



**PENGARUH PEMBERIAN KAFEIN TERHADAP JUMLAH PEMBULUH
DARAH PADA LIGAMEN PERIODONTAL TIKUS YANG DI INDUKSI
GAYA ORTODONTI**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk meraih
gelar Sarjana Kedokteran Gigi (S1) pada Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Jember

Oleh

Farah Alvira
NIM 121610101029

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2016

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan kepada :

1. Tanah air Indonesia
2. Almamater tercinta saya Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
3. Ibunda saya Hj. Iim Halimatus Sa'diyah, SE; dan Ayahanda saya H. Sugiyarto, SH; Nenek Salwati dan Kakek Puguh Rahardjo yang selalu memberikan semangat dan doa
4. Adik-adik tersayang Ahmad Firdaus dan Salsabila
5. Guru-guru TK, SD, SMP, SMA dan dosen-dosen di Perguruan Tinggi yang telah mengajarkan saya mengenai ilmu pengetahuan di dunia ini.
6. Agama dan Bangsa yang saya cintai dan saya banggakan.

MOTTO

“Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan. Maka apabila engkau telah selesai (dari suatu urusan), tetaplah bekerja keras (untuk urusan yang lain).”

(Terjemahan Surat Al-Insyiroh: 6-7)*)

“Maka barang siapa mengerjakan kebaikan seberat *zarrah* niscaya dia akan melihat (balasan)nya.”

(Terjemahan Surat Az-Zalzalah: 19)*)

*) Departemen Agama Republik Indonesia. 2005. Al-Qur'an Al-Karim dan Terjemah Makna ke Dalam Bahasa Indonesia. Kudus : Menara Kudus.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Farah Alvira

NIM : 121610101029

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “*Pengaruh Pemberian Kafein terhadap Jumlah Pembedahan Darah pada Ligamen Periodontal Tikus yang diInduksi Gaya Ortodonti*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, Juni 2016

Yang menyatakan,

Farah Alvira

NIM 121610101029

SKRIPSI

**PENGARUH PEMBERIAN KAFEIN TERHADAP JUMLAH PEMBULUH
DARAH PADA LIGAMEN PERIODONTAL TIKUS YANG DI INDUKSI
GAYA ORTODONTI**

Oleh

**Farah Alvira
NIM 1216101010029**

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : drg. Hj. Herniyati, M.Kes

Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Nuzulul Hikmah, M.Biomed

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Pengaruh Pemberian Kafein terhadap Jumlah Pembuluh Darah pada Ligamen Periodontal Tikus yang Diinduksi Gaya Ortodonti” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember pada :

hari, tanggal : Senin, 27 Juni 2016

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Tim Penguji

Dosen Penguji Ketua

Dosen Penguji Anggota

drg. Budi Yuwono, M.Kes
NIP. 196709141999031002

drg. Hafiedz Maulana, M.Biomed
NIP. 198112042008121005

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Pendamping

drg. Hj. Herniyati, M.Kes
NIP. 195909061985032001

drg. Nuzulul Hikmah, M.Biomed
NIP. 198107172008012017

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Jember

drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Prost

NIP. 196901121996011001

RINGKASAN

Pengaruh Pemberian Kafein terhadap Jumlah Pembuluh Darah pada Ligamen Periodontal Tikus yang Diinduksi Gaya Ortodonti. Farah Alvira, 1216101010029;2016:70 halaman ; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Perawatan ortodonti merupakan perawatan pengaturan gigi geligi yang tidak teratur dengan cara menggerakannya ke tempat yang ideal. Proses pergerakan gigi tersebut bertujuan untuk mendapatkan perubahan dinamis dalam bentuk dan komposisi dari tulang dan jaringan lunak yang lebih baik dengan memberikan gaya ortodonti yang adekuat. Tingginya prevalensi maloklusi di Indonesia yang mencapai 80% menyebabkan kebutuhan akan perawatan ortodonti terus meningkat.

Pergerakan gigi secara ortodonti disebabkan oleh adanya *remodelling* jaringan periodontal akibat respon dari kekuatan mekanis yang diterima oleh ligamen periodontal. Pembuluh darah yang terdapat pada ligamen periodontal berupa pembuluh darah kapiler yang membentuk suatu anyaman (pleksus) yang mensuplai daerah apikal ligamen periodontal. Didalam ligamen periodontal terdapat pembuluh darah yang memberikan dua fungsi utama yaitu sebagai nutritif dan protektif bagi sel-sel ligamen periodontal dan menyediakan bahan gizi untuk aktivitas osteogenik, sementogenik, dan fibrogenik.

Kafein merupakan zat psikoaktif yang terdapat pada beberapa produk minuman seperti kopi, teh, dan cola dimana produk minuman tersebut paling banyak dikonsumsi di seluruh dunia. Batas aman konsumsi kafein yaitu sekitar 300mg/hari. Kafein memiliki kandungan berupa metil dimana metil dapat mengikat lipid yang terdapat pada permukaan sel endotel. Hasil penelitian Alexander (2013), menyatakan bahwa kafein dapat meningkatkan jumlah pembuluh darah melalui mekanisme hypoksia yang dimediasi oleh *hypoxia inducible factor-1* (HIF-1), HIF-1 Merupakan pengatur respon sel hypoxia. Penelitian tentang kafein menyebabkan kondisi hypoksia dengan dosis kafein sebesar 10 mg/kg Berat badan tikus.

Penelitian eksperimental laboratoris pada tikus sprague dawley ini menggunakan rancangan *the post test only control group design*. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai November 2015 di Laboratorium Fisiologi dan Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, serta Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Brawijaya dan RSUD dr. Soetomo. Sampel penelitian adalah 8 ekor tikus dengan kriteria tikus umur 3 bulan dan dalam keadaan sehat. Kelompok penelitian terdiri dari 2 kelompok (masing-masing terdiri dari 4 ekor tikus), yaitu kelompok kontrol yang diberi aquadest dan diinduksi gaya ortodonti dan kelompok perlakuan yang diberi sodase kafein pada lambung tikus dan diinduksi gaya ortodonti selama 21 hari. Selanjutnya hewan coba dieutanasia menggunakan eter secara inhalasi, kemudian dilakukan pengambilan rahang atas dimulai dari gigi molar 3 rahang atas kanan sampai gigi insisiv. Tahap selanjutnya yaitu melakukan pemrosesan jaringan dan pengecatan menggunakan larutan *Hematoxylin Eosin* kemudian dilakukan pengamatan jumlah pembuluh darah dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian kafein pada kelompok perlakuan dapat meningkatkan jumlah pembuluh darah pada daerah tekanan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hal ini sesuai dengan penelitian observasional sebelumnya yang menunjukkan bahwa pemberian kafein dengan dosis 10mg/kg Berat badan tikus sangat erat kaitannya dengan kondisi *hypoxia* yang memicu sintesis VEGF yang merupakan faktor pertumbuhan pembuluh darah. Didukung penelitian sebelumnya dimana kandungan metil dalam kafein dapat berikatan dengan lipid pada membran sel sehingga terjadi difusi bebas intercelluler dan mengakibatkan sel kekurangan Fe serta mengalami *hypoxia*. Kondisi *hypoxia* inilah yang memicu pengeluaran HIF 1 α (*Hypoxia Inducible Factor*) yang akan mensintesis (*Vascular Endothelial Growth Factor*) VEGF. VEGF inilah yang berperan dalam meningkatkan jumlah pembuluh darah.

Dosis kafein yang digunakan pada penelitian ini sebesar 1,37mg/100g Berat badan tikus. Menurut penelitian Alexander (2013), kafein dapat memicu kondisi

hypoksia dengan dosis sebesar 10mg/kg Berat badan tikus. Menurut penelitian Julien (2010), kafein dapat memicu kondisi hypoksia dengan dosis sebesar 20mg/kg Berat badan tikus. Dapat disimpulkan bahwasannya dosis yang diberikan pada penelitian ini dapat memicu kondisi hypoxia sehingga peningkatan jumlah pembuluh darah akibat dari pemberian kafein. Menurut penelitian Brodmann (2003), kafein dengan dosis 0,097mg/g Berat badan tikus dapat menyebabkan vasodilatasi pembuluh darah melalui mekanisme hypoxia yang menginduksi adenosin. Dapat disimpulkan bahwasannya dosis kafein pada penelitian ini dapat mempengaruhi jumlah pembuluh darah akibat dari proliferasi sel endotel melalui mekanisme vasodilatasi pembuluh darah.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah Subhanahu wa ta'ala atas segala rahmat dan karunia-Nya, serta shalawat dan salam selalu tercurah pada Nabi Muhammad Sallahu alaihi wasallam, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengaruh Pemberian Kafein terhadap Jumlah Pembuluh Darah pada Ligamen Periodontal Tikus yang Diinduksi Gaya Ortodonti”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes, Sp. Prost. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang telah memberikan kesempatan penulis untuk melakukan penelitian hingga selesainya penulisan ini. Dr.drg. I Dewa Ayu Susilawati M.Kes selaku Pembantu Dekan I, Dr.drg. Sri Hernawati, M.Kes selaku Pembantu Dekan II, dan drg. Izzata Barid, M. Kes selaku Pembantu Dekan III.
2. drg. Hj. Herniyati, M.Kes selaku dosen pembimbing utama dan drg. Nuzulul Hikmah, M.Biomed selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang telah banyak meluangkan waktunya untuk memberikan pengarahan dan bimbingan sejak awal hingga selesainya penulisan skripsi ini, serta drg. Budi Yuwono, M.Kes. selaku Dosen Penguji Ketua dan drg. Hafiedz Maulana, M.Biomed selaku Dosen Penguji Anggota pada saat ujian skripsi yang juga telah memberikan bimbingan demi kesempurnaan skripsi ini.
3. DR. drg. FX Ady Soesetidjo, Sp.Prost selaku dosen pembimbing akademik, terimakasih atas bimbingan dan motivasi yang begitu besar selama menempuh bangku perkuliahan.

4. Ibunda tercinta Hj. Iim Halimatus Sa'diyah SE dan ayahanda tercinta H. Sugiyarto SH. terima kasih untuk selalu menemani dalam setiap keadaan, semua semangat dan kasih sayang yang ibu dan bapak berikan, semua do'a yang dipanjatkan, kini satu persatu terwujud.
5. Nenek Salwati dan Kakek Puguh Rahardjo terimakasih atas semua doa yang telah dipanjatkan dan kata-kata motivasinya.
6. Adik-Adik saya Ahmad Firdaus dan Salsabila terimakasih sudah selalu menghibur dan memberikan senyuman diwajah ini.
7. Keluarga Besar Kakek H.Nur Wahid, Nenek Hj.Asiah, Tante dan Om yang saya sayangi.
8. Sahabat-sahabat sekaligus saudara saya di Jember, Amel, Vina, Tria, Gungis, Isna, Niken, Arum, Ayuk Roro, Sahabat seangkatan di FKG Universitas Jember, shabat-sahabat di kosan Silfi, Linda, Erica, Windy. Sahabat penelitian ayoek dan dian terimakasih selama ini sudah menemani dalam disetiap keadaan baik suka maupun duka. Terimakasih buat Silfi yang sudah meluangkan waktunya untuk membantuku dalam skripsi ini.
9. Staf Laboratorium Biologi-Kimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Pak Wibi, staf Laboratorium Biomedik Bu Wahyu dan Mas Agus, terimakasih telah menemani, membimbing dan membantu penelitian ini hingga selesai.
10. Teman-teman seperjuangan saya 2012, terimakasih atas segala kebersamaan
11. Semua pihak yang terlibat baik secara langsung maupun tidak langsung membantu dalam penelitian hingga tersusun menjadi karya tulis ini.

Penulis menyadari masih ada banyak ketidaksempurnaan dan kekurangan dalam penulisan skripsi ini, untuk itu kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan demi mengharap kesempurnaan penulisan selanjutnya. Akhir kata, Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat. Aamin.

Jember, Juni 2016

Penulis

DAFTAR ISI

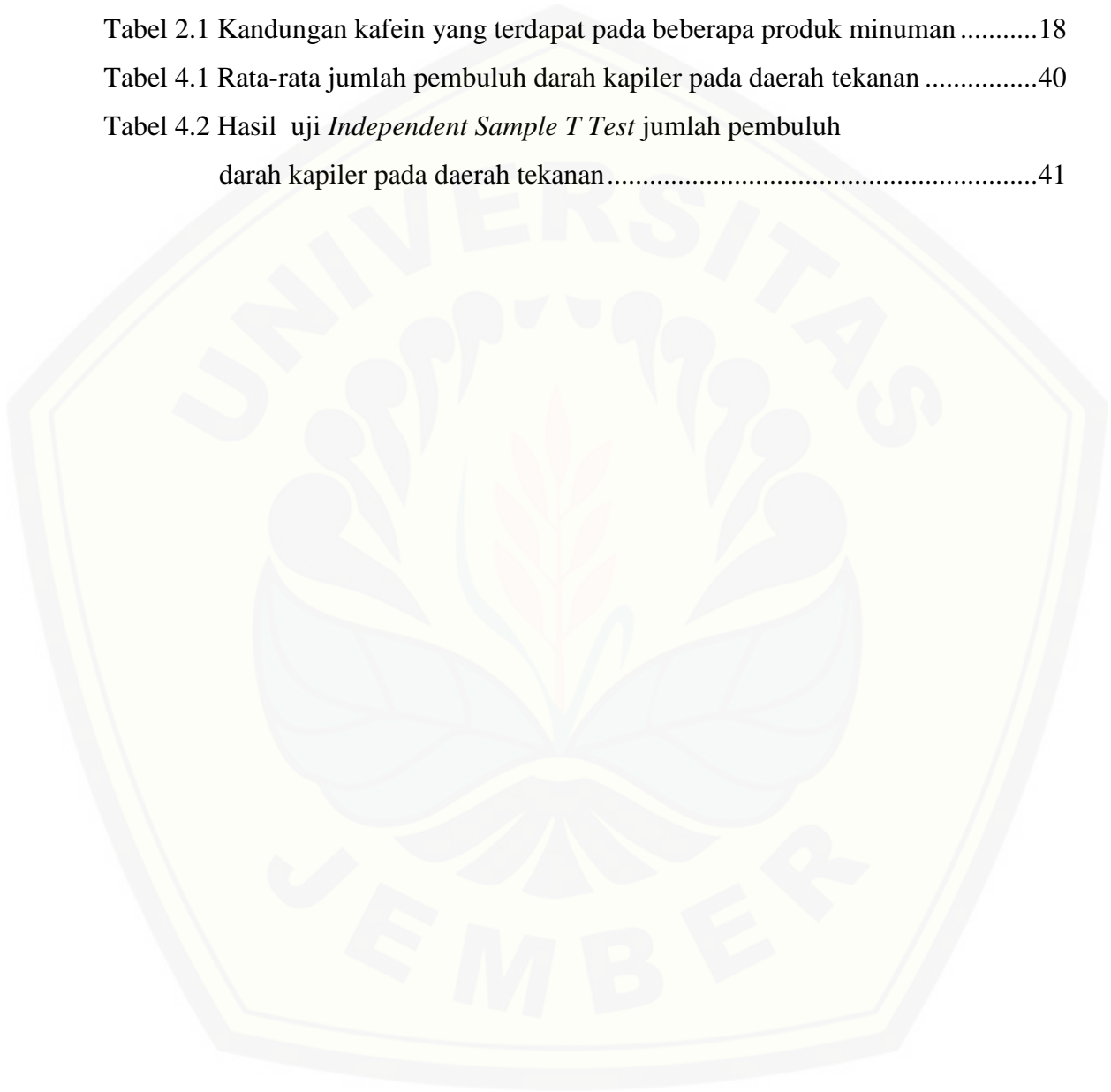
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Pembuluh Darah.....	5
2.1.1 Definisi.....	5
2.1.2 Struktur Pembuluh Darah.....	5
2.1.2.1 Pembuluh Darah Arteri.....	5
2.1.2.2 Pembuluh Darah Vena.....	6
2.1.2.3 Pembuluh Darah Kapiler	7
2.1.3 Pembentukan Pembuluh Darah Baru (<i>Angiogenesis</i>)	7
2.2 Ligamen Periodontal	8

2.2.1 Pembuluh Darah Pada Ligamen Periodontal	9
2.3 Pergerakan Gigi Secara Ortodonti	11
2.3.1 Definisi	11
2.3.2 Tahap-Tahap Pergerakan Gigi	11
2.3.3 Teori Pergerakan Gigi	11
2.3.4 Efek Distribusi Kekuatan dan Tipe Gerakan Gigi	13
2.3.5 Pengaruh Gaya Ortodonti Terhadap Pembuluh Darah pada Ligamen Periodontal.....	14
2.4 Kafein.....	16
2.4.1 Definisi Kafein	16
2.4.2 Sifat Kimia Kafein	16
2.4.3 Sumber Kafein.....	17
2.4.4 Farmakodinamik Kafein.....	18
2.4.5 Pengaruh Kafein Terhadap Pembuluh Darah pada Ligamen Periodontal yang Di Induksi Gaya Ortodontik.....	19
2.5 Kerangka Konseptual.....	21
2.6 Hipotesis	23
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	24
3.1 Jenis Penelitian.....	24
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	24
3.2.1 Tempat Penelitian.....	24
3.2.2 Waktu Penelitian	24
3.3 Identifikasi Variabel Penelitian.....	24
3.3.1 Variabel Bebas	24
3.3.2 Variabel Terikat.....	25
3.3.3. Variabel Terkendali.....	26
3.4 Sampel Penelitian	26
3.4.1 Kriteria Sampel Penelitian	26
3.4.2 Besar Sampel.....	27

3.5 Alat dan Bahan Penelitian	28
3.5.1 Alat-Alat Penelitian.....	28
3.5.2 Bahan Penelitian.....	28
3.6 Prosedur Penelitian	29
3.6.1 Tahap Persiapan	29
3.6.2 Pembagian Kelompok Hewan Coba	29
3.6.3 Pemasangan <i>Ni-Ti Closed Coil Spring Wire</i>	30
3.6.4 Pemberian Kafein	32
3.6.5 Evaluasi Pemakaian Alat.....	32
3.6.6 Pengambilan Jaringan	33
3.6.7 Dekalsifikasi Sampel Penelitian.....	34
3.6.8 Pemrosesan Jaringan	34
3.6.9 Pengecatan <i>Hematokxylin Eosin (HE)</i>	35
3.7 Tahap Pengamatan Histologi Pembuluh Darah	36
3.8 Analisis Data	36
3.9 Alur Penelitian	38
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	39
4.1 Hasil Penelitian	39
4.2 Hasil Penghitungan Rata-Rata Jumlah Pembuluh Darah Kapiler pada Daerah Tekanan	40
4.3 Pembahasan	42
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN.....	46
5.1 Kesimpulan.....	46
5.2 Saran	46
DAFTAR PUSTAKA	47
LAMPIRAN.....	53

