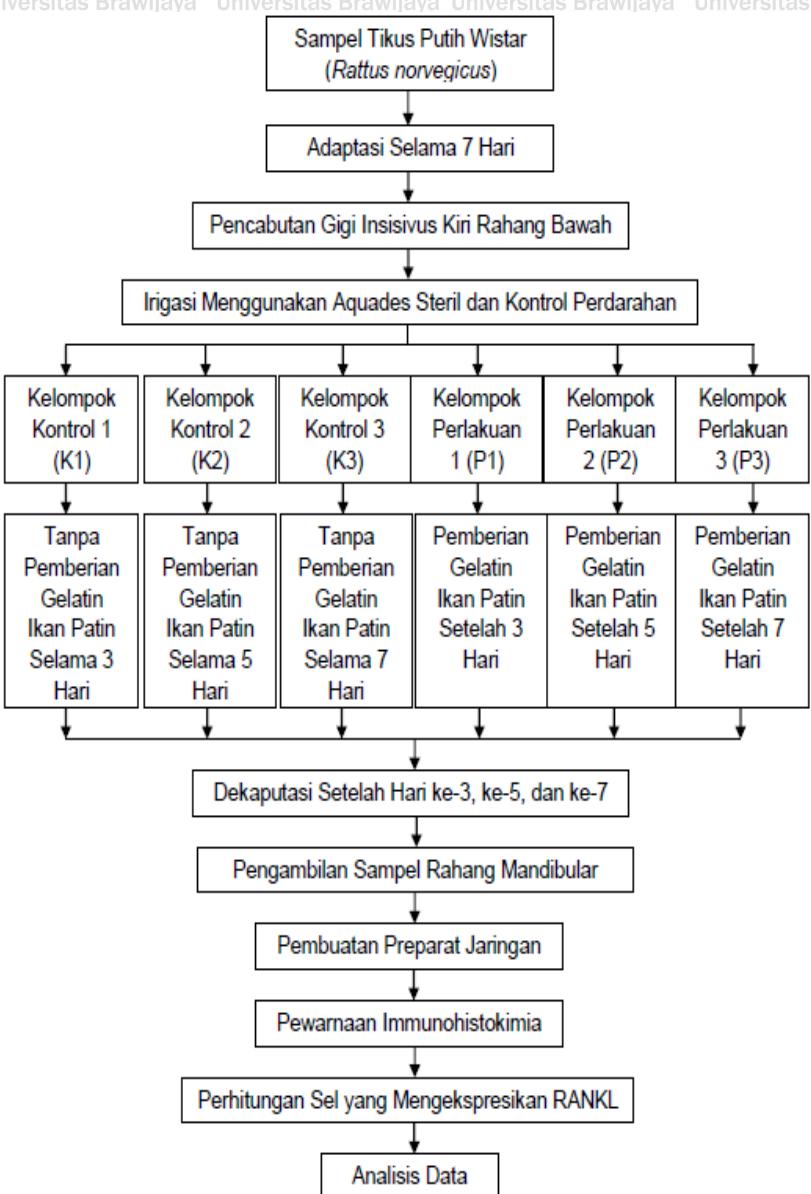
4.9 Analisis Data

Untuk mendapatkan data perhitungan jumlah ekspresi RANKL diperoleh dari analisis statistika menggunakan program *Statistical Product of Service Solution* (SPSS) 16.0 untuk Windows dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p=0,05$) dan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Langkah pertama pada analisis statistik yaitu uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* karena sampel besar ≥ 50 dengan tujuan menilai sebaran data berdistribusi normal atau tidak normal. Langkah yang kedua adalah melakukan uji homogenitas ragam dengan tujuan untuk mengetahui sebaran data masing-masing kelompok homogen atau tidak homogen dengan menggunakan *Levene's test*. Langkah ketiga, jika terdapat data berdistribusi normal ($\alpha > 0,05$) dan data bersifat homogen ($p > 0,05$) dapat dilakukan uji t tidak berpasangan dengan tujuan untuk mengetahui perbedaan jumlah ekspresi RANKL antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok perlakuan pada saat proses penyembuhan luka setelah pencabutan gigi tikus putih galur wistar (*Rattus norvegicus*). Langkah keempat yaitu melakukan *Post Hoc Turkey* dengan menggunakan *Least Significance Differences* (LSD) untuk mengetahui perbandingan rata-rata antar kelompok. Langkah kelima yaitu apabila data tidak berdistribusi normal dan tidak homogen maka dapat dilakukan uji non parametrik dengan menggunakan uji

Mann Whitney untuk mengetahui perbedaan peningkatan jumlah ekspresi RANKL antar kelompok.



4.10 Skema Prosedur Penelitian







BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil

5.1.1 Hasil Penelitian

Dengan Surat Kelaikan Etik No. 196/EC/KEPK-S1-FKG/08/2018 penelitian ekspresi RANKL ini dilakukan padahewan coba yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu kelompok kontrol dan perlakuan. Kelompok kontrol terdiri atas 3 kelompok, yaitu kelompok kontrol 1 (hewan coba yang tidak diberi perlakuan selama 3 hari pasca pencabutan gigi), kelompok kontrol 2 (hewan coba tidak diberi perlakuan selama 5 hari pasca pencabutan gigi), dan kelompok kontrol 3 (hewan coba tidak diberi perlakuan selama 7 hari pasca pencabutan gigi). Sedangkan kelompok perlakuan yaitu kelompok yang diberikan gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) dengan konsentrasi 100%, pada soket gigi pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvericus*), yaitu terdiri dari kelompok perlakuan 1 (hewan coba diberi perlakuan setelah 3 hari pasca pencabutan gigi), kelompok perlakuan 2 (hewan coba diberi perlakuan setelah 5 hari pasca pencabutan gigi), dan kelompok perlakuan 3 (hewan coba diberi perlakuan setelah 7 hari pasca pencabutan gigi).