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kandungan kafein yang terdapat pada beberapa produk minuman	18
Tabel 4.1 Rata-rata jumlah pembuluh darah kapiler pada daerah tekanan	40
Tabel 4.2 Hasil uji <i>Independent Sample T Test</i> jumlah pembuluh darah kapiler pada daerah tekanan.....	41



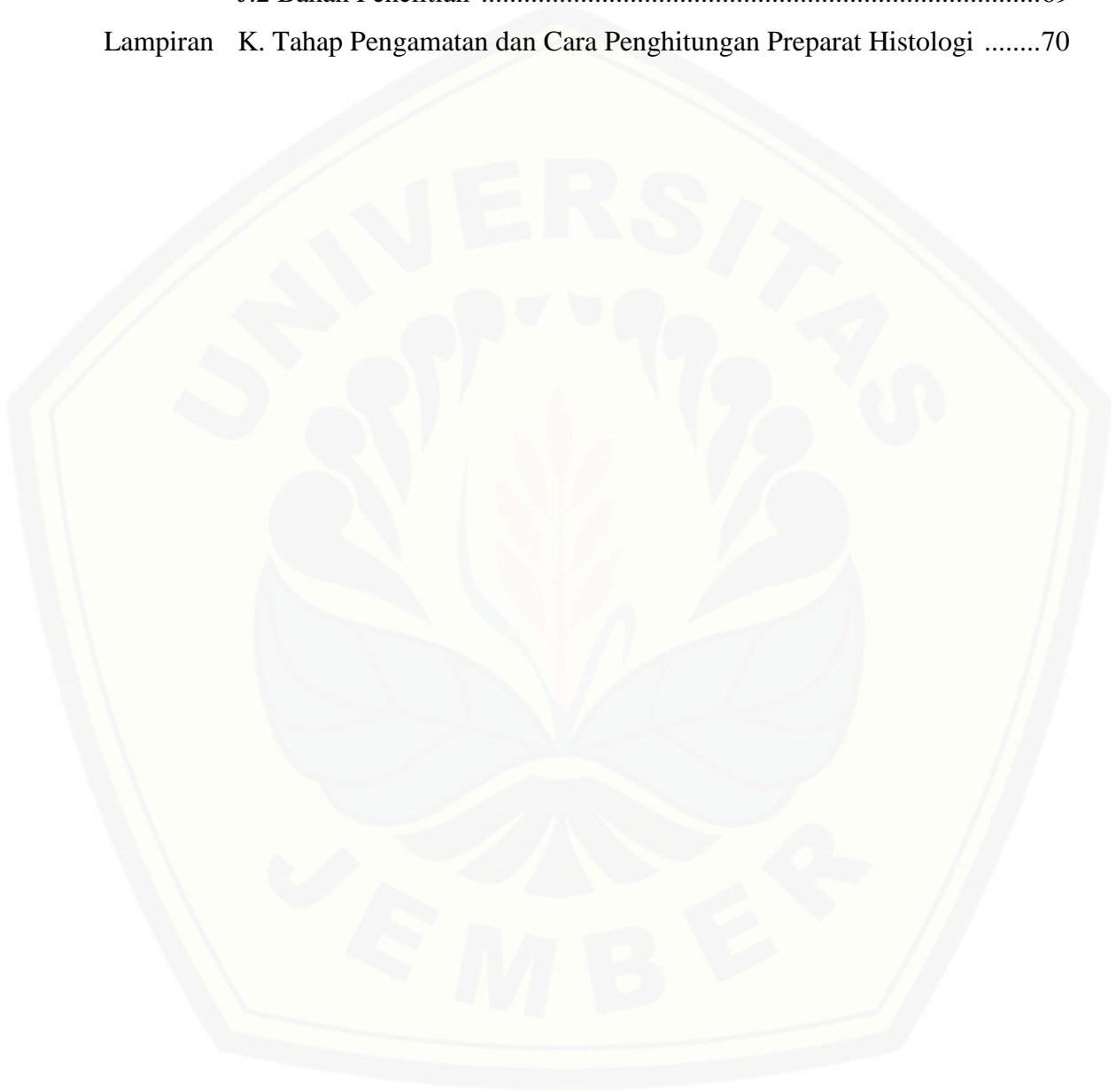
DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur Dinding Pembuluh Darah Arteri	6
Gambar 2.2 Struktur Pembuluh Darah Vena	6
Gambar 2.3 Gigi Melekat ke Tulang Alveolar Melalui Perlekatan Sementum dengan Ligamen Periodontal	8
Gambar 2.4 Struktur Pembuluh Darah Ligamen Periodontal Daerah Tekanan.....	10
Gambar 2.5 Struktur Pembuluh Darah Ligamen Periodontal Daerah Tarikan	10
Gambar 2.6 Perubahan Aliran Darah disekitar Ligamen Periodontal Daerah Tekanan	12
Gambar 2.7 Pergerakan Gigi Meliputi Tipping, Translasi dan Torque	13
Gambar 2.8 Mekanisme <i>Hypoxia</i> pada Sel	15
Gambar 2.9 Struktur Kimia Kafein <i>1,3,7-Trimethylxanthine</i>	17
Gambar 3.1 <i>Ni-ti Closed Coil Spring Wire</i>	30
Gambar 3.2 Gambar Pemakaian <i>Ni-Ti Closed Coil Spring Wire</i> pada Gigi Tikus dari Gigi Insisive Sampai Sela-Sela Antara	32
Gambar 3.2 Gambar Pemakaian <i>Ni-Ti Closed Coil Spring Wire</i> pada Gigi Molar Pertama dan Molar ke Dua	32
Gambar 4.1 Gambaran Histologis Potongan Transversal Gigi Molar..... Tikus Daerah Tekanan dan Tarikan dengan Pewarnaan	39
Gambar 4.1 Gambaran Histologis Potongan Transversal Gigi Molar..... Tikus Daerah Tekanan dan Tarikan dengan Pewarnaan	39
Gambar 4.2 Gambaran Histologis Pembuluh Darah Kapiler Daerah	40
Gambar 4.2 Gambaran Histologis Pembuluh Darah Kapiler Daerah	40
Gambar 4.2 Gambaran Histologis Pembuluh Darah Kapiler Daerah	40
Gambar 4.3 Rata-Rata Jumlah Pembuluh Darah pada Daerah Tekanan Ligamen Periodontal Gigi Tikus pada Kelompok Kontrol (K) dan Kelompok Perlakuan (P).....	41

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	A. Surat Keterangan Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Terpadu Universitas Gadjah Mada-Yogyakarta.....	53
Lampiran	B. Keterangan Kelaikan Etik.....	54
Lampiran	C. Sertifikat Pengujian	55
Lampiran	D. Pembuatan Seduhan Kopi Kering	56
	D.1 Seduhan Kopi	56
	D.2 Penetapan Kadar Kafein.....	57
Lampiran	E. Penghitungan Dosis Ketamin.....	58
Lampiran	F. Tabel Konversi Dosis (Tabel <i>Laurence-Bacharach</i>).....	59
Lampiran	G. Gambaran Histologis Pembuluh Darah Kapiler Daerah Tekanan.....	60
	G.1 Gambaran Histologis Potongan Transversal Gigi Molar Tikus	
	Dengan Pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE) Perbesaran 40x	60
	G.2 Gambaran Histologis Pembuluh Darah Kapiler pada	
	Ligamen Periodontal Daerah Tekanan dengan Pewarnaan.....	
	Hematoxylin Eosin (HE) Perbesaran 400x	61
	
Lampiran	H. Hasil Penghitungan Jumlah Pembuluh Darah	62
	H.1 Kelompok Perlakuan Kafein dan Induksi Gaya Ortodonti	
	Daerah Tekanan Hari ke 21	62
	H.2 Kelompok Kontrol Aquadest dan Induksi Gaya Ortodonti.....	
	Daerah Tekanan Hari ke 21	63
Lampiran	I. Analisis Data.....	66
	I.1 Uji Normalitas <i>Kolmogorov-smirnov</i>	66
	I.2 Uji Homogenitas <i>Levene-Statistik</i>	66
	I.3 Uji Independent <i>Sample T Test</i>	67

Lampiran J. Alat dan bahan penelitian	68
J.1 Alat Penelitian	68
J.2 Bahan Penelitian	69
Lampiran K. Tahap Pengamatan dan Cara Penghitungan Preparat Histologi	70



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Perawatan ortodonti merupakan perawatan pengaturan gigi geligi yang tidak teratur dengan cara menggerakannya ke tempat yang ideal. Proses pergerakan gigi tersebut bertujuan untuk mendapatkan perubahan dinamis dalam bentuk dan komposisi dari tulang dan jaringan lunak yang lebih baik dengan memberikan gaya ortodonti yang adekuat (Takashi, 2003). Tingginya prevalensi maloklusi di Indonesia yang mencapai 80% menyebabkan kebutuhan akan perawatan ortodonti terus meningkat (Dika, 2011).

Pergerakan gigi secara ortodonti disebabkan oleh adanya *remodelling* jaringan periodontal akibat respon dari kekuatan mekanis yang diterima oleh ligamen periodontal (Thilander, 2005). Pembuluh darah yang terdapat pada ligamen periodontal berupa pembuluh darah kapiler yang membentuk suatu anyaman (pleksus) yang mensuplai daerah apikal ligamen periodontal (Derringer, 1998). Didalam ligamen periodontal terdapat pembuluh darah yang memberikan dua fungsi utama yaitu sebagai nutritif dan protektif bagi sel-sel ligamen periodontal (Priyatmoko, 2014) dan menyediakan bahan gizi untuk aktivitas osteogenik, sementogenik, dan fibrogenik (Marquezan, 2013).

Hasil penelitian Knop (2012), menyatakan bahwa terdapat hubungan antara pergerakan gigi dengan sirkulasi pembuluh darah pada ligamen periodontal. Adanya gaya ortodonti akibat dari aplikasi alat ortodonti akan menyebabkan dua daerah yang terlibat yaitu daerah tekanan dan daerah tarikan pada ligamen periodontal. Pada daerah tekanan aliran darah akan berkurang karena pembuluh darah tertekan. Sedangkan pada daerah tarikan aliran darah bertambah. Perubahan aliran darah akan mengubah keadaan kimia darah. Suplai oksigen akan berkurang pada daerah tekanan dan daerah tarikan sehingga memicu suatu kondisi hypoksia pada pembuluh darah kapiler ligamen periodontal (Niklas, 2013). Gaya yang diaplikasikan pada perawatan ortodonti semakin lama semakin berkurang sehingga sel yang awalnya mengalami

hypoksia dapat survive dan berproliferasi. Daerah yang mengalami tekanan dan tarikan tersebut merangsang aktifnya mediator inflamasi yang disebabkan oleh aplikasi gaya ortodonti sehingga menimbulkan respon nyeri. Proses inflamasi merupakan respon dari injury (tekanan) yang dapat memicu sintesis *Vascular Endotelial Growth Factor* (VEGF) dan *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) yang berperan sebagai faktor pertumbuhan pembuluh darah baru (angiogenesis) (D'apuzzo, 2013).

Kafein merupakan zat psikoaktif yang terdapat pada beberapa produk minuman seperti kopi, teh, dan cola dimana produk minuman tersebut paling banyak dikonsumsi di seluruh dunia. Diperkirakan lebih dari 80% orang dewasa di Amerika Serikat mengonsumsi kafein setiap harinya (Nawrot, 2003). Batas aman konsumsi kafein yaitu sekitar 300mg/hari (Hardinsyah, 2008). Kafein memiliki kandungan berupa metil dimana metil dapat mengikat lipid yang terdapat pada permukaan sel endotel pembuluh darah (Julien, 2010). Hasil penelitian Alexander (2013), menyatakan bahwa kafein dapat meningkatkan jumlah pembuluh darah melalui mekanisme hypoksia yang dimediasi oleh *hypoxia inducible factor-1* (HIF-1), HIF-1 Merupakan pengatur respon sel hypoxia (Merighi, 2007).

Dalam hubungannya dengan pembuluh darah kafein dengan dosis 0,097mg/g berat badan tikus dapat mempengaruhi sel endotel dengan cara menstimulasi produksi *nitric oxide* yang mengakibatkan vasodilatasi pembuluh darah (Echeverri, 2010). Kafein menyebabkan kondisi hypoksia pada jaringan otak dengan dosis sebesar 10 mg/kg berat badan tikus (Alexander, 2013). Selain peningkatan dari *Vascular Endotelial Growth Factor* (VEGF) dan *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) yang merupakan faktor pertumbuhan pembuluh darah terjadi pelepasan mediator-mediator kimia yang akan mengaktifasi dan menstimulasi pembentukan pembuluh darah (Liu, 2011).

Kafein diduga dapat memicu peningkatan jumlah pembuluh darah. Penelitian eksperimental mengenai peningkatan jumlah pembuluh darah pada ligamen periodontal menggunakan hewan coba masih belum banyak diteliti. Oleh karena itu,

pada penelitian ini akan dipelajari pengaruh pemberian kafein terhadap peningkatan jumlah pembuluh darah pada ligamen periodontal gigi tikus yang di induksi gaya ortodonti.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah penelitian ini yaitu apakah pemberian kafein dapat meningkatkan jumlah pembuluh darah pada ligamen periodontal tikus yang di induksi gaya ortodonti?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui adanya peningkatan jumlah pembuluh darah pada ligamen periodontal tikus yang di induksi gaya ortodonti dengan pemberian kafein.

1.3.2 Tujuan Khusus

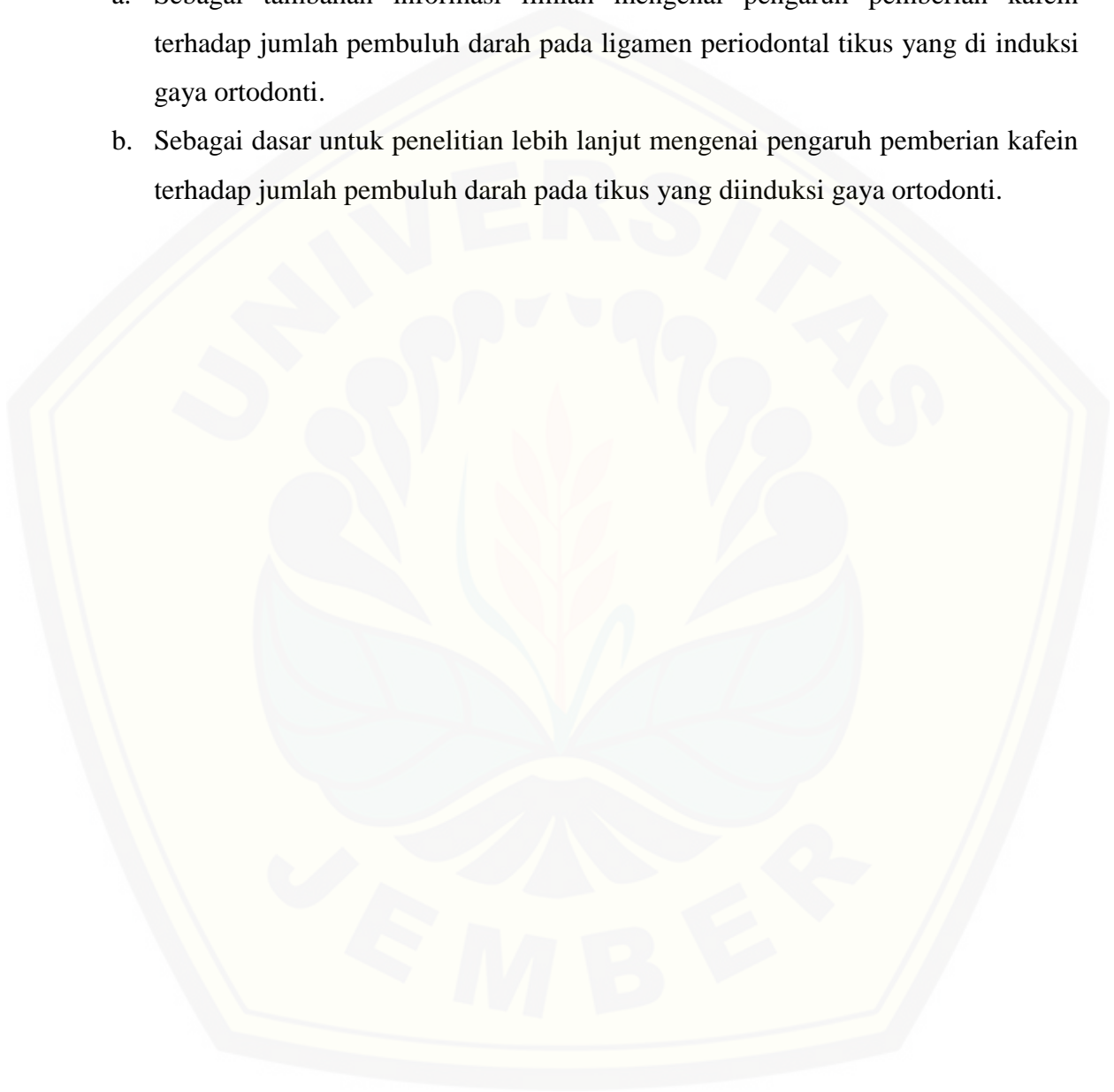
Tujuan khusus dari penelitian ini adalah:

- a. Mengetahui jumlah pembuluh darah pada daerah tekanan dan tarikan kelompok kontrol yang di induksi gaya ortodonti
- b. Mengetahui jumlah pembuluh darah pada daerah tekanan dan tarikan kelompok perlakuan yang diberi kafein dan di induksi gaya ortodonti
- c. Membandingkan jumlah pembuluh darah pada kelompok kontrol yang di induksi gaya ortodonti dan kelompok perlakuan yang diberi kafein dan di induksi gaya ortodonti

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini antara lain:

- a. Sebagai tambahan informasi ilmiah mengenai pengaruh pemberian kafein terhadap jumlah pembuluh darah pada ligamen periodontal tikus yang di induksi gaya ortodonti.
- b. Sebagai dasar untuk penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh pemberian kafein terhadap jumlah pembuluh darah pada tikus yang diinduksi gaya ortodonti.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pembuluh Darah

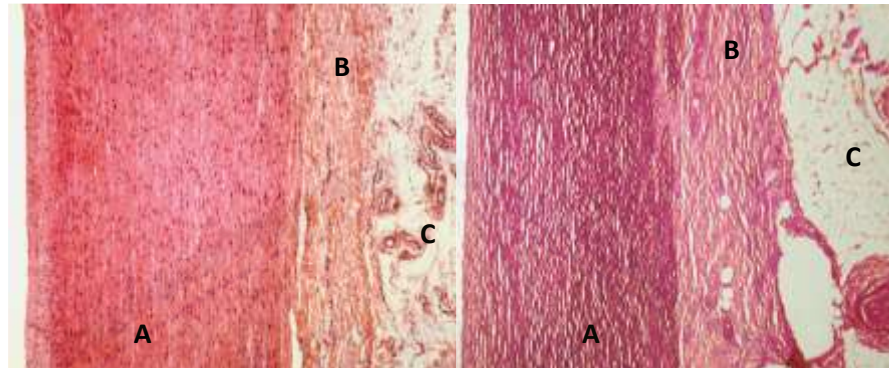
2.1.1 Definisi

Pembuluh darah adalah bagian dari sistem sirkulasi yang mengangkut darah ke seluruh tubuh. Dinding pembuluh darah terdiri dari tiga lapisan utama yaitu tunika eksterna atau adventisia, tunika media dan tunika intima. Tunika adventisia adalah lapisan terluar pembuluh darah. Tunika media adalah lapisan tengah pembuluh darah dan terdiri dari otot polos vaskular. Lapisan ketiga pembuluh darah adalah tunika intima yang terletak pada lapisan paling dalam. Lapisan ini tersusun dari sel-sel endotel (Corwin, 2007).

2.1.2 Struktur Pembuluh Darah

2.1.2.1 Pembuluh Darah Arteri

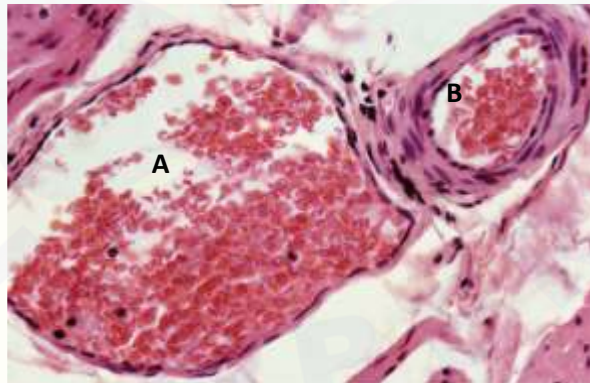
Arteri merupakan pembuluh darah yang keluar dari jantung yang membawa darah ke seluruh bagian tubuh arteri mempunyai dinding yang kuat dan tebal tetapi sifatnya elastis (Syarifuddin, 2006). Dinding arteri terdiri atas tiga lapis, lapisan terluar terdiri atas jaringan ikat fibrous, disebut tunika adventisia. lapisan tengah yang berotot dan elastis disebut tunica media, dan lapisan dalam yang endotelial disebut tunika intima (Gambar 2.1). Lapisan terluar pembuluh darah merupakan pelindung, sedangkan lapisan tengah pembuluh darah adalah lapisan yang kuat membuat pembuluh darah tetap terbuka dan dengan kontraksi serabut ototnya memberikan tekanan yang tetap terhadap darah. Lapisan dalam yang terbentuk oleh endotelium sangat licin, dibatasi selapis tunggal sel epitel gepeng (Pearce, 2010).



Gambar 2.1 Dinding Pembuluh Darah Arteri sebelah kiri (A) Tunika Intima, tengah (B) Tunika Media, sebelah kanan (C) Tunika Adventisia (Sumber : Ovalle, 2013)

2.1.2.2 Pembuluh Darah Vena

Vena (pembuluh darah balik) merupakan pembuluh darah yang membawa darah dari bagian tubuh masuk ke dalam jantung (Syaifuddin, 2006). Vena juga berdinding tiga lapis seperti seperti arteri, tetapi lapisan tengah berotot lebih tipis, kurang kuat, lebih mudah kempes, dan kurang elastis dari pada arteri (Gambar 2.2).



Gambar 2.2 Vena (A) Arteri (B) vena memiliki dinding yang lebih tipis dibandingkan arteri. (Sumber: Ovalle, 2013)

Oleh karena darah dalam anggota gerak berjalan melewati gaya berat, vena mempunyai katup yang disusun sedemikian sehingga darah dapat mengalir ke jantung tanpa jatuh kembali ke arah sebaliknya. Katupnya berbentuk lipatan setengah bulan

terdiri atas lapisan dalam vena yaitu endotelium, yang di perkuat sedikit jaringan fibrus (Pearce, 2010).

2.1.2.3 Pembuluh Darah Kapiler

Kapiler merupakan pembuluh darah yang sangat kecil, tempat arteri berakhir. Diameternya kira-kira 0,008 mm. Bagian tubuh yang tidak terdapat kapiler yaitu rambut, kuku, dan tulang rawan. Pembuluh darah kapiler umumnya meliputi sel-sel jaringan karenanya berhubungan langsung dengan sel (Syarifuddin, 2006).

Dindingnya terdiri dari suatu lapisan endotel. Semakin kecil arteriol semakin menghilang ketiga lapis dindingnya sehingga ketika sampai pada kapiler yang sehalus rambut, dinding itu tinggal satu lapis saja, yaitu lapisan endotelium. Lapisan yang sangat kecil itu memungkinkan limfe merembes keluar membentuk cairan jaringan dan membawa air, mineral, dan zat makanan untuk sel, dan melalui pertukaran gas antara pembuluh kapiler dan jaringan sel, menyediakan oksigen, serta menyingkirkan bahan buangan termasuk karbon dioksida. Oleh sebab itu kapiler melaksanakan fungsi yang sangat penting sebagai distributor zat-zat penting ke jaringan yang memungkinkan berbagai proses dalam tubuh berjalan (Pearce, 2010).

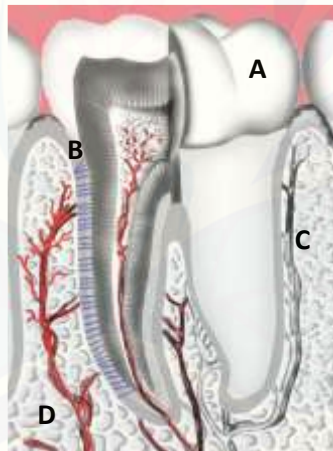
2.1.3 Pembentukan Pembuluh Darah Baru (*Angiogenesis*)

Pembentukan pembuluh darah baru dari pembuluh darah yang sudah ada dinamakan dengan Angiogenesis. Angiogenesis dapat terjadi melalui proses fisiologis maupun proses patologis. Dalam proses fisiologis angiogenesis terjadi saat perkembangan embrionik, penyembuhan luka, dan siklus menstruasi. Sedangkan dalam proses patologis angiogenesis terjadi pada kanker (tumor solid dan hematologis), penyakit kardiovaskuler (aterosklerosis, restenosis), dan inflamasi kronis (*reumatoid arthritis*). Pertumbuhan pembuluh darah baru untuk mensuplai

oksigen dan nutrisi dan menghilangkan produk-produk yang tidak digunakan lagi oleh tubuh (Schwab, 2001).

2.2 Ligamen Periodontal

Ligamen periodontal merupakan jaringan ikat fibrous yang padat dan berada dalam ruangan periodontal antara akar gigi dan tulang alveolar. Lebar jaringan periodontal ini berkisar antara 0,15-0,38 mm. Daerah yang tersempit terletak pada daerah fulkrum dan terlebar di daerah *alveolar crest*. Perlekatan gigi ke tulang alveolar melalui perlekatan sementum dengan ligamen periodontal. Bagian luar tulang alveolar adalah korteks yang merupakan fraksi struktural dan juga merupakan bagian terpenting dari proses remodelling tulang. (Gambar 2.3) (Priyatmoko, 2014).



Gambar 2.3 Gigi melekat ke tulang alveolar melalui perlekatan sementum dengan ligamen periodontal (A) Gigi, (B) Ligamen Periodontal, (C) Tulang Alveolar, (D) Tulang Kortikal (Sumber: Niklas, 2013)

Ligamen periodontal terdiri atas matriks ekstraseluler yang terutama terdiri atas serat kolagen dengan bahan dasar proteoglikans dan glukoprotein serta serat oksitalin. Pada ligamen periodontal juga terdapat beberapa sel, yaitu fibroblas, osteoblas, osteoklas, dan sementoblas. Selain itu masih ada sel-sel lain misalnya

macrophages dan terkadang terdapat sisa-sisa sel *malassez* serta banyak pembuluh darah kapiler yang merupakan pleksus. Ligamen periodontal beserta cairan yang terdapat pada soket gigi berfungsi sebagai bantalan (*shock absorber*) bagi gigi bila mendapat tekanan yang mendadak. Selain itu juga berpengaruh pada proses erupsi gigi dan pergerakan gigi dalam perawatan ortodonti (Rahardjo, 2009).

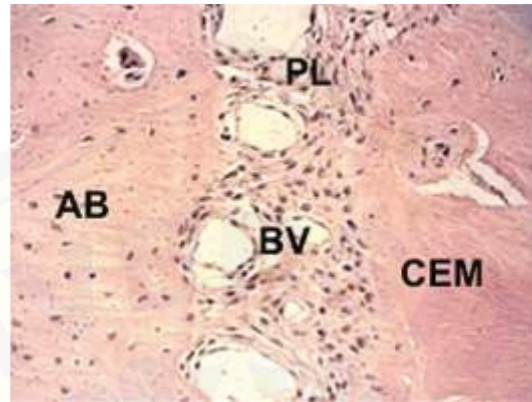
Ligamen periodontal memiliki peranan yang sangat penting dalam proses pergerakan gigi secara ortodonti karena kemampuan jaringan ini dalam merespon kekuatan mekanik yang diterimanya menyebabkan adanya *remodelling* tulang alveolar sehingga gigi bisa bergerak. apabila suatu kekuatan yang optimal dikenakan pada gigi maka daerah tarikan pada ligamen periodontal mengalami aposisi tulang dan daerah tekanan akan terjadi resorpsi tulang (Rahardjo, 2009).

2.2.1. Pembuluh Darah Pada Ligamen Periodontal

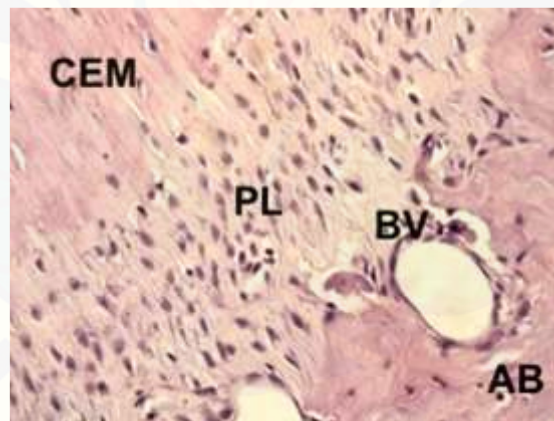
Pembuluh darah yang terdapat pada ligamen periodontal adalah pembuluh darah kapiler. Kapiler merupakan pembuluh darah yang sangat kecil, tempat arteri berakhir. Dindingnya terdiri dari suatu lapisan endotel. Lapisan yang sangat kecil itu memungkinkan limfe merembes keluar membentuk cairan jaringan dan membawa air, mineral, dan zat makanan untuk sel, dan melalui pertukaran gas antara pembuluh kapiler dan jaringan sel, menyediakan oksigen, serta menyingkirkan bahan buangan termasuk karbon dioksida. Oleh sebab itu kapiler melaksanakan fungsi yang sangat penting sebagai distributor zat-zat penting ke jaringan yang memungkinkan berbagai proses dalam tubuh berjalan (Pearce, 2010).

Fungsi dari pembuluh darah kapiler adalah sebagai alat penghubung antara pembuluh darah arteri dan vena, tempat terjadinya pertukaran zat-zat antara darah dan cairan jaringan, dan mengambil hasil-hasil dari kelenjar (Syarifuddin, 2006). Ligamen periodontal terletak diantara tulang alveolar dan sementum, Pembuluh darah kapiler yang terdapat pada ligamen periodontal mengalami penyempitan pada daerah tekanan

(Gambar 2.4) dan mengalami pelebaran pada daerah tarikan (Gambar 2.5) (Shintcovsk, 2014).



Gambar 2.4 Pembuluh Darah (BV), Tulang Alveolar (AB), Sementum (CEM), pada Ligamen periodontal yang mengalami Tekanan alat orthodontik terlihat penyempitan pembuluh darah (Shintcovsk, 2014)



Gambar 2.5 Pembuluh Darah (BV), Sementum (CEM), Tulang Alveolar (AB), Ligamen Periodontal (PL) Pada daerah tarikan pembuluh darah terlihat melebar (Shintcovsk, 2014)

2.3 Pergerakan Gigi secara Ortodonti

2.3.1 Definisi

Pergerakan gigi secara ortodonti merupakan kombinasi dari reaksi biologis yaitu tekanan yang dihasilkan oleh gaya ortodonti pada ligamen periodontal dan tulang alveolar (Takashi, 2003). Gaya ortodonti tersebut berasal dari piranti ortodonti yang digunakan (kawat, braket, dan elastomer). Gigi geligi dan jaringan pendukungnya merespon gaya tersebut dengan suatu reaksi biologis yang kompleks sehingga terjadi pergerakan gigi melalui tulang (Williams, 2000).

2.3.2 Tahap-Tahap Pergerakan Gigi

Terdapat tiga tahap dalam pergerakan gigi, yaitu (Burstone, 1962):

a) *Initial phase* (tahap awal)

Ditandai dengan gerakan segera cepat dan terjadi 24 jam sampai 48 jam setelah aplikasi pertama kekuatan untuk gigi dan merupakan gerakan awal dari gigi dalam soket tulang.

b) *Lag phase*

Berlangsung selama 20 sampai 30 hari dan menunjukkan tidak ada pergerakan gigi. Fase ini ditandai dengan terjadinya hialinisasi.

c) *Postlag phase* mengikuti *lag phase* dimana terjadi peningkatan dalam pergerakan gigi.

2.3.3 Teori Pergerakan Gigi

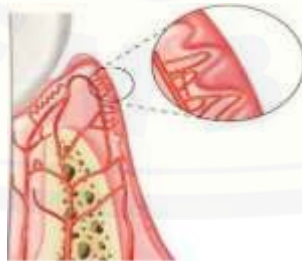
Terdapat dua mekanisme yang mempengaruhi pergerakan gigi secara ortodonti yaitu teori elektrisitas biologis (*biologic electricity*) dan teori tekanan-tarikan (*pressure-tension*) yang terjadi pada ligamen periodontal sehingga mempengaruhi aliran darah.

1. *Piezoelectric Theory*

Teori elektrisitas biologis (*piezoelectric*) berhubungan dengan perubahan metabolisme pada tulang yang dikontrol sinyal elektrik yang terjadi ketika tulang alveolar berubah bentuk karena tekanan. Sinyal elektrik mempengaruhi reseptor membran sel atau permeabilitas membran (atau keduanya) dan keadaan ini mempengaruhi aktivitas sel. Pada suatu penelitian didapatkan kenyataan bahwa tulang mempunyai efek piezoelektrik kurang lebih delapan kali dentin dan sementum. Kekuatan efek *piezoelectric* berkorelasi dengan kemampuan jaringan untuk mengadakan *remodelling*. Karena tulang mempunyai efek piezoelektrik yang besar maka tulang paling mudah melakukan *remodelling* (Devonshire, 1954).

2. *Pressure Tension Theory*

Jika gigi mendapatkan gaya ortodonti maka akan terjadi daerah tekanan dan tarikan. Sehingga terjadi perubahan kimiawi pada ligamen periodontal sebagai stimulus perubahan seluler pada pergerakan gigi. Perubahan aliran darah pada ligamen periodontal karena adanya tekanan yang lama menyebabkan gigi bergeser dalam soket gigi dan mempengaruhi ligamen periodotal. Aliran darah dan pasokan oksigen berkurang pada ligamen periodontal yang tertekan sedangkan pada ligamen periodontal yang tertarik pasokan darah tetap atau bertambah (Gambar 2.6). Perubahan kimiawi juga mempengaruhi pelepasan agen biologi aktif yang merangsang diferensiasi dan aktivitas sel (Schwarz, 1932).

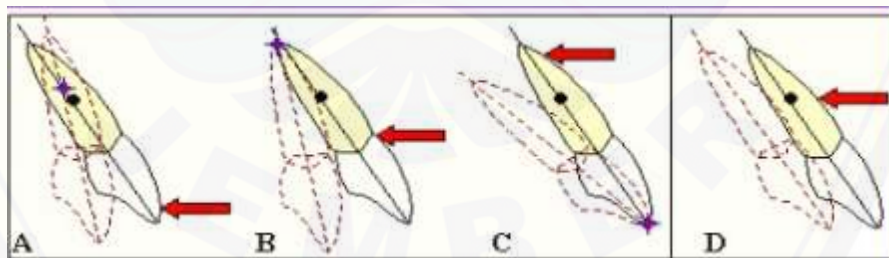


Gambar 2.6 Perubahan aliran darah disekitar ligamen periodontal daerah tekanan (Sumber : Rose, 2011)

Tekanan yang besar menyebabkan pembuluh darah di daerah yang tertekan mengecil atau bahkan menutup sehingga tidak ada aliran darah sama sekali. Bila tekanan yang kecil berlangsung lama pada gigi akan terjadi sedikit kompresi pada ligamen periodontal, ada aliran cairan keluar dari ligamen periodontal dan gigi bergerak dalam soketnya. Kekuatan yang diperlukan dalam menggerakkan gigi sebaiknya adalah kekuatan yang cukup untuk merangsang aktivitas sel tanpa menyebabkan tertutupnya pembuluh darah pada ligamen periodontal. Distribusi kekuatan yang mengenai ligamen periodontal berbeda tergantung pada tipe gerakan gigi dan kekuatan yang digunakan.

2.3.4 Efek Distribusi Kekuatan dan Tipe Gerakan Gigi

Kekuatan yang diperlukan untuk menggerakkan gigi sebaiknya adalah kekuatan yang cukup untuk merangsang aktivitas sel tanpa menyebabkan tertutupnya pembuluh darah pada ligamen periodontal. Distribusi kekuatan pada ligamen periodontal berbeda-beda tergantung pada tipe gerakan gigi dan kekuatan yang digunakan. Terdapat beberapa tipe gerakan gigi dalam perawatan ortodonti yaitu *tipping*, translasi, ekstrusi, dan intrusi (Gambar 2.7) (Traves, 2004).



Gambar 2.7 (A) Tipping tidak terkontrol, (B) Tipping terkontrol, (C) Torque, (D) Translasi atau Bodily. Tanda panah merah merupakan gaya yang diberikan pada gigi. (Sumber : Cordasco, 2010).