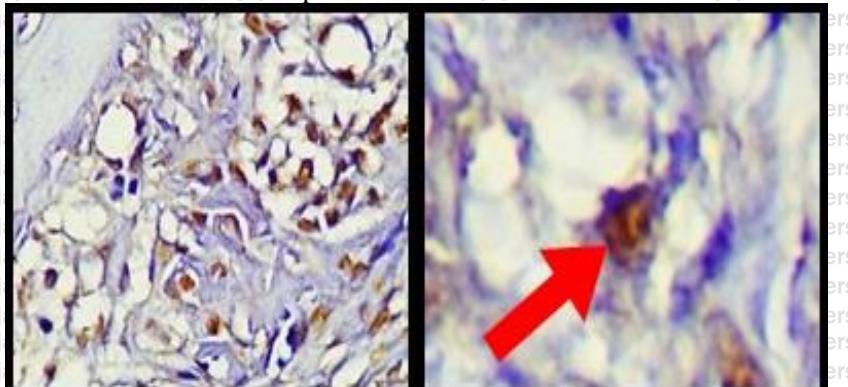
Sampel preparat jaringan luka pasca pencabutan gigi yang telah dilakukan pengecatan imunohistokimia dilakukan pengamatan dan penghitungan sel untuk mengetahui jumlah ekspresi RANKL dengan menggunakan mikroskop cahaya *Olympus CX-21* dengan perbesaran 1000x pada 20 bidang pandang.

Rata-rata ekspresi RANKL pada kelompok kontrol 1 (K1) berjumlah 15.Rata-rata ekspresi RANKL pada kelompok perlakuan 1 (P1) berjumlah 10.Hal ini menunjukkan bahwa jumlah ekspresi RANKL pada kelompok P1 memiliki jumlah yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok K1.Ekspresi RANKL tampak berwarna coklat keunguan pada jisel yang ditunjuk dengan panah hitam pada **gambar 5.1** dan **gambar 5.2**.

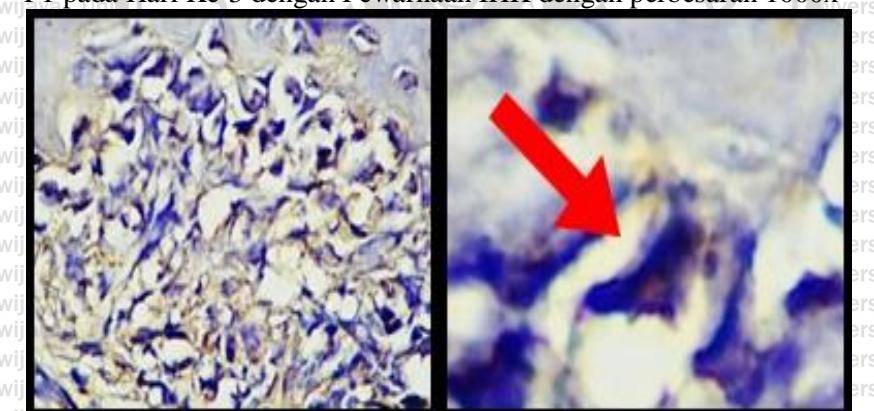


36

Gambar 5.1 Gambaran Histologi Ekspresi RANKL pada Kelompok K1 pada Hari Ke-3 dengan Pewarnaan IHK dengan perbesaran 1000x



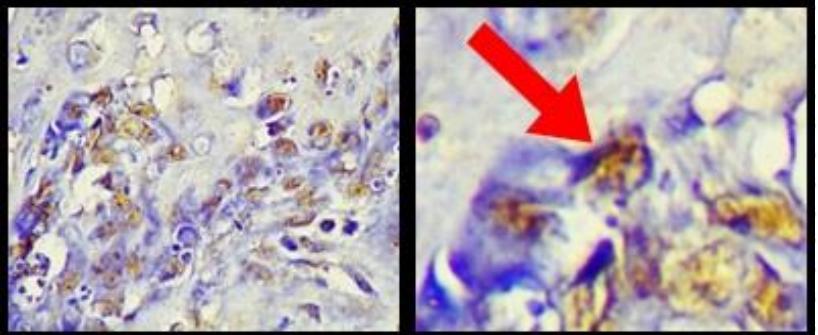
Gambar 5.2 Gambaran Histologi Ekspresi RANKL pada Kelompok P1 pada Hari Ke-3 dengan Pewarnaan IHK dengan perbesaran 1000x



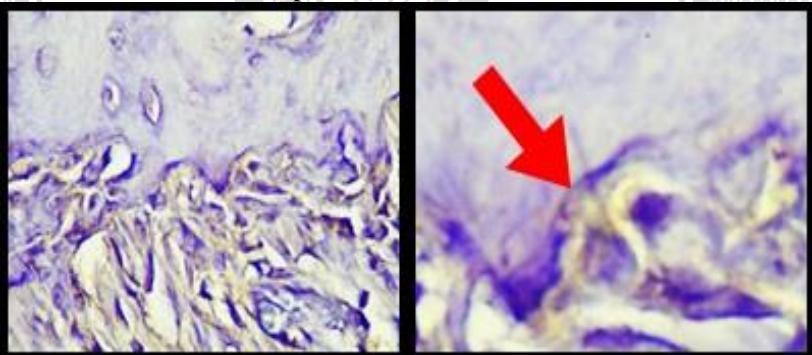
Rata-rata ekspresi RANKL pada kelompok kontrol 2 (K2), yaitu kelompok tikus yang tidak diberi gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) setelah 5 hari pasca pencabutan gigi, berjumlah 20,57. Rata-rata ekspresi RANKL pada kelompok perlakuan 2 (P2), berjumlah 8,14. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah ekspresi RANKL pada kelompok P2 memiliki jumlah yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok K2. Ekspresi RANKL yang ditunjuk

oleh panah hitam dan tampak berwarna coklat keunguan pada **gambar 5.3** dan tampak berwarna coklat kekuningan pada **gambar 5.4**.

Gambar 5.3 Gambaran Histologi Ekspresi RANKL pada Kelompok K2 pada Hari Ke-5 dengan Pewarnaan IHK dengan perbesaran 1000x



Gambar 5.4 Gambaran Histologi Ekspresi RANKL pada Kelompok P2 pada Hari Ke-5 dengan Pewarnaan IHK dengan perbesaran 1000x

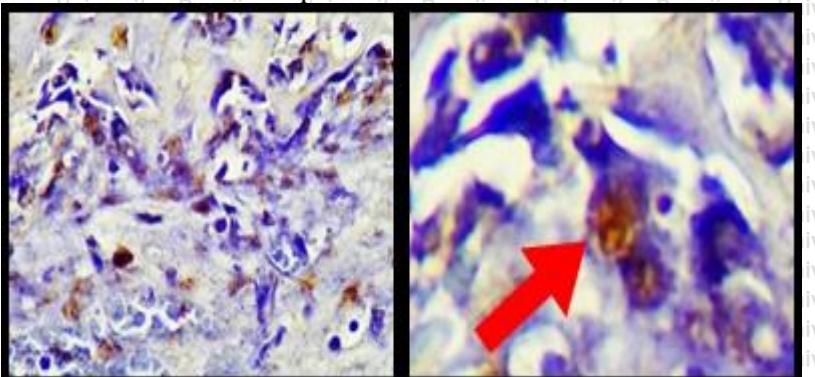


Rata-rata jumlah ekspresi RANKL pada kelompok kontrol 3 (K3), yaitu kelompok tikus yang tidak diberi gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) selama 7 hari pasca pencabutan gigi, yaitu berjumlah 21. Rata-rata jumlah ekspresi RANKL pada kelompok perlakuan 3 (P3), yaitu berjumlah 4,86. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah ekspresi RANKL pada kelompok P3 memiliki jumlah yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok K3. Ekspresi RANKL