Tekanan ringan pada gigi akan mengakibatkan gerakan *tipping* yang dihasilkan dari kekuatan tunggal yang diaplikasikan dari peranti lepasan. Tekanan

yang diberikan untuk menggerakkan gigi secara *tipping* tidak melebihi 50 gram. Kekuatan yang diberikan sekitar 35 gram untuk gigi insisiv dan 60 gram untuk gigi berakar ganda. Seluruh ligamen periodontal mendapatkan tekanan yang sama sehingga dibutuhkan kekuatan yang besarnya dua kali besar kekuatan *tipping* yaitu sekitar 100gram. Gerakan translasi biasanya dihasilkan oleh piranti cekat dengan besar kekuatan 70 gram untuk insisiv dan 100 gram untuk gigi posterior. Untuk gerakan instruksi diberikan tekanan yang sangat ringan kurang lebih 10 gram untuk insisiv dan 20 gram untuk gigi posterior karena kekuatan akan terkonsentrasi pada daerah yang sangat sempit disekitar apeks. Tekanan yang besar akan mengakibatkan *undermining resorption* selain akan terjadi resorpsi pada apeks (Rahardjo, 2009)

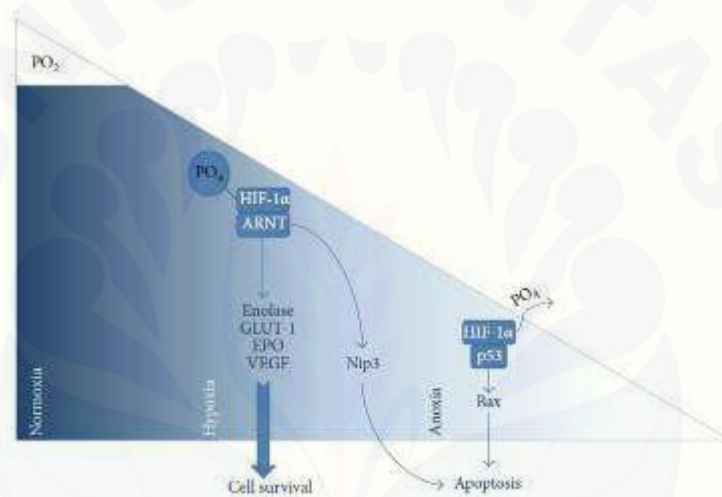
Untuk menggerakkan gigi secara ortodonti diperlukan kekuatan yang bisa bertahan dalam waktu yang lama tetapi bukan berarti harus kekuatan yang berkesinambungan (*continuous force*). kekuatan tersebut harus tetap ada beberapa jam per hari untuk dapat menimbulkan reaksi seluler pada ligamen periodontal. Durasi kekuatan peranti ortodonti dapat dibagi sebagai berikut : Kekuatan berkesinambungan (*continuous force*) yang mempunyai kekuatan hampir sama seperti ketika dipasang sampai waktu yang lama, Kekuatan yang terputus-putus (*interrupted force*) yaitu kekuatan yang turun sampai nol setelah beberapa waktu. Kekuatan intermitten, yaitu kekuatan yang turun menjadi nol secara tiba-tiba ketika peranti orthodonti dilepas oleh pasien (Rahardjo, 2009).

2.3.5 Pengaruh Gaya Ortodonti terhadap Pembuluh Darah pada Ligamen Periodontal

Gaya ortodonti yang ditimbulkan akibat aplikasi alat orthodonti cekat dapat memicu terjadinya *injury* mekanik bagi jaringan periodontal. Proses inflamasi yang terjadi sebagai respon dari keberadaan *injury* dapat memicu sintesis *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) dan *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) berperan dalam proses angiogenesis (Newman, 2011). Aplikasi gaya ortodonti mengakibatkan

terjadinya tekanan pada ligamen periodontal sehingga memicu pengeluaran HIF 1 α dan kondisi hypoksia.

Gaya yang diaplikasikan semakin lama akan mengalami penurunan sehingga sel endotel dapat survive dan berproliferasi (Gambar 2.8). Faktor angiogenik berupa faktor pertumbuhan kemudian berikatan dengan reseptor yang spesifik yang terdapat pada reseptor sel endotel (EC) disekitar lokasi pembuluh darah lama. Ketika faktor angiogenik berikatan dengan reseptornya, sel endotel akan teraktivasi dan menghasilkan signal yang kemudian dikirim dari permukaan sel ke nukleus.



Gambar 2.8 Hypoksia dimediasi oleh HIF 1 α yang Mengakibatkan sel *survive* atau apoptosis (Niklas, 2013)

Organel-organel sel endotel kemudian mulai memproduksi molekul baru antara lain enzim protease yang berperan penting dalam degradasi matriks ekstraselluler untuk mengakomodasi percabangan pembuluh darah. Faktor pertumbuhan angiopoietin, serta aktivitas enzim-enzim yang dihasilkan oleh sel endotel yang teraktivasi seperti matrix metalloproteinase dibutuhkan untuk menginisiasi pembentukan pembuluh darah baru (Dai, 2007).

2.4 Kafein

Kafein pertama kali ditemukan pada tahun 1827 dan dinamakan *theine* pada teh memiliki sifat yang sama dengan kafein pada kopi, kemudian nama *theine* sudah tidak digunakan lagi. Jumlah kafein yang terkandung didalam teh maupun kopi tergantung pada berbagai faktor seperti jenis daun, tempat tumbuhnya tanaman, ukuran partikel, serta metode dan lamanya waktu penyeduhan. Lokasi perkebunan teh dan kopi juga mempengaruhi kadar kafein pada daun teh dan kopi tersebut (Mokhtar, 2000).

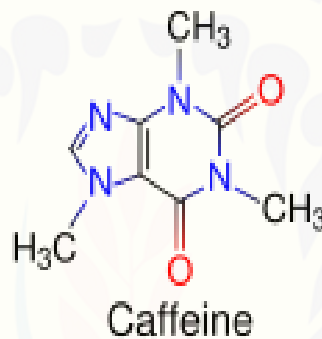
2.4.1 Definisi Kafein

Kafein merupakan senyawa kimia alkaloid yang mempunyai rasa pahit dan berwarna putih yang berguna dalam bidang obat-obatan sebagai bahan aditif. Kandungan kafein paling banyak ditemukan pada biji kopi. Kandungan kafein pada biji kopi arabika berkisar antara 1-2% dan pada kopi robusta sekitar 1,5% (Nopitasari, 2010). Kandungan kafein pada teh sebesar (1-4,8%), kopi (1-1,5%), dan biji kola (2,7-3,6%). Kafein diproduksi secara komersial dengan cara ekstraksi dari tanaman tertentu serta diproduksi secara sintetis. Kebanyakan produksi kafein bertujuan untuk memenuhi kebutuhan industri minuman. Kafein juga digunakan sebagai penguat rasa atau bumbu pada berbagai industri makanan (Misra, 2008).

2.4.2 Sifat Kimia Kafein

Kafein termasuk ke dalam senyawa kimia golongan *methylxanthine* bersama dengan senyawa *tefilin* dan *teobromin*, yang berlaku sebagai perangsang sistem saraf pusat. Ketiga senyawa tersebut mempunyai daya kerja sebagai stimulan sistem syaraf pusat, stimulan otot jantung, meningkatkan aliran darah melalui arteri koroner, relaksasi otot polos bronki, dan aktif sebagai diuretika, dengan tingkatan yang berbeda (Mumin, 2006). Kafein dalam bentuk murni muncul sebagai bedak kristal

putih yang pahit dan tidak berbau. Rumus kimia kafein adalah $C_8H_{10}N_4O_2$ dan memiliki nama kimia *1,3,7-trimethylxanthine* (Gambar 2.9). Nama IUPAC untuk kafein adalah *1,3,7-trimethyl-1H-purine-2,6(3H,7H)-dione*, *3,7-dihydro-1,3,7-trimethyl-1H-purine-2,6-dione* (Erowid, 2011). Dasar-dasar seluler dan kerja xantin adalah bergabung dengan translokasi ion Ca intraseluler, berhubungan dengan peningkatan akumulasi c-AMP, dan berhubungan dengan blok pada reseptor adenosin. Kandungan metil pada kafein dapat mengikat lipid yang ada pada dinding sel sehingga sel mengalami difusi bebas (Ganisware, 1995).



Gambar 2.9 Struktur Kimia Kafein *1,3,7-trimethylxanthine*
(Sumber: Heckman, 2010)

2.4.3 Sumber Kafein

Kafein merupakan senyawa kimia yang dijumpai secara alami di dalam makanan contohnya biji kopi, teh, buah kola (*cola nitide*), *guarana*, dan *mate*. Teh merupakan sumber kafein yang lain dan mengandung setengah dari kafein yang terkandung dalam kopi. Beberapa tipe teh yaitu teh hitam yang mengandung lebih banyak kafein dibandingkan dengan jenis teh lainnya. Selain itu kafein juga terkandung dalam beberapa minuman non alkohol seperti cola, pepsi, minuman kopi, teh, minuman coklat, dan minuman berenergi (Tabel 2.1) (Yi, 2015).

Tabel 2.1 Kandungan kafein yang terdapat pada beberapa produk minuman

Produk Minuman	Kandungan Kafein	Rata – Rata
45,6 mg/12 oz	Coca Cola	
38,4 mg/12 oz	Pepsi	
36,0 mg/12 oz	RC Cola	
60-180 mg	Minuman Kopi	115mg/5 oz
20-90 mg	Minuman Teh	40 mg/5 oz
2-7 mg	Minuman Coklat Susu	5 mg/8oz
50 mg	Minuman Energi (kratindeng, M 150, Galin Bulgar, dll)	

Sumber : Sianturi, 2001

2.4.4 Farmakodinamik Kafein

Kafein mempunyai efek relaksasi otot polos, terutama otot polos *bronchus*, merangsang susunan syaraf pusat, otot jantung dan meningkatkan deuresis. Pengaruh kafein pada pembuluh darah dapat menyebabkan dilatasi pembuluh darah termasuk pembuluh darah koroner dan pulmonal, karena efek langsung pada otot pembuluh darah (Aghili, 2014). Kafein dapat menstimulasi pusat vasomotor dan pusat pernafasan, tetapi tekanan darah tidak naik karena pada saat yang bersamaan juga terjadi dilatasi pembuluh kulit, ginjal, dan koroner. Akibat kerja kafein pada sistem saraf perifer (Mutschler, 1991). IFIC (*International Food Information Council*) pada tahun 2008 mengkaji beberapa dampak positif mengkonsumsi kafein seperti mengurangi resiko penyakit diabetes melitus tipe 2. Hal ini dibuktikan dengan adanya penelitian yang telah dilakukan oleh Keijzers (2002) bahwa kafein dapat meningkatkan metabolisme glukosa. Kafein juga bermanfaat menurunkan resiko

kanker hati, cirrhosis (inflamasi kronis pada hati), meingkatkan daya tahan otot (Bruce, 2000).

2.4.5 Pengaruh Kafein terhadap Pembuluh Darah pada Ligamen Periodontal yang Diinduksi Gaya Ortodonti

Kafein merupakan derivat xantin yang mengandung gugus *metil* dalam bentuk *1,3,7-trimetil xantin*. Derivat xantin akan bergabung dengan translokasi ion Ca^{2+} intraseluler, berhubungan dengan peningkatan akumulasi c-AMP, dan berhubungan dengan blok reseptor adenosin (Ganisware, 1995). Kandungan kafein berupa *metil* akan berikatan dengan lipid yang terdapat pada dinding sel sehingga tegangan permukaan pada dinding sel mengalami penurunan yang mengakibatkan difusi bebas intraseluler (Julien, 2010). Dalam hubungannya dengan pembuluh darah kafein bekerja sebagai penghambat Fe sehingga sel mengalami hypoksia dan mengeluarkan HIF 1 α sehingga memicu dari sintesis VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) yang merupakan faktor pertumbuhan pembuluh darah (Merighi, 2007).

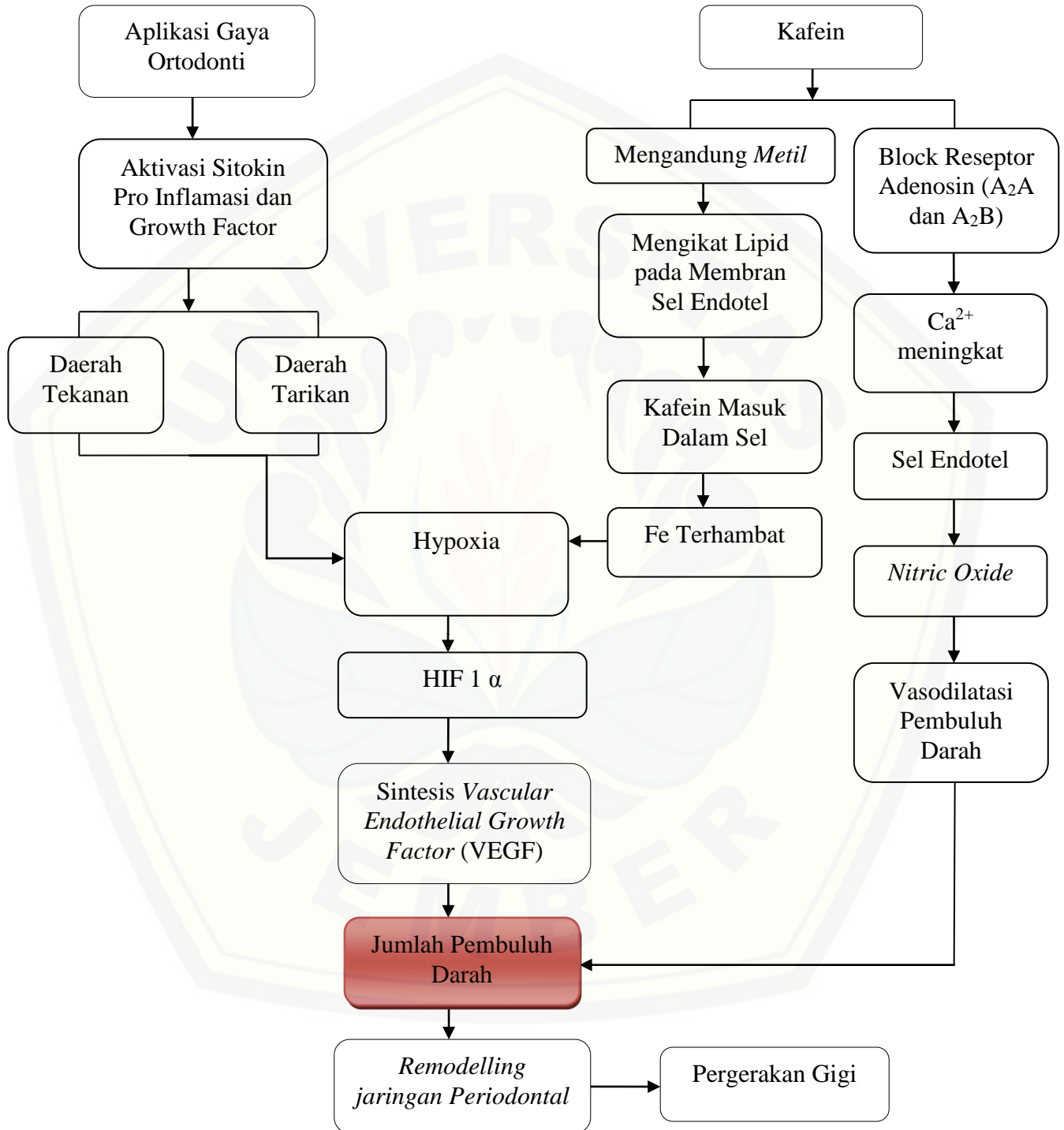
VEGF merupakan glikoprotein pengikat heparin. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa heparin berinteraksi dengan VEGF melalui pembentukan kompleks Heparin-VEGF yang menyebabkan perubahan molekul sehingga VEGF menjadi lebih stabil, lebih resisten terhadap inaktivasi dan memiliki waktu paruh yang lebih panjang (Domenico, 2012). Pembentukan kompleks Heparin-VEGF menyebabkan terjadinya afinitas reseptor VEGF yang terdapat pada permukaan sel sehingga terbentuk signal intraseluler sebagai bentuk aktivasi terjadinya proliferasi (Nayak, 2013).

Faktor angiogenik berupa faktor pertumbuhan VEGF kemudian berikatan dengan reseptor yang spesifik yang terdapat pada reseptor sel endotel (EC) disekitar lokasi pembuluh darah lama. Ketika faktor angiogenik berikatan dengan reseptornya, sel endotel akan teraktivasi dan menghasilkan signal yang kemudian dikirim dari permukaan sel ke nukleus. Organel-organel sel endotel kemudian mulai memproduksi

molekul baru antara lain enzim protease yang berperan penting dalam degradasi matriks ekstraselluler untuk mengakomodasi percabangan pembuluh darah. Faktor pertumbuhan *angiopoietin*, serta aktivitas enzim-enzim yang dihasilkan oleh sel endotel yang teraktivasi seperti *matrix metalloproteinase* dibutuhkan untuk menginisiasi pembentukan pembuluh darah baru (Dai, 2007)



2.5 Kerangka Konsep Penelitian



Aplikasi gaya ortodonti memicu pengeluaran sitokin proinflamasi dan *growth factor* (faktor pertumbuhan) pada daerah tekanan dan daerah tarikan ligamen periodontal. Aplikasi gaya ortodonti juga memicu suatu kondisi *hypoxia* dimana hipoksia akan direspon oleh faktor transkripsi hipoksia inducible factor (HIF-1) yang terdiri dari HIF 1 α dan HIF 1 β yang bekerja pada proses angiogenesis.

Kafein memiliki kandungan berupa metil dimana metil dapat mengikat lipid yang terdapat pada permukaan sel endotel sehingga kafein mudah berdifusi masuk ke dalam sel dan terjadi resistensi Fe diluar sel yang mengakibatkan sel mengalami hypoksia. Sel yang mengalami hypoksia direspon oleh faktor transkripsi hipoksia inducible factor (HIF-1), dimana HIF 1 α dapat memicu sintesis *Vascular Endotelial Growth Factor* (VEGF) sehingga terjadi peningkatan jumlah pembuluh darah.

Kafein memiliki mekanisme selluler yaitu memblok reseptor adenosin (A_{2A} dan A_{2B}) sehingga mengakibatkan peningkatan kalsium darah. Peningkatan kalsium dapat mempengaruhi jumlah pembuluh darah dengan cara menstimulasi produksi *nitric oxide* pada sel endotel yang mengakibatkan vasodilatasi pembuluh darah. Vasodilatasi pembuluh darah berperan penting untuk suplay nutrisi dan oksigen dalam proses angiogenesis. Proses pergerakan melibatkan *remodelling* jaringan periodontal, pada jaringan periodontal pembuluh darah memberikan peranan penting bagi kehidupan sel maupun jaringan.

2.6 Hipotesis

Pemberian kafein dapat meningkatkan jumlah pembuluh darah pada ligamen periodontal tikus yang di induksi gaya ortodonti.