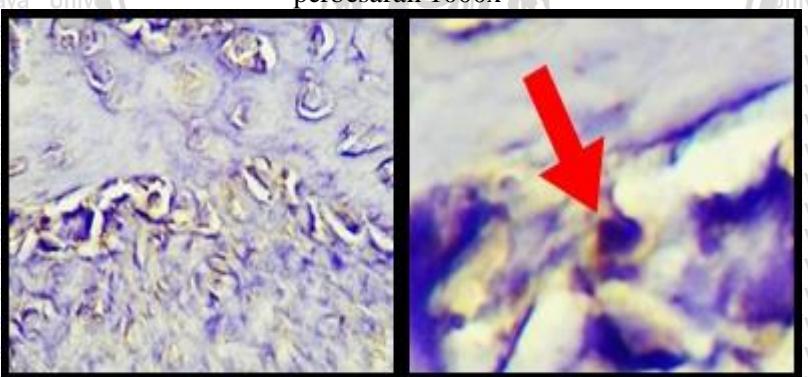


pada sel yang ditunjuk dengan panah hitam pada yang tampak berwarna coklat kekuningan **gambar 5.5** dan berwarna coklat kekuningan pada **gambar 5.6**.

Gambar 5.5 Gambaran Histologi Ekspresi RANKL pada Kelompok K3 pada Hari Ke-7 dengan Pewarnaan IHK dengan perbesaran 1000x



Gambar 5.6 Gambaran Histologi Ekspresi RANKL pada Kelompok P3 pada Hari Ke-7 dengan Pewarnaan IHK dengan perbesaran 1000x



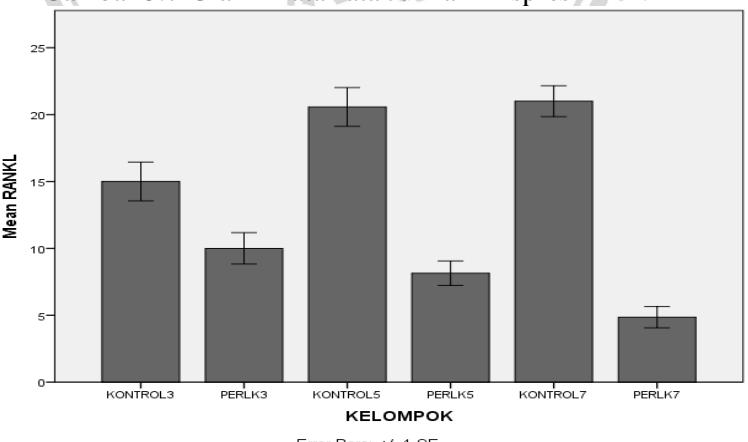
Dari hasil perhitungan ekspresi RANKL, selain rata-rata didapatkan juga standar deviasi untuk setiap kelompok yang tertera dalam **tabel 5.1**.

Tabel 5.1 Hasil Perhitungan Rata-rata dan Standar Deviasi Jumlah Ekspresi RANKL pada Soket Gigi Pasca Pencabutan Gigi Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Kelompok	Mean	Standar Deviasi
K1	15.00	3.83
K2	20.57	3.82
K3	21.00	3.05
P1	10.00	3.1
P2	8.14	2.41
P3	4.86	2.11

Berdasarkan data pada tabel di atas, dapat disimpulkan bahwa jumlah rata-rata ekspresi RANKL tertinggi, yaitu kelompok K3, sedangkan jumlah rata-rata ekspresi RANKL terendah, yaitu P3. Didapatkan jumlah ekspresi RANKL perbandingan jumlah ekspresi RANKL pada kelompok kontrol dan 64 perlakuan mengalami penurunan pada kelompok perlakuan, seperti pada **gambar 5.7**.

Gambar 5.7 Grafik Rata-rata Jumlah Ekspresi RANKL





Grafik di atas menunjukkan bahwa terjadi penurunan di hari ke-3 (fase inflamasi) menuju hari ke-5 (fase awal proliferasi) sampai hari ke-7 (fase puncak proliferasi) pada kelompok perlakuan. Sedangkan pada kelompok kontrol telihat sebaliknya, yaitu jumlah rata-rata ekspresi RANKL meningkat walaupun tidak signifikan antara hari ke-5 dan ke-7.

5.1.2 Analisa Data

Data perhitungan jumlah ekspresi RANKL yang merupakan data dari hasil penelitian dianalisa secara statistika menggunakan program IBM *Statistical Product of Service Solution* (SPSS) 22.0 untuk Windows dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Langkah pertama, yaitu uji normalitas dengan menggunakan uji Shapiro-Wilk karena besar sampel ≤ 50 dengan tujuan menilai apakah sebaran data tersebut berdistribusi normal atau tidak normal. Langkah yang kedua adalah dilakukan uji homogenitas ragam yang bertujuan untuk mengetahui apakah sebaran data masing-masing kelompok tersebut homogen atau tidak dengan menggunakan *Levene's test*. Langkah ketiga, jika terdapat hasil bahwa data hasil penelitian berdistribusi normal ($p > 0,05$) dan data bersifat homogen ($p > 0,05$). Kemudian uji *one way ANOVA* yang dilakukan untuk mengetahui perbedaan jumlah ekspresi RANKL pada kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan pada proses penyembuhan luka pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*) di fase inflamasi, fase awal proliferasi, dan fase puncak proliferasi. Bila nilai signifikansi hasil uji $p < 0,05$ maka hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan sehingga H_0 ditolak. H_0 dari penelitian ini adalah pemberian gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) tidak berpengaruh terhadap jumlah ekspresi RANKL pada luka pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*). Sedangkan H_1 dari penelitian ini adalah pemberian gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) berpengaruh terhadap jumlah ekspresi RANKL pada luka pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*). Langkah keempat, dilakukan uji Post Hoc untuk mengetahui perbedaan yang bermakna antar kelompok sebagai uji lanjutan dari uji *one way ANOVA*.