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratoris. Desain yang digunakan adalah *the post test only control group design*, yaitu melakukan pengamatan dan pengukuran setelah penelitian dengan membandingkan kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol (Notoatmodjo, 2010).

3.2 Tempat dan Waktu penelitian

3.2.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk proses perlakuan hewan coba dan pengambilan jaringan penelitian. Proses pembuatan preparat jaringan dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan RSUD dr. Soetomo. Dan proses pemeriksaan dan pembacaan jaringan dilakukan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

3.2.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Februari 2015 – November 2015. Penelitian ini telah disetujui oleh Komisi Kelaikan Etik Penelitian Kesehatan (KKEPK) Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.

3.3 Identifikasi Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah kafein.

Definisi Operasional :

Kafein merupakan bubuk berwarna putih dan mempunyai rasa pahit yang diberikan kepada tikus sesuai dengan berat badan dengan cara sondase pada lambung tikus setiap hari selama 21 hari.

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah jumlah pembuluh darah.

Definisi operasional

a) Jumlah pembuluh darah

Jumlah pembuluh darah merupakan jumlah pembuluh darah kapiler dengan bentuk oval, bulat, dan tidak beraturan yang dibatasi selapis membran dan dikelilingi sel endotel yang dihitung pada ligamen periodontal melibatkan daerah tekanan dan daerah tarikan gigi tikus dengan aplikasi gaya ortodonti selama 21 hari.

b) Daerah tekanan

Daerah tekanan adalah daerah disebelah mesial gigi molar satu oleh karena aplikasi alat ortodonti dengan gaya mekanis sebesar 10 gr/cm^2 selama 21 hari.

c) Daerah tarikan

Daerah tarikan adalah daerah disebelah distal gigi molar satu oleh karena aplikasi alat ortodonti dengan gaya mekanis sebesar 10 gr/cm^2 selama 21 hari.

Metode

Pembuluh darah yang tampak secara histologis diamati dibawah mikroskop cahaya pembesaran 400x. Pembuluh darah yang terpotong melintang terlihat bentuk bulat atau oval seperti lumen dan dikelilingi sel endotel. di dalam lumen terdapat sel darah atau tidak ada. Bila pembuluh darah terpotong memanjang tampak sebagai pembuluh panjang yang dibatasi oleh sel endotel. Sel endotel tampak berinti gepeng.

3.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah kriteria hewan coba, makanan tikus berupa pakan standar tikus merek Turbo, Indonesia. minuman tikus berupa air mineral merek Aqua, Indonesia. Tempat dan cara pemeliharaan tikus yaitu tikus ditempatkan pada kandang dengan ukuran 30x30 cm. Setiap kandang berisi 1 ekor tikus, Kandang dibersihkan secara berkala yaitu 1 kali dalam 4 hari. Injeksi kafein secara intragastrik dilakukan setiap hari dengan dosis sebesar 3,69mg pada tikus dengan berat badan rata-rata 270g.

3.4 Sampel Penelitian

3.4.1 Kriteria Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah tikus *sprague dawley* dengan kriteria inklusi sebagai berikut, a) jenis kelamin jantan, b) berat badan lebih dari 250 gram, c) umur 3 bulan, d) pakan seragam berupa diet normokolesterol standar, e) minum air mineral seragam secara *ad libitum*, f) kondisi sehat yang ditandai dengan nafsu makan yang baik dan perilaku normal. Kriteria eksklusi adalah, a) tikus yang mati selama penelitian, b) penurunan berat badan secara drastis, c) diare ditandai dengan feces yang tidak berbentuk, d) kelainan fisik dan tikus yang agresif. Hewan coba dikatakan tidak memenuhi syarat penelitian apabila memenuhi atau masuk ke dalam kriteria eksklusi dan diganti dengan tikus lain sesuai dengan kriteria inklusi sehingga didapat jumlah tikus sesuai perhitungan besar sampel.

Pemilihan sampel penelitian dengan menggunakan *Purposive Sampling* atau *Judgmental Sampling*, merupakan cara penarikan *sample* yang dilakukan memilih subjek berdasarkan kriteria spesifik yang ditetapkan peneliti (Arikunto, 2006). Pengelompokan dilakukan dengan metode *simple random sampling*, yang berarti tiap anggota populasi memiliki peluang yang sama untuk masuk ke dalam kelompok penelitian (Tjokronegoro dan Sudarso, 1999). Pada penelitian ini terdapat dua kelompok sampel yang dibagi berdasarkan pemberian kafein sebagai kelompok

perlakuan dan tidak diberi kafein sebagai kelompok kontrol dengan masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor tikus.

3.4.2 Besar Sampel

Besar sampel penelitian yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 4 ekor tikus tiap kelompok perlakuan. Adapun besar sampel minimal dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Daniel, 2005)

$$n = \frac{Z^2 \cdot \sigma^2}{d^2}$$

Keterangan :

n = jumlah sampel minimum

σ = standar deviasi sampel

d = kesalahan yang masih dapat ditoleransi, diasumsikan $d = \sigma$

Z = konstanta pada tingkat kesalahan tertentu, jika $\alpha = 0,05$ maka $Z = 1,96$

Perhitungan :

$$n \geq \frac{Z^2 \times \sigma^2}{d^2}$$

$$\begin{aligned} n &\geq 3,84 \\ n &\geq (1,96^2) \\ n &\geq 4 \end{aligned}$$

Berdasarkan rumus diatas, Jumlah *sampel* yang digunakan dalam penelitian ini adalah 4 sampel untuk masing-masing kelompok.

3.5 Alat dan Bahan Penelitian

3.5.1 Alat-alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut, Kandang pemeliharaan hewan coba ukuran Panjang: 34cm, Lebar: 26,5cm, Tinggi: 12cm, wadah pakan, wadah minum, timbangan neraca, alat semprot air, sapu lidi, blender, *syringe* kecil kapasitas 1ml (Terumo, Jepang), tabung bius, papan wax, jarum pentul, pinset anatomis, pinset chirurgis, gunting, *scalpel*, masker, sarung tangan, sonde bengkok, plastis filling instrumen, sonde lurus, pisau malam, lampu, papan bedah, botol untuk dekalsifikasi, vibrator (Vortex), *object glass* (Citoplus, China), *cover glass*, stop watch (Diamond, Cina), besi bentuk L untuk alat cetak blok parafin, mikrotom putar (Leica RM 2135), *block holder* mikrotom, *water bath* (Memert, Jepang), *slide warmer* (Sakura, Jepang), *filling cabinet* (Sakura, Jepang), rak pengecatan, timbangan digital (Snug-300, China), kuas kecil, oven (Memert, Jepang), kompor listrik (Maspion, Indonesia), kertas saring, mikroskop cahaya (Olympus, Jepang), optilab (OptiLab Advance, Indonesia).

3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut, bubuk kafein (TCI, America United State), *Ni-Ti closed coil spring wire* dengan panjang 6mm dan diameter 0,012 inch (Orto Tech, America United State), NaCl fisiologis 0,85%, Glass ionomer fuji IX, tikus sprague *dawley*, pakan standar (Turbo, Indonesia), air mineral (Aqua, Indonesia), kloroform, formalin 10%, larutan PBS (BioWORLD, USA), xilol, alkohol, parafin, ketamin (Ketamine Hidroklorida Injeksi), xylazine (xylazine 20 injektion kepro, Holland), NaCl, kapas steril, *polyelisir*, akuades, larutan *picrosirius red* (ScyTek, USA), larutan asam (asam asetat), etanol 100%, *xylane* (Merck, Jerman), *propylane glycol* absolute (Gama Scientific Biolab, Indonesia), *propylane glycol* 85% (gama Scientific Biolab,

Indonesia), *Mayer's Hematoxylin* (Merck, Jerman), *glycerin jelly* (Merck, Jerman), Canada balsam (Merck, Jerman), minyak imersi (Olympus Corp., Jepang).

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Tahap Persiapan

Sebelum dilakukan penelitian, hewan coba dan prosedur penelitian dilakukan pengurusan *ethical clearance* di Komisi Kelaikan Etik Penelitian Kesehatan (KKEPK) Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Serta menyiapkan perizinan dan peminjaman laboratorium, menyiapkan alat dan bahan.

Hewan coba diadaptasikan selama 7 hari dengan lingkungan kandang dan makanan sebelum diberikan perlakuan. Hal ini bertujuan untuk memperoleh keseragaman dalam melakukan penelitian. Tikus diberi makanan berupa pakan standart normokolesterol serta air minum aquadest.

Sebelum dilakukan perlakuan tiap tikus ditimbang berat badannya dan diamati kesehatannya meliputi gerakan berat badan, pola makan dan minum. Berat badan hewan coba ditimbang dengan menggunakan timbangan digital sampai memenuhi lebih dari 250 gram per ekor. Hal ini bertujuan untuk memperoleh keseragaman dalam melakukan penelitian selain itu tikus dengan berat badan lebih dari 250 g lebih kuat dan tidak mudah sakit apabila diberikan perlakuan seperti aplikasi gaya ortodonti.

3.6.2 Pembagian Kelompok Hewan Coba

Hewan coba dikelompokkan menjadi 2 kelompok, setiap kelompok terdiri dari 4 ekor hewan coba dan dipilih secara acak, yaitu :

- a) Kelompok I (4 ekor) merupakan kelompok kontrol yang di induksi gaya ortodonti dengan besar gaya 10 gr/cm^2 dengan pemasangan *Ni-Ti closed coil spring wire* selama 21 hari.

- b) Kelompok II (4 ekor) merupakan kelompok perlakuan yang diberi induksi gaya ortodonti dengan besar gaya 10 gr/cm^2 dengan pemasangan *Ni-Ti closed coil spring wire* dan diinjeksi kafein secara intragastrik selama 21 hari. Untuk dosis kafein disesuaikan dengan masing-masing berat badan tikus.

3.6.3. Pemasangan *Ni-Ti Closed Coil Spring Wire*

Setelah diadaptasikan pada lingkungan kandang selama 7 hari dan dilakukan penimbangan berat badan tikus sampai memperoleh berat badan lebih dari 250 g. Kemudian dilakukan pemasangan *Ni-Ti closed coil spring wire* (Orto Tech, America United State) dengan panjang 6 mm dan diameter 0,012 (Gambar 3.1) dengan gaya 10 gr/cm^2 pada gigi molar 1 sampai insisiv hewan coba. Gaya sebesar 10 gr/cm^2 sebelumnya telah diukur dengan menggunakan *Tension Gauge*. Tahapan *Ni-Ti closed coil spring wire* dapat dilakukan dengan cara:



Gambar 3.1 *Ni-ti Closed coil spring wire* dengan panjang 6mm dan diameter 0,012 inch.

- a) Pertama-tama melakukan anestesi pada hewan coba dengan menggunakan ketamin (*Ketamine Hidroklorida* Injeksi). Dosis yang diberikan sebanyak 1 ml/kg BB ($0,2 \text{ ml/ekor tikus}$) pada otot paha bagian belakang hewan coba secara *intramuscular*. Anestesi ini dilakukan supaya hewan coba tidak bergerak saat dilakukan aplikasi *Ni-Ti closed coil spring wire*.

- b) Meletakkan hewan coba pada papan bedah hewan coba.
- c) Membuka mulut hewan coba dengan alat bantu berupa pisau malam yang ujungnya tumpul agar mulut hewan coba terbuka selama pemasangan alat sehingga mempermudah operator dalam melakukan pemasangan alat.
- d) Pada masing-masing ujung *Ni-Ti closed coil spring wire* diikatkan *ligature wire* (Gambar 3.2) dengan ukuran 10 cm untuk membantu melekatkan koil spring pada gigi molar satu dan insisiv.
- e) Melakukan pengeburan pada gigi insisiv 1 mm diatas margin ginggiva sampai berbentuk cekungan dengan ukuran kurang lebih 0,5 mm. Cekungan tersebut digunakan untuk melekatkan bagian *ligature wire* pada ujung *Ni-Ti closed coil spring wire*. Pengeburan dilakukan dengan menggunakan bur *low speed* dan mata bur *wheel* dengan diameter 3 mm.
- f) Melilitkan *ligature wire* pada bagian cerukan gigi tersebut kemudian membuat tali simpul untuk mengikat dengan erat agar kawat tidak terlepas. Mengikatkan kawat pada kedua gigi insisivus sebagai retensi atau tumpuan saat menarik gigi molar pertama agar terjadi pergeseran (Gambar 3.2)
- g) Sedangkan salah satu kawat pada ujung koil spring yang lain dililitkan pada gigi molar pertama, dengan cara memasukkan *ligature wire* pada sela-sela antara gigi molar pertama dengan gigi molar kedua.
- h) Setelah itu dibuat simpul dan diikat dengan kuat
- i) Memotong ujung *ligature wire* yang tersisa menggunakan gunting
- j) Hasil potongan *ligature wire* pada simpul tadi dilapisi dengan Glass Ionomer menggunakan ujung sonde supaya ujung kawat tidak melukai jaringan lunak di dalam rongga mulut hewan coba.
- k) Menunggu Glass Ionomer sampai kering selama 2-5 menit agar perlekatan kawatnya kuat, kemudian diperbolehkan menutup mulut hewan coba.
- l) Bersihkan darah yang keluar menggunakan kapas atau kasa apabila keluar darah saat melakukan tahap pemasangan ini supaya tidak mengganggu operator atau teknisi saat melakukan pemasangan alat dan oleskan betadine

apabila terjadi luka saat pemasangan alat agar tidak terjadi infeksi pada hewan coba.



Gambar 3.2 Gambar Pemakaian *Ni-Ti closed coil spring wire* pada gigi tikus dari gigi insisiv sampai sela-sela antara gigi molar pertama dan molar ke dua

3.6.4 Pemberian Kafein

Kafein diberikan pada kelompok tikus perlakuan dengan cara sondase pada lambung tikus supaya penyerapan kafein dalam tubuh lebih optimal. Sondase kafein pada tikus sebesar 3,69 mg /270 gram BB tikus dilakukan setiap hari pada sore hari selama 21 hari. Sondase kafein pada tikus dilakukan dengan cara, kafein diseduh dengan air sebanyak 2ml pada wadah kecil berbentuk tabung dengan diameter 3 cm dan panjang 4 cm(Gambar 3.3)

3.6.5 Evaluasi Pemakaian Alat

Evaluasi pemakaian alat dilakukan setiap hari untuk mengetahui ada atau tidaknya *Ni-Ti closed coil spring wire* yang lepas dari gigi tikus. Apabila terdapat alat yang lepas atau bergeser maka dilakukan pemasangan kembali

3.6.6 Pengambilan Jaringan

Pada hari ke 22 hewan coba dieutanasia dan dilakukan bedah untuk mengambil rahang bagian maksila. Dilakukan pengambilan tulang rahang dari gigi insisiv sampai gigi molar tiga. Kemudian potongan jaringan dimasukkan kedalam larutan fiksasi (formalin 10%) yang dicampur dengan aquadest steril 100 ml dengan perbandingan 1:9 selama 24 jam pada suhu kamar. Berikut ini tahapan pengambilan jaringan, yaitu:

- a) Pemberian anastesi pada hewan coba secara inhalasi menggunakan eter yang ada di dalam tabung berisi kapas, kemudian memasukkan hewan coba ke dalam tabung dan menunggu sampai hewan coba lemas atau tidak bergerak lagi.
- b) Mengambil hewan coba yang sudah lemas, kemudian meletakkan hewan coba pada papan untuk dilakukan pengambilan jaringan
- c) Dilakukan eksisi pada sudut-sudut mulut hewan coba menggunakan gunting bedah agar lapang pandang lebih luas sehingga memudahkan tekhnisi untuk mengambil jaringan
- d) Memotong bagian rahang atas yang digunakan sebagai penelitian menggunakan bur *diamond disk* dengan diameter 2 cm yaitu pada regio molar pertama sampai insisiv. Agar *Ni-Ti closed coil spring wire* tetap terpasang pada gigi
- e) Menyimpan hasil potongan jaringan ke dalam botol-botol kecil seperti tabung dengan ukuran panjang 6 cm dan diameter 3,5 cm yang sudah di isi dengan larutan *buffer neutral* formalin 10 % selama 24 jam. Proses ini bertujuan untuk mencegah terjadinya autolisis, mempertahankan morfologi sel seperti semula, dan mencegah pertumbuhan bakteri maupun jamur.

3.6.7 Dekalsifikasi Sampel Penelitian

Melakukan perendaman jaringan dalam larutan dekalsifikasi EDTA 10% dengan PH 7,4 selama 1,5 bulan. Proses ini bertujuan agar garam-garam kalsium dari jaringan tulang dapat dihilangkan sehingga dapat membuat tulang menjadi lunak, dan memudahkan proses pemotongan. Larutan dekalsifikasi diganti setiap 2 hari agar memperoleh hasil yang baik.

3.6.8 Pemrosesan Jaringan

Tahapan selanjutnya merupakan tahap pembuatan sediaan histologi. Adapun tahapannya sebagai berikut:

a) *Dehidrasi*

Diawali dengan proses dehidrasi terhadap spesimen menggunakan alkohol secara bertingkat dengan menggunakan konsentrasi rendah ke tinggi. yaitu alkohol 30% selama kurang lebih 60 menit, dilanjutkan alkohol 50%,70%, 80%, 96% dan absolut masing-masing selama60 menit.

b) *Clearing*

Clearing merupakan proses penjernihan jaringan menggunakan bahan-bahan *clearing*. Bahannya menggunakan *xylol* sebanyak 2 kali yang masing-masing selama 60 menit.

c) *Embedding*

Proses infiltrasi ke dalam oven dengan cara spesimen dimasukkan ke dalam parafin cair dengan suhu 56°-60° C, kemudian dilakukan proses *embedding* terhadap spesimen dan diberi label. Pemotongan jaringan secara transversal menggunakan mikrotom dengan ketebalan kurang lebih 6 µm paralel sumbu panjang gigi.

3.6.9 Pengecatan Hematoksilin Eosin (HE)

Proses pengecatan jaringan menggunakan *Hematoxylin Eosin*, adapun langkah-langkahnya sebagai berikut:

a) Deparafinasi

Tahapan deparafinasi bertujuan untuk menghilangkan parafin dari jaringan dengan cara memasukkan preparat ke dalam *xylol* selama 5 menit sebanyak dua kali secara berturut-turut.

b) Rehidrasi

Tahapan rehidrasi bertujuan untuk memasukan air ke dalam jaringan supaya air tersebut dapat mengisi rongga-rongga jaringan yang kosong. Bahan yang digunakan yaitu alkohol absolut, alkohol 96%, 80%, 70%, 50%, dan 30% selama 5 menit. Kemudian di bilas menggunakan dH₂O selama 5 menit.

c) Mencuci preparat dengan PBS PH 7,4 selama 5 menit.

d) Memasukkan preparat dalam larutan *Mayer's Hematoxylin* selama 10 menit.

e) Dilakukan perendaman pada tap water selama 10 menit, kemudian dibilas menggunakan dH₂O.

f) Dehidrasi dengan cara memasukkan preparat ke dalam alkohol 30% dan 50% masing-masing selama 5 menit.

g) Memasukkan preparat ke dalam larutan *Eosin* selama 3 menit. Kemudian dibilas menggunakan alkohol 30%.

h) Mencuci preparat dengan dH₂O selama 5 menit kemudian dikeringkan.

i) Penutupan jaringan (*mounting*)

Tahapan *mounting* ini dilakukan dengan cara preparat ditetesi *entellan* dan kemudian menutup preparat dengan *cover glass* dan membersihkan sisa *entellan* yang telah meleleh keluar menggunakan kapas yang sudah terbasahi *xylol*.

j) Memberikan label pada preparat histologi yang telah dibuat dan membiarkannya sampai mengering.

3.7 Tahap Pengamatan Histologi Pembuluh darah

Pengamatan sediaan histologis menggunakan mikroskop cahaya binokuler dengan lensa obyektif pembesaran 400x dengan 5 lapang pandang yang berbeda. Pemotongan jaringan pada gigi molar satu tikus dilakukan secara transversal yaitu dari oklusal ke apikal gigi. Bila pembuluh darah terpotong melintang terlihat bentuk bulat atau oval seperti lumen dan dikelilingi sel endotel. di dalam lumen bisa terdapat sel darah atau tidak ada. Bila pembuluh darah terpotong memanjang tampak sebagai pembuluh panjang yang dibatasi oleh sel endotel. Pembuluh darah yang dihitung adalah pembuluh darah dengan bentuk bulat, oval atau memanjang yang terdapat pada ligamen periodontal daerah tekanan dan tarikan. Setiap sampel diambil 3 potongan atau 3 kali pengulangan dalam 1 preparat. Setiap preparat masing-masing diamati oleh 3 orang pengamat yang berbeda dan dihitung jumlah pembuluh darah sesuai dengan lapang pandang yang telah ditentukan, kemudian hasil ke tiga lapang pandang dijumlahkan, setelah itu dirata-rata, sehingga didapatkan data jumlah yang valid.

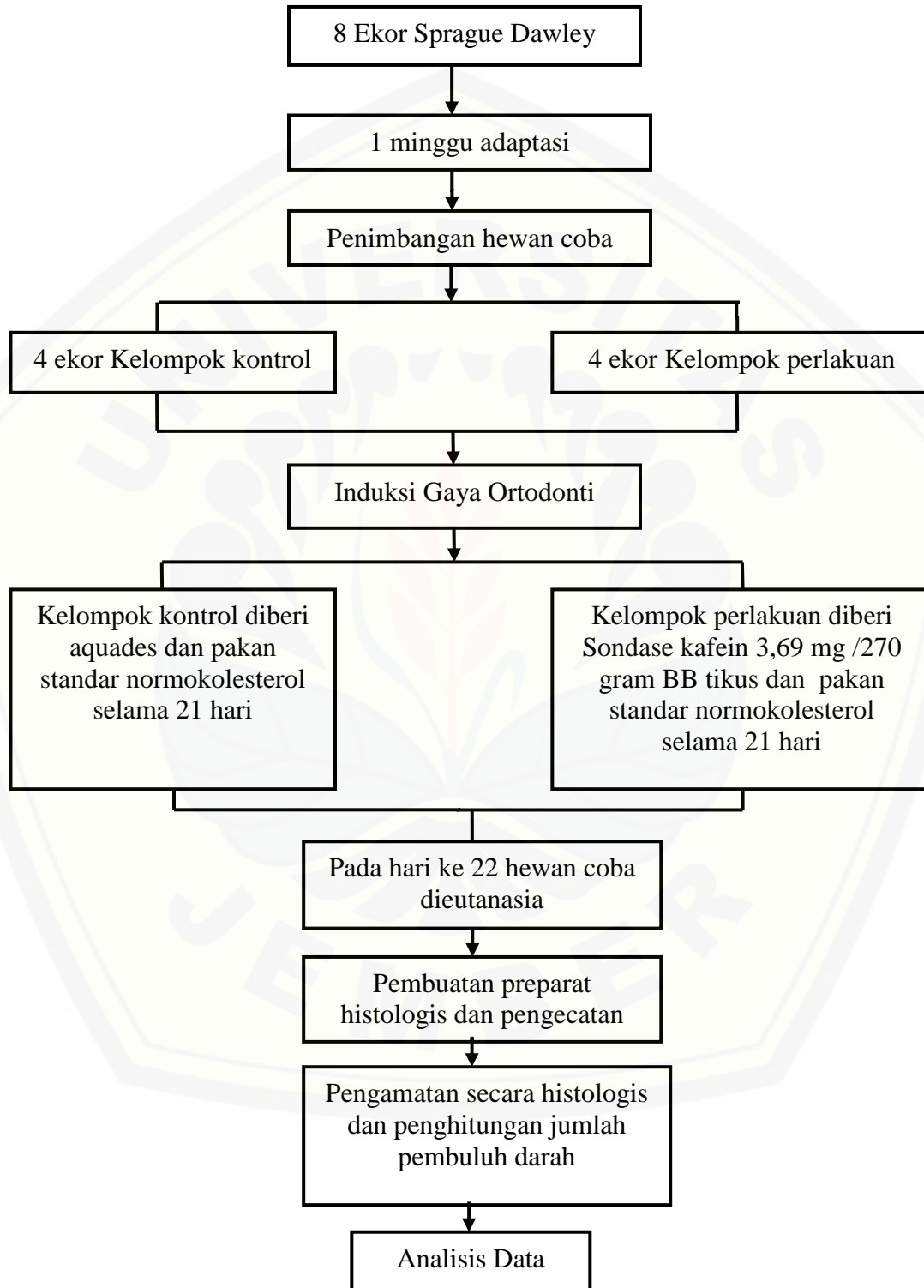
3.8 Analisis Data

Penelitian ini menghasilkan data kuantitatif berupa hasil perhitungan jumlah pembuluh darah pada ligamen periodontal tikus. Data dianalisis dengan statistik parametrik secara komputerisasi menggunakan *software* SPSS (*Statistical Package for the Social Science*). Mula-mula dilakukan uji normalitas menggunakan *Kolmogorov-Smirnov* dan uji homogenitas menggunakan uji *Lever's Test* dengan nilai signifikansi 95 % ($p \geq 0,05$). Jika data berdistribusi normal dan homogen maka dapat dilanjutkan uji statistika *parametric* yaitu uji *Independent Sampel T test* untuk menguji hipotesis dengan cara membandingkan 2 subyek dengan nilai signifikansi 95% ($p < 0,05$). jika data yang diperoleh tidak berdistribusi normal dan tidak homogen, maka dilakukan uji statistik *Non Parametrik Mann-Withney Test* untuk

mengetahui perbedaan antara 2 (dua) kelompok yang saling bebas atau untuk mengetahui perbedaan perlakuan.



3.9 Alur Penelitian



BAB 5. KESIMPULAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa kafein dapat meningkatkan jumlah pembuluh darah pada ligamen periodontal yang diinduksi gaya ortodonti di daerah tekanan.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, saran yang dapat diberikan adalah perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan variasi dosis kafein, optimasi dan variasi besar gaya ortodonti, waktu penelitian yang berkaitan untuk mengetahui potensi kafein dalam mempengaruhi proses *remodelling vasculer* pada perawatan ortodonti, dan optimasi prosedur histologis.

DAFTAR PUSTAKA

- Addicott, M.A., Yang, L.L., Peiffer, A.N., Burnett, L.R., Burdette, J.H. 2009. The Effect of Daily Caffeine Use on Cerebral Blood Flow. NIH Public Access Author Manuscript.
- Aghili, HA., Hoseini, SM., Yassae, S., Meibodi, S.M.F., Zaeim, M.H.T., Moghadam M.G. 2014. *Effect of Carbonated Soft Drink Consumption on Orthodontic Tooth Movements in Rats*. Vol:11, No.2.
- Alexander, M., Smith AL., Rosenkrantz TS., Fitch RH. 2013. *Therapeutic Effect Of Caffeine Treatment Immediately Following Neonatal Hypoxic-Ischemic Injury On Spatial Memory In Male Rats*. ISSN 2076-3425
- Arikunto, S. 2006. *Prosedur Penelitian Suatu Pendekatan Praktik*. (Edisi Revisi Keenam). Jakarta: PT. Rineka Cipta.
- Bahirrah, S.2004. *Pergerakan Gigi Dalam Bidang Ortodonsia Dengan Alat Cekat*. e-USU Repositor. Universitas Sumatera Utara
- Brodmann, M., Lisching, U., Lueger, A., Piger, E., Stark, G. 2013. *The Effect of Caffeine on Peripheral Vascular Resistance in Isolated Perfused Guinea Pig Hind Limbs*. Jounal Cardiovascular Protocol
- Bruce, C.R., Anderson, M.E., Fraser, S.F., Stepto, N.K., Klein, R., Hopkins, W.G., Hawley, J.A. 2000. *Enhancement of 2000-m Rowing Performance after Caffeine Ingestion*. *Med Sci Sport Exerc.* 32(11)
- Burstone, C.J 1962 dalam Nanda, R.1993. *Retention and Stability in Orthodontics*. Philadelphian W.B. Sanders Company. ISBN: 9780721643427
- Cordasco,G., Militi, A., Nigrone, V., Matarese, G. 2010. *Changes in Vascular System During Experimental Tooth Movement*. Vol.115
- Corwin, E.J. 2007. *Buku Saku Patofisiologi*. Edisi III. Alih bahasa oleh Nike Budhi Subekti. Jakarta: EGC
- Dai, J., Rabie, A.B.M. 2007. *VEGF: an Essential Mediator of Both Angiogenesis and Endochondral Ossification*. *Journal of Dental Research in Oral Biology and Medicine*;86; 937

- Dika, D.D., Hamid, T., Sylvia, M. 2011. Penggunaan Index of Orthodontic Treatment Need (IOTN) Sebagai Evaluasi Hasil Perawatan dengan Perati Lepas. *Orthodontic Dental Journal*, Vol.2.No.1.45-48
- D'apuzzo, F., Cappabianca, S., Ciavarella, D., Monsurro, A., Biavati, A.S., Perillo, L. 2013. *Biomarkers of Periodontal Tissue Remodelling During Orthodontic Tooth Movement in Mice and Men: Overview and Clinical Relevance*. *The Scientific World Journal*. ID 105873
- Derringer, K.A., Linden, R.W.A. 1998. *Enhanced Angiogenesis Induced by Diffusible Angiogenic Growth Factors Released from Human Dental Pulp Explants of Orthodontically Moved Teeth*. *European Journal of Orthodontic* 357-367
- Devonshire, 1954 dalam Fridkin, V and Ducharme, S. 2014. *Theory of Ferroelectricity and Ferroelectric Phase Transition in Physics* 3 (10).
- Domenico, M.D., D'Apuzzo, F., Feola, A., Cito, L., Monsurro, A., Pierantoni, G.M., Berrino, L., De Rossa, A., Polimeni, A., Perillo, L. 2012. *Cytokines and VEGF Induction in Orthodontic Movement in Animal Models*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 201689
- Echeverri, D., Montes, F.R., Cabrera, M., Galan, A., Prieto, A. 2010. *Caffeine's Vascular Mechanisms of Action*. *International Journal of Vascular Medicine*. Vol.2010
- Geethavani, G., Rameswarudu, M., Reddy, R.R. 2014. *Effect of Caffeine on Heart Rate and Blood Pressure*. *International Journal of Scientific and Research Publication*, Vol.4
- Hardinsyah. 2005. Tea. Tersedia pada <http://fema.ipb.ac.id>. (diakses 05 Februari 2012)
- Heckman, Melanie A., Weil, Jorge., de Mejia, Elvira Gonzalez. 2010. *Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) in Foods : A Comprehensive Review on Consumption, Functionality, Safety, and Regulatory Matters*. *J of Food Sci.* 75 (3) : R77-R87
- Henneman, S., Von de Hoff J.W., Maltha, J.C. 2008. *Mechanobiology of Tooth Movement*. *European Journal of Orthodontics*. 30:299-306.
- Hwa Liu., Shing Hwa., Chen, Chinliang., dkk. 2011. *Caffeine Enhances Osteoclast Differentiation from Bone Marrow Hematopoietic Cells and Reduces Bone Mineral Density in Growing Rats*. *J Ortho Research*.

- Julien CA., Joseph V., Bairam AA. 2010. *Caffeine Reduces Apnea Frequency and Enhances Ventilatory Long-Term Facilitation in Rat Pups Raised in Chronic Intermittent Hypoxia*. International Pediatric Research Foundation. Vol. 68
- Keijzers, G.B., De Galan, B.E., Tack, C.J., Smits, P. 2002. *Caffeine can Decrease Insulin Sensitivity in Humans*. *Diabetes Care*.
- Knop, L.A.H., Shintcovsk, R.L., Retamoso, L.B., Gregio, A.M.T., Tanaka, O. 2012. *The Action of Corticosteroids on Orthodontic Tooth Movement : A Literature Review*. Dental Press Journal.
- Liu, Chen, Yang, Yen, Yang, dan Tsai. 2011. *Caffeine Enhances Osteoclast Differentiation from Bone Marrow Hematopoietic Cells and Reduces Bone Mineral Density in Growing Rats*. Orthopaedic Research Society. Published by Wiley Periodicals, Inc.
- Lyrwati, D. 2008. Arteriogenesis dan Angiogenesis pada Stroke Hemoragik: Mempertajam Konsep untuk Memeroleh Manfaat Terbaik Neovaskularisasi. *Jurnal Kedokteran Brawijaya* Vol. XXIV, No.1
- Marquezan, M., Bolognese, A.M., Araujo, M.T. 2013. *Evaluation of Two Protocols for Low Level Laser Application in Patients Submitted to Orthodontic Treatment*. Dental Press Journal of Orthodontic
- Mazure, N.M., Brahimi-Horn M.C., Pouyssegur J. 2003. Protein Kinase and the hypoxia-inducible factor-1, two switches in angiogenesis. *Current Pharmaceutical Design*;9; 531-541
- Merighi, S., Benini, A., Mirandola, P., Gessi, S., Varani, K., Simioni, C., Leung, E., MacLennan, S., Baraladi, P.G., Borea, P.A. 2007. *Caffeine Induce Accumulation of Hypoxia Inducible Factor-1 α , Vascular Endothelial Growth Factor, and Interleukin-8. Expression in Hypoxic Human Colon Cancer Cell*. Vol.72. No.2
- Misra H,D. Mehta, B.K. Mehta, M. Soni, D.C. Jain. 2008. Study Of Extraction and HPTLC-UV Method for Estimation of Caffeine in Marketed Tea (*Camellia Sinensis*) Granules. *International Journal of Green Pharmacy* : 47-51
- Mokhtar, H and N. Ahmed, 2000. Tea Polyphenols: Prevention of Cancer and optimizing health. *Am.J.Clin.Nutr.*, Suppl., 71 : 16985-17028
- Mumin A, Kazi F A, Zainal A, Zakir H. 2006. *Determination and Characterization of Caffeine in Tea, Coffee, and Soft Drink by Solid Phase Extraction and High*

Performance Liquid Chromatography (SPE-HPLC). Malaysian Journal of Chemistry, 8:45-51

Nawrot, P., Jordan, S., Eastwood, J., Rostein, A, Hugenholt. 2003. *Effect of Caffeine on Human Health*. ISSN 0265-203x. Vol. 20. No.1, 1-30.

Nayak, BN., Galil, KA., Wiltshire, W., Lekic, PC. 2013. *Molecular Biology of Orthodontic Tooth Movement*. Journal of Dentistry and Oral Health. Vol 1:101

Newman MG., Tukey H., Carranza Klokkevold PR., Caranza FA. 2011. Editors., *Eds Carranza's Clinical Periodontology*. 10 th edn St Louis, MO; Saunders.

Niklas, A., Proff, P., Gosau, M., Romer, P. 2013. The Role of Hypoxia in Orthodontic Tooth Movement. International Journal of Dentistry, 7 page

Nopitasari, I. 2010. Processing Groung Coffe (Blending of Arabica and Robusta) and The Quality Chages During Storage. Institut Pertanian Bogor

Notoadmodjo, S. 2010. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta: PT Rineka Cipta.