5.1.2.1 Uji Normalitas

Uji normalitas data digunakan untuk mengetahui data penelitian ini berdistribusi normal atau tidak. Uji normalitas data dilakukan dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk* karena data yang digunakan <50 . Bila nilai signifikansi penghitungan $p>0,05$ maka uji normalitas data terpenuhi. Berdasarkan uji normalitas data, didapatkan hasil signifikansi penghitungan data sebesar 0,811 untuk kelompok kontrol dan 0,244 untuk kelompok perlakuan. Nilai signifikansi yang didapatkan lebih besar dari 0,05. Jadi, dapat disimpulkan bahwa uji normalitas terpenuhi karena data hasil penelitian berdistribusi normal. Selanjutnya dilakukan uji homogenitas data.

5.1.2.2 Uji Homogenitas Data

Levene's Test digunakan untuk menguji homogenitas data yang bertujuan untuk menguji data penelitian mempunyai variasi yang sama (homogen). Bila nilai signifikansi uji *Levene's Test* lebih besar daripada 0,05 maka dapat menolak H_1 sehingga diperoleh data yang homogen. Pada penelitian ini, didapatkan nilai signifikansi uji homogenitas sebesar 0,482. Nilai yang didapatkan lebih besar dari 0,05. Dapat disimpulkan bahwa data homogen karena H_0 diterima (tidak terdapat perbedaan). Selanjutnya dilakukan uji analisa statistik, yaitu dengan menggunakan uji *one way ANOVA* karena data berdistribusi normal dan data homogen.

5.1.2.3 Uji One Way ANOVA

Uji *one way ANOVA* digunakan untuk menguji perbedaan jumlah ekspresi RANKL pada kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan secara keseluruhan. Uji *one way ANOVA* terpenuhi bila nilai signifikansi hasil penghitungan adalah $p < 0,05$ sehingga H_0 ditolak. Dari hasil uji *one way ANOVA*, diperoleh nilai signifikansi sebesar 0,000. Nilai yang didapatkan lebih kecil dari 0,05 sehingga H_0 ditolak dan H_1 diterima. Kesimpulan dari hasil uji *one way ANOVA* pada penelitian ini adalah terdapat perbedaan antara jumlah ekspresi RANKL yang tidak diberi gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) dan diberi gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) di fase inflamasi, fase awal proliferasi, dan fase puncak proliferasi pada



proses penyembuhan luka pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*).

5.1.2.4 Uji Post Hoc LSD

Uji Post Hoc LSD untuk mengetahui perbedaan jumlah ekspresi RANKL antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan secara lebih detail. Bila nilai signifikansi $p < 0,05$ dengan interval kepercayaan 95% maka Uji Post Hoc LSD terpenuhi. secara keseluruhan hasil uji Post Hoc adalah terdapat perbedaan rata-rata jumlah ekspresi RANKL yang bermakna antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pada hari yang sama dalam satu fase penyembuhan luka. Hasil uji Post Hoc dapat didilihat pada tabel 5.5.

Tabel 5.2 Hasil Uji Post Hoc LSD

Kelompok	Kelompok Pembanding	P
P1	K1	0.052
	K2	0.000
	K3	0.000
P2	K1	0.003
	K2	0.000
	K3	0.000
P3	K1	0.000
	K2	0.000
	K3	0.000



5.2 Pembahasan

Penelitian ini bertujuan untuk mengamati ekspresi RANKL pada soket pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*) setelah pemberian gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*).Rata-rata jumlah ekspresi RANKL tertinggi pada kelompok kontrol hari ke-7 (K3).Rata-rata jumlah ekspresi RANKL terendah pada kelompok perlakuan hari ke-7 (P3).

Pada kelompok kontrol hari ke 3 yang tidak diberi perlakuan (K1), jumlah ekspresi RANKL sebanyak 15 kemudian meningkat pada hari ke-5 (K2) dengan jumlah 20,57 sel.Jumlah ekspresi RANKL meningkat sedikit pada hari ke-7 (K3) dengan jumlah 21 sel.Hasil ini didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Kon, dkk (2001) bahwa jumlah ekspresi RANKL akan terus meningkat dari hari ke-3 sampai hari ke-14. Pada kelompok perlakuan terjadi penurunan dari hari ke-3 sampai hari ke-7.Jumlah ekspresi RANKL pada hari ke-3 (P1) yaitu 10, pada hari ke-5 (P2) jumlah ekspresi RANKL adalah 8,14 sel dan jumlah ekspresi RANKL menurun secara signifikan pada hari ke-7 (P3) menjadi 4,81 sel. Hasil ini didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Wang, dkk.(2013) yang didapatkan bahwa ekspresi RANKL sangat tinggi pada saat awal terjadinya fraktur tulang dan kemudian jumlah ekspresi RANKL menurun hingga sampai minggu ke-12 yang telah diberikan serum yang mengandung enzim imunosorben.Rasio RANKL / OPG lebih rendah pada kelompok fraktur *intertrochanteric* dibandingkan dengan kelompok kontrol yang tidak diberi perlakuan. Rasio RANKL terlihat lebih rendah secara signifikan segera setelah 4 minggu setelah cedera, sementara tidak ada perbedaan yang signifikan antara 2 kelompok pada minggu ke-8 dan minggu ke-12 setelah fraktur. Keseimbangan RANKL/OPG sangat penting untuk remodeling tulang dan massa tulang (Galli, dkk., 2011).

Keseimbangan RANKL-OPG dapat mempengaruhi aktivitas osteoklas, RANKL diekspresikan oleh sel osteoblas dan sel-sel stroma dalam tulang (Takahashiet. Al., 1999). Sedangkan reseptornya RANK dihasilkan oleh osteoklas. Interaksi antara RANKL dan RANK merangsang pembentukan, aktivasi, diferensiasi dan kelangsungan hidup dari osteoklas sehingga osteoklastogenesis terjadi dan kemudian terjadilah resorpsi tulang (Blair, et. Al., 2007).

Penurunan ekspresi RANKL pada soket luka pasca pencabutan gigi dapat mempengaruhi penyembuhan jaringan keras. Jika RANKL jumlah RANKL menurun maka aktivasi osteoklas juga menurun dan dapat mengganggu proses resorpsi tulang pada masa penyembuhan jaringan tulang keras. Fungsi dari osteoklas adalah membuat batas antara jaringan keras yang nekrotik dan jaringan keras yang sehat lalu kemudian membersihkan jaringan yang nekrotik. Setelah jaringan nekrotik dibersihkan, osteoklas mengisolasi daerah jaringan sehat (Feng & Steven, 2013). Apabila fungsi osteoklas menurun maka pembersihan jaringan nekrotik pada jaringan keras akan tidak maksimal sehingga dapat mengganggu penyembuhan tulang. Jadi, apabila ekspresi RANKL menurun dan aktivasi osteoklas pun menurun, maka proses penyembuhan jaringan keras tidak akan maksimal.