Ovalle, W.K., Nahirney, P.C., Netter, F.H. 2013. *Netter's Essential Histology*. Second edition. Philadelphia, PA 19103-2899. Page: 173-194

Pearce, C.E. 2010. *Buku Anatomi dan Fisiologi untuk Paramedis*. Alih bahasa Sri Yuliani Handoyo. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama

Prahanarendra, G. 2015. Study Awal Histoteknik: Gambaran Histologi Organ Ginjal, Hepar, dan Pankreas Tikus Sprague Dawley dengan Pewarnaan HE dengan Fiksasi 3 Minggu. Research Journal

Prijatmoko D. 2014. *Biomekanik Pergerakan Gigi*. Jakarta : Sagung Seto. Hal 29

Rahardjo P. 2009. *Orthodonti Dasar*. Surabaya : Airlangga University Press. Hal 144-153

Rose, L.F., Brian, Cohen. 2011. *Periodontic Surgery*. Page 23

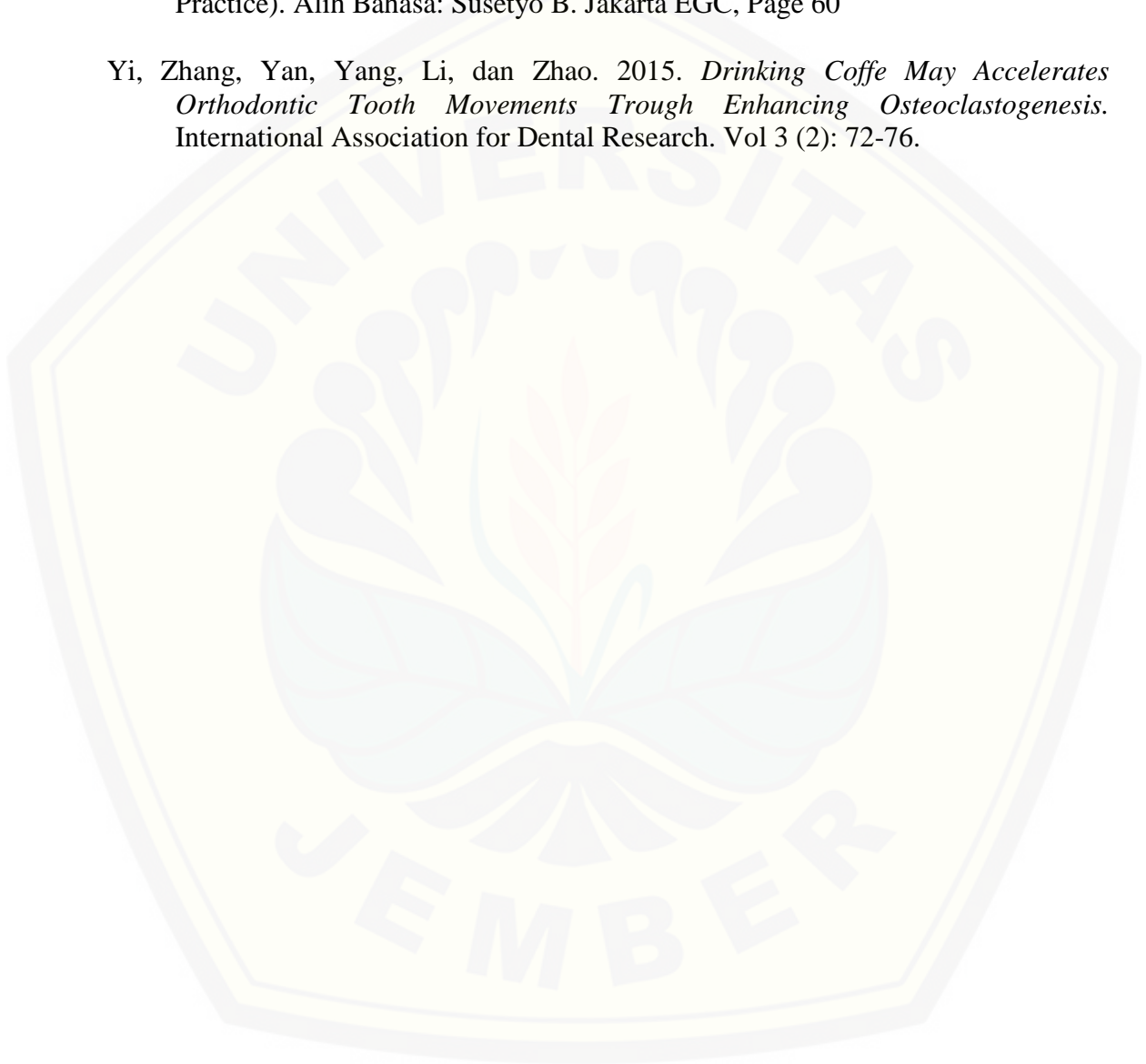
Salamao, M.F.L., Reis, S.R.A., Vale, V.L.C., Machado, C.D.V., Meyer, R., Nascimento, I.L.O. 2014. Immunolocalization of FGF-2 and VEGF in Rat Periodontal Ligamen During Experimental Tooth Movement. Dental Press Journal Orthodontic, 67-74.

- Santoso, E. 2011. Buku Ajar Etik Penelitian Kesehatan. Malang. Universitas Brawijaya Press.
- Schwab, M. 2001. Encyclopedic Reference Of Cancer. Heidelberg : Springer.
- Schwarz, 1932 dalam Krishnan, V., Davidovitch. 2006. Cellular, Molecular, and Tissue-Level Reactions to Orthodontic Force. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics
- Sharma R., Preethi N., Sidana A. 2015. *Neurological Mechanisms Involved in Orthodontic Tooth Movement : A Contemporary Review*: International Journal of Contemporary Dental and Medical Review
- Shintcovsk RL., Knop L., Tanaka OM., Maruo H., 2014. *Nicotine Effect On Bone Remodelling During Orthodontic Tooth Movement : Histological Study In Rats*, Dental Press J Orthod. 96-107
- Sianturi, G. 2001. Kafein dan Minuman Kesehatan. www.gizi.net
- Simons, M. 2005. *Angiogenesis, Arteriogenesis, and Diabetes*. Journal of American College of Cardiology. Elsevier Inc
- Spinetti, G., Kraenkel, N., Emanuelli, C., Madeddu, P. 2008. Diabetes and Vessel Wall Remodelling: From Mechanistic insights to regenerative therapies. Cardiovascular Research
- Syaifuddin, H. 2006. Buku Anatomi Fisiologi untuk Mahasiswa Keperawatan. Edisi III. Jakarta: EGC
- Takashi, I., Nishimura, M., Onodera, K., Bae, J.W. 2003. *Expression of MMP-8 and MMP-13 Genes in the Periodontal Ligament During Tooth Movement in Rats*. Journal of Dental Research. Page 646
- Thilander, B., Pena, L., Infante, C., Parada, S., Mayorga, C.D. 2001. *Prevalence of Malocclusion and Orthodontic Treatment Need in Children and Adolescents in Bogota, Colombia. An Epidemiological Study Related to Different Stage of Dental Development*. European Journal Orthodontics. 153-167
- Thilander, B., Rygh P, Reitan K, *Tissue Reaction in Orthodontics*, in Graber TM, Vanarsdall Jr RL, Vig KWL (editors), 2005. *Orthodontic: Current Principles and Techniques*. St. Louis, Mosby Elsevier


Traves, H., Robbert, H., Sandy, J. 2004. *Orthodontics. Part 6: Risk in Orthodontic Treatment*. British Dental Journal. Vol. 196.

Williams, J.K., Cook, P.A., Isaacson, K.G., Thom, A.R. 2000. *Alat-Alat Orhodonti Cekat: Prinsip dan Praktek (Fixed Orthodontics Appliance; Principle and Practice)*. Alih Bahasa: Susetyo B. Jakarta EGC, Page 60

Yi, Zhang, Yan, Yang, Li, dan Zhao. 2015. *Drinking Coffe May Accelerates Orthodontic Tooth Movements Trough Enhancing Osteoclastogenesis*. International Association for Dental Research. Vol 3 (2): 72-76.



Lampiran A. Surat Keterangan Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Terpadu Universitas Gajah Mada - Yogyakarta

**UNIVERSITAS GADJAH MADA**
LABORATORIUM PENELITIAN DAN PENGUJIAN TERPADU
(LPPT - UGM)
Bidang Layanan Penelitian Pra - Klinik dan Pengembangan Hewan Percobaan
Jl. Agro Karang Malang Kampus UGM
Telp. (0274) 7497705, FAX. (0274) 546868, e-mail: lppt_info@mail.ugm.ac.id

SURAT KETERANGAN
NO : 342/LP3HP/15/I/2015

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Drh. Claude Mona Airin, MP.
NIP : 19760708 200801 2 012
Jabatan : Kabid Unit Pra Klinik - I PPT UGM.

Menerangkan bahwa ;


Nama : drg. Hj. Herniyati, M.Kes.
Instansi : Fakultas Kedokteran Gigi UNEJ Jember.

Pada bulan Januari 2015 membeli Tikus putih (*Rattus norvegicus L.*) Jantan galur *Sprague dawley* usia 3 bulan sejumlah 30 (Tiga puluh) ekor dari Unit Pra-Klinik LPPT Universitas Gadjah Mada.

Hewan tersebut dalam keadaan masih vertil dan tidak terinfeksi penyakit sehingga tidak menularkan penyakit. Menurut keterangan dari yang bersangkutan hewan tersebut akan dibawa ke Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Negeri Jember dan akan digunakan sebagai hewan percobaan Penelitian.

Demikian surat keterangan ini dibuat, agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Atas kerjasama yang baik diucapkan banyak terima kasih

Yogyakarta, 15 Januari 2015
Kabid Unit Pra- Klinik LPPT UGM

Dr. drh. Claude Mona Airin, MP.
NIP : 19760708 200801 2 012

Lampiran B. Keterangan Kelaikan Etik

KOMISI KELAIKAN ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KKEPK)
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS AIRLANGGA

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")

Nomor : 18/KKEPK.FKG/II/2015

Komisi Kelaikan Etik Penelitian Kesehatan (KKEPK) Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, telah mengkaji secara seksama rancangan penelitian yang diusulkan, maka dengan ini menyatakan bahwa penelitian berjudul :

" RASIO RANKL-OPG, PROFIL VEGF, TGF- β 1, AKTIVITAS BALP, DAN JUMLAH BONE ISLAND PADA JARINGAN PERIODONTAL YANG DIINDUKSI GAYA MEKANIS ORTODONTI SETELAH PEMBERIAN SEDUHAN KOPI "

Peneliti Utama : **Herniyati, drg.,M.Kes**
Unit / Lembaga/ Tempat Penelitian : - Lab. Biomedik Kedokteran Gigi,
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Lab. Biokimia FK Universitas Brawijaya Malang.


DINYATAKAN LAIK ETIK

Surabaya, 16 Pebruari 2015
Ketua,



Prof. Dr. M. Rubianto, drg., MS., Sp. Perio (K)
NIP. 195009081978021001

Lampiran C. Sertifikat Pengujian

 UNIT LAYANAN PENGUJIAN
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AIRLANGGA


1/1

SERTIFIKAT PENGUJIAN
No. 0116b/SA/III/2015*

1. No. Surat Permohonan : -
2. Tanggal Surat Permohonan : 2 Pebruari 2015
3. Tanggal sampel dikerjakan : 2 Pebruari 2015
4. Nama Pemilik Sampel : **Drg. Herniyati., M.Kes.**
5. Alamat : Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Jember
6. Jenis>Nama Sampel/Kode : **Kopi hasil Freeze Drying**
7. Keperluan Uji :
8. Parameter yang diuji : Kafein
9. Hasil :

Jenis pemeriksaan	Metode	Hasil
Kafein	HPLC	[8,84 ± 0,05] % b/b

*Data terlampir

Surabaya, 27 Maret 2015
Direktur

Dr. rer. nat. M. Yuwono, MS.

Jl. Dharmawangsa Dalam, Surabaya 60286
Telp / Fax : 031-5036779, E-mail : ulpfua@yahoo.com

Lampiran D. Pembuatan Seduhan Kopi Kering

D.1 Seduhan Kopi

Seduhan kopi diperoleh dari kopi bubuk Robusta yang diproduksi oleh PTPN X Jember. Dosis seduhan kopi pada manusia adalah 1 sendok makan kopi bubuk sebesar 10 gram dilarutkan dalam 150 ml air/1 cangkir. Selanjutnya seduhan kopi dibuat menjadi seduhan kopi kering (*Freeze Dried Ekstract*)

Tahapan pembuatan (*Freeze Dried Ekstract*) dalam penelitian ini adalah sebagai berikut ;

- (a) Ditimbang 10 gram bubuk kopi
- (b) Dilarutkan dalam 150 ml aquades panas/mendidih
- (c) Diaduk hingga homogen
- (d) Disaring dengan kertas saring
- (e) Filtrat dikeringkan dengan menggunakan *freeze dryer*
- (f) Didapatkan ekstrak kering
- (g) Ditimbang beratnya, didapatkan berat sebesar 2,27 g.

Keterangan :

- (1) Tikus dengan berat badan 200 g memiliki faktor konversi sebesar 0,018, maka dosis seduhan kopi kering sebesar $0,018 \times 2,27 \text{ g} = 0,04 \text{ g} = 40 \text{ mg}$.
- (2) 1 ekor tikus dengan berat badan 300 g dosis seduhan kopi kering yang diberikan adalah $40\text{mg} \times 300/200 = 60 \text{ mg}/300\text{g BB}$, tikus dengan berat badan 100 g dosis seduhan kopi kering yang diberikan adalah $40\text{mg} \times 100/200 = 20 \text{ mg}/100 \text{ g BB}$.

D.2 Penetapan Kadar Kafein

Penetapan kadar kafein dilakukan dengan mengambil sampel *Freeze Dried Ekstract*/seduhan kopi kering.

Tahapan penetapan kadar kafein dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- (a) Sampel ditimbang 1 gram= 1000 mg ke dalam labu takar 25 ml
- (b) Ditambahkan metanol hingga tepat tanda
- (c) Diultrasonikasi 30 menit, lalu dikocok
- (d) Diambil 1 ml dimasukkan labu takar 10 ml
- (e) Ditambah metanol ad tepat tanda, lalu dikocok ad homogeny
- (f) Disaring dengan membran nilon 0,2 mikron
- (g) Siap dianalisis dengan HPLC
- (h) Diperoleh kadar kafein dalam sampel adalah sebesar $(6,84 \pm 0,05) \% \text{ b/b}$

Keterangan :

- (1) 1 gram seduhan kopi kering mengandung 6,84 mg kafein.
- (2) Tikus dengan berat badan 100 g diberikan 20 mg seduhan kopi kering.
- (3) Tikus dengan berat badan 100 g diberikan kafein = $20/100 \times 6,84 \text{ mg} = 1,368 \text{ mg}/100\text{g}$ (dibulatkan menjadi 1,37 mg).

Lampiran E. Penghitungan Dosis Ketamin

Perhitungan Dosis Ketamin

Menurut Karaman (2012), dosis anestesi ketamin yang digunakan pada tikus yaitu 0,6 - 1 ml/kg berat badan.

Dosis yang digunakan :

$$\begin{array}{r} \frac{X \text{ ml}}{200 \text{ gr}} = \frac{0,6 - 1 \text{ ml}}{1000 \text{ gr}} \\ \frac{X \text{ ml}}{5} = 0,6 - 1 \text{ ml} \\ X = 0,12 - 0,2 \text{ ml} \end{array}$$

Dosis ketamin yang digunakan berdasarkan perhitungan adalah 0,12 - 0,2 ml.

Lampiran F. Tabel Konversi Dosis (Tabel Laurence-Bacharach).

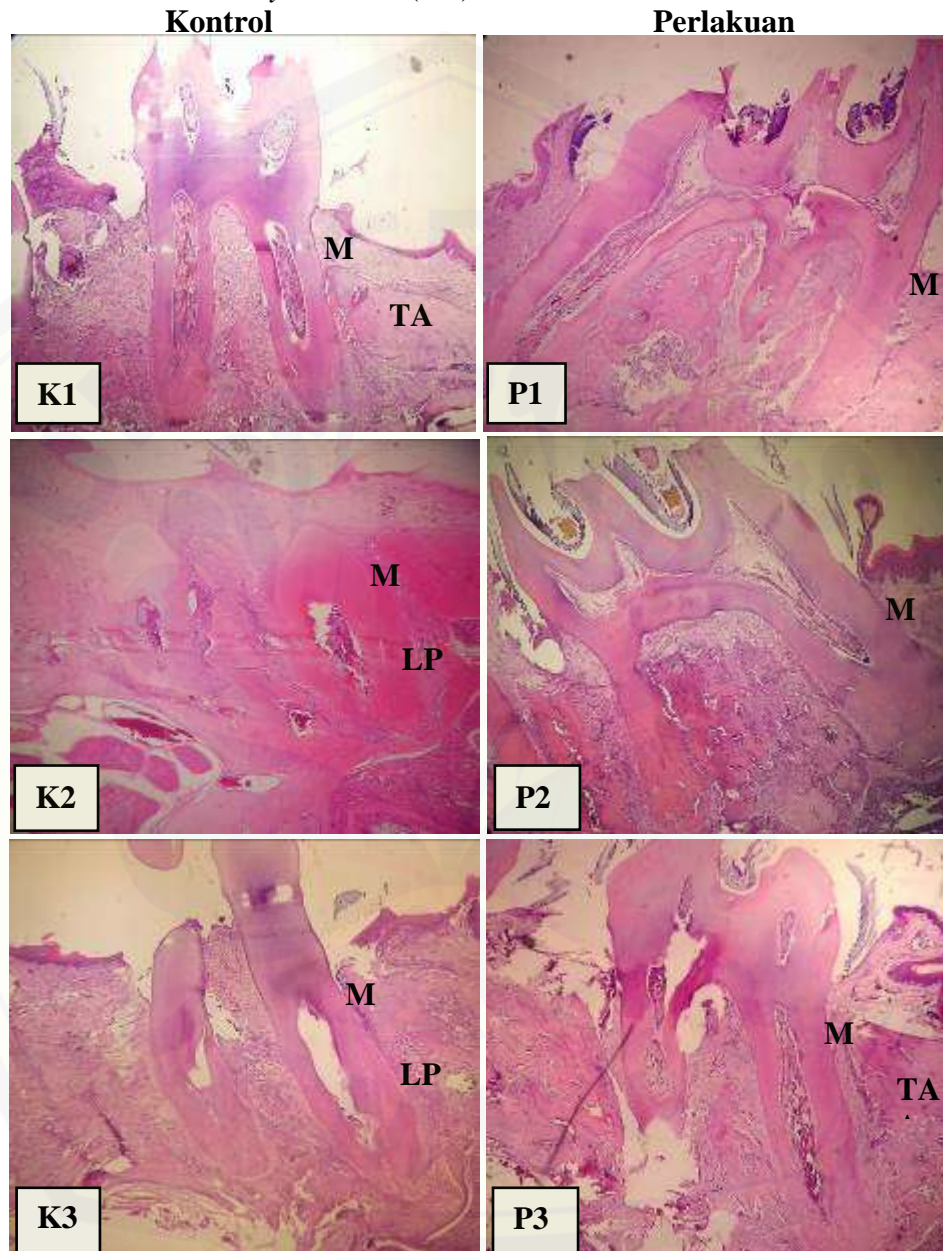
Menurut Friezka (2014) luas permukaan hewan coba untuk konversi dosis dapat dilihat pada tabel.