Ikan patin (*Pangasius djambal*) memiliki kandungan yaitu kadar air 75,75-79,42%; kadar protein 12,94-7,59%; kadar lemak 1,81-6,57% serta kadar abu 0,16-0,23%. Ikan patin mengandung kadar protein yang cukup tinggi dan mengandung semua asam amino esensial serta mengandung lisin dan arginin yang lebih tinggi dibandingkan dengan protein susu dan daging (Suryaningrum, dkk., 2010). Arginin dan glutamin merupakan dua asam amino yang memiliki peran dalam proses penyembuhan luka. Arginin merupakan asam amino semi essensial yang bertindak sebagai substrat untuk sintesis protein, desposisi kolagen, dan pertumbuhan seluler. Arginin meningkatkan produksi *nitrit oxyde* (NO) atau nitrogen monoksida, meningkatkan fungsi imun, dan dapat mempercepat penyembuhan luka (Stechmiler, 2010). Asam amino arginin juga memiliki peran sebagai salah satu komponen penyusun hormon insulin dan glikogen. Semakin tinggi asupan protein, maka sekresi hormon ini akan mengalami peningkatan. Peningkatan hormon ini menyebabkan kadar glukosa dalam darah akan berkurang karena sebagian diubah menjadi energi yang juga membantu mempercepat proses metabolisme tulang (Diani et al., 2004).

Nitrogen monoksida memiliki banyak fungsi dan pengaruh, terutama dalam sistem kardiovaskular (Hirata, et. al., 2010) di mana ia berfungsi sebagai molekul yang menjadi sinyal dalam vasodilatasi dan angiogenesis (Lee, et. al., 1999). Melalui mekanisme yang sama, nitrogen monoksida terlibat dalam penyembuhan luka karena

memberikan oksigen dan nutrisi yang cukup area luka, yang merangsang fibroblas untuk mensintesis kolagen dan keratinosit agar berkembang. Oleh karena itu nitrogen monoksida juga memiliki peran penting dalam penyembuhan luka pada jaringan lunak.

Dalam penelitian Choi dkk., (2018) didapatkan bahwa ekspresi RANKL menurun pada tikus yang keropos tulang pada ovariektomi dengan perlakuan menggunakan metilasi protein arginin yang terbentuk dari *Posttranslational Modification Mediated by Protein Arginine Methyltransferase* (PRMTs). Penelitian yang telah dilakukan oleh Xian, dkk.(2004) menunjukkan bahwa nitrogen monoksida berpotensi menekan ekspresi RANKL. Nitrogen monoksida meningkatkan ekspresi OPG bersamaan dengan menurunkan ekspresi RANKL. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa nitrogen monoksida dapat mempengaruhi remodeling tulang (Xian, et. al., 2004).

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa hipotesis penelitian dapat diterima karena pemberian gelatine ikan patin terbukti berpengaruh terhadap penurunan rata-rata ekspresi RANKL pada luka 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 RANKL pada luka pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*) maka dapat ditarik kesimpulan bahwa :

1. Terdapat pengaruh pemberian gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) terhadap penurunan ekspresi RANKL pada lukapasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*)
2. Jumlah perhitungan ekspresi RANKL pada luka pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang tidak diberi gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) sebesar 15 pada hari ke-3 (fase inflamasi), 20 pada hari ke-5 (fase awal proliferasi), dan 21 pada hari ke-7 (fase puncak proliferasi). Sedangkan, jumlah perhitungan jumlah perhitungan ekspresi RUNX2 pada luka pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diberi gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) sebesar 10 pada hari ke-3, 8 pada hari ke-5, dan 5 pada hari ke-7.
3. Terdapat perbedaan yang bermakna antara ekspresi RANKL pada luka pasca pencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang tidak diberi gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) dengan ekspresi RANKL pada luka pascapencabutan gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diberi gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) dibuktikan dengan jumlah ekspresi RANKL pada kelompok perlakuan (P) lebih sedikit dibandingkan pada kelompok kontrol (K) gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) dibuktikan dengan jumlah ekspresi RANKL pada kelompok perlakuan (P) lebih banyak dibandingkan pada kelompok kontrol (K).

6.2 Saran

Saran yang diberikan berdasarkan penelitian ini untuk penelitian lebih lanjut adalah sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut setelah minggu 1 hingga minggu ke 4 untuk mengetahui lanjutan ekspresi RANKL hingga pada penyembuhan tulang pasca pencabutan gigi.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai toksisitas, dosis maksimum dan dosis minimum yang efektif dalam pemberian gelatin ikan patin (*Pangasius djambal*) sebagai bahan untuk penyembuhan luka pada soket pasca pencabutan gigi.

DAFTAR PUSTAKA

Agustin, Agnes Triasih. Gelatin ikan: sumber, komposisi kimia dan potensi pemanfaatannya. FPIK Universitas Sam Ratulangi. 2013

- Ahmet Eken, Fatma Z Okus, Mehmet F Yetkin, Mustafa Cakir, Aykut Ozdarendeli and Meral MirzaSIP₁ Agonist SEW2871 Inhibits human Th17 cell generation and functions. *The Journal of Immunology* May 1, 2017, 198 (1 Supplement) 156.19
- Alexander JW, Supp DM. Role of Arginine and Omega-3 Fatty Acids in Wound Healing and Infection. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2014;3(11):682-690.
- Amri, K. dan Khairuman.2002. *Buku Pintar Budidaya 15 Ikan Konsumsi*.Agromedia. Jakarta
- Andersen TL, Sondergaard TE, Skorzynska KE, Dagnaes-Hansen F, Plesner TL, Hauge EM, Plesner T, Delaisse JM. A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone. *Am J Pathol*. 2009;174:239–247
- Anthony Atala, Darrel J. Irvine, Marsha Moses, and Sunil Shaunak. *Wound Healing Versus Regeneration: Role of the Tissue Environment in Regenerative Medicine*.MRS Bull. 2013 Aug 1; 35(8): 10.1557/mrs2010.528.
- Aydin Husnu, Cihad Tatar, Osman Anil Savas, Tamer Karsidag, Bahri Ozer, Nevra Dursun, Aylin Bekem, Ahmet Unal & Ishak Sefa Tuzun. *The Effects of Local and Systemic Administration of Proline on Wound Healing in Rats*, 2018 *Journal of Investigative Surgery*
- Baharuddin NA, Coates DE, Cullinan M, Seymour G, Duncan W, Localization of RANK, RANKL and osteoprotegerin during healing of surgically created periodontal defects in sheep. *J Periodont Res* 2014; doi: 10.1111/jre.12196.

Barreiros D, Pucinelli CM, Oliveira KMH, et al. *Immunohistochemical and mRNA expression of RANK, RANKL, OPG, TLR2 and MyD88 during apical periodontitis progression in mice*. *J Appl Oral Sci.* 2018;26:e20170512. Published 2018 Jun 25. doi:10.1590/1678-7757-2017-0512



50

- Blair, H. C., Schlesinger, P. H., Huang, C. L., and Zaidi, M. (2007). *Calcium signalling and calcium transport in bone disease*. Subcell Biochem 45, 539–562.
- Boyce, B. F., D. E. Hughes, K. R. Wright, L. Xing, and A. Dai, “Recent advances in bone biology provide insight into the pathogenesis of bone diseases,” Laboratory Investigation, vol. 79, no. 2, pp. 83–94, 1999.
- Boyce and L. Xing, “Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling,” Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 473, no. 2, pp. 139–146, 2008
- Burger E. H., and J. Klein-Nulend, “Mechanotransduction in bone—role of the lacuno-canalicular network,” The FASEB Journal, vol. 13, no. 8, pp. S101–S112, 1999.
- Capulli, M., R. Paone, and N. Rucci, “Osteoblast and osteocyte: games without frontiers,” Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 561, pp. 3–12, 2014.
- Choi, Joo-Hee & Jang, Ah-Ra & Kim, Dong-il & Park, Minjung & Lim, Seul-Ki & Kim, Myung-Sun & Park, Jong-Hwan. (2018). PRMT1 mediates RANKL-induced osteoclastogenesis and contributes to bone loss in ovariectomized mice. Experimental & Molecular Medicine. 50. 11. 10.1038/s12276-018-0134-x.
- Crockett, D. J. Mellis, D. I. Scott, and M. H. Helfrich, “New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: focus on the RANK/RANKL axis,” Osteoporosis International, vol. 22, no. 1, pp. 1–20, 2011.
- Daly JM, Reynolds J, Thom A, Kinsley L, Dietrick-Gallagher M, Shou J, Ruggieri B. Immune and metabolic effects of arginine in the surgical patient. Ann Surg 1988;208:512-23.
- Damoulis P. D., and P. V. Hauschka, “Nitric oxide acts in conjunction with proinflammatory cytokines to promote cell death in osteoblasts,” Journal of Bone and Mineral Research, vol. 12, no. 3, pp. 412–422, 1997.
- Darby IA, Laverdet B, Bonté F, Desmoulière A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. Clinical, Cosmetic and

- Investigational Dermatology*. 2014;7: 301-311. Doi:10.2147/CCID.S50046.

Diani AR, Sawada G, Wyse B, Murray FT, Khan M. *Pioglitazone preserves pancreatic islet structure and insulin secretory function in three murine models of type 2 diabetes*. Am J Physiol Endocrinol Metab 2004; 286: E116-E122.

Fabricio Gibertoni et al. *Evolution of Periodontal Disease: Immune Response and RANK/ RANKL/ OPG System*. 2017. Graduate Program in Biomedical Sciences, FHO Uniararas Centro Universitario Herminio Ometto, Araras, SP, Brazil

Fairchild S., Susan. *Comprehensive Perioperative Nursing Review*. 1993. London: Johns and Barlett Publisher International

Feng, Xu., Steven L. Teitelbaum. *Osteoclasts: New Insights*. Department of Pathology, The University of Alabama at Brimingham. Bone Research (2013) : 11-26. Doi: 10.4248/BR201301003

Fernanda Manfrin Arnez, Maya & Nogueira Soares Ribeiro, Larissa & Dessotti Barreto, Gabriel & Maria Monteiro, Patrícia & Ervolino, Edilson & Bernadete Sasso Stuani, Maria. (2017). *RANK/RANKL/OPG expression in rapid maxillary expansion*. Brazilian Dental Journal. 28. 296-300. 10.1590/0103-6440201601116.

Florencio-Silva et al, *Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells*. Department of Morphology and Genetics, Laboratory of Histology and Structural Biology, Federal University of São Paulo, Brazil. 2015

Galli C, Passeri G, Macaluso GM. FoxOs, Wnts and oxidative stress-induced bone loss: new players in the periodontitis arena. J Periodontal Res. 2011; 46(4): 397-406.

Geoffrey L. Howe, T.D., M.D.S. (Dunelm.), M.R.C.S. (Eng.), L.R.C.P. (Lond.), F.D.S.R.C.S.(Eng.), F.F.D.R.C.S.(Irel.). *Minor oral surgery*. Professor of Oral Surgery, University of Newcastle upon Tyne

Gomez-Guillen, Turnay MCJ, Fernandez-Diaz MD, Ulmo N, Lizarbe MA, Montero P. 2002. *Structural and physical*



properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. Food Hydrocolloids 16:25-34.

Heys SD, Walker LG, Smith I, Eremin O. *Enteral nutritional supplementation with key nutrients in patients with critical illness and cancer: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials.* Ann Surg 1999;229:467-77.

Hibbs JB Jr, Vavrin Z, Taintor RR. *L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells.* J Immunol 1987;138:550-65

Hirata Y, Nagata D, Suzuki E, Nishimatsu H, Suzuki J, Nagai R. *Diagnosis and treatment of endothelial dysfunction in cardiovascular disease.* Int Heart J 2010;51:1-6.

Horuk R. The Duffy Antigen Receptor for Chemokines DARC/ACKR1. *Front Immunol.* 2015;6:279. Published 2015 Jun 5. doi:10.3389/fimmu.2015.00279

Hupp, James. *Contemporary Oral and Maxillofacial Surgery 6th edition.* 2013. St Louis, United States

Ibsen Olga, RDH, MS and Joan Andersen Phelan, DDS. *Oral Pathology for the Dental Hygienist, 5th Edition.* 2009. New York: Saunders.

Jan Jin et al. *Risedronate inhibits bone marrow mesenchymal stem cell adipogenesis and switches RANKL/OPG ratio to impair osteoclast differentiation.* Journal of Surgical Research Volume 180, Issue 1, March 2013, Pages e21-e29

Jin, Q., Cirelli, J. A., Park, C. H., Sugai, J. V., Taba, M., Kostenuik, P. J., & Giannobile, W. V. (2007). RANKL inhibition through osteoprotegerin blocks bone loss in experimental. *Journal of Periodontology,* 78 (7), 1300-8.