Tabel perbandingan luas permukaan hewan coba untuk konversi dosis

Dicari	Mencit 20 g	Tikus 200 g	Marmut 400 g	Kelinci 1,5 kg	Kera 4 kg	Anjing 12 kg	Manusia 70 kg
Mencit (20 g)	1	7	12,29	27,7	64,1	124,2	387,9
Tikus (200 g)	14	1	1,74	3,3	9,2	17,8	56
Marmut (400 g)	0,08	0,57	1	2,25	5,2	10,2	31,5
Kelinci (1,5 kg)	0,04	0,25	0,44	1	2,4	4,5	14,2
Kera (4 kg)	0,016	0,11	0,19	0,42	1	1,9	6,1
Anjing (12 kg)	0,008	0,06	0,1	0,22	0,52	1	3,1
Manusia (70,0 kg)	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,16	0,32	1

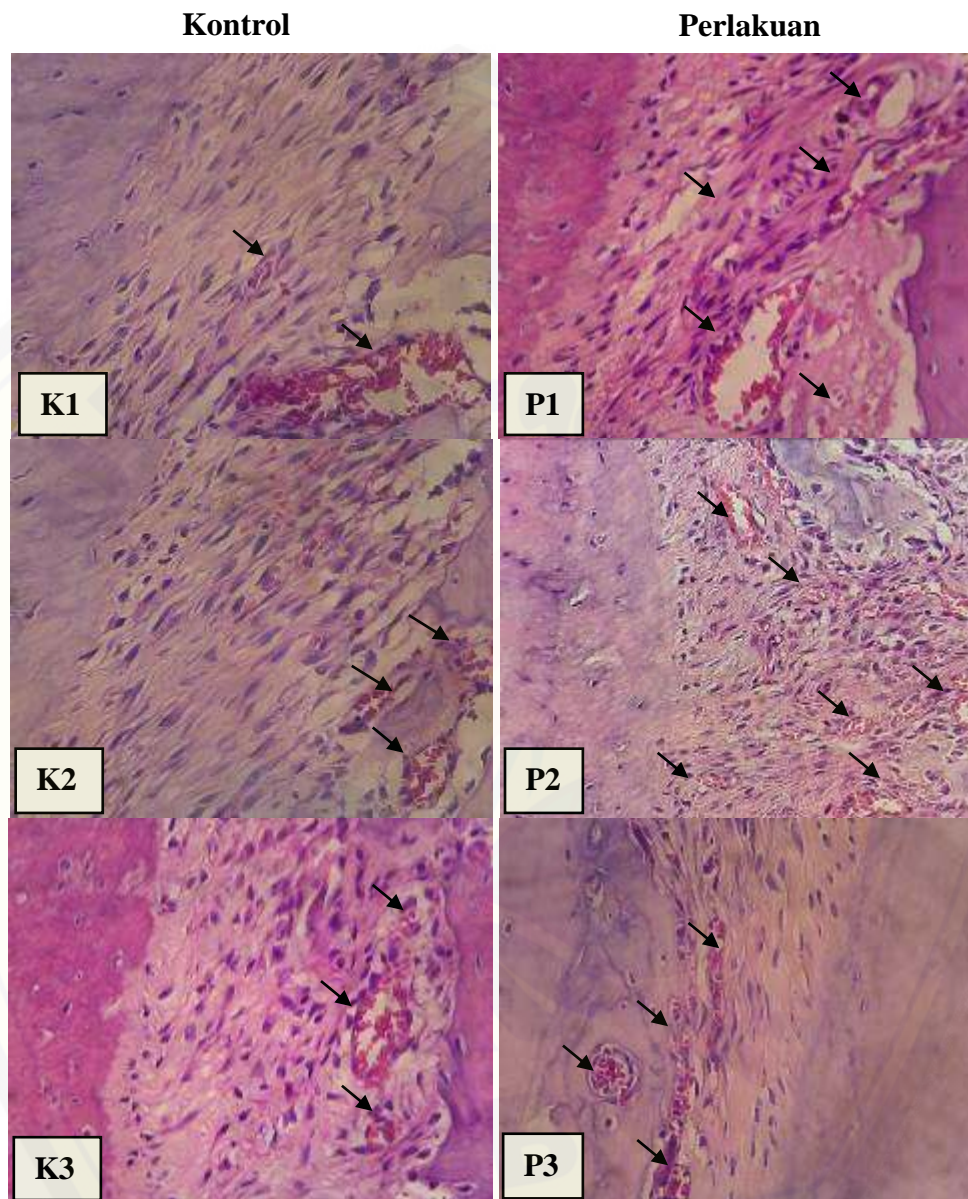
Lampiran G. Gambaran Histologis Pembuluh Darah Kapiler Daerah Tekanan

G.1 Gambaran Histologis Potongan Transversal Gigi Molar Tikus dengan Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE) Perbesaran 40x



Gambar 1.1 Gambaran Histologis Potongan Transversal Gigi Molar Tikus dengan Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE) Perbesaran 40x. Keterangan: TA) Tulang Alveolar, LP) Ligamen Periodontal, dan M) Mesial Gigi atau Daerah Tekanan. K) Kelompok Kontrol dan P) Kelompok Perlakuan.

G.2 Gambaran Histologis Pembuluh Darah Kapiler pada Ligamen Periodontal Daerah Tekanan dengan Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE) perbesaran 400x.



Gambar 1.2 Gambaran Histologis Pembuluh darah kapiler daerah tekanan ligamen periodontal tikus dengan pengecatan *Hematoxylin Eosin* (HE) Perbesaran 400x. K) Kelompok kontrol, jumlah pembuluh darah lebih sedikit dibandingkan kelompok perlakuan. P) kelompok perlakuan, terjadi peningkatan jumlah pembuluh darah dibandingkan kelompok kontrol.

Lampiran H. Hasil Penghitungan Jumlah Pembuluh Darah**H.1 Kelompok Perlakuan Kafein dan Induksi Gaya Ortodonti Daerah Tekanan Hari ke-21**

KODE	PENGAMAT	LP 1	LP 2	LP 3	LP 4	LP 5	JUMLAH	RATA-RATA	RATA-RATA TOTAL	
S1	a	5	3	7	13	14	42	8,4	8,47	
	b	6	3	6	14	15	44	8,8		
	c	5	4	7	12	15	43	8,6		
								8,6		
KODE	PENGAMAT	LP 1	LP 2	LP 3	LP 4	LP 5	JUMLAH	RATA-RATA		
S2	a	6	3	6	11	15	41	8,2		
	b	6	4	6	12	14	42	8,4		
	c	5	4	8	11	15	43	8,6		
								8,4		
KODE	PENGAMAT	LP 1	LP 2	LP 3	LP 4	LP 5	JUMLAH	RATA-RATA		
S3	a	4	3	7	13	14	41	8,2		
	b	5	3	8	12	13	42	8,4		
	c	5	4	7	13	13	42	8,4		
								8,4		

KODE	PENGAMAT	LP 1	LP 2	LP 3	LP 4	LP 5	JUMLAH	RATA-RATA	RATA-RATA TOTAL	
S1	a	7	8	6	5	7	33	6,6	8,17	
	b	7	8	7	4	6	32	6,4		
	c	7	7	6	5	7	32	6,4		
								6,4		
KODE	PENGAMAT	LP 1	LP 2	LP 3	LP 4	LP 5	JUMLAH	RATA-RATA		
S2	a	7	8	6	8	13	42	8,4		
	b	8	7	7	9	12	43	8,6		
	c	8	9	6	9	12	44	8,8		
								8,6		
KODE	PENGAMAT	LP 1	LP 2	LP 3	LP 4	LP 5	JUMLAH	RATA-RATA		
S3	a	7	8	8	16	9	48	9,6		
	b	9	7	9	15	9	49	9,8		
	c	8	7	9	14	8	46	9,2		
								9,5		

Kelompok Perlakuan Kafein dan Induksi Gaya Ortodonti Daerah Tekanan Hari ke-21

KODE	PENGAMAT	LP 1	LP 2	LP 3	LP 4	LP 5	JUMLAH	RATA-RATA	RATA-RATA TOTAL	
S1	a	4	6	6	5	9	30	6	6,2	
	b	4	7	6	6	8	31	6,2		
	c	5	6	8	5	9	33	6,6		
								6,2		
KODE	PENGAMAT	LP 1	LP 2	LP 3	LP 4	LP 5	JUMLAH	RATA-RATA		
S2	a	5	6	8	5	7	31	6,2		
	b	4	7	6	5	8	30	6		
	c	5	7	7	5	8	32	6,4		
								6,2		
KODE	PENGAMAT	LP 1	LP 2	LP 3	LP 4	LP 5	JUMLAH	RATA-RATA		
S3	a	4	6	7	5	8	30	6		
	b	4	8	6	4	9	31	6,2		
	c	5	7	7	5	8	32	6,4		
								6,2		

H.2 Kelompok Kontrol Aquadest dan Induksi Gaya Ortodonti Daerah Tekanan Hari ke-21

KODE	PENGAMAT	LP 1	LP 2	LP 3	LP 4	LP 5	JUMLAH	RATA-RATA	RATA-RATA TOTAL	
S1	a	3	3	2	1	5	14	2,8	2,91	
	b	4	3	2	1	4	14	2,8		
	c	3	2	3	1	5	14	2,8		
								2,8		
KODE	PENGAMAT	LP 1	LP 2	LP 3	LP 4	LP 5	JUMLAH	RATA-RATA		
S2	a	2	2	2	2	5	13	2,6		
	b	3	2	3	1	3	12	2,4		
	c	3	4	3	2	3	15	3		
KODE	PENGAMAT	LP 1	LP 2	LP 3	LP 4	LP 5	JUMLAH	RATA-RATA		
S3	a	3	4	2	1	5	15	3		
	b	2	3	2	2	4	13	2,6		
	c	3	2	3	3	5	16	3,2		
								2,94		

Kelompok Kontrol Aquadest dan Induksi Gaya Ortodonti Daerah Tekanan Hari ke-21

KODE	PENGAMAT	LP 1	LP 2	LP 3	LP 4	LP 5	JUMLAH	RATA-RATA	RATA-RATA TOTAL
S1	a	2	3	6	4	7	22	4,4	4,57
	b	3	3	6	3	7	22	4,4	
	c	2	3	5	4	6	20	4	
								4,27	
KODE	PENGAMAT	LP 1	LP 2	LP 3	LP 4	LP 5	JUMLAH	RATA-RATA	
S2	a	3	2	6	5	8	24	4,8	
	b	3	3	7	4	7	24	4,8	
	c	2	2	6	4	8	22	4,4	
								4,7	
KODE	PENGAMAT	LP 1	LP 2	LP 3	LP 4	LP 5	JUMLAH	RATA-RATA	
S3	a	2	4	6	5	7	24	4,8	
	b	2	3	6	4	7	22	4,4	
	c	3	2	7	5	8	25	5	
								4,74	

KODE	PENGAMAT	LP 1	LP 2	LP 3	LP 4	LP 5	JUMLAH	RATA-RATA	RATA-RATA TOTAL
S1	a	10	8	3	5	3	29	5,8	5,52
	b	11	7	4	5	2	29	5,8	
	c	12	7	3	4	2	28	5,6	
								5,74	
KODE	PENGAMAT	LP 1	LP 2	LP 3	LP 4	LP 5	JUMLAH	RATA-RATA	
S2	a	11	8	2	4	3	28	5,6	
	b	10	7	4	6	2	29	5,8	
	c	12	8	2	5	2	29	5,8	
								5,74	
KODE	PENGAMAT	LP 1	LP 2	LP 3	LP 4	LP 5	JUMLAH	RATA-RATA	
S3	a	9	7	3	6	2	27	5,4	
	b	8	7	2	4	2	23	4,6	
	c	9	8	3	5	2	27	5,4	
								5,1	

14 Februari 2016

Mengetahui

Pengamat

Pemeriksa



Farah Alvira
NIM. 121610101029

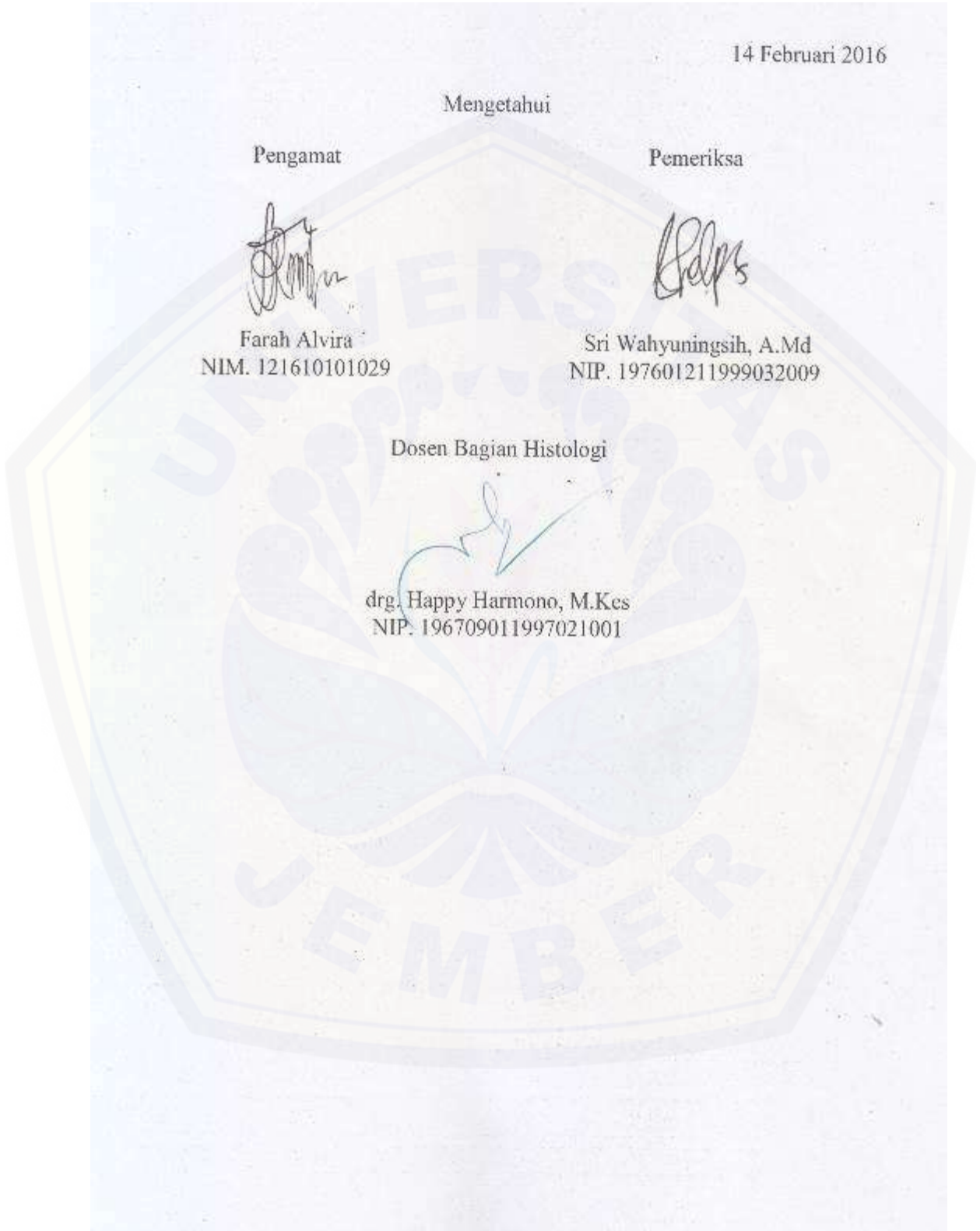


Sri Wahyuningsih, A.Md
NIP. 197601211999032009

Dosen Bagian Histologi



drg. Happy Harmono, M.Kes
NIP. 196709011997021001



Lampiran I. Analisis Data

I.1 Uji Normalitas *Kolmogorov-smirnov*

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Kontrol	Perlakuan
N		3	3
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	4,3111	7,6311
	Std. Deviation	1,38658	1,22626
Most Extreme Differences	Absolute	,241	,346
	Positive	,193	,248
	Negative	-,241	-,346
Kolmogorov-Smirnov Z		,417	,600
Asymp. Sig. (2-tailed)		,995	,865

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

I.2 Uji Homogenitas Levene-Statistik

Descriptives

Rata-rata

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					Kontrol	3		
Perlakuan	3	7,6311	1,22626	,70798	4,5849	10,6773	6,22	8,47
Total	6	5,9711	2,16269	,88292	3,7015	8,2407	2,81	8,47

Test of Homogeneity of Variances

Rata-rata

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,018	1	4	,901

I.3 Uji Independent Sample T Test

T-Test Tekanan antara Kontrol-Perlakuan

Group Statistics

	Kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Rata-rata	Kontrol	3	4,3111	1,38658	,80054
	Perlakuan	3	7,6311	1,22626	,70798

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means		
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)
Rata-rata	Equal variances assumed	,018	,901	-3,107	4	,036
	Equal variances not assumed			-3,107	3,941	,037

Independent Samples Test

		t-test for Equality of Means			
		Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
				Lower	Upper
Rata-rata	Equal variances assumed	-3,32000	1,06869	-6,28717	-,35283
	Equal variances not assumed	-3,32000	1,06869	-6,30474	-,33526

Lampiran J. Alat dan Bahan Penelitian

J.1 Alat Penelitian

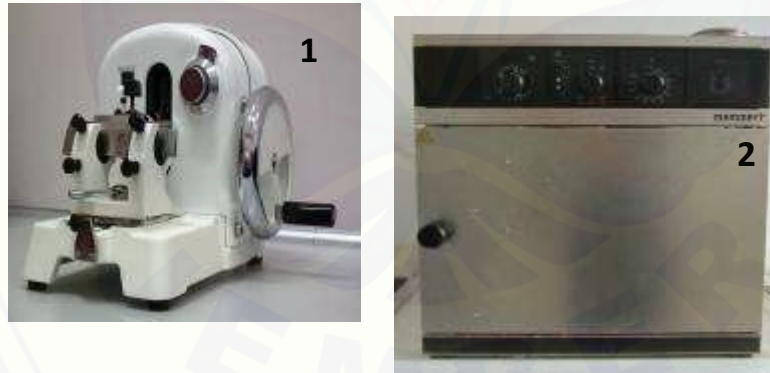
a. Alat pemakaian *Ni-Ti Closed Coil Spring Wire*



Keterangan :

1. *Ni-Ti Closed Coil Spring Wire*
2. Ligature Wire

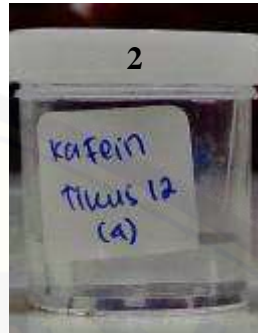
b. Alat Pemrosesan Jaringan dan Pengecatan



Keterangan :

1. Mikrotom
2. Autoclave

J.2 Bahan Penelitian



Keterangan :

1. Glass Ionomer Kaca Tipe IX
2. Seduhan Kafein

Lampiran L. Tahap Pengamatan dan Cara Penghitungan Preparat Histologi

Sebelum dilakukan pembacaan preparat histologis terlebih dahulu memberikan pengarahan (*Breaving*) terhadap 3 pengamat yang berbeda dengan cara:

3. Memberikan penjelasan tentang cara pemakaian mikroskop cahaya binokuler kepada 3 pengamat.
4. Menjelaskan berapa lapang pandang yang akan digunakan dalam penelitian
5. Menjelaskan cara penghitungan variabel yang akan di amati (pembuluh darah) pada 5 lapang pandang yang berbeda.
6. Menjelaskan variabel yang akan diamati (Pembuluh Darah) pada daerah tekanan ligamen periodontal.
7. Dilakukan pemasangan optilab pada mikroskop cahaya binokuler kemudian dilakukan penghitungan pembuluh darah dimulai dari alveolar crest sampai apikal gigi molar tikus.
8. Menggerakkan mikroskop cahaya secara perlahan dari alveolar crest sampai apikal gigi pada 5 lapang pandang. Lapang pandang yang telah dihitung tidak diperbolehkan menghitung kembali.
9. Menghitung jumlah pembuluh darah kapiler ligamen periodontal pada setiap lapang pandang
10. Hasil penghitungan dari 3 pengamat yang berbeda di jumlahkan kemudian dirata-rata