Katili, Abu Bakar Sidik. *Struktur dan fungsi protein kolagen.* 2009

Kasten TP, Collin-Osdoby P, Patel N, Osdoby P, Krukowski M, Misko TP, Settle SL, Currie MG, Nickols GA. 1994. *Potentiation of osteoclast boneresorption activity by inhibition of nitric oxide synthase.* Proc Natl Acad Sci USA 91:3569-3573

- Kelly E, Morris SM Jr, Billiar TR. *Nitric oxide, sepsis, and arginine metabolism*. JPEN J Parenter Enteral Nutr 1995;19:234-8.
- Khairuman SP, Budi Daya Patin Super. 2007. Jakarta: Agromedia
- Kim, Yang-Hee; Furuya, Hiroyuki; Tabata, Yasuhiko. *Enhancement of bone regeneration by dual release of a macrophage recruitment agent and platelet-rich plasma from gelatin hydrogels*. 2013. Department of Biomaterials, Field of Tissue Engineering, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Japan
- Kirk SJ, Barbul A. *Role of arginine in trauma, sepsis, and immunity*. JPEN J Parenter Enteral Nutr 1990;14(5 Suppl):226S-9S.
- Kon Tamiyo,et al.*Expression of Osteoprotegerin, Receptor Activator of NF- κ B Ligand (Osteoprotegerin Ligand) and Related Proinflammatory Cytokines During Fracture Healing*. 2001. Boston University Medical Center, Boston, Massachusetts, USA
- Koyama A, Otsuka E, Inoue A, Hirose S, Hagiwara H. 2000. *Nitric oxide accelerates the ascorbic acid-induced osteoblastic differentiation of mouse stromal ST2 cells by stimulating the production of prostaglandin E(2)*. Eur J Pharmacol 391:225–231
- Kristensen HB, Andersen TL, Marcussen N, Rolighed L, Delaisse JM. *Increased presence of capillaries next to remodeling sites in adult human cancellous bone*. J Bone Miner Res. 2013;28:574–578
- Lee PC, Salyapongse AN, Bragdon GA, Shears LL 2nd, Watkins SC, Edington HD, Billiar TR. *Impaired wound healing and angiogenesis in eNOS-deficient mice*. Am J Physiol 1999;277:H1600-8.
- Levy AS, Chung JC, Kroetsch JT, Rush JW. *Nitric oxide and coronary vascular endothelium adaptations in hypertension*. Vasc Health Risk Manag 2009;5:1075-87.
- Li, Yaping et al. “*Interleukin-35 upregulates OPG and inhibits RANKL in mice with collagen-induced arthritis and fibroblast-like synoviocytes*.” Osteoporosis International 27 (2015): 1537-1546.
- Lin, J., Bi, L., Yu, X., Kawai, T., Taubman, M. A., Shen, B., & Han, X. (2014). *Porphyromonas gingivalis exacerbates ligature-*



- induced, RANKL-dependent alveolar bone resorption via differential regulation of Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4.* Infection and immunity, 82(10), 4127-34.
- Linzey, Don., Brecht Christy. Rattus norvegicus, Norway Rat. 2006. Wytheville Community College
- Lowik C, Nibberin PH, van de Ruit M, Papapoulos SE 1994 *Inducible production of nitric oxide in osteoblast-like cells and in fetal mouse bone explants is associated with suppression of osteoclastic bone resorption.* J Clin Invest 93:1465-1472
- Marks Jr. and S. N. Popoff, "Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton," American Journal of Anatomy, vol. 183, no. 1, pp. 1-44, 1988.
- Morison, Moya J. *Manajemen Luka*; alih bahasa, Tyasmono A. F. ; editor edisi bahasa Indonesia, Florinda, Monica Ester, Sari Kurnianingsih. — Jakarta : EGC, 2003
- Middleton, Jane E., Wound Healing: Process, Phases, Promoting. 2011. Nova Science Publishers.
- Mahyuddin Kholis, *Panduan Lengkap Agribisnis Lele.* 2010. Penebar Swadaya
- Matthew P. Caley, Vera L. C. Martins, and Edel A. O'Toole. *Advance in Wound care.* April 2015.
- Moraes Maiara, He'vio Freitas de Lucen, Paulo Roberto Medeiros de Azevedo, Leila Maria Guedes Queiroz, Antonio de Lisboa Lopes Costa. *Comparative immunohistochemical expression of RANK, RANKL and OPG in radicular and dentigerous cysts.* Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil
- Ngangi RS, Mariati NW, Hutagalung B. *Gambaran pencabutan gigi di balai pengobatan rumah sakit gigi dan mulut Universitas Sam Ratulangi.* Jurnal e-Gigi. 2012
- Niu C, Xiao F, Yuan K, Hu X, Lin W, Ma R, Zhang X and Huang Z (2017) *Nardosinone Suppresses RANKL-Induced Osteoclastogenesis and Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Alveolar Bone Resorption.* Front. Pharmacol.8:626.
- Pedlar. *Oral and Maxillofacial Surgery: An Objective-based Textbook.* 2001

- Parker,A.L., 1982, *Principles of Biochemistry*, Worth Publishers, Inc., Sparkas, Maryland.
- Ren, H., Ren, H., Li, X., Yu, D., Mu, S., Chen, Z., & Fu, Q. (2015). *Effects of intermedin on proliferation, apoptosis and the expression of OPG/RANKL/M-CSF in the MC3T3-E1 osteoblast cell line. Molecular medicine reports*, 12(5), 6711-7.
- Reynolds JV, Daly JM, Shou J, Sigal R, Ziegler MM, Naji A. *Immunologic effects of arginine supplementation in tumor-bearing and non-tumor-bearing hosts*. Ann Surg 1990;211:202-10.
- Reza Hekta Saputra, Indah Widiastuti, Agus Supriadi. *Karakteristik Fisik dan Kimia Gelatin Kulit Ikan Patin dengan Kombinasi Berbagai Asam dan Suhu*. Jurnal Teknologi Hasil Perikanan ISSN:2302-69. Vol. 4, No.1: 29-36, Mei 2015
- Rizky Arcinthya Rachmania , Fatimah Nisma, Elok Mayangsari. *Ekstraksi Gelatin Dari Tulang Ikan Tenggiri Melalui Proses Hidrolisis Menggunakan Larutan Basa*. Media Farmasi, Vol 10 No.2 September 2013 : 18. Skripsi, Jurusan Farmasi UHAMKA, Jakarta.
- Ruslim, A., Anitasari, S., Ismail, S., Oli'I, E., & Yani, S. (2017). Effect of African Leaves Extract (*Vernonia amygdalina* del.) on Wound Healing VelocityAfter Tooth Extraction in *Rattus norvegicus*. *Jurnal Sains Dan Kesehatan*, 1(8), 408-414
- Sarah Wolfensohn, Maggie Lloyd. *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare, 4th Edition*. 2003
- Sayani, Chattopadhyay, Ronald T. Raines. 2014. *Collagen-Based Biomaterials for Wound Healing*. Biopolymer. © 2014 Wiley Periodicals, Inc.
- Schäffer MR, Tantry U, Thornton FJ, Barbul A. *Inhibition of nitric oxide synthesis in wounds: pharmacology and effect on accumulation of collagen in wounds in mice*. Eur J Surg 1999;165:262-7
- Seunggon JUNG, Hee-Young YANG, Tae-Hoon LEE. *Differential expression of immunologic proteins in gingiva after socket preservation in mini pigs*. 2015. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of

- Dentistry, Chonnam National University, Gwangju, Republic of Korea
- Stechmiller, J. K. 2010. Understanding the Role of Nutrition and Wound Healing. *Nutr Clin Pract*: 25(1):61-68
- Streicher, C., Heyny, A., Andrukhova, O., Haigl, B., Slavic, S., Schüler, C., Kollmann, K., Kantner, I., Sexl, V., Kleiter, M., Hofbauer, L. C., Kostenuik, P. J., Erben, R. G. (2017). *Estrogen Regulates Bone Turnover by Targeting RANKL Expression in Bone Lining Cells*. *Scientific reports*, 7(1), 6460. doi:10.1038/s41598-017-06614-0
- Sodek J., and M. D. McKee, "Molecular and cellular biology of alveolar bone," *Periodontology 2000*, vol. 24, no. 1, pp. 99–126, 2000.
- Soekobagiono, Adrian Alfiandy, and Agus Dahlan. *RANKL expressions in preservation of surgical tooth extraction treated with Moringa (Moringa oleifera) leaf extract and demineralized freeze-dried bovine bone xenograft*. 2017. Department of Prosthodontics Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga. Surabaya – Indonesia
- Suryaningrum, Theresia Dwi., Muljanah, Ijah., Tahapari Evi. *Profil Sensori dan Nilai Gizi Beberapa Jenis Ikan Patin dan Hibrid Nasutus*. Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan Vol.5, 2010.
- Syam IA, Hatta R, & Ruslin M. 2015. *Potensi dari Ceker Ayam Kampung (Gallus domesticus) untuk Mempercepat Penyembuhan Soket Pasca Ekstraksi Gigi*. Makasar Dental Journal, 4(2):50-55.
- Takahashi N., Udagawa N., Suda T. *A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/ OPGL/ TRANCE/ RANKL, regulates osteoclast differentiation and function*. Biochem Biophys Res Commun. 1999 Mar 24; 256(3): 449-455. doi: 10.1006/bbrc.1999.0252
- Takayanagi H., "Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems," *Nature Reviews Immunology*, vol. 7, no. 4, pp. 292–304, 2007.
- Tang Y, Wu X, Lei W, Pang L, Wan C, Shi Z, Zhao L, Nagy TR, Peng X, Hu J, et al. *TGF-beta1-induced migration of bone*



mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nat Med.* 2009;15:757–65.

Tazwir, M. Amiruldin dan R. Kusumawati. 2009. *Pengaruh Perendaman Tulang Ikan Tuna (Thunnus albacores) dalam Larutan NaOH Terhadap Kualitas Gelatin Hasil Olahannya*. Jurnal Pasca Panen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan. 4(1):29-36.

Triyono, B., 2005, *Perbedaan Tampilan Kolagen di Sekitar Luka Insisi pada Tikus Wistar yang Diberi Infiltrasi Penghilang Nyeri Levobupivakain dan yang Tidak Diberi Levobupivakain*, Suatu Studi Histokimia, Tesis, Magister Ilmu Biomedik dan Program Pendidikan Dokter Spesialis I Bidang Anestesiologi, Universitas Diponegoro, Semarang.

Tzeng E, Billiar TR. Nitric oxide and the surgical patient. Identifying therapeutic targets. *Arch Surg* 1997;132:977-82.

Triyono, Bambang, 2005. *Perbedaan Tampilan Kolagen di sekitar Luka Insisi pada Tikus Wistar yang diberi Infiltrasi Penghilang Nyeri Levobupivakain dan yang tidak diberi Levobupivakain*, Tesis, Program Megister Biomedis dan PPDS I, UNDIP, Semarang.

Wang Huisin, Zhong Xiaohan. *Insulin effect on RANKL and OPG expression in human osteoblast-like MG63 cells*. *Turk J Med Sci* (2013) 43: 631-636

Werner, Sabine, and Grose, Richard. *Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines*. Institute of Cell Biology, Department of Biology, ETH Zurich, Zurich, Switzerland; and Cancer Research UK, London Research Institute, London, United Kingdom. 83: 835–870, 2003; 10.1152/physrev.00031.

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

Wimalawansa S, Chapa T, Fang L, Yallampalli C, Simmons D 2000. Frequency-dependent effect of nitric oxide donor nitroglycerin on bone. *J Bone Miner Res* 15:1119–1125





Wimalawansa SJ. 2000. *Nitroglycerin therapy is as efficacious as standard estrogen replacement therapy (Premarin) in prevention of oophorectomy-induced bone loss: a human pilot clinical study.* J Bone Miner Res 15:2240–2244

Witte MB, Barbul A. *Role of nitric oxide in wound repair.* Am J Surg 2002;183:406-12.

Wu G, Morris SM Jr. *Arginine metabolism: nitric oxide and beyond.* Biochem J 1998;336:1-17.

Cynober L. Can arginine and ornithine support gut functions? Gut 1994;35(1 Suppl):S42-5.

Xian Fan, Eileen Roy, Liping Zhu, Tamara C. Murphy, Cheryl Ackert-Bicknell, C. Michael Hart, Clifford Rosen, Mark S.

Nanes, Janet Rubin; Nitric Oxide Regulates Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand and

Osteoprotegerin Expression in Bone Marrow Stromal Cells, *Endocrinology*, Volume 145, Issue 2, 1 February

2004, Pages 751–759

Yoshida H, S.-I. Hayashi, T. Kunisada et al., “The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene,” Nature, vol.

345, no. 6274, pp. 442–444, 1990.